

STRONGAVIDIINI – BIOTIINIA SITOVA
MERISIILESTÄ PERÄISIN OLEVA AVIDIININ
KALTAISEN PROTEIINI

Pro Gradu -tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta
kesäkuu 2009
Katja Vilhelmiina Veneskoski

KIITOKSET

Tämä biotekniikan pro gradun kokeellinen osa tehtiin Tampereen Lääketieteellisen teknologian instituutissa vuosina 2005–2006 prof. Markku Kulomaan tutkimusryhmässä. Haluan kiittää työni mahdollistanutta prof. Markku Kulomaata sekä erityisesti haluan kiittää työni ohjaajaa FM Juha Määttäa loistavasta ja kärsivällisestä kannustuksesta sekä fil. tri Henri Nordlundia hyvistä neuvoista ja ohjeista. Kiitokset kuuluu myös laboratoriomestarille Ulla Kiiskiselle liuosten valmistamisesta sekä teknisistä neuvoista. Lisäksi esitän kiitokset FM Satu Helppolaiselle ja Tiina Paldaniukselle sekä muille tutkimusryhmän jäsenille avusta ja kannustuksesta. Viimeiseksi haluan kiittää myös Seija Veneskoskea ohjeista ja avustuksesta pro graduni viimeistelyssä.

Jyväskylän yliopisto
Pro gradu -tutkielman tiivistelmä
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Tekijä:	Katja Veneskoski
Tutkielman nimi:	Strongavidiini – Biotiinia sitova merisiilestä peräisin oleva avidiinin kaltainen proteiini
English title:	Strongavidin- biotin binding avidin related protein from sea urchin origin
Sivumäärä:	86
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Biotekniikka
Tutkielman ohjaaja(t):	FM Juha Määttä, FT Henri Nordlund
Päivämäärä:	15.6.2009

Avainsanat: avidiini, streptavidiini, avidiini-biotiini teknologia, biotiini, *Strongylocentrotus purpuratus*

TIIVISTELMÄ

Biotiinia eli vitamiinia H suurimmalla luonnossa tavatulla ei-kovalenttisella affiniteetilla sitovaa avidiinia ja sen bakteeriperäistä sukulaisproteiinia streptavidiini käytetään laajasti erilaisissa avidiini-biotiini teknologian sovellutuksissa. Alun perin avidiini löydettiin kananmunan valkuaisesta ja sen rakenne on myöhemmin selvitetty tarkasti. Avidiinilla ja streptavidiinilla on monia hyödyllisiä ominaisuuksia. Avidiinin ja streptavidiinin on havaittu biotiiniin sitouduttuaan olevan erittäin stabiileja proteiineja, jotka kestävät hyvin mm. proteolyttisiä entsyymejä ja ne omaavat voimakkaan lämmönkestävyyden. Yksi avidiini koostuu neljästä samanlaisesta monomeeristä, joista jokainen pystyy sitomaan yhden biotiinimolekyyliin.

Avidiinin ja streptavidiinin käyttämisessä on kuitenkin rajoituksia johtuen niiden farmakokineetikasta ja immunologisista ominaisuuksista. Näihin ongelmiin on pyritty löytämään vastauksia uusista avidiinin kaltaisista proteiineista, jotka ovat erilaisia mm. fysikaalisilta ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan. Avidiinin kaltaisia proteiineja on löydetty mm. bakteereista, lintujen ja matelijoiden munista, merisiilestä sekä viimeisimmäksi sienestä. Näitä proteiineja vertailemalla on havaittu proteiinien olevan varsin konservatiivisia biotiinia sitovalta aminohapposekvenssinsä osalta. Proteiinien ominaisuuksia on tutkittu myös mutaatiolla, jolloin eri aminohapposekvenssejä on siirretty proteiinista toiseen. Näin on pystytty parantamaan monia avidiinin ominaisuuksia kuten esimerkiksi lämmönkestävyyttä, säilyttämällä samalla biotiininsitomiskykyä.

Tässä tutkimuksessa tutkittiin *Strongylocentrotus purpuratus* merisiilen genomista löydetyn geenin koodaaman avidiinin kaltaisen proteiinin, strongavidiinin, ominaisuuksia. *Strongylocentrotus purpuratus* merisiilestä peräisin olevasta viidestä geenistä ainoastaan yhtä onnistuttiin monistamaan ja sen proteiinia tuottamaan. Aikaisemmin merisiilestä löydettyjen fibropelliinien, jotka myös ovat avidiinin kaltaisia proteiineja, ei ole havaittu sitovan biotiinia. Strongavidiinin kuitenkin havaittiin sitovan voimakkaasti biotiinia.

Strongavidiinia onnistuttiin tuottamaan *E. coli* bakteerissa ja puhdistamaan 2-iminobiotiinikolumnilla. Strongavidiinin havaittiin muistuttavan avidiinia rakenteeltaan sekä monilta ominaisuuksiltaan, kuten biotiinin sitomiskyvyltään. Biotiinin sitomiskyky varmistettiin ITC-mittauksilla (Isothermal titration calorimetry). Proteiinin muita ominaisuuksia tutkittiin SDS-PAGE:n, ELISA:n ja immunoblottauksen sekä Dot-blottauksen avulla. Strongavidiinin isoelektrisen pisteen voitiin havaita eroavan avidiinin ja streptavidiinin isoelektrisestä pisteestä. Erittäin matala isoelektrinen piste aiheutti mm. sen, että immunoblottausta ei saatu suoritettua strongavidiinille. Strongavidiinin matala isoelektrinen piste (3,91) näytti aiheuttavan monessa vaiheessa mittausongelmia.

Lämpökäsitellyissä näytteissä biotiinin sitoutumisen strongavidiinin havaittiin nostavan strongavidiinin lämmönkestävyyttä. Sitoutumattomassa muodossaan lämmönkestävyys näytti heikommalta kuin avidiinin ja streptavidiinin lämmönkestävyys.

Strongavidiinilla näyttää esiintyvän ristiinreagoimista avidiinin ja streptavidiinin vasta-aineiden kanssa Dot-bolttauksella suoritettuna sekä ELISA-mittauksissa. Strongavidiinilla on kolme kysteiniitähdettä ja kaksi näistä saattaa muodostaa monomeerien sisäisiä rikkisilloja samalla tavoin kuin avidiinin monomeereissä. SDS-PAGElla ilman β -merkaptetanolin pelkistävää vaikutusta suoritetuissa kokeissa, strongavidiini esiintyi osittain tetrameerisessä muodossa. Tämä viittaa siihen, että strongavidiini muodostaa myös alayksiköiden välisiä rikkisilloja.

Author: Katja Veneskoski
Title of thesis: Strongavidin- biotin binding avidin related protein from sea urchin origin
Finnish title: Strongavidiini – Biotiinia sitova merisiilestä peräisin oleva avidiinin kaltainen proteiini
Pages: 86
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Biotechnology
Supervisor(s): FM Juha Määttä, FT Henri Nordlund
Date: 15.6.2009

Key words: avidin, streptavidin, avidin-biotin technology, *Strongylocentrotus purpuratus*

ABSTRACT

Avidin and its bacterial analogue streptavidin, which both bind to the vitamin biotin with the highest affinity for non-covalent interactions found in nature, are widely used tools in numerous applications in (strept)avidin-biotin technology. Avidin was first extracted from chicken egg white and its structure is well known. Avidin and streptavidin have many useful characteristics. They are very stable proteins, especially when bound to biotin. Avidin and streptavidin are resistant to proteolytic enzymes and they have high thermal stability. Avidin contains four identical avidin monomers, which each bind one biotin molecule.

Although, avidin and streptavidin have become widely used tools in the life sciences, their pharmacokinetics and immunological defectiveness is limiting this use. These problems have led to search of new biotin binding proteins with different physical and chemical properties. Avidin-like proteins have been found for example in bacteria, bird and reptile eggs, sea urchin and recently in mushrooms. Compared to avidin, avidin-like proteins have very conserved amino acid sequence in their biotin-binding site. Characterization of avidin and proteins similar to avidin has been conducted using other avidin-like proteins as templates in mutations. Modifications have enhanced many properties in avidin, like thermal stability, without affecting biotin binding ability.

In present study avidin-like protein, named Strongavidin, encoded by a genome sequence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* was characterized. Only one gene from original five genes encoding avidin-like proteins from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* produced successfully. Previously discovered avidin-like fibropellins from the sea urchin did not bind to biotin. However, strongavidin was found to bind strongly to biotin.

Strongavidin was produced in *E. coli* bacteria and purified with 2-iminobiotin column. Strongavidin resembles avidin by its structure and many characteristics, including biotin binding ability. Biotin binding capability was verified with Isothermal titration calorimetry (ITC) analysis. Characterization of strongavidin included also SDS-PAGE, ELISA, immunoblotting and Dot-blotting procedures. Strongavidin diverges from avidin and streptavidin by its isoelectric point. Due to low isoelectric point, we were not able to perform immunoblotting to strongavidin. In many procedures, low isoelectric point (3,91) of strongavidin appeared to cause problems.

In heat treatment SDS-PAGE assay strongavidin showed increased thermal stability when bound to biotin. Furthermore, in the absence of biotin strongavidin seems to have lower thermal stability than avidin and streptavidin.

In cross reactivity analysis conducted with Dot-blotting and ELISA assay with avidin and streptavidin antibodies, some cross-reactivity was observed with strongavidin. Strongavidin has three cysteine residues and two of them, according to the known avidin structure, could form an intramonomeric disulfide bridge. Additionally, tetrameric forms were observed in the SDS-PAGE samples boiled in reducing condition in the absence of β -mercaptoethanol, indicating that strongavidin does have intermonomeric bridges.

SISÄLLYS

1. JOHDANTO	9
1.1 AVIDIINI JA BIOTIINI.....	9
1.1.1 Avidiinin rakenne	10
1.1.2 Biotiinin rakenne	11
1.1.3 Biotiinin sitoutuminen avidiiniin.....	11
1.2 AVIDIININ KALTAISET PROTEIINIT	12
1.2.1 AVR-proteiinit	12
1.2.2 Streptavidini	13
1.2.3 Fibropelliinit.....	14
1.2.4 Bradavidini	14
1.2.5 Rhizavidini	15
1.2.6 Tamavidini	15
1.2.7 Muut biotiinia sitovat proteiinit.....	15
1.3 BIOTIININ METABOLIA JA HÄIRIÖT AINEENVAIHDUNNASSA.....	16
1.3.1 Biotiinin toiminta metaboliassa	17
1.3.2 Biotinidaasin puutos	19
1.3.3 Holokarboksylaasipuutos	19
1.3.4 Biotiini-riippuvainen basaali gangliotauti	20
1.3.5 Biotiinin osallistuminen transkriptioon	21
1.4 (STREPT)AVIDIINI-BIOTIINI TEKNOLOGIA.....	21
2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	28
3. AINEISTO JA MENETELMÄT	29
3.1 AVIDIININ KALTAISEN REKOMBINANTTI DNA:N RAKENTAMINEN	29
3.1.1 Proteiinia koodaavan geenin sisältävän plasmidin monistaminen.....	29
3.1.2 Bakteeriperäisen OmpA signaalsekvenssin rakentaminen PCR:n avulla	30
3.1.3 Vektorin valmistus ohjaavan TOPO [®] kloonauksen avulla.....	32
3.1.4 Plasmidin tarkistussekvensointi.....	33
3.2 PROTEIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTAMINEN	35
3.2.1 Proteiinin tuottaminen Escherichia coli soluissa	35
3.2.2 Proteiinin puhdistus 2-iminobiotiiniagaroosilla	36
3.3 STRONGAVIDIININ KARAKTERISOINTI	37
3.3.1 SDS-PAGE.....	37
3.3.2 Coomassie- värjäys	38

3.3.3 Immunoblottaus.....	38
3.3.4 Dot- blottaus	39
3.3.5 Lämpöstabiilisuuskokeet	40
3.3.6 Proteiini biotiininsitomiskyvyn määrittäminen ITC-menetelmällä	41
3.3.7 ELISA-analyysit.....	43
3.4 PROTEIININ TEOREETTINEN TARKASTELU	44
4 TULOKSET	45
4.1 AVIDIININ KALTAISEN REKOMBINANTTISEN DNA:N RAKENTAMINEN	45
4.1.1 Proteiinia koodaavan geenin sisältävän plasmidin monistaminen.....	45
4.1.2 Bakteeriperäisen OmpA signaalisekvenssin rakentaminen PCR:n avulla	45
4.1.3 Vektorin valmistus ohjaavan TOPO [®] kloonauksen avulla.....	47
4.1.4 Plasmidin tarkistussekvensointi.....	47
4.2 PROTEIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTAMINEN	47
4.2.1 Proteiinin tuottaminen <i>Escherichia coli</i> soluissa.....	47
4.2.2 Proteiinin puhdistus	48
4.2.3 SDS-PAGE ilman β-merkaptotetanolia	50
4.2.4 Immunoblottaus.....	51
4.2.5 Dot- blottaus	52
4.2.6 Lämpöstabiilisuuskokeet	53
4.2.7 Proteiini biotiininsitomiskyvyn määrittäminen ITC- laitteella	55
4.2.8 ELISA-analyysit.....	60
4.3 PROTEIININ TEOREETTINEN TARKASTELU	61
5. TULOSTEN TARKASTELU	64
5.1 AVIDIININ KALTAISEN REKOMBINANTTISEN DNA:N RAKENTAMINEN	64
5.2 PROTEIININ TUOTTAMINEN JA PUHDISTAMINEN	65
5.3 PROTEIININ KARAKTERISOINTI.....	67
5.3.1 SDS-PAGE alayksiköiden välisten rikkisiltojen selvittämiseksi.....	67
5.3.2 Lämpöstabilisuuden määrittäminen.....	68
5.3.3 Strongavidiinin biotiinin sitomiskyky	70
5.3.4 Strongavidiinin immunologiset ominaisuudet.....	73
LÄHTEET	75
LIITTEET	81
LIITE I. TYÖSSÄ KÄYTETYT ALUKKEET JA PCR-OHJELMAT.....	81
LIITE II. TYÖSSÄ KÄYTETYN Pet101/D-TOPO VEKTORIN KARTTA JA POLYLINKKERI	82
LIITE III. LIUOKSET JA REAGENSIT.....	84

KÄYTETYT LYHENTEET

A	absorbanssi
ACC	asetyyli-CoA karboksylaasi
amp	ampisilliini
AP	alkalinen fosfataasi (engl. alkaline phosphatase)
AVD	avidini proteiini (engl. avidin)
ARV	avidinin kaltainen proteiini (engl. avidin related protein)
BBP	biotiinia sitova proteiini (engl. biotin binding protein)
bp	emäspari (engl. base pair)
BGD	basaaligangliotauti
BBGD	biotiini riippuvainen basaaligangliotauti
BSA	naudan seerumin proteiini (engl. bovine serumalbumin)
BSO	D-biotiini D-sulfoksidi
BTN	biotiini
cal	kalori (engl. calory)
cDNA	komplementtaarinen DNA (engl.complementary DNA)
CEA	karsinoembryonaalinen antigeeni
CoA	koentsyymi A (engl. coenzyme A)
dNTP	deoksinukleotiditriofosfaatti (engl. deoxyribonucleotide triphosphate)
DOTA	engl. tetra –azacyclododecanetetra acetic acid
ELISA	entsyymi-immunomääritys (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
G	g-voima = RCF (engl. Relative centrifugal force)
GAR-AP	engl. Goat anti-Mouse alkaline phosphatase
HCG	holokarboksylaasi syntaasi geeni (engl. holocarboksylase syntase gene)
HCS	holokarboksylaasi syntaasi entsyymi (engl. holocarboksylase syntase)
HeLa	cervical cancer cells
HPLC	korkeapaineliuoskromatografia (engl. High Pressure Liquid Cromatography)
Ig	immunoglobuliini
ITC	isoterminen titraatio kalorimetri (engl. isothermal titration calorimetry)
K _D	dissosiaatiovakio
kDA	kilodaltoni
LB	kasvatusmedium (Luria-Bertami)
MCC	β-metyylikrotonyyli-CoA
OD	optinen tiheys (engl. optical density)
OmpA	bakteriaalinen <i>Bordetella avium</i> signaalisekvenssi
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
PBS	fosfaattipuskuri (engl. phosphate buffered saline)
PC	puryvaatti karboksylaasi
PCC	propionyyli-CoA karboksylaasi
PCR	polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)
pI	isoelektrinen piste
rpm	kierrosta minuutissa (engl. rounds per minute)
RT	huoneenlämpötila (engl. room temperature)
SA	streptavidiini proteiini
SDS	natriumdodekyylisulfaatti (engl. sodium dodecyl sulfate)
SES	sekvenssin asteittainen pidentäminen (engl. stepwise elongation of sequence)

S.O.C	optimoitu kasvatusliuos, lisätty glukoosia (engl. SOB=super Optimal Broth, catabolite repression)
SS	signaalisekvenssi
TBS	Trispuuskuri (engl. tris buffered saline)
tet	tetrasykliini
UV	ultravioletti
V	voltti
Vis	visuaalinen

1. JOHDANTO

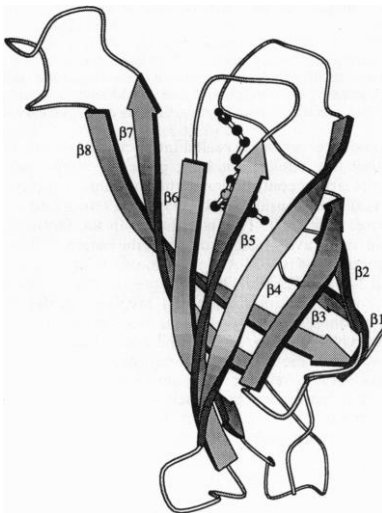
1.1 Avidiini ja biotiini

Avidiini on yksi kananmunan (*Gallus gallus*) valkuaisessa esiintyvistä proteiineista. Sen alkuperä paljastui, kun rotille syötettiin kuivattua kananmunan valkuaisista ainoana proteiinin lähteenä (Boas, 1927). Rotilla ilmeni epätyypillistä dermatiittia, joka myöhemmin johti H-vitamiinin tunnistamiseen (György ym., 1940). Avidiiniaktiivisuutta on löydetty munista ja munanjohtimista monilla lintulajeilla sekä sammakon kudusta, joissa avidiini muodostaa 0,05 % proteiinien kokonaismäärästä (Green, 1975). Avidiinin on arveltu suojaavan kehittyvää kanan alkioita bakteeri-infektioilta (Tuohimaa ym. 1989). Tätä arvelua tukee myös avidiinin kaltaisen proteiinin, streptavidinin, löytyminen *Streptomyces* viljelmistä. Huomattiin, että viljelmien suodoksissa oleva aktiivisuus gram-negatiivisia bakteereita kohtaan johtuu streptavidinin biotiinin sitomiskyvystä (Chaiet ym., 1963). Avidiinin tuotto tapahtuu pikarisoluissa munajohtimen epiteelissä (Kohler ym., 1968) ja sen tuottoa säädellään progesteroni hormonin avulla (Hertz ym., 1949).

Biotiini eli H-vitamiini on pieni vesiliukoinen molekyyli (molekyylipaino 244,31 g/mol), jolla tärkeä osa erilaisissa solun toiminnoissa. Biotiinin aktiivisen muodon, D-biotiinin, kiinnittyminen eli biotinylointi säätelee monien solun metaboliaan osallistuvien entsyymien toimintaa (Green, 1975, McMahan, 2002). Nisäkkäät eivät pysty syntetisoimaan biotiinia, vaan sitä syntetisoi suolistossa mikro-organismien toiminnan seurauksena. Myös kasveilla on kyky syntetisoida biotiinia. Biotiinin suositeltava päiväannos vaihtelee 30–100 µg/päivä välillä (McMahan, 2002). Biotiinia lisätään moniin lisäravinteisiin, jotta sitä saataisiin tarpeeksi. Näin siksi, koska esimerkiksi tupakoinnin on todettu lisäävän biotiinin kataboliaa, kuten myös monien muiden ravintoaineiden pilkkoutumista (Sealey ym., 2004). Biotiini toimii koentsyyminä ja katalysoi monenlaisia karboksylaatiotapahtumia (Chapman-Smith ym., 1999). Biotiinin puutos aiheuttaa mm. monenlaisia iho- (dermatiitti) ja kynsiongelmia, karboksylaasien puutosta sekä rasva-aineenvaihdunnan häiriöitä (Mock ym., 1988, No authors listed: Biotin 2007).

1.1.1 Avidiinin rakenne

Avidiini on tetrameerinen proteiini, joka koostuu neljästä pohjimmiltaan identtisestä 128 amonihapon mittaisesta alayksiköstä (Kuva 1.1). Avidiinin alayksikössä on kaksi kysteiniinjäännettä, joiden täytyy muodostaa ketjun sisäinen rikkisilta, koska avidiini on voitu jakaa alayksiköihin ilman pelkistävää vaikutusta (esim. β -merkaptotetanolia) (DeLange ja Huang, 1971). Tetrameerin molekyylipaino on 63kDa (Green, 1975). Avidiinin alayksikön molekyylipaino on 15,6 kDa. Avidiinin rakenteessa on havaittu vaihtelua mannoositähteiden (4-6 mannoositähdettä) määrän osalta. Jokaisessa alayksikössä on kaksi metioniinjäännettä. Alayksiköiden identtisyys todettiin eristämällä kolme syaanibromidipeptidiä. Ensimmäinen oli 18-aminohappojäänteiden peptidi NH_2 terminaalipäästä, toinen oli 78-aminohappojäänteiden peptidi keskeltä ja kolmas oli 32-aminohappojäänteiden peptidi COOH terminaalipäästä (neljäs koostui kahdesta ensimmäisestä peptidistä). Mikäli alayksiköt olisivat epäidenttisiä, olisi sekvensoinnissa pitänyt löytyä syaanibromidipeptideitä enemmän kuin kolme perustuen metioniinjäännteisiin jokaisessa alayksikössä (DeLange, 1970). Avidiinin alayksikkö muodostuu kahdeksasta antiparalleelista β -juosteesta, joita yhdistää kuusi ulkonevaa silmukkaa. Juosteet muodostavat klassisen β -tynnyrirakenteen (Kuva 1.1.) (Livnah ym., 1993).



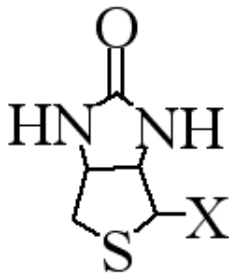
Kuva 1.1. Avidiinin monomeeri. β -juosteet on merkitty nuolilla ja biotiini on sitoutuneena sitoutumistaskuun (Livnah ym. 1993).

Avidiinin isoelektrinen piste (pI) on noin pH arvossa 10 (eli tällöin proteiinilla ei ole nettovarausta) eli se on emäksinen glykoproteiini. Avidiini on stabiili laajalla pH- ja

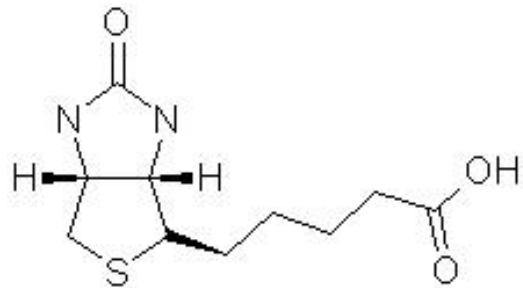
lämpötila-alueella ja sen on havaittu olevan stabiili proteolyttisiä entsyymejä vastaan (Green, 1975).

1.1.2 Biotiinin rakenne

Biotiini on rikkiä sisältävä orgaaninen happo, jonka kemiallinen kaava on $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ (Du Vigneaud ym., 1942). Biotiinin kemiallinen rakenne selvitettiin jo 1940-luvulla. Se on kaksoisrengas rakenteinen heterosyklinen yhdiste, jonka toinen rengas sisältää ureido ryhmän (-N-CO-N-) ja toinen rikki atomin (Kuvat 1.2 ja 1.3). Luonnossa esiintyy ainoastaan yhtä stereoisomeeriä, entsyymaattisesti aktiivista d-(+)-biotiniä (kirjallisuudessa D-biotiini nimellä), kahdeksasta mahdollisesta isomeerimuodosta. (No authors listed: Biotin, 2007).



Kuva 1.2. Biotiinin rakenne



Kuva 1.3. D-biotiinin rakenne (Malli kuvaan otettu Pugliese ym. 1993)

1.1.3 Biotiinin sitoutuminen avidiiniin

Biotiinin sitoutuminen avidiiniin on voimakkain luonnossa tunnettu ei-kovalenttinen proteiinin ja ligandin välinen sidoks. Sidoksen dissosiaatiovakioksi K_D on määritetty noin $10^{-15}M$ (Green 1963, 1975). Avidiini-tyynyriin toisen pään polaariset ja aromaattiset aminohappotähteet ovat täydellisesti järjestäytyneitä biotiinin sitoutumisen kannalta. Kun biotiini sitoutuu avidiiniin, se syrjäyttää biotiinimolekyylin muotoon järjestäytyneet liuosmolekyylit (esim. viisi vesimolekyyliä), jonka jälkeen $\beta 3$ -juosteen ja $\beta 4$ -juosteen yhdistävä silmukka lukitsee biotiinin sitoutumistaskuun. Sitoutumisessa $\beta 3$ - ja $\beta 4$ -juosteessa tapahtuu konformaationaalisia muutoksia. Biotiinin sitomiseen osallistuu viisi hydrofobista aminohappotähdettä, jotka ovat Trp-70, Phe-72, Phe-79, Trp-97 yhdestä monomeeristä sekä Trp-110 viereisestä monomeeristä. Trp-110 muuttuu rakenteeltaan jäykäksi sitoutumistapahtumassa ja muodostaa kannen biotiinin sitoutumistaskulle.

Hydrofobisten sitoutumisten lisäksi tapahtuu hydrofiilisiä reaktioita. Biotiinin ureidorenkaan (-N-CO-N-) heteroatomit muodostavat vetysidoksia polaaristen aminohappotähteiden sivuketjujen kanssa. Ureidorenkaan happi puolestaan muodostaa kolme vetysidosta aminohappotähteiden Asn-12, Ser-16 ja Tyr-33 kanssa muodostaen tetrahedraalisen anionin. Renkaan tyypet muodostavat kumpikin yhden vetysidoksen aminohappotähteiden Thr-35 ja Asn-118 kanssa. Rikki saattaa reagoida Thr-77 aminohappotähteen kanssa. Karboksylaatin kaksi happea muodostaa viisi vetysidosta. Toinen niistä sitoutuu pääketjuun aminohappotähteistä Ala-39 ja Thr-40 sekä sivuketjuun Thr-38 tähteestä. Nämä aminohappotähteet muodostavat osan silmukkaa, joka stabiloituu, kun biotiini on sitoutuneena. Toinen happi atomi puolestaan muodostaa vetysidokset tähteiden Ser-73 ja Ser-75 kanssa (Livnah, 1993; Wilchek ja Bayer, 1999).

Avidiini-biotiini-kompleksin kestävydestä ja sitoutumisen vahvuudesta kertoo se, että kompleksi ei hajoa proteolyyttisten entsyymien toimesta edes ruuansulatusjärjestelmässä. Avidiinin biotiinin sitomiskyky ei häviä pH arvoalueelle 2-13. Sitomiskyvyn menetys johtuu pääasiassa avidiinin denaturaatiosta (Green 1975).

1.2 Avidiinin kaltaiset proteiinit

Avidiinin lisäksi on löydetty useita spesifisesti biotiinia sitovia proteiineja, jotka muistattavat avidiinia rakenteellisesti ja toiminnallisesti. Avidiinin lisäksi tunnetuin biotiinia sitova proteiini on streptavidini. Näiden kahden proteiinin rakennetta, biotiinin sitomiskykyä ja ominaisuuksia on tutkittu eniten ja niiden käytöstä avidiini-biotiini teknologiassa on saatu kokemuksia jo vuosien ajalta (Wilchek ja Bayer, 1999).

1.2.1 AVR-proteiinit

Avidiinille on löydetty seitsemän sukulaisgeeniä kanasta. Näitä kutsutaan avidiinin kaltaisiksi proteiineiksi (AVR) ja niiden määrä vaihtelee lintuyksilöiden välillä (Keinänen ym. 1988, Keinänen ym. 1994 ja Ahlroth ym. 2000). AVR-proteiinit ovat aminohapposekvenssiltään 85-100% identtisiä toisiinsa nähden ja 74-81% identtisiä avidiinin kanssa. Samankaltaisuudesta riippumatta esim. AVR-proteiinit 1, 6 ja 7 ovat pI arvoltaan neutraaleja, AVR-proteiini 2 on pI arvoltaan hapan (pI n. 5) ja AVR-proteiinit 3

ja 4/5 ovat pI arvoltaan avidiinia lähimpänä (pI n. 10). Kuitenkin AVR-proteiineilla näyttää olevan kyky sitoa biotiinia. On mahdollista, että AVR-proteiinit parantavat kanan mahdollisuutta puolustautua mikro-organismeja vastaan lisäämällä vaihtelevuutta biotiinia sitoviin proteiineihin (Laitinen ym. 2002).

1.2.2 Streptavidini

Avidiinin vastine streptavidini löydettiin vahingossa bakteerista *Streptomyces avidinii* etsittäessä mahdollisia uusia antibiootteja bakteeriskriinuksella (Chaiet 1963). Streptavidini esiintyy lopullisessa muodossaan 125–127 aminohapon mittaisena proteiinina (Pähler ym. 1987, Bayer ym 1989). Streptavidiinilla on 30 % identtisyys avidiinin kanssa ja 40 % samankaltaisuus. Homologiselta osaltaan kuitenkin identtisyys on 64 % ja samankaltaisuus 74 % ja näiden alueiden ulkopuolella vastaavat luvut ovat 7%:a ja 17%:a. Streptavidiinin ja avidiinin laskostuminen muistuttavat toisiaan suuresti. Molempien monomeerit muodostuvat kahdeksanjuosteisesta β -tynnyristä, joiden suurimmat erot ovat silmukoiden muodoissa. Monomeerien 1–2 ja 1–4 vuorovaikutukset ovat avidiinilla ja streptavidiinilla hyvin samankaltaiset, mutta monomeerien 1–3 vuorovaikutukset eroavat toisistaan. Avidiinilla näiden monomeerien vuorovaikutus johtuu yksistään van der Waalsin voimista, kun taas streptavidiinilla vuorovaikutukseen osallistuu vetysidoksia (Livnah ym. 1993a).

Streptavidiinilla on hieman avidiinia matalampi kyky sitoa biotiinia, joka saattaa johtua pienistä eroista biotiinin sitomisalueella, kuten silmukan pituus β -juosteiden 3 ja 4 välillä (Green 1990). Streptavidiinin pI arvo on hieman hapan verrattuna avidiiniin ja siltä puuttuu hiilihydraattiketju (Green 1975). Streptavidiinilta puuttuu monomeerin sisäiset rikkisillat, koska sillä ei ole kysteiini aminohappotähteitä. Avidiinilla nämä kysteiinitähteet ovat aminohappotähteiden 4 ja 83 välillä (Argana ym. 1986, DeLange ym. 1971).

*Streptomyces avidinii*in lisäksi muutamista muista bakteereista on löydetty streptavidiniä muistuttavia proteiineja. Streptavidiineiksi v1 ja v2 nimetyt proteiinit löydettiin *S. venezuelae* bakteerista (Bayer ym. 1995).

1.2.3 Fibropelliinit

Merisiilen, *Strongylocentrotus purpuratus*, alkiota ympäröi sen kehityksen aikana apikaalinen lamina eli hyaliini kerros. Tämän laminan muodostavat fibropelliinit, jotka ovat glykoproteiineja ja ne sijaisevat geeneissä SpEGF I ja SpEGF III. Fibropelliinien muodostama verkkomainen rakenne toimii alustana epiteelisolujen kiinnittymiselle niiden kehittyessä ja liikkeessa gastrulaation eli alkiolevyn erilaistumisen aikana (Bisgrove ym. 1991, 1993).

Fibropelliinit kuuluvat EGF-proteiineihin (epidermal growth factor) ja ne koostuvat 482 aminohaposta. Fibropelliineissa on aminotermiinalinen EGF osa ja C-termiinalinen osa. Aminotermiinalisessa päässä sijaitsee signaaliptidi, jonka jälkeen seuraa EGF:n kaltaisia alueita. C-termiinalinen osa koostuu 129 aminohaposta ja sen on todettu muistuttavan avidiinia ja streptavidiinia primäärirakenteeltaan niin paljon, että sen perusteella avidiinin kaltaisen osan on kuviteltu pystyvän sitomaan biotiinia. Fibropelliinien avidiinin kaltainen alue on konservoitunutta mahdollisilta biotiinia sitovilta alueiltaan suhteessa avidiiniin (Delgadillo-Reynoso ym. 1989, Hunt ym. 1989).

Fibropelliinien avidiinin kaltaisilta alueilta puuttuu kuitenkin biotiinin sitomiskyky. Biotiinia sitovilla alueilla avidiinin ja streptavidiinin seriini, joka muodostaa vetysidoksen biotiinin ureido renkaassa sijaitsevan hiilen kanssa, on korvautunut fibropelliineissa aspartaattihapolla. Kuitenkin myös aspartaattihappo pystyy muodostamaan vetysidoksia. Biotiininsitomiskyvyn puuttuminen johtuukin todennäköisesti kahden tryptofaanin korvautumisesta arginiinillä ja lysiinillä. Mikäli avidiinin ja streptavidiinin tryptofaanit muutetaan fibropelliinien kaltaisiksi, eivät nämä mutatoituneet muodot sido biotiiniä. (Laitinen ym. 1999).

1.2.4 Bradavidiini

Hiljattain myös genomien skriinaus projektissa löydettiin (strept)avidiinia muistuttava proteiini bakteerilajista *Bradyrhizobium japonicum* jonka on todettu olevan biotiinia sitova proteiini. Bradavidiini on aminohapposekvenssiltään 30 % identtinen avidiinin kanssa, eikä

sillä näytä olevan merkittävää ristiinreagoimista polyklonaalisten (strept)avidini potilasseerumien vasta-aineiden kanssa (Kaneko ym. 2002, Nordlund ym., 2005).

1.2.5 Rhizavidiini

Ensimmäinen löydetty avidiinin kaltainen dimeeri proteiini on *Rhizobium etli* bakteerista löytynyt Rhizavidiini. *Rhizobia*-bakteerit muodostavat symbioosisuhteen isäntäkasvin kanssa osallistumalla sen typpiaineenvaihduntaan. Rhizavidiinilla on 20–30 % samankaltaisuus muihin tunnettuihin avidiinin kaltaisiin proteiineihin. Rhizavidiinilla ei havaittu huomattavaa ristiinreagoimista avidiinia tai streptavidiinia saaneiden potilaiden seerumin vasta-aineiden kanssa. Sen lämmönkestävyys on avidiinia pienempi, mutta samankaltainen streptavidiinin kanssa (Helppolainen ym. 2007).

1.2.6 Tamavidiini

Viimeisin löydös avidiini-perheeseen on *Pleurotus cornucopiae* sienestä löydetty avidiinin kaltaiset proteiinit tamavidiini 1 ja tamavidiini 2. Tamavidiinit ovat tetrameerisiä avidiinin kaltaisia proteiineja, joilla on 31 % ja 36 % samankaltaisuus avidiinin ja 47 % ja 48 % samankaltaisuus streptavidiinin kanssa. Tamavidiini 2 eroaa avidiinista ja streptavidiinista immunologisilta ominaisuuksiltaan ja se on avidiinia ja streptavidiinia kestävämpi korkeissa lämpötiloissa. Tamavidiinin 2 epäspesifinen sitoutuminen DNA:han on avidiinia pienempää, joten se saattaa osoittautua hyödylliseksi tutkimuskohteeksi avidiini-biotiinitekniikan alueella (Takakura ym., 2009).

1.2.7 Muut biotiinia sitovat proteiinit

Munankeltuaisesta on löydetty avidiinin lisäksi kaksi biotiinia sitovaa proteiinia BBP-I ja BBP-II (Biotin binding protein) (White ym. 1987). Munankeltuaisen biotiinia sitova proteiini on tetrameerinen proteiini, jonka alayksiköt ovat identtisiä. BBP-proteiinit eroavat avidiinista mm. isoelektriseltä pisteeltään (pI on 4,6), aminohapporakenteeltaan sekä BBP-proteiinin NH₂-terminaalinen aminohappo on valiini, kun se avidiinilla on alaniini. Munankeltuaisen ja -valkuaisen biotiinia sitovat proteiinit ovat eri geenien tuotteita, kun taas monet munankeltuaisen ja -valkuaisen samankaltaiset proteiinit esim. riboflaviinia

sitova proteiini on yhden saman geenin tuotos riippumatta siitä, onko se valkuaisessa vai keltuaisessa (White ym. 1976, Meslar ym. 1978).

BBP-proteiineja syntetisoidaan munimisen aikana, jolloin niiden syntetisoimista säätelevät estrogeenit. Näiden proteiinien syntetisoimista säätelee myös biotiinin konsentraatio plasmassa, joka taas on riippuvainen biotiinin saatavuudesta ruokavaliosta. BBP-II proteiinin tuotto näyttää olevan riippuvaisempi biotiinin konsentraatiosta plasmassa kuin BBP-I proteiinin. Biotiinin konsentraatio keltuaisessa on 20-kertaa suurempi kuin plasmassa. Tämä suhde vaihtelee kuitenkin välillä 3–30 riippuen biotiinin saatavuudesta ruokavaliosta. Koska biotiinin määrä munankeltuaisessa ei korreloi lineaarisessa suhteessa konsentraatioon plasmassa, biotiini ei liiku vapaasti plasman ja keltuaisen välillä, vaan biotiinin siirtyminen plasmasta keltuaisen vaatii oman kuljetusmekanismin. BBP-proteiinit sitovat biotiinia plasmasta ja niiden arvellaankin vastaavan biotiinin kuljettamisesta plasman ja munankeltuaisen välillä (White ym. 1987).

Avidiini-perheeseen on löytynyt myös biotiinia sitova proteiini BBP-A. Biokemiallisen karakterisoinnin perusteella se näyttää olevan eri proteiini kuin BBP-I tai BBP-II. BBP-A sitoo myös D-biotiini D-sulfoksidia (BSO). BBP-A proteiini näyttää muuttavan biotiinin itse BSO:ksi toistaiseksi tuntemattomalla katalyyttisellä mekanismilla (Hytönen ym. 2007).

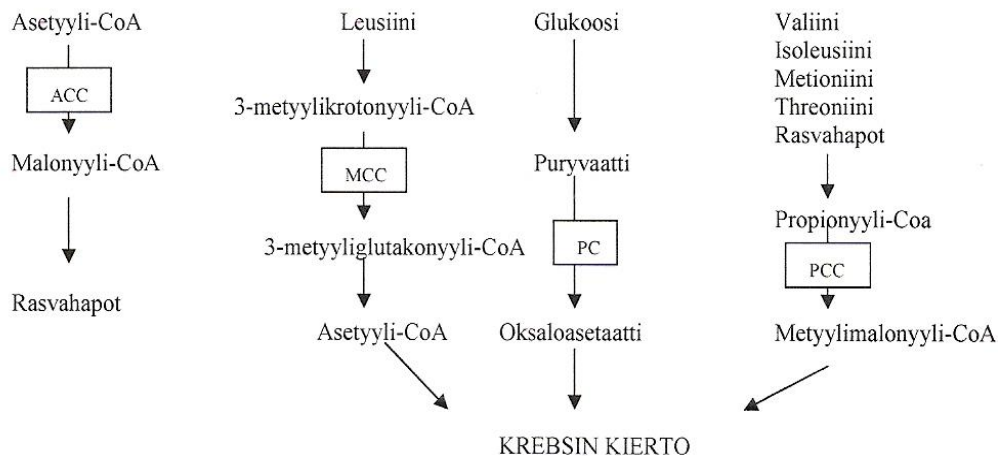
1.3 Biotiinin metabolia ja häiriöt aineenvaihdunnassa

Mikro-organismit sekä kasvit kykenevät syntetisoimaan biotiinia, kun taas eläimiltä puuttuu tämä kyky. Näin ollen eläinten tarvitseman biotiinin syntetisoi joko suolen normaalifloora tai biotiini on saatava ruuan mukana. Ruuasta saatu biotiini esiintyy joko kovalenttisesti sitoutuneena polypeptideihin lysiinitähteen kautta tai vapaana biotiinina. Sitoutuneen biotiinin vapauttaminen tapahtuu ruoansulatuskanavan proteaasien sekä oletettavasti biotinidaasin avulla (McMahon 2002). Suolessa tuotetulla, mikrobien syntetisoimalla biotiinilla näyttää olevan vähäinen merkitys elimistön kokonaisbiotini määrään. Kontrolloiduissa tutkimuksissa sikojen suoleen lisättiin infuusiolla avidiinia. Sioille annettiin myös oraalisesti antibioottia estämään mikrobikasvustoa tai laktuloosia ruokkimaan mikrobikasvustoa. Kokeessa plasman

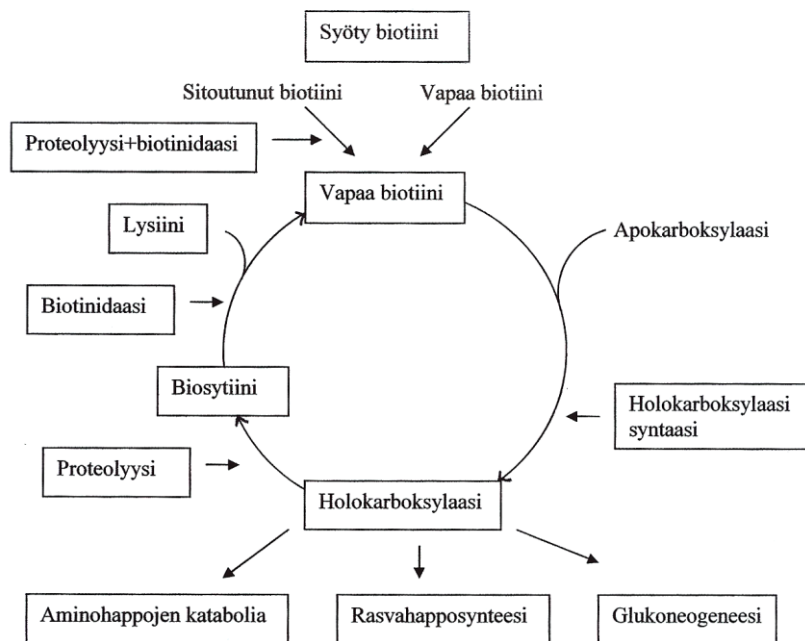
biotiinikonsentraation olisi pitänyt pudota, mikäli suolessa muodostuvalla biotiinilla olisi merkitystä elimistön kokonaisbiotiinimäärään. Kokeessa ei kuitenkaan saatu merkittäviä muutoksia plasman tai virtsan biotiinikonsentraatioon. Avidiinin infuusiota seurasi ulosteen biotiinimäärän merkittävä nousu. Vaikka endogeenisesti tuotetun biotiinin määrä oli huomattava, syy sen vähäiseen merkitykseen biotiinin kokonaistasossa saattaa olla synteessin tapahtuminen imeytymiselle mahdottomassa kohdassa suolistoa (Scholtissek ym. 1990). Sioilla tehdyt kokeet osoittavat myös, että oraalisesti syötetty biotiini erittyy imeytymisen jälkeen virtsaan eikä ulosteeseen. Biotiinin infuusio kekumiin osoitti, että biotiinia erittyy sekä virtsaan että ulosteeseen, joten ainakin osa biotiinista imeytyy kekumista (Kopinski ym. 1989).

1.3.1 Biotiinin toiminta metaboliassa

Biotiini toimii kofaktorina entsyymeille, jotka tunnetaan biotiini-riippuvaisina karboksylaaseina. Biotiini toimii karboksylaatioreaktioissa karboksyyli-ryhmän välittäjänä luovuttajan ja saajan välillä. Biotiinin kovalenttista sitoutumista apoentsyymien katalysoi holokarboksylaasi syntaasi entsyymi (HCS) (ks. kirjallisuuskatsaus Pacheco-Alvarez ym. 2002). Energia tähän kaksivaiheiseen reaktioon saadaan adenosinitrifosfaatilta (Burri ym. 1981). Biotiini-riippuvaiset karboksylaasit katalysoivat monia tärkeitä reaktioita glukoneogeneesissä, rasvahappojen synteessissä ja aminohappojen kataboliassa (Kuva 1.4). Biotiinin puutos tai puutokset karboksylaasientsyymien rakenteessa/toiminnassa saattavat olla kohtalokkaita, johtuen entsyymien tärkeydestä toimia välittäjinä aineenvaihdunnassa. Korkeammilla organismeilla on biotiinin tarpeen täyttämiseen ja käyttöön perustuva biotiinikierto (Kuva 1.5) (ks. kirjallisuuskatsaus Pacheco-Alvarez ym. 2002).



Kuva 1.4. Biotiini-riippuvaisten karboksylaasien merkitys ihmisen aineenvaihdunnassa. Kuvassa PC on puryvaatti karboksylaasi, PCC on propionyyli-CoA karboksylaasi, MCC on β -metyylikrotonyyli-CoA ja ACC on asetyyli-CoA karboksylaasi. Biotiini toimii näiden entsyymien karboksylaatioreaktioissa karboksyyli-ryhmän välittäjänä luovuttajan ja saajan välillä. (mallina käytetty kuvaa 2, kirjallisuuskatsaus Pacheco-Alvarez 2002).



Kuva 1.5. Biotiini kierto. (malli kuvaan otettu kirjallisuuskatsauksesta Pacheco-Alvarez, 2002)

Biotiini-riippuvaliset entsyymit sijaitsevat ihmisoluissa mitokondriossa tai sytoplasmassa (Lynen F. 1979). Puryvaatti karboksylaasi (PC) katalysoi puryvaatin transformatiota oksaloasetaatiksi, joka on väliaine fosfoenolipuryvaatin synteesissä ja siten tärkeä glukoosin synteesissä (Kuva 1.4.) (ks. kirjallisuuskatsaus Pacheco-Alvarez 2002). Propionyyli-CoA karboksylaasi (PCC) osallistuu aminohappo- ja rasvahappoketjujen

kataboliaan katalysoimalla propionyyli-CoA transformaatiota metyyylimalonyyli-CoA:ksi (Browner ym. 1989). β -metyylikrotonyyli-CoA (MCC) osallistuu leusiinin kataboliaan katalysoimalla 3-metyylikrotonyyli-CoA:n karboksylaatiota 3-metyylyglutakonyyli-CoA:ksi (McKean ym. 2000). Asetyyli-CoA karboksylaasi (ACC) katalysoi asetyyli-CoA:n karboksylaatiota malonyyli-CoA:ksi, joka on tärkeä vaihe rasvahappojen synteesissä. Ihmissoluissa esiintyy kahta muotoa asetyyli-CoA karboksylaasista. Muotoja koodaavat eri geenit (Abu-Elheiga ym. 1995, 1997).

Koska biotiini-riippuvaiset karboksylaasit katalysoivat samantapaisia reaktioita, voidaan geenien, jotka koodaavat näitä entsyymejä, olettaa olevan lähtöisin samasta esi-isästä (Lynen F. 1979). Näiden proteiinien biotinylaatioon osallistuva vastaanottajasekvenssi on lysiinijääne sekvenssin Met-Lys-Met sisällä. Tämä sekvenssi on useimmilla biotiini-riippuvaisilla karboksylaaseilla 35 aminohappoa karboksylaasiterminaalista päästä. Mutaatio tässä sekvenssissä estää entsyymien biotinylaation (Leon-Del-Rio ym. 1994).

1.3.2 Biotinidaasin puutos

Biotinidaasi on ainoa entsyymi, joka pystyy pilkkomaan biosytiiniä. Biosytiiniä syntyy holokarboksylaaseista proteolyysin tuloksena. Biotinidaasin puutos johtaa sekundaariseen biotiinipuutokseen, jolloin kaikkien biotiini-riippuvaisten karboksylaasien toiminta häiriintyy. Näillä potilailla imeytymismekanismi ja biotinylaatio toimii, jolloin potilaiden biotiinipuutos korjaantuu, mikäli heille annetaan biotiinilisää. Biotinidaasin puutos aiheuttaa monia kliinisiä neurologisia oireita ja iho-oireita, kuten alopeciaa, kehityksen viivästymistä, ihottumaa, asiduriaa, kohtauksia, lievää hyperammonemiaa ja hengitysvaikeuksia. Biotinidaasin aktiivisuus seerumissa on normaalia matalampi puutoksesta kärsivillä potilailla. Biotinidaasia koodaavassa geenissä on havaittu useita erilaisia mutaatioita, jotka aiheuttavat eriasteista biotinidaasiaktiivisuuden alenemista (Hymes ym. 2001).

1.3.3 Holokarboksylaasipuutos

Holokarboksylaasisyntaasi entsyymi (HCS) katalysoi biotiinin sitoutumista biotiini-riippuvaisiin karboksylaasi entsyymeihin. Nämä entsyymit taas toimivat monissa tärkeissä

aineenvaihduntareaktioissa. Mutaatiot Holokarboksyylaasigeenissä (HCG) aiheuttaa puutoksia HCG:n aktiivisuudessa. Mutaatiot vaikuttavat suoraan solun kykyyn biotinyloida karboksylaaseja (Burri ym. 1981). Taudin kliinisinä oireina esiintyy asidoosia, asiduriaa, hyperammonemiaa, ihottumaa, syömisvaikeuksia, hypotoniaa, kohtauksia, kehityksen viivästymistä, alopeciaa ja koomaa. Tila johtaa kuolemaan, ellei sitä hoideta antamalla biotiinilisää (Pacheco-Alvarez ym. 2002).

1.3.4 Biotiini-riippuvainen basaaligangliotauti

Hiljattain on löytynyt kliinisiltä ja neurologisilta oireiltaan aivon basaaligangliotauti (BGD). Tähän biotiini-riippuvaiseen basaaliganliotautiin (BBGD) liittyy tyvitymakkeiden (caudatus) tuhoutuminen sekä joko osittainen tai täydellinen häviäminen (putamen). Tyypillistä tälle taudille on sen perinnöllisyys todennäköisesti resessiivisesti sekä vaste biotiinilisälle. Taudin alkuvaiheessa oireet häviävät muutaman päivän sisällä, mikäli potilaalle annetaan biotiinia 5-10 mg/kg/pvä. Oireet palaavat, mikäli biotiinin antaminen lopetetaan. Taudin oireina esiintyy sekavuutta, koomaan syvenevää letargiaa, oksentelua, aivoperäisiä kohtauksia, dystoniaa, dysarthiaa, dysfagiaa, seitsemannen hermon halvaantumista, neliraajapareesia, ataksiaa, hypertensiaa sekä tahdotonta spastista nykivää liikehdintää. Hoitamattomana tauti johtaa kuolemaan. Kaikilla tutkituilla potilailla oli normaali karboksylaasi- sekä biotinidaasiaktiivisuus, joten taudin saattaa aiheuttaa puutos biotiinin kuljetusmekanismeissa aivo-veriesteessä. Taudinkuvassa on kuitenkin vielä epäselvyyksiä, kuten esimerkiksi se että, miksi jotkut potilaat pysyvät oireettomina 14-vuotiaiksi asti (Ozand ym. 1998).

BBGD:n geeni löytyi kromosomista 2 ja se nimettiin SLC19A3 geeniksi. Aminohappo järjestyksen on todettu olevan identtinen ihmisillä, hiirillä sekä alemmilla organismeilla viitaten geenin konservatiivisuuteen evoluutiokehityksessä. Geenin koodaaman proteiinin arvellaan toimivan biotiinin kuljettajana. Lisätutkimuksia kuitenkin tarvitaan, jotta voidaan selvittää kykeneekö SLC19A3 kuljettamaan tiamiinin lisäksi biotiinia vai parantaako biotiinilisä vain epäsuorasti mutatoituneen SLC19A3 aiheuttamia muutoksia tiamiinin ja muiden ravintoaineiden kuljetuksessa. Voidaan myös spekuloida, että oireet aiheutuvat välituotteiden aiheuttamasta tuhosta basaaliganglioissa. Toisaalta kuitenkin potilailla,

joilla on mutaatioita biotinidaasia ja holokarboksylaasi syntaasia koodaavissa geneeissä, ei ole samoja kliinisiä oireita (Zeng ym. 2005).

1.3.5 Biotiinin osallistuminen transkriptioon

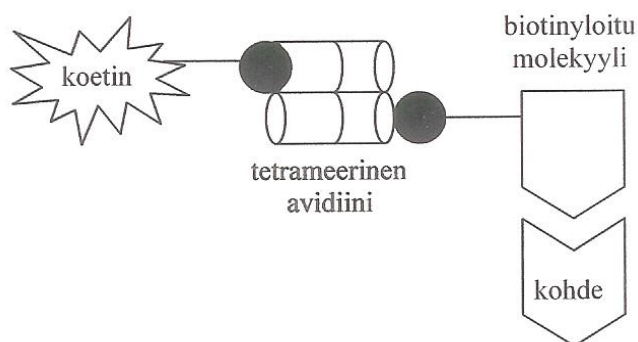
Proteiinisynteesiin vaikuttaa monet ekstrasellulaariset signaalit. Myös vitamiinit säätelevät proteiinisynteesiä (ks. yleiskatsaus Dakshinamurti 2005). Biotiinin lisäys on mm. stimuloinut proteiinien synteesiä aminohapoista *in vivo* ja *in vitro* rottien maksakudoksessa (Dakshinamurti ja Boeckx 1968). Biotiinin lisäys biotiinin puutoksesta kärsivien HeLa-solujen mediumiin kasvatti leusiinin liittämistä proteiiniin kaksinkertaiseksi ja siten proteiinisynteesiä. Rotan maksasolujen tumasta on onnistuttu eristämään proteiini, joka sitoo biotiinia ei-kovalenttisesti. On mahdollista, että tämä biotiinia sitova proteiini on osallisena ekspressiossa (ks. yleiskatsaus Dakshinamurti 2005).

Histonien tiedetään osallistuvan geenien transkriptioon. Histonien biotinylaatiota tapahtuu monissa ihmissoluissa *in vivo* ja solujen jakaantumisen aikana biotinylaatio lisääntyy. Histonien kromatiinissa tapahtuu muutoksia mm. asetylaation, metylaation ja fosforylaation jälkeen. Holokarboksylaasi syntaasin puutoksesta kärsivillä potilailla on havaittu puutteellista histonien fosforylaatiota. Näin ollen histonien biotinylaatio saattaa aiheuttaa rakennemuutoksen ja siten säädellä DNA:n transkriptiota (ks. yleiskatsaus Dakshinamurti 2005).

1.4 (Strept)Avidiini-biotiini teknologia

(Strept)Avidiini-biotiini teknologian suurimmat hyödyt ovat sen monipuolisuudessa ja erittäin laajassa käyttöalueessa. Kaupallisesti on saatavilla jo suuri joukko sekä biotinyloituja että avidiinikonjugoituja tuotteita. Diagnostiikassa avidiini-biotiini systeemi lisää herkkyttä vahvistamalla signaalia. Avidiinia sisältävät biotinyloidut tuotteet ovat stabiileja ja kestävät hyvin säilytystä. Avidiini-biotiini teknologian käyttömahdollisuuksia löytyy mm. useissa erilaisissa affiniteetti sovellutuksissa, blottausteknologiassa, kohdennetussa lääkehoidossa ja geeniterapiassa, flow-sytometriassa, immunohistokemissa, histologiassa, jne. (Bayer ja Wilcheck, 1994; kappale 14 kirjassa *In Egg Uses and Processing Technologies*). Avidiinin avulla voidaan puhdistaa ja eristää aineita, jotka jo

luonnostaan sisältävät biotiinia. Monia molekyyliä voidaan myös kemiallisesti tai metabolisesti biotinyloida, jolloin biotiini liitetään kovalenttisesti biotinyloitavaan molekyyliin valeriaanihappo-sivuketjunsä kautta (ks. kirjallisuuskatsaus Barry ym., 2003; Wilchek ja Bayer 1990). Tämä konjugointi ei juuri merkittävästi muuta molekyylin biologisia tai fysiokemiallisia ominaisuuksia. Biotinylointi ei tuhoa biotiinin biologista aktiivisuutta eikä näin ollen sen kykyä sitoutua avidiiniin (Wilchek ja Bayer 1990). Koska avidiini sitoutuu biotiinin ureidoryhmän kautta (ks. 1.1.3 *Biotiinin sitoutuminen avidiiniin*), toisin kuin useat muut aineet, voi avidiini sitoutua biotinyloituun tuotteeseen. Tetrameerinä yksi avidiinimolekyyli voi lisäksi sitoa teoriassa neljä biotiinimolekyyliä. Tämä erilaisten biotiinia sisältävien molekyylien keskinäinen konjugointiominaisuus on lisännyt avidiini-biotiini teknologian käyttötapoja.



Kuva 1.6. Esimerkki yleisestä avidiini-biotiini teknologian sovellutuksesta, jossa kohdemolekyyliin sitoutuu biotinyloitu sitoutujamolekyyli. Biotinyloituun molekyyliin vuorostaan sitoutuu avidiini, johon on sitoutunut biotinyloitu koetin. Koetin voidaan konjukoida myös suoraan avidiiniin.

Streptavidinin löytyminen mahdollisti avidiinin korvaamisen streptavidiinilla avidiini-biotiini teknologiassa. Avidiinin käytön ongelmana on sen epäspesifinen sitoutuminen ja tausta, jotka johtuvat avidiinin positiivisesta varauksesta neutraaleissa olosuhteissa (korkea isoelektrinen piste) sekä olikosakkaridi jäänteistä. Voimakas positiivinen varaus aiheuttaa avidiinin epäspesifiä sitoutumista negatiivisesti varautuneiden molekyylien, kuten nukleiinihappojen, kanssa. Avidiinin sisältämät sokerit taas aiheuttavat avidiinin sitoutumista lektiinin tapaisten molekyylien kanssa. Vaikka streptavidinin käyttö menetelmissä on avidiinia kalliimpaa, voidaan sen etuina nähdä lähes neutraali pI sekä se, ettei streptavidini glykosyloidu natiivissa muodossaan. Huolimatta näistä eduista avidiiniin nähden, streptavidiinilla on monissa koejärjestelyissä havaittu vuorovaikutusta tunnistamattomien makromolekyylien kanssa. Tämän ominaisuuden epäillään johtuvan streptavidiinin sisältämästä Arg-Tyr-Asp sekvenssistä. Tämä sekvenssi muistuttaa suuresti

monien solujen pintaan tarttuvien molekyylien, kuten esimerkiksi fibrinogeenin ja kollageenin, sisältämää Arg-Gly-Asp sekvenssiä, jonka solujen pinnassa oleva reseptori tunnistaa ja johon se sitoutuu (Bayer ja Wilcheck, 1994; kappale 14 kirjassa *In Egg Uses and Processing Technologies*). Streptavidini ja avidiini käyttöä kohdennetussa lääkeshoidossa vaikeuttaa niiden myös aiheuttama immuunireaktio ihmisellä (Chinol ym., 1998).

Kohdennetussa lääkeshoidossa hoito kohdistetaan suoraan sairaaseen elimeen, esimerkiksi syöpäkasvaimeen tai sillä voidaan hoitaa oireita aiheuttavaa sairauden syytä. Monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö mahdollisti kohdennetun lääkeshoidon tiettyä pinta-antigeenia kohtaan. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan käyttää hyödyksi myös syövän diagnosoinnissa. Näissä menetelmissä vasta-aineeseen on liitetty kemoterapeuttinen lääkeaine tai detektoinnin mahdollistava radioisotooppi.

Goldenberg ym. (1980) onnistuivat saamaan keskimääri 2,5 kertaisen parannuksen tuumorien kuvantamisessa. I^{131} -leimatuilla CEA (carcinoembryonic antigen) vasta-aineilla suoritettussa tutkimuksessa, jossa vasta-aineilla merkittyä tuumorialuetta verrattiin alueeseen jossa tuumoria ei ollut, kolorektaalisen syövän diagnostiseksi sensitiivisyydeksi saatiin 85 %, ovariosyövän 88 %, cervikaalisen syövän 90 % ja keuhkosyövän 71 %. Tutkimuksessa oli mukana 142 syöpäpotilassa ja osassa tapauksista radioimmunodetektioilla saatiin positiivinen tulos, vaikka muilla havainnointimenetelmillä oli saatu negatiivinen tulos. Radioimmunodetektioilla havaittiin n. 2 cm suuret tuumorit ja metastaasit pystyttiin paikallistamaan joillakin potilailla, joilla oli yleisesti käytössä olevalla plasman-CEA mittauksella saatu normaali plasman-CEA tulos.

Vasta-aineiden käyttöön kohdennetussa lääkeshoidossa ja diagnostiikassa liittyy myös monia ongelmia. Radiolääkeaineet leviävät verenkierron mukana elimistöön. Mikäli tuumorissa ei ole verenkiertoa ja tuumorin keskusta on jo joutunut kuolioon eli negroosiin, eivät myöskään radioleimatut vasta-aineet saavuta kaikkia kohdesolujaan. Vasta-aineiden käyttöä kohdennetussa lääkeshoidossa ja diagnostiikassa vaikeuttavat myös vasta-aineen suuri koko, johon ratkaisua on haettu käyttämällä vasta-aineen antigeenin tunnistavaa Fab-osa, joka diffundoituu kokonaista vasta-ainetta nopeammin pienemmän kokonsa ansiosta.

Toisaalta taas vasta-aineen osa myös poistuu elimistöstä nopeammin kuin kokonainen vasta-aine, joten vasta-aineen konsentraatio tuumorissa on korkeampi kokonaista vasta-ainetta käytettäessä kuin vasta-aineen Fab-osaa käytettäessä. Vasta-aineiden epäspesifistä sitoutumista joudutaan vähentämään laimentamalla vasta-ainetta kylmävasta-aineella, jolloin epäspesifistä sitoutumista aiheuttavat kohdat saadaan saturoitua. Taustan vähentämiseksi on myös ajateltu menetelmiä, joissa mm. käytetään toista vasta-ainetta tai tietokonekuvantamista, jossa vähentämällä toisen tai mahdollisesti kolmannenkin radiolääkeaineen aiheuttama tausta vähennetään alkuperäisestä kuvasta, jolloin tuumorialue saadaan näkyviin. Radioleimattu vasta-aine voidaan myös injektoida paikallisesti, jolloin saadaan paikallisesti suurempi konsentraatio vasta-ainetta esimerkiksi imusolmukkeisiin (Goodwin 1987).

Yksi mahdollisuus taustan vähentämiseen on menetelmä, jossa vasta-aine ja leima annostellaan eri aikaan. Tässä menetelmässä (strept)avidiniä voidaan käyttää apuna. Menetelmää on kokeiltu mm. 20 potilaalla, joilla oli histologisesti todennettu syöpä sekä positiivinen plasman CEA tulos. Kolmivaiheisessa menetelmässä ensin annosteltiin biotinyloitu tuumorispesifinen vasta-aine, jonka jälkeen odotettiin riittävä aika sitoutumattoman vasta-aineen poistumiseksi elimistöstä. Seuraavaksi potilaille injektointiin avidiniä. Jälleen odotettiin riittävä aika, jotta sitoutumaton avidiini poistuu elimistöstä ja viimeiseksi injektointiin biotinyloity radioaktiivinen merkkiaine, joka sitoutuu tuumoriin sitoutuneisiin avidiini-monoklonaalisiin vasta-ainekomplekseihin. Potilailla ei havaittu toksisia sivuvaikutuksia, sitoutumattoman merkkiaineen poistuminen elimistöstä oli varsin nopeaa, koska merkkiainemolekyylillä oli hyvin pieni ja näin ollen muiden elinten altistumisaikaa radioaktiiviselle leimalle saatiin vähennettyä. Myös tausta pieneni, koska merkkiaine annettiin erikseen ja vasta-aineiden immuunireaktiivisuus saatiin säilytettyä sekä avidiinin biotiinia sitovien kohtien avulla havainnointi signaalia saatiin vahvistettua. Tämä menetelmä myös mahdollistaa useampien radionuklidien käytön. (Paganelli ym. 1991)

Monivaiheinen menetelmä, jossa terapeutinen aine on kohdennettu syöpäkasvaimen kuvantamis- tai hoitotarkoituksessa on osoittautunut lupaavaksi. Tässä menetelmässä ongelmaksi on kuitenkin muodostunut immunogeenisyyden lisäksi radioaktiivisuus, joka kohdistuu munuaisiin. Förster ym. (2006) suorittamassa tutkimuksessa selvitettiin

mahdollisuuksia vähentää radioaktiivisuuden munuaisille aiheuttamaa räsitusta. Toistaiseksi ei mekanisme (strept)avidiin kertymiselle munuasiin ole tunnettu, mutta yksi mahdollisuus on reseptorivälitteinen mekanismi. Prebiotinyloidun streptavidiin käyttö estämään reseptorivälitteinen radioleimatun streptavidiin kertymisestä munuasiin ei kuitenkaan tuottanut tulosta, joten streptavidiin kertyminen munuasiin tuskin on reseptorivälitteistä. Toinen tutkittu mahdollisuus oli vapaiden positiivisten ryhmien sitoutuminen ja takaisin imeytyminen munuaisissa. Tällöin pienten peptidien imeytyminen voidaan estää käyttämällä positiivisesti varautuneita aminohappoja. Menetelmää on jo kliinisesti testattu hyvällä menetyksellä estämään leimattujen vasta-aineiden kertymistä munuasiin (Behr ym. 1998). Försterin ym. (2006) suorittamassa tutkimuksessa D-lysiinin annostus ei kuitenkaan vähentänyt radioleimatun streptavidiin kertymistä munuasiin. Kolmantena keinona Förster ym. (2006) tutkivat mahdollisuutta käyttää kolkisiinia yksistään tai yhdessä lysiiin kanssa estämään mahdollinen endosytoosi mikrotubuluksissa. Myöskään tämä menetelmä ei vähentänyt streptavidiin kertymistä munuasiin. Viimeisenä tutkimuksessa selvitettiin mahdollisuutta estää radioleimatun streptavidiinikonstruktion kertyminen munuasiin muuttamalla proteiinin kokonaisvaraus positiivisesta negatiiviseksi, koska negatiivisesti varautuneiden makromolekyylien tiedetään olevan kykenemättömiä läpäisemään glomerulusten seinämä. Försterin ym. (2006) tutkimuksessa streptavidiiin konstruktion kokonaisvaraus muutettiin sukkinylaatiolla, joka ei muuta streptavidiin biotiin sitomiskykyä, negatiiviseksi (pI \approx 4,4). Tämä viimeinen vaihtoehto vähensi DOTA-biotiin kertymistä munuasiin yli 30 %:lla. Sekä ^{67}Ga - että ^{90}Y -DOTA-biotiin munuaisabsorptio keskiarvo pieneni 44 %:lla sukkinylaation jälkeen.

(Strept)avidiin antigeenisyyden aiheuttamaa ongelmaa lääketieteellisessä käytössä on yritetty vähentää monin tavoin. Chinol ym. (1998) tutkivat natiivin, rekombinantin, sukkinyloidun ja PEGyloidun (polyetyleni glykoli konjugoitu) avidiin vaikutuksia immuunivasteeseen. Ainoastaan PEGyloidulla avidiinilla, johon oli liitetty 7 PEG- ketjua, oli vähäisempi immunigeenisuus. Calicetin ym. (2002) spektroskopiatutkimuksissa avidiinilla, johon oli sitoutuneena 5 tai 10 kDa PEG:a, säilyi 90 % natiivin avidiin biologisesta aktiivisuudesta. Myös näissä tutkimuksissa PEGyloidulla avidiinilla oli natiivia muotoa pienempi immuunigeenisuus, mutta myös munuasiin ja maksaa kertyminen väheni suhteessa avidiin sidotun PEG:n määrään. Mitä enemmän avidiiniin

oli sidottu PEG-konjugaattia, sitä vähäisempää kertyminen oli. PEG-konjugaatit säilyttivät sitoutumiskykynsä tuumorimassaan.

Yksi mahdollisuus vähentää (strept)avidiinin antigeenisyyttä on mutatoida proteiinia. Proteiinien muokkaamisella mutageneesin avulla on jo pitkään paranneltu natiiviproteiinien ominaisuuksia vähentämällä tai lisäämällä aminohappoja. Van der Burg ym. (1998) paransivat mutageneesin avulla *Bacillus stearothermophiluksesta* peräisin olevan proteaasin lämmönsietokykyä. Proteiini säilyi toimintakykyisenä 170 minuuttia 100 °C:ssa natiivimuodon denaturoituessa alle puolessa minuutissa. Avidiinin lämmönkestokykyä on pystytty parantamaan siirtämällä AVR4-proteiinista 21 aminohapon sekvenssi avidiiniin ilman biotiinin sitomiskyvyn poistumista (Hytönen ym. 2005).

Streptavidiinin antigeenisyyden kaneilla on todettu pienenevän korvaamalla sen pinnan ionisia ja hydrofobisia vuorovaikutuksista vastaavia aminohappoja. Joissakin tapauksissa mutatoidulla streptavidiinilla dissosiaatio biotiinista oli kuitenkin natiivi streptavidiniä nopeampaa. On mahdollista, että biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohapot, ovat osallisena myös vasta-aineiden sitomisessa ja siten niiden mutatoiminen vaikuttaa myös biotiinin sitomiskykyyn (Meyer ym.2001).

Kohdennetussa lääkehoidossa yhtenä viimeisimmistä mielenkiinnonkohteista on kudosspesifinen transduktio, jossa käytetään hyväksi virusvektoria, esimerkiksi rekombinantista ei-patogeenista adenovirusta. Tässäkin menetelmässä stabiilisuuden ja spesifisyyden parantamiseen voidaan käyttää avuksi avidiini-biotiinitekniologiaa. Tällöin virusvektori biotinyloidaan. Kudosspesifinen kohdentaminen tapahtuu bispesifisellä proteiinilla, jonka toisena osana on esimerkiksi streptavidini ydin ja toisena jotakin pintareseptoria vastaan kohdistettu proteiini. Tällä menetelmällä onnistuttiin parantamaan spesifisyyttä ja transduktion tehokkuutta *in vitro* kokeissa, jotka tehtiin adenovirus resistenteillä megakaryootti leukemiasoluilla (Ponnazhagan ym. 2002).

Avidiinin ja streptavidiinin käyttöä rajoittavien farmakokineettisten puutteiden ja immunogeenisyyden takia, etsitään myös uusia mahdollisia biotiinia sitovia proteiineja. Hytönen ym. (2003) etsivät avidiinia vastaavia proteiineja ankasta, hanhesta, strutsista ja

kalkkunasta. Nämä avidiinin kaltaiset proteiinit olivat ominaisuuksiltaan hyvin samankaltaisia kanan avidiinin kanssa. Ankasta, hanhesta ja strutsista peräisin olevat avidiinit eivät ristiinreagoineet kanan avidiinin polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa, jotka olivat kanista peräisin. (Strept)avidiinilla hoidettujen potilaiden seeruminvasta-aineilla ja ankan, hanhen sekä strutsin avidiinien välillä ei havaittu selvää korrelaatiota immunologisessa vasteessa. Nordlund ym. (2005) tutkivat *Bradyrhizobium japonicumista* löytynyttä avidiinin ja streptavidinin kaltaista proteiinia bradavidiniä. Myöskään tämä proteiinia ei ristiinreagoi kanin ja ihmisen polyklonaalisten (strept)avidiniä vastaan muodostuneiden vasta-aineiden kanssa. Ensimmäinen dimeerisenä muotona luonnossa esiintyvä avidiinin kaltainen proteiini rhizavidini *Rhizobium etli* bakteerista ei sekään ristiinreagoi ihmisperäisten polyklonaalisten (strept)avidini vasta-aineiden kanssa (Helppolainen ym., 2007).

2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tuottaa merisiilestä *Strongylocentrotus purpuratus* löydettyjä viittä aminohapposekvenssiltään erilaista ja erikokoista avidiinin kaltaista proteiinia. Proteiinit löytyivät EST-projektin yhteydessä, joka on perustettu Kansallisen ihmisengenomitutkimus instituutin (engl. the National Human Genome Research Institute) (National Institutes of Health, NIH) toimesta. Proteiinit tuotettiin *Escherichia coli* tuottosysteemillä ja puhdistettiin affiniteettikromatografialla.

Työn toisena tarkoituksena oli karakterisoida proteiinien biokemiallisia ominaisuuksia, kuten lämmönkestävyyttä, rakenteellisia ominaisuuksia, immunologisia ominaisuuksia sekä biotiinin sitomiskykyä.

Avidiinia ja sen kaltaisia proteiineja on onnistuneesti aikaisemmin tuotettu *Escherichia coli* tuottosysteemillä (Nordlund ym. 2005, Hytönen ym., 2004). Aikaisemmin on tuotettu myös merisiilen *Heliocidaris erythrogamman* avidiinia muistuttavan fibripelliiniproteiini-domeenin mutatoituja muotoja bakulovirusekspressio-vektorisysteemillä (Laitinen ym. 1999). *E.coli* on kuitenkin halvempi ja hyvin tunnettu ja toimiva tuottosysteemi, jonka takia oli perusteltua käyttää sitä.

Uusien avidiinin kaltaisten proteiinien löytyminen avaa uusia mahdollisuuksia lääketieteen ja nanotieteiden saralla. Löydettyjen proteiinien ominaisuuksien karakterisointi sekä ominaisuuksien hyödyntäminen mahdollistaa jatkuvan kehityksen mm. proteiinien muokkaamisessa. Tällaisia ominaisuuksia voivat olla parempi stabiilisuus tai pienempi antigeenisuus.

3. AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Avidiinin kaltaisen rekombinantti DNA:n rakentaminen

Tutkimuksessa käytetty cDNA-plasmidin sisältämä geeni, joka koodaa merisiilestä *Strongylocentrotus purpuratus* löytynyttä avidiinin kaltaista proteiinia (strongavidiini), vaati muokkaamista, ennen kuin rekombinanttisen proteiinin tuottaminen *Escherichia coli* soluissa voitiin aloittaa. Alun perin strongavidiinin geeni oli pCMVSPORT6.1 plasmidissa (Invitrogen), joka oli säilötty whatmanin FTA filteri- tyynyihin. Plasmidi sisältää ampicilliini resistenssigeenin, joka mahdollistaa tähän vastustuskykyyn perustuvan antibioottiselektion. Tutkimusta varten tuli viisi erilaista cDNA-plasmidia, jotka kukin sisälsivät aminohapposekvenssiltään erilaisen geenikonstruktion.

3.1.1 Proteiinia koodaavan geenin sisältävän plasmidin monistaminen

EST projektista saadun geenin sisältämä cDNA- plasmidi valmistettiin transformaatiota ja PCR:ää varten pesemällä plasmidin sisältämää tyynyä 400µl:lla TE puskuria. Puskuria pipetoitiin tyynyllä kaksi kertaa 5-10 sekunnin ajan. Tämä vaihe toistettiin kaksi kertaa ja kaikki TE puskuri jäämät poistettiin. Pesuvedet säästettiin siltä varalta, että plasmidi olisi eluoitunut pesuveteen. Plasmidin eluoimiseksi tyynystä, tyynyä inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä 50 µl:ssa TE puskuria. Plasmidin sisältämä liuos siirrettiin omaan putkeensa.

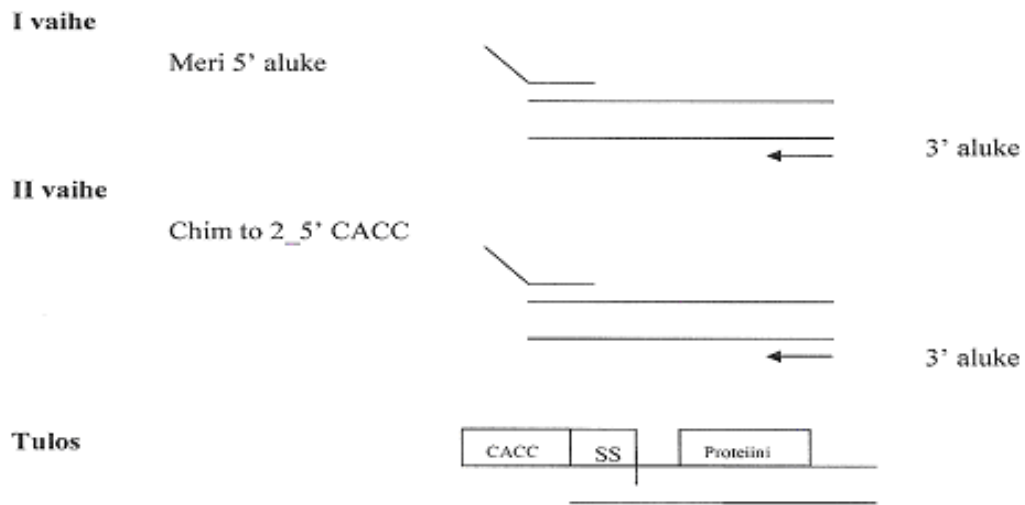
Plasmidien lukumäärän oletettiin olevan alhainen eluutioliuoksessa, joten plasmidia monistettiin kemiallisesti kompetenteissa One Shot[®] TOP 10 soluissa (Invitrogen) myöhempien transformaatioiden tehostamiseksi. Plasmidi transformoitiin TOP 10 soluihin ns. tukkimiehen transformaatiolla. Plasmidin sisältämää eluutioliuosta pipetoitiin 1µl 10µl:aan TOP 10 soluja. Seosta inkuboitiin jäähauteella 30 minuuttia. Lämpöshokki tehtiin +37°C:een lämpötilassa kahden minuutin ajan, jonka jälkeen seos siirrettiin takaisin jäähauteelle. Seokseen lisättiin S.O.C liuosta 100 µl ja koko seos siirrettiin lämpökaappiin +37 °C:een tunniksi. Soluseos maljattiin ampicilliini antibiootin sisältämille maljoille (LB_{amp}). Tällöin vain plasmidin sisältämät bakteerit kasvavat maljalla. Maljoja inkuboitiin +37 °C:een lämpötilassa yön yli.

Maljoilta siirrostettiin yksi pesäke kasvatusmediumiin plasmidin monistamiseksi. Kasvatusmediumi sisälsi 5 ml LB-mediumia ja 5 µl:a ampisillinia (100 mg/ml). Soluja kasvatettiin yön yli +37 °C:een lämpötilassa tasoravistelijassa (250 rpm). Seuraavana päivänä kasvatuksista tehtiin glyserolistokki säilytettäväksi –20 °C:ssa. Soluja ja steriiliä glyserolia sekoitettiin suhteessa 1:1. Loppukasvatuksesta eristettiin plasmidi NucleoSpin® Plasmid for Plasmid DNA Purification kitillä (Macherey-Nagel). Eristäminen suoritettiin valmistajan työohjeen mukaan.

3.1.2 Bakteriperäisen OmpA signaalisekvenssin rakentaminen PCR:n avulla

E. colia on paljon käytetty rekombinanttisten proteiinien tuotossa sen tunnettavuuden ja edullisuuden vuoksi. *E. colin* käyttö streptavidiin ja etenkin avidiinin tuotossa on kuitenkin tuottanut hankaluuksia tuottojen välisten vaihteluiden, matalien tuottojen tai inkluusio kappaleiden vuoksi. Tässä tutkimuksessa strongavidiniin ohjattiin periplasmiseen tilaan kloonamalla bakteriperäinen *Bordetella avium* OmpA signaalisekvenssi (MNKPSKFALALAFAAVTASGVASAQTV) proteiinin geenin eteen (Hytönen ym., 2004).

Sekvenssin rakentaminen suoritettiin kahdessa osassa (Kuva 3.1). Ensimmäisessä vaiheessa monistettiin proteiinia koodaavaa geeniä SES-PCR:n reaktion avulla (Majumder, 1992) sekä lisättiin osa OmpA sekvenssiä. Seuraavassa vaiheessa 5' päähän liitettiin OmpA sekvenssin loppuosa sekä TOPO kloonauksessa tarvittava CACC yli menevä juoste (over hang) PCR:n reaktion avulla. Käytetyt alukkeet löytyvät liitteestä I.



Kuva 3.1. Strongavidiinin sekvenssiin liitettiin bakteerilaaninen OmpA signaalisekvenssi kahdessa vaiheessa alukkeiden avulla. Signaalisekvenssiä tässä kuvaa SS (engl. signal sequence).

Käytetty reaktioseos oli seuraavanlainen molemmissa vaiheissa:

10µl	10X P _{fun} polymeraasipuskuria (Fermentas)
2µl	3' aluketta (100pmol/µl) (TAG Copenhagen A/S)
2µl	5' aluketta (100pmol/µl) (ensimmäisessä meri 5' ja toisessa chim to 2_5') (TAG Copenhagen A/S)
1µl	templaattia
10µl	dNTP mixiä (2mmol/l) (Fermentas)
74µl	H ₂ O
99µl	tot.

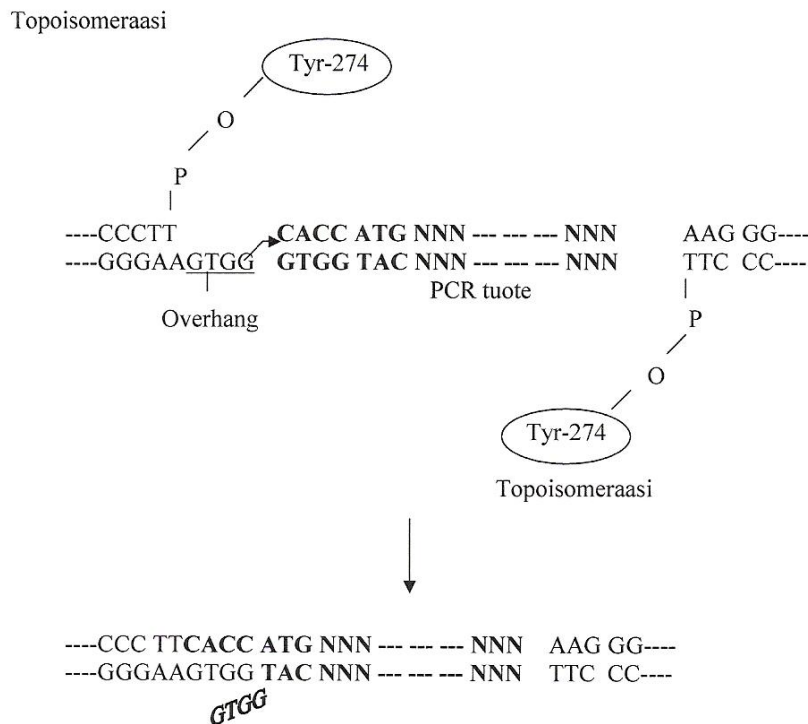
1µl P_{fun} polymeraasia (Fermentas) lisättiin laitteen lämmitettyä +95°C:een lämpötilaan.

Putket siirrettiin PCR laitteeseen ja ajettiin PCR ohjelma 1 (liite I). Ohjelman päätyttyä näytteet ajettiin 1,5 % agarosigeelissä (3,75 g agarosia (Promega), 0,4 µl/ml etidumbromidia, 250 ml TAE-puskuria). Geeliä ajettiin 40 minuuttia Bio-Radin

elektroforeesilaitteella, jonka jälkeen tulos tarkistettiin UV-valossa. Oikean kokoiset DNA fragmentit valittiin markkerin (GeneRuler™, 100bp, Fermentas) avulla ja eristettiin geelistä NucleoSpin® Extract II kitillä (Macherey-Nagel) valmistajan työhöjeen mukaisesti. Geelissä oli mukana myös avidiinin DNA:ta kontrollina oikean kokoisen fragmentin valitsemiseksi.

3.1.3 Vektorin valmistus ohjaavan TOPO® kloonauksen avulla

Proteiinin tuottoa varten OmpA signaalisekvenssin sisältämä geeni kloonattiin pET101/D-TOPO (5753 bp) vektoriin (kartta liittessä II) (Invitrogen) ohjaavan TOPO® kloonauksen (Invitrogen) avulla (kuva 3.2). Ohjaava TOPO® kloonauksen on suunniteltu tasapäisten PCR-tuotteiden kloonaukseen vektoriin, jossa on T7- promoottori. Menetelmässä geeni saadaan liitettyä vektoriin halutun suuntaisesti ylijuoesten CACC avulla. T7 RNA polymeraasin korkea aktiivisuus ja herkkyys mahdollistavat erilaisten rekombinanttien proteiinien tuoton *E.colissa* T7 promoottorin alaisena (Rosenberg ym, 1987; Studier and Moffatt, 1986; Studier ym., 1990). Kloonauksen ei vaadi ligaasia. Vektorissa on myös ampisilliini resistenssi geeni ja se on matalan kopioluvun plasmidi (pBR322 origin).



Kuva 3.2. "Overhang" tunkeutuu DNA ketjujen väliin ja syrjäyttää alemman GTGG nukleotidin.

Ohjaavassa TOPO kloonauksessa käytetty reaktioseos oli seuraavanlainen:

- 3µl PCR tuotetta
- 1µl suolaliuosta
- 1µl steriiliä vettä
- 1µl pET101 vektoria

Putkia sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin 5 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen putket siirrettiin jäille. Kloonaustuotetta otettiin 3 µl:a ja transformaatio suoritettiin 16 µl:aan TOP 10 soluja. Reaktioseosta pidettiin jäillä 30 minuuttia, jonka jälkeen lämpöshokki suoritettiin +37 °C:een lämpötilassa kahden minuutin ajan. Putket siirrettiin takaisin jäille ja S.O.C liuosta lisättiin 250 µl. Putkia inkuboitiin tämän jälkeen +37 °C:een lämpötilassa tunnin ajan ja maljaus tehtiin LB_{amp} maljoille, joita kasvatettiin +37 °C:een lämpötilassa yön yli. Transformaation onnistumisen kontrollina käytettiin saman valmistajan pUC vektoria.

Seuraavana päivänä siirrostettiin yksi pesäke maljalta NUNC- putkeen kasvatusmediumiin (10 ml:a LB:ta, 10 µl:a ampicillinia (100 mg/ml)). Soluja kasvatettiin kasvatusmediumissa +37 °C:een lämpötilassa yön yli tasoravistelijassa (250 rpm). Kasvatuksesta tehtiin glyserolistokki (soluja ja steriiliä glyseroli sekoitettiin 1:1) säilytettäväksi -20°C:een. Lopusta kasvatuksesta eristettiin plasmidi NucleoSpin[®] Plasmid (macherey-Nagel) kitillä valmistajan työohjeen mukaan. Kohdassa viisi tehtiin ylimääräinen pesu lämmitetyllä AW puskurilla. Ennen eluutiota steriiliä vettä inkuboitiin membraanilla 30 minuuttia.

3.1.4 Plasmidin tarkistussekvensointi

Tämän tutkimuksen avidiinin kaltaista proteiinia koodaavan plasmidin tarkistussekvensoinnissa käytettiin Sangerin sekvensointia. Se perustuu dideoksinukleotidien käyttämiseen polymeerasiketjureaktiossa terminaattoreina. Dideoksinukleotideistä puuttuu 3'hydroksyyli ryhmä, joka keskeyttää ketjun kasvun, koska 5'→3' fosfodiesteri siltaa ei voi muodostua. Dideoksinukleotidien satunnainen kiinnittyminen templaattiin muodostaa erimittaisia DNA-fragmenteja, jotka erotellaan elektroforeettisesti. Elektroforeesi suoritettiin ABI:n laitteella 3130xl Genetic Analyzer. Laite on 16- kapillaarinen ja suorittaa

elektroforeesin kapillaarissa perinteisen geielektroforeesin sijaan. Kapillaarielektroforeesin etuna perinteiseen geielektroforeesiin on se, että kapillaarin käytössä ei synny yhtä paljon lämpöenergiaa kuin geelissä. Sekvensointi-PCR:ssa käytettiin oligonukleotideja pET101_forw tai pET101_rev (Invitrogen). DNA:n konsentraatio mitattiin UV/Vis spektrofotometrillä, jotta sekvensoinnissa voitiin käyttää 100-300 ng DNA:ta. Tässä tutkimuksessa käytettiin 300ng DNA:ta. Sekvensointi PCR:ssa käytettiin seuraavanlaista reaktioseosta, jonka pipetointi tapahtui jäähauteella:

- 1,5 µl templaattia
- 1 µl aluketta (pET101_forw tai pET101_rev) (Invitrogen)
- 4 µl TRR-Mix (35 µl BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (AB),
35 µl puskuri (200 mM Tris, 5 mM MgCl₂))
- 3,5 µl H₂O

Putket siirrettiin PCR laitteeseen ja ajettiin ohjelmalla 2 (liite I). DNA:n saostus suoritettiin välittömästi ohjelman loputtua seuraavan ohjeen mukaisesti, jossa liuosten lisääminen tapahtuu PCR reaktiotuotteen sekaan:

- 1 µl 3M Na-asetatti pH 5.2
- 25 µl 94 % etanoli

Sekoitettiin varovasti ja inkuboitiin 15 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen sentrifugoitiin eppendorffuugissa 30 minuuttia 13 000 rpm:ssa. Sentrifugoinnin jälkeen suspensio imettiin varovasti ja mahdollisimman tarkasti vesi-imulla pois käyttämällä injektioneulaa. Seuraavaksi lisättiin:

- 70–100 µl 70 % etanolia

Sentrifugoitiin 10 minuuttia 13 000 rpm:ssa ja imettiin etanoli jälleen mahdollisimman tarkasti pois vesi-imulla. Sakan annettiin kuivua n. 15 minuuttia ennen suspensioimista 12 µl:aan HiDi formamidia. Lopuksi DNA denaturoitiin pitämällä putkea +94 °C:een lämpötilassa kaksi minuuttia.

3.2 Proteiinin tuottaminen ja puhdistaminen

Ohjatulla TOPO kloonauksella tuotetut strongavidiinin sisältämät pET101 plasmidit transformoitiin kemiallisesti kompetentteihin BL21-AITM OneShot[®] soluihin (Invitrogen). BL21-AITM *E. coli* kanta on johdettu BL21 kannasta (Grodberg ja Dunn, 1988; Studier ja Moffatt, 1986). BL21-AITM soluista puuttuu proteaasit *lon* ja *OmpT*. Tämä edesauttaa rekombinantti proteiinin säilymistä. Solut sisältävät myös *tetA* geenin, joka mahdollistaa tetrasykliinin käytön selektio menetelmänä ja muiden bakteerien kasvun estämiseen. BL21-AITM soluissa on T7 RNAP polymeraasi geeni *araB* lokuksessa, mahdollistaen siten *araBAD* promoottorin alaisen T7 RNAP ekspression. T7 RNAP taas laukaisee rekombinantti proteiinin tuoton pET101/D-TOPO vektorissa.

Lämpöshokki transformaatio suoritettiin seuraavalla tavalla: eppendorf putkeen otettiin 3 µl:a plasmidia ja 25 µl:a BL21-AITM soluja. Tätä seosta inkuboitiin 30 minuuttia jäähauteella, jonka jälkeen lämpöshokki suoritettiin inkuboimalla seosta +42 °C:een lämpötilassa 30 sekuntia. Lämpöshokin jälkeen seos siirrettiin takaisin jäähauteelle ja putkeen lisättiin 250 µl:a S.O.C liuosta. Seuraavaksi soluja kasvatettiin +37 °C:een lämpötilassa yhden tunnin ajan. Solut maljattiin LB_{amp+tet} maljoille, joihin oli lisätty glukoosi (0,1 % w/v). Maljoja kasvatettiin +37 °C:een lämpötilassa yön yli.

3.2.1 Proteiinin tuottaminen *Escherichia coli* soluissa

Koekasvatusta varten BL21-AITM soluista, jotka sisälsivät pET101 vektorin ja strongavidiinia koodaavan geenin, tehtiin siemen ottamalla maljalta yksi pesäke ja siirrettiin se kasvatusmediumiin 50 ml NUNC-putkeen (10 ml LB, 10 µl ampisilliinia (100 mg/ml) (c=100 µl/ml), 27,5 µl 2M glukoosia (c=0,1 % w/v), 5 µl tetrasykliiniä (c=5 µl/ml)). Siementä kasvatettiin yön yli +26 °C:een lämpötilassa tasoravistelijassa (225 rpm). Seuraavana päivänä siemen siirrettiin isompaan kasvatusmediumiin (200 ml LB, 550 µl:a 2M glukoosia (c=0,1 % w/v), 200 µl ampisilliinia (100 mg/ml)(c=100 µl/ml)) yhden litran Erlenmeyer pulloon. Kasvatusta jatkettiin +26 °C:een lämpötilassa tasoravistelijassa (225 rpm) kunnes OD (optinen tiheys) saavutti n. 0,4 arvon. Absorbanssi mitattiin Perkin Elmerin MBA 2000 spektrofotometrillä 600 nm aallonpituudella. Kasvatus indusoiitiin L(+)-arabinoosilla (Sigma), kun oikea bakteeritiheys oli saavutettu. L(+)-

arabinoosia lisättiin 0,4 g, jotta lopullinen konsentraatio oli 0,2 % w/v. Proteiinituotto tapahtui myös +26 °C:een lämpötilassa tasoravistelijassa (225 rpm). Koekasvatuksen onnistuttua, tehtiin myös viiden ja kahden litran kasvatukset (liuosten sisältö ja konsentraatiot kuten edellä), jotta strongavidiinia saatiin riittävästi karakterisointikokeita varten. Vastaavasti siemenet olivat 400 ml ja 100 ml. Kasvatukset suoritettiin kahden litran Erlenmeyer pulloissa, joihin laitettiin kasvatusmediumia 500 ml. Proteiinin tuotto pysäytettiin sentrifugoimalla solut pohjaan Sorvall RC5C sentrifugilla (Du Pont). Supernatantti heitettiin pois.

3.2.2 Proteiinin puhdistus 2-iminobiotiiniagarosilla

Tuoton jälkeen proteiini piti puhdistaa soluista ja muista proteiineista. Strongavidiinin kohdalla ei tässä vaiheessa tiedetty sopivaa puhdistusmetodia, mutta loogisinta oli kokeilla avidiinin puhdistuksessa käytettävää affiniteetikromatografiaa 2-iminobiotiini sepharosi (Affiland) resiinillä (Hytönen ym., 2004). Avidiini sitoutuu voimakkaasti 2-iminobiotiiniin pH:n ollessa välillä 9–11, mutta pH:n alettaessa sitoutuminenkin heikkenee. Kun pH on laskenut riittävän alas, 2-iminobiotiinin guanidoryhmä protonoituu ja avidiini tai sen kaltaiset proteiinit irtoavat 2-iminobiotiinista (Heney ja Orr, 1981). Tämä puhdistustapa osoittautui onnistuneeksi valinnaksi.

Tuoton jälkeen solut piti hajottaa proteiinin vapauttamiseksi periplasmisesta tilasta. Solut suspensoitiin SET-puskuriin (4 ml/100 ml kasvatusta). Tähän lisättiin lysosyyymi (5 mg/ml) (5 µl/100 ml kasvatusta) ja seosta inkuboitiin huoneenlämmössä 30 minuuttia. HilloI-puskuria lisättiin inkuboinnin jälkeen 10 ml/100 ml kasvatusta. Solut hajotettiin sonikoimalla niitä sonikaattorilla (Sonics Materials, Vibra Cell) 40 %:n amplitudilla kahden minuutin ajan 1s on/1s off syklillä. Sonikoinnin jälkeen otettiin 100 µl:n näyte (total), johon lisättiin 100 µl:a SDS-PAGE näytepuskuria, joka sisälsi β-merkaptotetanolia (2X) (Promega). Seuraavaksi seos jaettiin 250 ml:n sentrifugi putkiin ja sentrifugoitiin Sorvall- sentrifugilla ja GSA-lite roottorilla 30 minuutin ajan 15 000 G:n voimalla (9600 rpm). Supernatantti suodatettiin Miraclothin läpi ja tarkistettiin, että suodos oli kirkasta. Supernatantista otettiin 100 µl:n näyte (L1), johon lisättiin 100 µl SDS-PAGE näytepuskuria. Myös pelletistä, joka suspensoitiin 50 ml:aan PBS-puskuria, otettiin 100 µl:n näyte (S), joka sekoitettiin 100 µl:aan SDS-PAGE näytepuskuria. Supernatantin

määrä mitattiin ja siihen lisättiin vastaava määrä pH 11- puskuria. Liuoksen pH säädettiin välille 10–11, jotta proteiinin sitoutuisi 2-iminobiotiini agarosi resiiniin. Liuoksen pH mitattiin Methrom-laitteella ja säädettiin oikealle tasolle käyttämällä 10 M NaOH:a. Liuos jaettiin 50 ml NUNC-putkiin, joihin lisättiin n. 0,5 ml:a 2-iminobiotiini resiiniä. Resiini oli pesty 50 ml:lla pH 11-puskuria. NUNC-putkia inkuboitiin yhden tunnin ajan kylmähuoneen veriputkisekoittajassa. Inkuboinnin jälkeen NUNC-putket sentrifugoitiin Hettich Zentrifugen Rotina 48R sentrifuugilla viiden minuutin ajan 500 G:n voimalla (1400 rpm). Supernatantti kaadettiin varovasti pois ja säilöttiin pakastimeen $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:een lämpötilaan, siltä varalta, ettei proteiini olisi tarttunut resiiniin. Tässä vaiheessa supernatantista otettiin 100 μl :n näyte (L2), johon lisättiin 100 μl :a SDS-PAGE näytepuskuria. Resiini pestiin tämän jälkeen pH 11-puskurilla ja sentrifugoitiin edellä mainitulla tavalla. Tämä pesu toistettiin kaksi kertaa. Pesujen jälkeen agarosi siirrettiin kolumniin käyttämällä pH 11-puskuria ja pestiin valuttamalla 20 ml pH 11-puskuria kolumnin läpi. Proteiini eluointiin 0,5 M etikkahapolla. Yhden ml:n eluointifraktioita otettiin 15 kappaletta ja ne säilöttiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan. Jokaisesta fraktiosta otettiin myös 10 μl :n näyte, joka sekoitettiin 10 μl :an SDS-PAGE näytepuskuria. Fraktioista mitattiin myös absorbanssi arvo 280 nm aallonpituudella NanoDropilla (ohjelma 1000 v3.2.1) (A280) proteiinkonsentraation laskemiseksi. Tällä aallonpituudella vain aromaattiset aminohapot ja kysteini absorboivat merkittävästi. Kun absorboivien aminohappojen molaarinen absorbtiviteetti tiedetään (tryptofaani 5500, tyrosiini 1490 ja kysteini 125) (Pace ym., 1995), voidaan proteiinin molaarinen absorbtiviteetti laskea, kunhan sen aminohapposekvenssi tunnetaan. Konsentraatio voidaan laskea kaavasta, jossa A on absorbanssi, ϵ on molaarinen absorbtiviteetti ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), c on konsentraatio ja l on kyvetin paksuus senttimetreinä: $A=\epsilon cl$

3.3 Strongavidiinin karakterisointi

3.3.1 SDS-PAGE

Fraktioista otetut näytteet ajettiin seuraavaksi SDS-polyagryyliamidigeelielektroforeesilla Bio-Radin ajolaitteella PowerPac BasicTM puhdistuksen onnistumisen arvioimiseksi. Elektroforeesissa käytettiin epäjatkovaa puskurisysteemiä (Laemmli 1970). Ensin valettiin ajogeeli (n. 2 cm:n päähän yläreunasta), jonka annettiin polymerisoitua. Ajogeeelin yläreuna

peitettiin tislattulla vedellä kuivumisen estämiseksi. Ajogeelin polymerisoitua vesi poistettiin, lasilevyjen väli täytettiin ylägeeliseoksella, ja näytekampa asetettiin paikoilleen. SDS-PAGE:a varten valmistettiin 15 % erottelugeeli (ajogeeli) ja 5 % konsentroitugeeli (ylägeeli) (Liite III). Kaivoihin pipetoitiin näytettä 16-25 µl ja molekyylipainomarkkeria 6 µl (PageRuler™, Fermentas). Ajolaite täytettiin SDS-ajopuskurilla. Geeliä ajettiin 80–100 V jännitteellä 20 minuuttia ja 180–200 V jännitteellä kunnes väriaine oli saavuttanut geelin alaosan ollen siitä noin yhden senttimetrin päässä.

Eluutiiofraktioista otettiin myös 20 µl:n näytteet, joihin lisätyissä 20 µl:ssa SDS-PAGE näytekupuria (2X) ei ollut β-merkaptopetanolia (ei-pelkistävä käsittely). Näille näytteille tehtiin SDS-PAGE ajo edellä kuvatulla tavalla.

3.3.2 Coomassie- värjäys

SDS-PAGE ajon jälkeen geeleille tehtiin Coomassie värjäys. Värjäyksessä käytettiin Coomassie Brilliant Blue R250 väriä (Serva). Astiaan, jossa geeli oli, lisättiin noin 20 ml värjäysliuosta. Värjäystä jatkettiin yön yli ja seuraavana päivänä väri poistettiin värinpoistoliuoksella, kunnes väriä ei enää lähtenyt geelistä. Tämän jälkeen geeli värjättiin uudelleen Coomassilla 1–2 tunnin ajan, jonka jälkeen väri poistettiin jälleen värinpoistoliuoksella kunnes geelistä ei enää irronnut väriä. Lopuksi geeli skannattiin.

3.3.3 Immunoblottaus

SDS-PAGE:n jälkeen proteiinit voitiin siirtää, vaihtoehtona Coomassie-värjäykselle, nitroselluloosafilterille western blottauksella. Western blottaus suoritettiin osalle strongavidiini sekä avidiini, ja streptavidiini näytteille. Tässä kokeessa oli tarkoituksena tehdä strongavidiinille immunovärjäykset avidiini- ja streptavidiinivasta-aineilla blottauksen jälkeen, jotta nähtäisiin, ristiinreakoiko strongavidiini avidiinin tai streptavidiinin kanssa. Siirto tehtiin Bro-Radin Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell-laitteella. Proteiinien siirto geelistä nitroselluloosalle kesti 60 minuuttia, kun ajo tehtiin 100 V jännitteellä. Siirrossa käytetyn ajopuskurin lämpötila oli +4 °C ja ajo suoritettiin kylmähuoneessa. Mukana oli myös jääblokki vähentämässä sähkövirrasta johtuvaa lämpenemistä. Siirtopuskuria sekoitettiin koko ajon ajan magneettisekoittajalla

(laite ja teho). Ajon jälkeen geelit pestiin 20 ml:ssa TBS-puskuria 5 minuuttia huoneenlämpötilassa. Kahdelle nitroselluloosafiltterille tehtiin blokkaukset 5 %:lla maitojauheella TBS-puskurissa yön yli +4 °C:een lämpötilassa. Blokkauksen jälkeen filtrit pestiin kolme kertaa TBS-puskurilla (n. 3 minuuttia/kerta). Yksi filtri värjättiin 20 ml:ssa Ponceau-värjäysliuosta 5 minuuttia huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen ylimääräinen väri huuhdottiin vedellä pois, jolloin voitiin nähdä selluloosakalvolle tarttuneet proteiinit.

Blokatuille filtereille tehtiin vasta-aine värjäykset epäsuoralla vasta-ainevärjäyksellä. Ensimmäisen polyklonaalisen vasta-aineen (Oulun yliopisto) anti-AVD (1:5000, liuottimena 5 % maitojauhe TBS-tween puskurissa) tai anti-SA (Rabbit anti-streptavidin antiserum, Bayer) (1:5000, liuottimena 5 % maitojauhe TBS-tween puskurissa) annettiin vaikuttaa keinuttajassa yhden tunnin ajan huoneenlämpötilassa (20 ml/ blottaus). Tämän jälkeen vasta-aine pestiin pois kolmeen kertaan TBS-tweenillä (n.3 minuuttia/ kerta). Seuraavaksi lisättiin sekundääri vasta-aine GAR-AP (anti-Rabbit IgG, antibody developed in goat, Sigma) (1:2000, liuottimena 5 % maitojauhe TBS-tween puskurissa) yhden tunnin ajaksi keinuttajassa (20 ml/ blottaus). Sekundääri vasta-aine pestiin pois käyttämällä kolme kertaa TBS-tweeniä (n. 3 minuuttia/ kerta). Pesun jälkeen filtereitä huuhdeltiin APA-puskurilla viiden minuutin ajan huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen ne värjättiin (6 ml APA, 60µl NBT, 60µl BCIB/ blottaus) noin viiden minuutin ajan pimeässä. Lopuksi värjäys pysäytettiin tislattulla vedellä ja filtereiden annettiin kuivua huoneenlämpötilassa.

3.3.4 Dot- blottaus

Ristiinreakoimiskokeena käytettiin myös koetta, jota tässä nimitetään dot-blottaukseksi. Kahdelle nitroselluloosafiltterille pipetoitiin kolme erikokoista tippaa strongavidiniä, avidiniä ja streptavidiniä. Tippojen proteiinipitoisuus oli 1 mg/ ml ja niiden määrät olivat 1 µl, 3 µl ja 10 µl. Tippojen annettiin kuivua huoneenlämmössä, kunnes filtri oli täysin kuiva. Tämän jälkeen filtereille tehtiin vasta-ainevärjäys streptavidini ja avidiinivasta-aineilla.

Ensiksi filtereille tehtiin blokkaukset 5 %:lla maitojauheella (liuottimena TBS-puskuri) yön yli +4 °C:een lämpötilassa. Seuraavat vaiheet tapahtuivat huoneenlämmössä. Tämän

jälkeen filtrit pestiin kolmeen kertaan TBS-puskurilla (3 minuuttia/ kerta). Seuraavaksi toiseen filteriin lisättiin 20 ml primaarivasta-ainetta anti-AVD (1:5000, liuottimena 5 % maitojauhe TBS-tween puskurissa) ja toiseen primaarivasta-aine anti-SA (1:5000, liuottimena 5 % maitojauhe TBS-tween puskurissa). Vasta-aineiden annettiin vaikuttaa yhden tunnin ajan keinuttajassa, jonka jälkeen ne pestiin pois TBS-tween puskurilla kolmeen kertaan (3 minuuttia/ kerta). Sekundääri vasta-aineen GAR-AP (1:2000, liuottimena 5 % maitojauhe TBS-tween puskurissa) annettiin vaikuttaa myös yhden tunnin ajan keinuttajassa. Sekundääri vasta-aine pestiin pois samaan tapaan, kuin primaari vasta-aine. Näiden pesujen jälkeen filtrit pestiin vielä APA-puskurilla viisi minuuttia (20 ml/ blottaus). Lopuksi filtrit värjättiin (6 ml APA, 60 μ l NBT, 60 μ l BCIB/ blottaus) pimeässä. Värjäysliuoksen annettiin vaikuttaa 5–10 minuuttia, jonka jälkeen se pestiin pois vedellä. Lopuksi filtereiden annettiin kuivua.

3.3.5 Lämpöstabiilisuuskokeet

Proteiinien lämpökestävyyttä tutkittiin tekemällä niille lämpökäsittely (Bayer ym., 1996). Näytteiden lämpöstabiilisuus testattiin biotiinin kanssa ja ilman sitä, koska biotiini stabiloii avidiinin tetrameerin rakennetta. Näytteissä oli proteiini noin 600 μ l/ ml ja sitä pipetoitiin 7 μ l/ näyte Eppendorf- putkiin. Biotiinia lisättiin 5 μ l/ näyte (0,17 mg/ ml). Ilman biotiinia käsiteltäviin näytteisiin lisättiin 5 μ l tislattua vettä. Ensimmäisellä kerralla ilman biotiinia olevat näytteet käsiteltiin 20 minuuttia lämpötiloissa: RT, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ja 80 °C. Näytteitä, joihin oli lisätty biotiinia, pidettiin 20 minuuttia lämpötiloissa: RT, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ja 100 °C. Lämpötilat oli säädetty, joko lämpöblokkiin tai PCR- laitteeseen. Lämpöblokkissa oli mukana lämpömittari. Biotiini-näytteiden 90 °C:een lämpötila vaihteli välillä 85–90 °C:tta ja 95 °C:een lämpötila välillä 95–97 °C:tta. Biotiini-näyte, joka oli 85 °C:een lämpötilassa, oli siinä 22 minuuttia. Lämpökäsittelyn jälkeen näytteet siirrettiin jäähauteelle.

Lämpökäsittelyn jälkeen näytteet ajettiin 15 %:ssa SDS-PAGE geelissä. Jokaiseen näytteeseen lisättiin ennen ajoa SDS-PAGE näytekuskuria 12 μ l:aa (2X). Ajon jälkeen geelit värjättiin coomassie-värillä ja skannattiin.

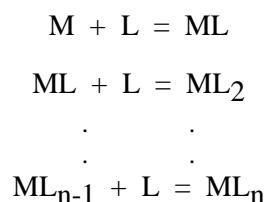
Tulosten pohjalta tuotetulle proteiinille tehtiin uusi lämpötilakäsittely eri lämpötiloilla. Ilman biotiinia olevat näytteet pidettiin huoneen lämpötilassa (RT), 30 °C, 40 °C ja 51 °C ja biotiinin kanssa olevat näytteet pidettiin huoneen lämpötilassa (RT), 60 °C, 70 °C ja 75 °C 20 minuuttia. Myös näille näytteille tehtiin SDS-PAGE analyysi.

3.3.6 Proteiini biotiininsitomiskyvyn määrittäminen ITC-menetelmällä

Mittaukset tehtiin VP-ITC- laitteella (MicroCal, LLC) ja tulokset käsiteltiin ja arvioitiin laitteen sisältämällä VPViewer ja Origin software ohjelmilla (Perozzo ym., 2004). Menetelmä perustuu monimutkaisten proteiini-ligandi sitoutumisista aiheutuvien lämpötilamuutosten mittaamiseen nesteestä vakio­lämpötilassa. Muodostuva tai sitoutuva lämpö mitataan kalorimetreissä ja tämä on ainoa menetelmä, joka mahdollistaa makromolekyylien välisten ja sisäisten fysikaalisten voimien suoran tutkimisen mittaamalla niiden aiheuttamia lämpötilavaikutuksia. Laitteessa on kaksi solua, referenssi- (sisältää vettä) ja näytesolu. Näytesoluun pipetoidaan 1,3 ml makromolekyylin sisältämää liuosta, jonka konsentraatio tunnetaan. Tähän liuokseen titrataan ruiskulla ligandia, jonka konsentraatio myös tunnetaan, kunnes tasapaino on saavutettu. Laite seuraa pipetoinnin jälkeistä lämpötilaeroa näiden kahden solun välillä ja muuntaa sen voimayksiköiksi.

Menetelmä mahdollistaa tasapainovakion (K_B) ja siten Gibb­sin vapaaenergian muutoksen (ΔG), entalpiamuutoksen (ΔH), entropiamuutoksen (ΔS) assosiaatiotapahtuman stokiometrian, ja melkein koko tapahtuman vuorovaikutusten termodynaamisen luonteen yhtäaika­isen määrittämisen.

Ligandin L sitoutuminen makromolekyylin M identtisiin sitoutumiskohtiin n



yhden sitoutumiskohdan vakio on

$$K = \frac{[\text{täytetyt kohdat}]}{[\text{tyhjät kohdat}][X]}$$

ja

$$\Delta G^0 = -R T \ln K = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

Jossa ΔG^0 , ΔH^0 ja ΔS^0 ovat vapaaenergia, entalpia, ja entropiamuutos yhdelle sitoutumiskohdalle.

Mittaamalla isotermistä sitoutumista toisessa lämpötilassa mahdollistaa sitoutumisen lämpökapasiteetin muutoksen määrittämisen suhteesta:

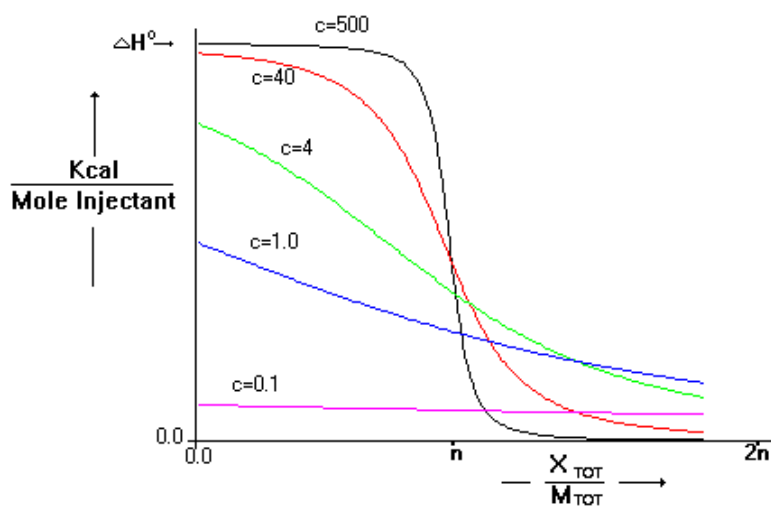
$$\Delta C_p = \frac{\Delta H^0_{T2} - \Delta H^0_{T1}}{T2 - T1}$$

Tiedetään, että ΔC_p on hyvä indikaattori sitoutumistapahtuman hydrofobisille vuorovaikutuksille olemalla negatiivinen, jos hydrofobisia siltoja muodostuu ja positiivinen jos niitä rikkoutuu.

Parametri, joka määrittelee isotermisen sitoutumisen muodon, on ilman yksikköä oleva vakio c , joka on vakio K kerrottuna makromolekyylin konsentraatiolla kokeen alussa M_{tot} kerrottuna stokiometrialla parametrilla, n .

$$c = KM_{tot}^n$$

Kun mahdollista $c:n$ arvon tulisi olla välillä 5 ja 500, jotta sitoutuminen olisi voimakkuudeltaan keskinkertaista (Kuva 3.3).



Kuva 3.3. Parametrin c suhde makromolekyylin konsentraatioon ja niiden vaikutus sitoutumisreaktioon. Kun $c:n$ arvo on pieni, on nähtävissä melkein horisontaalisessa tasossa oleva viiva ja $c:n$ arvon kasvaessa sitoutuminen voimistuu ja viiva jyrkkenee (VP-ITC User Manual).

Makromolekyylin konsentraation valinta riippuu mittauksen tavoitteista (eli halutaanko mitata vain sitoutumistapahtuman ΔH° , vai halutaanko määrittää lisäksi n ja K) ja K :n suuruudesta. Konsentraatiota päätettäessä täytyy huomioida myös, että VP-ITC- laitteen herkkyys on 0,1 μcal injektiota kohden, joten lämpöä pitäisi syntyä tai sitoutua ainakin 3–5 μcal 1,3 ml soluun, jotta mittaus olisi tarkka.

Tämä koe suoritettiin 25°C:ssa, strongavidiinin (makromolekyyli) konsentraatio oli 30 μM , biotiinin (ligandi) 0,4 mM ja 2- iminobiotiinin 0,4 mM. Proteiini ja ligandit dialysoitiin ITC- puskuriin, jonka pH oli 7. Strongavidiini ja 2- iminobiotiini dialysoitiin myös ITC- puskureihin, joiden pH:t olivat 9 ja 11. Dialyysit suoritettiin yön yli +4°C:een lämpötilassa ja dialyysiliuoksen tilavuus oli 400 ml. Ligandin injektio suoritettiin 25 kertaa. Ensimmäisen injektion tilavuus oli 1 μl ja loppujen 10 μl . Titrausliuoksen sekoitusnopeus oli 300 rpm. Kontrolleina tehtiin samat mittaukset myös avidiinille.

3.3.7 ELISA-analyysit

Strongavidiinin immunologisia ominaisuuksia tarkasteltiin epäsuoralla ELISA-menetelmällä (Engvall ja Perlmann, 1972) aikaisempia julkaisuja soveltaen (Hytönen ym., 2003, Nordlund ym., 2005). Määrittämisessä käytettiin avidiinille ja streptavidiinille altistettujen potilaiden seeruminäytteitä. Positiiviset ja negatiiviset kontrollinäytteet oli kerätty Division of Nuclear Medicine laitoksella (European Institute of Oncology, Milan, Italy). Määrittämisessä analysoitiin proteiinien kouttausvoimakkuus, strongavidiinin ristiinreagoiminen avidiinin ja streptavidiinin kanssa sekä seerumikokeet.

Analyysi aloitettiin kiinnittämällä tutkittavat proteiinit 96-kuoppaiselle Maxisorp Nunc-Immuno plate levyille (NuncTM) pipetoimalla 50 μl avidiinia ja streptavidiinia (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pH 9,6 Na-fosfaattipuskurissa ja strongavidiinia 50 μl (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pH 9,6 Na-karbonaattipuskurissa. Levyä inkuboitiin kaksi tuntia +37 °C:ssa. Tämän jälkeen kuopat pestiin kolmeen kertaan 300 μl PBS-tween-puskuria (0,05 %) huoneenlämmössä. Vapaiden sitoutumispaikkojen blokkaukset suoritettiin 1 %:lla PBS-BSA-liuoksella (300 μl /kuoppa, 30 min, +37 °C), jonka jälkeen kuopat jälleen pestiin PBS-tween-puskurilla (3X300 μl , 0,05 %).

Primaari vasta-aineena kuoppiin pipetoitiin 50 μ l polyklonaalista avidiini (Oulun yliopisto) ja streptavidiinin vasta-ainetta (Rabbit anti-streptavidini antiserum, Bayer) laimennettuna PBS-tween-puskuriin (0,05 %) 1:2000 tai potilasseerumia laimennettuna PBS-tween-puskuriin 1:100. Primaari vasta-aineen lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin +37 °C:een lämpötilassa yhden tunnin ajan, jonka jälkeen kuopat pestiin 0,05 %:lla PBS-tween-puskurilla kolmeen kertaan (300 μ l/kuoppa). Levyssä oli mukana kontrollina kuopat, joista puuttui primaari vasta-aine. Kouttauskokeessa primaari vasta-ainetta ei pipetoitu.

Sekundääri vasta-aineena potilasseerumi kuoppiin pipetoitiin 50 μ l anti-human polyvalent immunoglobuliineja (α -, μ - ja γ - chain specific, Sigma) laimennettuna 1:6000 PBS-tween-puskurilla (0,05 %). Anti-SA ja anti-AVD kuoppiin pipetoitiin 50 μ l GAR-AP (anti- Rabbit IgG, antibody developed in goat, Sigma) laimennettuna 1:2000 PBS-tween-puskurilla (0,05 %). Kouttauskoe kuoppiin lisäti 50 μ l Biotinyloitu-AP, joka oli laimennettu PBS-tween-puskurilla (0,05 %) 1:2000. Sekundääri vasta-aineita inkuboitiin yhden tunnin ajan +37 °C:een lämpötilassa, jonka jälkeen kuopat pestiin PBS-tween-puskurilla (0,05 %, 3X200 μ l/ kuoppa ja 3X400 μ l/ kuoppa) huoneenlämpötilassa.

Määrityksen lopuksi kuoppiin lisäti 100 μ l/kuoppa PNPP-liuosta (AP-substraattiliuosII). Levy suojattiin valolta ja mittaus aloitettiin välittömästi huoneenlämpötilassa PNPP-liuoksen lisäämisen jälkeen automaattisella ELISA- lukulaitteella (Labsystems Multiskan[®] Plus) viiden minuutin välein 45 minuutin ajan aallonpituudella 405 nm.

3.4 Proteiinin teorettinen tarkastelu

Strongavidiinin teoreettisia ja avidiinin kaltaisten domeenien ominaisuuksia tarkasteltiin erilaisilla ohjelmilla.

Strongavidiinin cDNA-sekvenssin translaatiossa käytettiin apuna DNAMAN-ohjelmaa. Proteiinin isoelektrinen piste (pI) ja teorettinen molekyyli massa laskettiin ExPASyn ProtParam ohjelmalla (<http://us.expasy.org>) (Bjellqvist ym.,1994, Bjellqvist ym., 1993). ProtParam ohjelmaa käytettiin apuna myös molaarista absorptiviteettiä laskettaessa siten, että kaikki kysteiniinit osallistuvat rikkisiltojen muodostamiseen sekä siten, että kysteiniinit ovat vapaina.

4 TULOKSET

4.1 Avidiinin kaltaisen rekombinanttisen DNA:n rakentaminen

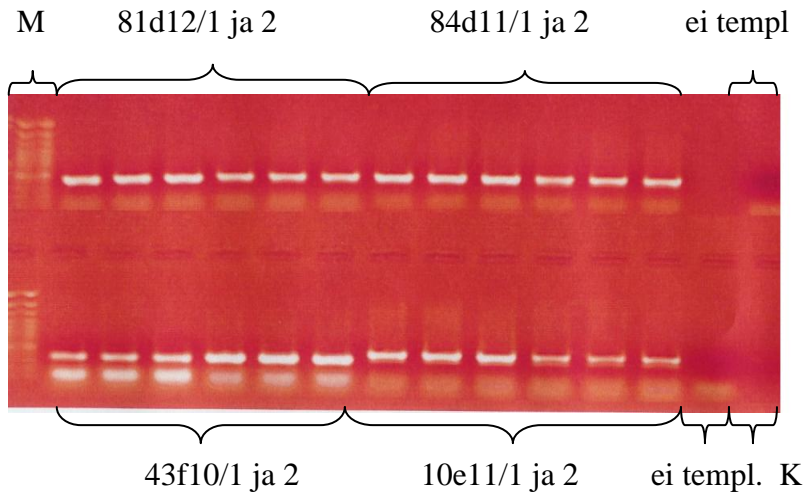
Tässä työssä käytetyt avidiinin kaltaisten proteiinien geenit saapuivat valmiina konstruktioina pCMVSPORT6.1 plasmidissa. Geenit oli löydetty EST-projektin yhteydessä National Institutes of Health'ssä merisiilestä *Strongylocentrotus purpuratus*.

4.1.1 Proteiinia koodaavan geenin sisältävän plasmidin monistaminen

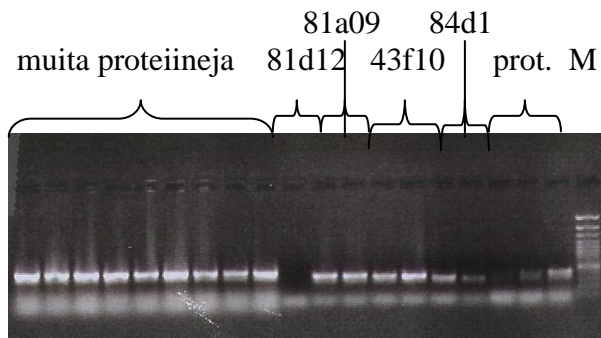
Strongavidiniin sisältämällä pCMVSPORT6.1 vektoreilla transformoitiin One Shot[®] TOP 10 *E. coli* soluja. Maljat sisälsivät ampicilliinantibiootin ja vektorissa oli ampicilliini-resistenssigeeni, joten transformaation onnistuminen pystyttiin havaitsemaan bakteeripesäkkeiden kasvuna maljalla. Alkuperäinen oletus siitä, että plasmidien määrä eluutioliuoksessa olisi pieni, osoittautui oikeaksi, sillä pesäkkeitä ilmestyi n. 2–5 pesäkettä/malja, kun eluutioliuosta oli otettu 100 µl:aa. Plasmidia haluttiin monistaa ennen PCR:n aloittamista, joten maljalta valittiin kaksi pesäkettä, joita kasvatettiin kasvatusmediumissa yön yli. Mediumissa oli mukana ampicilliinia selektion mahdollistamiseksi. Bakteerien kasvu havaittiin seuraavana aamuna kasvatusmediumin samentumisena. Tässä vaiheessa kaikki viisi konstruktioita olivat kasvaneet.

4.1.2 Bakteeriperäisen OmpA signaalisekvenssin rakentaminen PCR:n avulla

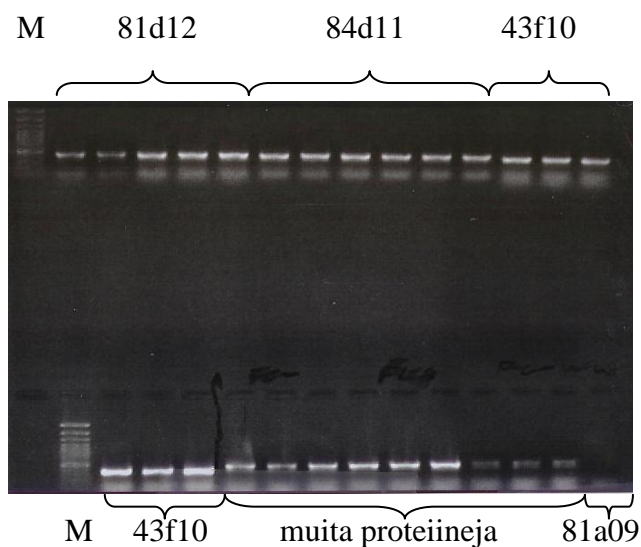
Bakteeriperäisen *Bordetella avium* OmpA signaalisekvenssi kloonattiin proteiinin geenin eteen, jotta strongavidini saatiin ohjattua periplamiseen tilaan proteiinin puhdistamisen helpottamiseksi (Hytönen ym., 2004). Sekvenssin rakentaminen suoritettiin kahdessa osassa monistamalla strongavidiniin geenialuetta SES-PCR:n avulla. Tulokset analysoitiin 1,5 % agarosigeelin avulla ja UV-valaisua käyttämällä geelistä löydettiin oikean kokoiset DNA-tuotteet (Kuvat 4.1, 4.2 ja 4.3). Proteiini konstruktioista 81a09 ei missään vaiheessa saatu minkäänlaista DNA-tuotetta SES-PCR:ssä.



Kuva 4.1. Vaiheen I DNA-tuotteet proteiineista 81d12, 84d11, 43f10 ja 10e11 SES-PCR:llä kloonattuina. Mukana bändit, joissa ei ole mukana templaattia, sekä bändi, jossa on kontrollina avidiinin DNA-tuote. Kontrollissa oli mukana niin vähän DNA:ta, ettei se tässä kuvassa enää juuri näy. Kuvassa M on markkeri.



Kuva 4.2. SES-PCR DNA-tuotteet 81a09, 81d12, 84d11 ja 43f10 vaihe I. Kuvassa myös muiden fibrobelliinien DNA-tuotteita. Kuvassa M on markkeri.



Kuva 4.3. Kuvassa SES-PCR DNA-tuotteita proteiineista 81d12, 84d11 ja 43f10 vaiheesta II, sekä proteiinin 81a09 kuva vaiheesta I. Kuvassa M on markkeri.

4.1.3 Vektorin valmistus ohjaavan TOPO[®] kloonauksen avulla

Jäljellä olevien neljän proteiinin geenit kloonattiin pET101/D-TOPO (5753 bp) vektoriin ohjaavan TOPO[®] kloonauksen avulla. Vektorit sisältävät ampicilliiniresistenssigeenin, joten transformaation jälkeen TOP10 *E.coli* solut maljattiin ampicilliinin sisältämille maljoille, jolloin oikeiden pesäkkeiden valinta oli mahdollista suorittaa antibioottiselektiolla. Seuraavana päivänä maljoilla kasvoi useita satoja pesäkkeitä. Transformaation onnistumisen kontrollina käytettiin lisäksi kaupallista pUC vektoria, joka kasvoi antibiootti maljalla. Pesäkkeitä oli useita satoja.

Jokaiselta neljältä maljalta valittiin yksi pesäke jatkosiirrosta varten. Tämä pesäke siirrettiin kasvamaan kasvatusmediumiin ja seuraavana päivänä kasvu oli mahdollista havaita sumentuneena liuksena.

4.1.4 Plasmidin tarkistussekvensointi

Ennen proteiinien tuottamista täytyi niiden sisältämille pET101/D-TOPO vektoreille suorittaa tarkistussekvensointi. Sekvensointituloksena saatiin kaksisuuntainen sekvenssi insertioalueesta. Tulosta verrattiin DNAMAN-ohjelman avulla tietokannoista löytyviin cDNA-vastineisiin. Vain geenin 81d12 osalta havaittiin sekvenssien vastaavan toisiaan. Muistakin proteiineista saatiin sekvenssi, mutta ne eivät vastanneet alkuperäisiä. Sekvensointia yritettiin useamman kerran, mutta vain 81d12:sta saatiin alkuperäistä vastaava sekvenssi.

4.2 Proteiinin tuottaminen ja puhdistaminen

4.2.1 Proteiinin tuottaminen *Escherichia coli* soluissa

Strongavidiinia (muoto 81d12) tuotettiin yhteensä 7,7 litraa. Koetuotot olivat 200 ja 500 ml. Myös muodosta 10e11 tehtiin 200 ml koetuotto. Tästä tuotosta ei kuitenkaan tässä vaiheessa saatu puhdistettua proteiinia, joten seuraavaksi keskityttiin vain muodon 81d12 tuottamiseen ja karakterisoimiseen. Strongavidiini karakterisointia varten tehtiin ensin viiden litran ja myöhemmin kahden litran tuotot. Proteiinin tuotot tehtiin aikaisempiin

havaintoihin perustuen ilman erillistä tutkimusta tuoton optimoinnista (Nordlund ym., 2005; Hytönen ym., 2004) biotiinittomassa LB-mediumissa (Luria Bertami).

4.2.2 Proteiinin puhdistus

Merisiilestä *Strongylocentrotus purpuratus* löydettyä avidiinin kaltaista proteiinia ei aikaisemmin ole tuotettu, eikä puhdistettu, joten tutkimuksen tässä vaiheessa ei sopivaa puhdistusmenetelmää ollut tiedossa. Avidiinin kaltaisia proteiineja on aikaisemmin puhdistettu niiden biotiininsitomiseen perustuvalla affiniteettikromatografialla. Kiinteänä faasina voi olla biotiini tai sen analogi 2-iminobiotiini (Heney ja Orr, 1981). Aikaisempiin tutkimuksiin perustuen oletimme puhdistuksen onnistuvan 2-iminobiotiinilla strongavidiinin ja avidiinin samankaltaisuuden vuoksi (Airenne ym., 1997, Nordlund ym., 2005).

Avidiinin kaltaiset proteiinit sitoutuvat voimakkaasti 2-iminobiotiinin pH-alueella 9–11 ja sitoutuminen heikkenee pH laskiessa (Heney ja Orr, 1981). Muiden proteiinien poistamiseksi pylvästä sitä huuhdeltiin sitouttamisen jälkeen pH 11-puskurilla. Avidiini eluoituu pylvästä pH 4-puskurilla. Koetuotuoissa etsittiin pH aluetta, jolla proteiini eluoituisi pylvästä. Strongavidiinia yritettiin ensiksi eluoida pH 4 puskurilla. Eluutiiofraktioissa ei kuitenkaan havaittu proteiinia, kun ne tarkastettiin mittaamalla absorptioarvo 280 nm aallonpituudella. Myöskään 0,1 M etikkahapolla ei pylvästä saatu eluoitua proteiinia. Vasta 0,5 M etikkahapolla strongavidiinin sitoutuminen 2-iminobiotiiniin heikkeni ja proteiini irtosi resiinistä. Proteiinin havaittiin eluoituvan nopeasti neljännessä fraktioista alkaen (taulukko 4.1). Spektrofotometri kalibroitiin eluoimisliuoksella.

Taulukko 4.1. Proteiinipuhdistuksesta saatujen fraktioiden absorbanssit ja konsentraatiot (5 litran tuotossa) mitattuna. Strongavidiini eluoitui 0,5 M etikkahapolla melko tiiviinä pakettina fraktioihin 4–11. Fraktion 13 jälkeen ei enää eluoitunut merkittävää määrää proteiinia.

	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7	f8	f9	f10	f11	f12	f13
Abs	-0,023	0,015	0,06	3,91	3,07	9,06	9,02	6,64	1,88	0,535	0,248	0,115	0,038
mg/ml				1,41	1,11	3,28	3,27	2,4	0,68	0,19			

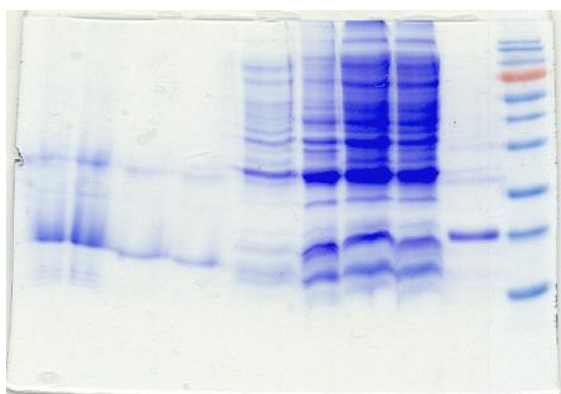
Taulukko 4.2. Kahden litran tuotosta tehdyn proteiinipuhdistuksen absorbanssit ja konsentraatiot

	f1	f2	f3	f4	f5	f6	f7	f8	f9	f10
Abs	0,005	-0,004	0,176	1,37	1,555	2,9	2,2	0,85	0,287	0,067
mg/ml NanoDrop			0,05	0,7	1,22	1,35	0,98	0,44	0,11	

Tuottojen tehokkuutta voidaan arvioida vertaamalla puhdistetun proteiinin saantoa kasvatusilavuuteen. Kahden litran tuoton saanto on (kokonaisproteiinimäärä) 4,85 mg, jolloin proteiinia saatiin 2,425 mg/litra kasvatusta. Viiden litran tuotosta saatiin proteiinia 2,576 mg/litra kasvatusta.

Puhdistuksen eri vaiheista otetuista näytteistä voitiin havaita proteiinin puhdistuneen ja konsentroituneen muista proteiineista. Puhdistusfraktioista valittiin SDS-PAGE analyysiä varten muutama fraktio, joissa oli merkittävä määrä proteiinia. Kuvassa 4.4 näkyy puhdistukset eri välivaiheista ja fraktioista otetut näytteet. Näyte T on otettu sonikoinnin jälkeen koko solumassasta, L1 on solujen erottamisen jälkeen jääneet liukoiset proteiinit, S on sentrifugoituun soluainekseen jääneet liukenemattomat proteiinit ja L2 on resiiniin tarttumattomat proteiinit.

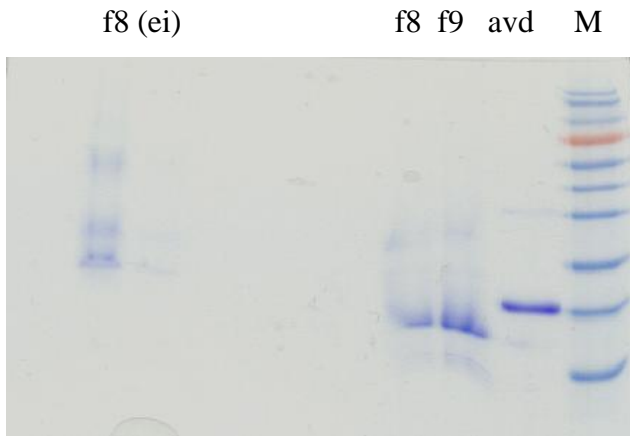
f7 f6 f5 f4 L2 S L1 T avd M



Kuva 4.4. Puhdistuksen eri vaiheista ja puhdistusfraktioista tehty SDS-PAGE analyysi, joka on värjätty coomassie-värjäyksellä. Näyte M on markkeri molekyylipainon määrittämiseksi. Näyte T on totaalinäyte, jossa on mukana kaikki proteiinit ja solumassa. Näyte L1 liukoinen faasi sentrifugoinnin jälkeen. Näyte S on liukenematon faasi sentrifugoinnin jälkeen. Näyteessä L2 on mukana ne proteiinit, jotka eivät tarttuneet resiiniin. Fraktioiksi on valittu sellaiset, joissa oli mukana merkittävä määrä proteiinia. Mukana oli vielä lisäksi avidiini kontrolli avd selvittämässä oikeaa suuntaista molekyylipainoa.

4.2.3 SDS-PAGE ilman β -merkapttoetanolia

Viiden litran kasvatuksesta fraktiosta kahdeksan valmistettiin näyte, johon lisätyssä SDS-PAGE näytekurissa (2X) ei ollut β -merkapttoetanolia (ei-pelkistävä käsittely). Näyteelle tehtiin normaali SDS-PAGE ajo, jonka jälkeen geeli värjättiin coomassie värillä (kuva 4.5).



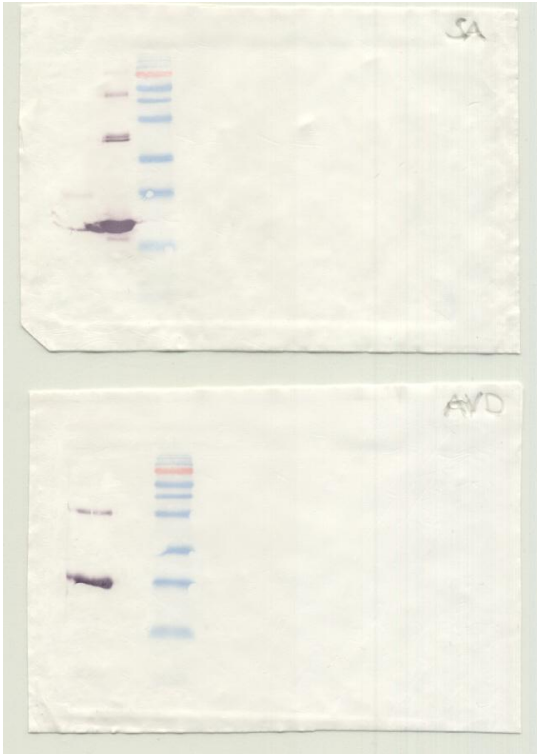
Kuva 4.5. SDS-PAGE ajo, jossa fraktiossa kahdeksan on näytekuri (2X) ilman β -merkapttoetanolia (f8 (ei)). Mukana on avidiini kontrolli (AVD) ja markkeri (M) molekyylipainon määrittämiseksi. Mukana ovat myös fraktiot kahdeksan ja yhdeksän (f8 ja f9), joissa on mukana β -merkapttoetanolii.

Ilman β -merkapttoetanolia ajetusta näytteestä voidaan nähdä molekyylipainoltaan raskaampia kokonaisuuksia kuin avidiinin monomeeri. Tästä voidaan päätellä, että strongavidiinilla on monomeerien välisiä rikkisiltoja. Avidiinilla ei näitä monomeerien välisiä rikkisiltoja ole, ainoastaan monomeerin sisäisiä rikkisiltoja.

4.2.4 Immunoblottaus

Fraktioista yhdeksän ja kymmenen tehtiin immunoblottaus avidiini- ja streptvidiini vasta-aineilla ristiinreagoimisen määrittämiseksi (Kuva 4.6) sekä Ponceau värjäys (Kuva 4.7).

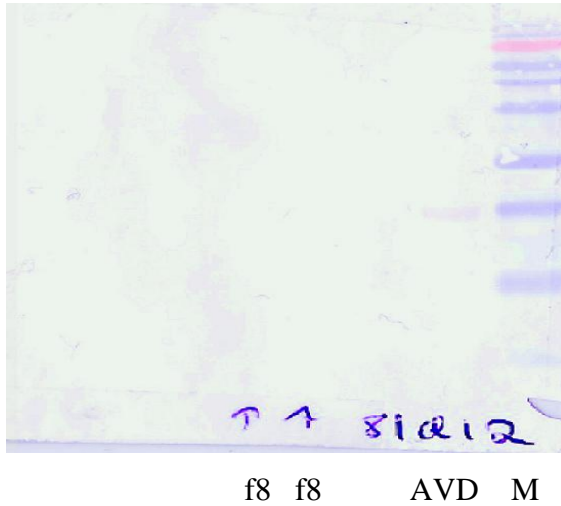
AVD SA M f9 f10



AVD SA M f9 f10

Kuva 4.6. Ylemmässä kuvassa filteri on värjätty streptavidini vasta-aineilla ja alemmassa kuvassa avidiini vasta-aineilla. Molemmissa on mukana avidiini (AVD), streptavidini (SA), markkeri (M) molekyylipainon määrittämiseksi sekä strongavidiinista fraktiot yhdeksän ja kymmenen (f9 ja f10).

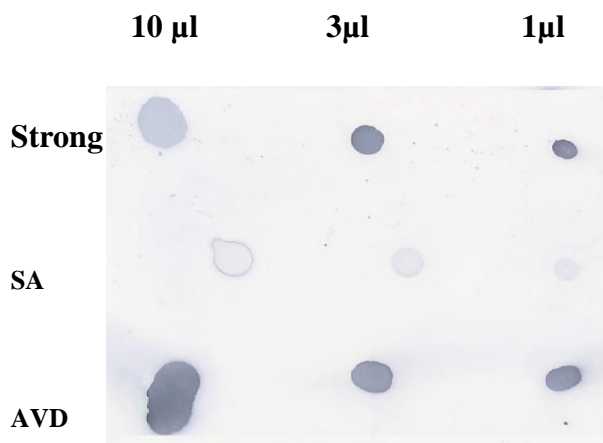
Immunoblottauksen jälkeen tehdyssä vasta-aine värjäyksessä ei voida nähdä strongavidini proteiinia. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että strongavidini ei ristiinreagoi avidiini- tai streptavidini vasta-aineilla. Ponceau värjätystä filteristä (Kuva 4.7) voidaan nähdä, ettei strongavidiniä ylipäänsä ole filterillä. Tämä todennäköisesti johtuu strongavidinin alhaisesta isoelektrisestä pisteestä (teoreettinen arvo on 3,91), jolloin proteiini liikkuu sähkövirrassa nopeammin kuin avidiini, streptavidini ja markkeri ja kulkeutuu filterin läpi.



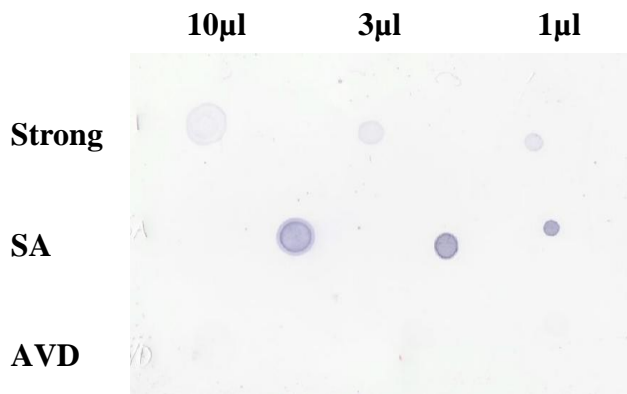
Kuva 4.7. Ponceau S värjätty filteri. Mukana olivat strongavidiini, joka ei värjäytynyt sekä avidiini markkeri (AVD), joka värjäytyi, ja molekyylipaino markkeri (M).

4.2.5 Dot- blottaus

Immunoblottauksen huonon tuloksen johdosta tarkastettiin strongavidiinin ristiinreagoiminen pipetoimalla strongavidiini, avidiini ja streptavidiini proteiineja suoraan selluloosa filterille sekä tekemällä niille vasta-aine värjäykset avidiinin ja streptavidiinin vasta-aineilla (Kuvat 4.8 ja 4.9). Strongavidiinin värjäytyvyys testattiin myös biotinyloidulla alkalisella fosfataasilla (AP) (Kuva 4.10).



Kuva 4.8. DOT-Blottaus ja vasta-aine värjäys avidiinin vasta-aineilla. Filterille imeytettiin 10µl, 3µl ja 1µl strongavidiini (Strong), avidiini (AVD) ja streptavidiini (SA) proteiineja. Tippojen, joiden proteiinkonsentraatio oli 1 mg/ml, annettiin kuivua puoli tuntia, jonka jälkeen niille tehtiin vasta-aine värjäys avidiinin vasta-aineilla. Strongavidiini ja avidiini värjäytyivät avidiinin vasta-aineilla.



Kuva 4.9. DOT-Blottaus ja vasta-aine värjäys streptavidiinin vasta-aineilla. Filtterille imeytettiin 10µl, 3µl ja 1µl strongavidiini (Strong), avidiini (AVD) ja streptavidiini (SA) proteiineja. Tippojen, joiden proteiinkonsentraatio oli 1 mg/ml, annettiin kuivua puoli tuntia, jonka jälkeen niille tehtiin vasta-aine värjäys avidiinin vasta-aineilla. Värjäyksen jälkeen huomattiin, että strongavidiini värjäytyi hieman streptavidiinin vasta-aineilla, streptavidiinin värjäytyessä kaikkein voimakkaimmin ja avidiinin jäädessä värjäytymättä kokonaan.



Kuva 4.10. Strongavidiinin värjäytyvyys testattiin myös biotinyloidulla alkalisella fosfataasilla. (AP).

4.2.6 Lämpöstabiiisuuskokeet

Lämpöstabiiisuuskokeiden avulla pyrittiin tutkimaan tuotetun strongavidiinin rakennetta ja lämpökestävyyttä sekä biotiinin vaikutusta siihen. Lämpökäsittelyn jälkeen näytteille tehtiin SDS-PAGE analyysi ja geelit värjättiin Coomassie-värillä (Bayer ym., 1996). Biotiinia (BTN) sitovien proteiinien on havaittu kestävän korkeampia lämpötiloja biotiinin sitouduttua niihin. Kanan avidiinin hajoaa monomeiksi ilman biotiinia 55–60 °C:ssa ja biotiinin kanssa 95–100 °C:ssa. Lämpökäsittelyt tehtiin talukon 4.3 mukaan.

Taulukko 4.3. Strongavidiinin lämpöstabiiisuuskokeet I

Lämpötilat ilman BTN (°C)	RT, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80
BTN kanssa (°C)	RT, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100

Ensimmäisessä lämpöstabiiisuuskokeessa biotiinittomien strongavidiininäytteiden havaittiin hajoaneen jo huoneen lämpötilassa. Näytteissä, joihin oli lisätty biotiinia,

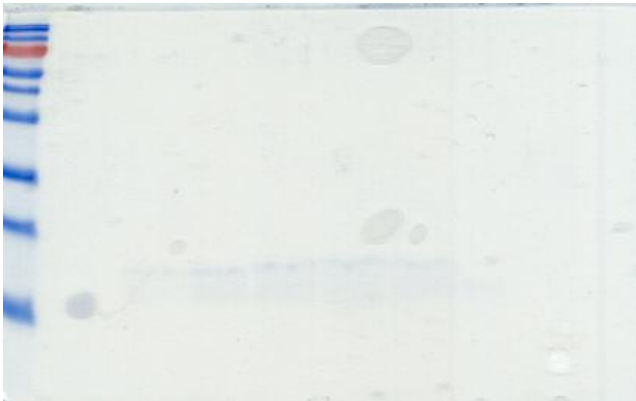
lämmönkestävyys oli noussut. Lämpötilan kohotessa voitiin proteiini-kompleksin denaturoituminen alayksiköiksi havaita monomeerisen proteiinin massaa vastaavan vyöhykkeen kasvamisena. Lämpöstabiilisuuskokeissa havaittiin biotiinin lisäävän strongavidiinin lämmönsietokykyä aina noin 75 °C asti.

M RT 50 55 60 65 70 75 80

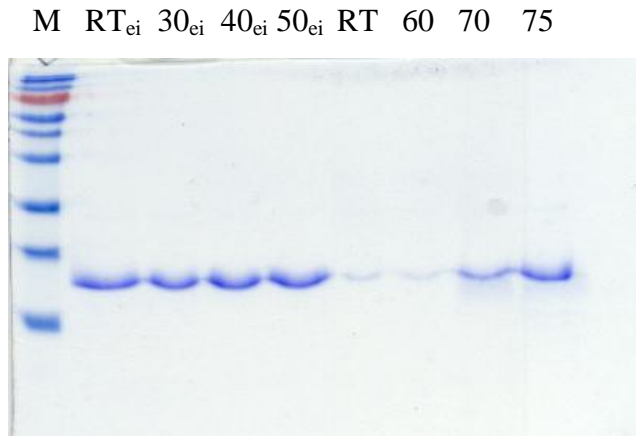


Kuva 4.11. Ilman biotiinia lämpötilakäsitellyt (I) strongavidiini näytteet. Mukana on molekyylipainomarkkeri kontrolli (M). Proteiini on hajonnut monomeeriseksi kaikissa lämpötiloissa.

M RT 70 75 80 85 90 95 100



Kuva 4.12. Biotiinin kanssa inkuboidut strongavidiininäytteet (lämpökäsittely I). Mukana on molekyylipainon määrittämiseksi kontrolli (M). Tuotettu proteiini näyttää esiintyvän tetrameerisenä ainakin osittain vielä 70 °C lämpötilassa. Osa proteiinista näyttää olevan niin isona kompleksina, ettei kulkeudu geelissä ollenkaan.



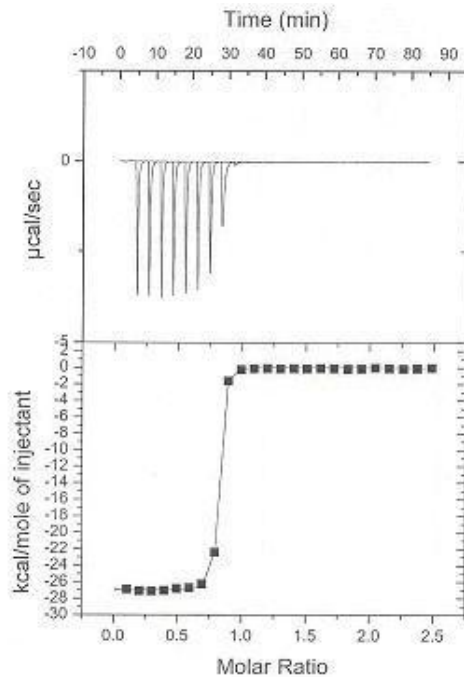
Kuva 4.13. Strongavidiinin lämpökäsittelykokeet II. Mukana on molekyylipainon määrittämiseksi kontrolli (M). Ensimmäiset neljä näytettä ovat proteiini ilman biotiinia ja jälkimmäiset neljä biotiinin kanssa. Ilman biotiinia strongavidiini on täysin monomeerisenä muotona. Biotiinin kanssa vielä 70 °C lämpötilassa osa proteiinista on tetrameerisenä muotona.

4.2.7 Proteiini biotiininsitomiskyvyn määrittäminen ITC- laitteella

Strongavidiinin biotiininsitomiskykyä määritettiin VP-ITC- laitteella (MicroCal, LLC) ja tulokset käsiteltiin ja arvioitiin laitteen sisältämällä VPViewer ja Origin software ohjelmilla (Perozzo ym., 2004). Aluksi määritettiin avidiinin biotiinin ja 2- iminobiotiinin sitomiskyky ITC- puskurissa pH 7 ja sen jälkeen strongavidiinille tehtiin samat mittaukset. Lopuksi avidiinin ja strongavidiinin biotiinin ja 2- iminobiotiinin sitomiskykyä mitattiin vielä ITC- puskurissa, jonka pH oli 11.

Avidiini sitoo biotiinia voimakkaasti ($K_d \sim 10^{-15}$ M), joten ITC-mittauksissa oli odotettavissa voimakas sitoutumisreaktio, johon strongavidiinia verrattiin. Proteiinin sitoutuessa ligandiin ITC- laite mittaa lämpötila muutoksen näytesolun ja referenssisolun välillä ja laitteen oma ohjelma muuttaa tuloksen graafiseen muotoon. Sitoutumisen voimakkuus vaikuttaa syntyvän tai sitoutuvan lämpöenergian määrään. Avidiini-biotiini titrauksen reaktio on voimakkaasti eksoterminen $\Delta H = -26,9$ kcal/mol pH 7 ITC-puskurissa. Reaktion tasapainon saavuttaminen riippuu käytetyn puskurin konsentraatiosta. Kuvassa 4.14 on kuvattu avidiinin kyllästyminen biotiinilla. Tuloksista on nähtävissä, että avidiinin monomeeri sitoo noin yhden biotiinin ($N = 0,78 \pm 8,49E^{-4}$). Tämä on todettu myös aikaisemmissa tutkimuksissa (Green 1975, 1990). Reaktion dissosiaatiokerto on ($K_B = 1/K_D$)

$K_D=4,9 \times 10^{-9}$ ja virhemarginaali on 12%. Vaikka virhemarginaali on kohtuullinen, on tulos kuitenkin VP-ITC laitteen mittausalueen ulkopuolella.

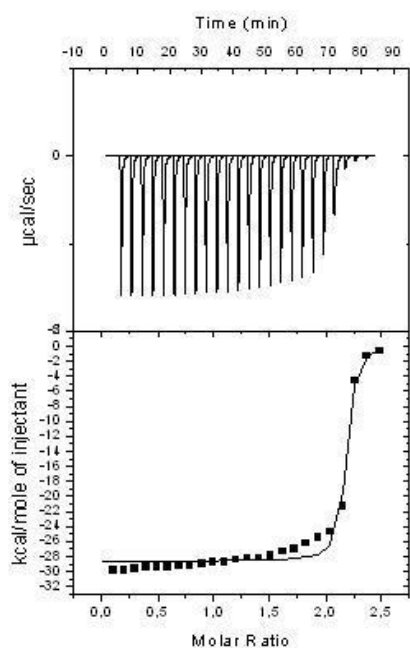


Data: Avidin- Btn 190106
 Model: OneSites
 $\chi^2/\text{DoF} = 2,241\text{E}4$
 $N = 0,780 \pm 8,49\text{E}-4$
 $K_B = 2,03\text{E}8 \pm 2,37\text{E}7$
 $\Delta H = -2,692\text{E}4 \pm 58,42$
 $\Delta S = -52,3$

$$\Delta G = -26920 \text{ cal/mol} - 298,15 \text{ K} * -52,3 \text{ cal/mol/K} = -11326,755 \text{ cal/mol} = -11,3 \text{ kcal/mol}$$

Kuva 4.14. Avidiini- biotiini titrauksen kromatogrammi pH 7:ssä. Yläosassa on raakadata, jossa vaiheessa 1 yhtään sitoutumispaikkaa ei ole vielä täytetty. Seuraavaksi sitoutumispaikkaa alkavat täyttyä ja lopuksi yhtään sitoutumispaikka ei enää ole vapaana. Alakuvassa on piirrettynä kuvaaja piikkien pinta-alasta (=pipetoinnista vapautunut energia) ligandin ja proteiinin konsentraatiosuhteen funktiona.

Strongavidiinin sitoutuminen biotiiniin on myös voimakkaasti eksoterminen ($\Delta H=-28,6$ kcal/mol) ollen samaa luokkaa avidiini-biotiini mittauksen kanssa. Tulosten perusteella strongavidiinin monomeeri näyttäisi sitovan kaksi biotiini molekyyliä ($N=2,14 \pm 0,00865$). Kuvaajan perusteella saturaatio saavutetaan melko myöhäisessä vaiheessa titrausta, joten strongavidiinin konsentraatio saattaa olla oletettua suurempi ja tästä syystä sitomispaikkojenkin määrä näyttäisi olevan avidiinia suurempi. Strongavidiinin ja biotiinin sitoutumisen tasapainovakion (K_b) virhemarginaali on 38% ja näin ollen dissosiaatiovakiota ei pystytä laskemaan. Reaktion entalpia energiasta on nähtävissä, että sitoutuminen on kuitenkin erittäin vahva ollen $> 10^{-12}$.

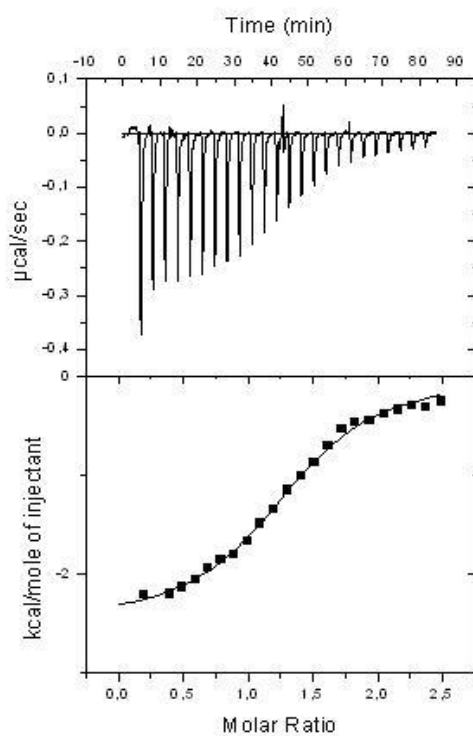


Data: Strongavidin- Btn 190106
 Model: OneSites
 Chi²/DoF = 1,242E6
 N 2,14 ± 0,00865
 K_B 5,27E7 ± 2,02E7
 ΔH -2,864E4 ± 264,5
 ΔS -60,7

$$\Delta G = -28640 \text{ cal/mol} - 298,15 \text{ K} * -60,7 \text{ cal/mol/K} = -10,542 \text{ kcal/mol}$$

Kuva 4.15. Strongavidiini- biotiini pH 7. Kuvasta on nähtävissä, että joko proteiinin konsentraatio on suuri tai sitomisaikojen määrä on suuri.

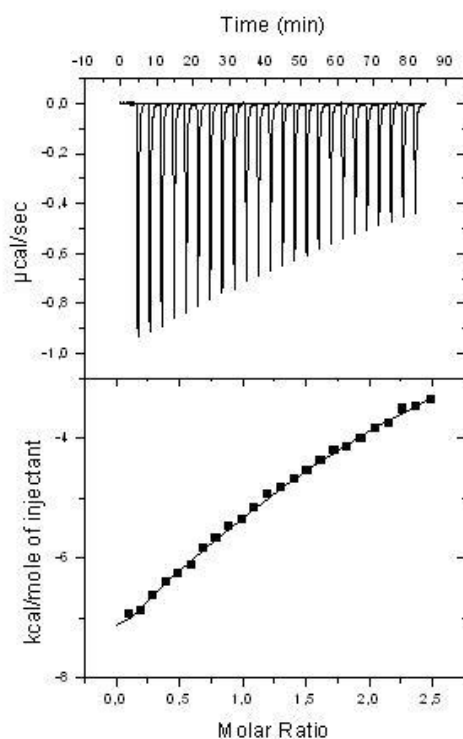
Kuvassa 4.16. on kuvattu avidiinin ja 2-iminobiotiinin sitoumisreaktio pH 7 ITC-puskurissa. Reaktio dissosiaatiovakio (K_D) on $3,3 \times 10^{-6}$ ja virhemarginaali on n. 7,8 %. Sitoutuminen on näin ollen heikompaa 2-iminobiotiinin kuin biotiiniin pH 7 ITC-puskurissa. Myös strongavidiinin sitoutuminen 2-iminobiotiiniin on heikompaa kuin biotiiniin pH 7 puskurissa ($K_D=9,9 \times 10^{-5}$ ja virhemarginaali n. 14 %). Kuvaajasta (Kuva 4.17) on kuitenkin nähtävissä, että selvää saturaatiota ei saavuteta.



Data: Avd – Btn
 Model: OneSites
 $\chi^2/\text{DoF} = 1611$
 $N = 1,34 \pm 0,0143$
 $K = 3,00E5 \pm 2,35E4$
 $\Delta H = -2492 \pm 41,01$
 $\Delta S = 16,7$

$$\Delta G = -7471,105 \text{ cal/mol} = -7,5 \text{ kcal/mol}$$

Kuva 4.16. Avidiini- 2-iminobiotiini pH 7.

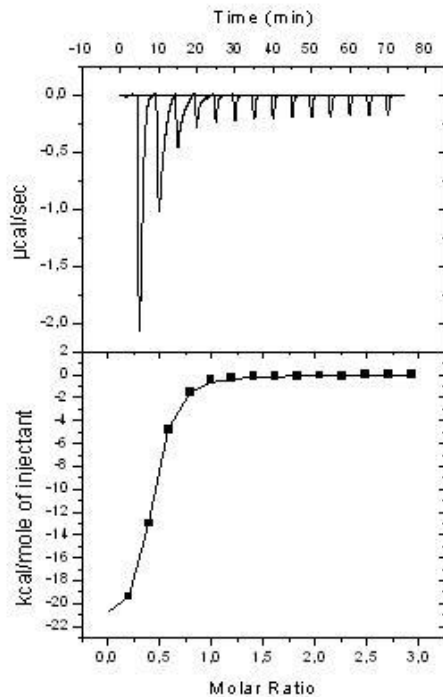


Data: strong – 2-iminoBtn
 Model: OneSites
 $\chi^2/\text{DoF} = 1841$
 $N = 2,28 \pm 0,122$
 $K_B = 1,01E4 \pm 1,38E3$
 $\Delta H = -1,750E4 \pm 1972$
 $\Delta S = -40,4$

$$\Delta G = -29515,26 \text{ cal/mol} = -29,5 \text{ kcal/mol}$$

Kuva 4.17. Strongavidini-2-iminobiotiini ($c_{2\text{iminoBtn}} = 0,4 \text{ mM}$, pH 7)

Avidiinille suoritetuissa mittauksissa pH 11 ITC-puskurissa dissosiaatiovakioksi biotiinin kanssa saatiin $K_D=8,2 \times 10^{-7}$ (Kuva 4.18) ja 2-iminobiotiinin kanssa $K_D=7,8 \times 10^{-8}$ (Kuva 4.19). Virhemarginaaliksi mittauksissa biotiinin kanssa saatiin noin 6% ja 2-iminobiotiinin kanssa 11,4%. Kuvan 4.18 perusteella avidiinin konsentraatio on ollut suhteellisen pieni ja saturaatio saavutetaan jo mittauksen alkuvaiheessa.



Data: Avd-btn pH11 080206

Model: OneSites

Chi²/DoF = 1,282E4

N 0,367 ± 0,00303

K_B 1,22E6 ± 7,13E4 (virhe noin 6% mutta kuvaaja ei kovin hyvän näköinen)

ΔH -2,226E4 ± 242,6

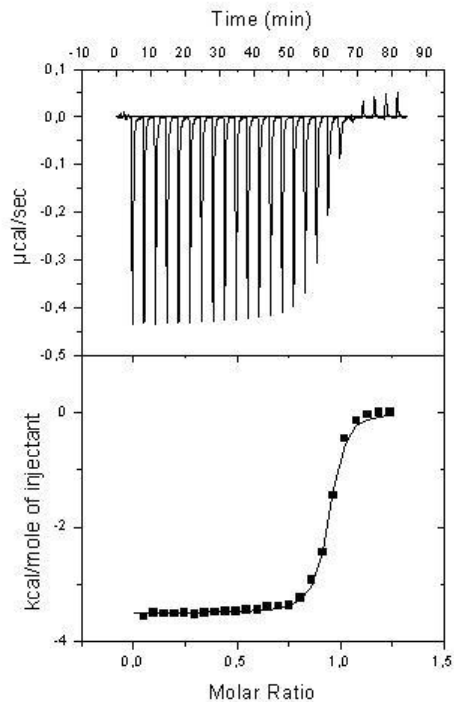
ΔS -46,8

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

= -22260 cal/mol - 298,15 K * -46,8 cal/mol/K

= -8306,58 cal/mol = -8,3 kcal/mol

Kuva 4.18. Avidiini-biotiini, pH 11.



Data: Avd-2iminobtn pH11

070206 KV

Chi²/DoF = 3718

N 0,924 ± 0,00230

K_B 1,29E7 ± 1,48E6 (virhe 11,4% eli ihan OK)

ΔH -3502 ± 16,61

ΔS 20,8

lasketaan $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

= -3502 cal/mol - 298,15 K * 20,8 cal/mol/K

= -9703,52 cal/mol

= -9,7 kcal/mol

$K_B = 1/K_D \rightarrow K_D = 7,8 \times 10^{-8}$

[neutraali pH:ssa K_D (Avd - Btn) = $\sim 10^{-15}$]

Kuva 4.19. Avidiini ($c_{\text{Avd}} = 0,06$ mM)- 2-iminobiotiini ($c_{\text{2iminoBtn}} = 0,4$ mM, pH 11).

Taulukko 4.4. Taulukkoon on kerätty ITC-mittauksissa saadut tulokset.

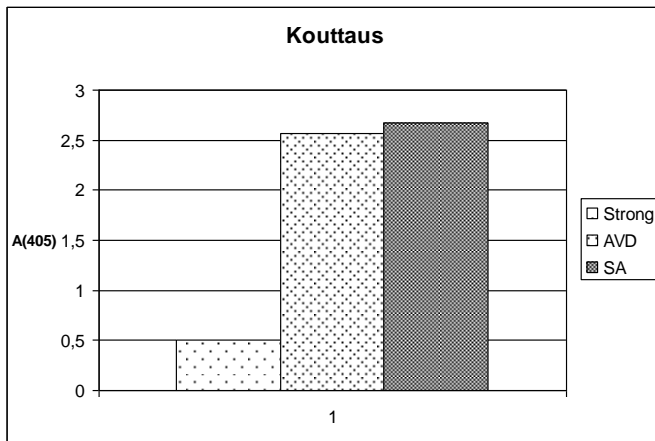
	K_B	K_D	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	ΔS
Avd-Btn, pH 7	$2,03 \times 10^{-8}$	¹⁾ $4,9 \times 10^{-9}$	-11,3	-26,9	-52,3
Strong-Btn, pH 7	$5,27 \times 10^{-7}$	²⁾	-10,5	-28,6	60,7
Avd-2-iminobtn, pH 7	3×10^{-5}	$3,3 \times 10^{-6}$	-7,5	-2492	16,7
Strong-2-iminobtn, pH 7	$1,01 \times 10^{-4}$	$9,9 \times 10^{-5}$	-29,5	-17,5	-40,4
Avd-Btn, pH 11	$1,22 \times 10^{-6}$	$8,2 \times 10^{-7}$	-8,3	-22,3	-46,8
Avd-2-iminobtn, pH 11	$1,29 \times 10^{-7}$	$7,8 \times 10^{-8}$	-9,7	-3502	20,8

¹⁾ Vakio on ITC-laitteen mittausalueen ulkopuolella

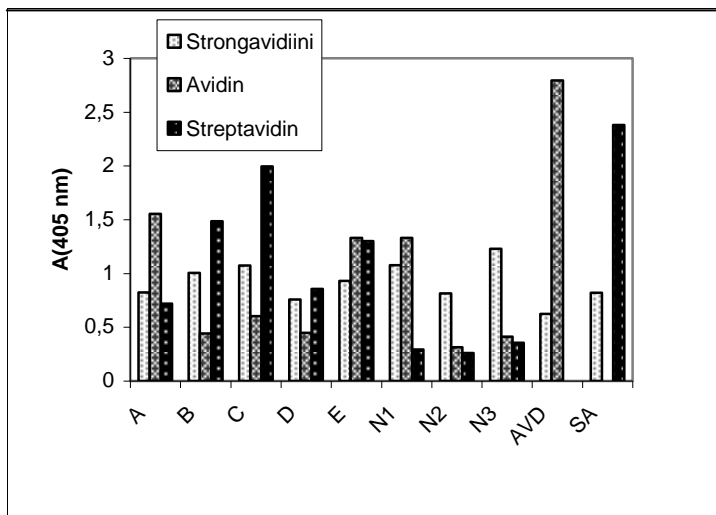
²⁾ Virhemarginaali liian suuri, jotta dissosiaatiovakiota saataisiinn laskettua

4.2.8 ELISA-analyysit

Tässä mittauksessa pyrittiin määrittämään strongavidinin ristiinreagoimista avidiin ja streptavidinin vasta-aineiden kanssa sekä selvittämään, reagoiko strongavidini kohdennetulla lääkehoidolla hoidettujen potilaiden seerumien vasta-aineiden kanssa. Osa potilasseerumeista oli potilaista, jotka olivat saaneet hoitona avidiinia ja streptavidinia. Mukana oli myös kontrollina negatiivisia potilasseerumeita. Määritykset tehtiin kaksoismittauksina, joista laskettiin keskiarvo. Ennen vasta-aine mittauksia testattiin proteiinien sitoutuminen kuoppalevyyn (Kaavio 4.1). Tutkittavat proteiinit kiinnitettiin ELISA- levyille ja tunnistettiin avidiini ja streptavidini vasta- aineilla. Sekundaari vasta-aineeseen sidottu alkalinen fosfataasi katalysoi substraatin kanssa lopputuotetta, joka absorboi 405 nm:ssä. Absorbanssin suuruus riippuu siitä, kuinka hyvin primäärivasta-aine on sitoutunut kuopassa olevaan proteiiniin. Nollanäytteinä käytettiin kaikkia proteiineja niin, että primaarinen vasta- aine jätettiin pipetoimatta. Kaaviossa 4.2 näyttäisi seeruminäyte N1 kontaminoituneen avidiinin kohdalla näytteen E seerumin kanssa, koska pylväät ovat suurin piirtein samansuuruiset. Samoilla seeruminäytteillä mitatuissa tutkimuksissa avidiinin kohdalla negatiiviset seeruminäytteet eivät ole tuottaneet merkittävää vastetta (Helppolainen ym., 2007).



Kaavio 4.1. Ennen kokeiden suorittamista testattiin proteiinien (Strongavidiiini, avidiini ja streptavidiiini) sitoutuminen Maxisorp Nunc- Immuno plate levyille (NuncTM). Kaaviosta on nähtävissä strongavidiiinin heikompi sitoutuminen kuoppalevyyn.



Kaavio 4.2. Kuvaajassa kohdennetussa lääkähoidossa avidiinilla ja streptavidiinilla hoidettujen potilaiden seerumit on merkitty A-E. Negatiiviset kontrolliseerumit on merkitty N1-N3. Mukana ovat myös Strongavidiiinille tehdyt mittaukset avidiinin (AVD) ja streptavidiinin (SA) vasta-aineilla. Myös avidiini mitattiin avidiinin vasta-aineilla ja streptavidiiini streptavidiinin vasta-aineilla, jotta strongavidiiinin reagoiminen voitaisiin suhteuttaa näihin pylväisiin. Kaaviossa absorbanssipyöväiden korkeus kuvaa sitoutumisen voimakkuutta eli sitä, kuinka vahvasti vasta-aineet tunnistavat kunkin proteiinin suhteessa toisiinsa.

4.3 Proteiinin teorettinen tarkastelu

Strongavidiiinille määritettiin internetistä (<http://us.expasy.org>) löytyvillä ohjelmilla isoelektrinen piste (pI), teorettinen molekyylipaino (MW) sekä molaarinen absorbtiviteetti (ϵ) (A kysteiniit muodostavat rikkisillat, B rikkisilloja ei muodostu). Mukana on myös aminohappojen lukumäärä (lkm). Tulokset on esitetty taulukossa 4.5, johon on otettu mukaan vastaavat tulokset avidiinista.

Taulukko 4.5. Strongavidiinin teoreettiset arvot ja samat arvot avidiinille. Taulukossa pI on isoelektrinen piste, MW on molekyyliaino, A on molaarinen absorbtiviteetti rikkisiltojen kanssa ja B on ilman rikkisiltoja, ah lkm on aminohappojen lukumäärä.

	pI	MW	A	B	ah lkm
Strongavidiini	3,91	12487,7	34490	34615	120
Avidiini	9,69	14344,1	24160	24040	128

Strongavidiinin polypeptidiketjulle suoritettiin myös vertailu avidiinin, streptavidiinin ja bradavidiinin (Nordlund ym., 2005) ketjujen kanssa (Kuva 4.20). Vertailusta voidaan havaita, että strongavidiinilla on kolme kysteiinihappotähdettä, kun taas esimerkiksi avidiinilla niitä on kaksi.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Streptavidin  -AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAG--ADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATD-G
Avidin        ARK■SLTGKWT■NDLGSNMTIGAVN-SRGEFTGTY■ITAV■TAT■SNEIKESPLHGQTQNTINKR
Strongavidin  -AE■SVEGAWTNELGSTVSEFVVDK-DTGLMTGTYTTAVGDAP----PTPFPLTGWTSPOG
Bradavidin    ---QSVNWTWTNQYGSTLAITSFNSNTGAI■TGTYT■NNAANS■CDE--GKPQGV■TGWLAYGN
              .:  * *: **.. .      * :**** . . :      .      :

Streptavidin  SGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEAR--INTQWLLTSGT-TEANAWKSTLV
Avidin        TQPTFGFTV■NWK---FSEST■TV■FTG■Q■CFIDRNGKEVLKTM■WLLRSSVNDIGDD■W■KATRV
Strongavidin  SHTSVSFSVLWN---GGTSTTAWAG-VLLT■DGRET■LKTTWLLVSET-D■DN■SWGDTQV
Bradavidin    TGTAISFVS■NFLG---■CGSTTV■WTG---QLN■NATGFQGLWYLSLAE---AVAWNGISA
              : ..:::* :      *:*:::*      :      :: * *      *      .

Streptavidin  GHDTFTKVKPSAAS
Avidin        GINIFTRLRTQKE-
Strongavidin  GFDDFIRVIA----
Bradavidin    GADTFTFSSGDKAL
              * : *

```

Kuva 4.20. Sekvenssi vertailu avidiinille, streptavidiinille, bradavidiinille ja strongavidiinille. Kysteiinitähteet, jotka muodostavat rikkisiltoja on merkitty harmaalla ja avidiinin biotiinin sitomisen kannalta tärkeät aminohapot on lihavoitu (Livnah ym., 1993). Aminohapot, jotka ovat kaikilla samat, on merkitty tähdillä.

Taulukossa 4.6 on avidiinin laskotuneelle pinnalle sijoittuvat vasta-aineiden tunnustuskohdat ja strongavidiinin vastaavat kohdat sekvenssivertailun pohjalta otettuina. Samat aminohapot on merkitty taustavärillä. Myös samankaltaiset aminohapot on merkitty taustavärillä, mutta kursiivilla kirjaimella.

Taulukko 4.6. Avidiinin vasta-aineiden tunnistuskohdat (Subramanian ja Adiga, 1997)

Avidiini	Strongavidiini
⁶ LTGKWTNDLGS ¹⁶	⁵ VEGAWTNELGS ¹⁵
³⁰ TGTY ³³	²⁹ TGTY ³²
⁶² PIFGFI ⁶⁷	⁵⁷ TSVSES ⁶²
⁷⁶ TTVFTGQ ⁸²	⁷¹ TTAWAGV ⁷⁶
⁸⁷ RNGK ⁹¹	⁸¹ CDGR ⁸⁴
¹¹⁰ WKAT ¹¹³	¹⁰³ WGDT ¹⁰⁶

5. TULOSTEN TARKASTELU

5.1 Avidiinin kaltaisen rekombinanttisen DNA:n rakentaminen

Prokaryootit ovat halpa ja helppo valinta proteiinien tuottamiselle. Kaupallisesti on saatavilla laaja valikoima vektoreita sekä isäntäbakteeria. *Escherichia coli* on usein ensimmäinen vaihtoehto isäntäsoluksi ja siitä on saatavilla useita kantoja. *E. coli* BL21 kanta ei tarvitse vaativia kasvatusolosuhteita ja se on turvallinen valinta, koska se ei ole taudinaiheuttaja (Chart et al., 2000). Tässä työssä avidiinin kaltaista proteiinia tuotettiin *E. colissa* ja proteiinin syntyminen saatiin aikaiseksi lisäämällä L-arabinoosia kasvatusliuokseen. Työssä käytetyissä soluissa oleva T7-promoottori löytyy *araB* geenin paikasta. Plasimidit, jotka pohjautuvat *araBAD* promoottorille, mahdollistavat tiukan kontrollin tuotettavan proteiinin valmistamiselle (Guzman ym. 1995). Näin syntynyt T7 RNA polymeraasi aloittaa varsinaisen kohdeproteiinin kääntämisen. T7 polymeraasi kykenee kääntämään maksimissaan 230 nukleotidia sekunnissa ja on siten nopeampi kuin *E. coli* oma RNA polymeraasi. T7 RNA polymeraasin taustaekspressiota on vähennetty lisäämällä pET plasmideihin T7 lysotsyymigeeni, joka on T7 RNA polymeraasin luonnollinen estäjä (Sorensen ym. 2005).

Kun rekombinanttiproteiinia tuotetaan suuria määriä lyhyessä ajassa, osa proteiineista kerääntyy liukenemattomiksi inklusio kappaleiksi (Marston 1986). Inklusio kappaleita muodostavat proteiinit ovat puutteellisesti laskostuneita, eivätkä ne ole biologisesti aktiivisia (Misawa ym. 1999). Inklusio kappaleilla on kuitenkin muutamia etuja verrattuna liukoisiin proteiineihin. Biologisesti aktiiviset proteiinit ovat helpommin alttiita proteolyysille sekä ne saattavat olla haitallisia isäntäsoluille. Inklusio kappaleet ovat kohtuullisen suuria ja niiden osittainen puhdistaminen on mahdollista sentrifugaatiolla. Inklusio kappaleiden syntymistä on yritetty ehkäistä useilla eri menetelmillä ja jo syntyneiden inklusio kappaleiden proteiineja palauttaa aktiiviseen muotoon (Sorensen ym. 2005). Vaikka proteiinien saaminen liukoiseen muotoon inklusio kappaleista on mahdollista, niiden käytön hyödyntäminen vaatii jatkokäsittelyitä ja osa proteiinista jää aina liukenemattomaan muotoon eikä inklusio kappaleiden tarkoitusta tai toimintaa vielä

täysin tunnetta (Mar Carrio ym. 2001). Tässä työssä valittiinkin menetelmäksi ohjata tuotettu proteiini *E. coli* periplasmiseen tilaan.

Strongylocentrotus purpuratus merisiilestä löydettyjä viittä geeniä täytyi sekä monistaa että muokata ennen kuin niiden tuottamista voitiin ajatella. Kun geenin sisältämää alkuperäistä plasmidia oli saatu monistettua riittävästi One Shot® TOP 10 *E. coli* bakteerien sisällä kasvattamalla niitä yön yli kasvatusliuoksessa, lisättiin proteiinin geenin eteen bakteriaalinen OmpA signaalisekvenssi SES-PCR:llä proteiinin saattamiseksi bakteerin periplasmiseen tilaan ja puhdistuksen helpottamiseksi (Hytönen ym. 2004). Plasmidia, joka sisälsi strongavidiini 81a09 muodon, yritettiin monistaa useampaan kertaan. Tämän plasmidin monistumatta jääminen SES-PCR:llä saattaa johtua siitä, ettei DNA-sekvenssissä ollut alukkeita vastaavia koodoneita. On myös mahdollista, että vektori pCMVSPORT6.1 ei alun perinkään ole sisältänyt koko strongavidiini 81a09 muotoa. Neljän jäljelle jääneen geenin aminohapposekvenssin tarkistuksessa ainoastaan yksi strongavidiinimuoto vastasi tietokannassa olevaa sekvenssiään. Muut geenit ovat saattaneet mutatoitua esimerkiksi niiden pCMVSPORT6.1 vektoriin kloonausvaiheessa.

5.2 Proteiinin tuottaminen ja puhdistaminen

Strongavidiinin muodon 81d12 lisäksi muotoa 10e11 yritettiin vielä varmuuden vuoksi tuottaa. Tästä tuotosta ei proteiinia saatu puhdistettua 2-iminobiotiinikolumnilla, joten mahdollisesti tuottunut proteiini ei sitoutunut 2-iminobiotiiniin. Todennäköisempää kuitenkin lienee, että avidiininkaltaista proteiinia ei ole tuottunut ollenkaan mutaatioiden vuoksi.

Strongavidiinimuodon 81d12 tuottaminen ja puhdistuminen onnistuivat. Strongavidiinin sisältämien vektorien transformointi onnistui *E. coli* (BL21-AI™) tuottosoluihin ja pesäkkeitä kasvoi maljoille satoja. Proteiinin tuoton olosuhteita ei optimoitu, vaan tuotto tehtiin aikaisempien avidiinin kaltaisten proteiinien tuottojen kanssa samankaltaisissa olosuhteissa (Nordlund ym. 2005, Hytönen 2004). Vaikka olosuhteiden optimointi saattaa vaikuttaa tuoton määrään, valitut olosuhteet olivat strongavidiinille suotuisat ja proteiinia saatiin tuotettua riittävästi tutkimuksia varten. Ensimmäisissä koetuotoissa proteiinia

saatiin keskimäärin noin 2,5 mg/litra. Tuottoon lienee vaikuttanut strongavidiinin samankaltainen kestävyys proteolyttisille olosuhteille sekä stabiilisuus kuin mitä avidiinilla on havaittu (Green 1975). Olosuhteiden optimointi todennäköisesti kasvattaisi tuottoa moninkertaiseksi.

Proteiinien puhdistusvaihe on saannon osalta myös kriittinen vaihe. Mikäli kaikkia soluja ei saada hajotettua, vaikuttaa se saantoon heikentävästi. Kuvasta 4.4 on nähtävissä fraktioista, että proteiinia on tuottunut kahta eri painoista muotoa. On myös mahdollista, että osa soluista on hajonnut epätäydellisesti ja osa tuotetusta proteiinista on jäänyt solupellettiin, koska pylväissä L1 ja S on nähtävissä samankaltaisuutta tarkasteltavalla alueella. Strongavidiini näyttäisi sitoutuneen resiiniin kokonaan, koska resiiniin sitoutumattoman näytteen (L2) mukana ei strongavidiinia enää esiinny. Puhdistuksen eri vaiheista otetuista näytteistä ei voinut tehdä vasta-aineeseen perustuvia värjäyksiä, joilla olisi strongavidiinin esiintyminen eri vaiheiden näytteissä pystytty määrittämään tarkasti, koska strongavidiinille ei vielä ole vasta-aineita käytössä. Tulevaisuudessa strongavidiinin esiintymistä eri vaiheissa voisi kokeilla avidiinin ja streptavidiinin vasta-aineilla, koska ristiinreagoiminen voitiin havaita myöhemmissä kokeissa.

Tuotetun proteiinin eluoiminen osoittautui hankalaksi. Avidiini eluoituu pylvästä pH 4 -puskurilla, jota ensimmäisenä kokeiltiin. Eluointifraktioista ei kuitenkaan löytynyt proteiinia absorbanssia 280 aallonpituudella mitattaessa. Eluointi 0,1 M etikkahapolla ei tuottanut sen enempää tulosta. Proteiini eluoitui vasta 0,5 M etikkahapolla. Strongavidiinin teoreettinen isoelektrinen piste on 3,91, kun se avidiinilla on 9,69. Tämä on ainakin yksi syy strongavidiinin eluoitumisen vaatimalle happamuustasolle. Myös AVR2-proteiinin eluoimiseen D-biotiini kolumnista on käytetty 0,5 M etikkahappoa ja tämän proteiinin teoreettinen isoelektrinen piste on 4,7 (Hytönen ym. 2005). Näin voimakkaasti happaman etikkahappoliuoksen käytössä on kuitenkin riskinsä ja se saattaa denaturoida proteiinia. Mahdollisen denaturoimisen vähentämiseksi olisi proteiinin voinut dialysoida puskuriin heti eluoimisen jälkeen. Kuitenkin avidiinin biotiinin sitomiskyvyn on todettu säilyvän pH alueella 2–13 ja avidiini-biotiini-kompleksi on todettu kestävän 0,1 M HCl-käsittelyä (Green 1975). Strongavidiinin ei havaittu missään vaiheessa esimerkiksi sakkautuvan etikkahapossa, mutta etikkahappo on saattanut vaikuttaa joihinkin tuloksiin antamalla

haitallista taustaa. Avidiinin on todettu hajoavan alayksiköikseen 0,1M etikkahapossa ilman ketjunsisäisten rikkisidosten pelkistymistä (Green 1975). Strongavidiinilla havaittiin ketjujen välisiä rikkisidoksia ilman β -merkapttoetanolin pelkistävää vaikutusta ajetuissa näytteissä, joten on mahdollista, ettei 0,1M etikkahappo denaturoi strongavidiniä ainakaan pelkistämällä rikkisidoksia.

5.3 Proteiinin karakterisointi

Strongavidiinin karakterisoinnissa vertailu suoritettiin avidiinia kohtaan. Olettamuksena on aminohapposekvenssin perusteella proteiinien samankaltaisuus. Olettamusta tukee tuottamisen ja puhdistumisen onnistuminen samankaltaisissa olosuhteissa kuin avidiinilla. Proteiinin puhdistumisen onnistuminen 2-iminobiotiini kolumnilla on todiste biotiinin sitomiskyvystä. Proteiineista löytyy myös eroavaisuuksia, joista erilainen isoelektrinen piste ja siten eluution vaatima erilainen happamuustaso on vain yksi esimerkki. Myös pelkistävissä olosuhteissa tehdyissä määrityksissä havaittiin eroja. Strongavidiinin tarkempi rakenteellinen tutkimus myös sen kolmiulotteisen rakenteen sisältäen, saattaisi antaa lisäselvitystä eroavaisuuksien ja samankaltaisuuden taustaan.

5.3.1 SDS-PAGE alayksiköiden välisten rikkisiltojen selvittämiseksi

Strongavidiinilla on aminohappoketjussaan kolme kysteinitähdettä, kun taas avidiinilla niitä on kaksi (Kys-4 ja kys-83). Avidiinilla ei näitä alayksiköiden välisiä rikkisiltoja ole, ainoastaan yksi monomeerien sisäinen rikkisilta stabiloimassa rakennetta (Green 1990). Strongavidiinin kysteinitähteistä kaksi sijaitsevat rakenteellisesti melko samanlaisissa kohdissa aminohappoketjua (kys-3 ja kys-81) kuin avidiinilla, joten näiden voidaan toimivan samalla tavoin kuin avidiinilla ja muodostavan alayksikön sisäisen rikkisillan. Kolmas kysteinitähde (kys-99) sijaitsee β 7- ja β 8- juosteiden välisessä silmukassa.

Alayksiköiden välisten rikkisiltojen olemassa oloa testattiin SDS-PAGE-kokeella jättämällä näytteestä pelkistävä β -merkapttoetanolin pois. Kokeen perusteella havaittiin strongavidiinilla esiintyvä monomeerien välisiä rikkisiltoja. SDS-PAGE ajossa ilman β -merkapttoetanolin ajatus näytteessä esiintyi di- ja tetrameerisiä muotoja. Geelissä näkyi myös kolmas heikko juoste, jonka molekyylipaino on n. 33kDa.

Strongavidiinin tertiäärisen rakenteen selvittäminen toisi tarkennusta saatuihin tuloksiin. On myös mahdollista, että strongavidiinilla ei ole lainkaan alayksikön sisäisiä rikkisiltoja, vaan esimerkiksi kys-82 ja kys-99 muodostavat rikkisillan monomeerien 1–4 ja 2–3 välille, vastaavalla tavalla kuin avidiinille tehdyissä mutaatiokokeissa, jolloin asparagiinihappo-86 ja isoleusiini-106 korvattiin kysteiniitähteillä (Nordlund ym. 2003). Samaisessa kokeessa tetrameerisiä muotoja nähtiin mutatoitulla avidiinilla, jolla asp-86 ja ile-106 lisäksi ile-117 korvattiin kysteiniitähteellä. Tästä voitaisiin päätellä, että strongavidiinin kolmesta kysteiniitähteessä kaikki kysteiniitähteet saattavat osallistua alayksiköiden välisten rikkisiltojen muodostamiseen. Tarkemmat rakenteelliset määritykset saattaisivat tuoda selvennystä myös geelissä nähdyn kolmannen juosteen olemassaoloon.

5.3.2 Lämpöstabilisuuden määrittäminen

Strongavidiinin lämmönkestävyyttä tutkittiin lämpökäsittelyn avulla (Bayer ym. 1996). Biotiinin on aikaisemmin todettu stabiloivan avidiinin rakennetta ja nostavan proteiinin lämmönkestävyyttä. Strongavidiinille tehtiin kokeet myös biotiinin kanssa.

Strongavidiinille tehdyissä kokeissa proteiinin havaittiin hajonneen alayksiköikseen kaikissa lämpötiloissa. Kokeessa proteiinia pidettiin eri lämpötiloissa 20 minuuttia ja jo huoneenlämpötilassa olleessa näytteessä proteiini esiintyi alayksiköikseen hajonneena. Näytteet, joihin oli lisätty biotiinia, osoittivat, että biotiinin lisääminen nostaa lämmönkestävyyttä jonkin verran. Vielä 70 °C lämpötilassa osa proteiinista näyttää esiintyvän oligomeerisinä muotoina. Biotiinin lisääminen näyttää aiheuttaneen proteiinin esiintymisen niin isona kompleksina, ettei se kulkeutunut geelissä lainkaan. Kokeesta voidaan päätellä, että biotiini lisää strongavidiinin lämmönkestävyyttä samalla tavoin kuin se lisää muidenkin avidiinin kaltaisten proteiinien lämmönkestävyyttä. Lisäselvitystä rakenteeseen sekä strongavidiinin ominaisuuksiin voisi tuoda lisäkokeet, joissa proteiini asetyloitaisiin, niin että nähtäisiin, kulkeeko se SDS-PAGE geelissä silloin paremmin. Lämmönkestävyyttä voisi kokeilla myös ei-pelkistävässä olosuhteissa. Silloin nähtäisiin, vaikuttavatko alayksiköiden väliset rikkisillat lämmönkestävyyteen. Aikaisemmin heti puhdistuksen jälkeen tehdyissä SDS-PAGE ajoissa strongavidiini näyttää esiintyvä myös monomeeriä suurempina kokonaisuuksina. Näin ollen voi olla mahdollista, että proteiinin

säilyttämin 0,5M etikkahapossa alkaa pidemmällä aikavälillä vaikuttaa proteiinin rakenteeseen.

Avidiinin ja sen kaltaisten proteiinien ominaisuuksien muuttumista on tutkittu vaihtamalla proteiinien aminohappoja toisiin. Idea näihin kokeisiin on saatu monesti avidiini-perheen sisältä. Aminohappoja, joiden on oletettu vaikuttava johonkin ominaisuuteen, on vaihdettu toisiin joko pistemutaatiolla tai vaihtamalla pidempi osa aminohappoketjua. Mutaatiokokeissa avidiinin ja sen kaltaisten proteiinien välillä on havaittu eri mutaatioiden parantavan tai heikentävän mm. lämmönkestävyyttä. AVR4 proteiinien rakennetta on hyödynnetty yritettäessä parantaa avidiinin lämmönkestävyyttä. Näissä tutkimuksissa isoleusiinin vaihtaminen tyrosiiniksi paikalla 117 avidiinissa on parantanut proteiinin lämmönkestävyyttä (Hytönen ym. 2005). Strongavidiinilla on samassa kohdassa aminohappona fenyylialaniini. Aromaattisten aminohappojen merkitystä lämmönkestävyydelle on tutkittu ja ylimääräisten aromaattisten aminohapporyhmien proteiinien pinnalla uskotaan parantavan proteiinien lämmönkestävyyttä samoin kuin parittaisten aminohapporyhmien (Kannan ym. 2000). Vaikka fenyylialaniini on aromaattinen aminohappo ja siten se saattaisi parantaa lämmönkestävyyttä, saattaa selitys strongavidiinin avidiinia heikommalle lämmönkestävyydelle olla fenyylialaniinin hydrofobisuudessa. Myös isoleusiini on hydrofobinen aminohappo ja sen korvaaminen hydrofiilisellä tyrosiinillä paransi avidiinin lämmönkestävyyttä, joten tämä kohta aminohappojärjestyksessä saattaa olla rakenteellisesti tärkeä lämmönkestäkyvylle sen suhteen onko aminohappo liukoinen vai ei. Olettamusta tukevat tulokset, joissa korvaamalla hydrofobinen isoleusiini hydrofiilisellä asparagiinillä proteiinin pinnalla onnistuttiin parantamaan proteiinin lämmönkestävyyttä (Wigley ym. 1987).

Muita lämmönkestävyyteen vaikuttavia tekijöitä löytyy mm. ioni- ja vetysidoksista (Kannan ym. 2000, Jelesarov ym. 2009) Näiden rakenneominaisuuksien tarkempi tutkiminen saattaisi tarjota lisäselvitystä siihen, miksi Strongavidiini näyttää olevan heikompi lämmönkestävyydeltään kuin avidiini. Kysteiinihappotähteiden lisääminen muutatiolla avidiiniin erityisesti 1–4 ja 2–3 alayksiköiden rajapinnalle heikensi avidiinin lämmönkestävyyttä erityisesti ilman biotiinia tehdyissä kokeissa (Nordlund y., 2003).

Koska strongavidiinilla on alayksiköiden välisiä rikkisilloja ja strongavidiini sitoo biotiinia saattaa alayksiköiden väliset rikkisillat heikentää myös strongavidiinin lämmönkestävyyttä.

5.3.3 Strongavidiinin biotiinin sitomiskyky

Strongavidiinin puhdistamisen onnistuminen 2-iminobiotiini kolumnilla viittasi siihen, että strongavidiini kykenee sitomaan biotiinia. Biotiinin sitomiskyvyn todentamiseksi tehtiin mittauksia VP-ITC laitteella sekä biotiinilla että 2-iminobiotiinilla. Kontrollina tehtiin samoja mittauksia avidiinilla. Ongelmana VP-ITC-laitetta käytettäessä on, että sillä voidaan mitata affiniteettiarvoja vain n. $K_d=10^{-9}$ asti. Kontrollina käytetyllä avidiinilla affiniteetti biotiinin kanssa on $K_d=10^{-15}$ (Green 1975).

Ensimmäisenä suoritettiin biotiinin sitomismittaukset pH 7 ITC-puskurissa avidiinille ja strongavidiinille. Ennen mittauksia strongavidiinille suoritettiin dialyysi, jotta proteiinille saatiin vaihdettua tarvittava puskuri. Mittausten perusteella avidiinin ja strongavidiinin havaittiin sitovan biotiinia. Tuloksista (Kuva 4.14) voidaan havaita avidiinin monomeerin sitovan yhden ($N=0,78 \pm 8,49E^{-4}$) biotiinin, joka on linjassa aikaisemmille tutkimustuloksille (Green 1975, 1990). Tuloksista on myös nähtävistä, että avidiini-biotiini titraus on voimakkaasti eksoterminen ($\Delta H=-26,9$ kcal/mol) eli sitoutuminen on erittäin vahvaa. Tasapainovakion virhemarginaali mittauksissa on n. 12 % ja $K_D= 4,9 \times 10^{-9}$. Vaikka virhemarginaali ei ole vielä huomattavan suuri, menee dissosiaatiovakio kuitenkin VP-ITC laitteella luotettavasti mitattavan alueen ulkopuolelle. Kuvasta 4.15 voidaan nähdä, että myös strongavidiinin ja biotiinin titraus reaktio on voimakkaasti eksoterminen ($\Delta H=-28,6$ kcal/mol) ja suurin piirtein samaa luokkaa kuin avidiini-biotiini titraus. Tulosten perusteella jokainen strongavidiini monomeeri näyttäisi sitovan 2 biotiinia. Tämä tulos voi selittyä sillä, että strongavidiini muodostaa oligomeerejä esimerkiksi kysteiinitähteidensä avulla tai käytetyn strongavidiiniliuoksen konsentraatio on suurempi kuin mitä alun perin absorbanssin perusteella on laskettu. Tuloksista nähdään myös, että tasapainovakion (K_b) virhemarginaali on liian suuri (n. 38 %), jotta dissosiaatiovakiota saataisiin pH 7 puskurissa laskettua. Kuitenkin entalpia energia kertoo, että sitoutuminen on erittäin vahva ollen $> 10^{-12}$.

Avidiinin affiniteetti 2-iminobiotiiniin mitattaessa voidaan havaita sen olevan heikompi pH 7 ITC-puskurissa kuin avidiinin sitoutuminen biotiiniin (Kuvat 4.14 ja 4.16). Reaktion dissosiaatiiovakio on $3,3 \times 10^{-6}$ ja virhemarginaali on n. 7,8 %, joten dissosiaatiiovakio on laskettavissa. Myös strongavidinin affiniteetti 2-iminobiotiiniin ($K_D=9,9 \times 10^{-5}$ ja virhemarginaali n. 14 %) on selvästi heikompi pH 7 puskurissa kuin biotiiniin (Kuva 4.17). Kuvaajasta on kuitenkin nähtävissä, että strongavidini ei saavuta selvää saturaatiota 2-iminobiotiiniin. Saturaatio voitaisiin saavuttaa vähentämällä strongavidinin konsentraatiota.

Avidiinin affiniteetti biotiiniin ja 2-iminobiotiiniin suoritettiin myös PH 11 ITC-puskurissa. Tulosten perusteella dissosiaatiiovakio biotiinin kanssa on $K_D=8,2 \times 10^{-7}$ ja 2-iminobiotiinin kanssa $K_D=7,8 \times 10^{-8}$. Biotiinin kanssa virhemarginaali on n. 6 %, joten tulos on luotettava, mutta kuvaajan (Kuva 4.18) perusteella avidiinin konsentraatio olisi voinut olla hieman suurempi, jotta biotiinia olisi tarvinnut titrata muutama kerta enemmän ennen kuin sitomistaskut alkavat saturoitua. Tulosten perusteella avidiinin sitoutuminen 2-iminobiotiiniin näyttäisi voimakkaammalta kuin biotiinin pH 11-puskurissa. Aikaisemmin on todettu 2-iminobiotiinin sitoutumisen voimakkuuden avidiiniin olevan riippuvainen pH:sta ja tähän perustuu myös 2-iminobiotiinikolumnin käyttäminen puhdistettaessa avidiinia ja sen kaltaisia proteiineja (Moy ym. 1994, Orr ym. 1980). Avidiinia muokkaamalla on saatu tuloksia, joissa avidiinin sitoutuminen biotiiniin on riippuvainen pH:sta (Morag ym. 1996, Marttila ym. 2003). Moragin ym (1996) tutkimuksessa avidiinin biotiinin sitomisalueella olevaa tyrosiinia (Tyr-33) muokattiin kemiallisesti lisäämällä siihen nitriittiryhmä. Tällöin hydroksyyliiryhmän dissosiaatiiovakio pienenee ja avidiinin sitoutuminen biotiiniin oli palautuvaa korkeilla pH-arvoilla, koska vetysidoksia ei voi muodostua korkeassa pH:ssa. Tämän perusteella avidiini-biotiini kompleksin pitäisi dissosioitua korkeassa pH:ssa, mutta näin ei käy alle pH 13:sta. Tämä voi johtua avidiinin rakenteesta niin, että tyrosiinilla on normaalia korkeampi dissosiaatiiovakio sen sijainnista ja hydrofobisesta ympäristöstä johtuen. Myös Moragin ym. (1996) luoma nitro-avidini dissosioituu biotiinista vasta pH 10:ssa, vaikka nitrotyrosiinin dissosiaatiiovakio on yleensä n. 7,2. Myös tämän oletetaan johtuvan tyrosiinin sijainnista ja ympäristöstä. Avidiinin sitoutuminen 2-iminobiotiiniin korkeassa pH:ssa on arveltu johtuvan siitä, että korkeassa pH:ssa aminoryhmän vety muodostaa avidiinin kanssa

sitoutumiseen tarvittavan vetysidoksen. Kun taas matalassa pH:ssa 2-iminobiotiinin aminoryhmä on ionisoituneena muotona, eikä vetysidosta pääse muodostumaan tyrosiinin hydroksyyliiryhmän välille (Morag 1996). Marttila ym. (2003) ovat osoittaneet, että tämä vetysidos ei välttämättä ole niin tärkeä biotiinin sitomiskyvylle kuin aikaisemmin on luultu. Siksi saattaa olla, ettei korkea pH yksistään aiheuta avidiinin ja biotiinin dissosiaatiota. Näistä ominaisuuksista johtuen saattaa olla mahdollista, että avidiini sitoutuu voimakkaammin 2-iminobiotiiniin kuin biotiiniin pH 11, kuten tulokset näyttävät. Tosin kuvaaja avidiinin sitoutumisesta biotiiniin pH 11-puskurissa ei ole paras mahdollinen, joten tuloksen luotettavuuden arvioimiseksi avidiinin sitoutumista biotiiniin ja 2-iminobiotiiniin täytyisi tutkia tarkemmin eri pH:ssa.

Avidiinissa 16 aminohappotähdettä, joista 5 muodostavat hydrofobisia sidoksia ja 11 vetysidoksia, osallistuu biotiinin sitomiseen (Livnah ym. 1993). Vertailtaessa näitä avidiinin rakenneosia strongavidiinin aminohappotähteisiin, voidaan havaita niissä huomattavaa samankaltaisuutta. Eroavaisuuksia löytyy avidiinin β 3- ja β 4-juosteiden välillä olevasta silmukasta, jossa avidiinin Thr-Ala-Thr sekvenssi on strongavidiinissa muuttunut Gly-Asp-Ala sekvenssiksi. Tämä strongavidiinin silmukan sekvenssi taas muuttuu enemmän streptavidiinin saman silmukan Gly-Asn-Ala sekvenssiä. Avidiinin Phe-77 on strongavidiinissa vaihtunut toiseen hydrofobiseen aminohappotähteeseen tryptofaaniin. Tämän muutos ei oletettavasti vaikuta biotiinin sitomiseen, koska avidiinissa itsessäänkin kolme tryptofaania osallistuu biotiinin sitomiseen (Livnah ym. 1993). Mielenkiintoisin eroavaisuus löytyy β 5- ja β 6-juosteiden välisestä silmukasta. Avidiinissa biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohappotähteet Phe-72 ja Ser-73 ovat strongavidiinissa vaihtuneet kahteen glysiiniin. Streptavidiinissa samaiset aminohappotähteet ovat asparagiini ja alaniini, joten strongavidiinilla ei tässä kohtaa ole samankaltaisuutta streptavidiininkaan kanssa. Strongavidiinissa olevat glysiinitähteet eivät kuitenkaan näytä vaikuttava biotiinin sitomiskykyyn.

Merisiilestä peräisin olevilta fibropelliineiltä puuttuu biotiinin sitomiskyky. Biotiinin sitomiskyvyn puuttumisen on todettu johtuvan todennäköisesti avidiinin kahden biotiinin sitomiseen osallistuvan tryptofaanitähteen korvautumisesta arginiinillä ja lysiinillä. Mikäli avidiinin tryptofaanitähteet korvataan arginiinillä sekä lysiinillä, menettää

mutatoitu avidiinimuoto biotiinin sitomiskykynsä (Laitinen ym., 1999). Strongavidiinissa nämä biotiinin sitomiseen osallistuvat tryptofaanitähteet löytyvät identtisistä kohdista avidiinin tryptofaanitähteiden kanssa. Tämä saattaa olla ainakin yksi syy sille, että merisiilestä löydetty strongavidiiini sitoo biotiinia, vaikka merisiilestä löydetty fibropelliineiltä tämä biotiinin sitomiskyky puuttuu.

5.3.4 Strongavidiiinin immunologiset ominaisuudet

Strongavidiinille suoritettussa immunoblotauksessa ei proteiinia saatu blotattua filterikalvolle. Tämä johtuu todennäköisesti strongavidiiinin matalasta isoelektrisestä pisteestä (Nordlund ym. 2005, Akasawa ym. 1996). Sen sijaan strongavidiinille tehtiin dot-blottaus, jossa proteiinia pipetoitiin suoraan selluloosa filterille. Strongavidiinille tehtiin vasta-ainevärykset avidiinin ja streptavidiinin vasta-aineilla.

Tulosten perusteella avidiinin vasta-aineet näyttäisivät tunnistavan strongavidiiinin lähes yhtä voimakkaasti kuin avidiinin ja huomattavasti voimaakkaammin kuin streptavidiinin. Myös streptavidiinin vasta-aine näyttää tunnistavan strongavidiiinin, vaikka vaste on heikompi kuin avidiinin vasta-aineella. Streptavidiinin vasta-aine ei näytä tunnistavan avidiinia ollenkaan. Tulosten perusteella strongavidiiini muistuttaa suuresti avidiinia epitooppiensa rakenteiden perusteella. Taulukossa 4.6 on nähtävissä vertailua avidiinin vasta-aineiden tunnistuskohtien ja vastaavien strongavidiiini sekvenssien välillä. Myös tästä taulukosta on nähtävissä samankaltaisuutta avidiinin ja strongavidiiinin vasta-aineiden tunnistuskohtien välillä.

ELISA-levyllä suoritetuissa ristiinreagoimiskokeissa ei strongavidiinilla näyttäisi olevan niin suurta vastetta kuin dot-blottausten perusteella voisi olettaa. Syynä tähän saattaa olla muutokset strongavidiiinin konformaatioissa. Syynä voi olla myös strongavidiiinin mahdollisesti heikompi kiinnittyminen ELISA-levylle. Tähän viittaisi myös kouttauskokeesta (Kaavio 1) saatu tulos. Siinä strongavidiinilla on nähtävissä avidiinia ja streptavidiinia pienempi absorbanssi ja siten pienempi proteiinikonsentraatio. Absorbanssia ei saatu merkittävästi nostettua edes pipetoitavaa proteiinikonsentraatiota nostamalla. Vaikka käytettyjen Nuncin 96-kuoppaisten MaxiSorp-levyjen pitäisi soveltua molekyyille, joilla on sekalaisia hydrofiilisiä ja hydrofobisia alueita, on kiinnittymiseen

saattanut vaikuttaa merkittävästi strongavidiinin huomattavan matala isoelektrinen piste. Käytetyssä puskurissa, jonka pH oli 9,6, strongavidiini esiintyy negatiivisesti varautuneena. Strongavidiinin ja ELISA-levyn sähköiset vuorovaikutukset ovat saattaneet heikentää strongavidiinin kiinnittymistä levyyn verrattuna avidiiniin ja streptavidiiniin.

Strongavidiinille suoritetuissa seerumikokeissa havaittiin sekä positiivisten että negatiivisten potilasnäytteiden vasta-aineiden tunnistavan proteiinin yhtä voimakkaasti. Negatiiviset potilasnäytteet eivät sisällä polyklonaalisia vasta-aineita avidiinille tai streptavidiinille. Tulos saattaa johtua epäspesifistä sitoutumisesta strongavidiinin ja seerumin immunoglobuliinien välillä. Yleensä epäspesifinen sitoutuminen on voimakkaampaa positiivisesti varautuneilla proteiineilla (ks. Kappale 1.4 (Strept)Avidiini-biotiini teknologia) ja pH 9,6 natriumkarbonaattipuskurissa strongavidiini esiintyy negatiivisesti varautuneena isoelektrisestä pisteestään johtuen. Syynä epäspesifiin sitoutumiseen löytyykin todennäköisesti yhdestä tai useammasta strongavidiinin sisältämistä aminohappoketjuista ja siten rakenteellisista ominaisuuksista.

LÄHTEET

Abu-Elheiga L., Jayakumar A., Baldini A., Chirala S.S. ja Wakil S.J. (1995) Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4011–4015.

Abu-Elheiga L., Almarza-Ortega D.B., Baldini A. ja Wakil S.J. (1997) Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem.* 272:10669–10677.

Ahloth M. K., Kola E. H., Ewald D., Masabanda J., Sazanov A., Fries R. ja Kulomaa M. S. (2000) Characterization and chromosomal localization of the chicken avidin gene family. *Anim Genet.* 31:367–375.

Airenne K.J., Oker-Blom C., Marjomäki V.S., Bayer E.A., Wilchek M. ja Kulomaa M.S. (1997) Production of biologically active recombinant avidin in baculovirusinfected insect cells. *Protein Expr. Purif.* 9:100–108.

Akasawa A., Hsieh L.S., Martin B.M., Liu T. ja Lin Y. (1996) A novel acidic allergen, Hev B 5, in latex. Purification, cloning and characterization. *J Biol Chem.* 271:25389–93.

Argana C.E., Kuntz I.D., Birken S., Axel R. ja Cantor C.R. (1986) Molecular cloning and nucleotide sequence of streptavidin gene. *Nucleic Acids Res.* 14:1871–1872.

Barry M.A., Campos S.K., Ghosh D., Adams K.E., Mok H., Mercier G.T. ja Parrott M.B. (2003) Biotinylated gene therapy vectors. *Expert Opin Biol Ther.* 3:925–40. Review.

Bayer E.A., Ben-Hur H., Hiller Y. ja Wilchek M. (1989) Postsecretory modifications of streptavidin. *Biochem J.* 259:369–76.

Bayer E.A. ja Wilchek M. (1994) Modified avidins for application in avidin-biotin technology: an improvement on nature. In *Egg Uses and Processing Technologies* (J. S. Sim and S. Nakai, ed.), pp. 158–176. CAB International, Wallingford, UK.

Bayer E. A., Kulik T., Adar R. ja Wilchek M. (1995) Close similarity among streptavidin-like, biotin-binding proteins from *Streptomyces*. *Biochim. biophys. Acta* 1263: 60–66.

Bayer E.A., Ehrlich-Rogozinski S., ja Wilchek, M. (1996) Sodium dodecyl sulfatopolyacrylamide gel electrophoretic method for assessing the quaternary state and comparative thermostability of avidin and streptavidin. *Electrophoresis* 17:1319–1324.

Behr T.M., Goldenberg D.M., Becker W. (1998) Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med.* 1998 25:201–12.

No authors listed (2007) Biotin. *Altern Med Rev.* 12, 73–8.

Bisgrove B.W., Andrews M.E. ja Raff R.A. (1991) Fibropellins, products of an EGF repeat-containing gene, form a unique extracellular matrix structure that surrounds the sea urchin embryo. *Dev Biol.* 146:89–99.

Bisgrove B.W. ja Raff R.A. (1993) The SpEGF III gene encodes a member of the fibropellins: EGF repeat-containing proteins that form the apical lamina of the sea urchin embryo. *Dev Biol.* 157, 526–538.

Bjellqvist B., Hughes G. J., Pasquali C., Paquet N., Ravier F., Sanchez J. C., Frutiger S. ja Hochstrasser D. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14, 1023–1031.

- Bjellqvist B., Basse B., Olsen E. ja Celis J. E. (1994) Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*, 15, 529–539.
- Boas M.A. (1927) The effect of desiccation upon the nutritive properties of egg white. *Biochem. J.* 21:712–724.
- Boeckx R.L. ja Dakshinamurti K. (1968) Biotin-mediated protein biosynthesis. *Biochem J.* 140:549–556.
- Browner M.F., Taroni F., Sztul E. ja Rosenberg L.E. (1989) Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the alpha-subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* 264:12680–12685.
- Burri B.J., Sweetman L. ja Nyhan W.L. (1981) Mutant holocarboxylase synthetase: evidence for the enzyme defect in early infantile biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *J Clin Invest.* 68:1491–1495.
- Caliceti P., Chinol M., Roldo M., Veronese F.M., Semenzato A., Salmaso S. ja Paganelli G. (2002) Poly(ethylene glycol)-avidin bioconjugates: suitable candidates for tumor pretargeting. *J Control Release.* 83:97–108.
- Mar Carrió M. ja Villaverde A. (2001) Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Lett.* 26;489:29–33.
- Chart H., Smith H.R., La Ragione R.M. ja Woodward M.J. (2000) An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *J. Appl. Microbiol.* 89:1048–1058.
- Chaiet L., Miller T., Tausig F. ja Wolf F. (1963) Separation and Purification of Synergistic Components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 3, 28–32.
- Chapman-Smith A. ja Cronan J.E. Jr. (1999) Molecular biology of Biotin attachment to proteins. *J. Nutr.* 129:477S–484S.
- Chinol M., Casalini P., Maggiolo M., Canevari S., Omodeo E. S., Caliceti P., Cremonesi M., Chiolerio F., Nardone E., Sicaardi A. G. ja Paganelli G. (1998) Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity. *Br. J. Cancer* 78: 189–197.
- Dakshinamurti K. (2005) Biotin--a regulator of gene expression. *J Nutr Biochem.* 16:419–23. Review.
- DeLange R.J. (1970) Egg white avidin. I. Amino acid composition; sequence of the amino and carboxyl-terminal cyanogen bromide peptides. *J. Biol. Chem.* 246, 907–916.
- DeLange R.J. ja Huang T.-S. (1971) Egg White avidin. III. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *J. Biol. Chem.* 246, 698–709.
- Delgadillo-Reynoso M.G., Rollo D.R., Hursh D.A. ja Raff R.A. (1989) Structural analysis of the uEGF gene in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* reveals more similarity to vertebrate than to invertebrate genes with EGF-like repeats. *J. Mol. Evol.* 29:314–327
- du Vigneaud V. (1942) THE STRUCTURE OF BIOTIN. *Science.* 96:455–461.
- Engvall E. ja Perlmann P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J. Immunol.*, 109:129–135.
- Förster G.J., Santos E.B., Smith-Jones P.M., Zanzonico P. ja Larson S.M. (2006) Pretargeted radioimmunotherapy with a single-chain antibody/streptavidin construct and radiolabeled DOTA-biotin: strategies for reduction of the renal dose. *J Nucl Med.* 47:140–9.

- Guzman L.M., Belin D., Carson M.J. ja Beckwith J. (1995) Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177:4121–4130.
- Goldenberg D.M., Kim E.E., DeLand F.H., Bennett S. ja Primus F.J. (1980) Radioimmuno-detection of cancer with radioactive antibodies to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 40:2984–92.
- Goodwin D.A. (1987) Pharmacokinetics and antibodies. *J Nucl Med.* 28:1358–62.
- Green N.M. (1963) AVIDIN. 1. THE USE OF (14-C)BIOTIN FOR KINETIC STUDIES AND FOR ASSAY. *Biochem J.* 89:585–91.
- Green, N.M. (1975) Avidin. *Advanced Protein Chemistry* 29, 85–133.
- Green N.M. (1990) Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* 184:51–67.
- Groberg J., ja Dunn J. J. (1988). ompT Encodes the Escherichia coli Outer Membrane Protease that Cleaves T7 RNA Polymerase During Purification. *J. Bacteriol.* 170, 1245–1253.
- György P., Melville D.B., Burk D. ja DU Vigneaud V. (1940) THE POSSIBLE IDENTITY OF VITAMIN H WITH BIOTIN AND COENZYME R. *Science.* 91:243–245.
- Helppolainen S.H., Nurminen K.P., Määttä J.A., Halling K.K., Slotte J.P., Huhtala T., Liimatainen T., Ylä-Herttua S., Airene K.J., Närvänen A., Jänis J., Vainiotalo P., Valjakka J., Kulomaa M.S. ja Nordlund H.R. (2007) Rhizavidin from *Rhizobium etli*: the first natural dimer in the avidin protein family. *Biochem J.* 405:397–405.
- Heney G. ja Orr G. A. (1981) The purification of avidin and its derivatives on 2-iminobiotin-6-amino-hexyl-Sepharose 4B. *Anal Biochem*, 114, 92–96.
- Hertz R., Dhyse F.G. ja Tullner W.M.W. (1949) Elevation of biotin activity in the serum of estrogen treated chicks; relationship to hormone-induced avidin formation in the oviduct *Endocrinology* 45(5), 451–454.
- Hunt L. T. ja Barker W. C. (1989) Avidin-like domain in an epidermal growth factor homolog from a sea urchin. *FASEB* 3:1760–1764.
- Hymes J., Stanley C.M. ja Wolf B. (2001) Mutations in BTM causing biotinidase deficiency. *Hum Mutat.* 18:375–381.
- Hytonen V. P., Laitinen O. H., Grapputo A., Kettunen A., Savolainen J., Kalkkinen N., Marttila A. T., Nordlund H. R., Nyholm T. K., Paganelli G. ja Kulomaa M. S. (2003) Characterization of poultry egg-white avidins and their potential as a tool in pre-targeting cancer treatment. *Biochem J*, 372:219–225.
- Hytönen V. P., Nyholm T. K., Pentikainen O. T., Vaarno J., Porkka E. J., Nordlund H. R., Johnson M. S., Slotte J. P., Laitinen O. H. ja Kulomaa M. S. (2004) Chicken avidin-related protein 4/5 shows superior thermal stability when compared with avidin while retaining high affinity to biotin. *J Biol Chem*, 279:9337–9343.
- Hytönen V.P., Määttä J.A., Nyholm T.K., Livnah O., Eisenberg-Domovich Y., Hyre D., Nordlund H.R., Hörhå J., Niskanen E.A., Paldanius T., Kulomaa T., Porkka E.J., Stayton P.S., Laitinen O.H. ja Kulomaa M.S. (2005) Design and construction of highly stable, protease-resistant chimeric avidins. *J Biol Chem.* 280:10228–33.
- Hytönen V.P., Määttä J.A.E., Niskanen E.A., Huuskonen J., Helttunen K.J., Halling K.K., Nordlund H.R., Rissanen K., Johnson M. S., Salminen T.A., Kulomaa M.S., Laitinen O.H. ja Airene T.T (2007) Structure and characterization of a novel chicken biotin-binding protein A (BBP-A). *BMC Struct Biol.* 7:8.
- Jelesarov I. ja Karshikoff A. (2009) Defining the role of salt bridges in protein stability. *Methods Mol Biol.* 490:227–60.

- Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Minamisawa K., Uchiumi T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Iriguchi M., Kawashima K., Kohara M., Matsumoto M., Shimpo S., Tsuruoka H., Wada T., Yamada M. ja Tabata S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9:189–197.
- Kannan N. ja Vishveshwara S. 2000 Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins. *Protein engineering* 13:753–61.
- Keinänen R.A., Laukkanen M.L. ja Kulomaa M.S. (1988) Molecular cloning of three structurally related genes for chicken avidin. *J. Steroid Biochem.* 30, 17–21.
- Keinänen R.A., Wallen M.J., Kristo P.A., Laukkanen M.O., Toimela T.A., Helenius M.A. ja Kulomaa M.S. (1994) Molecular cloning and nucleotide sequence of chicken avidin-related genes 1–5. *Eur. J. Biochem.* 220, 615–621.
- Kohler P.O., Grimley P.M. ja O'Malley B.W. (1968) Protein synthesis: Differential stimulation of cell-specific proteins in epithelial cells of the chick oviduct. *Science.* 160:86.
- Kopinski J.S, Leibholtz J ja Loveb R.J. (1989) Biotin studies in pigs.5. *Br. J. Nutr.* 62:781–789.
- Laitinen O.H., Airene K.J., Marttila A.T., Kulik T., Porkka E., Bayer E.A., Wilchek M. ja Kulomaa M.S. (1999) Mutation of a critical tryptophan to lysine in avidin or streptavidin may explain why sea urchin fibropellin adopts an avidin-like domain. *FEBS Lett.* 461:52–8.
- Laitinen O. H., Hytönen V. P., Ahlroth M. K., Pentikäinen O. T., Gallagher C., Nordlund H. R., Marttila A. T., Heino S., Johnson M. S., Airene K. J. ja Kulomaa M. S. (2002) Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin. *Biochem. J.* 363: 609–617.
- Leon-Del-Rio A. ja Gravel R.A. (1994) Sequence requirements for the biotinylation of carboxyl-terminal fragments of human propionyl-CoA carboxylase alpha subunit expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 269:22964–8.
- Livnah O., Bayer E.A., Wilchek M. ja Sussman J.L. (1993) Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5076–5080.
- Lynen F. (1979) New experiments of biotin enzymes. *CRC Crit Rev Biochem.* 7:103–19.
- Majumder K. (1992) Ligation-free gene synthesis by PCR: synthesis and mutagenesis at multiple loci of a chimeric gene encoding OmpA signal peptide and hirudin. *Gene.* 110:89–94.
- Marston F.A.O (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 240:1–12.
- Marttila A.T., Hytönen V.P., Laitinen O.H., Bayer E.A., Wilchek M. ja Kulomaa M.S. (2003) Mutation of the important Tyr-33 residue of chicken avidin: functional and structural consequences. *Biochem J.* 369:249–54.
- McMahon R. J. (2002) Biotin in Metabolism and Molecular Biology. *Annu Rev Nutr.*, 22, 221–39.
- McKean A.L., Ke J., Song J., Che P., Achenbach S., Nikolau B.J. ja Wurtele E.S. (2000) Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* 275:5582–5590.
- Melville D., Moyer A.W., Hofman K ja du Vigneaud V. (1942) The Structure of Biotin: The Formation of Thiophenevaleric Acid from Biotin. *J. Biol. Chem.*, 146, 487.
- Meslar H.W., Camper S.A. ja White H.B. 3rd. (1978) Biotin-binding protein from egg yolk. A protein distinct from egg white avidin. *J Biol Chem.* 253:6979–6982.

- Meyer, D.L., Schultz, J., Lin, Y., Henry, A., Sanderson, J., Jackson, J.M., Goshorn, S., Rees, A.R. ja Graves, S.S. (2001) Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis. *Protein Sci.* 10, 491–503.
- Misawa S. ja Kumagai I. (1999) Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers.* 51:297–307.
- Mock D.M., Johnson S.B. ja Holman R.T. (1988) Effects of biotin deficiency on serum fatty acid composition: evidence for abnormalities in humans. *J Nutr.*, 118:342–348.
- Mock D.M., Mock N.I., Stewart C.W., LaBorde J.B. ja Hansen D.K. (2003) Marginal biotin deficiency is teratogenic in ICR mice. *J Nutr.*, 133:2519–25.
- Morag E., Bayer E.A. ja Wilchek, M. (1996) Reversibility of biotin-binding by selective modification of tyrosine in avidin. *Biochem. J.* 316:193–9.
- Moy V.T., Florin E.-L. ja Gaub H. E. (1994) Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*, 266:257–259.
- Nordlund H.R., Laitinen O.H., Uotila S.T., Nyholm T., Hytonen V.P., Slotte Jp.P ja Kulomaa M.S. (2003) Enhancing the thermal stability of avidin. Introduction of disulfide bridges between subunit interfaces. *J Biol Chem.* 278:4010–4.
- Nordlund H.R., Hytonen V.P., Laitinen O.H. ja Kulomaa M.S. (2005) Novel avidin-like protein from a root nodule symbiotic bacterium, *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biol Chem.* 280:13250–13255.
- Ozand P.T., Gascon G.G., Al Essa M., Joshi S., Al Jishi E., Bakheet S., Al Watban J., Al-Kawi M.Z. ja Dabbagh O. (1998) Biotin-responsive basal ganglia disease: a novel entity. *Brain.* 121:1267–1279.
- Orr, G.A. (1981) The Use of the 2-Iminobiotin-Avidin Interaction for the Selective retrieval of Labeled Plasma Membrane Components. *J. Biol. Chem.* 256, 761–766.
- Pacheco-Alvarez D., Solorzano-Vargas R.S. ja Del Rio A.L. (2002) Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res.* 33:439–447. Review.
- Paganelli G., Magnani P., Zito F., Villa E., Sudati F., Lopalco L., Rossetti C., Malcovati M., Chiolerio F., Seccamani E., Siccardi A.G. ja Fazio F. (1991) Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients. *Cancer Res.* 1991 51:5960–6.
- Perozzo R., Folkers G. ja Scapozza L. (2004) Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res.* 24:1–52.
- Ponnazhagan S., Mahendra G., Kumar S., Thompson J.A. ja Castillas M. Jr. (2002) Conjugate-based targeting of recombinant adeno-associated virus type 2 vectors by using avidin-linked ligands. *J Virol.* 76:12900–7.
- Pähler A., Hendrickson W.A., Kolks M.A., Argaraña C.E. ja Cantor C.R. (1987) Characterization and crystallization of core streptavidin. *J Biol Chem.* 262(29):13933–13937.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.-S., Lin, S.-W., Dunn, J.J. ja Studier, F.W. (1987) Vectors for Selective Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. *Gene* 56, 125–135
- Scholtissek J., Barth C.A., Hagemeister H. ja Frigg M. (1990) Biotin supply by large bowel bacteria in minipigs: evidence from intracaecal avidin. *Br J Nutr.* 64:715–720.
- Sealey W.M., Teague A.M., Stratton S.L. ja Mock D.M. (2004) Smoking accelerates biotin catabolism in women. *Am J Clin Nutr.* 80, 932–5.

- Studier, F.W. ja Moffatt, B.A. (1986) Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113–130
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. ja Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. *Meth. Enzymol.* 185, 60–89
- Subramanian N. ja Adiga P.R (1997) Mapping the common antigenic determinants in avidin and streptavidin. *Biochem Mol Biol Int.* 43:375–82.
- Sørensen H.S ja Mortensen K.K (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115:113–128.
- Takakura Y., Tsunashima M., Suzuki J., Usami S., Kakuta Y., Okino N., Ito M. ja Yamamoto T. (2009) Tamavidins--novel avidin-like biotin-binding proteins from the Tamogitake mushroom. *FEBS J.* 276:1383–97.
- Tuohimaa P., Joensuu T., Isola J., Keinänen R., Kunnas T., Niemelä A., Pekki A., Wallen M., Ylikomi T. ja Kulomaa M. (1989) Development of progesterin-specific response in the chicken oviduct. *Int. J. Dev. Biol.* 33:125–134.
- Van den Burg B., Vriend G., Veltman O.R., Venema G. ja Eijssink V.G. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2056–60.
- White H.B. 3rd., Dennison B.A., Della Fera M.A., Whitney C.J., McGuire J.C., Meslar H.W. ja Sammelwitz P.H. (1976) Biotin-binding protein from chicken egg yolk. Assay and relationship to egg-white avidin. *Biochem J.* 157:395–400.
- White H.B. 3rd ja Whitehead C.C. (1987) Role of avidin and other biotin-binding proteins in the deposition and distribution of biotin in chicken eggs. Discovery of a new biotin-binding protein. *Biochem J.* 241:677–84.
- Wigley D.B., Clarke A.R., Dunn C.R., Barstow D.A., Atkinson T., Chia W.N., Muirhead H. ja Holbrook J.J. (1987) The engineering of a more thermally stable lactate dehydrogenase by reduction of the area of a water-accessible hydrophobic surface. *Biochim Biophys Acta.* 916:145–8.
- Wilchek M. ja Bayer E.A. 1990. Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol.*;184:5–13.
- Wilchek M. ja Bayer E.A. (1999) Foreword and introduction to the book (strept)avidinbiotin system. *Biomol. Eng.* 16, 1–4.
- Wood H.G. ja Barden R.E. (1977) Biotin enzymes. *Annu Rev Biochem.* 46:385–413.
- Zeng W.Q., Al-Yamani E., Acierno J.S. Jr, Slaugenhaupt S., Gillis T., MacDonald M.E., Ozand P.T. ja Gusella J.F. (2005) Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in SLC19A3. *Am J Hum Genet.* 77:16–26.

LIITTEET

LIITE I. TYÖSSÄ KÄYTETYT ALUKKEET JA PCR-OHJELMAT

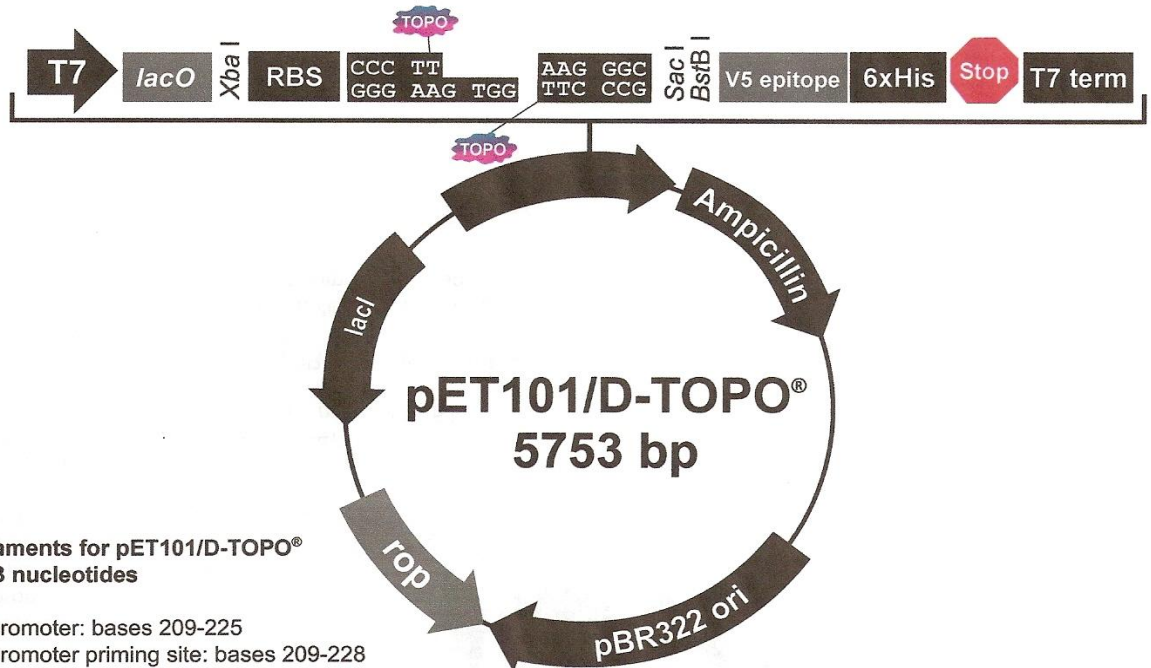
TAULUKKO I.1 Työssä käytetyt alukkeet.

Nimi	Sekvenssi (5' → 3')
81d12_3' meri 5'	CTA AGC AAT CAC GCG AAT GA GCC GCC GTT ACG GCC TCT GGT GTT GCC TCG GCT CAG ACC GTG GCA GAA TGC AGT GTG GAA
Chim to 2_5'	CACC ATG AAC AAA CCC TCC AAA TTC GCT CTG GCG CTT GCC TTC GCC GCC GTT ACGG CCTC
pET101_forw 5'	TAA TAC GAC TCA CTA TA GGG 3'
pET101_rev	TAG TTA TTG CTC AGC GGT TGG

TAULUKKO I.2 Työssä käytetyt PRC ohjelmat.

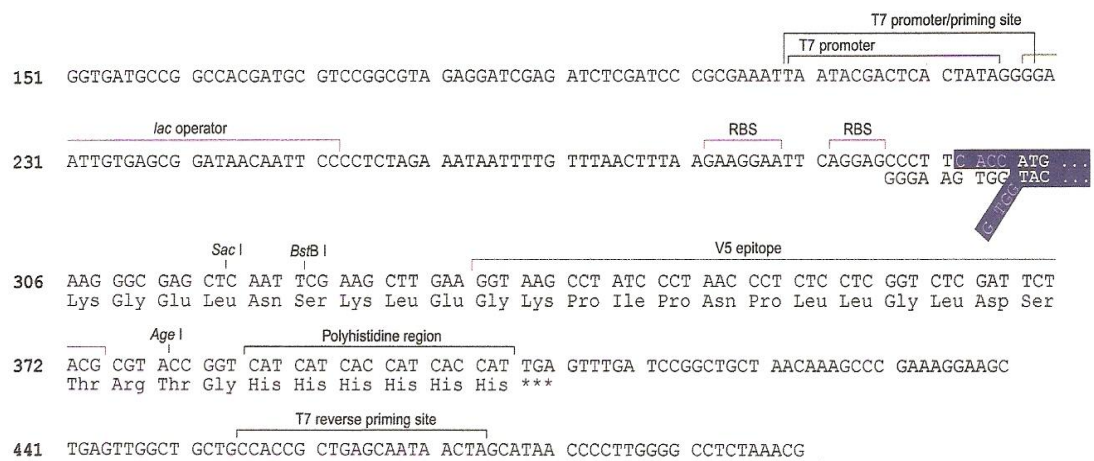
PCR- ohjelma 1	PCR- ohjelma 2
1. 95°C, 5 min	1. 96°C, 30 s
2. 94°C, 1 min	2. 50°C, 15 s
3. 50°C, 1 min	3. 60°C, 4 min
4. 72°C, 1,5 min	4. 4°C, ∞
5. 72°C 5 min	
6. 4°C, ∞	

LIITE II. TYÖSSÄ KÄYTETYN Pet101/D-TOPO VEKTORIN KARTTA JA POLYLINKKERI



Comments for pET101/D-TOPO® 5753 nucleotides

T7 promoter: bases 209-225
 T7 promoter priming site: bases 209-228
lac operator (*lacO*): bases 228-252
 Ribosome binding site (RBS): bases 282-288, 292-296
 TOPO® cloning site (directional): bases 297-310
 V5 epitope: bases 333-374
 Polyhistidine (6xHis) region: bases 384-401
 T7 reverse priming site: bases 455-474
 T7 transcription termination region: bases 416-544
bla promoter: bases 845-943
 Ampicillin (*bla*) resistance gene (ORF): bases 944-1804
 pBR322 origin: bases 1949-2622
 ROP ORF: bases 2990-3181 (complementary strand)
lacI ORF: bases 4493-5584 (complementary strand)



Kuva II.2. Valmistajan antama polylinkkeri (DNA jakso) vektorille pET101/D-TOPO.

LIITE III. LIUOKSET JA REAGENSIT

TAE-PUSKURI:

0.04 M Tris-asetatti
1 mM ADTA

10 x DNA LASTAUSPUSKURI:

5 mg bromofenolisininen
5 mg ksyleenisyanoli
300 mg Ficoll 400
Liuoksen tilavuus täytetään vedellä 1 ml:ksi

S.O.C.-LIUOS:

2.0 % Bacto-tryptone
0.5 % Yeast-extract
10 mM M NaCl
2.5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₂
20 mM glukoosi

LB-LIUOS:

10 g Bacto-Tryptone
5 g Bacto- yeast extract
10 g NaCl
Liuoksen tilavuus täytetään vedellä 1 l:ksi.

LB-AGAR:

Valmistetaan kuten nestemäinen LB- liuos, mutta seokseen lisätään 15 grammaa Bactoagaria.
Agar sulatetaan liuokseen (121 °C, 20min) ja liuos maljataan. Antibiootit lisätään ennen maljausta jäähtyneeseen (48 C°) agarliuokseen haluttuun konsentraatioon.

pH 11 –PUSKURI:

50 mM NA₂CO₃
1 M NaCl

HILLO I –PUSKURI:

50 mM Tris-HCL (pH 8)
1 % Triton-X100
2mM EDTA
150 mM NaCl

PBS:

276 mM NaCl
16 mM Na₂HPO₄
10.7 mM KCL
2.9 mM KH₂PO₄

pH 4 –PUSKURI:

50 mM NH₄CH₃COO
0,5 M NaCl

AJOGHEELIT:**5 % ylägeeli:**

680 µl H₂O
170 µl 30 % akryyliamidi
130 µl 1,5 M Tris (pH 6,8)
10 µl 10 % SDS
10 µl 10 % APS
1 µl TEMED

15 % ajogeeli:

1.1 ml H₂O
2,5 ml 30 % akryyliamidi
1,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
50 µl 10 % SDS
50 µl 10 % APS
2 µl TEMED

SDS-PAGE NÄYTEPUSKURI (2X):

0.5 ml 0,5 M tris-HCL (pH 6,8)
0.8 ml 10 % SDS
0.4 ml glyseroli
0.04 ml 0,2 % bromifenolisininen
0.2 ml β-merkaptotetanoli
8.06 ml H₂O

SDS-PAGE AJOPUSKURI (1x):

3.03 g Tris
14.4 g glysiini
1.0 g SDS
87

Liuksen tilavuus täytetään vedellä 1 l:ksi.

COOMASSIE BRILLIANT BLUE –VÄRJÄYSLIUOS:

0.05 % Coomassie Brilliant Blue R-250
40 % etanoli
10 % etikkahappo
50 % H₂O

VÄRISPOISTO (“DESTAINING”) -LIUOS:

40 % etanoli
10 % etikkahappo
50 % H₂O

SDS-SIIRTOPUSKURI (1x):

3.03 g Tris
14.4 g glysiini
20 % metanoli
Liuoksen tilavuus täytetään vedellä 1 l:ksi.

PONCEAU S –VÄRJÄYSLIUOS:

0.05 % Ponceau S
1 % etikkahappo (97 – 100 %)
99 % H₂O

PBS-TWEEN (10x):

0.1 M PBS
0.05 % Tween 20

100 bp:N DNA-KOKOSTANDARDI (BIOLABS):

1 µl DNA-ladder (Biolabs)
1 µl 6 x Loading Dye (Biolabs)
4 µl H₂O

pH 9,6 Na-FOSFAATTI (0.1 M) PUSKURI

I 27,6 g NaH₂PO₄ --> liuoksen tilavuus täytetään vedellä 1 litraksi
II 53.62 g Na₂HPO₄ --> liuoksen tilavuus täytetään vedellä 1 litraksi
sekoitetaan 5,3 ml I ja 94,7 ml II liuosta (pH 8.0) ja säädetään pH NaOH:lla