

## **Yksilöllisempää syöpähoitoa kolmiulotteisten soluviljelmien avulla?**

*Erilaisiin syöpiin sairastuu Suomessa vuosittain lähes 33 000 ja niihin kuolee yli 12 000 ihmistä. Aikainen diagnoosi ja oikea hoitovalinta parantavat ennustetta huomattavasti. Oikean lääkehoidon valinta ei kuitenkaan ole aina helppoa, sillä jokainen syöpä reagoi hoitoihin eri tavalla. Yleensä hoidon toimivuus nähdäänkin vasta hoitojen edetessä. Hoidon valinnassa voitaisiin hyödyntää potilaan kasvaimesta eristettyjä soluja, joita altistetaan eri syöpälääkkeille kolmiulotteisissa soluviljelmissä.*

### **Emma Talvitie**

Ohjaajat: FT Ville Härmä, FT Juha Rantala  
BIOTEKNIKKA DI

Kolmiulotteista soluviljelymenetelmää voidaan hyödyntää yksilöllisen syövänhoidon valinnassa. Menetelmässä potilaan kasvaimesta eristetään syöpäsoluja, joita kasvatetaan kolmiulotteisesti biologisessa väliaineessa ja altistetaan potentiaalisille syöpälääkkeille. Soluja kuvataan altistamisen edetessä ja lääkevasteet määritetään altistuksen eri vaiheista otetuista kuvista.

-Vastaavaa menetelmää on käytetty yksilöllisen syövänhoidon valintaan kaksiulotteisista soluviljelmistä, mutta oletettavasti lääkkeiden toiminta on kolmiulotteisissa viljelmissä lähempänä niiden toimintaa syövän hoidossa ihmisen kudoksissa verrattuna kaksiulotteisiin soluviljelmiin, Talvitie kertoo.

Talvitie kehitti diplomityössään kolmiulotteista soluviljelymenetelmää potilaiden kasvaimista eristettyjen solujen lääkevasteiden analysointia varten. Menetelmän kehittämiseen kuului olennaisesti myös kuva-analyysi, johon Talvitie hyödynsi syväoppivia neuroverkkoja.

-Syväoppivien neuroverkkojen avulla kolmiulotteiset solurakenteet saatiin ulkomuotonsa perusteella jaoteltua joko normaaleiksi tai runsaasti solukuolemaa sisältäviksi rakenteiksi. Näin saatiin solurakenteista tärkeää tietoa perinteisillä kvantitatiivisilla kuva-analyysimenetelmillä saadun tiedon lisäksi, Talvitie toteaa.

### **Analyysityökalut vaativat vielä hiomista**

Talvitie toteaa, että analyysityökalut vaativat kuitenkin vielä hiomista, ennen kuin menetelmällä saatuja lääkevastetuloksia voitaisiin suoraan hyödyntää potilaan syöpähoidon valinnassa.

-3D-menetelmällä saatuja lääkevasteita analysoidessa eri analyysityökaluilla saadut tulokset eivät ole yksiselitteisiä ja ovat jopa ristiriidassa keskenään. Näyttäisi kuitenkin siltä, että neuroverkot toimivat tässä paremmin, kuin perinteinen kuva-analyysi, Talvitie tarkentaa.

## **Erikoistyöntekijä tutki uuden sukupolven sekvensointitekniikoiden hyödyntämistä epitooppimallinnuksessa**

*Diplomityönsä Turun yliopiston biotekniikan osastolla tehnyt Merimari Seppänen kehitti vasta-aineita prostataspesifistä antigeenia (PSA) vastaan. Työssään hän pyrki määrittämään vasta-aineiden DNA-sekvenssin kolmella eri sekvensointimenetelmällä ja mallintamaan PSA:n epitooppeja eli vasta-aineen sitoutumiskohtia laskennallisilla menetelmin.*

### **Merimari Seppänen**

Ohjaaja: Ph.D. Janne Leivo

BIOTEKNIikka DI

Seppänen tuotti diplomityössään vasta-aineita PSA:ta vastaan faaginäyttökemian avulla. Satunnainen, 30 kloonin otos vasta-aineita sekvensoitiin perinteisellä Sanger-sekvensoinnilla, ja sekvensseistä löytyi yhteensä 19 uniikkia vasta-ainetta. Sekvenssien perusteella Seppänen loi vasta-aineille 3D-mallit supertietokoneen avulla, ja näiden sitoutumista PSA:han mallinnettiin onnistuneesti.

Seppänen valmisti myös laadukkaan vasta-aine-DNA-kirjaston seuraavan sukupolven sekvensointia (engl. Next generation sequencing, NGS) varten. NGS-kirjaston avulla voitaisiin sekvensoida kaikki tuotetut vasta-aineet, eikä vain muutamaa kymmentä yksittäistä kloonaa, kuten Sanger-sekvensoinnilla. Seppänen työskenteli biotekniikan osastolle hankitun uuden nanohuokossekvensointilaitteen, MinIONin käyttöönoton parissa ja saattoi laitteen käyttövalmiiksi. Kontrollisekvensointi MinIONilla tuotti paljon dataa, joka vastasi laadultaan odotuksia ja julkaistuja tuloksia, mutta itse sekvensointikirjaston ajossa Seppänen kohtasi ongelmia.

- Ongelmat johtuivat todennäköisesti näytteenkäsittelystä. Minulla ei ollut mahdollisuutta käyttää valmistajan suosittelemaa puhdistusmenetelmää, ja kokeilin useampaa erilaista menetelmää, mutta ne kaikki vaikuttivat ilmeisesti näytteeseen niin, ettei sekvensointi lopulta onnistunut, Seppänen kertoo.

Nanohuokossekvensoinnissa kohdattujen ongelmien jälkeen Seppänen yritti sekvensoida kirjaston toisella NGS-menetelmällä, Illuminan MiSeqillä. Tämä sekvensointiajo kuitenkin keskeytyi, eikä saatu data vastannut määrältään tai laadultaan odotuksia. Datasta voitiin kuitenkin eristää eniten muuntelua sisältävät ja vasta-aineen sitoutumiseen vahvimmin vaikuttavat alueet CDR-H3:t (engl. third heavy chain complementary determining region), joita Seppänen vertaili Sanger-sekvensoinnilla löytyneisiin CDR-H3-alueisiin.

- Ideaalitilanteessa sekvensointidataa olisi kertynyt valtava määrä niin MinIONista kuin MiSeqistä, mutta jatkuvat ongelmat ja takaiskut toivat haasteita. Ajan ja resurssien rajallisuuden vuoksi kirjastoa ei saatu sekvensoitua uudelleen, mikä näkyy luonnollisesti myös tulosten määrässä, Seppänen huokaa.

Tavoitteena on sekvensoida kirjastot myöhemmin jonkin toisen projektin puitteissa. Tällöin on odotettavissa, että löytyy aivan uusia, tehokkaita vasta-aineita PSA:ta vastaan. Myös datankäsittelyyn on löydettävä uusia, tehokkaita menetelmiä. Epitooppien tarkasta tuntemisesta on hyötyä muun muassa diagnostiikassa sekä rokotteiden ja terapeuttien vasta-aineiden löytämisessä ja kehittämisessä.

## **Kudosnäytteiden käsittely parantaa elinten erottelua toisistaan**

*Elimet koostuvat erilaisista kudoksista ja erilaistuneista soluista. Menetelmää, jolla pystytään luokittelemaan ja tunnistamaan elinkudoksia, voitaisiin hyödyntää tulevaisuudessa esimerkiksi syöpäkasvainien tarkempaan luokitteluun. Vilhelmiina Lehti on tehnyt diplomityönsä Aqsens Health -yrityksessä selvittäen, miten E-TRF-teknologiaa voisi käyttää kudosten luokitteluun ja miten kudosnäytteiden käsittely vaikuttaa lopputulokseen.*

### **Vilhelmiina Lehti**

Ohjaaja: M.Sc. Janne Kulpakko

BIOTEKNIikka DI

Lehti tutkii kudosnäytteiden käsittelyn vaikutusta määrityksen erotuskykyyn ja elinten luokitteluun. Lehden tutkimusten perusteella kalan eri elimistä otetut kudosnäytteet pystytään osittain luokittelemaan menetelmän avulla. Näytteiden entsyymäattinen käsittely ennen määritystä osoittautui tehokkaammaksi menetelmäksi kuin käsittelemättä jättäminen ja alustavien tulosten mukaan jokainen tällä tavalla käsitelty elin erottuu omaan luokkaansa.

- Entsyymäattinen käsittely vaikuttaa näytteessä vapaana olevaan proteiinipitoisuuteen ja näyttää vapauttavan sellaisia aineenvaihduntatuotteita, jotka voidaan havaita menetelmällä ja parantavat sen luokittelukykyä, Lehti toteaa.

Tätä näyttää tukevan myös tulokset, jotka Lehti on saanut vertaamalla elinkohtaisesti käsiteltyä kudosnäytettä käsittelemättömään. Tulosten mukaan ero nähdään jokaisen elimen kohdalla entsyymäattisesti käsitellyn ja käsittelemättömän välillä. Samaa vaikutusta ei saatu aikaan ääriämpötiloja hyödyntävällä pakastus-sulatuskäsittelyllä, jonka avulla eroja nähtiin vain osalla elimistä. Tutkimuksen päätavoitteena oli, että Lehti pystyisi luokittelemaan eri elinkudoksia ja erottamaan niitä toisistaan menetelmällä. Hän vertaili käsittelemättömiä elimiä keskenään ja teki samoin myös entsyymäattisesti- ja pakastus-sulatuskäsitellyille elimille.

- Jokaiselle näytteelle on luotu rinnakkaisten määritysten avulla ikään kuin sormenjälki, joita vertaamalla mahdolliset eroavaisuudet saadaan esiin ja luokittelua pystytään tekemään. Osa käsittelemättömien kudosnäytteiden sormenjäljistä menee päällekkäin, joten luokittelu on osittaista. Samankaltaisia tuloksia saatiin myös pakastus-sulatuskäsitellyillä näytteillä. Entsyymäattisesti käsiteltyjen näytteiden sormenjäljet eroavat toisistaan enemmän ja elimet pystytään erottamaan toisistaan, Lehti kertoo tuloksistaan.

Lehden tutkimuksissaan käyttämä E-TRF-menetelmä perustuu aikaerotteiseen fluoresenssiin, jossa näytteeseen lisätään valoa tuottava molekyyli. Näytteen sormenjälki muodostetaan näytteestä mitatun valon ja sen muutosten perusteella.

- Näiden alustavien tulosten pohjalta haluaisin tutkia vielä kudosnäytteiden entsyymäattista käsittelyä lisää. Tulevaisuudessa menetelmään pohjautuvia käytännön sovelluksia voisi kehittää patologiaan tai rikostekniseen tutkimukseen. Sitä ennen tarvitaan vielä kuitenkin paljon lisätutkimuksia, Lehti kiteyttää.

## **Diplomityöntekijä kehitti vasta-ainepohjaista Covid-19 pikatestiä**

*Vallitseva koronaviruspandemia on riivannut ihmisiä kuluneen vuoden. Tartuntojen kartoittamiseksi käytetään erilaisia diagnostisia menetelmiä. Turun yliopistolla diplomityössään Saarinen kehitti vasta-ainepohjaista kuoppalevymääritystä koronavirusinfektion seulontaan.*

### **Roope Saarinen**

Ohjaajat: FT Tuomas Huovinen, FM Sami Oksanen  
Biotekniikka DI

Roope Saarinen seuloi tuhansia vasta-aine-variantsseja SARS-Cov-2 viruksen nukleokapsidiproteiinia (N) kohtaan. Seulonta toteutettiin 96-kuoppalevyllä bakteerikasvatuksina.

- Parhaiten N-proteiinia sitovat vasta-aineet valittiin jatkoon ja niiden sitomiskykyä analysoitiin tarkemmin. Näin pystyttäisiin valmistamaan mahdollisimman tarkka testi, toteaa Saarinen.

### **Mutaatioilla parempaan sitomiskykyyn**

- Vasta-aineiden sitomiskyky perustuu niiden CDR-ketjuihin (complementarity-determining regions). Oletimme sitoutumisen paranevan kohdistamalla mutaatioita CDR-L3-ketjuun, Saarinen pohdiskelee.

Oletus sitomiskyvyn paranemisesta ei kuitenkaan toteutunut halutulla tavalla. Mahdollista on, että käytetty analyysimenetelmä ei soveltunut kyseisille vasta-aineille ja täten positiivista eroa sitomiskyvyssä ei havaittu.

Lopullista testiä varten Saarinen kehitti työnsä lopulla vasta-aineista komplekseja käyttäen uudenlaista sitomismenetelmää, jossa hyödynnettiin SpyCatcher – SpyTag välistä kemiaa.

### **Kehitystyötä jatkettava**

- Hienoa, että saimme tehtyä toimivan konseptin, mutta kehitystyötä tulee jatkaa. Muihinkin CDR-ketjuihin kannattaisi kohdistaa mutaatioita, sekä niiden vaikutusta tulisi tarkastella herkemällä menetelmällä, kuin tässä työssä käyttämämme EC50 (half effective concentration), toteaa Saarinen.

Kuoppalevymäärityksen lisäksi tuotettuja vasta-aineita hyödynnettiin lateraalivirtaus-pikatestin kehittämässä toisen tutkimusryhmän kanssa.

## **Improving the fragrance of alcoholic beverages**

*Using non-Saccharomyces yeasts to ferment alcoholic beverages can improve their aroma, according to the study done by BSc. (Tech.) Tapio Metz. Alcoholic black currant beverages fermented with the so-called non-Saccharomyces yeasts showed improved aromatic qualities when compared to black currant beverages fermented with the more traditional Saccharomyces yeasts. Main improvements were a stronger “black currant” aroma as well as a weaker “stuffy” or “musty” odour.*

### **Tapio Metz**

Supervisors: MSc. (Tech.) Niina Kelanne, Docent Oskar Laaksonen  
FOOD DEVELOPMENT

The alcoholic black currant beverages were made with five different yeast strains, of which three were non-*Saccharomyces* yeasts. A panel was trained to evaluate the taste, odour, and mouthfeel characteristics of the beverages by scoring the different sensory attributes on a scale from 0 to 10.

- The results of the study are promising. They indicate that alcoholic black currant beverages produced with specific non-*Saccharomyces* yeasts have better aromatic qualities than those produced with the *Saccharomyces* yeasts, said Metz.

None of the taste attributes showed significant differences, however.

- Due to the acidic nature of black currants, which was further enhanced by the loss of sugars during the fermentation, the panelists were unable to differentiate the beverages by taste.

Producing alcoholic beverages from non-grape fruits has its own challenges, but fruit wines have a lot of market potential, especially in regions where viticulture does not thrive. And they have one advantage, which is that they are not confined to seasonal production as they can be made from concentrates.

### **Low alcohol future**

*Saccharomyces* yeasts are effective alcohol producers, which is why they have been the *de facto* winemaking yeasts for so long, but recently beverages with lower alcohol content have been increasing in popularity. As the trend is expected to continue, even grape wine manufacturers are striving to produce wines with less alcohol – which is something that can be achieved with non-*Saccharomyces* yeasts.

- *The aroma enhancing effects are specific to the yeast strain and to the fruit from which the beverage is made, so more research is still needed. But non-Saccharomyces yeasts have a lot of potential, especially in producing low alcohol beverages*

## **Potential new Finnish pear variants for pear cider production have been found**

*Ciders can be produced from both apples and pears, but alcoholic pear beverages or pear ciders have not been investigated that widely. Currently, there are little data available on the suitability of Finnish pears in alcoholic beverages. This study investigates sensory properties phenolic compound profiles of the pear ciders aiming to find new Finnish pear variants with interesting sensory and chemical properties.*

### **Laura Vaateri**

Supervisors: Doc. Oskar Laaksonen and M.Sc. Wenjia He  
FOOD DEVELOPMENT

There is a high scientific interest in phenolic compounds as they show a positive impact on human health. Phenolic compounds are also closely associated with the sensory properties of ciders. In her master's thesis project, Laura Vaateri has studied the correlations between sensory characterization and chemical composition of alcoholic pear beverages with the aim of finding a pear variant with good quality requirements and sensory properties to be used in pear cider production in Finland.

Based on preliminary analysis of the samples, significant differences were found in the variants, especially when comparing the sweetness and astringency of the alcoholic pear beverages or the intensity of cooked pear odour. These differences give possibilities to produce pear ciders with vastly different properties which would expand the customer base in the market.

Alcoholic pear beverages included in the study consisted of ten pears received from the Natural Resources Institute of Finland and of two commercial cultivars. The beverages were fermented with two yeast strains: *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii*. Sensory characteristics were studied by training a sensory panel to evaluate odor, flavor and color of the pear cider samples. In chemical analysis the phenolic compounds were extracted with ethyl acetate extraction and the quantification and identification were done using UPLC and Q-ToF respectively.

The results from sensory evaluation indicate many potential pear variants that could be used in local pear cider production. Processing of the results from chemical analyses is currently still ongoing and the next step in the thesis project is to compare the results from sensory evaluation and chemical analyses.

## **Oxidative protection and sensory perception of omega-3 enriched foods**

*Microencapsulation of omega-3 is shown to have protective effect against oxidation. Omega-3 fortified cookies and chocolate capsule materials to exhibit the best protective effect are pea protein and maltodextrin and whey protein and maltodextrin.*

### **Annalisa Seubert**

Supervisors: Ph.D. Annelie Damerou, M.Sc. Sari Mustonen, Doc. Oskar Laaksonen,  
Prof. Kaisa Linderborg  
FOOD DEVELOPMENT

Data shows microcapsules made with pea protein and maltodextrin exhibit the best results delaying the oxidation of omega-3 in cookies, while whey protein and maltodextrin capsules show the best protective effects in chocolate. The cookies and chocolates containing these capsules showed similar characteristics to cookies and chocolate without added linseed oil. The exact reason why the capsule's protective function changes between the different foods is still unclear. The cookies and chocolates were evaluated by a sensory panel.

The studied capsules were made of pea, soy and whey protein combined with maltodextrin. Each of these capsules containing linseed oil was added to cookies and chocolates during their production in concentration that have a positive effect on health. The fortified cookies and chocolates were stored over a period of time to study the protective effect of the capsule. As a continuation of the research, oxidative stability of linseed oil in the cookies and chocolates will be studied during storage and correlated to the sensory results.

Microencapsulation has potential to shield the sensitive essential omega-3s against oxidation. To produce the microcapsules, linseed oil and a protein are mixed forming an emulsion. The emulsion is atomized and dehydrated producing the microcapsules. The protein forms the outer layer of the capsule while linseed oil is protected at the core. By microencapsulating linseed oil, an omega-3 rich source, researchers have found it possible to protect the omega-3s and allowing the possibility of enriching food with them.

Omega-3 fatty acids are essential in the human diet. The body cannot produce them by itself, so they have to come from the food we consume. However, the omega-3 intake in Western countries is below recommended amount. For this reason, food fortification with omega-3s have been of interest. A challenge when working with omega-3 fatty acids is they oxidize easily during food processing affecting their nutritional properties and modifying their sensory qualities, like aroma and flavor.

Omega-3 consumption offers a multiple health benefits. Reduction of coronary heart disease, reduction of disease-promoting inflammation (like psoriasis and rheumatoid arthritis), and promoting normal brain development in infants are some of them. The methods developed in this research enable supplementing food with plant-based omega-3 source, improving the nutritional quality of food and offering health benefits to the consumer.

## **Itämeren levistä ympäristöystävällistä tulevaisuuden ruokaa**

*Itämeressä kasvavat levät kiinnostavat elintarviketeollisuutta. Leviä voidaan hyödyntää sellaisenaan ruuaksi tai parantamaan elintarvikkeiden laatua. Levien koostumukseen vaikuttavat useat ympäristön tekijät. Pihla Pyykkönen tutkii pro gradu -työssään laiduntamisen ja eri kasvupaikkojen vaikutusta rakkohaurun (*Fucus vesiculosus*) aineenvaihduntatuotteisiin. Levätutkimuksella on tärkeä rooli elintarvikealan kehityksessä kohti uusia, innovatiivisia ja kestäviä vaihtoehtoja.*

### **Pihla Pyykkönen**

Ohjaajat: Apulaisprofessori, Maaria Kortensniemi ja FT, Moona Rahikainen  
ELINTARVIKEKEMIA

Leväsiirat ovat rakkolevien luonnollisia laiduntajia. Varsinkin levien perusaineenvaihduntaan kuuluvan sokerialkoholin, mannitolin, pitoisuuden havaittiin vähenevän laidunnuksen myötä.

- Mannitoli on fotosynteesin päätuote levillä ja sillä on tärkeä asema muun muassa levien energiantuotannossa ja vesipotentiaalin ylläpidossa. Lisäksi se toimii muiden yhdisteiden lähtöaineena, selventää Pihla.

Tutkimusasetelmassa sama leväyksilö jaettiin kahteen altaaseen, jossa toisessa oli leväsiirto mukana ja toisessa ei. Altaiden olosuhteet säädettiin vastaamaan Itämeren olosuhteita. Laidunnus saa levän tuottamaan sekundaarimetaboliitteja, jotka voivat suojata levää levänsyöjiltä.

### **Levien koostumus ja viljely**

Kasvumeren sijainnin on havaittu vaikuttavan Itämeressä kasvavien levien sisältämien yhdisteiden määrään ja laatuun. Alueet eroavat toisistaan muun muassa suola- ja ravinnepitoisuuden, veden sameuden sekä muiden kasvutilaa vievien kasvien ja levänsyöjien suhteen.

- Alueellisten erojen syy on varmasti monien tekijöiden summa. Seuraamalla säännöllisesti levien alueellisia muutoksia, eri tekijöiden osuutta pystytään ymmärtämään ja hyödyntämään paremmin, toteaa Pihla

Levien sisältämiä kemiallisia yhdisteitä pystytään tutkimaan esimerkiksi ydinmagneettisen resonanssi spektroskopian (engl. nuclear magnetic resonance, NMR) avulla. Menetelmän etuna on se, että samaan aikaan voidaan havainnoida monipuolisesti kemiallisesti erilaisia yhdisteitä.

Levän kasvatus onnistuisi ilman makeaa vettä ja maa-alaa, ja ravinteetkin levät saavat kerättyä ympäröivästä merestä. Pihla vakuuttaa, että Itämeressä kasvavia leviä pystyttäisiin paremmin hyödyntämään elintarviketeollisuudessa. Leviin kerääntyvät ei-toivotut aineet, kuten raskasmetallit on tietysti huomioitava, joten niiden määrittäminen ja seuraaminen on elintarviketurvallisuuden kannalta pakollista.



## **Turun Yliopistossa tutkitaan kauran vaikutusta oluen aromiyhdisteisiin**

*Oluen hajun ja maun muodostuminen on monimutkainen prosessi, jossa eri kemialliset yhdisteet reagoivat keskenään valmistuksen eri vaiheissa. Turun Yliopistolla tehtävässä tutkimuksessa tutkitaan kauran merkitystä oluen hajuun vaikuttavien yhdisteiden koostumukseen. Alustavien tulosten mukaan kauran osuus oluen haihtuvien yhdisteiden koostumukseen on ollut vähäinen.*

### **Jesse Ojala**

Ohjaaja: Dos. Oskar Laaksonen  
ELINTARVIKEKEMIA

Kaura on hyvien terveysominaisuuksiensa vuoksi useissa elintarvikkeissa nykyään suosittu raaka-aine. Viime vuosien suosituimpiin oluttyyleihin kuuluvat mehumaiset ja sameat IPA-oluet ovat huomattavasti lisänneet kauran kysyntää myös panimoteollisuudessa. Oluen laadusta puhuttaessa, on hajulla ja maulla suuri merkitys. Jesse Ojala tutkii erikoistyössään mallastetun sekä mallastamattoman kauran vaikutusta oluen haihtuviin yhdisteisiin. Kaura sisältää suhteessa muihin viljoihin enemmän proteiinia, rasvaa ja kuituja. Nämä kauran ominaisuudet tekevät siitä terveydelle hyödyllisen ja Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen onkin myöntänyt kauralle kolme terveystietä. Kaura sopii myös gluteenittomaan ruokavalioon, siten on suurta kiinnostusta tehdä kauratuotteita.

Oluen valmistuksen kannalta kauran ominaisuudet eivät kuitenkaan ole optimaaliset esimerkiksi, yleisesti oluen teossa käytettyyn ohraan verrattuna. Kauran tärkkelys on hankalammin pilkkoutuvassa muodossa kuin ohrassa, joka johtaa matalampaan alkoholipitoisuuteen. Beta-glukaani, kauran kuitu, saattaa lisätä oluen viskositeettiä ja rasvahapot on yhdistetty kitkerän virhemaun muodostumiseen.

- Tähän mennessä olen tunnistanut 49 haihtuvaa yhdistettä oluista, joiden mallasrunгон osana on käytetty eri mallastamattomia kauraeriä. Kauraerien yhdisteiden pitoisuuksien suhteissa on vain pieniä eroavaisuuksia ohraluueen verrattuna, Ojala toteaa.

Kauramaltaista tehdyt oluet valmistuvat myöhemmin keväällä.

### **Maltaan koostumus vaikuttaa haihtuviin yhdisteisiin**

Kaikista oluen aromiyhdisteistä esterit ja korkeammat alkoholit ovat merkittävimpiä. Sopivissa pitoisuuksissa ne muodostavat hedelmäisiä ja parfyymisiä hajuja. Niiden liian korkeat pitoisuudet taas voivat johtaa epämiellyttävien hajujen syntyyn.

- Hiivan tuottamien korkeampien alkoholien ja esterien syntymiseen vaikuttaa olutvierteessä olevien vapaiden aminohappojen määrä. Siksi tutkimme myös kauran vaikutusta oluen valmistukseen, esimerkiksi vapaan aminotyperen määrityksellä, jolla voimme arvioida vierteen aminohappojen määrää, kertoo Ojala

Haihtuvia yhdisteitä tutkitaan HS-SPME-GC-MS-menetelmällä, jossa oluen haihtuvat yhdisteet uutetaan kaasukromatografista erottelua varten. Tutkimuksen avulla voidaan ymmärtää oluen valmistuksessa käytettyjen raaka-aineiden vaikutusta haihtuvien yhdisteiden koostumukseen. Niiden ymmärtäminen ja kontrollointi voisi auttaa oluen laadun ja maun tasaisena pitämisessä ja siten edesauttaa kauran käyttöä oluissa.

## Syanobakteerien käyttöä ihmisen hyödyksi tutkitaan Turun yliopistossa

*Syanobakteerit eli sinilevät tunnetaan Suomessa parhaiten kesäisistä kukinnoistaan, mutta niitä voidaan käyttää myös biotuotantoon ja jätevesien puhdistukseen. Erikoistyössään Otso Turunen rakentaa Synechocystis-syanobakteerista paremmin toimivia tuottokantoja. Tähän pyritään muokkaamalla syanobakteerin stressiolosuhteisiin sopeutumista ja kasvua säätelevien sigmafaktoreiden määriä. Tulokset osoittavat, että biopolttoaineiden ja hapettavien aineiden sietokykyä on parannettu tehdyillä muutoksilla.*

### Otso Turunen

Ohjaajat: Dos. Taina Tyystjärvi, FT Juha Kurkela

MOLEKULAARINEN KASVIBIOLOGIA

Sigmafaktorit säätelevät mitkä geenit ovat kulloinkin aktiivisia. Tietyn sigmafaktorin määrää muuttamalla voidaan vaikuttaa satojen eri geenien ilmenemiseen. Tässä työssä ylituotetaan *Synechocystis*-syanobakteerin sigmafaktoreita ja tutkitaan ylituoton vaikutusta solujen kasvuun ja kykyyn sopeutua epäsuotuisiin olosuhteisiin. *Synechocystiksen* yhdeksästä sigmafaktorista ollaan tutkittu laajemmin kahta: SigA:ta ja SigB:tä.

-Lupaavimmat tulokset on saatu SigB:tä ylituottamalla. Tämä syanobakteerikanta kasvaa normaalia *Synechocystistä* paremmin hapettavien aineiden sekä butanolin kanssa. Butanoli on biopolttoaine, jota on yritetty tuottaa syanobakteereissa ja jätevesien puhdistukseen tarvittaisiin hapettavaa stressiä sietäviä kantoja. SigA taas säätelee jakautumiseen, kasvuun ja yhteyttämiseen liittyviä geenejä. Sen määrää lisäämällä toivotaan kasvun parantuvan suotuisissa olosuhteissa entisestään, Turunen kertoo.

### Tulevaisuuden näkymiä

Tutkimussuunnitelmaan kuuluu vielä sigmafaktoreiden SigC ja SigD ylituottaminen.

-SigD:llä yritetään lisätä stressinsietokykyä ja SigC:llä hidastaa kasvua. Joissain sovelluksissa kasvu saattaa kilpailla biotuotannon kanssa tai tiheä kasvusto varjostaa valolta. Olosuhteitten mukaan kasvua halutaan sekä lisätä että hillitä. Nykyisillä kannoilla on myös monia kokeita suorittamatta ja paljon mielenkiintoista on vielä selvittämättä, paljastaa Turunen.

Tämänhetkistä tutkimusta voisi kuvailla perustutkimukseksi, jonka päämääränä ovat teknilliset sovellukset.

-Nykyisen hankkeen taustalla on tutkimusryhmän vuosia tekemä työ sigmafaktoreiden parissa. Tieto ja kokemus koko tällä tieteen saralla jatkaa kasvuaan, eivätkä hyödylliset sovellukset ole enää kaukana tulevaisuudessa, Turunen ennustaa.

## **Master's student studies cyanobacterial heat acclimation**

*Cyanobacterial RNA polymerase is a protein complex which produces RNA from DNA template in a process called transcription. Regulatory sigma factors of RNA polymerase orchestrate gene expression by selecting which genes are transcribed. Master's student Jesse Vainio has shed light on the roles of two transcription related proteins in the heat acclimation of cyanobacteria.*

### **Jesse Vainio**

Supervisors: Adjunct professor Taina Tyystjärvi & Ph.D. Juha Kurkela  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Vainio studied the roles of the omega subunit of RNA polymerase and Ssr1600 protein in the heat acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis*. The small omega subunit of RNA polymerase is non-essential in optimal conditions, but it is known to be important to the heat acclimation process. Vainio uncovered that excess Ssr1600 protein is detrimental for *Synechocystis* in high temperatures.

- I conducted growth experiments at 40°C with multiple mutant strains and it became clear that the lack of the omega subunit of RNA polymerase can be compensated with low amount of the Ssr1600 protein. A strain which produced a lot of Ssr1600 protein grew poorly at 40 °C, which implicates that excess Ssr1600 protein is problematic for *Synechocystis* at high temperatures, Vainio interprets.

### **Climate change: The need for understanding cyanobacterial heat acclimation**

Cyanobacteria alongside algae might provide greenhouse gas neutral production platforms due to their ability to assimilate carbon dioxide in a process called oxygenic photosynthesis. However, climate change compromises the use of cyanobacteria as bioproduction platforms in future.

- The most cost-effective method of cultivating cyanobacteria is the use of open ponds which have no temperature control. The global temperature rise will lead to loss of productivity if the optimum growth temperature of these cyanobacteria is surpassed. Also, heat tolerant cyanobacteria may be useful in some bioproduction applications today, so the importance of basic research of cyanobacterial heat acclimation should not be overlooked, Vainio mentions.

- The research is however only in its infancy, and I only have a handful of results at this moment. I am producing multiple mutant strains which will hopefully shed more light on the significance of the Ssr1600 protein in the heat acclimation of *Synechocystis*. Also, more experiments are required with the existing strains to validate some of the results.

## **DNA methylation and transcriptome changes caused by glucocorticoid treatment in childhood leukemia patients**

*Leukemia is the most common pediatric cancer. The survival rate in T- cell acute lymphoblastic leukemia (TALL) is approximately 70% to 80%. In some cases, there is relapse of the ALL where the children who receives the treatment for ALL reaches the initial phase of complete remission and relapses. The study is focussed on understanding the molecular mechanisms of glucocorticoids responses in ALL and its importance in drug resistance in ALL as glucocorticoids correlates with prognosis. DNA methylation changes and gene expression changes caused by the treatment are identified and studied.*

### **Shreya Joshi**

Supervisor: Adjunct professor, Senior researcher, Head of FFGC, Group leader, Riikka Lund

#### **MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY**

In leukemia, there are some cases where the disease relapse even after the successful treatment and further in such cases the chances of survival are lower. However, the advancements in chemotherapy assures the complete remission in majority of the paediatric cases. TALL therapy in clinics use glucocorticoids and are considered to be important in the treatment. Especially dexamethasone has the higher ability to generate better response in central nervous system with reduction in relapse and improved survival rates. Also there are several paediatric cases resulting into long term effects of cancer therapies like neurocognitive and psychological problems.

A study conducted to identify the DNA methylation changes that are caused by glucocorticoid treatments in ALL cells and associated gene expression changes. The regulation of DNA methylation is very important epigenetic mechanism of cancer initiation, maintenance and progression. Through this findings, a better understanding of molecular mechanisms of glucocorticoid responses that leads to drug resistance in ALL is obtained as glucocorticoids correlates with the prognosis. This enhances the current knowledge towards DNA methylation patterns and mechanisms of glucocorticoid resistance. This may lead to the significant development of cancer treatments with lesser toxic side effects.

### **Aberrant changes in DNA methylation can lead to disease initiation state**

To identify the DNA methylation and transcriptome changes caused by dexamethasone in pediatric ALL cell line CCRF-CE, Reduced Representation Bisulfite Sequencing libraries are prepared. For the analysis of data, bioinformatics pipelines are used, such as quality control, filtering and trimming of reads, mapping against reference genome, generation of methylation calls and identification of differentially methylated sites. However, for the RRBS libraries, the digestion could not be successfully done and hence while methylome analysis, we did not get expected results. For identification of transcriptome changes, mRNA-seq data is used. The reads are aligned to reference genome with STAR aligner and genes are identified using PQLseq. Also targeted bisulfite pyrosequencing is done to identify DNA methylation profiles and differential gene expression with epigenetic effects.

## **Development of a YAP reporter cell model.**

*Yes-associated protein 1 (YAP) is a transcription co-activator that is highly active following targeted therapy. While the activation of YAP is essential for cancer cells to survive targeted therapy, the upstream activators of YAP remain unknown. University of Turku masters student, Kamal Wahid, has developed a YAP reporter cell model based on fluorescent technology which can be used to reveal novel genes that activate YAP following targeted therapy.*

### **Kamal Wahid**

Supervisors: Ph.D. Kari Kurppa & Prof. Paula Mulo.

### **MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY**

Targeted therapy kills majority of tumor cells but a small fraction of cells manage to survive. These surviving cells display increased activity of YAP which mediates survival by repressing the expression of an apoptotic protein called BMF.

- K. Wahid and Kurppa lab have endogenously tagged BMF with a neon green fluorescent protein. The expression of BMF will result in a strong fluorescent signal whereas increased YAP activity will repress BMF and the fluorescence signal will be weak or nonexistent.

- This cell model will be subjected to genome-wide CRISPR/Cas9-knockout to perform loss-of-function screens. Targeted therapy followed by fluorescence-activated cell sorting will sort the cells into a population that has lost YAP activity and a population that has retained YAP activity. Next generation sequencing of these populations will reveal genes that are upregulated in the population with high YAP activity and absent in the opposite population.

### **The identification of YAP upstream activators will open new therapeutic windows**

Lung cancer is the second most diagnosed cancer in the world. Targeted treatment often results in remission; however, a minority of cells with increased YAP activity endure therapy and prove to be a major source of relapse.

- Simultaneous inhibition of YAP alongside targeted therapy has proven to be a breakthrough in cancer therapy. The identification of YAP upstream activators can potentially uncover pathways and molecules that can be targeted to prevent YAP activation following targeted therapy. This advancement can result in better treatment response and decreased chances of relapse.

## **Photosynthesis researchers investigate how plants are affected by changing CO<sub>2</sub> concentration**

*Plants use photosynthesis to convert CO<sub>2</sub> from the atmosphere into sugars, which are used for energy production or as building blocks in plant cells. As a part of the photosynthesis research group in the University of Turku, Ville Käpylä is studying how different CO<sub>2</sub> concentrations affect the photosynthesis and metabolism of plants. Käpylä's project started with the idea that photosynthesis is vulnerable to damage in low CO<sub>2</sub> concentration.*

### **Ville Käpylä**

Supervisors: Adjunct Professor Peter Gollan, Professor Eva-Mari Aro  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Photosynthesis uses the energy of sunlight to move electrons along an electron transfer chain (ETC), producing energy that is used for fixing atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) into sugars. Considering the central role of CO<sub>2</sub> as a primary sink of photosynthetic energy, Käpylä's project set out two main goals: 1) to investigate the effects of CO<sub>2</sub> concentration on the efficiency and inhibition of photosynthesis, and 2) to identify genes and processes that are affected by different CO<sub>2</sub> levels in plant cells.

Käpylä studies photosynthetic activity in leaves by measuring changes in the very weak emission of light from chlorophyll. Käpylä has tested the theory that low CO<sub>2</sub> concentrations would inhibit or suppress photosynthesis due to electrons accumulating in the ETC when there is not enough CO<sub>2</sub> to take up these electrons. The accumulation of electrons in the ETC is harmful for the plant because it promotes creation of reactive oxygen species (ROS), which cause damage to the photosynthetic protein machinery. Conversely, high CO<sub>2</sub> concentration could enhance photosynthesis and protect photosynthetic machinery against damage. Käpylä's results indicate that CO<sub>2</sub> levels can change the efficiency of photosynthesis, but that CO<sub>2</sub> does not affect the damaging effect of ROS.

In addition to fixing CO<sub>2</sub>, photosynthetic activity also triggers reprogramming of the plant cell through regulation of gene expression, to suit the environmental conditions. Käpylä's project also works on uncovering metabolic processes affected by CO<sub>2</sub> by studying changes in the transcriptome, where genes encoded in DNA are expressed to RNA to become functional proteins. His initial results in this area show that photosynthetic activity, hormonal regulation, ROS removal and other stress processes are affected by different CO<sub>2</sub> concentrations. "We still have our hands full with our transcriptomics data, but bearing the initial results in mind, I am confident that we will make many interesting findings once we have been able to fully analyze our massive RNA sequencing data set," Käpylä states.

"Given the rising concentration of CO<sub>2</sub> in our atmosphere and the central role of photosynthesis in converting that CO<sub>2</sub> into food calories, it is important that we understand of CO<sub>2</sub>'s effects on photosynthesis and plant metabolism," Käpylä says. The results of this project can provide us with important insight for further optimizing crop growth and yield in high CO<sub>2</sub>, which is an important investment in future food security.

## **Investigating the control of the relief valves of photosynthesis**

*Flavodiiron proteins function as a sort of relief valve in most photosynthetic organisms, but not in flowering plants. In her master's thesis Janette Vähäsarja from the University of Turku is investigating whether thioredoxin A is one of the proteins that control the flavodiiron proteins.*

**Janette Vähäsarja**

Supervisor: Ph.D. Lauri Nikkanen

MOLECULAR PLANT BIOLOGY

Janette Vähäsarja is researching the interactions between different flavodiiron proteins and thioredoxin A in order to find out whether this thioredoxin controls the activity of the flavodiiron proteins. Flavodiiron proteins work as a sort of relief valve in the cell parts responsible for photosynthesis. By passing electrons to oxygen and creating water, they relieve pressure if the plant is receiving too much light. If thioredoxin A is proven to interact with the flavodiiron proteins, new research opportunities will rise. This knowledge can then be used to enhance growth of photosynthetic organisms, or to direct photosynthetic energy towards bioproduction of desired compounds.

### **From food pollutant to printer, E. coli is being put to good use**

In her master's thesis Vähäsarja uses bimolecular fluorescence complementation tests (BiFC) in the cyanobacterium *Synechocystis* to investigate the interactions between thioredoxin A and four different flavodiiron proteins. In BiFC the proteins of interest are labelled in such a way that they will begin to glow when they interact with one another. In order to make the proteins glow in the first place the DNA of the cyanobacteria needs to be slightly modified. This is being done with the help of the bacterium *Escherichia coli*, which essentially works as a printer to create lots of copies of the modified DNA. The DNA is then introduced to the cyanobacteria, allowing them to start using this new DNA and create the modified proteins. The modification adds a section of another protein, a fluorescent protein originally isolated from a jellyfish, to the original protein. This new protein will fit perfectly with its counterpart on one of the other proteins, like how a key fits perfectly to its corresponding lock. And just like keys and locks, the attached proteins also must be close enough to one another in the correct orientation in order to connect properly. The two protein sections will glow only when they are properly connected to one another, so in this scenario they should be able to connect only if the thioredoxin is interacting with one of the flavodiiron proteins.

So far Vähäsarja has been working with *E. coli* to assemble the modified DNA constructs for the cyanobacteria to use. Several cautionary measures are taken to ensure that the DNA the bacteria produce has everything needed for the following steps of the experiments.

- No matter what this research will reveal, the information will undoubtedly be useful in the future, Vähäsarja says.

## Monianalyyttimääritys kustannustehokkaaksi testimenetelmäksi

*Kun diagnoosiin vaaditaan useamman biomerkkiaineen tarjoamaa tietoa, vaaditaan analyysiin enemmän näytettä, testimateriaaleja sekä aikaa. Monianalyyttimäärityksillä voidaan samasta näytteestä havaita samanaikaisesti useampi merkkiaine. Tämä tekee määrittämisestä kustannustehokkaamman säästämällä näytettä. PerkinElmerillä diplomityönsä tehnyt Ulla Vahtera, kehitti projektissaan monianalyyttimääritystä neljälle biomerkkiaineelle.*

Ulla Vahtera

Ohjaaja: FT Henna Päckilä & FT Teemu Korpimäki  
BIOTEKNIikka DI

Ulla Vahtera kehitti diplomityössään PerkinElmerillä monianalyyttimääritystä, joka mahdollisti neljän biomerkkiaineen samanaikaisen havaitsemisen samasta näytteestä. Monianalyyttimääritykset ovat oiva ratkaisu työnkulun helpottamiseen. Sen lisäksi että määrityksillä maksimoidaan näytteestä saatava informaatio, lisäävät ne myös määritysten luotettavuutta.

– Kun fysiologista tilaa arvioidaan useamman merkkiaineen ohjaamassa kontekstissa, luotettavinta tietoa antaa määrittäminen, joka havaitsee yhdestä näytteestä kaikki diagnoosiin tarvittavat merkkiaineet. Tällöin jokainen osamääritys on käsitelty täysin samalla tavalla ja samanaikaisesti, mikä vähentää luonnollisesti virheitä, Vahtera selittää.

Työn mallimerkkiaineina toimivat alfa-fetoproteiini, raskauden aikainen plasmaproteiini A, istukan kasvutekijä sekä vapaa koriongonadotropiinin beta-alayksikkö, jotka ovat testaustarkoituksen lisäksi hyödyllisiä myös kliinisestä näkökulmasta. Näitä merkkiaineita käytetään tyypillisesti yhdessä ensimmäisen raskauskolmanneksen aikana Downin syndroomaa seulottaessa.

Vahteran kehittämä määrittäminen perustuu käänteisviritteisiin nanopartikkeleihin, joiden avulla merkkiaineet voidaan tunnistaa niiden sijainnin perusteella. Menetelmään kehitetty määrittämislevy sisältää jokaiselle merkkiaineelle oman sitoutumiskohtansa, jonka signaalista merkkiaineen pitoisuus selviää. Tavanomaisista levyistä monianalyyttimääritykseen valjastettu levy mahdollistaa perinteisten laboratorioinstrumenttien käytön määrittämisessä.

Kehitetty määrittäminen oli tavanomaisia yhden merkkiaineen mittaavia määrittämiä nopeampi ja vaati huomattavasti pienemmän määrän näytettä. Tutkimus osoitti monianalyyttimäärityksen kyseisellä asetelmalla mahdolliseksi. Määrittämisjärjestelmän toimivuuteen jäi kuitenkin vielä paljon toivomisen varaa.

– Määrittämisjärjestelmän rajoittaviksi tekijöiksi jäivät merkkiaineiden suppeat toiminta-alueet, seeruminäytteen aiheuttama häiriö sekä menetelmän toistettavuus. Kyseiset ongelmat ovat monianalyyttimäärityksille hyvin tyypillisiä. Ongelmien ratkaisemiseksi määrittäminen vaatii lisää optimointia, Vahtera toteaa.



## **DNA-pyydytämismenetelmä syövän varhaiseksi diagnosoimiseksi**

*Syövän varhainen havaitseminen on jo pitkään ollut haaste monien eri syöpätautien kohdalla. Käyttämällä kasvaimesta lähtöisin olevaa solunulkoista DNA:ta, syöpä voidaan havaita jo aikaisin. Anna Tuominen kehitti turkulaisyritys Genomill Health:ssa uudenlaisen tavan kalastaa haluttu solunulkoisen DNA mutaatio suoraan virtsa- ja sylkinäytteistä.*

### **Anna Tuominen**

Ohjaaja: FT Juha-Pekka Pursiheimo

### **BIOTEKNIikka DI**

Tuominen kehitti ja optimoi DNA:n prosessointimenetelmää mahdollisimman minimaaliseksi, ottaen kuitenkin huomioon kaikki menetelmälle annetut vaatimukset. Yhden työpäivän aikana kyettiin poimimaan keinotekoinen mutaatio ihmisen virtsa- ja sylkinäytteestä, jonka jälkeen mutaatio tunnistettiin sekvensoimalla. Sekvensoinnin avulla mutaatiot tunnistettiin oikeiksi 100 %:n tarkkuudella.

Solunulkoisen DNA irtoaa syöpäsoluista, kun ne kuolevat tai erittävät sitä aineenvaihduntansa seurauksena. Myös tavalliset solut vapauttavat solunulkoista DNA:ta, mutta syöpäsoluilla se on tehokasta, koska niiden kasvu ja kuolema on hallitsemattomampaa. Solunulkoista DNA:ta on kaikissa kehon nesteissä, kuten verenkierrossa, virtsassa ja syljessä. Nestebiopsia tutkimuksilla näyte otetaan näistä lähteistä ja on siten minimaalisesti kajoavaa. Verrattuna tällä hetkellä vakiintuneessa käytössä oleviin kudoksiin, uudenlainen nestebiopsiatutkimus olisi potilaan kannalta parempi. Nestebiopsia on potilasystävällinen, toistettava ja aina saatavilla.

### **Diagnoosi ja tehokas lääkehoito yhdellä testillä?**

Tuominen kertoo kehittämällään menetelmällä olevan laajat käyttökohteet. Syöpädiagnostiikassa yhdestä nestebiopsianäytteestä kalastamalla mutaatiot, voidaan tehdä niin syöpädiagnoosi kuin ohjata lääkehoitoa mahdollisimman tehokkaaksi. Erilaisia syöpämutaatioita varten on kehitetty täsmälääkkeitä, jotka tehoavat hyvin tiettyihin syöpätyyppeihin. Yhdellä testillä voisi olla siis diagnoosiakin laajempi käyttötarkoitus.

Tutkimuksessaan Tuominen mainitsi myös uuden menetelmän mahdollisuudet levitä syöpädiagnostiikan ulkopuolelle.

- Vallitsevassa tilanteessa DNA:n kalastusmenetelmä voisi toimia myös mikrobiagnostiikassa. COVID-19-tauti voitaisiin mutaatioiden tavoin havaita käyttämällä solunulkoisen DNA:n tilalla kohdemolekyylinä virusperäistä perimää.

Tulevaisuudessa Tuominen toivoo menetelmän auttavan monia ihmisiä syöpädiagnoosin selvittämisessä.

## **Nopeat koronapikatestit mahdollistavat laajemman ja nopeamman testaamisen**

*Loppuvuonna 2019 puhjonneen SARS-CoV-2-viruksen aiheuttaman COVID-19 -taudin testaaminen on tapahtunut lähes poikkeuksetta PCR-pohjaisilla testeillä, jotka ovat suhteellisen hitaita sekä kalliita testejä laajempien ihmismassojen testaamiseen. Turun Yliopistossa diplomityötä tehnyt Arto Talvinen on ollut mukana tutkijaryhmässä, joka on ollut kehittämässä nopeaa pikatestiä, jolla infektio voitaisiin todeta alle puolessa tunnissa.*

### **Arto Talvinen**

Ohjaajat: FT Teppo Salminen ja DI Iida Martiskainen

BIOTEKNIikka DI

Talvinen on työnsä aikana testannut muun tutkijaryhmän kehittämiä vasta-aineita, jotka tunnistavat koronaviruksen nukleoproteiinia. Menetelmä eroaa merkittävästi perinteisestä PCR-testistä, jossa monistetaan ja tunnistetaan viruksen DNA:ta. Ryhmän kehittämät vasta-aineet on leimattu käänteisviritteisillä nanopartikkeleilla ja Talvinen on pystynyt osoittamaan niiden toimivuuden kyseisenlaisissa lateraalivirtauspikatesteissä.

-Nukleoproteiinia on viruksen sisällä melko runsaasti, minkä vuoksi se toimii tunnistettavana kohteena hyvin ja on potentiaalinen menetelmä nopeaan pikatestiin. Nukleoproteiini on myös melko samanlainen useilla SARS-koronaviruksilla, minkä takia kehitettävä testi voisi mahdollisesti toimia myös tulevaisuuden koronavirusepidemioissa, selventää Talvinen.

### **Alustavista tuloksista valmiiksi testiksi**

Varsinaisella testilastulla tehdyt testit ovat toistaiseksi aiheuttaneet joitakin haasteita. Käytetyt partikkelit ovat tarttuneet toisiinsa, eikä ne näin ollen pääse etenemään lastulla, vaan isot aggregaatit aiheuttavat padon, josta myöskään yksittäiset partikkelit eivät pääse sujuvasti läpi. Tämä on kuitenkin normaalia lateraalivirtaustestien kehittämisessä ja tietyt muutokset olosuhteissa voivat ratkaista nämä ongelmat.

-Pikatestin kehittäminen laajempaa ja nopeampaa testausta varten on välttämätöntä, jotta testausta voitaisiin toteuttaa muun muassa satamissa ja lentokentillä. Toistaiseksi alustavat tulokset ovat olleet lupaavia, mutta olemme kohdanneet haasteita varsinaisen testin kehittämisessä. Työt kuitenkin jatkuvat ja toivottavasti lopulta testi saadaan valmiiksi, toteaa Talvinen.

## **Kolmiulotteinen molekyyli rakenne - avain suorituskykyisempiin immunomäärityksiin?**

*Jaani Hakamäki kehitti Turun yliopistolla kolmiulotteisen molekyyli rakenteen kiintokantajapintana toimineen polystyreenitangon päähän. Kolmiulotteiseen, avaruudelliseen rakenteeseen voidaan kiinnittää huomattavan paljon biomolekyyliä, kuten immunomäärityksessä käytettäviä vasta-aineita. Kiintokantajana toimiva tankomainen rakenne myös mahdollistaa immunomäärityksen pyörityksessä, jolloin sekoitus on tehokasta. Suuremmat määrät vasta-aineita ja tehokas sekoitus immunomäärityksissä lisäävät diagnostisten testien suorituskykyä.*

### **Jaani Hakamäki**

Ohjaajat: DI Saara Kuusinen ja Prof. Tero Soukka

#### **BIOTEKNIikka DI**

Hakamäki muodosti diplomityössään tavallisten polystyreenitankojen pinnalle kolmiulotteisen molekyyli rakenteen kemiallisesti ja kiinnitti tähän rakenteeseen biomolekyylinä streptavidini proteiinia. Hän myös teki immunomäärityksen, automatisoidulla määritysalustalla, jossa kiintokantajina toimivia polystyreenitankoja pyöritettiin inkubointien aikana reaktioiden nopeuttamiseksi.

- Avaruudellinen molekyyli rakenne mahdollistaa "tilan" tehokkaan hyödyntämisen ja siten biomolekyylien suuremman määrän kiinnittämisen kiintokantajapintaan, verrattuna tilanteeseen, jossa pinta on kaksiulotteinen. Tekemieni analyysien perusteella onnistuin tässä tavoitteessa erinomaisesti, Hakamäki kertoo.

Immunomäärityksissä usein rajoittavana tekijänä on tehokas aineensiiro, eli miten analyytit (esimerkiksi taudinaiheuttajat) siirtyvät kiintokantajan pinnalla olevien vasta-aineiden ulottuville, jotta ne voisivat kiinnittyä.

- Immunomäärityksissä vasta-aineen ja analyytin välinen reaktio on yleensä nopea. Määritystä usein hidastava aineensiiro lähellä kiintokantajapintaa voidaan ratkaista tehokkaalla sekoituksella, jossa virtaus ohjataan suoraan päin pintaa ja siten myös vasta-aineita. Yhtenä vaihtoehtona toteuttaa järjestely on tämän työn mukainen tankomainen kiintokantajapinta perinteisen kuoppalevyn sijaan, jossa sekoitus on rajallinen, lähinnä ravistelua, jatkaa Hakamäki.

Immunomäärityksiä käytetään yleisesti diagnostisina testeinä ihmisten terveydenhuollossa, eläinlääketieteessä, elintarvike- ja ympäristöturvallisuuden varmistamisessa ja ehkäistäessä bioterrorismia. Testien jatkuvalla suorituskyvyn kehittämisellä pyritään kustannustehokkuuteen, parempiin määritysvasteisiin ja yksinkertaisempiin, nopeampiin sekä herkempiin analyyseihin.

- Nopeat analyysit estävät tautien leviämistä ja lyhentävät potentiaalista sairaalassaoloaikaa. Herkemmillä testeillä havaitaan analyytit myös näytteissä pienempinä pitoisuuksina. Yksinkertaiset, nopeat ja herkäät immunomääritykset mahdollistavat myös vieritestauksen ja kokonaisvaltaisen kustannustehokkuuden, tarkentaa Hakamäki.

## **New approach in finding drug treatment for breast cancer**

*Breast cancer is one of the most common cancer type worldwide. In breast cancer cells kinase and phosphatase balance is incorrect, leading in cellular missfunctions like unstoppable dividing and cell survival. In this cancer type, PP2A is inhibited by overexpressed CIP2A, that is Lehtinen's target in this research. Here Lehtinen has identified that one molecule of interest is capable of inhibiting CIP2A expression.*

### **Aleksi Lehtinen**

Supervisors: Ph.d Julia Vainonen, Doctor candidate Srikar Nagelli

### **BIOCHEMISTRY**

Aleksi Lehtinen is studying protein phosphatase 2A's (PP2A) inhibitor CIP2A as novel drug target in cancer therapies. This protein of interest consists of two identical parts. These parts form a functional protein that would otherwise be destroyed in the cell. Four molecules were earlier, predicted by an Indian research group, to inhibit CIP2A by competing with this dimer formation.

-This is a good opportunity to be able to identify new approaches in drug discovery and there is a urgent need for new approaches in cancer related therapies overall.

Lehtinen has been able to find out that only one of these molecules is able to inhibit this protein. Unlike predicted, this molecule is not able to prevent CIP2A dimerization but it affects to mRNA level. Reason or function how it interacts is still unknown. Because of working with breast cancer cell lines and with recombinant protein, time was consumed at preparation of experiments, says Lehtinen. Next step would be identifying what proteins are affected that leads in CIP2A suppression and identify if this molecule can be developed as a drug.

-One promising molecule was found and I think this molecule should be studied more detailed because it was not able to compete with CIP2A binding, but it decreased protein levels in cells by affecting in mRNA. This also proves that by inhibiting CIP2A protein, breast cancers could be treated with drugs affecting similar way.

## **Vimentiini - rintakudoksen mekaaninen säätelijä?**

*Solun tukirangan säieproteiini vimentiinin tutkimus voi antaa uutta tietoa rintasyövän muodostumisesta ja leviämisestä. Turun yliopistossa erikoistyötään suorittava Sonja Vahlman selvittää vimentiinin osuutta maitorauhasen kasvussa ja mekaanisissa ominaisuuksissa.*

### **Sonja Vahlman**

Ohjaaja: Dos. Emilia Peuhu

MOLEKULAARINEN SOLUBIOLOGIA

Vimentiinisäikeet tukevat soluja ja osallistuvat niiden liikkumiseen ja kiinnittymiseen kudoksessa. Vimentiinin määrä on myös koholla rintasyöpäsoluissa ja siksi sen tutkiminen voi lisätä ymmärrystä rintasyövän muodostumisesta ja leviämisestä. Turun yliopiston tutkimusryhmä käyttää maitorauhastutkimuksissaan pääosin rintojen pienennysleikkauksista ylijäävää normaalia rintakudosta ja siitä saatuja soluja.

- Rintakudoksesta saatuja yksittäisiä rintaepiteelisoluja voidaan kasvattaa kolmiulotteisissa soluväliainegeeleissä, joissa ne muodostavat haarakkeisia maitorauhasrakenteita. Näiden organoideiksi kutsuttujen muodostelmien kasvua voidaan tutkia eri menetelmin, kertoo Vahlman.

Erikoistyössään Vahlman on selvittänyt, mitä tapahtuu, kun vimentiinin vaikutus poistetaan, eli se hiljennetään rintakudoksesta saaduista soluista. Tarkoituksena on seurata organoidien kasvua ja rakennetta, kun vimentiiniä ei enää muodostu soluissa.

- Vimentiinin hiljentyminen voidaan varmistaa värjäämällä organoidit tai solut vimentiinin tunnistavalla vasta-aineella ja kuvaamalla niitä sitten mikroskoopilla. Kuvaamalla nähdään myös, mikäli organoidien kasvu ja rakenne on normaalista poikkeavaa, Vahlman selittää.

### **Vimentiini uutena tutkimuksen kohteena**

Vahlman tutkii ensimmäistä kertaa vimentiinin osuutta maitorauhassolujen mekaanisissa ominaisuuksissa. Solut vastaavat solunulkoisiin mekaanisiin viesteihin muuttamalla toimintaansa solunsisäisesti. Tätä ilmiötä kutsutaan mekanotransduktioksi.

- Vimentiini on tärkeä proteiini solun liikkeelle ja kiinnittymiselle, joten on kiinnostavaa selvittää, miten vimentiini liittyy mekaanisten viestien vasteeseen ihmisen maitorauhasen epiteelisoluissa. Tähän mennessä olen havainnut maitorauhasen eri solupopulaatioiden välillä eroavaisuuksia mekanotransduktion voimakkuudessa. Vimentiinin osuuden selvittäminen mekaanisiin ominaisuuksiin jatkuu yhä.

## **Predicting inflammatory response in advance of animal studies - Long-acting eye medicines**

*Studying the inflammatory response in human body towards new medicines is necessary for developing safe and functional medicines. This study is typically carried out in animals during drug development. Ville Pollari has identified a good alternative method to predict medicines inflammatory features without using animals.*

### **Ville-Matias Pollari**

Supervisors: Ph.D. Marceline Akieh-Pirkanniemi & M. Sc. Jari Mikkola  
BIOCHEMISTRY

Ville Pollari has studied long-acting biological drug components formulated for medicine with DelSiTech Oy:s technology. To predict the inflammatory response in animals beforehand helps to develop the medicines in an even more human way than before. Inflammatory response study was done with the usage of human whole blood which was exposed to different samples containing the active pharmaceutical ingredient(s) (APIs). Whole blood was used immediately after drawing to keep the white blood cells (cells responsible for immune defence) alive. Immune response was predicted by measuring a cytokine, a protein affecting the initiation of the inflammatory response, content after the exposing of whole blood.

- Cytokine release test is a good way to check the inflammatory properties in advance because it is relevantly fast and easy to make, Ville Pollari says.

Research started from studying the stability of the drug in different environments it was going to face in its lifetime. This provided more information on the suitability of DelSiTech:s technology in terms of usage in eye medicines. API in the final product has such a release rate that it can sustain high enough concentrations to be effective as a drug for a relevantly long time.

- Results obtained by now are looking very promising. Yet I would select the blood donors for future testing more carefully. Examination of the complete blood count could provide something that was not considered for result processing, notes Ville Pollari.

It is a well-known fact that aggregates could initiate the inflammatory response in the human body. With this knowledge in hand, the APIs were monitored for their aggregation levels and other chemical modifications. This was done with the usage of different methods and equipment.

- We have obtained a lot of data and it is needed to process the results next. Yet it is difficult at this moment to say anything more but the suitability of the methods in tests was looking great, says Ville Pollari.

## **Identifying SARS-CoV-2 proteins that interfere with the innate immune response**

*The ongoing pandemic caused by severe acute respiratory syndrome-2 (SARS-CoV-2) virus has prompted researchers worldwide to concentrate their efforts into finding out more about the virus to limit its devastating effects. In his master's thesis, Arttu Reinholm set out to find which, if any, SARS-CoV-2 proteins inhibit the innate immune response to the virus.*

### **Arttu Reinholm**

Supervisors: Docent Laura Kakkola, Professor Ilkka Julkunen, Researcher Rickard Lundberg, Professor Jarmo Käpylä

### **MOLECULAR CELL BIOLOGY**

Viruses have many ways to protect themselves from the host's innate immune response, such as hiding their presence in the cell or directly interfering with various signaling pathways that trigger cell defenses against virus infections. SARS-CoV-2 has been shown to interfere with at least one such signaling pathway activated by the retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I). This signaling pathway has multiple proteins that work in sequence to prime the cell's defenses if virus matter is detected within the cell. SARS-CoV-2 interferes with this process by inhibiting the function of one or more proteins in the pathway with its virus products.

-Antiviral drugs often target virus proteins specifically, since they are unique to the given virus and therefore the drugs do not affect host's proteins and possibly cause harmful side effects to the patient. To accelerate the development of antiviral drugs against SARS-CoV-2, it is essential that we identify the proteins that interfere with the RIG-I pathway, Reinholm explains.

By making cells produce individual SARS-CoV-2 proteins, their inhibitory effects can be examined. Reporter proteins are also produced at the same time, which allows Reinholm to gauge the strength of the inhibitory effects, if any are present. One of these reporter proteins, a light-emitting luciferase IFN- $\lambda$ 1, is produced when the RIG-I pathway works normally. If the intensity of the emitted light goes down, then the produced SARS-CoV-2 protein inhibits the pathway.

-Production of these proteins has proven to be quite challenging, but I have no doubt that I will succeed. After this the inhibitory effects can be determined, and the inhibiting protein can be further investigated to resolve which part of the pathway it affects, Reinholm concludes.

## **Komplementtisysteemin reaktiokinetiikat apuvälineenä mikrobiperäisen tulehdustilan diagnosoimisessa**

*Mikrobivaurioiden arvioidaan aiheuttavan merkittävät kansanterveydelliset ja -taloudelliset vahingot. Altistumisesta johtuvat oireet ovat moninaisia ja diagnosointi työlästä. Olli Lukkarinen tutkii, jos komplementtisysteemin aktivoitumista altistuneiden potilaiden seeruminäytteissä voitaisiin käyttää apuvälineenä mikrobivaurion aiheuttaman tulehdustilan diagnosoimisessa.*

### **Olli Lukkarinen**

Ohjaaja: FT Janne Atosuo

### **BIOKEMIA**

Jopa 800000 suomalaista altistuu päivittäin sisäilmaongelmille, joihin kuuluvat rakennusmateriaaleista vapautuvien yhdisteiden lisäksi myös erilaiset mikrobit, kuten homeet ja bakteerit. Mikrobivauriolle altistuminen saattaa johtaa matalaan tulehdustilaan, jonka oireita ovat esimerkiksi astma, nuha, poskiontelo- ja keuhkotulehdus. Osa altistuneista kokee väsymystä, muistihäiriöitä ja keskittymisvaikeuksia.

- Sisäilmavaurion aiheuttamat oireet ovat monipuolisia ja ne saattavat erota paljonkin eri potilaiden välillä. Ehkä juuri tästä syystä homeallergia on yhä melko kiistanalainen puheenaihe lääketieteessä, Olli Lukkarinen pohtii.

Tulehdustilan diagnosoiminen on vaikeaa, eikä yhtä yleisesti hyväksyttyä menetelmää ole. Diagnosointi perustuu usein potilaskyselyiden vertaamiseen kliinisiin kokeisiin, kuten keuhkofunktiomittauksiin sekä leukosyyttitesteihin, ja rakennusnäytteiden toksisuusmittauksiin.

Kliinisen tutkimusyksikkö TROSSI:n osana työskentelevä Immunokemian tutkimusryhmä tutkii uusia työkaluja mikrobiperäisen tulehdustilan diagnosoimiseen. Eräs lupaava menetelmä on potilasnäytteiden komplementtisysteemin aktiivisuuden reaktiokinetiikkojen seuraaminen.

### **Komplementtisysteemi aktivoituu mikrobi-infektiossa**

Komplementtisysteemi on immuunipuolustuksen ensisijainen puolustuskeino mikrobi-infektioita vastaan. Se osallistuu tulehdustilan käynnistämiseen, säätelyyn ja mikrobien tappamiseen. Komplementin toimintaa voidaan seurata käyttämällä apuna valoa tuottavaa koetinbakteeria *E. coli-lux*:ia. Seeruminäytteiden komplementtisysteemin tappaessa bakteerisoluja, näiden tuottaman valon väheneminen kertoo kuolleiden bakteerien määrästä.

Menetelmä todettiin toimivaksi ja komplementin eri reaktiotiet löydettiin onnistuneesti. Seuraavaksi tutkimuksissa siirrytään mikrobivaurioille altistuneiden potilasseerumien analysoimiseen. Näkykö mahdollinen tulehdustila eroavaisuuksina komplementin tappokinetiikoissa terveiden koehenkilöiden seeruminäytteisiin verrattuna?



Erikoistyöntekijä etsii diagnostisissa keinoja kosteusvaurioiden terveysvaikutusten todentamiseen

*ELISA-menetelmät tarjoavat uudenlaisen luotettavan vaihtoehdon todentaa elinympäristön mikrobivaurioiden vaikutusta ihmisen immuunijärjestelmään. Vaurioista kärsineiden henkilöiden ongelmien syy voidaan selvittää näillä seerumitesteillä. Erikoistyöntekijä Boucht on kaupallisia kittejä sekä itse kehitettyjä ELISA-menetelmiä hyödyntämällä voinut analysoida ja vertailla kohderyhmiä keskenään.*

Oliver Boucht

Ohjaajat: FT Janne Atosuo, FM Outi Karhuvaara

SOLUBIOLOGIA

Noin joka viides suomalainen kärsii huonosta sisäilmasta työpaikalla. Suuressa osassa rakennuksista ilmenee jossain niiden elinkaaren aikana kosteusvaurioita, joissa usein myös havaitaan mikrobikasvustoa. Kuivuessaan mikrobipartikkelit usein lähtevät liikkeelle sisäilmaan kasvustosta, jolloin ne saattavat päätyä hengitysteihin. Hiukkaset voivat aktivoida immuunijärjestelmää ja aiheuttaa laajan kirjon hengitysteiden ongelmia aina pienestä yskästä vakaviin tauteihin. Immuunijärjestelmän aktivaatiosta voivat kertoa esimerkiksi kohonneet tulehdusvälittäjäaine- ja vasta-ainetasot, joita voidaan mitata seerumista ELISA-testeillä.

ELISA-(engl. enzyme linked immunosorben assay) menetelmiä käytetään laboratoriossa diagnostisiin tarkoituksiin, kuten tautien todentamiseen. Näytteistä tuloksiin voidaan päästä jopa parissa tunnissa. Tuloksia vertaillaan tiedettyihin vakioihin, viitearvoihin tai verrokkiryhmään.

-ELISA-menetelmien avulla saadaan nopeasti ja luotettavasti määritettyä jo pienestäkin näytemäärästä suuntaa antavia tuloksia, Boucht kertoo.

Seerumitestien testien optimointi vie aikansa

Bouchtin tutkimuksessa käytetyt veren seeruminäytteet on kerätty klinisen tutkimusyksikkö TROSSIn tutkimuksen yhteydessä, Länsi- ja Etelä-Suomessa mikrobivaurioituneissa rakennuksissa työskenteleviltä vapaaehtoisilta koehenkilöiltä. Verrokkiryhminä käytetään vaurioitumattomissa kohteissa työskennelleitä ihmisjoukkoja.

Veren seerumitestejä löytyy kaupalliselta puolelta laajasti, ja immunokemian laboratoriossa kehitetään myös omia menetelmiä. Testeillä voidaan mitata useiden immuunijärjestelmän tekijöitä, kuten tulehdusvälittäjäaineiden, tai vasta-aineiden, määrää verestä. Menetelmien optimointi ja niiden soveltaminen mikrobivaurioiden tutkimuksessa on yksi monista tutkimuksen työvaiheista.

-Optimointityö vie suuren osan työskentely ajasta, mutta tällä hetkellä vertailutulokset alkavat näyttää hyviltä, Boucht kommentoi.

Tutkimus on vasta pintaraapaisu mikrobivaurioiden terveyshaittojen diagnostiikassa, mutta tulevaisuudessa testeillä voitaisiin nopeasti todentaa altistuneet henkilöt, vaurioituneet rakennukset ja valmistautua tarvittaviin jatkotoimenpiteisiin.

## Novel approach to prostate cancer diagnostics

*Research group at the Biotechnology unit at University of Turku are developing a non-invasive method for diagnosing prostate cancer. The aim is to develop an immunoassay that uses antibodies and lectins to find cancer-associated patterns in sugar-residues on the surface of proteins found in urine.*

Kristiina Mäkelä

Supervisors: Dos. Janne Leivo, M.Sc. Khirul Islam

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Research group at the Biotechnology unit of University of Turku are developing a lectin-based glycoisoform immunoassay, that targets biomarkers on the surface of cell-secreted particles called extracellular vesicles. This immunoassay uses urine as a sample matrix, which makes this method completely non-invasive.

Many different combinations of antibodies and lectins were tested for their abilities to bind cancer-specific sugar-structures of proteins and few of them showed promising preliminary results. In the assays the lectins and antibodies were expected to produce a strong signal and successfully discriminate between healthy, benign and prostate cancer (PCa) affected patient samples, meaning that the signal should be significantly higher in cancer-affected versus benign samples.

Although the work is still in progress, preliminary results show that immunoassay using a combination of human CA19-9 antigen and plant-derived protein, *Ulex Europaeus* agglutinin, successfully detected prostate cancer (PCa) specific biomarkers in pooled human urine samples. This assay produced 2.5 fold signal with PCa affected samples compared to benign controls, which is very promising news. Further optimization of the assay, as well testing on individual patient samples, is still required.

Prostate cancer (PCa) is among the most frequently diagnosed and deadly types of cancer in men. However, there is still no specific and sensitive diagnostic tool for its detection, particularly in its early stages. Extracellular vesicles, which have recently gained increasing interest in research, are very small membranous particles secreted by most cells and present in all bodily fluids. The surface of extracellular vesicles is enriched with membrane proteins, that can be used as targets to search for cancer-associated structures. Lectins and some antibodies have the ability to bind to these specific structures, which makes them a useful tool in cancer research. All in all, lectin-based immunoassay, targeting biomarkers on the surface of extracellular vesicles presents a novel non-invasive tool for PCa diagnosis, as well as disease progression and response to therapy.

## **Circulating lung cancer biomarker candidates for diagnostics.**

*Lung cancer-specific biomarker candidates were found by comparing protein glycosylation of lung cancer patients to healthy individuals. Master's student Inka Salminen reported glycovariant based lung cancer discrimination with both more conventional and novel markers. Lung cancer biomarkers are needed to improve the poor 5-year survival rate.*

### **Inka Salminen**

Supervisors: PhD. Kamlesh Gidwani, MSc. Shruti Jain

#### **MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS**

Glycoprofiling experiments performed by Master's student Inka Salminen reported multiple lung cancer biomarker candidates for diagnostics. Glycosylation-based discrimination of cancer over healthy individuals was reported with more conventional markers as well as with novel markers.

- Although lung cancer is the second most common cancer globally, lack of early symptoms often causes the disease to be found at later stages with very poor 5-year survival rate. Easier, faster and more sensitive diagnostic methods are desperately needed to change that, Salminen explains.

### **Glycosylation-based cancer discrimination**

Changes in normal glycosylation have been linked to many types of cancers. Analysis of these abnormal glycovariants could improve cancer diagnostics by allowing earlier detection and thus, improve the disease outcome.

Project was carried out by comparing circulating glycoprotein glycosylation of patients with lung cancer to those of healthy individuals. More conventional glycoprotein markers, such as CA125 and CA19-9 stood out but novel biomarkers were also found in exosomes and integrins.

The method used in the project is a simple, sandwich-like immunoassay but instead of using labelled antibodies Salminen used lectin-coated fluorescent nanoparticles for detection. Use of lectins, which are selective carbohydrate binding proteins allows the detection of glycosylation on the protein surface whereas conventional immunoassay detects the protein epitope.

- Lung cancer diagnostics still rely heavily on tumor detection with computer tomography scan as cancer-specific biomarkers have not yet been found. Few proteins have been proposed for the task but they all can be present in circulation even in healthy individuals and thus, are not suited for diagnostic purposes, Salminen points out.

Salminen will continue her work with assay optimizations. Different molecular blockers and buffer solutions are used to further improve assay discrimination.

## **A novel probe for detecting ovarian cancer**

*A new probe for detecting a specific sugar chain which seems to be highly expressed in ovarian cancer. Priyadharhini Parimelazhagan Santhi, a master student at the university of Turku has developed a nanoparticle probe-based assay which detects ovarian cancer better than the previously existing detection methods.*

### **Priyadharshini Parimelazhagan Santhi**

Supervisors: Dr.Kamlesh Gidwani and Rufus Vinod

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

In the thesis project, Parimelazhagan investigated the circulatory glycovariant biomarkers of conventional CA125 and extracellular vesicles. The thesis result indicates that a sulphated sugar moiety is highly expressed on CA125 of ovarian cancer and a novel sulphated probe conjugated nanoparticle used for detecting this sugar moiety. The novel glycovariant of CA125- assay performs much better than the conventional methods available.

### **Why Extracellular vesicles and altered glycosylation?**

The extracellular vesicles (EVs), previously considered to be garbage bags secreted by the cells are now gaining attention, due to their role in intercellular communication. The cancer derived EVs carry an array of oncogenic cargo, including glycoprotein such as Integrins, tetraspanins and mucins, dysregulated glycosylations of these glycoproteins have been reported in the cancer which are specific and differentially expressed in different stages of cancer.

Lectins and glycan binding antibodies with distinct specificities can potentially be used to target the aberrant glycosylation on EVs. The lectins bind to a broad range of glycans. Moreover, Parimelazhagan used a novel probe which is highly specific towards a sulphated sugar moiety.

Parimelazhagan believed that she developed an Eu- nanoparticle-based assay to detect the circulatory biomarkers of ovarian cancer. The strength of these nanoparticles is that they can reduce nonspecific binding and give strong fluorescent signals. The Eu nano-particle conjugated with hundreds of lectins/probes could detect the altered glycosylation on cancer antigen. For this research she used serum samples of healthy, benign disease and ovarian cancer patients to make sure the assay is specific for ovarian cancer detection. The samples she used was poorly discriminating with the commercial biomarkers.

### **What next?**

Parimelazhagan started explaining the possible future studies. “This research can further be conducted by including early-stage ovarian cancer patient samples. To check if those results could further improve the specificity and sensitivity of the assay.

In the EV study the sample volume was very limited so I focused fucose binding lectins, the study can further be continued by including a large panel of lectins/glycan-binding antibodies”.

**Dipankar Biswas**

**Supervisor: Docent Oskar laaksonen**

## **FOOD DEVELOPEMNT**

### **Some phenolic compounds are not stable during storage for long time**

*Berries are potentially rich source of polyphenols, particularly anthocyanin's that may contribute to the reduced risk of chronic diseases. The factors influencing the stability of phenolic compounds are the type of process and process parameters and storage condition. Thesis work of Dipankar Biswas has shown how the storage condition affects the stability of phenolic compounds in different freeze-dried berries. Compounds responsible for the color of the berries is significantly affected.*

Anthocyanin are very susceptible to degradation during processing and storage. Freeze-drying is a preservation method where water is removed by sublimation from the frozen material. Typically, the process is used with high-value raw materials, such as berries, which can be used as ingredients in mueslis and granolas.

In this study, the effect of storage on anthocyanin and flavonol compositions and contents and total antioxidant activity was evaluated in different freeze-dried berries maintained at accelerated storage (40 °C for 1-6 months). Samples were muesli packages including freeze-dried strawberry, black currant or blueberry material prepared in Estonia. Identifications and quantifications of the phenolic compounds were carried out using HPLC-DAD and HPLC-MS instruments.

Total anthocyanin found in Strawberry (at Day zero) 45.49 mg/100g dry matter, expressed as Pelargonidin 3-O-rutinoside equivalent, In blackcurrant 104.77 mg/100g expressed as Delphinidin 3-O-rutinoside equivalent and in blueberries 89.06 mg/100g expressed as Malvidin 3-O-glucoside. After 30 days of storage at 40 °C of all berries (Strawberry, Blueberry and Blackcurrant) resulted in significant losses in anthocyanin's with as much as 4% in strawberry, 30% in Blueberry and 18% in Blackcurrant compared to Day 0 with 100%. In addition, after 56 days anthocyanin losses were more 47% in strawberry, 40% in Blueberry and 58% in Blackcurrant compared to Day 0 with 100%

The results of this research still provided evidence on the degradation kinetics of individual as well as total anthocyanin in different berries when stored at 40 °C temperatures for long periods. The individual anthocyanins exhibited different degradation rates, which might be related to their chemical structure. Higher temperatures and longer storage periods not only reduced anthocyanin concentrations but also change the color. Therefore, the findings could be adapted to industrial applications for preserving the biologically active anthocyanins by storing them at low temperatures for limited storage periods. Therefore, time is additional challenge in this case to develop product.

## Could fermentation improve the utilization of pulses?

*Pulses are considered as remarkable and sustainable source of plant protein. However, their utilization as part of our diet is limited due to several antinutritional compounds that decrease the nutritional value of the pulse or cause flatulence for part of consumers. In an EU funded project SIMBA 818431 at Natural Resources Institute Finland fermentation was successfully studied as a tool to improve the nutritional value and usability of pulses.*

### **Iida Ikonen**

Supervisors: Ph.D. Minna Kahala, Ph.D. Markus Nurmi, Ph.D. Jukka-Pekka Suomela  
FOOD DEVELOPMENT

Master's Thesis worker Iida Ikonen studied the effect of fermentation on the unwanted compounds in faba bean. Based on tentative results, fermentation process produced by lactic acid bacteria at controlled conditions remarkably reduced the amount of antinutritional compounds in combination of faba bean and oat.

- Selected lactic acid bacteria strains were able to break down the undesired compounds such as vicine that is considered to cause harmful symptoms for people with certain genotype, and short chain sugars, oligosaccharides, that are known to cause flatulence or bowel irritation, Ikonen clarifies.

Ikonen tested different fermentation temperatures and durations using different lactic acid bacteria mixes in order to find the best performing conditions. She also studied the sensory properties of the fermented samples with an affective test and found out that selected bacteria affected the odor and taste of the samples.

### **Potential processing method**

Fermentation is widely used processing method in food industry as it can be used to improve the shelf life, digestibility, structure or taste of food and beverages. In addition, it supports sustainability and circular economy as it enables better utilization of food production side streams by increasing their nutritional value. It is also relatively natural, and less energy consuming method compared to highly refined food production chains.

Need for sustainable plant-based food is increasing as world's population continues to grow and environmental emissions of food production need to be reduced. Ikonen believes, that fermentation will be one way to improve the utilization of pulses

- I hope, that in the future we can create new fermented food products into markets to increase the utilization and consumption of different pulses as part of a healthy diet. My study will provide information about the suitable fermentation conditions but in order to further develop the product, the fermentation should be scaled up and the number of analyzed antinutritional compounds could be increased, Ikonen notes.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 818431 (SIMBA). This output reflects only the author's view and the Research Executive Agency (REA) cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

## **Tuoksuvaan tutkimusta puolukasta**

*Puolukan tuoksuprofiiliin vaikuttaa kymmenet eri tuoksuvat yhdisteet. Puolukasta on tehty suhteellisen vähän tutkimusta ja vielä vähemmän on tutkittu sen haihtuvia yhdisteitä ja niihin vaikuttavia tekijöitä. Tässä erikoistyössä selvitettiin kasvupaikan, lämpötilan ja sijainnin sekä kypsyyssasteen vaikutusta yhdisteiden määrään.*

### **Sanni Tuominen**

Ohjaajat: DI Niina Kelanne, dosentti Oskar Laaksonen

#### **ELINTARVIKEKEMIA**

Tutkimuksessa on selvinnyt, että kypsemmistä puolukoista löytyy enemmän bentsoehappoa sekä etanolia ja alkoholien hajoamistuotteita. Marjan kypsyyssaste ja kasvulämpötila vaikuttavat myös vihreän tuoksuisen heksanaalin ja sen johdannaisen määrään. 9 °C:ssa kasvaneista marjoista löytyi esimerkiksi vähemmän bentsoehappoa, mutta enemmän heksanaalia sekä 2- ja 3-heksanaalia kuin 15 °C:ssa kasvaneista. Bentsoehappo on luonnon oma säilöntäaine ja sitä löytyy puolukasta moninkertaisesti muihin haihtuviin yhdisteisiin verrattuna. Kukkaisten tuoksuinen linalooli ja yrttimäisen tuoksuinen eukalyptoli muodostavat edelle mainittujen yhdisteiden kanssa osan puolukan marjojen tuoksusta. Linaloolia lisätään muun muassa hygieniatuotteisiin ja eukalyptolia käytetään makuaineena leivonnaisissa.

### **Tuoksuilla parempaa puolukkaa**

Tietyt yhdisteet voivat suun kautta päätyä nenään ja näin synnyttää tuoksun ja maun yhteisvaikutelman eli flavorin. Muun muassa puolukasta löytyvä pineeni maistuu puiselta ja hieman trooppiselta, mutta tuoksuu pääosin yrttiseltä. Tuoksuvat yhdisteet vaikuttavat myös koettuun makuelämykseen korostaen esimerkiksi makeuden aistimusta. Marjojen tuoksuprofiili muodostuu haihtuvista orgaanisista yhdisteistä, kuten estereistä, aldehydeistä, alkoholeista ja terpeeneistä. Suosittujen marjojen, kuten mustikoiden ja mansikoiden, tuoksuprofiili tiedetään ja näin voidaankin viljellä tuoksultaan houkuttelevampia lajikkeita.

Koska puolukan tuoksuvista yhdisteistä on tehty niukasti tutkimusta, on tärkeää aloittaa perusteista. Puolukan tuoksuvien yhdisteiden jäsentäminen voi auttaa uusien lajikkeiden viljelyssä ja laajentaa puolukan käyttömahdollisuuksia elintarviketeollisuudessa. Puolukan happamuus on haastava ominaisuus uusien tuotteiden kehityksessä. Tämä näkyy myös puolukan myyntiluvuissa: puolukkaa myydään vuosittain kolmasosa vähemmän kuin mustikkaa ja kolme kertaa vähemmän kuin mansikkaa.

Kasvuolosuhteiden ja kypsymisen vaikutuksesta tuoksuviin yhdisteisiin on hyvä tutkia lisää, jotta metsästä saadaan poimittua parhaat puolukat. Puolukoiden viljely ja tuoksuvien lajikkeiden kehittäminen voi olla seuraava tutkimuksen aihe.

## **Easy qPCR assay for determining fetal RhD genotype from maternal plasma sample**

*RhD is a common antigen found from red blood cell surfaces, which determines whether the blood group is classified either negative or positive, e.g. A+ or A-. In a situation, where expecting mother is RhD negative and fetus RhD positive, severe health problems can occur to the unborn child. However, those can be prevented with anti-D prophylaxis treatment, which is usually routinely performed to all RhD negative mothers. Approximately 40 % of these treatments are performed unnecessarily in cases where fetus is RhD negative. In her master's thesis work at PerkinElmer, Suvi Parviainen has developed a simple assay to detect the presence of RHD gene in the fetal DNA. In her assay, fetal RhD genotype can be solved from maternal plasma sample during pregnancy.*

### **Suvi Parviainen**

Supervisor: Ph.D. Ville Veikkolainen

### **MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS**

The assay Parviainen has optimized relies on quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method, which utilizes DNA amplification for target gene detection.

- This assay recognizes RhD negative and RhD positive individuals, and based on our experiments, it should be sensitive enough for detecting those small amounts of fetal DNA in maternal plasma samples. However, results should be confirmed with samples with known RhD genotypes, Parviainen states.

Highly developed countries, such as Denmark, Finland, and the Netherlands, already provide fetal RhD genotyping for RhD negative mothers, and anti-D prophylaxis treatments are targeted based on that result.

- Some RhD genotyping assays have already been developed, but only few of them have been commercialized. The aim behind this project was to develop a fetal RhD test with an easy protocol, designed for worldwide implementation, Parviainen validates.

### **Is there potential for a commercial product?**

Parviainen used an automated system for DNA extraction from maternal plasma samples. These extracted samples contained also small amounts of fetal DNA, which she utilized in her RhD testing. The actual qPCR assay needs only sample addition and suitable qPCR instrument, since it uses reagents that are already dried to the assay plate by the manufacturer.

- The automated DNA extraction method has already been developed for other prenatal screenings, so this fetal RhD genotyping would be easy and fast to perform among other testing during pregnancy, Parviainen considers.

Parviainen desires, that the results she accomplished in her master's thesis project could be used in future product development. Nevertheless, a lot of testing should be performed to prove the clinical specificity and sensitivity of the assay, and thus the real potential of the assay could be evaluated.



## **Improved diagnostics to identify pertussis infection**

*Improved diagnostic methods enable more reliable pertussis diagnostics. Niina Forstén has studied two functions of antibodies during her thesis project at the University of Turku. The development of these new methods aims to reduce incorrect diagnoses.*

### **Niina Forstén**

Supervisor: M.Sc. (tech) Aapo Knuutila

#### **MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS**

Forstén's research has focused on the study of binding strength of the antibodies (avidity) and binding sites (epitopes) of molecules, which antibodies recognize, causing the pertussis infection. Her results show that avidity is higher after vaccination than infection and that expectedly a booster vaccine increases avidity. However, after a year, avidities are elevated only in children and adolescents, whereas in adults and elderly people avidities reduce at the same level as before the booster.

With the epitopes, Forstén was aiming to further development of the assay. The project was successful.

- The optimized assay consumes less sample and other reagents. The costs are reduced and therefore more extensive testing can be done, Forstén summarizes.

### **Towards more reliable diagnostics and better vaccines**

Currently used blood-based diagnostics is limited to measure only the number of antibodies in serum samples and no separation between infection and recent vaccination can therefore be done.

- The number of antibodies remains elevated for at least two years after the vaccination. A respiratory infection patient may obtain a false positive result from pertussis testing if he/she has been vaccinated recently. This leads to unnecessary use of antibiotics, Forstén lists the limitations of current diagnostics.

In the future, antibody functions such as avidity could be used as a more accurate measure of antibody response to avoid these incorrect diagnoses.

The immunity is not lifelong neither after the vaccination nor infection. Vaccines provide immunity against pertussis for 4 to 12 years whereas after the infection the immunity can last up to 20 years. By identifying epitopes of natural infection, vaccines can be developed to mimic natural infections resulting in prolonged protection against the disease.

## **A new method for studying the aggregation of Alzheimer's disease protein amyloid beta**

*A new method for studying the aggregation of amyloid forming proteins was developed by Ville Vapa for his master's thesis. This method could pave the way for new drug discoveries against diseases such as Alzheimer's or Parkinson's.*

### **Ville Vapa**

Supervisor: M.Sc. Pharm. Laura Leimu

BIOTECHNOLOGY(TECH.)

Alzheimer's and about thirty other diseases are thought to be caused by fibrillar protein aggregates called amyloids. There is a growing interest to develop drugs that affect the formation of these amyloids but methods for studying the protein aggregation are limited. In his master's thesis done at Orion, Ville Vapa tested if Bio-Layer Interferometry (BLI) could be used to study the aggregation of amyloid forming proteins. Based on Vapa's findings, BLI can be used to detect the aggregation of proteins, but the method reproducibility still needs work for drug screening purposes.

- Established methods for studying the aggregation are great but have a few drawbacks such as not being able to study the first, most important steps of the aggregation or being very sensitive about the sample composition. We thought that BLI might not have those drawbacks and could be an excellent addition to the tools for studying the aggregation, Vapa explains.

BLI has optic fiber-like sensors and it measures the thickness of the molecule layer on the sensor. BLI is usually used to study the binding of proteins. This is done by immobilizing one protein on the sensor and detecting the increase of thickness when target molecule binds to the immobilized protein. BLI is already heavily used in the industry.

### **A hard protein to work with**

The method Vapa has developed works by first immobilizing biotinylated protein to the BLI sensor and then dipping that sensor to a sample containing monomerized form of the same protein. If aggregation happens, signal should increase. Vapa used amyloid beta as the model protein for the test. Amyloid beta aggregates are found in the brains of Alzheimer's patients.

- We chose amyloid beta because it is widely used and has a lot of research already done. We also ran some tests with gelsolin but had problems with sample evaporation as the aggregation of gelsolin happens very slowly. Amyloid beta is a hard protein to work with and we had to test multiple preparation methods before finding an optimal one. No wonder people call this the "protein from hell", Vapa chuckles.

In the future this method may enable the discovery of new drugs against difficult to treat diseases such as Alzheimer's or Parkinson's. Vapa is planning next to optimize the method and test it with other aggregating proteins.

## **Narrowing the gap between lignin and industrial applications**

*BS Jonas Hoisko performed a comprehensive analysis of lignin powders to enable the selection of types of industrial application and promote the expansion of lignin based applications. Lignin is a biopolymer found in plants and it is a promising raw material for replacing fossil based chemicals. The results showed that the lignin powders prepared with METNIN™ technology have distinct physical and chemical properties which makes one or the other more suitable for certain industrial applications.*

### **Jonas Hoisko**

Supervisor: PhD. Antoine Mialon  
BIOTECHNOLOGY

MetGen Oy has developed METNIN™ technology which enzymatically refines and fractionates crude lignin according to a very specific molecular weight. For his Master's thesis, Jonas Hoisko researched and developed new analytical methods for different molecular weight lignin powders which were produced with METNIN™ technology.

- The top priority properties for the lignin used in industrial applications are molecular weight, polydispersity, reactivity and lignin purity, Hoisko explains.

The powders were produced at an industrial scale trial using METNIN™ technology at a third party company. The crude Kraft lignin was treated in high pH solution with a genetically engineered enzyme, designed to specifically modify and activate lignin. The enzyme breaks down the lignin into fractions which were separated using membrane ultrafiltration and then further spray dried into powders. The membrane ultrafiltration enables the selection of a specific molecular weight for lignin fraction.

- The measured properties will affect the selection of an industrial application, applications include: polyurethane foams, thermoplastics, adhesives, resin coatings, biomedicine, cosmetics, packing materials, paints, and surfactants. For example the low molecular weight lignin is used for producing polyurethane foams but it doesn't suit thermoplastic production. The comprehensive analysis of each lignin fraction helps to guide the selection of lignin application, Hoisko explains.

### **Lignin replacing fossil based chemical**

Lignin is a biopolymer found in plants and it is the second most common natural polymer in the world after cellulose. It is rich in phenolic and aromatic groups which makes it a promising raw material for replacing fossil based chemicals. As a raw material its varied functionality, renewability, nontoxicity and low cost are an advantage. The main obstacles of lignin valorization are its diverse structure, low reactivity and poor solubility. To achieve desirable properties for industrial application, lignin usually needs to be fragmented to a lower molecular weight and often chemically modified as well.

- There is a huge amount of different applications for lignin but many of them haven't reached commercial use yet. Better understanding of the lignin and end applications requirements could promote the expansion of lignin based applications, states Hoisko.

## **Unveiling the mechanisms of neurodegeneration behind Parkinson's disease**

*Parkinson's disease (PD) is a brain disorder that causes difficulties with normal day to day life. Neurodegeneration in PD is manifested as a movement disorder with the pre-motor phase that can start years before diagnosis. So what is happening in the brain in the early stages of neurodegeneration? In her Master's thesis work, Jelena Gnjatovic is attempting to answer this question.*

### **Jelena Gnjatovic**

Supervisors: Research director, Eleanor Coffey, Dr. Prasannakumar Deshpande  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

In PD, neurons that produce dopamine in the brain area which controls movement become impaired and eventually die. Although there are known genetic risk factors, precisely what mechanism causes cell death in PD is unknown. Efforts from the Coffey lab are aimed at understanding the origins of neuronal death in PD.

The most common mutation causing PD is in the gene for the enzyme called leucine rich-repeat kinase 2 (LRRK2). LRRK2 belongs to a family of enzymes that are important regulators of protein function by changing their structure at a specific site, in a reaction called phosphorylation. The *G2019S* mutation increases LRRK2 activity and causes phosphorylation changes on its protein targets leading to compromised function.

“Previous results from the Coffey lab in the rat PD model identified three proteins downstream of LRRK2 as potentially involved in PD development. What we are trying to do now is to mimic protein marking by LRRK2 to investigate if those changes induce neurodegeneration. We can use mutated genes for our three proteins targets as tools for that purpose.”, Jelena states.

### **Creating Parkinson's disease in neuronal cells**

Fast and reliable disease modelling in cells can be achieved with a powerful gene editing tool, called CRISPR-Cas9. It allows scientists to create and study the effects of gene mutations suspected to be involved in disease development.

“CRISPR-Cas9 system inserts a change in the gene with the enzyme Cas9 and a piece of RNA called the guide RNA (gRNA). These gRNAs contain the information where our targeted gene is located in the genome. The gRNA guides the Cas9, which functions as molecular scissors, making a cut at that exact location. The desired mutated gene can then be inserted in that place.”, explains Jelena.

Mutated genes are delivered to cells in a gene editing vehicle, called a vector. So far in her work, Jelena has generated the genes for mutant proteins, called phosphomimetic and phospho-deficient mutants. Then, she inserted the mutated genes in the vector with corresponding gRNA sequence for each of the three protein targets. Such gene editing constructs were verified by DNA sequencing.

After an intense initial phase to generate and validate the genome editing tools, the next step is to deliver them to neuronal cells. Finally, critical functional tests can be done to determine if protein marking by LRRK2 does indeed trigger neurodegeneration.

## **Using a novel tool to generate cellular models to understand the pathogenesis of prostate cancer**

*Prostate cancer is one of the major causes of cancer-related death in men. It is a highly heritable disease and genetic factors explain 58 % of the risk. Laura Laihonen, MSc student at University of Turku, is doing her master's thesis in this field and trying to use a novel genome editing tool for studying a germline mutation associated with prostate cancer risk.*

### **Laura Laihonen**

Supervisor: PhD. Christoffer Löf  
MOLECULAR CELL BIOLOGY

Laihonen is studying a mutation in a gene called *HOXB13*. This gene belongs to the homeobox gene family and is essential for embryonic development. The G84E mutation causes one amino acid change to another and therefore may affect the function of the protein encoded from this gene. This particular mutation was found in 2012 and it has been associated with increased prostate cancer risk, however, its mechanism and function in cancer progression still remains unclear. Laihonen is trying to generate this mutation in prostate cancer cells with a new gene editing method called prime editing.

- Generating cell models for this particular mutation is important since not much of its mechanism in cancer progression is known. Using prime editing is also very exciting since the method is so new, and I believe it has a lot of potential in studying different mutations, and in the future, it might benefit the treatment of different diseases, explains Laihonen.

### **Mutations as potential therapeutic targets in prostate cancer**

Laihonen has so far transfected LNCaP cells, which is a cell line derived from human prostate cancer, with three different prime editing constructs that she has generated. Once the cells are grown enough for DNA extraction, she will find out whether the constructs are working or not.

- Basically, if these constructs work, they can be used for any prostate cancer cell line. The reason I generated three different plasmids is to find out which is the most efficient one. Since this method is new and it has not been used with this particular mutation and cell line, it needs optimization, says Laihonen.

Targeted therapy in cancer treatment uses drugs that are specific to particular genes and proteins involved in the progression of the disease. This is why understanding the mechanisms and functions of particular mutations is extremely important. Once these questions are answered, potential drugs can be developed to treat cancer. Especially in the case of prostate cancer, identification of germline mutations and studying them is crucial because it is a highly heritable disease.

Laihonen does not yet have many results, but she is eager and hopeful about the project.

- The ideal outcome of the study is of course that the prime editing works and I can find the most efficient one of my constructs. Hopefully in a week or two, I can get the final results, Laihonen tells.

If Laihonen manages to succeed in her experiment, the construct is later used to generate cellular model of the G84E mutation in *HOXB13* for later functional studies.

## Insights into the biosynthesis of antibacterial lugdunomycin

*Streptomyces species QL37 utilizes Lug enzymes to produce lugdunomycin antibiotic. Aleksi Nuutila shows that enzymes LugOII, LugM and LugOI homolog PgaE convert UWM6 into methyltetrangomycin, which is a proposed precursor for lugdunomycin.*

Aleksi Nuutila

Supervisors: Ph.D. Pedro Dinis and prof. Mikko Metsä-Ketelä

BIOKEMIA

In his Master's thesis project, Aleksi Nuutila has studied the biosynthesis of lugdunomycin, an antibiotic produced by a species of *Streptomyces* soil bacteria, named QL37. Lugdunomycin belongs to the group of angucyclines, which are commonly produced by *Streptomyces*. Nuutila has shown that LugOI homolog PgaE, LugOII and LugM convert UWM6, a common angucycline precursor, into methyltetrangomycin, which is a proposed precursor for lugdunomycin. He has also shown that unlike LugOII, its close relative LanV enzyme cannot carry out the unique C1 ketoreduction. Understanding how QL37 makes lugdunomycin could enable us to engineer and produce new synthetic antibiotics in the future.

A research group led by Gilles van Wezel from Leiden University, found lugdunomycin in 2019. His group also conducted the first studies on the biosynthesis of this novel compound by silencing the genes that contain the blueprints for the Lug enzymes.

"Studying the function of these enzymes by studying how their inactivation affects the lugdunomycin biosynthesis, is like studying the form of a sculpture by observing its shadow. Our job is to continue the work of van Wezel's group by studying the enzymes directly, in order to get a better picture of the biosynthesis", Nuutila explains.

Nuutila has produced UWM6 and other angucyclines in modified *Streptomyces* bacteria, and extracted the compounds with high-performance liquid chromatography (HPLC), which is a method for separating different compounds from each other. Then he carried out reactions with these compounds, using combination of different Lug enzymes, and analyzed the reaction products with analytical HPLC and mass spectrometer to see what reaction each enzyme catalyzes.

"So far I have not been able to get the LugOIII enzyme reactions to work, which is unfortunate since LugOIII likely catalyzes the most interesting chemical reaction, which is responsible for the complex structure of lugdunomycin", Nuutila confesses. In the future, his most important objective is to solve the function and mechanism of LugOIII. He will also investigate how LugOII has gained the extra C1 ketoreductase function that LanV lacks.

Studying the mechanism of natural antibiotic biosynthesis provides important tools for designing and producing new synthetic antibiotics, which could provide a solution for the increasing threat of antibiotic resistant pathogens.

Uuden kasvatusmenetelmän käytön laajentaminen nopeuttaa vasta-ainetuotantoa

*Vasta-aineet ovat elimistön luomia puolustusmekanismin proteiineja, jotka toimivat tiettyjä molekyylejä vastaan. Vasta-aineiden tuottamisella diagnostiikan tarpeisiin on pitkät perinteet, mutta siitä huolimatta tuotantolaitteiston pitäminen ajan tasalla on erityisen tärkeää. Erikoistyötään tekevä Mäkinen on mukana toteuttamassa kahden solulinjan siirtoa uudelle tuotantomenetelmälle yhdessä Wallac Oy:n vasta-ainevalmistuksen kanssa.*

Wallac Oy:ssä aiemmin käyttöön otettu uusi tuotantomenetelmä on saanut aikaan hyviä tuloksia vasta-aineiden tuotantotehokkuudesta. Pussimallinen bioreaktori mahdollistaa nopean ja tehokkaan tuotantosolujen kasvattamisen aiempaan menetelmään verrattuna. Mäkisen mukaan kyseinen menetelmä soveltuu saatujen tulosten perusteella hyvin käytettäväksi myös tulevaisuudessa vasta-ainetuotannon vakituisena menetelmänä.

-Uudella tuotantomenetelmällä kykenimme valmistamaan tuotantotehokkaasti vasta-aineita, joiden laatu vastaa täysin aiempia tuotantoeriä. Täyteen tuotantokapasiteettiin skaalattuna uusi menetelmä mahdollistaa aiempaa nopeamman ja mukautettavamman tuotannon. Menetelmää käyttämällä kyetään lyhentämään tuotantoerän valmistamiseen käytettyä työaikaa, sekä valmistamaan tuotantotehokkaasti juuri haluttu määrä vasta-ainetta, Mäkinen toteaa.

Mäkinen korostaa, että solukasvatuksessa on tärkeää huolehtia puhtaista ja steriileistä työskentelytavoista, jotta suoritettava solukasvatus ei saastuisi ympäristömme muilla mikrobeilla. Solujen toistuva käsittely lisää huomattavasti kasvatuksen altistumisriskiä ulkopuolisille mikrobeille. Solukasvatuksessa solujen hyvinvointia seurataan päivittäin, ja solujen vointia on opittava tulkitsemaan solujen ulkoisen olemuksen perusteella.

-Solujen kanssa työskennellessä on hankala kertoa tarkalleen, mikä kasvuolosuhteissa on vialla, mutta hyvinvoivan ja kauniin solun erottaa selkeästi. Meillä on erillisiä analysointilaitteita, jotka kertovat kasvatusliuoksen ravinteiden määrästä. Eri solulinjat vaativat kukin omanlaisensa elinolosuhteet, ja tämän takia emme voi sokeasti luottaa laitteiden mielipiteisiin asiasta. Solujen hyvinvoinnilla on suora yhteys tuottamamme vasta-aineen määrään, joka on meille pääasiallinen tuote, Mäkinen kertoo.

Perinteistä diagnostiikkaa vasta-aineiden avulla

Mäkisen erikoistyössä tuotetut vasta-aineet on kehitetty Downin syndrooman seulontaan. Downin syndrooma on hyvin tunnettu kromosomihäiriö, jonka sairastumisriski kyetään selvittämään jo raskauden ensimmäisen kolmanneksen aikana vasta-aineita hyväksi käyttäen. Kasvatetut solulinjat tuottavat vasta-ainetta, joka on kehitetty tunnistamaan raskaudenaikana esiintyvää veren plasmaproteiini A:ta. Kyseisellä proteiinilla on todettu olevan suora yhteys sikiössä esiintyvälle kromosomin 21 trisomialle. Vasta-ainepohjaisen testin käyttö osana raskaudenaikaista seulontaa mahdollistaa nopean ja turvallisen tuloksen ilman lapsivesinäytettä. Saadun tuloksen pohjalta voidaan tehdä päätös mahdollisista jatkotutkimuksista.

-On mukava tietää, että erikoistyöstä saadut tulokset ja tuotetut vasta-aineet menevät oikeasti käyttöön ja mahdollistavat täten useiden tuhansien Downin syndrooman seulontatestien valmistuksen, Mäkinen kertoo.

## **Probiooteista ongelmanratkojiksi paperin- ja kartongintuotannossa?**

*Mikrobiologiset ongelmat paperin- ja kartonginvalmistusprosessissa aiheuttavat merkittäviä tuotannollisia tappioita ja kasvattavat eri kemikaalien lisäämisen tarvetta. Heidi Toivonen pyrki diplomityössään selvittämään, mikäli mikrobiologisia ongelmia voitaisiin ratkoa hyödyntämällä prosesseille hyödyllisiä bakteereja eli probiootteja. Vaikka Toivosen tutkimuksessa hyödyntämät bakteerit eivät osoittautuneet prosessille probioottisiksi, antoi tutkimus vahvaa alustaa tulevaisuuden jatkotutkimuksille aiheeseen liittyen.*

### **Heidi Toivonen**

Ohjaaja: FM Jaakko Simell

### **BIOTEKNIikka**

Toivonen tutki diplomityössään paperikoneelta eristettyjen bakteerien probioottisuutta eli hyödyllisyyttä kierrätyskuitua hyödyntävien paperin- ja kartonginvalmistuskoneiden määrässä päässä. Tutkimuksessa tutkitut bakteerit eivät kuitenkaan osoittautuneet prosessille hyödyllisiksi, sillä ne eivät tasoittaneet muiden bakteerin kasvusta johtuvaa prosessiolosuhteiden vaihtelua, kuten pH:n laskua tai johtokyvyn nousua.

– Probiootit ovat monelle tuttuja erilaisista elintarvikkeista ja eri bakteerien hyödyllisyyttä esimerkiksi ihmisen ruoansulatukselle ja immuunipuolustukselle on tutkittu paljon. Probioottien hyödyntäminen teollisuuden prosesseissa on kuitenkin hyvin uusi tutkimuksen ala ja sovelluksia, joissa esimerkiksi kemikaalien runsasta käyttöä pyrittäisiin vähentämään hyödyntämällä prosessia tukevia bakteereja, on vasta kourallinen, toteaa Toivonen.

Vähäisestä alustavasta tutkimustiedosta lannistumatta Toivonen lähti etsimään tiettyyn bakteerisukuun kuuluvia bakteereja eri paperikoneiden prosessivesistä ja lisäsi näitä mahdollisia probiootteja tasaisin väliajoin paperimassakasvatuksiin, joilla simuloitiin paperikoneen prosessia laboratorio-olosuhteissa.

– Paperikoneiden olosuhteet ovat haastavat sillä niiden mikrobipopulaatiot ovat laajoja ja kilpailu elintilasta on kovaa. Probioottia lähdettiinkin etsimään paperikoneen prosessivesistä, sillä laajasta mikrobiopopulaatiosta ajateltiin mahdollisesti löytyvän sellainen bakteeri, joka pärjäisi haastavissa olosuhteissa, ja jonka määrää lisäämällä sen kilpailukykyä voitaisiin parantaa, selventää Toivonen.

Tutkimuksen tulos kuitenkin osoittautui hypoteesin vastaiseksi, eivätkä tutkimuksessa tarkastellut bakteerit osoittautuneet probioottisiksi.

– Tutkimuksen tulos ei sinänsä ollut toivottu, mutta antoi jalansijaa jatkotutkimuksille. Tutkimuksen aikana kehitetyt menetelmät osoittautuivat toimiviksi ja mahdollistaisivat tutkimuksen jatkamista matalalla kynnyksellä. Probioottien tulevaisuus paperin- ja kartonginvalmistuksen määrässä päässä on siis vieläkin avoin, pohtii Toivonen.

Määrällä päällä tarkoitetaan prosessin osaa, jossa yli 90 % vettä sisältävästä kuitumassasta lähdetään poistamaan kosteutta ja muodostamaan lopputuotteen kaltaista levyä.



## Maanperän bakteerit kolesterolimittauksen reseptinä

*Liian suuret ja pienet kolesterolipitoisuudet veressä ovat merkkejä sairauksista, joihin lukeutuvat sydän- ja verisuonisairaudet, jotka ovat länsimaiden yleisin kuolinsyy. Tämän vuoksi kolesterolin mittaaminen on erityisen kriittistä. Mittauksissa käytetään usein maaperän bakteerien tuottamaa entsyymiä.*

Niko Oksanen

Ohjaaja: Professori Mikko Metsä-Ketelä

### BIOTEKNIikka DI

Ennen kuin päästään itse kolesterolimittaukseen on tunnettava mittauksen tärkein tekijä eli entsyymi, joka merkittävästi nopeuttaa mitattavaa reaktiota. Juuri tätä asiaa Niko Oksanen tutkikin diplomityössään. Maaperän bakteerien tuottaman entsyymin ominaisuuksista määritettiin sen tärkein ominaisuus eli kuinka monta reaktiota se pystyy katalysoimaan tietyssä ajassa.

– Lääketieteessä on paljon suuria ongelmia, joihin vastaus löytyy yllättävän usein hyvin pienistä tekijöistä. Näistä tekijöistä tärkeimpien joukkoon lukeutuvat *Streptomyces* -suvun bakteerit, jotka yleisesti tunnetaan maaperän bakteereina. Kolesterolimittauksissa käytetty entsyymi, kolesterolioksidaasi, on yksi sadoista kiinnostavista molekyyleistä, joita nämä bakteerit valmistavat.

*Streptomyces lavendulae* -bakteerikanta tuottaa luontaisesti kolesterolioksidaasia hiivan läsnä ollessa, joka herättää lukuisia kysymyksiä tämän entsyymin merkityksestä bakteerille. Eräissä tutkimuksissa on löydetty yhteys entsyymin ja antibioottien tuotannon välillä, joka entisestään kasvattaa entsyymin merkitystä isossa mittakaavassa. Voitaisiinko sitä hyödyntää antibioottien tuotannon kasvattamiseen bakteereissa tai käynnistämään uuden antibiootin tuotanto?

– Kuten tutkimuksilla on tapana, niiden aikana herää vähintään yhtä monta kysymystä kuin mihin saatiin vastaus. Tämä tekeekin perustutkimuksesta niin tärkeää, osataan kysyä uusia kysymyksiä.

Entsyymin ominaisuuksien tutkimisen lisäksi tutkimusryhmä valmisti bakteerikantoja, joiden toivottiin tuottavan entistä enemmän entsyymiä. Ikävä kyllä tässä ei vielä onnistuttu, mutta *Streptomyces lavendulae* bakteerin tuottaman entsyymin määrä saatiin mitattua.