

The impact of HSF1 or HSF2 on cancer cell survival during HSP90 inhibition

Cancer cells are constantly in stressed state and therefore, they are dependent on stress-protective proteins. Targeting the stress-protective proteins with drugs would be beneficial as they would selectively kill cancer cells. One potential drug target is heat shock protein 90 (HSP90). However, HSP90 inhibitors have been problematic as they cause a cellular stress response increasing the overall amounts of stress-protective proteins, which is counterproductive. Since stress responses are regulated by heat shock transcription factors (HSFs), Laitala is studying how lowering the amounts of HSF1 and HSF2 affect the efficiency of HSP90 inhibitor treatment. Understanding the roles of HSF1 and HSF2 in HSP90 inhibition is important in order to develop a successful HSP90 inhibitor.

Leena Laitala

Supervisor: Ph.D. Pia Roos-Mattjus; Practical supervisor: M.Sc. Hendrik Hästbacka

MOLECULAR BIOSCIENCES, BIOCHEMISTRY

Laitala studies if HSP90 inhibitor treatment kills cancer cells more efficiently when they lack HSF1 or HSF2. The results of the project help to better understand the role of HSF1 and HSF2 in stress response that is caused by HSP90 inhibitors which would help to develop a successful HSP90 inhibitor-based treatment. Alternatively, HSP90 inhibitors could be used in combination therapy with some other therapeutic agent.

Based on the results of the research group, we already knew that human osteosarcoma U2OS cells where HSF1 or HSF2 genes were deleted, die more easily after HSP90 treatment than wild type U2OS cells.

- However, we did not know if this applies only to U2OS cells. Since HSP90 is found in all cells, it is important to make sure if the loss of HSF1 or HSF2 is associated to decreased viability also in other cancer cell lines. In order to proceed, I first had to destroy HSF1 or HSF2 proteins. Since deleting genes is time consuming, I instead used short hairpin RNA (shRNA) to reduce the amount of HSF1 and HSF2 in the cells, says Laitala.

HSF1 and HSF2 are destroyed using short hairpin RNA

- ShRNAs utilize a system that cells use normally to dismantle the viral RNA. I designed shRNAs targeting HSF1 or HSF2 RNA and inserted them into cells. Next, I confirmed that the shRNAs lower protein levels of HSF1 or HSF2 in human and mouse cells. Finally, I will treat shRNA-inserted cells with HSP90 inhibitors and study how it affects cell survival, explains Laitala.

The study will help to uncover why HSP90 inhibitors cause stress response and based on that, better HSP90 inhibitor can be developed. Additionally, shRNAs that Laitala has designed can be used to the benefit of future HSF research.

A promising alternative to treat cancer

Cancer is one of the most ancient diseases and one of the main causes of death worldwide. Novel cancer therapies include the targeting of molecules that allow malignant cells to grow without control. Master's student Daniela Mendoza from the University of Turku and Ph.D. Pia Roos-Mattjus lab from the Åbo Akademi University are currently characterizing novel isoform specific HSP90 inhibitors. Their work opens a promising alternative in the treatment of cancer.

Daniela Mendoza

Supervisor: Ph.D Pia Roos-Mattjus
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Daniela Mendoza is currently studying novel drug therapies to treat cancer. Over the years, the 90kDa heat shock protein (HSP90) has become a promising molecule to treat this disease due to its role in many cellular processes including malignant cell transformation. In humans, HSP90 family members include four isoforms (proteins with similar function but not identical amino acid sequence): HSP90 α and β , GRP94 and TRAP1. Mendoza and Roos-Mattjus are interested in targeting specific isoforms in order to minimize side effects and toxicity from those compounds that target all isoforms in once.

-“15 different inhibitors have been tested in different clinical trials; however, they have not succeeded because patients presented multiple side effects. Our aim now is to characterize novel specific inhibitors in order to minimize those effects”, states Mendoza.

What are the challenges in HSP90 inhibition?

One of the biggest challenges of working with HSP90 inhibitors is that they induce a heat shock response (HSR). The HSR is a mechanism that enables the cell to respond to a wide range of stress conditions by inducing heat shock proteins (HSPs) which can be counterproductive in the treatment of cancer. Hence, an alternative approach is the selective suppression of HSP90 isoforms

-“We are currently working with 9 novel isoform specific HSP90 inhibitors, we are assessing whether they induce an HSR. We are also assessing the sensitivity of cells to these novel inhibitors.” Says Mendoza.

Mendoza and Roos-Mattjus results show that certain inhibitors induce a stronger HSR than others. These results allow them to discriminate among the compounds for further characterization.

-“Our work opens new alternatives to treat cancer, but most importantly it improves the treatment and quality of life of cancer patients” Says Mendoza.

New protein TRIM28 found regulated by the tumour suppressor phosphatase, PP2A, shedding light to the nooks of cancer

Tumour suppressor protein PP2A is a known inhibitor of cancer and a new DNA binding protein known as TRIM28 is found to be regulated by this phosphatase. University of Turku's MSc student Joel Lainio has been researching relations between PP2A and TRIM28.

Joel Lainio

Supervisors: Ph.D(c). Mukund Sharma, MD, Ph.D. Jukka Westermarck

MOLECULAR CELL BIOLOGY

Cancer Cell Signalling group has found gene repressor TRIM28 to be one of the subjects inactivated by PP2A; when dephosphorylated they are binding less to the chromatin leading to gene expression. Also, PP2A's inhibitor PME1 was reported to interact with TRIM28. Lainio has researched different phosphorylation sites of TRIM28 and PP2A's binding to TRIM28 so far with promising results. He reports PP2A to be binding to TRIM28. In contradiction to preliminary data PME1 wasn't binding to TRIM28. However, further studies are needed for validation.

Lainio reports TRIM28 was found binding to chromatin with differences in variants. Future studies are going to involve analysis of gene expression directly, says Lainio. PP2A was correctly inhibited by PME1 and in continuation TRIM28 was expressed more. This result shines light to the nooks of how a significant part of cancers operate, Lainio notes.

PP2A is an up-and-rising tumour suppressor protein involved in up to 40 % of cancers. It is also in charge of regulating the cells normal healthy functions. In a nutshell: this phosphatase takes the battery out of proteins making them inactive which is needed all around a cell.

Not all smooth sailing

Most of Lainio's time during research went to fine-tuning the experiments parameters and troubleshooting. Firstly, making sure the constructs work, planning how different experiments were going to be carried out and optimization on these experiments needed to be done to be as efficient as possible. Secondly failing equipment and multiple complications in transfections exhausted Lainio, but he was finally able to achieve expected results during the last month of experiments. He now focuses on working out the wrinkles in his project and planning future experiments targeting gene expression markers.

Using smartly folded RNAs to watch the RNA synthesis in real-time

*Transcription is the synthesis of RNA and the first step into expressing proteins. Several clinically used antibiotics work by inhibiting transcription. In his master's thesis project, Puro developed a new assay to monitor transcription in real-time. He optimized the assay to monitor transcription in *Spirochaeta africana* as a way to help understanding transcription in pathogenic spirochetes in the future.*

Oskari Puro

Supervisors: M.Sc. Janne Mäkinen, Ph.D. Georgi Belogurov

BIOCHEMISTRY

Puro developed a method to monitor transcription with fluorescence light-up aptamers (FLAPs). Aptamers, in this case, are RNA fragments that can bind a small molecule called a fluorophore. In the assay, RNA polymerase synthesizes RNA using a circular piece of DNA as a template. The transcribed DNA contains a sequence encoding a FLAP. After the FLAP RNA is synthesized, it will adopt a complex structure and bind the fluorophore. This will lead to an increase of fluorescence that the researcher can monitor.

- So far, our research group hasn't had a straightforward way to study various stages of transcription, which include initiation, elongation and termination. The FLAP-based new assay gives us a chance to study the entire transcription cycle, which is important while studying various transcription factors, Puro states.

Transcription factors are proteins that regulate transcription. Using the assay Puro has been able to study the effect of *S. africana* transcription factors. He found that a large Gre factor, found only in spirochetes, strongly stimulates RNA synthesis. At the same time, LoaP factor slows transcription, but prevents the decline of transcription rate over time. As a result, LoaP also increases transcription output in the long-term.

From model organism to combat diseases

- Spirochetes are corkscrew-shaped bacteria of which some are pathogenic. However, *S. africana* is non-pathogenic which makes it an easy organism to handle and perfect for our research. We can use transcription in *S. africana* as a model for transcription in the pathogenic spirochete species, reveals Puro.

For now, assays utilizing the FLAP in the transcription research are still in its beginning stages as Puro just scratched the surface with his transcription factors study. There is still a lot of progress that needs to be done before reaching the end goal of the research group where Puro is making his master's thesis. They are intending to use the FLAP assays in the future to help understanding the transcription of certain pathogenic spirochete species that cause diseases like Lyme disease, syphilis and leptospirosis.

Assay for heart attack biomarker

A diagnostic assay for heart attack reliably detects heart attack biomarkers from patient samples. The research team has developed an assay for heart attack during Akseli Lahtinen's master's thesis project. Results from this study seem promising and the developed assay could be useful in the future.

Akseli Lahtinen

Supervisor: Dos. Saara Wittfooth, M.Sc. Rami Aalto

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Lahtinen's master's thesis research project aimed to develop an assay for heart attack biomarker cardiac troponin T. Considerable amount of effort was devoted to finding assay conditions that enabled reliable measurements. Results from over 200 patient samples indicate that the assay can detect cardiac troponin T reliably.

- Heart attack is one of the leading causes of death in the developed world. Heart attack biomarker cardiac troponin T is released to blood from heart tissue affected by heart attack. Therefore, cardiac Troponin T can be used as a specific biomarker for heart attack, Lahtinen states.

Towards more reliable and quicker assay

Although this newly developed assay seems promising, more work is needed. Currently the main issue with the assay is that precision and repeatability are not sufficient in samples which have lower concentrations of cardiac troponin T.

- More work is needed to make this assay usable in hospital laboratory environment. Poor reliability in lower concentration could be solved by using more sensitive detecting methods or by assay optimization. Also, currently the assay takes more than two hours to complete by hand. Incorporating this assay to automated laboratory equipment is essential, Lahtinen considers.

Lahtinen hopes that the work and results that he has accomplished in his master's thesis laboratory project could be useful in the future for the further development of this assay and for patients. Overall, the assay seems to have great potential but more work is needed to solve the issues of reliability at lower concentrations and automation.

fPAPP-A protein – a possible biomarker for pregnancy abnormalities

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) is a widely used biomarker for Down syndrome pregnancies. In her Master's thesis, Vilma Tiittanen revealed that the active free form of PAPP-A (fPAPP-A) may identify pregnancies which will result in miscarriage.

Vilma Tiittanen

Supervisor: Ph.D. Saara Wittfooth

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Vilma Tiittanen studied in her Master's thesis the free form of PAPP-A in the 1st trimester of pregnancy, and whether it is associated with the risk of miscarriage. The preliminary results showed that the fPAPP-A levels in normal pregnancy started to increase after seventh week of pregnancy, and continued to increase throughout the first trimester.

- According to the results, fPAPP-A levels in the early weeks of pregnancy were clearly lower in women who miscarried than those who had normal pregnancy, Tiittanen states.

The PAPP-A levels have been shown to be abnormally low in complicated pregnancies. Because fPAPP-A plays important role in regulation of growth factors, the low levels have been suggested to affect fetal growth and development of placenta. These may explain why downregulation of PAPP-A might increase the risk of complications in pregnancy.

Towards better biomarkers

Currently used commercial assays measure both PAPP-A forms, the complexed non-active and the active free form of PAPP-A. Limited previous evidence suggests that in the first trimester of pregnancy PAPP-A is mostly present in the circulation in free form. The active fPAPP-A could possibly be better indicator of pregnancy abnormalities in the first trimester. In her study, Tiittanen used a unique immunoassay, which measures only the fPAPP-A.

- When fPAPP-A levels and total PAPP-A levels were compared, we were surprised how small portion of the PAPP-A was actually in free and active form. This is unquestionably interesting finding, and it provides important information about fPAPP-A, Tiittanen explains.

More research needs to be done to actually see if fPAPP-A could be better biomarker for pregnancy abnormalities than the currently used total PAPP-A. Although if the results would indicate that fPAPP-A is not useful biomarker, in this setting, this research still provides important and new information about it.

A simple detection method for aflatoxin in milk.

Aflatoxins may be present in milk if livestock have eaten moldy feed. These toxins are poisonous substances that cause a serious risk to human health. Master's student Venla Saramäki discovered an antibody fragment that recognizes a complex in which the toxin is bound to another antibody. The novel antibody fragment is utilized in a new test which makes it easier to detect aflatoxin from milk.

Venla Saramäki

Supervisor: Ph.D. Riikka Peltomaa

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

In her master's thesis work, Venla Saramäki aimed to develop simple tools for aflatoxin detection in milk. The project focused on selecting novel antibodies against aflatoxin-antibody complex that would enable more sensitive toxin detection. Antibody selection was done by phage display technique where antibodies can be searched from large antibody libraries. Once antibodies were selected from library, Saramäki screened for such an antibody that is the most suitable for aflatoxin testing.

- Aflatoxins are highly toxic and carcinogenic compounds that might be present in dairy products of cows fed with moldy feed. Overall, aflatoxin occurrence in commodities is a problem around the world. Especially the risk of aflatoxin contamination in Africa is increasing. The intention was to develop simple and low-cost test to facilitate the detection of aflatoxins, Saramäki explains.

In central laboratories aflatoxins are detected with chromatographic methods. Instead, Saramäki has developed a test that is in the well plate format from which the fluorescent signal is proportional to the amount of toxin in the sample. European Union has set the regulatory limits to 0.05 µg/kg aflatoxin in milk. With some fine adjustments this test format would be suitable for identifying whether limits set by EU are being exceeded. The same antibody could be used to develop a rapid test in lateral flow format. This would provide new opportunities but requires a lot of further development as, in general, rapid tests are less sensitive.

- The well plate assay is cheaper and easier to use than chromatographic methods. A rapid test could be useful in developing countries and low-resource settings where milk farmers and consumers would benefit from it. The test could be done in the field where it is needed, Saramäki points out.

Aflatoxins are type of mycotoxins produced by certain molds which grow in hay and grains among others. Therefore, these toxins also cause significant economic loss. The FAO estimates that 25 percent or more of the world's food crops are destroyed each year by mycotoxins; of which aflatoxins have the greatest share. Because of the significant global impact on health and economy it is important to study more the effects of toxins and to develop more effective detection methods.

Developing and optimizing a novel diagnostic tool for measuring neutralizing antibodies to SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 pandemic has required the in-vitro-diagnostic community to rapidly develop advanced diagnostic tests to identify virus infection. In the Institute of Biomedicine, University of Turku, a novel biochemical test to measure neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 was developed. The test can be utilized to diagnose antibody responses in SARS-CoV-2 infections and potentially be extended to other highly pathogenic virus infections.

Sari Maljanen

Supervisors: Prof. Ilkka Julkunen and Adj. Prof. Laura Kakkola

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Neutralization tests are used to measure the levels of neutralizing antibodies for pathogens and to predict the protection against re-infection. Neutralization tests are vital for vaccine development to study the efficacy and the longevity of the post-vaccination response. Tests can also be utilized to distinguish between immunity induced by natural infection and by vaccination.

The virology unit developed a biochemical test, surrogate virus neutralization test (sVNT), which measures the antibody-mediated blockage of the interaction between the host angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor protein and the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2, mimicking the traditional neutralization test. The protocol has been commercialized, however, the test kit of 96- well plate is costly. Preliminary data of sVNT results from 64 human sera were compared to the traditional microneutralization test (MNT) indicating that sVNT could be used instead of the tedious and expensive MNT. Further investigation is warranted to validate the performance of sVNT against emerging SARS-CoV-2 variants due mutations of concern arising specifically in the RBD domain possibly affecting the neutralization capacity of the antibodies.

Why to evolve and improve serological tests?

While MNT remains the gold standard for serological testing and determining immune protection, it is not practical for largescale epidemiological studies due to its low throughput and, in case of SARS-CoV-2, due to stringent biosafety measures. Therefore, increasing number of serological tests have been developed, however, many of the new tests still await clinical validation and formal approval. The lack of comparative data and the lack of reference materials complicate the comparison of serological tests.

Future studies of sVNT with the sera of COVID-19 patients and SARS-CoV-2 vaccinees are required prior to robust assessments of accuracy of sVNT. sVNT results will be quantitated and harmonized to the results two antibody binding tests (EIA and MNT) using the international standard obtained from WHO. The validated sVNT will be available for clinically important applications to measure immunological protection against pathogens.

Erikoistyöopiskelija tutkii laadun muutoksia silakassa

*Silakoiden (*Clupea harengus membras*) laatu on merkittävä osasy sille, miksi vain pieni osa hyödynnetään elintarvikkeena. Eri laadunmittausmenetelmien soveltuvuudesta silakalle on kuitenkin vain vähän tietoa. Kristiina Aarnio tutkii pro gradu -työssään mitä kalojen eri laadun seurantamenetelmät kertovat silakan laadun muutoksista kylmäsäilytyksen aikana.*

Kristiina Aarnio

Ohjaajat: M.Sc. Tanja Kakko ja M.Sc. (Tech.) Ella Aitta

ELINTARVIKEKEMIA

Pilaantumisen edetessä haihtuvien yhdisteiden, haihtuvan kokonaistypen ja näytteistä mitattujen rasvojen primääristen hapettumistuotteiden määrät nousivat ja Torrymetrillä saadut tuoreusmittarilukemat laskivat tasaisesti. Näytteistä mitatut pH-arvot vaihtelivat epätasaisesti, minkä takia pH:n tilalle päädyttiin valitsemaan toinen pikamenetelmäksi sopiva laadun seurantamenetelmä. Tuloksia vertailtiin pääkomponentti- ja PLS-analyysillä keskenään korreloivien menetelmien löytämiseksi. PCA- ja PLS-kuvaajien perusteella tuoreusmittarilukemat ja TVB-N-tulokset korreloivat käänteisesti keskenään. Tuoreusmittarilukemat vaikuttivat myös olevan yhteyksissä eri tulosten ja näytteiden kanssa odotetulla tavalla. Tämän takia torrymetri voidaan katsoa edellä mainituista menetelmistä lupaavimmaksi pikamenetelmävaihtoehdoksi silakan laadun seurantaan. Menetelmän tulisi olla mahdollisimman yksinkertainen, jotta laatua voitaisiin seurata myös kentällä laboratorion sijasta.

- Tutkimuksen aikana olen huomannut, että eri kalaerien välillä on paljon eroavaisuuksia. Myös rinnakkaisten näytteiden ja mittausten välillä esiintyi paljon hajontaa tuloksissa, mutta keskiarvoissa näkyi odotetunlaista muuntelua näytteiden välillä. Alkuperäiseen suunnitelmaan, jossa pH-arvoa hyödynnettäisiin laadun pikamenetelmänä, piti kuitenkin tehdä muutoksia tutkimuksen aikana, Aarnio toteaa.

Silakan kulutuksen lisääminen laadun tarkkailun avulla

Tutkimusasetelmassa silakoiden pilaantumisprosessia seurattiin kylmäsäilytyksen aikana. Selkämeren jää Oy:ltä hankittuja silakkaeriä säilytettiin styroksilaatikoissa jäissä kylmähuoneessa 7–9 päivän ajan. Säilytyksen aikana silakoista otettiin eri aikapisteistä näytteitä, jotka analysoitiin valituilla laadunseurantamenetelmillä. Sopivan laadunseurantamenetelmän löytäminen on tärkeää, jotta silakan laatua ja siten elintarvikekäyttöä voidaan parantaa.

- Pyydyntämisen jälkeen silakan elimistössä alkaa välittömästi tapahtua erilaisia reaktioita, jotka pääsääntöisesti heikentävät silakan laatua. Nämä reaktiot voidaan havaita biokemiallisella, mikrobiologisella ja aistinvaraisella tasolla. Rasvojen hapettuessa muodostuva silakan luonteenomainen haju antaa silakasta monille kuluttajille hyvin epämiellyttävän kuvan, Aarnio kertoo.

Haihtuvia yhdisteitä tutkittiin HS-SPME-GC-MS-menetelmällä, jossa haihtuvat yhdisteet uutetaan kaasukromatografista erottelua varten. Haihtuvalla kokonaistypellä seurattiin muodostuvien haihtuvien tyyppiyhdisteiden määrää. Silakoiden pilaantumista seurattiin myös Torrymetrillä, joka on suunniteltu mittaamaan kalan pinnalta sähkönjohtavuudessa tapahtuvia muutoksia. Se on kannettava, laskimen kokoinen laite, joka soveltuu helpokäyttöisyydensä ansiosta käytettäväksi myös muualla kuin laboratoriossa.

Silakan ja kuoreen proteiinit talteen hapon ja emäksen avulla?

Emäksen ja hapon avulla saadaan erotettua proteiinit kalasta. Erotettua proteiinimassaa voidaan käyttää erilaisissa elintarvikesovelluksissa, kuten surimin kaltaisissa tuotteissa. Turun yliopistossa tehdyssä tutkimuksessa optimointiin menetelmää parhaan proteiinisaannon saamiseksi ja kokeiltiin myös antioksidanttien lisäämistä parantamaan laatua.

Nashmil Palani

Ohjaajat: Ella Aitta (DI) ja Tanja Kakko (MSc)
ELINTARVIKEKEMIA

pH-shift -menetelmässä kalan lihankudoksen proteiineja liuotetaan ja saostetaan pH:ta muuttamalla. Palanin työssä tutkittiin eri liuotus- ja saostus-pH-arvojen sekä antioksidanttien vaikutuksia silakasta ja kuoreesta saatujen proteiinimassojen ominaisuuksiin. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin erilaisia antioksidanteja, kuten tyrnin puristekakkua ja vitamiineja ehkäisemään hapettumista. Tuotettujen proteiinikonsentraattien peruskoostumus, hapettumisaste ja väri tutkitaan erilaisilla menetelmillä. Palani sai eristettyä silakan ja kuoreen proteiineista vähintään 85% kuivapainoa kohden. Kosteuspitoisuudet olivat molempien kalalajien proteiinimassoilla korkeammat kuin raaka-aineilla. Alustavien tulosten mukaan eri menetelmien (liuotus-pH:t & antioksidanttilisäykset) välillä oli haihtuvien hapettumisyhdisteiden osalta merkittäviä eroja.

Alihyödynnettyjen kalalajien käyttöä voidaan lisätä pH-shift -menetelmällä. Prosessilla uutettua proteiinia voidaan hyödyntää mm. surimin kaltaisissa valmisteissa tai muissa kalatuotteissa. Tutkimuksessa käytettyä menetelmää voisi käyttää myös sivuvirtatuotteille, kuten perkuujäänteille, jotta kalan tärkeät proteiinit saadaan hyödynnettyä.

Maisteriopiskelija selvittää kauraerien eroavaisuuksia

Kaurasadon ominaisuuksiin vaikuttavat viljellyn kauralajikkeeseen lisäksi etenkin satovuosi sekä kasvupaikan sijainti sääolosuhteineen. Suomessa viljeltävien kauraerien ominaisuuksia on tutkittu vasta vähän viime vuosina, mutta erien välisten erojen tutkimista kaurahiutaleilla on jatkanut Turun yliopistossa pro gradu -tutkielmaa tekevä Heidi Valtanen. Alustavat tulokset osoittavat kaurahiutale-erien ominaisuuksien vaihtelevan, mikä vaikeuttaa tasalaatuisen kauran käyttämistä elintarviketeollisuudessa. Lisäksi säilytyksellä on havaittu olevan vaikutusta erien sisältämien haihtuvien yhdisteiden kirjoon.

Heidi Valtanen

Ohjaajat: Prof. Kaisa Linderborg ja Dos. Oskar Laaksonen
ELINTARVIKEKEMIA

Valtanen tutkii pro gradu -tutkielmassaan eri kaurahiutale-eristä keitettyjen kaurapuurojen ominaisuuksia. Tutkimus on jatkoa OatHow-projektille, joka on neljän tutkimusryhmän ja usean yrityksen yhteistyössä toteutettu tutkimus, jonka tavoitteena on löytää kauralle laatuindikaattoreita ja analyysimenetelmiä, joiden perusteella on mahdollista valita kuhunkin käyttötarkoitukseen ja elintarviketehokkuuteen sopivin kauraerä. Valtanen on tutkinut kauraerien reologisia ominaisuuksia, kuten viskositeettia ja kaurapuuron rakenteen palautuvuutta sekä haihtuvia yhdisteitä.

- Tarkoituksena on selvittää, onko eri kaurahiutale-eristä valmistettujen puurojen rakenteellisilla ja aistittavilla ominaisuuksilla jokin yhteys. Siten on kiinnostavaa, havaitsevatko aistinvaraiseen arviointiin osallistuvat panelistit eroja näytteiden välillä, Valtanen pohtii. - Eri kauraeristä samalla tavalla valmistetut puurot ovat silmämääräisesti hieman erilaisia koostumukseltaan, ja eroja puurojen viskositeetissa onkin havaittu tähänastisissa tuloksissa, Valtanen jatkaa.

Haihtuvat yhdisteet vaikuttavat tuotteen hajuuun ja makuun

Kaurapuurojen haihtuvia yhdisteitä tutkitaan HS-SPME-GC-MS-menetelmällä, jossa ensin uutetaan kaurapuurosta näyteputken ilmatilaan haihtuvat yhdisteet. Sen jälkeen yhdisteet syötetään kaasukromatografialaitteistoon, jonka läpi yhdisteet kulkevat kukin omaa tahtiaan. Yhdisteet voidaan erotella ja tunnistaa käyttäen apuna yhdisteen kokoa ja aikaa, joka yhdisteeltä kestää kulkea laitteiston läpi.

- Analysoiduista näytteistä löytyi monia kiinnostavia haihtuvia yhdisteitä, joiden tunnistaminen on vielä kesken. Tutkimus paljasti myös, että kuusi kuukautta säilytetyistä näytteistä löytyi enemmän haihtuvia yhdisteitä kuin nollanäytteistä. Yhdisteiden suurempaa lukumäärää selittää esimerkiksi säilytyksen aikana tapahtunut kauran sisältämien monityydyttymättömien rasvahappojen hajoaminen, selvittää Valtanen.

Toistaiseksi tuloksia on niukasti, mutta tulevaisuudessa niitä saadaan lisää.

- Tutkimus on yhä kesken, eikä kaikkia tähän mennessä saatuja tuloksia ole vielä ehditty käsitellä kokonaan. Odotan kuitenkin innolla lopullisia tuloksia, vastaavatko tekemäni mittaukset ja aistinvaraisen arvioinnin tulokset toisiaan, Valtanen sanoo toiveikkaana. - Kauran suosio on noussut viime vuosien aikana niin vauhdikkaasti, että on puhuttu jopa kaurabuumista. Markkinoille on tullut lyhyessä ajassa paljon uudenlaisia kauratuotteita. Tällainen tutkimus on tärkeää, jotta tulevaisuudessa kauraelintarvikkeita voidaan kehittää mahdollisimman tehokkaasti, Valtanen jatkaa.

New tools for studying Parkinson's disease

Parkinson's disease is an age-related and progressive neurodegenerative disorder for which there is currently no cure. Aggregation of a protein called alpha-synuclein is considered to have a central role in the pathogenesis of Parkinson's disease. Master's student Selma Salonen tested new research tools for studying alpha-synuclein aggregation in preclinical models of Parkinson's disease. In the future, these new tools could help to identify novel therapies for Parkinson's disease.

Selma Salonen

Supervisor: Docent Andrii Domanskyi

BIOTECHNOLOGY (TECH.)

Parkinson's disease (PD) is a complex neurological disease which is associated with the accumulation of misfolded and aggregated alpha-synuclein into intraneuronal inclusions. In her Master's thesis project at Orion, Selma Salonen validated specific genetic tools and antibodies in preclinical models of PD to establish robust research tools for studying alpha-synuclein aggregation. Based on her results, commercially available small interfering RNAs (siRNA) called Accell siRNAs and an aggregate-selective alpha-synuclein antibody BIIB054 proved to be promising tools for future studies.

The molecular mechanisms regulating pathological alpha-synuclein aggregation remain poorly understood. Genetic tools such as siRNAs are useful for studying biological functions of specific target genes and can provide insight into the mechanisms regulating alpha-synuclein aggregation.

- Since Accell siRNAs resulted in efficient silencing of two selected housekeeping genes in mouse primary cortical neurons, they are an attractive tool for studying alpha-synuclein aggregation in primary neurons. Accell siRNAs targeting genes that are relevant for alpha-synuclein aggregation will be tested in the future studies, Salonen explains.

Alpha-synuclein antibodies are being developed as potential drugs for PD but they are also essential research tools for analyzing alpha-synuclein aggregation in both animal and cellular models of PD. Salonen's results show that an aggregate-selective alpha-synuclein antibody BIIB054 originally developed for the passive immunotherapy of PD prominently detected alpha-synuclein fibrils in mouse brain sections. Thus, it could be utilized for analyzing alpha-synuclein aggregation particularly in mouse models of PD.

Novel therapies for Parkinson's disease?

The incidence of PD is expected to increase dramatically within a few decades and yet there are no therapies available that could stop or at least slow PD progression. Therefore, new research tools are urgently needed for studying PD-relevant targets and developing novel therapies for PD.

- Hopefully, these new tools will help to identify potential disease-modifying treatments for PD in the future, Salonen says.

Eurooppalaisen lainsäädännön muutos kiristää GenomEra-koronatestille asetettuja raportointi- ja suorituskykyvaatimuksia

In vitro -diagnostiikkaan tarkoitettujen lääkinnällisten laitteiden lainsäädäntö on muuttumassa Euroopan unionissa 26.5.2022. Biotekniikan DI-opiskelija Laura Forsman on arvioinut diplomityössään Abacus Diagnosticalla yrityksen tammikuussa lanseeraaman GenomEra-koronatestin päivitystarpeita uuden lainsäädännön asettamiin vaatimuksiin verraten. Testi on suunniteltu ja valmistettu alan viimeisin kehitys huomioiden, mutta sen päivittäminen uuden lainsäädännön mukaiseksi diagnostiikkatuotteeksi kestää vielä.

Laura Forsman

Ohjaaja: FT Elina Tuomola
BIOTEKNIikka DI

GenomEra-koronatesti (GenomEra® SARS-CoV-2 2.0 Assay Kit) on tarkoitettu SARS-CoV-2-viruksen havaitsemiseen nenänielusta otetusta näytteestä. Määrittäminen on ammattikäyttöön tarkoitettu pika-PCR-testi. Tuote on saatettu markkinoille nykyisen Euroopan lainsäädännön mukaisesti, joten se on päivitettävä ja rekisteröitävä vuoteen 2025 mennessä uuden IVD-asetuksen vaatimusten mukaisesti.

Osana päivitysprojektia tehdyn selvityksen perusteella testin tekninen dokumentaatio vastaa jo pääosin uuden lainsäädännön vaatimuksia. Kuitenkin osa uusista markkinavalvontaan ja suorituskykyyn liittyvistä suunnitelmista ja raporteista ovat vielä puutteellisia. ”Juuri lanseeratun GenomEra-koronatestin erinomainen suorituskyky on todistettu sekä tutkimuksilla että asiakaskäytössä ja sen paranneltu näytteenkäsittelymenetelmä on käyttäjälle hyvin turvallinen. Itse tuote ei tule muuttumaan, vaikka lainsäädännön asettamat vaatimukset sen dokumentaatiolle muuttuvat”, selvityksen tehnyt diplomityöntekijä Forsman tarkentaa.

Tuotetta arvioitiin projektissa GAP-analyysillä. Se on eräänlainen nykytilan kuvaus, jossa tuotteen dokumentaatiota verrataan uuden lainsäädännön vaatimuksiin. Näin pyritään tunnistamaan päivitystarpeet. Tuotetta arvioitiin työssä useiden eri osa-alueiden kautta. ”Diplomityöprojektissa olen oppinut kuinka säädelyä IVD-tuotteiden kehittäminen ja valmistaminen on, ja olen saanut valmiuksia huomioida lainsäädännön vaikutuksia koko tuotteen elinkaaren ajalta. IVD-asetuksen voimaantulon myötä myös DI-koulutuksessa voisi aiempaa laajemmin huomioida lainsäädännöllistä näkökulmaa”, Forsman pohtii.

Uusi toukokuussa voimaan astuva IVD-asetus asettaa aiempaa tarkempia vaatimuksia tuotetietojen dokumentoinnille ja keskittää valvontaa kansallisilta viranomaisilta yhteisiin eurooppalaisiin tietokantoihin. Tuotteet jaotellaan myös aiempaa laajemmin riskiluokkiin, jotka asettavat erilaisia vaatimuksia tuotteiden seurannan laajuudelle. IVD-asetus vaatii kaikilta diagnostiikka-alan toimijoilta suuria ponnistuksia kaikkien markkinoilla jo myytävien tuotteiden päivittämiseksi. ”Päivitystyö on kuitenkin ensiarvoisen tärkeää, koska uudella lainsäädännöllä pystytään turvaamaan potilaille entistä laadukkaammat ja turvallisemmat tuotteet ja oikea diagnoosi heti ensimmäisellä lääkärikäynnillä”, Forsman toteaa.

Automatoitavan näytteenkäsittelyn kehitys vieritestauslaitteeseen

Diplomityötään tekevä Pinja Lillrank on tutkinut erilaisia potilasnäytteiden käsittelyyn sopivia menetelmiä. Menetelmistä halutaan seuloa esiin ne, jotka sopivat parhaiten integroitaviksi täysin automaattiseen diagnostiikkalaitteeseen. Tutkimuksessa on saatu lupaavia tuloksia erilaisten tautia aiheuttavien mikro-organismien perimäaineksen nopeista eristysmenetelmistä.

Pinja Lillrank

Ohjaajat: FM Antti-Heikki Tapio, FT Piia von Lode
BIOTEKNIikka DI

Diplomityössään Abacus Diagnosticalle – joka nyt on osa Uniogenia – Pinja Lillrank on testannut erilaisten näytteenkäsittelymenetelmien soveltuvuutta helppoon ja nopeaan näytteiden esikäsittelyyn. Suunnitteilla on uusi diagnostinen laite, jossa kaikki vaiheet näytteen esikäsittelystä tulosten tulkintaan tapahtuvat automaattisesti laitteen sisällä.

- Nykyisellä testimenetelmällämme näytteen esikäsittely tapahtuu manuaalisesti, eli laborantti käsittelee näytteen ennen kuin se analysoidaan. Tässä on aina inhimillisen virheen riski. Automaatiolla sen sijaan voidaan entistä paremmin taata menetelmän toistettavuus ja luotettavuus sekä säästää arvokasta työaika, Lillrank sanoo.

Universaalin näytteenkäsittelymenetelmän löytäminen on tärkeää

Monen tyyppisiin klinisiin näytteisiin soveltuva näytteenkäsittely on tärkeä osa testauskokonaisuutta, sillä epäoptimaalisilla menetelmillä käsitellyt näytteet voivat tuottaa väärän testituloksen – ja siten väärän diagnoosin – tai sairas potilas voi jäädä vaille diagnoosia. Etenkin luotettavalla PCR (polymeraasiketjureaktio) nukleiinihappomonistusmenetelmällä analysoitava näyte pitää käsitellä tarkkaan, jotta reaktiota häiritseviä aineita ei pääse mukaan reaktioon. Taudinaiheuttajat on myös saatava hajotettua, jotta niiden sisällä oleva perimäaine voidaan analysoida.

- Erilaiset taudinaiheuttajat hajoavat erilaisilla menetelmillä, jotkut helpommin ja jotkut vaikeammin. Tässä suuri haaste on löytää yksi menetelmä, joka sopisi kaikenlaisten eri mikro-organismien hajottamiseen mahdollisimman nopeasti, Lillrank toteaa.

Esimerkiksi vaikeasti hajotettavien mikro-organismien hajotukseen voidaan valjastaa ulkoinen sähkömagneetti, joka pyörittää koeputkessa olevaa magneettia. Tämä saa putkessa olevat pienet helmipartikkelit liikkumaan voimakkaasti, mikä murskaa näytteessä olevat mikro-organismit. Näin analysoitava perimäaine saadaan esiin. Perimäaineen eristämiseen toimii esimerkiksi geelisuodatus. Geelin läpi saadaan perimäaine, ja häiritsevät aineet jäävät geeliin. Tämä on yksinkertainen menetelmä, sillä pesuvaiheita ei tarvita, kuten monessa muussa eristysmenetelmässä. Toisaalta perimäainetta ei saada konsentroitua. Tämä tarkoittaa sitä, että mikäli mikro-organismia – ja täten sen perimäainetta – on vain pieni määrä näytteessä, sitä ei välttämättä havaita.

Uusi diagnostinen laite suunnitellaan vieritestaukseen sopivaksi. Vieritestauksessa potilaan näyte analysoidaan heti näytteenoton jälkeen potilaan lähellä, esimerkiksi lääkärin vastaanotolla, jolloin mahdollinen diagnoosi saadaan heti. Näin voidaan taata potilaan nopea hoito sekä sen myötä nopea parantuminen.

Vastataudin aiheuttaja voidaan jatkossa tunnistaa helposti yksinkertaisella testillä

Mahasuolitulehdus eli gastroenteriitti on yksi maailmanlaajuisesti eniten sairastuvuutta ja kuolemantapauksia aiheuttavista tartuntataudeista. Tauti voi olla vakava ja vaatia sairaalahoitoa erityisesti pienillä lapsilla ja vanhuksilla, jolloin on tärkeää selvittää oireiden syy. Turkulaisen Abacus Diagnostica Oy:n testilaitteella taudinaiheuttaja voidaan selvittää nopeasti ja helposti.

Nea Johansson

Ohjaaja: DI Jiri Vainio

BIOTEKNIikka DI

Turun yliopistossa biotekniikkaa opiskeleva Nea Johansson on perehtynyt diplomityössään vatsatautia aiheuttavien noro-, adeno- ja rotavirusten tunnistukseen tarkoitetun testin kehittämiseen GenomEra[®]-testialustalle. GenomEra[®] CDX on nopeaan tartuntatautien diagnostiikkaan tarkoitettu laite, jonka toiminta perustuu polymeerasiketjureaktioon (PCR). Sen avulla voidaan vajaan tunnin kuluessa osoittaa, onko näytteessä ollut tutkittavan taudinaiheuttajan perimää.

- GenomEra pystyy mittaamaan samanaikaisesti viittä eriväristä leimaa, mikä mahdollistaa usean eri taudinaiheuttajan havaitsemisen kerralla. Tätä ominaisuutta kannattaa ehdottomasti hyödyntää myös vatsatautia aiheuttavia viruksia tunnistettaessa, kertoo Johansson.

Leimat on kiinnitetty noin 15 nukleotidin mittaiseen DNA-jaksoon, jonka emäsjärjestys vastaa testattavan taudinaiheuttajan perimää. Tämä koettimiksi kutsuttu leimasin lähettää signaalia PCR:n aikana, jos näytteessä on kyseistä taudinaiheuttajaa. Työn alkuvaiheessa Johansson käyttikin paljon aikaa sopivien koettimien ja monistettavan alueen rajaamiseen käytettyjen alukkeiden suunnitteluun.

- Sopivat alukkeet ja koettimet ovat toimivan ja herkän testin perusta. Ne tulee suunnitella vastaamaan mahdollisimman hyvin kaikkia väestössä kiertäviä viruskantoja, jottei osa tapauksista jää testiltä huomaamatta. Suunnittelussa käytetään apuna tietokantoihin tallennettuja sekvenssejä, Johansson avaa.

Johansson testasi lukuisia teoreettisesti toimivia alukepari-koetin-yhdistelmiä laboratoriossa, ja kaikille kolmelle virukselle löytyikin useita hyvin toimivia yhdistelmiä. Lopuksi parhaiten toimineet yhdistelmät valittiin yhteensovitettavaksi. Johanssonin mukaan edessä on vielä valittujen yhdistelmien pitoisuuksien optimointia, jonka jälkeen testi on valmis ensimmäisen koe-erän tuotantoon.

***In vitro* screening of bispecific antibody fragments against GABA-A receptors**

Blood-brain barrier prevents most large molecules from reaching the brain. Bispecific antibody fragments have been made to take advantage of the barrier's transportation systems and bind specifically to its targets within the brain. In this thesis study master's student Emil Koski has investigated the functionality of these antibody fragments and according to the preliminary results show specific binding to the intended targets.

Emil Koski

Supervisors: Ph.D. Angel Garcia de Lucas, Prof. Urpo Lamminmäki, Ph.D. Francisco Lopez-Picon

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Emil Koski studies bispecific antibody fragments, which bind to two different targets, and their binding properties. Antibodies are commonly used biomolecules in the field of biotechnology for their highly specific binding properties that can target almost any possible molecule, targets are referred to as antigens. Antibodies usually have a singular target but, in this study bispecific antibody fragments were created targeting two antigens, GABA-A and transferrin-receptors. Koski has confirmed with *in vitro* screening that antibody fragments bind to a part of GABA-A receptors as intended but is yet to observe binding to transferrin-receptors.

- These bispecific antibody fragments are being tested for a larger GABARPET-project in which the goal is to attach radionuclides to these antibodies to transport them through the blood-brain barrier by inducing transcytosis using transferrin receptors. Blood-brain barrier is notoriously picky about what molecules it lets pass through. Once inside the brain the antibodies would be free to bind to GABA-A receptors and deliver radionuclides specifically and precisely to the areas of interest and Positron Emission Tomography (PET) scan can image these areas. That is why confirming binding to both antigens are important for the larger ongoing project, Koski muses.

PET and antibodies

In his study Koski has used mammalian cells more accurately Expi293™ cells that are derived from human embryonic kidney cell line called HEK293, to produce his bispecific antibody fragments. These antibodies may be used in the future to detect abnormalities in the distribution of GABA-A receptors within the brain through PET.

- The final goal of GABARPET-project is to image the distribution of GABA A receptors within the brain and compare healthy and schizophrenic brains to shed light into the reasons behind schizophrenia using these antibody fragments. Bispecific antibody fragments could also be harnessed for other uses as the target can be anything and instead of radionuclides, they could deliver precision medicine for other neurodiseases, Koski explains animatedly.

For now, Koski is yet to finish all his tests with the antibodies, but he remains hopeful that he can finish his work soon enough.

A novel screening approach to isolate high-producing mammalian cell clones

Chinese hamster ovary (CHO) cells are widely utilized systems for the production of recombinant therapeutic proteins. However, cell productivity is often a limiting factor in large-scale manufacturing. As a part of a research group at the Biotechnology unit at University of Turku, M.Sc. student Viola Inkinen is developing a screening approach for the isolation of high-producing mammalian cell clones from those with lower levels of protein production.

Viola Inkinen

Supervisors: Ph.D. Tuomas Huovinen, M.Sc. Anastasiia Kushnarova-Vakal

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

In her thesis work Inkinen is developing an efficient screening approach aiming to isolate high-producing mammalian cell clones, more specifically the Chinese hamster ovary (CHO) cell clones. CHO cells are one of the well-established and widely utilized systems in the production of recombinant therapeutic proteins. In contrast to other expression host systems, CHO cells enable proper protein folding, post-translational modifications, and product assembly, which are important for complete biological activity. However, cell productivity is often a limiting factor in large-scale manufacturing. Thus, stable mammalian cell lines with a high expression yield are required for the industrial manufacture of recombinant proteins, including antibodies.

- Methods to develop stable mammalian cell lines are time-consuming, laborious, and expensive and they involve extensive screening of a large number of cell clones from heterogeneous populations, which is why new methods for screening are needed in this field, explains Inkinen.

Inkinen has so far discovered and enriched antibodies against CHO cells and a recombinant CD44 protein, which is an abundant cell surface receptor of CHO cells, from synthetic antibody phage display libraries using phage display technology. The pool of selected antibodies was screened in order to identify specific CHO cell binders. Although the work is still in progress, preliminary results show that selected binders were successfully able to bind to the recombinant CD44 protein in a simple immunoassay.

- Further optimization and characterization of the selected binders by sequencing and studying their analytical performance is still required before we can move on to cell-based detection methods, tells Inkinen.

If Inkinen manages to succeed in the development of CHO cell binders, the binders together with fluorescence-activated cell sorting (FACS), a powerful technique that allows rapid, high-throughput analysis of individual cells, could be used for identification of high-producing CHO cells in a more effective manner to increase the cell-specific productivity, and hopefully overcome the major problems of the production of a stable mammalian cell line.

Production of antibody library in mammalian cells to accelerate therapeutic antibodies development for rare Finnish gelsolin amyloidosis disease

Udayani has developed a straightforward method to obtain individual antibody variant production from mixtures of different antibody's DNA (library) in mammalian cells. The antibodies can be studied on magnetic beads, where multiple samples can be combined and analyzed simultaneously.

Juli Udayani

Supervisors: PhD. Tuomas Huovinen & MSc. Sami Oksanen

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Mammalian cells naturally produce mixture of antibodies when infected with mixtures of the different antibody's DNA (library), which is unsuitable to study individual variant. Udayani tested two methods to enable production of individual antibody variant from DNA library in mammalian cells. The first approach using CRISPR/Cas9 system indicated successful integration of single antibody's DNA into host cells, as positive cells were identified under fluorescence microscope. However, the CRISPR experiment was terminated because the cells viability dropped drastically after antibiotics selection. For future research, cell-sorting is required for the positive clones before proceeding.

The second approach was infecting one circular DNA (plasmid) encoding the antibody fragment into mammalian cells, which was verified to produce antibody that recognized the target. The use of only one plasmid simplified the protocol to produce genuine antibody fragments and it was enabled by the ribosomal skipping peptide sequences between heavy and light chain sequences of the antibody. The plasmid DNA was amplified from bacteria colony using rolling circle amplification (RCA) then the products were directly infected to mammalian cells in 96-well format. This eliminates the need of big bacteria cultures production for plasmid DNA amplification. Injection of direct RCA products into mammalian cells was confirmed to successfully express the antibodies.

Towards high-throughput assay

One of the most sensitive multiplexed assay platforms is based on magnetic beads analyzed in flow cytometry. The beads were colored with different ratio of dye so that each beads have unique 'dye address'. Individual beads can be coated with specific antibody from the library then combined into single tube for testing against target. This reduces the reagents used and allows simultaneous analysis of all samples in one run.

Antibody were produced as fusion with SpyCatcher3 protein to mediate strong and stable coupling to the beads. Mammalian cells are more capable to produce such complex molecules compared to bacteria, thus in favor of this purpose.

Udayani developed the methods using antibodies against gelsolin. Gelsolin is the abnormal peptide fragment that plays major role in the pathogenesis of Finnish gelsolin amyloidosis. "The findings from this master's thesis project could benefit the ongoing research on therapeutic antibodies against gelsolin, and possibly other targets in general, by speeding up the assay in a cost-efficient manner," Udayani added.

Activation-induced cytidine deaminase could be the key in expanding antibody libraries in mammalian cells

Mammalian cell display is becoming a more common tool in finding new therapeutic antibodies for drug development, but the drawback in its use is the difficulty of creating antibody libraries with high diversity. In her master's thesis, Saara Östman aims to unravel if the utilization of the enzyme activation-induced cytidine deaminase (AID) could assist in overcoming this obstacle.

Saara Östman

Supervisors: M.Sc. (Tech.) Olli Huhtinen & Ph.D. Antti Kulmala

BIOTECHNOLOGY (TECH.)

In her master's thesis, Saara Östman has studied the utilization of activation-induced cytidine deaminase (AID) to create more diversity to an antibody library in Chinese hamster ovary cells at Orion Oyj. AID is an enzyme used *in vivo* by B cells in the immune defence system to create variation to antibodies against a foreign target by mutating the original antibody gene. By introducing this enzyme to cells including genes of an antibody library, new antibody genes could be produced within the cells by mutations.

- Finding effective ways to expand the initial antibody library in mammalian cells and to create more diversity within it is important for increasing the probability of finding new candidate antibodies. This could also be a way to improve the existing ones with enhanced properties, Östman explains.

Studying the different characteristics of AID

Many aspects of AID activity are still not understood. To get a broad perspective of the workings of AID in this study, Östman combined different variations of the enzyme as well as target gene constructs to compare them. The addition of enhancers to the genes was one of the variables of interest. Some of the preliminary results have not been what they had hoped, but some have given valuable information going forward.

- We chose multiple enhancers to try improving the gene activity to induce more mutations, but the enhancers seemed to only act as a hindering factor in this respect. They may still have an impact on the mutations acquired which we will find out in later analysis. On the other hand, while studying AID activity we saw how it decreases drastically over time for each enzyme variant, which is very useful to know in designing future studies, Östman argues.

The next step in her project is to analyse the sequencing data to characterize the mutations acquired and finally possibly draw some conclusions about how to utilize the process in future projects.

I'm hopeful that we could see some trends in how the mutations are targeted as well as differences between the constructs and enzyme variants to better understand how to utilize AID in a controlled manner. This would be just the first step, but it could ultimately lead to a great improvement on how we discover new antibodies for drug development in the future, Östman concludes.

- **Battle against multi-drug resistant bacteria: how do we get new antibiotics?**

The antibiotics currently in clinical use are becoming unusable against multi-drug resistant bacteria. This highlights the need to obtain new antibiotics. Heli Tirkkonen has generated seven modified versions of the antibiotic 8-demethyl-tetracenomycin C by attaching different sugar units to it. Determination of the antimicrobial activity of the new compounds will lead to the identification of best lead molecules for development as antibiotics.

Heli Tirkkonen

Supervisor: Prof. Mikko Metsä-Ketelä
MOLEKYYLIBIOTIETEET, BIOKEMIA FM

When bacteria become resistant to one class of antibiotics, it's important to have another antibiotic with a different mechanism of action at hand. Tetracenomycins are antibiotics that were recently discovered to have a new mechanism of action – thus the compounds are perfect candidates as new antibiotics. Tetracenomycins bind to a novel region in the ribosome and thus inhibit protein synthesis in the pathogenic bacteria. In her master's thesis work, Heli Tirkkonen has generated seven versions of the antibiotic 8-demethyl-tetracenomycin C by attaching different sugar units to it.

“Attaching sugar units to an antibiotic improves its water solubility, thus the antibiotic will be easier to administer orally. Of course, the potency of the antibiotic can be affected too.”, Tirkkonen explains.

Preliminary results show that the attachment of the sugar unit has a radical effect on the potency of the antibiotic. Their mechanism of action was found out to be inhibition of protein translation, which is the same as for the original tetracenomycins.

“So far, the branched chain sugar units have had the best potency. However, it will require more compounds to be tested to make any definite claims. The research into tetracenomycins is far from done, but the initial results will guide further generation of better antibiotics, which can eventually become life-saving medication.”, Tirkkonen ponders.

Generation of more new antibiotics with *Streptomyces* soil bacteria

The advances in genetic engineering of the soil bacteria *Streptomyces* has enabled the rational design of new antibiotics. In her work, Tirkkonen generated the sugar units by utilizing BioBricks genetic elements, which have been recently been adapted for making new tetracenomycin analogues in *Streptomyces*.

“*Streptomyces* are excellent chemists, and their genetic pathways can be modified in a rational manner, so that the bacteria produce novel antibiotics with desired modifications. The only downside is that *Streptomyces* can be a bit picky about their living conditions in the laboratory, which can lead to unexpected differences in production.”, Tirkkonen points out.

In the future, Tirkkonen will continue her work with tetracenomycins to further solve the best possible sugar unit that can be attached for maximal antibiotic potency.

Luonnontuotteista johdettujen syöpälääkkeiden tuotanto on nyt entistä tehokkaampaa

Monia antibiootteja ja syöpälääkkeitä valmistetaan suljetuissa bioreaktoreissa Streptomyces-maaperäbakteerien avulla. Tuotteet eristetään kasvatusliuoksista, ja siksi tavoitteena on tuottaa varsinaista lääkettä mahdollisimman paljon ja epätoivottuja sivutuotteita mahdollisimman vähän. Tämän vuoksi tuotantomenetelmien kehittäminen ja tehostaminen on tärkeää.

Jenni Peuhkurinen

Ohjaajat: Prof. Mikko Metsä-Ketelä, FM Magdalena Niemczura
MOLEKYYLIBIOTIETEET, BIOKEMIA

Luonnontuotteet ja niiden johdannaiset ovat tärkeitä antibioottien ja syöpälääkkeiden lähteitä.

Turun yliopiston bioteknologian laitoksella toimiva luonnontuotteita tutkiva ABE-ryhmä on yhdessä viimeisimmistä tutkimuksistaan keskittynyt syöpäläkkeenä käytettävien antrasykliinien tuotantoon ja tuotannon optimoimiseen. Antrasykliinit tuotetaan yleensä pääasiallisesti *Streptomyces*-tuottokannan avulla, jolloin tuotanto kestää noin seitsemän vuorokautta. Antrasykliinien tuotantoon on kuitenkin viimein kehitetty menetelmä huomattavasti nopeammalle tuottokannalle, *Echerichia colille*, jonka avulla haluttu tuote voidaan saavuttaa jopa vuorokaudessa.

Koska *E. coli* ei pysty tuottamaan antrasykliinejä luonnollisesti, bakteerikantaan pitää yhdistää muilta organismeilta saatavia osia halutun lääkeaineen tuottamiseksi. Tuotantoreitti on jaettu lisäksi useampaan vaiheeseen, jotta mahdollisten sivutuotteiden syntymistä on helpompaa säädellä.

Tämän uuden menetelmän avulla varsinaista lääkettä voidaankin parhaassa tapauksessa tuottaa lähes ilman näitä epätoivottuja sivutuotteita. Menetelmän avulla antrasykliinien tuottaminen on tulevaisuudessa nopeampaa ja tarkempaa. Kehitettyä menetelmää voidaan parhaassa tapauksessa soveltaa myös muiden luonnontuotteiden ja niiden johdannaisten tuotannon tehostamiseen.

Turun yliopistossa muunnetaan valoenergiaa kemialliseksi energiaksi syanobakteerisolujen avulla

Syanobakteerit, eli sinilevät, kykenevät tuottamaan erilaisia hiilipohjaisia yhdisteitä suoraan hiilidioksidista pelkän valoenergian avulla. Tämän vuoksi syanobakteereita tutkitaan uuden sukupolven tuotto-organismeina uusiutuvien kemikaalien kuten biopolttoaineiden, liuottimien ja muovien valmistukseen. Erikoistyössään Samuli Pyytövaara rakentaa kehittyneempää laitteistoa syanobakteerien kasvatukseen ja analysointiin osana Turun yliopistolla tehtävää soveltavaa fotosynteesitutkimusta.

Samuli Pyytövaara

Ohjaajat: Apulaisprofessori Pauli Kallio, Jani Yli-Alho

MOLEKULAARINEN KASVIBIOLOGIA

Pyytövaaran kehittämä syanobakteereille soveltuva kasvatuslaitteisto pohjautuu kaupalliseen fotobioreaktorilaitteeseen ja aikaisemmin tutkijoiden tekemiin pumppu- ja ohjelmistopäivityksiin. Uudistuksen jälkeen tuottokasvatuksia voidaan ylläpitää yhtämittaisesti viikkoja tai jopa kuukausia siten, että kasvatusta kerätään ja korvataan jatkuvasti uudella kasvatusliuoksella. Laitteistoon kehitetään myös analyttistä mittaustanturia yhteistyössä iontau Oy:n kanssa, jolla voidaan seurata kasvatuksen aikana tuotettavien haihtuvien orgaanisten yhdisteiden tuottoa. Anturi on vielä kehitys- ja testausvaiheessa.

- Jotta vuosikymmenten fotosynteesitutkimusta voidaan joskus hyödyntää kaupallisissa sovelluksissa, vaatii biologinen tutkimus rinnalleen myös laitteistokehitystä. Rakennetun laitteiston avulla pystytään tutkimaan muokattuja solukantoja pitkiäkin ajanjaksoja, joka on edellytys kestävien ja tehokkaiden teollisten tuotokantojen kehityksessä, Pyytövaara kertoo.

Kasvatuslaitteisto on nyt valmis ensimmäisiin kokeisiin

Ensimmäiset testikasvatukset etyleeniä tuottavilla syanobakteereilla ovat juuri alkamassa.

- Etyleeni on haihtuva hiilivety, jota käytetään teollisuudessa pääosin muovin valmistukseen ja on yksi maailman eniten tuotetuimmista orgaanisista yhdisteistä. Prosessi vapauttaa valtavia määriä hiilidioksidia ilmakehään, sillä tällä hetkellä etyleeni tuotetaan fossiilista raaka-aineista. Tehokkaan biologisen etyleenintuottosysteemin kehittämisellä olisi siis merkittävä CO₂-päästöjä vähentävä vaikutus. Syanobakteerit eivät tuota etyleeniä luonnostaan, vaan kyse on synteettisen biologian työkalujen avulla muokatuista solukannoista, Pyytövaara toteaa.

Kehitettävä laitteisto mahdollistaa kasvatus- ja tuotto-olosuhteiden optimoimisen. Lisäksi se säästää työtunteja automatisoidun näytteenoton ja mittauksen kautta. Laitteisto soveltuu erilaisia kemikaaleja tuottavien syanobakteerikantojen tutkimiseen.

- Lähitulevaisuudessa laitteistoa käytetään myös muun muassa etanolia ja laktaattia tuottavien muokattujen syanobakteerikantojen tuottotehokkuuden arvioimiseen ja optimointiin, paljastaa Pyytövaara.

Opiskelija laajensi vasta-ainekirjaston kirjoja.

Laajat vasta-ainekirjastot sisältävät miljardeja erilaisia valmiiksi tehtyjä, valikoitavissa olevia vasta-aineita, jotka tunnistavat erilaisia kohteita esimerkiksi sairauksien merkkiaineita. Turun Yliopistossa diplomityönsä tehnyt Vesa-Matti Veräjänkorva, tuotti ja testasi uusia vasta-ainerakenteita erityisesti hapteenien tunnistusta varten.

Vesa-Matti Veräjänkorva

Ohjaajat: FT Eeva-Christine Brockmann & Professori, FT Urpo Lamminmäki
BIOTEKNIikka DI

Vesa-Matti Veräjänkorva on diplomityössään Turun Yliopistossa tuottanut aiempaa laajemman vasta-ainekirjaston, joka soveltuu erityisesti hapteneja tunnistavien vasta-aineiden kehittämiseen. Vasta-ainekirjasto pyrkii jäljittelemään luonnollisten vasta-aineiden laajaa kirjoa ja satunnaisuutta, mutta siihen on tuotu enemmän vaihtelua ja se huomioi pienikokoisten hapteenien sitoutumisen erityispiirteet. Kirjaston kevyen ketjun runko on tehty uudeltaisista, ennen käytännössä testaamattomista geeneistä, jonka Vesa-Matti yhdisti Turun Yliopistossa aiemmin tehdyn raskaan ketjun rungon kanssa.

Hapteneja sitovilla vasta-aineilla paljon sovelluksia

”Hapteenit ovat pienimolekyylisiä yhdisteitä, jotka itsessään eivät käynnistä elimistössä vasta-ainetuotantoa, ellei niitä ole sidottu suurempaan kantajamolekyyliin. Siitä syystä niille on vaikea kehittää hyviä vasta-aineita. Hapteenit voivat sitoutua tuotettuihin vasta-aineisiin ja näin niitä voidaan tunnistaa ja mitata biologisista näytteistä. Hapteneja sitovia vasta-aineita voi tyypillisesti hyödyntää lääkeaineiden tai toksiinien mittaamiseen verestä, elintarvikkeista tai muusta ympäristönäytteestä. Nikkeli-allergiaa aiheuttavat nikkeli-ionit ovat tyypillinen esimerkki mahdollisista hapteneista.” – Vesa-Matti selittää.

Hapteenien tunnistukseen vaaditaan vasta-aineilta taskumaista rakennetta. Vasta-ainekirjasto on sitä hyödyllisempi, mitä suurempi ja monipuolisempi se on. Työssä Vesa-Matti otti käyttöön uuden kevyen ketjun rungon ”KV2-28”, jonka valmistusta ei ollut vielä testattu käytännössä. Vesa-Matin rakentama vasta-ainekirjasto hyödyntää faaginäytötekniikkaa.

Miksi faaginäyttö?

Bakteriofaagit ovat viruksia, jotka infektoivat bakteereja ja huiputtaa niitä tuottamaan bakteriofaagin geenin mukaisia proteiineja. Vuonna 1985, Nobel palkittu, George Smith keksi hyödyntää kyseistä viruksen ominaisuutta tutkimuksessaan. Hän kehitti faaginäytöksi kutsutun tekniikan, jossa faagin DNA:ta muutetaan niin, että se kantaa proteiinimolekyylin geneettisen reseptin. Tämä todella yksinkertainen tekniikka avasi lukemattomia uusia tutkimusmahdollisuuksia laboratorioissa ympäri maailmaa. Se antoi tutkijoille tavan yhdistää geenit tuottamiinsa proteiineihin. Ja se käynnisti uuden tavan valikoida ja kehittää uusia vasta-aineita kokonaan ilman koe-eläimiä.

Historiankirjoista raivataan palstatilaa kuin puita padelhallin tieltä: Uusi mikroskooppi tähtää selvittämään toisen genomimme roolin umpilisäketulehduksessa

Umpilisäketulehdus on yleinen sairaus, jonka hoitokäytäntö on muuttumassa. Osa tapauksista voidaan hoitaa leikkauksen sijasta antibiooteilla, mutta vielä ei tiedetä, mikä aiheuttaa tulehduksen. Turun yliopistossa diplomityötä tekevän Tuomas Bormanin mukaan suoliston mikrobisto saattaa selittää tulehduksen vakavuuden.

Tuomas Borman

Ohjaaja: Apulaisprofessori Leo Lahti
BIOTEKNIikka DI

Diplomityökseen Borman kehittää data-analytiikan työkaluja, joilla voidaan tutkia ihmisen mikrobistoa. Mikrobisto sisältää paljon eri lajeja, jotka verkostomaisesti vaikuttavat toisiinsa. Mikrobiston monimutkaisen luonteen vuoksi sekvensoinnilla – eli bakteerien perimäaineksen määrittämisellä – ja data-analytiikalla on keskeinen rooli tutkimuksessa.

– Sekvensoinnin ja data-analytiikan muodostama kokonaisuutta voidaan pitää uudenaikaisena mikroskooppina, jolla voidaan tarkastella ihmisen suoliston mikrobistoa uudella tavalla. Ilman kehittyntä data-analytiikkaa suoliston mikrobistosta ei voisi tehdä samalla tavalla, kuten sitä tehdään nykyään, Borman täsmentää.

Ihmisen mikrobisto on yhdistetty useisiin eri tauteihin mutta myös ihmisen terveyteen. Mikrobistolla arvellaan olevan rooli niin suoliston tulehdussairauksissa kuin myös esimerkiksi immuunipuolustuksemme kehityksessä. Mikrobiston tutkimus on lisääntynyt viime vuosina muun muassa sen vuoksi, että sen tärkeyttä on alettu ymmärtämään.

– Ihmisessä elävien mikrobien kokonaisuutta on kuvattu toiseksi genomiksemme tai viimeiseksi elimeksemme, mikä kuvastaa sen tärkeyttä. Tutkimus on kuitenkin vasta alussa. Olemme vasta siirtymässä yhteyksien löytämisestä siihen, että me alamme ymmärtämään monimutkaisia mekanismeja mikrobiston ja ihmisen välillä, Borman kertoo.

Umpilisäkkeitä ei enää automaattisesti poisteta

Umpilisäketulehdus on yleinen sairaus, jonka vakiintuneena hoitokeinona on ollut umpilisäkkeen poisto. Aikaisemman turkulaistutkimuksen mukaan umpilisäketulehdus ei ole yksi ja sama sairaus.

– Tutkimus osoitti, että antibiootit voivat olla tehokas hoitokeino umpilisäketulehdukseen, mikä viittaa bakteeriperäiseen tulehdukseen. Tutkimus ei kuitenkaan vastannut siihen, miksi osa potilaista voidaan hoitaa antibiooteilla ja osa ei. Saamani tulokset viittaavat siihen, että osalla potilaista umpilisäke on tulehtunut laajemmin, jolloin antibiootit eivät auta, Borman valottaa.

Mikrobiston vaikutusta umpilisäketulehduksen muotoon ei ole ennen tutkittu näin laajasti. Bormanin tulokset luovat hyvän pohjan tutkimukselle.

– Työssä kehitetyt analyysityökalut ovat skaalautuvia ja toistettavia, jolloin niillä pystytään mahdollisimman automaattisesti, tehokkaasti ja helposti analysoimaan näytteitä myös muista potilaista, Borman kertoo.

Verisuonia 3D-biotulostuksen avulla

3D-biotulostuksen odotetaan tulevaisuudessa tuovan uusia mahdollisuuksia ihmiskudoksen laboratoriotutkimukseen, personoituihin syöpähoitoihin ja jopa ratkaisuja elinsiirrepulaan. Turkulaisessa biotulostusyhtiössä Brinterissä diplomityötään tekevä Akseli Vainio tutkii verisuonimallien luomista biotulostuksen keinoin.

Akseli Vainio

Ohjaaja: FT Antti Arjonen

BIOTEKNIikka DI

Vainio on onnistunut tulostamaan silikonimateriaalista sisäläpimitaltaan 0,6 mm kokoisia suonia. Tällä hetkellä hän tutkii kollageenin käyttöä suonten materiaalina.

Biotulostuksella tarkoitetaan 3D-tulostusta, jossa tulostettavien kappaleiden rakennusmateriaalina käytetään biomateriaaleja. Tyypillisesti biomateriaali puristetaan tulostusalustalle liikkuvasta neulasta tietokonemallilla määritettyyn muotoon ja sen jälkeen tulostetun materiaalin rakenne kovetetaan esimerkiksi lämpötilan ja pH:n vaihtelun tai UV-valon avulla.

Tulostettujen biomateriaalien joukkoon voidaan lisätä eläviä soluja, jolloin saadaan aikaan kolmiulotteinen soluviljelmä. Tulostetuissa kolmiulotteisissa soluviljelmissä solut ovat ympäristössä, joka on lähempänä niiden luonnollista elinympäristöä. Tästä syystä biotulostettuja malleja voitaisiin käyttää esimerkiksi syöpätutkimuksessa.

Tulevaisuudessa biotulostettuja varaosia?

- Biotulostuksen kunnianhimoisin tavoite olisi kokonaisten toimivien elinten tulostaminen. Se tulee vaatimaan monien erilaisten tekniikoiden ja materiaalien yhdistelyä. Varmaa on, että kaikki suuremmat biotulosteet tulevat tarvitsemaan yhtenä osanaan toimivan verisuonituksen, Vainio kertoo.

Silikonisuonten tulostuksessa Vainio on käyttänyt työkalua, joka luo suonirakenteen sisäkkäisten neulojen avulla. Näin hän on voinut tulostaa rakenteen, jossa silikonin sisällä on toista materiaalia. Silikonin kovetuksen jälkeen Vainio liuottaa sisämateriaalin pois ja saa aikaan suonimaisen putkirakenteen.

- Työkalu on osoittautunut toimivaksi silikonia käytettäessä. Tällä hetkellä tutkin sen käyttämistä kollageenin tulostuksessa. Kollageeni on yksi parhaista kasvu ympäristöistä ihmisluille, mutta sen tulostaminen on haastavaa heikon rakenteellisen kestävyuden takia. Vaihtoehtoina on joko sekoittaa kollageeni toiseen tukevampaan materiaaliin tai tulostaa sitä tukigeelin sisälle, Vainio pohtii tulevaa.

Food Development Student is Developing a Method for the Analysis of Vitamin E in Sea Buckthorn berries

Sea buckthorn is well known to contain several health-beneficial compounds, including vitamin E. Lumi Pajunen, who is doing her Master's Thesis in Technology at the University of Turku, has been developing a new analytical method for determining vitamin E of sea buckthorn berries. The results have shown that the method development will significantly improve the analysis compared to the old method.

Lumi Pajunen

Supervisors: Assistant Professor Maaria Kortensniemi, Doc. Jukka-Pekka Suomela
FOOD DEVELOPMENT

Pajunen is currently developing a method for determining the vitamin E in sea buckthorn berries. The intention is to upgrade the current high-pressure liquid chromatography (HPLC) method to an ultra-high pressure liquid chromatography (UHPLC) to improve vitamin E analytics. Both methods are liquid chromatography techniques used to separate different components in a mixture. However, UHPLC has significant advantages over traditional HPLC. UHPLC equipment reaches higher back pressures due to smaller particle sizes in the column, enabling faster analysis times and lower solvent consumption. Also, better analyte separation and more sensitive detection are possible with UHPLC.

Vitamin E analysis of sea buckthorn berries will be going to be significantly faster

Method development enabled reducing the analysis time to about ten minutes instead of the previous 25 minutes.

- The fact that analysis time reduced by more than half compared to the previous time is a massive improvement over the old method, Pajunen says excitedly.

The shorter analysis time also affects solvent consumption, significantly reducing it. Approximately 50 ml of solvent was used to analyze one sample with the old method. With the new method, solvent consumption was reduced to about 4 ml.

- This means that solvent consumption is reduced by up to 92 %. From a sustainability perspective, this is a significant step forward. Results are promising, Pajunen says.

Development work will continue before the actual analyzes

So far, optimizing the new UHPLC method has reached a point where only minor fine-tuning is required. However, inconveniences have been caused by the chromatographic separation of β - and γ -tocopherols. These two compounds have very close retention times, so obtaining clear and distinct peaks in the chromatogram has required adjustments. Also, some shifting between retention times has caused some troubles.

- Different forms of vitamin E must be clearly distinguished in the chromatogram to identify the compounds. Some research still needs to be done to achieve optimum separation and minimize peak shifting, Pajunen states.

However, the optimization is going reasonably well and should be completed in the coming weeks. After that, actual vitamin E analyzes can get started. Pajunen will be using the method to compare the vitamin E levels in sea buckthorn berries grown in different latitudes.

Melatonin biosynthesis in plants: Where, why and how?

In Arabidopsis plants, eight active acetyltransferase enzymes are associated with the chloroplast. Master's student Umanga Ranasinghe revealed that two of the genes encoding these enzymes were highly expressed in young leaves indicating that the enzymes may be important for the metabolism of developing plants. Other acetyltransferase genes exhibited low expression levels in all plant tissues. Knowing the detailed physiological functions of these enzymes adds another piece in the puzzle aiming at future development of better crop varieties.

Umanga Ranasinghe

Supervisors: Prof. Paula Mulo, M.Sc. Laura Laihonen

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Post translational modifications (PTMs) regulate cell function with diverse mechanisms. Acetylation is one of the main PTMs, and the family of eight N-acetyltransferases (GNATs) known to catalyze acetylation reactions in plant chloroplasts. Although previous studies have indicated an important role of specific GNATS on the regulation of photosynthetic reactions, the detailed physiological functions of these enzymes have remained enigmatic. Ranasinghe has shed light on the metabolic roles of the GNAT enzymes by revealing the expression pattern of the *GNAT* genes in different plant organs.

- It has previously identified that the two of the GNAT enzymes (GNAT1 and GNAT2) are involved in the biosynthesis of melatonin in plants. Nevertheless, we think that other six GNATs may be also contribute to this process. Since melatonin is a signaling molecule, which plays an essential role in various biological processes in plants, it is worth to find out the involvement of other six GNATs in melatonin biosynthesis, says Ranasinghe.

Initially, Ranasinghe used RT-qPCR analysis to study the expression of these eight genes in Arabidopsis stems, flowers, siliques, roots, and young and mature rosettes. Her results show that the *GNAT* genes exhibited low expression levels in all plant tissues, especially in roots. Expression of the *GNAT1* and *GNAT10* genes, however, was upregulated in young rosettes indicating that the enzymes may be important for the metabolism of the developing leaves. In contrast to previous studies, Ranasinghe did not find evidence for a high expression of the *GNAT1* gene in flowers, possibly due to the differences in growth conditions of plants.

- Additionally, we have performed gene expression analysis by RNA-Seq (RNA sequencing), and the data analysis is currently being performed. Now we have handful of data, therefore most promising results could be expected within few weeks. Next, we will do HPLC to measure the melatonin content in different plant tissues as a further step, Ranasinghe says.

Revelation of the different roles played by the GNAT enzymes will be important for the fundamental plant science as well as for agricultural and biotechnological applications. Moreover, the study has potential to increase our knowledge on the regulation of molecular mechanisms determining enzyme activity also in other organisms.

Uusia menetelmiä kasvien satoisuuden parantamiseksi

*Geenitekniikan menetelmillä on mahdollista muokata kasvien fotosynteesiä ja siten parantaa esimerkiksi hyötykasvien tuottavuutta. Turun yliopiston tutkimuksessa erikoistyötään tekevä Henna Yliluikki vertasi geeniteknisin menetelmin muokatun lituruohon (*Arabidopsis thaliana*) fotosynteesin tehokkuutta muokkaamattoman kasvin tehokkuuteen ja havaitsi, että muokattu kasvi pärjää paremmin tietyntyyppisissä kasvien kasvatusolosuhteissa.*

Henna Yliluikki

Ohjaaja: FM Tapio Lempiäinen, FT Sanna Gunell, Prof. Eevi Rintamäki
MOLEKULAARINEN KASVIBIOLOGIA

Fotosynteesissä auringon säteilyenergiaa muutetaan kemialliseksi energiaksi ja varastoidaan sokereina. Fotosynteesi koostuu monista peräkkäisistä toisistaan riippuvaisista reaktioista, jotka jaetaan valoenergiaa sitoviin valoreaktioihin ja hiilidioksidia sitoviin yhteytysreaktioihin. Reaktioiden säätely on tärkeää tehokkaan fotosynteesin ylläpitämiseksi ja valon aiheuttamien fotosynteettisten rakenteiden vaurioiden välttämiseksi. Luonnollisissa olosuhteissa valon laatu ja määrä muuttuvat vuorokauden mukaan, mutta myös päivän aikana lyhyellä aikavälillä pilvisyydestä riippuen. Kasvin on kyettävä vastaamaan dynaamisella säätelyllään näihin muutoksiin. Säätelyn tehokkuus on suoraan yhteydessä kasvien satoisuuteen.

Turun yliopiston tutkimuksessa on saatu viitteitä, että geeniteknisin menetelmin muokattu lituruoho (*Arabidopsis thaliana*) kasvaa paremmin kuin muokkaamaton kasvi vaihtelevassa valossa, joka mallintaa luonnollisia valo-olosuhteita. Muokattu linja yli-ilmentää NADPH-riippuvaista tioredoksiinireduktaasia (NTRC). NTRC on kasvien luontainen entsyymi, mutta ylituottolinjassa entsyymiä on kymmenkertaisesti enemmän kuin muokkaamattomassa kasvissa. Ylituotto mahdollistaa nopeamman fotosynteesin säätelyn, mikä parantaa kasvin sopeutumista vaihtuviin valo-olosuhteisiin.

– NTRC osallistuu useiden fotosynteesiin liittyvien entsyymien aktiivisuuden säätelyyn, mutta NTRC:n kyky säädellä muita entsyymeitä riippuu fotosynteesin valoreaktioiden aktiivisuudesta. NTRC välittää ”tietoa” fotosynteesin reaktioiden välillä, minkä vuoksi se vaikuttaa merkittävästi fotosynteesin toimintatehokkuuteen, toteaa Yliluikki.

Tutkimusryhmä, jossa Yliluikki tekee erikoistyötään, on kasvattanut ylituottolinjaa ja muokkaamatonta kasvia vaihtelevassa valossa sekä tasaisessa valaistuksessa. Tutkimusryhmä vertaili eri olosuhteissa kasvaneiden kasvien fotosynteettistä aktiivisuutta ja hiilidioksidin sidonnan tehokkuutta. Lisäksi ryhmä tutki, miten NTRC:n ylituotto vaikuttaa kasvin geeniekspressioon sekä fotosynteettisten proteiinien määriin. Ilmiöiden takana olevien molekulaaristen mekanismien selvittäminen on tärkeää fotosynteesin toiminnan ymmärtämiseksi.

YK:n kestävän kehityksen tavoitteisiin kuuluu tuplata maatalouden tuottavuus sekä saavuttaa ruokaturva vuoteen 2030 mennessä. Näiden saavuttamiseksi nykyisten viljelyalueiden tuottavuutta tulisi parantaa, mihin fotosynteesin tehostaminen geeniteknisin keinoin voisi olla avainasemassa.

Omenan kypsyysaste vaikuttaa sienitaudin etenemiseen omenassa varastoinnin aikana

Omenan mätälaike on omenoissa ilmenevä tauti, jota aiheuttavat Colletotrichum-suvun mikrosienet. Turun yliopiston molekulaarisen kasvibiologian maisteriopiskelija Telma Kuuslampi on seurannut omenan kypsyysasteen vaikutusta mätälaikeun etenemiseen omenassa varastosäilytyksen aikana yhteistyössä Luonnonvarakeskuksen kanssa. Alustavat tulokset osoittavat, että omenan kypsyysastetta mittaavista muuttujista sokeri- ja tärkkelyspitoisuus vaikuttavat taudin etenemiseen.

Telma Kuuslampi

Ohjaajat: MMT Tuuli Haikonen ja Prof. Eevi Rintamäki
MOLEKULAARINEN KASVIBIOLOGIA

Telma Kuuslampi tutkii kasvitauteja aiheuttavien *Colletotrichum*-mikrosienten tartuttamiskykyä ja niiden aiheuttaman mätälaikeutaudin etenemistä Suomessa viljeltävien eri omenalajikkeiden hedelmissä. *Colletotrichum* saa aikaan sadon laatutappioita ja ruokahävikkiä mädättämällä omenia varastoinnin ja kauppaketjun aikana. Jotta mätälaikeun aiheuttamaa hävikkiä voitaisiin pienentää tulevaisuudessa, on tärkeää tutkia, mitkä asiat vaikuttavat mätälaikeun ilmenemiseen ja etenemiseen omenoissa.

Mätälaikeun oireet eivät välttämättä ole nähtävissä ennen omenan varastointia, vaikka *Colletotrichum*-sieni olisi tartuttanut omenan. Mätälaikeutauti puhkeaa omenan kypsymisen myötä varastossa. Kuuslampi havaitsi tutkimuksessa, että omenan varastokypsymiseen liitettävistä tekijöistä omenan tärkkelyksen väheneminen ja omenan sokeri- ja tärkkelyspitoisuuden muutokset vaikuttivat mätälaikeun kehittymiseen ja taudin etenemiseen omenan hedelmässä.

Omenalajikkeiden taudinsietokyky mätälaikeua vastaan

Omenalajikkeiden välillä voi esiintyä eroja taudinsietokyvyssä. Kuuslampi selvitti itiötartutusten avulla, miten mätälaikeusietokyky vaihtelee eri Suomessa kasvatettavien lajikkeiden välillä.

- Koska tauteja aiheuttavat sienet muodostavat helposti resistenssin sienitautien torjunta-aineille, on tärkeää löytää ja jalostaa taudinkestäviä omenalajikkeita, Kuuslampi toteaa.

Tämänhetkisten tulosten perusteella kuitenkin vaikuttaa siltä, että *Colletotrichum*-tartuntoja ei kovinkaan tehokkaasti tule poimintakypsään omena pelkkien itiöiden avulla, vaan taudinaiheuttaja tarvitsee haavoituksen ainakin tässä kypsyysvaiheessa.

- Voi olla, että mätälaikeua tartuttavat sienet leviävät tehokkaammin kehittyviin, mutta eivät poimintakypsiin hedelmiin itiötartutuksen avulla, eikä tutkimusasetelma tämän takia sopinut hyvin lajike-erojen havaitsemiseen, hän kommentoi.

Kuuslammen mielestä olisi hyvä tehdä jatkotutkimusta mätälaikeutaudista omenoissa haavatartutuksilla, joissa sienikasvustoa lisätään haavoitettuun omena, ja selvittää havaitaanko tällä tutkimusmenetelmällä eroja omenalajikkeiden taudinsietokyvyssä mätälaikeua vastaan.

A young scientist has identified new bacterial toxins

As DNA sequencing methods have become more advanced, metagenomics has revolutionised the ways to study microbes. Abdula Habib, a young scientist from the University of Turku has identified and characterized two new bacterial ADP-ribosyltransferase enzymes.

Abdula Habib

Supervisors: PhD. Arto Pulliainen, MSc. Moona Sakari

MOLECULAR BIOSCIENCES, BIOCHEMISTRY

ADP-ribosyltransferases (ART) are enzymes also including many notorious bacterial toxins, such as the cholera toxin of *Vibrio cholerae*, the pertussis toxin of *Bordetella pertussis* and the diphtheria toxin of *Corynebacterium diphtheriae*. One common disease-inducing feature of these enzymes is that they attach a special sugar molecule called adenosine diphosphate ribose (ADPr) to the proteins of the host cell once they enter it. Habib has succeeded in purifying new enzymes from *Yersinia* and *Bartonella* bacteria.

- These enzymes are called bacterial ART toxins. They consist of two parts, A and B that communicate together. The B part, also called the B subunit mediates cell entry whereas the A subunit is responsible for adding ADPr to its target, thus damaging the host cell, Habib clarifies.

How are new enzymes found?

Our research group utilizes shotgun metagenomic sequence information. Shotgun metagenomics is the study of all genetic material recovered from a sample, for example fecal sample. It is a very powerful tool since it not only allows us to intensively study microbial communities but also study microbes without the need to culture them in the laboratory.

- After the shotgun metagenomes have been assembled, we search for new ARTs by identifying areas in the genomes that are relatively similar to those of known ARTs, Habib adds.

So far, the enzymes we have found and purified have robust auto-ADP-ribosylating activity meaning that they are *bona fide* bacterial ARTs. Auto-ADP-ribosylation activity is a promising result because it also means that these enzymes most likely have a host cell target protein. Indeed, both enzymes display ADP-ribosylation activity towards mammalian proteins. One of the next steps is trying to identify the proteins these enzymes ADP-ribosylate with mass spectrometry.

Why study bacterial toxins?

Antibiotic resistance threatens treatment of ever-increasing range of infections. Antibiotics also damage the health-promoting microbiota. Bacterial toxins are promising targets to develop new pharmaceuticals that specifically disarm the pathogen.

- Identification of new bacterial toxins has both basic and translational importance. It would broaden our understanding of how pathogens interact with their hosts and also prepares us in the event that they might infect us in the future, Habib says.

Stressiproteiinista avaimia evoluution ymmärtämiseen?

*Stressimolekyylinä esiintyvän bakteerin pintaproteiinin BilRI:n tutkiminen voi auttaa ymmärtämään organismien selviytymistä epäsuotuisissa olosuhteissa. Bakteripatogeenin stressiproteiinit saattavat myös parantaa bakteerien kykyä siirtyä isännästä toiseen. Turun yliopistossa erikoistytään tekemä Wille-Veikko Poikonen selvittää BilRI:n roolia *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* -bakteereilla. Kyseinen bakteeri on ihmisillä parodontiittia, hampaan tukikudoksen sairautta aiheuttava patogeeni.*

Wille-Veikko Poikonen

Ohjaajat: Dos. Riikka Ihalin & FT. Anu Salminen

MOLEKULAARINEN SOLUBIOLOGIA

Poikonen tutkii BilRI-pintaproteiinin ilmentymistä *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* -lajin bakteereilla. Tutkimuksessa käytetään myös uusia työkaluja bakteerin yksisoluanalytiikkaa varten hyödyntämällä geenien muokkausta ja siirtoa. Proteiinin tutkiminen yksittäisissä bakteerisoluuissa onnistuu liittämällä bakteerin genomiin geeni, joka sisältää kuuden histidiinin pituisen "hännän". Tämä häntä voidaan leimata fluoresoivalla yhdisteellä, mitä voidaan hyödyntää esimerkiksi mikroskopiassa. BilRI:n on havaittu toimivan stressiproteiinina, jota bakteeri ilmentää erityisesti optimaalista kasvulämpötilaa alhaisemmissa lämpötiloissa.

- Geneettisesti muokatut bakteerit käsitellään fluoresoivalla leimalla, joka värjää pitkiä histidiiniketjuja sisältävät pintaproteiinit bakteeripopulaatiossa. Värjäyksen jälkeen virtaussytometrillä voidaan esimerkiksi verrata kuinka iso osa bakteereista populaatiossa tuottavat BilRI:ä. Virtaussytometrin lisäksi leimattuja bakteereita voidaan tutkia fluoresenssimikroskopialla. Aikaisemmin käytetyt menetelmät ovat mahdollistaneet BilRI:n ilmenemisen tutkimisen populaatiotasolla, nyt saamme tietoa yksittäisistä soluista, Poikonen kertoo.

Ongelmanratkaisua

Biokemistin tehtäviin kuuluu paljon ongelmanratkaisua ja sopivien tekniikoiden ja työkalujen kehittämistä. Työ on usein monivaiheista ja aikaa vievää. Tutkimuksen haasteena on tiedon ja tekniikoiden puute, mikä tarkoittaa, että usein pitää itse kehittää tekniikoita, joilla tutkia uusia ilmiöitä. Isoa osaa näistä tekniikoista voidaan kuitenkin käyttää myös muussa solubiologian tutkimuksessa, etenkin yksisoluanalytiikassa. Yksisoluanalytiikassa tutkitaan yksittäistä solua populaation tutkimisen sijaan.

Ensin *A. actinomycetemcomitansia* kasvatetaan neljä vuorokautta, jotta saadaan tarpeeksi soluja. Sen jälkeen niitä kasvatetaan biofilmikasvatuksessa toiset neljä vuorokautta, jotta päästään värjäys ja analyysivaiheeseen. Tärkeä osa tällaista tutkimusta on uusien menetelmien kehittäminen ja kokeileminen. Toimivia tekniikoita ja työkaluja voidaan käyttää myös muissa tutkimuksissa, Poikonen selittää.

- **ATP-pohjainen menetelmä mittaa veden mikrobiologisen laadun aiempaa nopeammin ja luotettavammin**

Diplomityöntekijä Jutta Lindfors tutkii Turun Vesihuollolla uutta laadunvarmistusmenetelmää, jolla voidaan määrittää veden mikrobiologinen laatu jopa 300 kertaa nopeammin sekä selkeästi luotettavammin kuin aiemmin. Uuden menetelmän avulla tulos verkostoveden laadun mahdollisista muutoksista saadaan käytännössä reaaliajassa. Työn aikana hän kartoitti verkoston ATP-pitoisuuksia sekä veden mikrobiologista laatua.

Jutta Lindfors

Ohjaaja: FM Silja Tiitta

BIOTEKNIikka DI

Lindfors tutki työssään Adenosiinitrifosfaattiin eli ATP:hen perustuvan menetelmän mahdollisuuksia toimia uutena työkaluna juomaveden laadunvalvonnassa. Tätä varten hän kartoitti verkoston ATP-pitoisuuksia sekä tutki veden mikrobiologista laatua. Tulokset menetelmän toimivuudesta olivat lupaavia. Seuraava askel olisikin ottaa määrittäminen mukaan saneerauskohteisiin. Ihannetilanteessa muutokset veden ATP-pitoisuuksissa osoittaisivat heti veden mikrobiologisen laadun muutoksista.

ATP on kaikkien elävien solujen aineenvaihdunnassa esiintyvä yhdiste, jota voidaan mitata valoa muodostavan entsyymireaktion avulla. Koska kaikki mikrobit sisältävät ATP:tä, voidaan sen pitoisuutta seuraamalla mitata verkoston mikrobiologista aktiivisuutta. Mittaus huomioikin verkoston koko mikrobiston toisin kuin tällä hetkellä käytössä olevat, viljelyyn perustuvat menetelmät, joilla tuloksien saamiseen menee kolme päivää.

Tarve uudelle nopealle työkalulle

ATP-menetelmän laadunvalvontaan soveltuvuuden tutkiminen onkin erittäin ajankohtaista, sillä lähitulevaisuudessa Suomessa tullaan tekemään mittavia saneeraustöitä vanhan vesiverkoston uudistamiseksi.

”Saneeraukset ovat juomaveden laadun kannalta ongelmallisia, sillä ne saattavat aiheuttaa muun muassa putkiston seinässä elävän mikrobiston irtoamista veteen. Tämä tietenkin heikentää veden laatua ja aiheuttaa pahimmassa tapauksessa hankalia ongelmatilanteita”, Lindfors selittää.

Myös kuluttajille uudesta menetelmästä olisi selvää etua. Kontaminaation tapahtuessa tieto veden laadusta saadaan huomattavasti entistä nopeammin, jolloin haitat voidaan rajata pienemmälle alueelle ja altistuneiden ihmisten määrää pienentyy.

Komplementtisysteemi - avain sisäilmavaurioille altistuneiden henkilöiden diagnosointiin?

Ihmiset viettävät ajastaan noin 90 % sisätiloissa, joten sisäilman laadulla on suuri vaikutus terveyteen. Sisätilojen huono ilmanlaatu on maailmanlaajuisesti iso ongelma. Altistumisen aiheuttamien oireiden kirjo on laaja ja diagnosointi on vaikeaa. Virtanen tutkii erikoistyössään voiko ihmisen seerumista löytyvän komplementtisysteemin aktiivisuusmittausten avulla diagnosoida sisäilmaongelmille altistuneiden potilaiden tulehdustiloja.

Julia Virtanen

Ohjaaja: FT Janne Atosuo
SOLUBIOLOGIA

Merkittävä osa väestöstä kärsii sisäilmaongelmista erityisesti työpaikoilla. Ongelmia aiheuttavat muun muassa mikrobit, rakennusmateriaaleista vapautuvat kemikaalit ja hiilimonoksidi. Sisäilmaongelmat aiheuttavat esimerkiksi väsymystä, päänsärkyä ja matalan tason tulehdustilaa. Tällä hetkellä tutkitaan voiko vauriot aiheuttaa myös syöpää.

- Sisäilmaongelmat aiheuttavat niin terveydellisiä kuin taloudellisia haittoja, joten sisäilmavaurioille altistuneiden diagnosoinnin kehittäminen on ensiarvoisen tärkeää. Tämänhetkinen tutkimus on tuottanut tulosta, sillä ihmisen seerumista löytyvä komplementtisysteemi voisi olla avain mikrobivaurioiden aiheuttamien tulehdustilojen diagnosoinnissa, Virtanen toteaa.

Kliininen tutkimusyksikkö TROSSI on mahdollistanut komplementtisysteemin tutkimisen Turun yliopistossa. Tutkimuksissa on käytetty potilasseeruminäytteitä, jotka on kerätty vapaaehtoisilta henkilöiltä sekä vaurio- että referenssirakennuksista.

Komplementtisysteemitestit antavat tuloksen muutamassa tunnissa

Komplementti on osa ihmisen immuunipuolustusta, ja on merkittävä tekijä tulehdustilan synnyssä ja säätelyssä sekä patogeenien tappamisessa. Rakennuksen vauriomikrobit (homeet, bakteerit, hiivat) ovat yleisimpiä sisäilmaongelmien aiheuttajia. Mikrobi-infektio ja altistuminen aktivoivat komplementtisysteemin kolmen reaktiotien kautta. Niiden kinesiikkaa voidaan seurata reaaliajassa valoa tuottavan bakteerikannan avulla. Valotuotanto heikkenee samassa suhteessa kuin komplementti tappaa mikrobeja.

- Menetelmä on käytännöllinen, eikä näytteiden tutkiminen vie päiväkausia, vaan tulokset saadaan jo saman päivän aikana. Toki testin optimointi vie oman aikansa, mutta oman tutkimuksen kohdalla optimaaliset olosuhteet löytyivät muutamassa päivässä, Virtanen kertoo.

Potilasnäytteiden tuloksissa havaittiin yksilöiden välillä suuria eroavaisuuksia komplementin aktivaatiossa. Potilastutkimusten lisäksi erikoistyössä tutkittiin miten lämpötilan muutokset ja kalsiumpitoisuus vaikuttivat komplementin toimintaan. Kuumeen huomattiin nostavan komplementin aktiivisuutta ja näin ollen mikrobien tappo tapahtui nopeammin.

A rapid test for quick diagnosis of a heart attack

Rapid lateral flow tests could be used for the diagnosis of a heart attack. It has been thought that proteins IgM and C1q in human blood could cause false test results and prevent a patient from getting an accurate diagnosis. A master's student Sonja Koskela has investigated this phenomenon at the University of Turku and comprehensively shown that the two proteins mentioned above do not affect the test result of a lateral flow test designed for the detection of a heart attack.

Sonja Koskela

Supervisor: Ph.D. Iida Martiskainen

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

According to previous test results, human proteins IgM and C1q could cause a matrix effect in diagnostic tests. The matrix effect is a phenomenon in which different components naturally found for example in a blood sample could interact with the molecule of interest that a diagnostic test was designed to detect. Koskela has investigated the effect of IgM and C1q on a lateral flow test which can be used to detect cardiac troponin I (cTnI) in a blood sample of a patient. The increase of cTnI in blood indicates damage to the heart and ultimately, a heart attack. Koskela has shown that IgM and C1q do not affect the test result of a cTnI lateral flow test. However, some components in a human plasma sample seem to affect the test results.

- It would be important to reduce the matrix effect in a cTnI lateral flow test to develop a test that could detect even the smallest amounts of cTnI in a patient sample since an early diagnosis of a heart attack would increase the chance of survival. There is an urgent need for a cTnI lateral flow test since heart attack is a major cause of death globally, Koskela points out.

Lateral flow tests for the detection of a heart attack can be very sensitive

Koskela uses a lateral flow test to detect cTnI in human plasma samples. Rapid covid antigen test is an example of a lateral flow test. The test strips absorb a sample that is in a liquid form. The sample travels through the test strip that contains two or more lines, usually a test and a control line, printed on a porous material. The test line consists of antibodies that bind cTnI. The control line binds antibodies that are attached to the surface of small particles, up-converting nanoparticles (UCNP). UCNPs absorb low energy photons and release photons with higher energy, which can be measured with a portable reader. The UCNPs that Koskela uses have been coated with antibodies that bind the cTnI.

- The more cTnI there is in the plasma sample, the higher the signals measured are as multiple UCNPs bind the cTnI, states Koskela.

The cTnI LFA has a lot of potential to become a test that can accurately detect small amounts of cTnI in the blood samples of patients. However, the matrix effect is still a challenge as Koskela has shown that the two potential causes, IgM and C1q, are not the root of the problem.

- Hopefully the cause of the matrix effect can be solved in the future. I am looking forward to the forthcoming studies, Koskela says.

Uudenlainen lähestymistapa tautimäärityksiin

Turun yliopistolla tehdyssä tutkimuksessa verinäytteiden analyysiin käytettävään testitikkuihin muokattiin tiheämpi tautia tunnistava pinta kemiallisen muokkauksen avulla. Jatkossa vielä nopeammalla ja virheettömämmällä tautimäärityksellä potilas voisi saada diagnoosin jo lääkärin vastaanotolla.

Joonatan Mäkelä

Ohjaajat: DI Saara Kuusinen ja Prof. Tero Soukka

BIOTEKNIikka DI

Turun yliopistossa kehitteillä oleva uudenlainen määrittämissuunnitelma pystyy tunnistamaan pieniä pitoisuuksia tunnettua sairauteen viittaavaa ainetta alle vartissa. Määrittäminen tehtiin muovisella, noin puolikkaan savukkeeseen suodattimen kokoisella tangolla, jonka pääty toimii sitojapintana mitattavalle yhdisteelle.

- Tutkimuksessa tangon pintaa muokattiin kemiallisesti, jotta mitattavalle yhdisteelle olisi enemmän kiinnittymispaikkoja ja muut kuin mitattavat aineet sitoutuisivat pintaan vähemmän. Jotta tulos olisi oikea ja se saataisiin nopeasti, on ensiarvoisen tärkeää, että kiinnittymispaikat olisivat tiheässä ja sitoutuminen spesifistä mitattavalle aineelle, Mäkelä kertoo.

Yksi testien nopeutta rajoittava tekijä on mitattavan yhdisteen hidas liikkuminen lähelle pintaa, johon se sitoutuu. Näytteen analysoinnin alkaessa mitattavaa yhdistettä on tasaisesti koko näytteessä. Sitoutuminen syö sitojapinnan lähellä olevaa yhdistettä ja reaktio hidastuu. Syntyy tarve sekoittaa näytettä niin, että mitattavaa yhdistettä olisi taas sitojapinnan läheisyydessä.

Perinteisemmissä määrittämissuunnitelmissä testiastiaa ravistellaan virtauksen aikaansaamiseksi. Uudenlaisen sekoitusmenetelmän tehokkuus perustuu testitikkun nopeaan pyörykseen näytteessä. Tällöin näytteeseen syntyy kova sitojapintaan kohdistuva virtaus.

- Arjessa ravistelun tehokkuutta voisi kuvata kahvin sekoittamisella kuppia heiluttamalla. Kahvi hölskyy ympäri mukin reunoja, mutta kahvi sekoittuu varsin hitaasti. Uudessa menetelmässä savukefilterin muotoinen testitikki pyörii akselinsa ympäri yli 30 kertaa sekunnissa, josta syntyy huomattava pyörre, Mäkelä toteaa.

Menetelmä vaatii vielä kehitystyötä

Täydellinen menetelmä ei ole. Tutkimuksessa ei olla onnistuttu välttämään verinäytteiden sisältämien lukuisien eri molekyylien häiritsevältä vaikutukselta. Lisäksi käsityönä valmistettujen testitikkujen välillä on mittausherkkyyttä heikentävää hajontaa. Nämä ongelmat ratkaistua menetelmällä voisi tunnistaa sairauksia entistä varhaisemmassa vaiheessa ja testituloksen voisi saada jo muutamissa minuuteissa verinäytteen käsittelystä.

Sikiöseulonnan luotettavuutta voidaan parantaa optimoimalla määritysmenetelmän entsyymien toimintaa

Vuosittain syntyy tuhansia lapsia, joilla todetaan kromosomaalinen poikkeavuus. Yleisin kromosomaalinen häiriö on yhden kromosomin ylimäärä eli trisomia, joka tunnetaan yleisemmin nimellä Downin syndrooma. Prenataaliseulontatestien avulla sikiön kromosomaaliset poikkeavuudet voidaan havaita heti raskauden alkuvaiheessa, mikä mahdollistaa oikean hoitosuunnitelman tekemisen jo raskausaikana. Tutkijat pyrkivät kehittämään prenataaliseulontamenetelmiä jatkuvasti menetelmän tarkkuuden ja luotettavuuden parantamiseksi. Maisteritutkintoaan suorittanut Fanny Korpela todisti mahdollisuuden laitteen toiminnan parantamiseen optimoimalla siinä käytettävien entsyymien toimintaa.

Fanny Korpela

Ohjaaja: Ph.D. Marko Tammenkoski

BIOKEMIA

Korpelan suorittama tutkimus osoitti, että optimoimalla biokemiallisia reaktioita pystytään parantamaan tutkimuskohteena olevan määritysmenetelmän suorituskykyä, ja siten saatujen tulosten luotettavuutta. Korpela keskittyi tutkimuksessaan ligaasin, detergentin, hybridisaatiopuskurin sekä leimauspuskurin toiminnan optimointiin.

- Entsyymit toimivat parhaiten niille optimaalisissa olosuhteissa. Ligaasin kohdalla tavoittelimme sille optimaalista happamuuden tasoa, jolla se pystyy toimimaan ihanteellisimmin, Korpela toteaa.

Saadut tulokset osoittivat, että pH-arvo on hyvin tärkeä ligaasin tasaisen aktiivisuuden takaamiseksi.

Aikaisemmin tehtyjen tutkimusten perusteella oli tiedossa, että määritysmenetelmässä käytettävän detergentin pH on kriittisessä roolissa menetelmän optimaalisen toimivuuden kannalta. Nykyisin käytössä olevan detergentin pH on riippuvainen lämpötilasta, mikä luo haasteita pH:n stabilointiin.

- Testasimme reaktioon vaihtoehtoisia detergentejä. Tämän tavoitteena oli löytää toimiva ja turvallinen detergentti, jonka pH olisi helpompi stabiloida. Tutkimuksen perusteella testattujen vaihtoehtoisten detergenttien pH oli myös riippuvainen lämpötilasta. Alustavien tutkimusten perusteella, testatut detergentit kuitenkin toimivat määrittäksessä jopa paremmin kuin nykyisin käytössä oleva detergentti, Korpela toteaa.

Hybridisaatiopuskuri sisältää detergenttiä. Aikaisemmin suoritettujen tutkimusten perusteella nykyinen detergentti voi muodostaa sakkaa pakastus-sulatus -syklin yhteydessä, minkä vuoksi se halutaan korvata. Vaihtoehtoisten detergenttien pakastus-sulatus -syklin jälkeen Korpela ei havainnut sakan muodostumista. Tämän lisäksi vaihtoehtoinen detergentti toimi määrittäksessä normaalisti. Testasimme kahta eri vaihtoehtoista detergenttiä, joista toinen toimi paremmin määrittäksessä käytettävänä detergenttinä ja toinen hybridisaatiopuskurissa, Korpela kertoo saamistaan tuloksista.

Määrittäksessä käyttää leimauspuskuria kromosomien optimaalisten leimausolosuhteiden luomiseksi. Aikaisemmat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että leimauspuskuri ei luo optimaalisia olosuhteita kaikkien kromosomien leimaukseen.

Ongelman korjaamiseksi Korpela testasi leimauspuskurin suolakoostumuksen muuttamista.

- Suolakoostumuksen muutoksen havaittiin parantavan leiman spesifistä sitoutumista, jolloin määrittämenetelmällä voidaan havaita luotettavammin kromosomaalisia häiriöitä, Korpela pohtii.

Korpela suoritti edellä mainitut testit käyttämällä sikiöseulontaan tarkoitettua määrittämenetelmää.

Tutkimustyötä jatkettava

Saadut tutkimustulokset vaikuttavat lupaavilta ja niiden perusteella on mahdollista, että määrittämenetelmän suorituskykyä sekä luotettavuutta voidaan parantaa. Lisää tutkimusta sekä testausta kuitenkin vaaditaan saatujen tulosten varmistamiseksi.

Hyödyntämällä saatuja ja tulevia tuloksia, uskon, että seulontamenetelmä saadaan entistä tarkemmaksi. Tämä mahdollistaa useamman kromosomaalisen poikkeavuuden kiinni jäämisen jo raskausaikana ja mahdollistaa oikean hoitosuunnitelman tekemisen varhaisessa vaiheessa, Korpela sanoo.

- **Erikoistyöopiskelija tutkii raaka-aineiden lisäpuhdistusten vaikutusta raskaudenseulontamenetelmän toimivuuteen**

Perkin Elmerin kehittämän entsyymaattisiin reaktioihin perustuvan noninvasiivisen raskaudenseulontamenetelmän toimivuuteen vaikuttaa merkittävästi reaktioissa käytettävien raaka-aineiden puhtaus. Erikoistyöopiskelija Sanni Sihvonen on tutkinut menetelmässä keskeisten oligonukleotidi-raaka-aineiden puhtauden ja parannetun puhtausasteen vaikuttavuutta. Alustavien tulosten perusteella menetelmän toiminnallisuuteen voidaan vaikuttaa, ja siten mahdollisesti lisätä menetelmän käyttöä.

Sanni Sihvonen

Ohjaaja: FT Thomas Nyholm

BIOKEMIA

Perkin Elmerin kehittämässä noninvasiivisessa raskaudenseulontamenetelmässä hyödynnetään entsyymaattisia reaktioita sikiön kromosomaalisten sairauksien tutkimiseen. Reaktioissa keskeisiä raaka-aineita ovat erilaiset oligonukleotidit, joiden laatua Sihvonen on erikoistyössään optimoinut ja hyödyntänyt optimoinnista kerättyä tietoa menetelmän toiminnallisuuden parantamisyrittämyksiin.

Sihvonen tutkii oligonukleotideille kehitetyn preparatiivisen HPLC-puhdistusmenetelmän toimivuutta, sekä erilaisten yksittäisten epäpuhtauksien ja kokonaispuhtausasteen vaikutusta oligonukleotidien toiminnallisuuteen. Toiminnallisuustestauksista kerätyn tiedon perusteella pyritään löytämään puhdistusmenetelmä, jonka avulla voidaan samalla pienentää huonosti toimivista oligonukleotideista johtuvia raaka-ainehyökkäyksiä ja parantaa seulontamenetelmän toiminnallisuutta asiakaskäytössä.

- Yleisesti syntetisoitujen oligonukleotidien laadunvarmistukseen riittää hieman kevyemmätkin toimenpiteet, eikä erillisille lisäpuhdistuksille ja puhtausasteen analyyseille ole kovinkaan usein tarvetta. Näin herkkiin reaktioihin pohjautuvassa menetelmässä kuitenkin pienikin epäpuhtaus näyttäisi aiheuttavan raaka-aineen toiminnallisuudelle merkittäviä puutteita, joten laadun optimoinnille on tarvetta, Sihvonen selvittää.

Tähän mennessä Sihvonen on ollut mukana kehittämässä puhdistusmenetelmää yhdelle oligonukleotidi-raaka-aineelle onnistunein tuloksin. Tarkoitus olisi jatkaa menetelmän kehitystä ja soveltaa sitä myös muille raskaudenseulontamenetelmässä käytettäville oligonukleotideille.

- Nyt kehitetty puhdistusmenetelmä näyttäisi toimivan raaka-aineen laadun optimoinnissa hyvin, mutta parannettavaakin toki on. Tarkoitus olisi jatkaa näitä tutkimuksia ja käyttää tietoa hyödyksi muiden raaka-aineiden laadun optimoimiseksi. Kenties työn päätyttyä on onnistuttu parantamaan koko menetelmän toiminnallisuutta ja siten lisätty noninvasiivisten menetelmien käyttöä raskaudenseulonnoissa, Sihvonen toivoo.

Erikoistyöopiskelija tutkii supertehostajien säätelemien pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien roolia ihon okasolusyövissä

Pitkät ei-koodaavat RNA-molekyylit vaikuttavat ihon okasolusyövän kehittymiseen. Turun yliopistossa erikoistyötään tekevä Josefiina Haalisto tutkii supertehostajien roolia pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien säätelyssä, ja alustavien tulosten mukaan supertehostajissa olisi potentiaalia terapeuttisina kohteina syövän hoidossa.

Josefiina Haalisto

Ohjaaja: Dosentti, FT Liisa Nissinen

MOLEKYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Ihon okasolusyöpä (cSCC) johtuu usein pitkittyneelle UV-säteilylle altistumisesta. Sen esiintyvyys on kasvussa, ja tavoitteena on löytää uusia toimivia kohteita sen hoidossa. Haalisto käyttää tutkimuksissaan eri cSCC-solulinjoja, ja hän on kyennyt osoittamaan, että pitkät ei-koodaavat RNA-molekyylit ovat supertehostajien säätelyn alaisia ihon okasolusyövissä, ja että supertehostajien estäminen vähentää syöpäsolujen kasvua.

- Supertehostaja on moniosainen kompleksi. Sen moitteeton toiminta on riippuvainen osasten toiminnasta, joten estämällä osasten toimintaa, kokonaisuuden toiminta estyy. Tämä on tärkeä havainto syövän hoidon kannalta, koska supertehostajien estäjien käyttö vaikuttaa samalla suoraan pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien toimintaan ja syöpäsolujen määrän kasvuun heikentävästi, Haalisto painottaa.

Haalisto tutkii neljää pitkää ei-koodaavaa RNA:ta, jotka ovat LINC7, LINC9, PICSAR ja PRECSIT.

- PICSAR ja PRECSIT ovat jo aiempien tutkimusten mukaan antaneet hyvää näyttöä, ja niiden on voitu osoittaa olevan osallisina ihon okasolusyövän muodostuksessa, syöpäsolujen kasvussa ja leviämisessä. Siksi halusimme tutkia myös muita ihon okasolusyövissä paljon ilmennettyjä pitkiä ei-koodaavia RNA-molekyyliä, kertoo Haalisto.

Tutkimukset ovat osoittaneet, että pitkät ei-koodaavat RNA:t vaikuttavat esimerkiksi kromatiinin muokkaukseen, geenien kopioimiseen ja geenien kopioimiseen tarvittavien proteiinien toimintaan soluissa. Kromatiini on kompleksi, joka muodostuu DNA:sta ja siihen liittyvistä proteiineista. Kromosomit puolestaan koostuvat kromatiinista.

- On tärkeää tutkia ja ymmärtää pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien toiminta ja vaikutus syövässä, jotta terapeuttisia kohteita voidaan kehittää. Ihon okasolusyövän ennuste parantumiseen varsinkin etäpesäkkeitä muodostavien syöpien kohdalla on huono vielä tällä hetkellä, ja spesifiä hoitoa levinneeseen ihon okasolusyöpään ei vielä ole, Haalisto tähdentää.

Jatkotutkimuksissaan Haalisto toistaa kokeita cSCC-kasvaimista eristetyillä solulinjoilla. Tavoitteena on tutkia lisää supertehostaja-estäjien annosvaikutusta syöpäsolujen kasvuun kokeilemalla niitä vielä laajemmalla skaalalla eri pitoisuuksissaan, ja tutkia niiden vaikutusta cSCC-solujen RNA-ilmentymisprofiiliin RNA-sekvensoinnilla.

Syöpäkantasolut – neuroloogia heinäsuovassa

Syöpäkantasolut koostuvat useista erilaisista soluista. Hyvin pieni osa näistä kasvaimen soluista on niin kutsuttuja syöpäkantasoluja, joiden uskotaan mahdollistavan muun muassa syövän uusiutumisen ja lääkeresistenssin kehittymisen syöpähoidoille. Siksi syöpäkantasolujen osuus kasvaimen soluista ja niiden sijainti kasvaimissa kiinnostaa tutkijoita. Turun Yliopistossa maisteriopiskelija Paula Kuuppo tutkii mahdollisuutta hyödyntää massasytometriaa syöpäkantasolujen tunnistuksessa kasvainnäytteistä.

Paula Kuuppo

Ohjaaja: Dos. Elisa Närvä

MOLEKYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Kantasolut ovat soluja, jotka pystyvät jakautumaan äärettömästi ja erilaistumaan. Kantasolut ovat erityisen tärkeitä yksilönkehityksessä, mutta niitä löytyy myös aikuisten kudoksista, joissa niiden tehtävä on mahdollistaa kudosten uusiutuminen korvaamalla vanhat kuolevat solut uusilla. Syöpäkantasolut ovat kantasolujen kaltaisia syöpäsoluja, jotka ovat valjastaneet samoja kehitysbiologisia signalointireittejä, jotka ovat aktiivisia normaaleissa kantasoluissa. Syöpäkantasolujen uskotaan mahdollistavan syövän uusiutumisen sekä syöpälääkeresistenssin ja etäpesäkkeiden syntymisen. Menetelmällä, jolla voitaisiin luotettavasti tunnistaa syöpäkantasolut kasvainnäytteistä olisi siis tarvetta muun muassa uusien syöpähoitojen kehitettäessä.

Massasytometria on menetelmä, jolla solunäytteistä voidaan tutkia yksittäisten solujen merkkiaineita. Merkkiaineet tunnistetaan spesifisillä vasta-aineilla, joihin on liitetty metalli-ioneja. Metallionit toimivat menetelmässä kuin väriaine eli niiden avulla voidaan havaita merkkiaineet soluista massasytometrillä. Menetelmällä voidaan tutkia yli 40 eri merkkiaineen läsnäoloa soluissa yksi solu kerrallaan yhdestä ja samasta näytteestä. Kuvantamismassasytometria hyödyntää niin ikään samanlaisia metalli-ioneilla leimattuja vasta-aineita. Tässä menetelmässä näytteenä on kudoksesta valmistettu lasille asetettu ohut leike. Kuvantamismassasytometrissä on laser, joka irrottaa leikkeestä aina yhden mikroneliömetrin kokoisen alueen kerrallaan. Tällä alueella olevat metalli-ionit tunnistetaan ja tiedot kootaan yhdeksi pikseliksi. Näin kuvantamismassasytometrillä voidaan rakentaa visuaalinen esitys leikkeestä löydettyistä merkkiaineista ja niiden sijainnista.

Turun Yliopistossa Elisa Närvän tutkimusryhmässä on kiinnostuttu massa- ja kuvantamismassasytometrian hyödyntämisestä syöpäkantasolujen tunnistamisessa.

- Tarkoituksenamme on rakentaa useita eri merkkiainetta tutkiva paneeli, jolla syöpäkantasolut voisi tunnistaa paljon erilaisia soluja sisältävistä näytteistä sekä massa- että kuvantamismassasytometrillä. Olemme valinneet 16 kiinnostavaa merkkiainetta, joiden esiintymisen tiedetään kanta- ja syöpäkantasoluissa poikkeavan erilaistuneista soluista. Näillä merkkiaineilla aloitamme paneelin testaamisen, kertoo maisteriopiskelija Paula Kuuppo.

- Tulevaisuudessa paneelia on tarkoitus laajentaa määrittämään 40–50 eri merkkiainetta, Kuuppo jatkaa tulevaisuudensuunnitelmista.

Jagged1 DNA:n eheyden ylläpitäjänä

Maisteriopiskelija Ciia Haikarainen tutkii Åbo Akademin Cell Fate -ryhmän tutkimusprojektissa Jagged1:n roolia DNA:n korjausmekanismeissa ja solujen jakautumisessa. Tutkimuksen tuloksissa nähdään, että ilman Jagged1:tä solujen kyky aktivoida DNA:n korjausmekanismit on alentunut ja soluissa on enemmän DNA-vaurioita. Lisäksi Jagged1:n puute hidasti syöpäsolujen jakautumista. Tutkimustuloksien perusteella Jagged1:een kohdistettu syöpähoito voisi parantaa rintasyöpäpotilaiden ennustetta.

Ciia Haikarainen

Ohjaajat: FM Marjaana Parikainen, FM Emma Suhonen ja Prof. Cecilia Sahlgren
SOLUBIOLOGIA

WHO:n tilastojen mukaan vuonna 2021 rintasyöpä diagnoosin sai noin 2.6 miljoonaa naista ja rintasyövän seurauksena menehtyi maailmanlaajuisesti yli 600 000 potilasta. Perinteiset, edelleen paljon käytössä olevat syöpähoidot ovat usein hyvin raskaita elimistölle. Kohdistetummat syöpähoidot voisivat parantaa potilaiden elämänlaatua ja siksi on tärkeää tutkia yksityiskohtaisemmin eri tekijöiden roolia syövän kehityksessä, ylläpitämisessä sekä etenemisessä. Syövän tunnusmerkkeinä tunnetaan muun muassa solujen epänormaali jakautuminen, suurempi määrä vaurioita DNA:ssa ja muutokset ohjelmoidussa solukuolemassa.

-Notch-soluviestintä on evolutiivisesti varhain konservoitunutta ja se on keskeinen tekijä monien eri solujen ja kudosten erilaistumisen ja kasvun säätelyssä. Osana Notch-soluviestintää Jagged1 osallistuu myös keskeisesti moniin edellä mainittuihin prosesseihin soluissamme. Jagged1:n korkea ilmentyminen on liitetty aggressiivisiin, huonon ennusteen rintasyöpä tyyppisiin, mikä tekee siitä kiinnostavan kohteen tulevaisuuden syöpähoitoja ajatellen, Haikarainen kertoo.

Erikoistyössään Haikarainen tutkii Notch-ligandi Jagged1:n roolia DNA:n eheyden ylläpidossa replikaatiostressin ja mittoosin aikana rintasyöpäsoluissa. Tutkimusryhmässä on aikaisemmin pystytty osoittamaan, että Notch1-reseptorilla on rooli replikaatiostressivasteen aktivaatiossa. Tuloksista nähdään, että myös solulinjassa, jossa Jagged1:n toiminta on hiljennetty, on alentunut replikaatiostressi vaste. Tuloksissa kuitenkin nähdään myös, että samoissa Jagged1 hiljennetyissä soluissa on enemmän DNA:n kaksoissäikeen vaurioita verrattaessa villityypin soluihin. Lisäksi Jagged1:n puute hidasti solujen jakautumista. Tulevaisuudessa on tarkoitus jatkaa edelleen Jagged1:n roolin tarkentamista solujen jakautumisen aikana, esimerkiksi tutkimalla Jagged1:n ja muiden proteiinien vuorovaikutussuhteita jakautuvissa soluissa.

Ihmisen papilloomavirus (HPV) manipuloi solujen kommunikointia

Maisteriopiskelija Valtteri Lempinen onnistui yhdessä Åbo Akademin Cell Fate - tutkimusryhmän kanssa selvittämään uuden transformaatiomekanismin, jota ihmisen papilloomavirus (HPV) hyödyntää infektiossa. HPV vaikuttaa normaalien solujen toimintaan ja kommunikaatioon. Tietty proteiinit, joita kutsutaan onkoproteiineiksi, kaappaavat solujen komponentteja muuttaen niiden normaalia toimintaa. Havaitsimme, että eri HPV-lajien onkoproteiini nimeltä E6 vaikuttaa solun Jagged1 proteiinin toimintaan, mikä häiritsee puolestaan normaalia solujenvälistä kommunikaatiota.

Valtteri Lempinen

Ohjaajat: Ph.D Elenaé Vázquez-Ulloa, Prof. Cecilia Sahlgren

MOLEKULAARINEN SOLUBIOLOGIA

Projektinsa aikana Cell Faten tutkimusryhmässä, Valtteri Lempinen havaitsi, että syöpää aiheuttava onkoproteiini nimeltä E6 vaikuttaa solujen normaaliin kommunikaatioon Jagged1 proteiinin kautta.

- Kuten ihmisten välinen viestintä, myös solut voivat “puhua” toisilleen, ylläpitäen niiden normaalia tilaansa. Lähettävä solu voi välittää viestin antennin tavoin viereiselle vastaanottavalle solulle. Kudoksilla on useita erilaisia viestintämekanismia. Meidän tutkimustyömme keskittyi Notch-nimiseen systeemiin. Tämä kommunikaatiokoneisto on välttämätön solujen tasapainon ylläpitämiseksi ja kasvainten muodostumisen välttämiseksi, Valtteri selittää.

Kun onkogeeninen virus läpäisee kehon puolustusmekanismit, virukset voivat välittää omat proteiininsa solujen sisään, kaapat sen ja manipuloiden solujemme normaalia kommunikaatiokoneistoa.

- Yksi Notch-koneiston komponenteista nimeltä Jagged1 kärsii HPV:n onkoproteiini E6:n läsnäolosta, jolloin normaali kommunikaatio häiriintyy ja mahdollistaa syövän kehittymisen, Valtteri lisää.

Kohti virustorjunnan päivitystä

Kuten biologi Peter Medawar sanoi: “virus on huono uutinen käärittynä proteiineihin”. Näiden virusten mekanismien ymmärtäminen on avain infektioiden seurauksien kitkemisessä. Maailmanlaajuisesti noin 20 % kaikista syöpätapauksista ovat infektioiden aiheuttamia, kuten HPV. On kuitenkin hyvä muistaa, että monet onkogeeniset virukset osoittavat paljon yhtäläisyyksiä niiden kyvyssä aiheuttaa syöpää.

- Meidän tuloksemme kertovat mahdollisesti yhdestä tavasta, jolla virusten infektiot johtaa syöpään. Näitä tuloksia voitaisiin käyttää muiden onkogeenisien virusten tutkimuksissa, kuten hepatiittivirus tai Epstein-Barr virus, Valtteri kertoo.

- Tuloksia on nyt paljon ja yritämme liimata kaiken yhteen ja jatkaa tutkimusta. Seuraava askel on selvittää, mitä seurauksia tällä muunnetulla viestinnällä on viereiseen kudokseen, Valtteri päättää.

Predictive potential of sugar compounds for head and neck cancer therapy

Presently, head and neck cancers lack biological indicators that can help diagnose or anticipate the nature of the emerging cancer nor is there any predictive indicators for targeted treatments. Masters' thesis student Sadie Salminen researched the predictive potential of sugar compounds in the hopes that positive findings could contribute to head and neck cancer therapy. In certain cancer cases significantly lower amounts of specific sugar compounds were observed.

Sadie Salminen

Supervisors: M.Sc Erica Routila, Ph.D., adj. prof. Janne Leivo & M.Sc Khirul Islam
MDP IN BIOMEDICAL SCIENCES, MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Salminen investigated 36 different integrin-lectin combinations on tumour tissue samples to find combinations that could be used as predictive indicators for tumour recurrence. The results were used to evaluate the predictive potential of the tested combinations for recurrence of the tumour, neck, and distant metastasis for head and neck cancer.

- We observed higher signals for the tumour samples than the adjacent healthy samples, indicating that the observed irregularities of sugar compounds on integrins could be a cancer-linked abnormality, says Salminen.

- According to our results we observed significantly lower amounts of certain sugar compounds with locoregional tumour recurrence and neck metastasis cases. Additional investigations with larger patient cohorts are required to confirm the validity of our results, Salminen explains.

Sugar compounds as predictive indicators?

Integrins are proteins that normally take part in our body's communications on a cell level. Changes to the sugar compounds on the surface of integrins, have been linked to different cancer traits for example metastasis. Lectins bind very specifically to sugar compounds but due to their weak binding strength, lectins tend to let go of their targets quite easily. To enhance their binding strength, lectins were bound to nanoparticles, which simultaneously improved the measured signal.

- We used an integrin-lectin nanoparticle -immunoassay to study the tissue samples received from head and neck cancer patients. Integrin recognizing antibodies would bind the desired integrin and lectins were used to recognize the sugar compound on the surface of the integrin, Salminen describes.

Nearly 900 000 new incidences and 400 000 mortality cases are reported for head and neck cancer annually. Head and neck cancers are often malignant, and each case is often very different from one another. The 5-year survival for head and neck cancer patients is approximately 50% and loss in quality of life is tightly linked to this type of cancer.

Due to the increasing number of new head and neck cancer cases and its malignant nature, there is a clear need for additional research into biological indicators that can help expedite the diagnostic process and predict the nature of the cancer.

Blood biomarkers for treatment response monitoring of lung cancer

Potential biomarkers that reflect patients' response to treatment were found by detecting glycoproteins' sugar moieties in follow-up samples. Master's student from University of Turku Neža Gregorčič reported three glycovariants whose blood concentration reflects patients' response to treatment. This could mean more efficient treatment protocols and better survival of lung cancer patients.

Neža Gregorčič

Supervisors: PhD. Kamlesh Gidwani, MSc. Shruti Jain

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

For her master's thesis project Gregorčič searched for different glycovariants of circulatory glycoproteins that would reflect treatment response in lung cancer patients. The results indicate such biomarker potential in three glycovariants. This could improve treatment and survival of lung cancer patients, because even though there are several treatment options for lung cancer, patients often develop resistance to treatment, thus their status needs to be monitored throughout.

Why glycovariants?

It is known that cancer cells exhibit glycosylation changes. These changes are protein, site, and cell specific, which is why glycosylation changes are considered a hallmark of cancer. Recognizing these changes could lead to a cancer specific and sensitive biomarker development. This could be achieved with lectins, carbohydrate-binding proteins with high specificity but these molecules have poor affinity towards their sugar moieties. The issue with low affinities can be remedied by coating them on fluorescent europium-nanoparticles, resulting in sensitive and specific detection of glycosylation changes.

Gregorčič used this knowledge in her assay. A simple sandwich-like immunoassay usually consists of a capture antibody that binds one part of the analyte and a tracer antibody which is labeled and binds to another part of the molecule. In this project the capture was an antibody that binds to protein moiety of CA19-9 or CA125 and the tracer was lectin-coated fluorescent nanoparticle that binds to their carbohydrate moiety.

Importance of lung cancer biomarker for treatment response monitoring.

Lung cancer is the 2nd most common cancer, and it has the highest mortality rate of all cancers. There are several treatment options for lung cancer, but patients often develop resistance to treatment, thus their status needs to be monitored throughout. There is currently no biomarker in clinical use for treatment monitoring of lung cancer patients; the monitoring only relies on CT-imaging. Gregorčič believes that with further optimizations and larger sample cohorts that would verify the discovered glycoproteins as biomarkers for treatment monitoring of lung cancer patients could provide better patient care. Clinicians would be alerted about treatment resistance sooner and could adapt it accordingly, thus improving the treatment protocol and outcome.

Improved detection of circulating pancreatic cancer biomarkers

Pancreatic cancer is among the most lethal and sneakiest malignancies, where traditional serum biomarkers lack specificity. In the cancer diagnostics team at the Department of Life Technologies at the University of Turku, Jami Heino aimed to discover novel circulating biomarkers and to develop glycovariant immunoassays to detect PanCa at an early stage.

Jami Heino

Supervisors: PhD. Kamlesh Gidwani, MSc. Rufus Vinod
BIOTECHNOLOGY (TECH.)

Asymptomatic pancreatic cancer (PanCa) is usually detected at a late stage and conventional detecting methods lack specificity due false negative results in some subjects with PanCa and false positive elevation in patients with benign diseases. In this master's thesis project, Heino optimized a method for detection of previously identified circulating biomarkers, extracellular vesicles, and consequently profiled what glycoproteins are enriched on cancerous EVs. Results indicate that CA125 and N-acetyl-D-glucosamine sugar moieties are highly expressed on surface of PanCa-derived EVs, and that more novel glycoproteins, such as integrin alpha subunit 4, are highly expressed on EVs while some are shed into circulation. Glycovariant assays targeting expressions of CA125, and other glycoproteins show improved performance over conventional methods.

Extracellular vesicles, aberrantly glycosylated proteins, and methods to target them

Being under increased focus during last decade, extracellular vesicles (EVs) which were thought to work as waste bags secreted by cells into circulation, carry a vast molecular cargo in bodily fluids and have a role in cell-cell communication. Cancerous EVs are strongly glycosylated, being rich in glycoproteins such as integrins, tetraspanins and mucins, and reflect the cell of origin. Altered glycosylation of circulatory biomarkers is a well-known phenomenon which is specific and varying in different stages of cancer.

Targeting the aberrant glycosylations and their expression level on EVs can be performed with glycan binding antibodies and lectins which have high binding against specific glycans, but also low affinity. Improvement in affinity can be achieved with more sensitive tracer molecules.

- I optimized an immunoassay developed previously by our team to detect glycans on cancerous EVs present in sera of PanCa patients which used fluorescent europium nanoparticles. Back in the day chelate molecules were used to generate fluorescent signals, but these Eu-NPs contain thousands of them, thus producing greatly amplified signal while also having non-specific binding reduced. By modifying the buffer into which sera is diluted, and with wheat germ agglutinin lectin conjugated onto Eu-NPs we could further improve PanCa-detecting assay by increasing discrimination between most problematic healthy, benign and PanCa samples, Heino explains.

Future aspects?

- Further studies of glycovariant assays could proceed with two alternative paths. As our sample cohort was small, higher number of samples could improve the assay further. More novel glycoproteins could also be screened and adapted into immunoassay platform to improve the specificity and sensitivity of the assay even further, Heino states excitedly.

ERBB reseptorien rooli syöpälääkevastustuskyvyn ensiaskeleissa

Erikoistyötä tekevä tutkijaopiskelija Iina Takala Turun yliopistosta on selvittänyt syöpälääketoleranssin ensimmäisiä vaiheita lääkehoidon aloittamisen jälkeen. Tutkimuksessa on selvitetty ERBB reseptorityrosiinikinaasien sekä niiden ligandien ilmentymistä, ja tutkimuksen mukaan tiettyjen geenien ilmentyminen kasvaa lääkehoidon seurauksena. Näitä tutkimustuloksia käytetään osana laajempaa syöpälääketoleranssitutkimusta, jonka tavoitteena on luoda ymmärrystä modernien syöpähoitojen haasteena olevaan syöpälääkevastustuskyvyn syntyyn.

Iina Takala

Ohjaajat: FT Kari Kurppa, FT/Prof. Klaus Elenius
BIOKEMIA

Erikoistyöopiskelija Iina Takala on tutkinut muutoksia ERBB reseptorityrosiinikinaasien ja niiden ligandien ilmentymisessä syöpäsoluhoitojen vasteena, osana Klaus Eleniuksen ja Kari Kurpan laboratorioden yhteistyöprojektia. Projektissa hän on havainnut kasvua erityisesti reseptoriperheen kahden edustajan ERBB3:n ja ERBB4:n geenien ilmentymisessä. Se voisi merkitä uudenlaisen ERBB reseptori-välitteisen signaalintireitin aktivoitumista syöpälääkehoidon seurauksena.

- Vielä on aikaista sanoa, kuinka merkittäviä lääketoleranssin syntymisen kannalta nämä tulokset ovat, mutta olemme nähneet selkeän kuvion ilmentymisen lisääntymisessä kyseisten reseptorien kohdalla, Takala spekuloi.

ERBB reseptoreja vastaan kehitetyt lääkkeet ovat tehokkaita, mutta niitä vastaan kehittyä helposti vastustuskyky. Vielä vuosien jälkeen syövän sairastamisesta se voi uusiutua, ja tällöin tauti on usein hyvin vastustuskykyinen lääkehoidoille. Projektissa tutkimusryhmä tutkii vastustuskykyisten uusivien syöpämuotojen aiheuttajia, syöpälääkkeille toleranteja soluja, jotka hoitojen jälkeen jäävät elimistöön latentteina, nukkuvina syöpäsoluina. Nämä ovat niitä soluja, jotka aktivoituessaan saavat pysyviä mutaatioita, mikä johtaa syöpäsolujen geneettiseen vastustuskykyyn.

Syöpäsolut siis eivät kaikki kuolekaan, vaikka potilas voikin saavuttaa täydellisen kliinisen remission, tilan, jossa syövästä ei enää havaita ollenkaan merkkejä tutkimuksissa. Geneettinen vastustuskyky puolestaan tarkoittaa mutaatioita syöpäsolujen geneeissä, jotka vaikuttavat lääkeaineiden kykyyn sitoutua kohteeseensa.

Miten tutkimusryhmät aikovat edetä tämän ongelman ratkaisemisessa?

Alustavat tutkimukset ERBB reseptorien roolista lääketoleranssissa voivat auttaa meitä ymmärtämään tapahtumia syöpäsoluissa lääkehoidon aivan ensimmäisinä päivinä, ja tukea uusien hoitomuotojen ja -mallien kehittämistä. Tavoitteena tässä tutkimuskokonaisuudessa on selvittää solujen sisäisiä tapahtumia, mutta myös mallintaa ja kokeilla uusia hoitomahdollisuuksia, jotka eivät risteäsi lääketoleranttien solujen ominaisuuksien kanssa, ja näin ollen tehoaisivat myös niihin jäljelle jääviin, taudin uusiutumista aiheuttaviin soluihin, Takala kertoo.

- Ihmisen kollageenireseptori-integriinien tunnistus- ja aktivaatiomekanismi

Ihmisen kollageenireseptori-integriinit ovat mukana useissa tärkeissä solun toiminnoissa ja solut hyödyntävät niitä saadakseen tietoa ympäristöstään. Turun yliopistossa erikoisyötä tekevä Liisa Pösö on tutkinut ihmisen kahden eri integriinin aktivaatiota molekyyllitasolla ja alustavan 3D rakenteen avulla todennut mekanistisia eroja kahden samankaltaisten integriinin välillä.

Liisa Pösö

Ohjaajat: FT Tomi Airene, Dos. Jarmo Käpylä, Prof. Tiina Salminen, Prof. Jyrki Heino
BIOKEMIA

Pösö tutkii kahta solun pinnalla sijaitsevaa ihmisen kollageenireseptori-integriiniä, jotka ovat merkittävässä roolissa solujen välisessä viestinnässä. Ne reagoivat niitä ympäröivään soluväliaineeseen, tässä tapauksessa kollageeniproteiiniin, jonka seurauksena solu muuttaa toimintaansa. Ilman tarkkaa kollageenimolekyylin tunnistusmekanismia integriinien toiminta ei aktivoidu ihmisille tarpeellisissa solutoiminnoissa. Tämän vuoksi integriinien spesifisten tunnistusmekanismien ymmärtäminen on tärkeää. Pösö on tähän mennessä osoittanut selvien mekanististen erojen olemassaolon ihmisen kahden eri integriinin tunnistusmekanismeissa, sekä saanut lisätietoa siitä, miten integriinit tunnistavat kollageenia.

- Integriinit ovat merkittäviä soluväliaineproteiineja, joilla on muun muassa syöpäkasvainten kehityksessä merkittävä rooli. Syöpäsolujen tiedetään ilmentävän enemmän integriineja, jotka aktivoituessaan edesauttavat syövän kasvua ja leviämistä. Integriinien tunnistus- ja aktivaatiomekanismiin onkin syytä perehtyä, sillä se mahdollistaa niihin kohdistettujen lääkeaineiden kehittämisen toteaa Pösö.

Kolibakteerin avulla vastauksia

Pösö hyödyntää tutkimuksessaan ripulikokkibakteerina tunnettua *E. coli*:a. Se on tutkimuksen kannalta täydellinen integriini-proteiinien tuottoisäntä, sillä sen genomi, eli perimä, on ollut jo pitkään tunnettu. Tämän lisäksi *E. coli* ei ole kasvuolosuhteiltaan nirso, jonka vuoksi sen kasvattaminen laboratoriossa on helppoa sekä edullista.

- Tutkittavien integriini-proteiinien geenit ovat liitetty osaksi *E. coli*:n genomia, jolloin tutkittavia proteiineja on voitu tuottaa suuressa mittakaavassa. Saadaksemme vertailumateriaalia olemme tehneet proteiineihin mutaatioita, joiden avulla olemme pystyneet määrittelemään integriinien geeneistä aktivaation kannalta tärkeitä osia, kertoo Pösö.

Tämän lisäksi Pösö on onnistunut selvittämään alustavan proteiimirakenteen yhdelle mutatoituista integriineista. Jatkossa Pösö toivoo pystyvänsä perehtymään entistä tarkemmin selvitettyyn proteiimirakenteeseen hyödyntämällä molekulaarista mallinnusta.

Tulehdusviestinnän yksityiskohtainen tunteminen lisää ymmärrystä kolorektaalisyövästä

Kolorektaalisyöpä on kolmanneksi yleisin syöpätyyppi miehillä sekä naisilla Suomessa. Sillä viitataan ruuansulatuskanavan loppuosassa eli umpisuolessa, koolonissa tai peräsuolen alueella esiintyvään syöpään. Ympäristötekijät sekä elintavat lisäävät tulehduksellisten sairauksien yleisyyttä ja yhä nuorempi sairastuu suolistosairauksiin ja jopa -syöpään. Emmi Virtanen tutkii pro gradu -työssään tulehdusviestintää kolorektaalisyöpäsoluissa Åbo Akademin ja Turun Yliopiston yhteisessä tutkimushankkeessa. Tutkimusryhmä on löytänyt keinon hidastaa kolorektaalisyövän kehitystä kolmiulotteisissa syöpämalleissa.

Emmi Virtanen

Ohjaajat: Ph.D. Gabriela Martínez Chacón, Dos. Annika Meinander
MOLEKYYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Åbo Akademin ja Turun Yliopiston yhteisessä tutkimushankkeessa tutkitaan metioniini 1-sidottua ubikitinaatiota (M-1 ubikitinaatio) ja sen roolia tulehdusviestinnässä. Tutkimuksessa havaittiin M-1 ubikitinaation määrän lisääntyvän kolorektaalisyövän kehityksen aikana, kun käytettiin kolmiulotteisia syöpäsolumalleja. Virtanen havaitsi ryhmänsä avustamana, M1-ubikitinaation kokoamiskoneiston olevan oivallinen kohde vähentää M1-ubikitinaation määrää kolorektaalisyöpäsoluissa. Tämä johti syövän kehityksen hidastumiseen sekä lopulta syöpäsolujen kuolemaan.

Tutkimuksessa kasvatetaan syöpäsoluista syöpä organoideja 10 päivän aikana kolmiulotteisessa biologisessa materiaalissa. Malleja altistetaan inhibiittorille säännöllisesti kasvun aikana. Solujen kehitystä organoideiksi seurattiin mikroskooppikuvien ja erilaisten laboratoriomenetelmien keinoin.

- Inhibiittori, joka vaikuttaa M1-ubikitinaation muodostumiseen antoi hyvän vasteen, ja syöpäsolut eivät päässeet muodostamaan samanlaisia organoideja kuin kontrollinäytteet. Käytetyt kolmiulotteiset syöpäsolumallit ovat erinomainen tapa jäljentää syövän kehittymistä laboratorio olosuhteissa, koska niissä syöpäsolut kasvavat samankaltaisissa olosuhteissa, kuin luonnollisestikin, Virtanen kertoo.

Virtasen mukaan tutkimustyötä on jatkettava

Alustavat tulokset ovat lupaavia. Syöpä organoidien kasvun hidastuminen ja totaalinen kasvun loppuminen ovat hyvin merkittäviä tutkimustuloksia. Virtanen toteaa niiden osoittavan, että M1-ubikitinaatio on elintärkeä organoidien kehitykselle. Tulevaisuudessa voisi olla mahdollista kohdennetulla läikehoidolla hoitaa tulehduksellisia sairauksia. Tämä vaatii kuitenkin lisää tutkimustyötä.

Tarvitsemme tulevaisuutta varten lisää ymmärrystä tulehduksellisista sairauksista ja ratkaisuja niiden hoitoon. Esimerkiksi tulehduksellisen suolistosairauden sairastavat ovat tutkitusti riskiryhmässä sairastua kolorektaalisyöpään, Virtanen toteaa.

- **Microsensor technology to help on the study of the effect of biofilms on copper corrosion**

The nuclear waste disposal system relies on the canister materials to withstand at least 100 000 years. The top-most layer is made of copper. In a worst-case scenario the copper capsule can be colonized by micro-organisms which can cause corrosion. Microsensor technology can be used in the study of copper corrosion under biofilms. In her master's thesis project Katariina Kilkku tries to develop a method of studying biofilms on top of copper using microsensors.

Katariina Kilkku

Supervisors: Dr. rer. nat. Thomas Ohligschläger, Sc.D. Pauliina Rajala

BIOTECHNOLOGY (TECH.)

In her master's thesis done at VTT, Kilkku is introducing the use of microsensor technology in studying copper corrosion under biofilms. Biofilms often form in microbially induced corrosion where they change the environmental conditions on the metal surface. The changed conditions may cause corrosion and reduce the lifetime of the material. Kilkku developed a synthetic biofilm matrix using 1% low gelling temperature agarose. Kilkku has also successfully tested commercially available microsensors in a series of experiments using chemical gradients. The experiments using the biofilm matrix with microbes and copper coupons is in progress with the main results still expected.

Kilkku selected a synthetic biofilm over a natural one because it can be used both with chemical gradients and microbes, and the thickness can be easily adjusted.

- The 1% agarose gel is firm enough to hold its shape but soft enough for microbes to migrate through it. The low gelling point allows microbes to be added to the gel while it's liquid at a temperature suitable for microbes. As an extra benefit, the chosen agarose gel can be remelted, if necessary, mentions Kilkku.

- The effects of the biofilm on corrosion are well covered in literature, which is why the aim is to concentrate on the use of microsensor technology. At first the used copper coupons are cast with abiotic synthetic biofilms containing chemical gradients. Microsensors are then used to see whether they can detect any effect near the copper surface. Similar tests are conducted with biotic biofilms as well, Kilkku specifies.

Corrosion of the copper capsule may have disastrous effects

While many protective measures are made to keep the spent nuclear fuel inside the disposal canisters, some microbes may still find their way to the surface of the outer copper capsule. It is important to study their effect to keep the nuclear fuel from entering the environment. Although not expected, the possibility of the biofilms' inhibiting corrosion is not excluded.

The thesis is done in connection with the coordinated research project *Interactions of release barriers and their relevance to copper corrosion (MoToPro/KUKO)*, which is part of the publicly funded *Finnish Research Programme on Nuclear Waste Management (KYT2022) 2019-2022*.

Lääkeaineen vapautumisnopeuden testimenetelmä sopivaksi ihonalaisille lääkevalmisteille

Lääkeaineiden annostelun parantamiseksi ja helpottamiseksi on kehitetty silikapohjaisia pitkäaikaisesti lääkeainetta vapauttavia ihonalaisia valmisteita. Turun yliopistossa biotekniikan diplomi-insinööriksi opiskeleva Päivi Järvensivu on kehittänyt menetelmää lääkeaineen vapautumisnopeuden selvittämiseksi silikapohjaisista lääkevalmisteista.

Päivi Järvensivu

Ohjaajat: TKT Mika Jokinen ja FT Marceline Akieh-Pirkanniemi

BIOTEKNIikka DI

Ihon alle laitettavien implanttien lääkeaineen vapautumisnopeuden selvittäminen on tärkeää, jotta implantit toimivat halutulla tavalla ja ovat turvallisia potilaille. Läpivirtausdissoluutiomenetelmää on alun perin käytetty suun kautta otettavien lääkeaineiden vapautumisnopeuden tutkimuksissa, mutta soveltavia laitteistoja on myös käytetty parenteraalisissa eli muun kuin suun kautta annosteltavissa lääkevalmisteissa.

- Lääkeaineen vapautumisnopeuden selvittäminen on tärkeää lääkevalmisteen laadun varmistamiseksi. Lisäksi luotettavat lääkeaineenvapautumistestit vähentävät tarvetta testata lääkettä eläimillä, tarkentaa Järvensivu.

Pitkäaikaiseen ihonalaiseen annosteluun on turkulainen yritys DelSiTech Oy kehittänyt injektoitavan silikageelivalmisteen, jossa lääkeaine on kapseloitu silikamikropartikkeleihin. Tämä silikapohjainen ihon alle injektoitava geeli on biohajoava, jolloin lääkeaine vapautuu elimistön käyttöön valmisteesta samalla kun silika hajoaa. Päivi Järvensivun tutkimuksen tavoitteena oli erityisesti kehittää läpivirtausdissoluutiomenetelmä ihon alle injektoitaville silikavalmisteille.

- Kehitetyn läpivirtausdissoluutiomenetelmän olosuhteita on optimoitu siten, että se jäljittelee mahdollisimman hyvin ihon alaisia olosuhteita, selventää Järvensivu.

Läpivirtausdissoluutiomenetelmän avulla ihon alle injektoitavan silikavalmisteen lääkeaineen vapautumisnopeus pystytään selvittämään mittaamalla lääkkeen pitoisuus eri aikapisteissä otetuista näytteistä.

- Tällä hetkellä kehitetty läpivirtausdissoluutiolaitteisto on toimiva ja sillä pystytään testaamaan injektoitavia silikavalmisteita. Laitteiston toimivuuden varmistamiseksi, tarkoituksena on kuitenkin tehdä lisää testauksia nopeasti ja hitaasti lääkeainetta vapauttavilla valmisteilla, lisää Järvensivu.

Lääketeollisuus vapisee uuden löydön edessä - UV-C-säteilystä uusi ase lääketieteelliseen laadunvalvontaan

UV-C-säteilyn avulla onnistuttiin tuhoamaan mikrobeja Tyvek-päällysteisten lääkepakkausten pinnalta. Löydös liittyi Juhani Kalsken diplomityöhön, jossa tutkittiin UV-C-säteilyn sopivuutta lääkepakkausten desinfiomisessa. Löydös tarkoittaa, että jatkossa Tyvek-päällysteiset lääkepakkaukset voitaisiin desinfioida tehokkaasti ilman kemiallisia desinfiointiaineita ennen niille tehtäviä mikrobiologisia laadunvalvontatestejä.

Juhani Kalske

Ohjaaja: FT Kati-Sisko Thiel
BIOTEKNIikka DI

Kalske tutki kolmen erilaisen testimikrobin avulla, miten ultraviolettisäteilyn suurenergisin muoto, UV-C-säteily, niihin vaikuttaa. Tutkittavista mikrobeista kaksi lajia kuuluivat bakteereihin ja yksi homeisiin. Tutkimuksissa mikrobit altistettiin kolmeksi minuutiksi kerrallaan UV-C-säteilylle erityisen UV-C-laitteiston avulla. Tulosten perusteella tutkitut bakteerit tuhoutuivat jo yhden kolmen minuutin säteilytyksen jälkeen, mutta homeiden kohdalla tarvittiin ajallisesti jopa kolminkertainen säteilytys. UV-C-säteily ei läpäissyt lääkepakkauksia.

- UV-säteilyhän on meille kaikille tuttu säteilyn muoto ihon rusketuksen kautta. Siinä merkittävimmissä roolissa on UV-C-säteilyyn verrattuna pienempienergisempi ja hieman aallonpituudeltaan pidempi UV-B-säteily. Kuten ihon palamisesta tiedämme, on jo tämä UV-säteilyn muoto soluille haitallista. UV-C-säteily absorboituu otsonikerrokseen, joten se ei onneksi meidän ihmisten murheena ole, mutta luonnollisesti eläville soluille tämä säteilyn muoto on vielä UV-B-säteilyäkin haitallisempaa. Ehkäpä tässä tutkimuksessa suurempi kysymysmerkki olikin Tyvekin rooli kuin UV-C-säteilyn toiminta, Kalske valistaa.

Kohti tehokkaampaa laadunvalvontaa

Tutkimuksessa käytetyn UV-C-laitteiston avulla mikrobiologista laadunvalvontaa voitaisiin mahdollisesti tehdä jatkossa entistä tehokkaammin. Keskeisenä tekijänä oli selvittää, että säteily ei pysty läpäisemään Tyvek-päällysteisiä lääkepakkauksia.

- Alusta asti oli selvää, että tutkimuksen onnistuminen nojaisi vahvasti nimenomaan siihen, että säteily ei läpäise Tyvekiä. Tämä johtuu siitä, että mikrobiologisissa laadunvalvontatesteissä pyritään selvittämään, löytyykö pakkausten sisältä mikrobeja. Mikäli UV-C-säteily tuhoisi mikrobit jo ennen näitä testejä, olisivat testit aina negatiivisia riippumatta siitä, oliko pakkauksissa alkujaan mikrobeja vai ei. Nyt, kun näin ei käynyt, voidaan UV-C-laitteistoa harkita käytettäväksi lääkepakkausten desinfiointissa, jolloin laboranttien manuaalinen työ vähenee ja kemiallisia desinfiointiaineita ei tarvittaisi, Kalske huomauttaa.

Työn keskiössä oli nimenomaan soveltavuus.

- Eiköhän tämä työ ole akateemisesti lähempänä Ö- kuin A-mappia, mutta työn tuloksia voitaisiin nopeastikin soveltaa lääkkeiden laadunvalvontaprosessissa. Jatkossa varmaan selvitetään, miten UV-C-laitteisto saataisiin mahdollisimman ketterästi mukaan suurempaan mikrobiologiseen laadunvalvontakokonaisuuteen, Kalske päättää.

Liekistä apua bioaktiivisen lasin muokkaukseen?

Bioaktiivinen lasi on biomateriaali, jota voidaan käyttää ortopedian ja hammaslääketieteen alalla erityisesti kovakudoskorjausta vaativissa kohteissa. Leila Lukin tutkii diplomityössään liekkipyöritysprosessin hyödyntämistä pyöreiden lasihelmien tuottamiseen murskatusta lasista. Tavoitteena on hyödyntää pyöritytettyä lasia injektoitavissa terveydenhuollon sovellutuksissa.

Leila Lukin

Ohjaajat: Insinööri (AMK) Jimmy Lucchesi ja DI Christoffer Sevoni
BIOTEKNIikka DI

Lukin on työnsä aikana tutkinut liekkipyöritysprosessin soveltuvuutta bioaktiivisen S53P4-lasin pyöritymiseen. Liekkipyöritysprosessi perustuu lasin pehmenemiseen kuumassa liekissä, jolloin lasi saavuttaa pintajännityksen vuoksi pyöreän muodon. Työn aikana kootulla laitteistolla valmistettuja lasipartikkeleita analysoitiin niiden koon, muodon, koostumuksen sekä bioaktiivisuuden selvittämiseksi. Tavoitteena oli saavuttaa materiaali, jonka koostumus, amorfisuus ja reagoitakyky pysyisi prosessin aikana mahdollisimman muuttumattomana.

- Bioaktiivinen lasi on biohajoava materiaali, jota voidaan käyttää turvallisesti kehossa. Lasia hyödyntämällä voidaan esimerkiksi vähentää muovin ja metallin käyttöä kovakudoskorjauksessa. S53P4-lasilla on myös havaittu olevan antibakteerisia ominaisuuksia, mikä vähentää paikallisten antibioottien tarvetta leikkausten yhteydessä, Lukin kertoo.

Lukin käyttää tutkimuksessaan lähtömateriaalina murskattua bioaktiivista lasia, josta tulisi saada täysin pyöreitä partikkeleita pyöritysprosessin seurauksena. Lasia olisi tulevaisuudessa tavoite käyttää injektoitavissa terveydenhuollon sovellutuksissa.

- Injektoitavuus avaa uusia käyttökohteita bioaktiiviselle lasille, sillä materiaalia voidaan käyttää hankalasti saavutettavissa paikoissa kehossa. Injektion hyödyntäminen tuo myös apua nykyisiin sovellutuksiin, sillä operaatioissa materiaali voidaan tuoda kehoon pienemmän leikkauskohdan kautta, selventää Lukin.

Kehitystyö jatkuu

Lasimurskan pyörityminen on osoittautunut prosessin aikana mahdolliseksi, mutta menetelmä vaatii vielä kehitystä. Työn aikana on tutkittu eri prosessiin vaikuttavia parametreja, joista on saatu paljon uutta tietoa. Aikaisempaa laajaa ja julkista tutkimusta S53P4-lasin liekkipyörityksestä ei ole saatavilla.

- Suurempien partikkelien pyörityminen osoittautui haastavaksi. Lisäksi työn aikana lasin havaittiin olevan altis korkealle ilmankosteudelle mikä toi haasteita prosessiin. Kosteudelle altistuneisiin partikkeleihin esimerkiksi saattoi muodostua kuplia tai ne saattoivat kiinnittyä toisiinsa valmistuksen aikana. Tämän havainto auttaa kuitenkin prosessikehitystä jatkossa ja tuo arvokasta lisätietoa bioaktiivisen lasin käyttäytymisestä, Lukin toteaa.

Työ jatkuu laitteiston kehityksellä. Tavoitteena olisi tulevaisuudessa saada yksinkertainen sekä kustannustehokas menetelmä pyöreiden lasipartikkeleiden tuottamiseen.

The 3D cancer spheroids, an indispensable cell culture method in cancer research

Current cancer research still mainly relies on traditional two-dimensional (2D) cell culture methods, which unfortunately do not reflect the complex structure and behavior of natural tumors. 3D cell cultures (spheroids) have gained increasing interest since they provide a more tissue-like environment and resemble more natural tumors compared to traditional 2D cell culture methods.

Ifrat Jahan Tamanna

Supervisors: Ph.D. Elina Siljamäki, MD. Ph.D. Jyrki Heino
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Master's Degree student Ifrat Jahan Tamanna from Professor Jyrki Heino's research group, is studying extracellular matrix (ECM) remodeling in a disease state, cancer hypoxia (low level of oxygen). The ECM is a non-cellular network of crosslinked macromolecules, such as collagens, glycoproteins and proteoglycans, and it plays a critical role in mediating cell adhesion, migration, and proliferation. Hypoxia is a key factor in cancer growth that promotes the expression of ECM proteins. Ifrat Jahan Tamanna has succeeded in showing that three of the core ECM proteins, namely collagen prolyl hydroxylases (P4HA1 and P4HA2) and collagen lysyl hydroxylase (PLOD2) expression increased in hypoxia both in transformed keratinocytes and metastatic cSCC (cutaneous squamous cell carcinoma) spheroids when these cell lines were cultured with human primary skin fibroblasts. She also showed that cell proliferation in 3D spheroids increased in hypoxic condition.

Cancer research development through 3D spheroids?

3D cell culture technologies are expected to add invaluable information about cancer growth and progression, as it is known that 2D cultures do not reflect the complex cancer microenvironment, especially the interconnection between cells and the ECM. Cancer microenvironment, and especially fibroblasts that are the most abundant cell type in that microenvironment, affect cancer cell behavior and modulate their signaling pathways. So, it is not surprising that ECM composition and its physiological properties influence for example cells' response to cancer drugs.

- Altogether, these results show that 3D spheroids containing cancer cells and fibroblasts are a promising tool in detecting ECM remodeling in normoxic and hypoxic conditions. Elevated protein levels of abundant ECM proteins were noted. This study provides valuable information about the potentiality of this method when detecting ECM proteins in cancer hypoxia and this could be a starting point for possible future method development.

Production and optimization of brain-targeted viral tools for target validation in Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) is a complex disorder in which the primary cells of the brain, "neurons," start to degenerate in specific regions. This degeneration manifests as movement disabilities in the final stages of the disease progression, when it can be diagnosed but not treated. In his Master's thesis, Soroush is looking to validate target proteins that contribute to disease development at the early stages. His project's results may help find specific novel drug targets in the follow-up studies.

Soroush Abyari

Supervisors: Research director Eleanor Coffey, Ph.D. candidate, MSc. Jelena Gnjatovic
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

In PD, neurodegeneration occurs in dopamine-producing neurons. Dopamine is a chemical that transfers messages in parts of the brain that control movement. The underlying molecular events in PD result from the complicated interplay of genetics and environment, yet the precise mechanisms of PD in neuronal cells at the early stages remain unknown. In the Coffey lab, we aim to shed more light on this.

The most prevalent mutation (G2019S) in PD patients occurs in the gene encoding for Leucine rich-repeat kinase 2 (LRRK2). This protein can modulate other proteins' activity by adding phosphate groups to specific structure sites. G2019S mutation increases LRRK2 phosphorylation activity. Previous studies in our group on rat models of PD identified disturbance in phosphorylation of three proteins downstream of the LRRK2 kinase activity. All three proteins have roles in cellular pathways that are implicated in PD. I evaluate the impact of their phosphorylation changes in PD model cells to understand if these changes lead to neurodegeneration or pathogenic events.

Generating AAV vectors, treating cells with AAV, and functional testing

Phosphomutant genes of three target proteins were generated in our lab. The next step was to synthesize vectors that can transfer those transgenes into cultured neurons or animal PD models. To achieve this, I generated adeno associated viral vectors (AAVs) that can systematically cross the brain-blood barrier and express the gene of interest under the control of cell-type specific promoters. So far in this project, after vector production and optimization of the best titer for AAVs to transduce in cells, cultured hippocampal neurons were treated with different AAVs to evaluate gene transfer efficiency. Immunofluorescence detection showed successful insertion and expression of mutant genes, opening doors for upcoming experiments. Finally, the effects of phospho-variant proteins on cell survival will be evaluated by measuring possible compromised functions in crucial cellular pathways that occur in PD.

Moving forward, identifying novel drug targets for PD demands detailed study on several cellular mechanisms and molecular interactions behind cell trafficking, autophagy, endolysosomal systems, etc. production and characteristic of these tools may validate a new target protein as potentially involved in the early stages of PD and pave the way for further studies

Gene-environment interaction for the inheritance of the high-fat diet-induced metabolic disorder

High consumption of fat is an environmental stress that results in obesity. It is well established that acquired paternal obesity does not only affect the health of exposed individuals, but it can also induce changes in offspring phenotype which strongly supports the heritable component involved in the inheritance of obesity and metabolic disorders. In her Master's thesis, Fatemeh is looking to determine how paternal high-fat diet-induced obesity and treating obesity with different interventions influences the small RNAs profile of sperm. Her project's results may help find specific novel information on the high-fat diet-induced changes in small RNAs throughout the male reproductive tract, as well as the effects of interventions on sperm small RNAs profile.

Fatemeh Hajati

Supervisors: Ph.D. Professor Noora Kotaja, Ph.D. Mari Lehti

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Obesity is a metabolic disorder that contributes to several diseases, including diabetes type II, cardiovascular diseases, respiratory problems, osteoarthritis, and cancer. Previous studies indicated that the health condition of offspring could be affected by the obesity of fathers through an alteration of small RNAs levels in sperm. The detailed information on which parts of the reproductive tract contribute to the obesity-induced sperm RNA changes is still missing. It is also unclear whether these changes can be reversed by treating obesity.

I evaluated how high-fat diet induced obesity in male mice and how treating obesity reversed these changes. According to results, high-fat diet consumption induced obesity in fathers with increased body weight and fat pads. Exercise intervention, a healthy diet, and metformin drugs after treatment of obesity can reverse gaining weight and fat mass weight. Still, these changes are more evident by treating obesity with exercise and diet. Although both female and male offspring of obese fathers consumed more food than controls, they showed smaller fat pads, which indicate signs of resistance to gaining weight. This condition was successfully reversed when the obesity of fathers was treated by exercise.

Trafficking small RNA changes induced by obesity throughout the reproductive tract

In this project, adult male mice were fed a high-fat diet for eight weeks to induce obesity and then acquired obesity was treated by a healthy diet, metformin medication, or exercise. Before sacrifice, males were mated with females to assess the offspring phenotype. Subsequently, sperm and different parts of the reproductive tract were collected for RNA extraction to assess small RNA expression patterns by next-generation sequencing. I successfully isolated intact RNA from sperm samples and different parts of reproductive tissues of male mice named efferent ducts and other parts of the epididymis (initial segment, caput, corpus, cauda). However, due to the time limitation of my thesis, the result of small RNA trafficking throughout the reproductive tract, as well as the effect of treating obesity in small RNAs of sperm, are not yet available. Still, we hypothesized these samples would reveal interesting novel information which expands our current knowledge on the inheritance and curing of obesity.