

# Nuoret tutkijat Young scientists 2023

Lehdistötiedotteet / Press releases

# Sisällys

Solujen ohjelmointi takaisin erilaistumattomaan tilaan – mahdollistaisi potilaskohtaisen hoidon.....	4
Kahden proteiinin sitoutumisrakenteen tutkiminen – mahdollisuus syöpälääkkeen kehitykselle?.....	5
Proteiinitasolta kohti syövän parantamista.....	6
Monosyyttiaktivaatiotesti – pyrogeenien testausta lääketuotteista ja lääkinnällisistä laitteista ilman koe-eläimiä .....	7
A green solid-state cell factory – producing solar chemicals with photosynthetic micro-organisms.....	8
Erikoistyöpiskelija selvittää sinilevien eli syanobakteerien sopeutumista typen puutteeseen.....	9
Towards more reliance on renewable chemicals produced by photosynthetic bacteria .....	10
Ihmisen maksamikrosomien käyttö sikiöille haitallisen entsyymi- inhibition havainnoinnissa.....	11
Oncofusions dysregulate cellular signalling via gaining several new functions .....	12
Sex hormones are critical for bone metastasis in prostate cancer .....	13
A novel technique for the early detection of prostate cancer. ....	14
Uuden äärellä – hypoksian vaikutus okasolusyöpäsoluihin .....	15
Erikoistyöpiskelija luo rintasyöpäpotilaalla löytynyttä uutta mutaatiota solulinjaan	16
Solunulkoiset vesikkelit heikentävät syövän hoidossa käytettävien vasta-ainelääkkeiden tehoa .....	17
New method for analysing metabolites associated with Type 1 diabetes .....	18
Novel strawberry hybrids with more flavour .....	19
Pastasäilykkeeseen soveltuvaa pastaa etsimässä.....	20
Maisteriopiskelija selvittää kasvipohjaisten proteiininlähteiden aminohappokoostumusta.....	21
Maisteriopiskelija selvittää kaupallisten alkoholittomien oluiden aistinvaraisia eroja ja laatua .....	22
Determining Fatty acid compositions of seafoods, milk, and oil lipids by advanced chromatographic separation techniques .....	23
The Benefits of Omega-3 Fatty Acids for Your Body .....	24
Study on Encapsulation's Effect on n-3 Polyunsaturated Fatty Acids for Food Fortification.....	25
Novel flavourful berry wines created from challenging lingonberries. ....	26
A study on the chemical composition of old Finnish apple cultivars for quality cider. ....	27
Production of vinegar from apple peels – potential of using different yeast species ..	28
Novel Screening Process and Investigating of Fermentation Kinetics to Optimizing the Health Promoting Potential of Food Fermentation Strains .....	29

Master's thesis study examines differences in the lipid profiles of plant-based meat alternatives. ....	30
The sensory study offers insights into the taste and texture of commercial plant-based meat alternatives. ....	31
Erikoistyöopiskelija tutkii lupiinin fermentoinnin mahdollisuuksia .....	32
Perustutkimus valottaa mekanismeja taudinaiheuttajien taudinaiheuttamiskyvyn taustalla .....	33
Äidinmaidon vasta-ainekoostumuksen vaikutus lapsen HPV-infektion kehitykseen. ....	34
Darpiini-sitojamolekyylien potentiaali lääkeaineina.....	35
Maitorauhaskudoksen 3D-rakenteen tarkempi tuntemus avuksi syöpätutkimukselle? .....	36
Nisäkässolunäyttötekniikan yhdistäminen satunnaismutageneesilla luotuihin vasta-ainekirjastoihin antaa suuntaa uudeltaiselle <i>in vitro</i> affiniteettimaturaatiomenetelmälle .....	37
Pro Gradu -tutkija kehittää vasta-aineita sinilevämyrkyä ei-kilpailevaan määritykseen .....	38
Pikatesti nopeuttaa tekonivelinfektioiden toteamista .....	39
Erikoistyöopiskelija selvittää mikrofluidiikan käyttömahdollisuuksia biotulostamisessa .....	40
Työkaluja ja menetelmiä proteiinimodifikaatioiden tutkimiseen.....	41
The ON-switch to feeling pain: prospective biological molecules boosting pain sensation and possibility to reduce animal experimentation for future studies.....	42
Lähistaus nopeuttaa ja helpottaa virustestien saatavuutta .....	43
Established tissue model shed light for pain drug development .....	44
Paraneeko lateraalivirtaustestin herkkyys magneeteilla? .....	45
Menetelmä uudenlaisten sitojaproteiiniyhdistelmien kehittämiseen.....	46
More stable antibodies in the fight against diseases .....	47
Vasta-aineiden kehitys gelsoliiniamyloidoosiin.....	48
Generation of novel specific tools for cancer diagnosis and follow-up .....	49
Discovery of specific antibodies to develop a diagnostic assay for human rhino viral infections.....	50
Lupaavia tuloksia tarkempaan ennusteeseen.....	51
Finding clinically relevant strains of <i>C. diphtheriae</i> using MALDI-TOF .....	52
Parempaa diagnostiikkaa munasarjasyövälle .....	53
Teknologia syöpämutaatioiden havaitsemiseksi automatisoitiin menestyksekkäästi .	54
Uusi pikatesti mahdollistaa munasarjasyövän aikaisemman ja varmemman diagnoosin .....	55
Herkkä määrittäminen mahdollistaa lyhyiden nukleinihappokohteiden pienempien pitoisuuksien mittaamisen .....	56
Uusi edullisempi, nopeampi ja skaalattavampi menetelmä kehitetty syövän aikaiseen diagnosointiin ja seurantaan .....	57

Organoidit osoittautuivat lupaavaksi soluviljelymenetelmäksi syöpälääketutkimukseen .....	58
3D-tulostetulla kasetilla eristettyä ja puhdistettua DNA:ta.....	59
Uusi testi parantamaan sydäninfarktin diagnostiikka.....	60
CA19-9 and CA15-3 glycovariants – Promising way to monitor lung cancer .....	61
Uusi tutkimustieto munuaispotilaista tarkentaa sydäninfarktin diagnostiikka .....	62

## **Solujen ohjelmointi takaisin erilaistumattomaan tilaan – mahdollistaisi potilaskohtaisen hoidon**

*Ihmisen kehon erilaistuneita soluja, kuten ihosoluja, voidaan ohjelmoida takaisin erilaistumattomaan, kantasolumaiseen, tilaan. Turun yliopiston maisteriopiskelija Sanne Forsback todistaa erikoistyössään, että ihosolujen ohjelmointi takaisin erilaistumattomaan tilaan on mahdollista ja testaa voisiko tekniikkaa soveltaa syöpäsoluille.*

### **Sanne Forsback**

Ohjaaja: Dos. Elisa Närvä

MOLEKYYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Ihmisen erilaistuneita soluja on mahdollista ohjelmoida takaisin erilaistumattomaan tilaan yli-ilmentämällä kantasoluille ominaisia tekijöitä hetkellisesti esim. viruksen avulla. Takaisin ohjelmoidut solut tulee todentaa erilaistumattomiksi soluiksi vakiintuneiden standardien mukaisesti. Forsback onkin onnistuneesti todentanut ihmisen ihosolujen ohjelmoinnin takaisin kantasolutilaan.

- Tutkimusryhmämme onnistui ohjelmoimaan ihon erilaistuneita soluja takaisin erilaistumattomaan tilaan ensimmäistä kertaa Turun Yliopistossa. Loimme kolme uutta kantasolulinjaa, joiden erilaistumaton tila, identiteetti ja turvallisuus tarkastettiin. Uudet solulinjat ovat todistetusti alkion kantasolujen kaltaisia ja pystyvät jälleen erilaistumaan eri solutyypeiksi. Solut olivat myös genomiltaan identtisiä alkuperäisten ihosolujen kanssa, eivätkä sisältäneet geneettisiä poikkeavuuksia, Forsback kertoo.

### **Soveltaminen syöpäsoluille**

Tutkimuksessaan Forsback testaa takaisin ohjelmointi tekniikkaa munasarjasyövän solulinjoille. Syöpäsolujen ohjelmointi takaisin erilaistumattomaan tilaan antaisi mahdollisuuden tutkia syövän kehitystä sekä ominaisuuksia.

- Syöpäsolujen onnistunut ohjelmointi takaisin erilaistumattomaan tilaan voisi tukahduttaa ja muuttaa syövän ominaisuuksia sekä parhaassa tapauksessa pysäyttää syövän kasvun. Tämä menetelmä mahdollistaisi myös potilas- ja syöpäkohtaisten lääkkeiden kehittämiseen, Forsback sanoo toiveikkaana.

Toistaiseksi munasarjasyövän solujen ohjelmointi takaisin erilaistumattomaan tilaan on osoittautunut haastavaksi.

- Syöpäsolujen ohjelmoinnin aikana olen törmännyt useisiin haasteisiin, joiden selättämisessä on vielä ratkaisemattomia ongelmia, Forsback huokaa.

Jatkossa Forsback pyrkii selättämään kohdatut haasteet ja luomaan uusia syöpäkantasolumalleja syöpätutkimukseen.

## **Kahden proteiinin sitoutumisrakenteen tutkiminen – mahdollisuus syöpälääkkeen kehitykselle?**

*Proteiinifosfataasi 2A on tärkeä proteiini solusignaaloinnissa. Tämän proteiinin toiminnan soluissa voi estää toinen proteiini, CIP2A. Näiden kahden proteiinin sitoutumista tutkii Nora Kullberg pro gradu -tutkielmassaan. Kullbergin alustavat tulokset osoittavat, että myös lyhyempi N-terminaalinen osa CIP2A proteiinista kykenee sitoutumaan PP2A:n alayksikköön.*

### **Nora Kullberg**

Ohjaaja: Prof. Jukka Westermarck  
MOLEKYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Kullberg tutkii kahden proteiinin, CIP2A:n ja B56:n, sitoutumista toisiinsa. B56 on yksi proteiinifosfataasi PP2A:n alayksiköistä. CIP2A sitoutuu B56:een ja voi estää PP2A:n normaalin toiminnan soluissa. CIP2A:n koko rakennetta ei tunneta, mutta jo aiemmin kristallisoitun osan (aminohapot 1–560) tiedetään sitoutuvan B56:een. Kullberg on sitoutumiskokeissaan osoittanut, että myös lyhyemmät osat CIP2A:sta kykenevät sitoutumaan B56:een.

—CIP2A-B56-interaktion ja rakenteen selvittäminen olisi tärkeää moneltakin kannalta. Tiedon avulla olisi mahdollista esimerkiksi kehittää uusia syöpälääkkeitä, jotka sitoutuisivat CIP2A-proteiiniin ja estäisivät sen sitoutumisen B56-proteiiniin, Kullberg selittää.

### **Tavoitteena on kahden proteiinin sitoutumisrakenteen selvittäminen**

Kullberg tuottaa proteiineja tutkimukseen *Escheria coli*-solujen avulla. Solut tuottavat haluttua proteiinia ja puhdistamalla proteiini erilleen soluista sitä voidaan käyttää monenlaisessa tutkimuksessa.

—Odotan innolla proteiinien kristallisoitua, jonka avulla voidaan selvittää proteiinin kolmiulotteinen rakenne. Kristallisointi on minulle kokonaan uusi osa-alue, joten paljon uutta opittavaa löytyy. Olisi erittäin hienoa saada kristalleja muodostumaan. Aikaisemmin ei tietääkseni ole kokeiltu kristallisoita lyhyttä CIP2A:ta B56:n kanssa, joten kristallisointi antaisi meille tärkeää tietoa näiden kahden proteiinin sitoutumisesta toisiinsa, Kullberg toteaa.

Ilman haasteita projektista ei ole selvitty.

—Proteiinien tuottamisessa on monta muuttuvaa tekijää. Puhtaan tuotteen saaminen vaatii pitkiä päiviä laboratorioissa ja aina tulos ei ole halutunlainen. Sitoutumiskokeissa on välillä ollut ongelmia proteiinin leimaamisessa fluoresoivalla värillä, mutta suurimmasta osasta haasteista on selvitty, Kullberg sanoo.

Seuraavaksi Kullberg kokeilee sitoutumiskokeita myös entisestään lyhyemmillä CIP2A proteiinin paloilla sekä aloittaa proteiinien tuottamisen kristallisoitua varten.

## Proteiinitasolta kohti syövän parantamista

Kaikista syöivistä noin 25 % on mutatoituneen *KRAS*-geenin aiheuttamia. Näiden mutaatioiden aiheuttamien syöpien hoito on vaikeaa johtuen geenin tuottaman proteiinin toiminnasta ja rakenteesta. Turun yliopistossa erikoistyötä tekevä Lotta Ristimäki tutkii työssään molekyylien sitoutumista syöpää aiheuttavan *KRAS*-geenin tuottamaan proteiiniin.

### Lotta Ristimäki

Ohjaaja: FT Dos. Ulla Pentikäinen, FT Hanna Parkkola, FM Pekka Roivas  
MOLEKYYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Ristimäki tutkii erikoistyössään kahden eri syöpää aiheuttavan mutatoituneen *KRAS*-geenin tuottaman proteiinin toiminnan estämistä eri molekyyyleillä. Mutantteja ovat G12D ja G12V. Solujen normaalissa toiminnassa *KRAS*-geenillä on oleellinen merkitys ja sen koodaama proteiini *kRAS* vaikuttaa esimerkiksi solujen liikkumiseen ja selviämiseen. Toiminnan häiriintyessä *kRAS*-proteiini pysyy jatkuvasti aktiivisena, jolloin syövän kehittyminen on mahdollista lisääntyneen solujen toiminnan seurauksena.

—Jopa neljäsosa syöivistä on syöpää aiheuttavan *KRAS*-geenin aiheuttamia. Koska mutatoituneiden *kRAS*-proteiinien toiminnan estäminen on vaikeaa, on hyvin tärkeää keskittyä löytämään molekyylijä, joiden avulla syöpää aiheuttavien *kRAS*-proteiinien toiminta voitaisiin estää, Ristimäki pohtii.

### Molekyylien sitoutuminen mahdottomiin proteiineihin

Työssä *kRAS*-proteiinit tuotetaan *Escherichia coli* -bakteerissa, joka on tavallinen ihmisten ja eläinten suolistossa esiintyvä bakteeri. *kRAS*-proteiinia tuottava geeni siirretään *Escherichia coli* -bakteeriin, joka tuottaa proteiinia. Proteiinin puhdistamista muusta solun materiaalista on helpotettu lisäämällä proteiiniin *GST*-proteiini, joka poistetaan myöhemmässä vaiheessa katkaisuentsyymien avulla. Molekyylien sitoutumista tarkastellaan tietokoneen välityksellä.

Työn tavoitteena on löytää molekyylijä, jotka estävät syöpää aiheuttavien *kRAS*-mutanttien toiminnan soluissa. Molekyylit ovat yhteistyökumppanin suunnittelemia.

— Vaikka *kRAS*-proteiinien toimintaa on tutkittu paljon, vielä ei ole löydetty varmaa hoitokeinoa eri *kRAS*-proteiinin mutanttien aiheuttamille syöville. Esimerkiksi G12V:n rakennetta ei vielä tunneta. Tutkimani *kRAS*-proteiineihin sitoutuvat molekyylit siirretään jatkotutkimuksiin ja ideaalitulanteessa tuloksia voidaan hyödyntää jopa syövän hoidossa, Ristimäki toivoo.

Tutkimusta jatketaan määrittämällä molekyylien sitoutumista mutatoituneisiin *kRAS*-proteiineihin.

## **Monosyyttiaktivaatiotesti – pyrogeenien testausta lääketuotteista ja lääkinnällisistä laitteista ilman koe-eläimiä**

*Laadunvalvonnan toimivuus ja tehokkuus on lääketeollisuudessa todella merkittävässä asemassa. Erikoistyöopiskelija Ellinoora Koivula on pystyttämässä Biovian Oy:lle uutta laadunvalvontamenetelmää pyrogeenien eli kuumetta aiheuttavien aineiden havainnoimista varten.*

### **Ellinoora Koivula**

Ohjaajat: FT Paula Pennanen, FT Tuomas Nikula  
MOLEKYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Lääketuotteita ja lääkinnällisiä laitteita testataan pyrogeenien varalta jo heti niiden kehitysprosessin alusta alkaen. Vakiintuneita pyrogeenien testausmenetelmiä on tällä hetkellä kolme, joista uusin on monosyyttiaktivaatiotesti. Se hyödyntää valkosolujen luonnollisesti tuottamia solun välittäjäaineita sytokiinejä, joita valkosolut tuottavat kohdatessaan pyrogeenejä. Tuotetut sytokiinit voidaan mitata spesifisellä immunomäärityksellä, jolloin testi on kvantitatiivinen.

Kvantitatiivisuuden lisäksi monosyyttiaktivaatiotestin etuja ovat sen kyky havainnoida pyrogeenejä laajalla skaalalla sekä ennustaa hyvin tuotteiden pyrogeenistä aktiivisuutta, koska testi perustuu ihmisen reaktioon pyrogeeneihin. Lisäksi testissä ei käytetä koe-eläimiä, joten testin suorittamiseen vaaditaan myös vähemmän byrokratiaa.

—Vanhemmilla pyrogeenien testausmenetelmillä on heikkouksia, joista merkittävimpänä voisi mainita koe-eläinten käytön. Monosyyttiaktivaatiotestissä ei käytetä koe-eläimiä lainkaan, vaan se voidaan toteuttaa ihmisen kokoveren, verestä eristettyjen valkosolujen tai ihmisestä peräisin olevan solulinjan avulla. Nyt pystytettävässä menetelmässä on käytössä kaupallinen monosyyttisolulinja eli verenluovuttajiakaan ei tähän versioon tarvita, Koivula toteaa.

### **Tulevaisuudessa kasvava käyttöaste?**

Euroopan ja Yhdysvaltain farmakopeoissa, eli käytössä olevien lääkeaineiden määritelmät sisältävissä kirjoissa, on huomioitu monosyyttiaktivaatiotesti pyrogeenien testausmenetelmänä. Niissä monosyyttiaktivaatiotesti on listattu perinteisempien testausmenetelmien rinnalle mahdollisesti käytettäväksi menetelmäksi. Viime aikoina on tutkittu monosyyttiaktivaatiotestin käyttöä etenkin lääkinnällisten laitteiden testaamiseen pyrogeenien varalta.

—Suosituin pyrogeenien testausmenetelmä on silti edelleen perinteinen kaneja koe-eläiminään käyttävä menetelmä. Uskoisin kuitenkin, että monosyyttiaktivaatiotestin käyttö pyrogeenien testausmenetelmänä tulee kasvamaan lähivuosina, Koivula pohtii.



## **A green solid-state cell factory – producing solar chemicals with photosynthetic micro-organisms**

*Green algae can be used as solid-state cell factories to produce valuable chemicals with the power from the sun. By testing different cell immobilization techniques, Tiia Siivola found the most efficient way to produce a chemical,  $\epsilon$ -caprolactone, used in biomedical applications.*

### **Tiia Siivola**

Supervisors: Ph.D. Vilja Siitonen, Prof. Yagut Allahverdiyeva-Rinne  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

For her master's thesis project, Tiia Siivola compared three different cell immobilization approaches to find the most efficient system for a solid-state cell factory. A genetically engineered green alga -species, *Chlamydomonas reinhardtii*, was used as the cell factory organism. The engineered species can produce a chemical called  $\epsilon$ -caprolactone from a fed precursor.  $\epsilon$ -caprolactone can be used to produce polycaprolactone, a biodegradable plastic used in biomedicine, for example.

— Currently,  $\epsilon$ -caprolactone is produced industrially with harsh chemicals. The chemical industry also consumes massive amounts of fossil fuels, which is why sustainable production platforms are crucial. A cell factory approach to produce  $\epsilon$ -caprolactone has previously been tested with the heterotrophic bacterium *Escherichia coli*, but this system consumes glucose and requires external oxygen to work. Therefore, using a photosynthetic micro-organism, such as *C. reinhardtii*, as the cell factory enables the process to be more sustainable, because the system functions with solar energy and produces the oxygen it needs by itself.

### **From suspension to solid-state**

The common approach to produce chemicals with photosynthetic micro-organisms is to have the organisms in a suspension. A more novel approach is to immobilize the cells to a solid state in a hydrogel. This offers unique benefits such as a more even light distribution, a higher cell density, and an easier harvest of the product. Different types of biomaterials derived from natural resources can be used in the cell entrapment as they form a sort of web around the cells. Also, different techniques can be used in the immobilization process. The most novel approach is to 3D-print the cells into a solid state. Siivola used three different biomaterials – alginate, nanocellulose and hemicellulose – to immobilize the engineered algae cells either by hand-coating or 3D-printing and compare the rates of  $\epsilon$ -caprolactone production.

— Suspension appears to still be the winning approach when looking at the length of the reaction, since it had the shortest production time. However, the maximum rate of the reaction was highest with nanocellulose both by itself and compared to the amount of cells. All in all, these results prove that cell immobilization is a viable and efficient approach but requires more optimization to unleash the full potential of solid-state cell factories, Siivola concludes.

## **Erikoistyöopiskelija selvittää sinilevien eli syanobakteerien sopeutumista typen puutteeseen**

*Syanobakteerit sopeutuvat typen puutteeseen muuttamalla geenien transkriptiota ja mukauttamalla solun perustoimintoja, kuten kasvua. Transkriptiossa RNA-polymeraasi kopioi DNA:ssa olevaa geneettistä informaatiota RNA:ksi, joka kuljettaa geneettisen informaation proteiineja valmistavaan solukoneistoon. Turun yliopistossa erikoistyötä tekevä Mithila Ray on työssään osoittanut, että RNA-polymeraasin  $\omega$ -alaysikkö ja transkriptoituviksi valikoitavien geenien tunnistuksesta vastaava SigC-tekijä ovat tärkeitä typen puutteessa sopeutumiselle ja siitä toipumiselle.*

### **Mithila Ray**

Ohjaaja: Dos. Taina Tyystjärvi, FT Juha Kurkela  
SOLUBIOLOGIA

Ray kertoo, että typenpuutteessa syanobakteerien kasvu ensin hidastuu ja lopulta loppuu kokonaan. Samalla solujen väri muuttuu, koska solut hajottavat sinisiä ja vihreitä fotosynteesisiä pigmenttejä, jolloin jäljelle jäävät kelta-oranssit suoja pigmentit, karotenoidit, näkyvät paremmin. Syanobakteerisolussa typen ja hiilen metaboliat ovat liitoksissa toisiinsa ja niiden koordinoitu säätely on välttämätöntä solutoimintojen tasapainon ylläpitämiseksi. Ray keskittyi tutkimuksessaan selvittämään vaikuttavako hiilisignaalintireitin komponentit myös typen puutteeseen sopeutumiseen. Hän seurasi hiilisignaalintireitin mutanttien kasvua ja pigmenttien muutoksia sekä solujen sopeutuessa typen puutteeseen että toipuessa siitä. Ray sai selville, että RNA-polymeraasin  $\omega$ -alaysikkö, joka on välttämätön korkeaan hiilidioksidipitoisuuden sopeutumiseen, vaikuttaa myös typen puutteeseen sopeutumiseen. Lisäksi hän osoitti, että geenien ilmenemistä kontrolloiva SigC-tekijä ja sitä säätelevä anti-SigC -vastavaikuttaja vaikuttavat typen puutteesta selviytymiseen.

— On erittäin mielenkiintoista, kuinka montaa solutoimintoa täytyy muuttaa, jotta syanobakteerit sopeutuisivat typen puutteeseen. Asiaa monimutkaistaa kuitenkin se, että näillä solutoimintojen muutoksilla on myös vaikutusta toisiinsa, Ray toteaa.

### **Syanobakteerit hyötynä ihmisille?**

— Syanobakteereja ajatellaan usein haitallisina organismeina, vaikka oikeasti niistä voi olla hyötyä. Fotosynteesin avulla syanobakteerit pystyisivät tuottamaan ihmisille hyödyllisiä aineita hiilineutraalisti tai jopa hiilnegatiivisesti ja lisäksi niitä voitaisiin käyttää ravinteiden kierrättämisessä, Ray kertoo.

— Jotta syanobakteerit palvelisivat ihmisiä biotuotannossa tehokkaasti, tarvitaan syanobakteerikantoja, jotka kestävät vaihtelevia ympäristöolosuhteita nykyisiä kantoja paremmin. Typen määrän vaihtelu on yksi näistä ympäristöolosuhteista. Toisin sanoen, tämä typen puutteeseen sopeutumisen tutkiminen on vain pieni osa erittäin laajaa tutkimusta, Ray toteaa.

## **Towards more reliance on renewable chemicals produced by photosynthetic bacteria**

“Researchers at university of Turku improve the prospect for using cyanobacteria as an environment-friendly production system”

The Synthetic biology research group at University of Turku has developed a handy tool that allows writing multiple instruction-containing scripts given to cyanobacteria in order to enhance production of fuels, plastics, and many other chemicals. Cyanobacteria are tiny creatures that cannot be seen by the naked eye, they inhabit fresh and marine waters as well as terrestrial environments. These creatures have something in common with the lovely green plant on your balcony, both can synthesize their own nutritional needs from sunlight, atmospheric carbon dioxide, and water.

### **Microbes as miniaturized factories**

Researchers are capable of programming these creatures to give us many products we use in our daily lives such as ethanol and butanol, which are used as fuels and solvents. “We can turn these organisms into small factories”, says Dr. Pauli Kallio; the leader of the Synthetic biology research group at University of Turku. Since cyanobacteria absorb carbon dioxide from the air, extensive reliance on these microbes for production will reduce carbon dioxide levels, the greenhouse gas accused of global warming. Osama Mohamed, B.Sc, points out how these organisms can be recruited to produce various chemicals, “We give instructions to cyanobacteria in DNA format and they swallow and interpret these instructions in the form of the target product”. However, the efficiency of cyanobacterial production systems are still not sufficient to be competitive with the well-established large-scale production systems.

### **A technology to enhance productivity, yet many hurdles on the way**

"The goal of our research project is to develop a platform that permits assembling several scripts that may result in higher productivity ", says Roland Ndeh; a doctoral researcher in the group, “We test our system to increase ethanol productivity in cyanobacteria”. “The biggest advantage of this technology is the ability to write the DNA script in one step instead of many labor-intensive steps using other technologies”, says Osama. Some scripts are more powerful than others in inducing ethanol production, thus the group researchers aim to test many assembled scripts to select for the one or the ones that perform with the highest efficiency. “It is pretty similar to the motivation letters written by students when applying for the university, some are more expressive than others”, said Dr. Pauli. While the scientific community is working on maximizing the productivity of cyanobacteria for various products, many technical hurdles are still on the way to large-scale industrial production, for example, establishing the open-field containers where the organisms thrive and reducing the costs of product harvesting. "All the efforts will pay off when dominating the market with low-price cyanobacterial products in the near future", says Osama.

### **Saving the planet comes first**

Cyanobacterial bioproduction provides a sustainable, carbon-neutral manufacturing route that reduces the detrimental impact on the environment caused by industrial activities. For instance, “More than 98% of gasoline in the U.S. contains some ethanol”, according to the U.S department of energy. Thus, biofuels will minimize our reliance on fossil-based products in a step to save our planet.

## **Ihmisen maksamikrosomien käyttö sikiöille haitallisen entsyymi-inhibition havainnoinnissa**

*Mutaatiot ja lääkkeiden aiheuttama inhibitio kolesterolia tuottavassa entsyymissä johtaa kolesterolin puutoshäiriöön sikiöillä. Maksamikrosomeissa sikiöille epämuodostumia aiheuttavien lääkkeiden entsyymi-inhibition seulontaa tutkii Turun yliopistossa erikoistyötä tekevä Anna Hämäläinen. Hämäläisen alustavat tulokset osoittavat ihmisen maksamikrosomien mahdollisen soveltuvuuden tutkimukseen.*

### **Anna Hämäläinen**

Ohjaajat: FT, proviisori Anne Filppula, M.Sc. Josefin Halin  
SOLUBIOLOGIA

Eräs entsyymi ihmisen kehossa tuottaa kolesterolia, mutta estettynä tämä entsyymi on syynä kolesterolin puutoshäiriöön sikiöillä. Jotkin lääkkeet voivat myös estää tätä entsyymiä ja johtaa jopa sikiön kuolemaan. Hämäläinen on tutkinut mahdollisuutta seuloa näitä lääkkeitä ihmisen omista maksamikrosomeista, ja tähän mennessä Hämäläinen on onnistunut todistamaan entsyymien aktiivisuuden näissä fraktioissa ja mahdollisesti löytänyt oikean reitin entsyymien inhibitiokokeille.

—Kolesteroli on tärkeä osa solujen rakenteellisena komponenttina ja elintärkeä ihmisille koko elämän ajan. Puutos kolesterolissa ja toksisten komponenttien kasvu tämän tietyn entsyymien eston seurauksena on suuri riski sikiöille ja vastasyntyneille. Lisäksi lääkkeiden toimiminen inhibiittoreina raskauden aikana aiheuttaa vielä enemmän huolta. Siksi *in vitro* -menetelmän kehittäminen tämän entsyymien inhibitiouseulonnalle on tärkeää, Hämäläinen toteaa.

### **Lääkekehityksestä tutut mikrosomit hyötykäyttöön**

Hämäläinen käyttää tutkimuksessaan ihmisen maksamikrosomeja ja S9-fraktioita sekä tutkii ihmisen rekombinanttiproteiineja mahdollisena vaihtoehtona. Nämä entsyymilähteet ovat yleisesti jo lääkekehityksessä käytössä.

—Ihmisen mikrosomit ovat edullinen ja yksinkertainen vaihtoehto inhibitiouseulonnoille ja ne ovat helposti saatavilla. Tämä helpottaa kehitetyn *in vitro* -menetelmän käyttöönottoa tulevaisuudessa lääkekehityksen inhibitiouseulontoihin, Hämäläinen arvioi.

Entsyymien tutkimus on alkuvaiheilla ja tuloksia on vielä niukasti, tämä alkaa kuitenkin muuttua.

—Ideaalitulanteessa olisimme jo kehittäneet menetelmän entsyymiaktiivisuuden mittaamiseksi ja tutkisimme erilaisten lääkkeiden inhibition vaikutusta entsyymiin. Huolta kuitenkin herättää näiden entsyymilähteiden kolesterolipitoisuus ja reagenssien saatavuus, mikä on häirinnyt tutkimuksen edistymistä. Olen kuitenkin toiveikas löydettyämme uuden reitin kolesterolisynteesissä, jossa tämä entsyymi on aktiivinen ja mikrosomit eivät sisällä tämän reitin entsyymien tuottamaa yhdistettä, Hämäläinen kertoo.

Hämäläinen jatkaa menetelmän optimoinnin ja inhibitiokokeiden parissa sekä selvittää rekombinanttiproteiinien soveltuvuuden tähän menetelmään.

## **Oncofusions dysregulate cellular signalling via gaining several new functions**

*There has been a considerable gap in understanding the protein level consequence of oncogenic gene fusions or oncofusions in cancer and my results suggest that oncoproteins resulting from fusions gain a plethora of novel interactors and lose most of their parent protein functions across all cancer types and subtypes. These proteins also end up in completely different sub-cellular locations that their parent proteins are not present in.*

**Lopamudra Chatterjee**

Supervisors: PhD, Docent, Markku Varjosalo and Prof. Paula Mulo  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Cancer is characterized by a variety of genetic alterations including missense, nonsense, frameshift mutations and chromosomal rearrangements. Chromosomal translocations often lead to oncogenic gene fusions, or oncofusions (OFs). As these fusions are only present in cancer, in-frame fusions or fusion proteins have long been identified as potential tumour-specific drug targets. Despite their clinical significance, drug development has so far been limited to a small cohort of fusions.

A recent systems level study (Salokas et al., 2020) has concluded that protein kinases (PKs) and transcription factors (TFs) are the two main gene families producing protein forming fusions. This study also predicted conserved parent protein domains in fusion and implicated some retained wild type function.

We generated five fusion proteins with PK and TF as each other's fusion partner for an interactome analysis. To capture both the transient and stable interactors of our protein of interest, we used affinity purification as well as BioID followed by liquid chromatography (LC) – mass spectrometry (MS) to quantify the protein complexes (Liu et al., 2020).

Comparing the interactome of the fusion proteins and their wild type counterparts we documented their gain of function and change in subcellular localisation. Our results also show that the dysregulation mechanism of these proteins is mainly dependant on cell cycle pathways and growth factor signalling pathways.

Most of kinases in fusion retained at least one of their functional domains and with the recent success in development of drugs against mutated kinases, it is evident that fusion proteins are likely to be promising targets for the next generation of therapeutic agents against cancer. Further network analysis of fusion proteins can also result in discovery of new targetable pathways.

References:

- Liu, X., Salokas, K., Weldatsadik, R. G., Gawriyski, L., & Varjosalo, M. (2020). Combined proximity labeling and affinity purification–mass spectrometry workflow for mapping and visualizing protein interaction networks. *Nature Protocols*, *15*(10), 3182–3211. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0365-x>
- Salokas, K., Weldatsadik, R. G., & Varjosalo, M. (2020). Human transcription factor and protein kinase gene fusions in human cancer. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71040-8>

## **Sex hormones are critical for bone metastasis in prostate cancer**

*We have identified adrenal derived factors as critical for the metastatic growth of prostate cancer in bone. Prostate cancer is a sex hormone dependent disease. It is the second most common cancer and fifth leading cause of cancer related death in men worldwide. A majority of patients with advanced prostate cancer will progress with bone metastasis. The metastases in prostate cancer are characterized by an abnormal bone growth which worsens the disease prognosis and life of quality for the patients. Today there is no cure for bone metastatic disease.*

### **Sowndharya Sankar Perumal**

Supervisors: Ph. D, Matti Poutanen, Ph. D, Malin Hagberg Thulin  
BIOSCIENCES – MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Sankar Perumal studied the mechanisms behind the development of bone metastasis in castration resistance prostate cancer. Most often patients with prostate cancer develop tumors in bone leading abnormal bone formation which causes severe conditions such as fractures, bone pain, disability, and increased mortality. The mechanisms that drives this metastatic process is not fully understood but it is known that the mutual interaction between the tumor cells and the bone cells contributes to the abnormal deposition of bone in prostate cancer patients. Using a mouse model with human bone metastases, Sankar Perumal has so far been successful in demonstrating that the factors originating from the adrenals markedly affect the expression of the genes responsible for the increased bone growth caused by the tumor.

Prostate cancer is widely known as a sex hormone-dependent disease. Therefore, blocking androgens is the main stay of treatments in the advanced condition. However, though the treatment efficiently blocks 90-95% of androgens that are produced by the testicles a significant proportion of sex hormones mostly are remained. The major part of the residual level of sex hormones are produced by the adrenals and their importance in bone metastasis is not known. Thus, studying the role of adrenal derived factors in disease progression in bone is necessarily essential, Sankar Perumal states.

### **Do adrenal derived precursors of androgens affect the tumor growth in bone?**

In her research, Sankar Perumal investigates the role of adrenal in tumor-inducing bone formation in advanced prostate cancer conditions by comparing the testicles removed and adrenal removed mice that expect to mimic prostate cancer treatment regimens in patients. Analysis of the genes responsible for the tumor-induced bone formation in the models show differences in their expression between mice with testicles removed and mice with both testicles and adrenals removed.

According to the study, adrenal derived factors, presumably precursors of androgen synthesis, play a definite role in the progression of the bone lesions of prostate cancer. Sankar Perumal foresee that identification of such adrenal factors will eventually lead to the generation of more effective treatments for prostate cancer patients with bone metastases.

## **A novel technique for the early detection of prostate cancer.**

*A new test developed at Biotechnology division of University of Turku which reveals promising results for early detection of prostate cancer. The test consisting of cancer antigens (Ca 15-3 and Ca 19-9) in combination with a plant protein lectin namely wheat germ agglutinin (WGA) were able to discriminate prostate cancer patients from benign control. The study conducted by Master's student Mafiur Rahman, PhD student Misba Khan and Dr. Khirul Islam from the University of Turku showed that Extracellular Vesicles (EV) based new diagnostic tool could enable the detection of prostate cancer.*

### **Md Mafiur Rahman**

Supervisors: M.Sc. Misba Khan and Dr. Khirul Islam  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Mr. Mafiur currently studying a new Extracellular Vesicles (EV) based technique for the early detection of prostate cancer. Prostate cancer is the second most common cancer among men worldwide, with an estimated 1.4 million new cases diagnosed in 2020 and caused 370,000 death. Early detection is critical for successful treatment, but current screening methods, such as prostate specific antigen (PSA) test, have limitations in terms of accuracy.

-“ Extracellular Vesicles were captured with biotinylated anti- antibody and this captured EVs were then detected with lectins coated on nanoparticles. We have studied several cancer biomarkers in combination with lectins and found out that test constructing using cancer antigens (Ca 15-3 and Ca 19-9) in combination with WGA lectin can interact with the EVs of prostate cancer patient promptly rather than benign one”, states Mafiur. He also point out that “there is a paucity of glycan specific antibodies. Thus, lectin WGA, a glycan binding protein, coated on nanoparticles was used to detect the altered glycan on EVs”.

### **Are EVs considered as a hidden treasures for prostate cancer detection?**

Extracellular Vesicles (EVs) present in urinary secretions from the prostate have emerged as potential biomarkers for detecting prostate cancer. These EVs have the ability to mimic cancer cells, making them a promising tool for early detection. One of the hallmarks of cancer cells is altered glycosylation, which is also observed on the surface of EVs. Therefore, studying the glycan composition of urological EVs could provide valuable insights for detecting prostate cancer.

Mafiur hopes that the work carried out in his master's thesis project could be useful for the early detection of prostate cancer.

## Uuden äärellä – hypoksian vaikutus okasolusyöpäsoluihin

*Alhainen happipitoisuus eli hypoksia on kiinteille kasvaimille tyypillinen piirre, joka vaikuttaa eri mekanismien avulla siihen, millaisia proteiineja solut tuottavat ja kuinka paljon. Turun yliopistossa erikoistyötään tekevä Hille-Kaisa Leppänen tutkii hypoksian vaikutusta matriksin metalloproteinaaseihin okasolusyövässä, joka on ihon pintakerroksen soluista lähtöisin oleva syöpä. Aiheesta ei ole julkaistu aikaisempia tutkimuksia, joten Leppänen on täysin uuden tiedon äärellä.*

### **Hille-Kaisa Leppänen**

Ohjaajat: FT Elina Siljamäki, Prof. Jyrki Heino  
SOLUBIOLOGIA

Hille-Kaisa Leppänen tutkii hypoksian eli alhaisen happipitoisuuden vaikutusta matriksin metalloproteinaasien (MMP) ilmentymiseen ihon okasolusyöpäsoluissa, ja on havainnut niiden ilmentymisen olevan poikkeavaa hypoksiassa. Tutkimustulokset viittaavat osan MMP:istä, kuten MMP-1:n ja MMP-2:n ilmentymisen nousevan proteiinitasolla hypoksian vaikutuksesta.

”Matriksin metalloproteinaasit eli MMP:t ovat proteolyttisiä entsyymejä, jotka pilkkovat solujen välisen aineen rakenneproteiineja, kuten esimerkiksi kollageenia. Normaalityössä MMP:t ovat tärkeässä roolissa esimerkiksi sikiön kehityksessä ja haavojen paranemisessa, mutta kasvaimessa soluväliaineen pilkkominen antaa syöpäsoluille tilaa kasvaa ja liikkua. Lisäksi soluväliaineesta vapautuu signaalimolekyylejä, jotka vaikuttavat solujen toimintaan”, Leppänen selittää.

Poikkeava MMP:iden ilmentyminen on aikaisemmissa tutkimuksissa ollut useiden syöpien, myös okasolusyövän, kohdalla kytköksissä syövän kasvuun ja leviämiseen. Hypoksian on osoitettu vaikuttavan MMP:iden ilmentymiseen useissa eri syövyissä, mutta okasolusyövän kohdalla vastaavia julkaistuja tutkimuksia ei vielä ole.

### **Pitkä matka kuljettavana**

Leppänen on toistaiseksi tutkinut MMP:iden ilmentymistä lähinnä proteiinitasolla, mutta tulevaisuudessa hän määrittää muutoksia myös proteiineja koodaavan RNA:n tasolla. Myös poikkeavan ilmentymisen takana olevat mekanismit ovat toistaiseksi epäselviä. Tutkimustyötä onkin siis jatkettava sekä Leppänen että muiden tutkijoiden toimesta.

”Nämä tutkimustulokset, vaikka tärkeitä ovatkin, eivät sellaisenaan voi vielä johtaa esimerkiksi lääkekehitykseen. Niiden avulla ymmärrämme kuitenkin paremmin okasolusyövän kehittymistä, ja jatkotutkimukset voivat mahdollisesti johtaa esimerkiksi uusien biomerkkiaineiden käyttöönottoon okasolusyövän havaitsemisessa ja sen aggressiivisuuden arvioinnissa”, Leppänen pohtii.



## **Erikoistyöopiskelija luo rintasyöpöpotilaalla löytynyttä uutta mutaatiota solulinjaan**

*Noin 5 % rintasyövistä Suomessa liittyy geenimutaatioihin. Turun yliopistossa erikoistyötään tekevä Laura Nikku lähti optimoimaan ja vertailemaan menetelmiä, joilla mutaatio saataisiin solulinjaan parhaalla onnistumisprosentilla, jotta uuden mutaation vaikutusta pystyttäisiin jatkossa tutkimaan. Tulokset osoittavat, että geenisaksina tunnetulla CRISPR/Cas9 -menetelmällä pystytään luomaan haluttu muutos genomiin jopa lähes 40 %:n tehokkuudella.*

### **Laura Nikku**

Ohjaajat: Ph.D. Christoffer Löf  
MOLEKYYLIBIOTIETEET, SOLUBIOLOGIA

Genetiikka on tärkeä osa syöpäalitiudessa. Nikku vertailee uusia menetelmiä nuorelta rintasyöpöpotilaalta löydetyn uuden mutaation luomiseksi syöpäsolulinjaan. Mutaatio voi olla pistemutaatio, jolloin vain yksi DNA:n emäspari vaihtuu tai nukleotidi on lisätty tai poistunut DNA sekvenssistä. Suurimman osan mutaatioista solut korjaavat, mutta kaikkia ne ei pysty korjaamaan, jolloin mutaatio jää geeniin. Osa mutaatioista vaikuttaa geenin toimintaan, mutta osa sijaitsee alueilla, joilla ei ole merkittävää vaikutusta geenin toimintaan. Tähän mennessä Nikku on onnistunut löytämään menetelmän olosuhteet, jolla saadaan haluttuja mutantteja lähes 40 %.

–Mutaatio on erittäin mielenkiintoisessa geenissä, sillä se on tärkeä genomien korjausgeeni ja täten myös tärkeä osa genomien eheyden ylläpidossa. Tätä kautta sen toiminnan haitalliset muutokset voivat johtaa syövän syntyyn, toteaa Nikku.

Potilas, jolta geenimutaatio löydettiin tutkimusryhmän ja lääkäreiden aiemmin tehdyssä tutkimuksessa, oli sairastuessaan vain 34-vuotias, joka on rintasyöpään todella nuori. Rintasyöpään sairastutaan yleisimmin yli 60-vuotiaana.

### **Uudet genomimuokkaustyökalut mahdollistavat tutkimuksen**

Kemian Nobelin palkinnon 2020 saaneet geenisakset eli CRISPR/Cas9 mahdollistavat tarkan genomimuokkauksen. Uusia menetelmän sovellutuksia tulee jatkuvasti ja aiempia muokataan tehokkaammiksi ja mahdollistamaan muokkauksia laajemmalla kirjolla. Nikun tutkimuksessa käytetty emäsmuokkaus-menetelmä ei vielä pari vuotta sitten ollut mahdollista tämän kyseisen mutaation kohdalla, sillä menetelmää ei ollut vielä kehitetty. Myöskään laajan muokkauskirjon omaava prime-muokkaus on vasta muutama vuosi sitten kehitetty menetelmä.

–Onhan se kiehtovaa, että nykyään pystytään jopa valitsemaan vaihtoehtoista, että mitä muokkauskeinoa käyttää. Tutkijat tekevät koko ajan työtä myös näiden menetelmien kehittämiseksi entistä paremmiksi, jolloin muutkin pääsevät hyödyntämään entistä paremmin toimivia menetelmiä omassa tutkimuksessaan, toteaa Nikku.

Nyt kun menetelmä mutaation luomiselle on optimoitu, mutanttiproteiinin vertailu villityppiin olisi seuraavana. Tutkimus siis jatkuu solutasolta molekyyllitasolle.

## **Solunulkoiset vesikkelit heikentävät syövän hoidossa käytettävien vasta-ainelääkkeiden tehoa**

*Solunulkoiset vesikkelit ovat pieniä kalvorakkuloita, joita kaikki solut erittävät ympäristöönsä. Pro gradu -työssään Laura Tyni selvitti, että elimistön immuunipuolustuksen valkosoluihin kuuluvien syöjäsolujen eli makrofagien erittämät solunulkoiset vesikkelit heikentävät syöpää tuhoavia tappaja-T-soluja aktivoivien vasta-ainelääkkeiden tehoa. Solunulkoisten vesikkelien aiheuttama vasta-ainelääkkeiden tehon heikkeneminen johtuu vesikkelien sisältämästä Clever-1-molekyylistä.*

### **Laura Tyni**

Ohjaajat: FM Miro Viitala, Dos. Maija Hollmén  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Syövän hoitoon käytetyt lääkkeet ovat kehittyneet viime vuosina paljon. Monet syövät ovat kuitenkin vastustuskykyisiä uusillekin hoitomuodoille, joilla pyritään aktivoimaan potilaan oma immuunipuolustus toimimaan syöpää vastaan. Vastustuskyky johtuu siitä, että syöpä pystyy estämään immuunipuolustuksen aktivoitumista. Tässä keskeisessä roolissa ovat immuunipuolustuksen valkosoluihin kuuluvat makrofagit. Syövälle edulliset makrofagit osallistuvat immuunipuolustuksen vaimentamiseen. Ne ilmentävät pinnallaan Clever-1-molekyyliä, johon sitoutuva kliinisissä kokeissa oleva vasta-ainelääke beksmarilimabi muuntaa syövälle edulliset makrofagit toimimaan syöpää vastaan, aktivoi immuunijärjestelmää sekä tehostaa muiden immuunipuolustusta vahvistavien vasta-ainelääkkeiden toimintaa.

Pro gradu -työssään Laura Tyni selvitti, että Clever-1-molekyyliä ilmentävien makrofagien erittämät solunulkoiset vesikkelit, jotka myös kantavat pinnallaan Clever-1-molekyyliä, heikensivät tappaja-T-soluja aktivoivien vasta-ainelääkkeiden tehoa.

— Koska solunulkoiset vesikkelit syntyvät silmikoitumalla solunsisäisistä kalvorakkuloista tai solukalvosta ja erittyvät solun ulkopuolelle, oli odotettavissa että Clever-1-molekyyliä ilmentävistä makrofageista peräisin olevat solunulkoiset vesikkelit estävät tappaja-T-solujen aktivoitumista, vasta-ainelääkkeiden tehoa ja täten vaimentavat immuunipuolustusta kuten makrofagitkin, Tyni kuvailee.

Tynin saamien tulosten valossa Clever-1-molekyylin toimintaa häiritsevä beksmarilimabi-vasta-ainelääke ei kuitenkaan estänyt solunulkoisia vesikkeleitä heikentämästä tappaja-T-soluja aktivoivien vasta-ainelääkkeiden tehoa.

— Vaikka beksmarilimabilla ei ollutkaan samanlaista suoraa vaikutusta solunulkoisiin vesikkeleihin kuin sillä on makrofagien toiminnalle, tässä työssä saadut tulokset laajensivat jälleen käsitystä siitä, mitkä tekijät syövän mikroympäristössä edesauttavat syövän kykyä torjua sekä immuunipuolustusta että immuunipuolustuksen herättämiseen perustuvien hoitojen tehokkuutta. Solunulkoisten vesikkelien aiheuttama vastustuskyky on syytä huomioida uusien hoitomuotojen kehittämisessä, Tyni summaa.

## **New method for analysing metabolites associated with Type 1 diabetes**

*Microbial modified bile acids are known to be associated with several disease however, such bile acids are chemically diverse and found in various concentration in biological samples. Sensitive analytical techniques such as liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) is required for their proper identification and quantification. As a part of a master's thesis in system medicine group, Pragya Karmacharya is involved in method development, optimisation and comparison of two analytical approaches for detection of 110 recently discovered microbial bile acids amidates (BAAs) in faecal samples. She will also investigate their pattern in relation to Type 1 diabetes (T1D).*

### **Pragya Karmacharya**

Supervisors: Postdoc. Matilda Kråkström, Dos. Santosh Lamichhane  
MOLECULAR SYSTEM BIOLOGY

LC-HRMS are powerful analytical tool for separation of hundreds of compounds in a single run. Advancement in mass spectrometry (MS) has evolved in development of many new approaches. However, selection of suitable MS approaches depends on the metabolites to be analysed. In the first part for her thesis work, Karmacharya has involved in comparing two untargeted MS acquisition namely, information dependent acquisition (IDA) and data independent acquisition (DIA) to detect 110 BAAs.

- Both IDA and DIA are able to generate MS<sup>2</sup> spectra of fragment ions however, our comparative study has shown that for detection of BAAs, IDA outperforms DIA with coverage of maximum number of compounds detected as compared to DIA.

In the second part of thesis work, with the optimised IDA technique, Karmacharya will analyse 110 BAAs in children who are prone to T1D. Bile acids (BAs) acts as a ligands to perform various biological role such as metabolism of glucose and lipids. Recently, it was discovered that gut microbes (GMs) are able to conjugate BAs with other amino acids forming BAAs. Although previous studies have already shown that there is alteration in GMs and their modified BAs in the children who progress to T1D, however, not much is known about the recently discovered BAAs in T1D.

- Our preliminary qualitative result have shown that there is alteration of BAAs in faecal sample of children. Our novel finding shows that in children primary conjugated BAAs are present in maximum number as compared to secondary BAAs. This shed a light that children prone to T1D will have altered BAAs, however quantitative analysis between the children are still in progress.

Hence, our study can pave a way for comprehensive understanding of T1D for early diagnosis and prevention. Also, optimized IDA for BAAs can be a valuable tool for analysis of biologically essential, BAAs in various other disease conditions.

## **Novel strawberry hybrids with more flavour**

*The new hybrid strawberries had more intense flavours than a commercial cultivar as tested by sensory panel. Master's Degree student Carla Vecenâncio compared the sensory and chemical profiles of these strawberries to traditional cultivars. Hybrid strawberries also had overall less intense red colour, which is one of the most important quality properties of commercial strawberries.*

### **Carla Vecenâncio da Silva**

Supervisors: D.Sc. (Tech) Niina Kelanne, Doc. Oskar Laaksonen, Assist. Prof. Maaria Kortensniemi

FOOD DEVELOPMENT

Carla Vecenâncio is comparing hybrid strawberries to commercially available varieties. The strawberries were developed in the NORDFRUIT breeding program at Natural Resources Institute Finland (Luke) aiming to find new cultivars that can withstand the harsh winter conditions in the Nordic countries. Carla's research indicates the new hybrid cultivars have a more intense total flavour. At the same time, analyses revealed they also had less intense red colour and a higher number of seeds, contributing to a rough mouthfeel.

### **Sensory evaluation of strawberries**

Nine volunteers were first trained to various properties (appearance, odour, and flavour) observed in the berry samples. The sensory evaluations had five hybrid strawberries and one traditional cultivar commonly sold at stores. The evaluations were organised in the controlled sensory laboratory conditions at the University of Turku. Evaluation sessions required the participants to try the different pureed strawberries and mark the intensity of each sensory property on a form.

### **Phenolic compounds and challenging analysis**

The phenolic composition of food products is related to their sensory characteristics, contributing to flavour and appearance properties. In strawberries, the red colour is related to the presence of one group of phenolic compounds called anthocyanins.

- Phenolic compounds contribute typically to bitter and astringent flavours, therefore their concentrations can be compared to the results evaluated by the sensory panel, Carla explains.

The phenolic profiles of all samples are being analysed by Ultra High Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector (UHPLC-DAD). However, troubleshooting and method optimization for novel berry material were some of the longest steps in the research to the moment. Even though going through unforeseen problems and seeing an equipment not perform as expected can be frustrating and demotivating, it represents an opportunity to learn. Carla is optimistic that she is close to overcoming these complications.

- This research will help define those hybrids best fit for the future markets, Carla envisions.

## **Pastasäilykkeeseen soveltuvaa pastaa etsimässä**

*Diplomityössään elintarvikevalmistaja Oy Lunden Ab Jalostajalle, Noora Tuominen tutki aistinvaraisten arviointien menetelmillä potentiaalisia pastoja, jotka kestävät teollisen lämpökäsittelyn.*

### **Noora Tuominen**

Supervisors: FT Tarja Aro (Oy Lunden Ab Jalostaja), Dos. Oskar Laaksonen ja Dos.

Jukka-Pekka Suomela

ELINTARVIKEKEHITYS

Tuomisen tavoitteena oli löytää säilyketuotteeseen soveltuvaa pastaa käyttämällä aistinvaraisten arviointien tutkimusmenetelmiä. Alustavat tulokset viittaavat jo siihen, että on löydetty säilykkeissä toimivia pastoja tulosten analysoinnin ollessa vielä kesken. Aistinvaraisissa arvioinneissa talon sisäinen raati arvioi teollisesti lämpökäsiteltyjen pastojen ja pasta-annosten pastojen rakennetta, kypsyyttä, makua ja flavoria sekä muita ominaisuuksia miellyttävyys-, intensiteetti- ja ominaisuuskartoitustesteillä.

Pastan kypsennyskäyttämiseen vaikuttaa tärkkelyksen ja proteiinien käyttäytyminen lämpötilojen vaihdellessa. Se tuo haasteen pasta-aterian monivaiheiseen säilykkeenvalmistusprosessiin, jossa pastaa saatetaan kuumentaa kahdesti. Myös erilaisilla raaka-aineilla on vaikutusta lopputulokseen, sillä pastaa voidaan tehdä erilaisista raaka-aineista, kuten kikherneistä. Kananmunan lisäämisellä taikinaan on myös vaikutusta aistinvaraiseen rakenteeseen ja kypsennyskäyttämiseen, vaikka proteiinipitoisuus ei juuri muuttuisi.

### **Säilykkeiden etuja ovat niiden pitkä säilyvyysaika ja huoneenlämmössä säilyminen**

Einesruuat ovat varmasti tuttuja kaikille, mutta yhtenä heikkoutena niissä on niiden nopea pilaantuminen, kun säilyketuotteet puolestaan kestävät pidemmän säilytyksen. Säilykkeiden pitkä säilyvyysaika perustuu autoklaavisterilointiin, jossa tuotteet kuumennetaan korkeaan lämpötilaan tuotekohtaisesti määräytyväksi ajaksi mahdollisten patogeenien tuhoamiseksi. Mikä olisikaan ollut parempi paikka päästä tutkimaan säilykkeiden valmistusta, kuin pitkät perinteet säilykkeiden valmistuksessa omaava turkulainen elintarviketehdas Oy Lunden Ab Jalostaja.

- On ollut hienoa päästä näkemään tuotantoa suuressa mittakaavassa ja huomata kuinka paljon asioita täytyy ottaa tuotteiden suunnittelussa huomioon, Tuominen kertoo. - Vaikka tämän työn arviointinäytteet tehtiin niin sanottuina käsinäytteinä, niin mielessä piti silti pitää suuremman mittakaavan prosessit, Tuominen jatkaa.

Lopullisia tuloksia odotellaan vielä.

- Viimeiset arvioinnit ovat vielä käynnissä, joten aivan viimeisiä tuloksia ei ole ulkona, eikä analysoituna, mutta alustavat tulokset osoittavat jo, että löytyy potentiaalisia pastoja sekä ominaisuuksia, jotka ovat soveltuvuuden taustalla, Tuominen summaa.

## **Maisteriopiskelija selvittää kasvipohjaisten proteiininlähteiden aminohappokoostumusta**

*Kasvipohjaisilla ruokavalioilla on tunnetusti hyödyllisiä vaikutuksia sekä terveydelle että ympäristölle. Erilaisilla elintarviketeknologian prosesseilla valmistettujen kasviproteiinituotteiden biokemiallisesta koostumuksesta on kuitenkin vain vähän tutkimustietoa. Turun yliopistossa kasvipohjaisten elintarvikkeiden aminohappokoostumusta on tutkinut pro gradu -tutkielmaa tekevä Katariina Kumpula.*

### **Katariina Kumpula**

Ohjaaja: Prof. Kati Hanhineva ja Dos. Jukka-Pekka Suomela  
ELINTARVIKEKEMIA

Elintarvikekemian maisteriopiskelija Katariina Kumpula on perehtynyt pro gradu -tutkimuksessaan kasvipohjaisten elintarvikkeiden aminohappokoostumuksen analysointiin. Tutkimus on osa laajempaa tutkimuskokonaisuutta, joka keskittyy kasvipohjaisten proteiininlähteiden terveysvaikutusten tutkimiseen, sekä uusien kasvipohjaisten uuselintarvikkeiden kehittämiseen. Kumpulan tutkimuksen tarkoituksena on selvittää, miten eri kaupallisten kasviproteiinituotteiden aminohappokoostumukset eroavat toisistaan.

- Tutkimuksessani olen analysoinut eri kasviproteiineista valmistettuja elintarvikkeita, jotka ovat myös eri tavoin prosessoituja. Jo alustavien tulosten perusteella on voitu havaita eroja esimerkiksi soijasta ja herneestä valmistettujen tuotteiden aminohappokoostumuksen välillä. Esimerkiksi histidiiniä oli soijapohjaisissa tuotteissa eniten. Myös prosessointitavalla on todennäköisesti vaikutusta aminohappokoostumukseen, Kumpula toteaa.

### **Menetelmän optimointi osana tutkimusta**

Kasviproteiinituotteiden aminohappoja tutkittiin nestekromatografiamenetelmällä, jossa pieni määrä näytettä injektoidaan ajoliuokseen, joka kulkee kolonnin eli stationääri- ja elutionäri- faasin läpi. Eri aminohapot kulkevat kolonnin läpi omassa tahdissaan, jolloin ne erottuvat toisistaan ja ne voidaan havaita fluoresenssidetektorilla. Menetelmän testausvaiheessa Kumpula käytti työssä aluksi HPLC-kolonnin, mutta siirtyi myöhemmin UHPLC-kolonnin sen tehokkuuden vuoksi.

- Vaihdoin kolonnin äärimmäisen korkean erotuskyvyn kolonniin, sillä sen käyttö lyhensi ajoaikaa ja vähensi kuluva ajoliuoksen määrää. Tämä nopeutti analyysien suorittamista huomattavasti, kommentoi Kumpula.

Tällä hetkellä kaikki näytteet on saatu analysoitua ja tulosten käsittely on hyvässä vauhdissa. Valmistaa ei kuitenkaan tule hetkessä, sillä tulosten analysoiminen on aikaa vievä prosessi.

- Tutkimus on yhä kesken, eikä kaikkia tähän mennessä saatuja tuloksia ole vielä ehditty käsitellä kokonaan. Tärkeintä on saada selville välttämättömien aminohappojen pitoisuudet, sillä niiden avulla voidaan mitata elintarvikkeiden proteiinin laatua parhaiten, Kumpula lisää.

## **Maisteriopiskelija selvittää kaupallisten alkoholittomien oluiden aistinvaraisia eroja ja laatua**

*Tuomas Rysä tarkastelee pro gradu -työssään Turun Yliopistossa kaupallisten alkoholittomien oluiden aistinvaraisia laatutekijöitä, kuten aromiin vaikuttavia yhdisteitä ja kuluttajien kokemuksia. Tulokset osoittavat aistittavan laadun merkittävistä eroista sekä saman oluttyypin sisällä, että eri oluttyyppien välillä.*

### **Tuomas Rysä**

Ohjaajat: Dos. Oskar Laaksonen & TkT. Niina Kelanne  
ELINTARVIKEKEMIA

Alkoholittomien oluiden suosio kasvaa kuluttajien keskuudessa jatkuvasti ympäri maailman. Alkoholittomien oluiden aistinvaraiset maku- ja hajuominaisuudet eivät kuitenkaan vastaa täysin tavanomaisen alkoholipitoisen oluen aistinvaraisia ominaisuuksia, vaikkakin yleisesti tämä on alkoholittomien tuotteiden pyrkimys. Pro gradu -työssään Rysä tutki eri panimoiden valmistamia kaupallisia alkoholittomia oluita. Tutkimuksessa käytettiin sekä kotimaisten panimoiden että ulkomaalaisten panimoiden ja olutbrändien tuotteita. Olutlaaduista tutkittiin alkoholittomia lager-, pils- ja Indian Pale Ale (IPA) oluttyyppejä.

Tarkoituksena on selvittää koulutetun raadin ja kuluttajaraadin avulla keskeisempiä eroja eri olutlaatuojen välillä. Hajuyhdisteitä tutkittiin GC-O-menetelmällä, jossa hyödynnetään kaasukromatografialaitteiston lisäksi samanaikaisesti ihmisarvioijaa olfaktometrin avulla. Tällä menetelmällä saadaan samanaikaisesti haihtuvien yhdisteiden intensiteetit, sekä ihmisarvioijan kuvailu yhdisteestä.

- Olutnäytteistä löytyi paljon haihtuvia yhdisteitä, sekä hajujen kuvailuja näille yhdisteille. Jokaisella arvioijalla on kuitenkin aina omakohtainen kokemuksensa hajusta ja siitä, miltä se hänen mielestään tuoksuu, Rysä toteaa

- Mielenkiintoista onkin, millaisia kuvailuja arvioijat ovat antaneet kullekin yhdisteelle. Annettu kuvailu on helppo yhdistää tietylle yhdisteelle, kun äänitiedostosta otetaan talteen aikapisteet kuvailuista ja yhdistetään ne kromatogrammeissa näkyviin intensiteetti- ja retentioaikoihin, Rysä lisää.

Kuluttaja-arviointi taas suoritettiin yhteensä kuudelle eri kaupalliselle alkoholittomalle olutnäytteelle. Kuluttajaraati arvioi oluiden makua ja hajua choose-all-that-apply ja rate-all-that-apply menetelmillä, sekä arvioimalla makujen ja hajujen ominaisuuksia asteikolla 1–10.

- Kuluttajaraadilla saadut tulokset koskien näytteiden makua ja hajua antoivat myös kiintoisia tuloksia. Kahden eri valmistajan IPA:t poikkesivat tilastollisesti merkittävästi toisistaan kysyttäessä hajun raikkautta. Osassa näytteissä oli alkoholia 0.3 % ja osassa 0 %, mutta tulosten perusteella tilastollisesti merkittävää makueroa ei alkoholin maun suhteen ollut, Rysä jatkaa.

## **Determining Fatty acid compositions of seafoods, milk, and oil lipids by advanced chromatographic separation techniques**

*Nita Pokharel, who is doing her Master's Thesis in Food Development has been identifying different fatty acids in seafood, milks, and plant oil lipids. For identifying fatty acids, she is using chromatographic techniques such as GC-FID and GC-MS. In addition to this work, she is attempting to validate the method development for identifying fatty acids using GC-FID and GC-MS.*

### **Nita Pokharel**

Supervisors: Ph.D. Marika Kalpio, Ph.D. Jukka-Pekka Suomela, it  
FOOD DEVELOPMENT

Nita Pokharel is working to identify different types of fatty acids present in marine, milk, and oil lipids. As fatty acids are energy source primarily and are important to maintain the body homeostasis, it is important to know about the types of fatty acids and their role in body physiology. There are numerous techniques to identify fatty acids, but her work is primarily focused on using chromatographic techniques to distinguish types of fatty acids. Her work is not limited to the identification of fatty acids present only but expands to determine the accurate concentrations of each fatty acid methyl ester present in the test sample. Currently, she is analyzing 3 different milk samples, 3 different marine samples, and 2 different oil samples.

### **Interesting differences in fatty acid composition**

With the use of advent chromatographic techniques, Nita has found a different types of fatty acids in different lipid samples. Interestingly, Nita has found more fatty acids in mustard oil compared to linseed oil. Additionally, based on the area percentage in mustard oil erucic acid, 22:1 (n-9) has been found in higher amounts followed by oysters with no detection in other samples. As predicted, Nita has found a higher number of fatty acids in a seafood sample. Moreover, Pokharel reported vendace sample constituted a higher number of fatty acids that is 30 different fatty acid esters compared to any other samples.

### **Optimization of analysis method is the basis of reliable results**

For the quantification, Pokharel is working with chromatographic separation technique and mass spectrometry. Pokharel is optimizing the working conditions to increase the robustness of the system. Interestingly, she found that optimization in chromatographic parameters, fatty acids from different food sources were able to separate from each other. Good chromatographic separation is the basis of reliable identification. Similarly, during the Mass spectrometry analysis, Pokharel observed that changing temperature and optimizing MS parameters resulted in better separation as well as fragmentation of peak for GC-MS.



## **The Benefits of Omega-3 Fatty Acids for Your Body**

*Our bodies need certain fats called omega-3 fatty acids to stay healthy. One of these fats, called docosahexaenoic acid (DHA), is especially important for the development and function of the brain & eyes. It is known that the position of fatty acid in the triacylglycerol molecule affects its metabolism in the human body. Our study found that DHA is accumulated better in visceral fat when it's located in the specific position of triacylglycerols.*

### **Xiangrong Fang**

Supervisor: Ph.D. researcher Yuqing Zhang, Ph.D. Marika Kalpio  
FOOD DEVELOPMENT

In this study, three groups of rats were fed with triacylglycerols, where DHA was either in position 1, 2 or 3. We found that the DHA-3 group had more of certain types of fats (such as 20:1(n-9), 20:4(n-6) and n-3 fatty acids in visceral fat compared to the DHA-1 group. But when DHA was in position 2, there were no significant differences in the types of fats found in the visceral fat of rats. This study highlights how the location of DHA in triacylglycerols can affect its metabolism in rats.

People get DHA mainly from fish and other marine products. DHA is an essential fat for our bodies, but many people around the world have a deficiency of it and our body doesn't synthesize it effectively. New studies have shown that the way DHAs are distributed within triacylglycerols can also affect how well our bodies absorb them.

### **How can we make the best use of omega-3 fatty acids?**

Our study aimed to find out if the position of DHA in triacylglycerols affects how well rats absorbed it by analyzing the composition of the visceral fat. The researchers created three types of artificial triacylglycerols with DHA on different positions (*sn*-1, *sn*-2, and *sn*-3) and gave them to male rats for four weeks, along with three control groups.

We analyzed the fats in the rats' visceral fat using gas chromatography to see if there were any differences in the types of fats present. We found that the position of DHA in the triacylglycerols did make a difference in the types of fats found in the rats' visceral fat. We could have more studies in the future to verify the results and also make clinical trials on humans to extend the study.

## Study on Encapsulation's Effect on n-3 Polyunsaturated Fatty Acids for Food Fortification

*Encapsulation of oils is an effective technique that has gained significant popularity in recent years, offering a multitude of benefits, including powdered or spherical physical form and increased stability of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs), which are essential for human health. With encapsulation, the oils are protected by a barrier that effectively prevents oxidation and masks off-flavors, resulting in an improvement in sensory quality. Master's student Saida Samadova investigated the effect of encapsulation on the fatty acid composition and release of volatiles from linseed oil ethyl esters, as well as the impact of in vitro digestion on fatty acids in prilling-encapsulated microalgae oil. The results have shown that, for food fortification applications using linseed oil ethyl esters, the most promising formulation is encapsulation with pregelatinized potato starch in terms of fatty acid composition and with maltodextrin in terms of total volatile release.*

### Saida Samadova

Supervisors: PhD Annelie Damerou, Prof. Kaisa Linderborg  
FOOD DEVELOPMENT

The study emphasizes the importance of encapsulation in improving the quality of n-3 PUFAs and provides valuable insights into the best encapsulation methods for different types of oils. Encapsulation was performed using various starches through spray-drying. As methyl esters, fatty acid profiles were examined using gas chromatography (GC) with a flame ionization detector (FID), whereas volatiles were analyzed using headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS).

- I found that **ethyl ester production and spray-drying had a minimal impact on the fatty acid composition of linseed oil**, consisting of ALA (54.7%), oleic acid (19.2%), linoleic acid (16.2%), palmitic acid (5.5%) and stearic acid (2.7%). Additionally, I analyzed the **volatile profiles and found that the masking of potential flavors depends on both the type of starch and the level of gelatinization**.

The study also investigates the influence of prilling-encapsulated microalgae oil on fatty acids during in vitro digestion. The data analysis of microalgae oil samples is ongoing, and the study is expected to provide further insights into the impact of encapsulation on the quality of n-3 PUFAs.

- The findings of this study could have significant implications for the food industry, as encapsulated n-3 PUFAs could be used in a wide range of food products to enhance their nutritional value and sensory quality. It is important to further investigate the effects of encapsulation in different types of oils and develop more effective methods, Samadova points out.

## **Novel flavourful berry wines created from challenging lingonberries.**

*Shania Saini, a Master's Technology student in Food Development, developed a method to make lingonberry wines (~7.5% alcohol) after benzoic acid reduction. Lingonberries are widely available in Finland and considered a superfruit due to their health benefits. However, the presence of a preservative (benzoic acid) prevents their usage in winemaking. Shania found from the developed wines' volatile composition and sensory attributes that a desirable flavour was generated; pointing towards a commercialization potential.*

### **Shania Saini**

Supervisors: Ph.D. Doc. Oskar Laaksonen, D.Sc. Tech. Niina Kelanne  
FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

After significant reduction of the initial benzoic acid content, wines with an average alcohol content of 7.7% (in incubator; IB) and 7.3% (at room temperature; RT) were successfully created. After fermentation, the typical lingonberry flavour decreased while astringency, bitterness, ester- and alcohol-like odours increased. This was supported by a surge in contents of volatile esters and higher alcohols, along with a decrease in terpenes (except linalool and alpha-terpineol) after fermentation compared to lingonberry juice.

### **How were these wines developed?**

The wines were made after decreasing benzoic acid by mixing in baker's yeast using a specific process. After reduction of benzoic acid below critical limit, fermentation was carried out by dilution of processed juice with water and total suspended solids were adjusted to original juice's value to ensure proper yeast nutrition. Fermentations were stopped after complete consumption of additional sugars. The fermentations were carried out at room temperature and in an incubator.

### **Is it a generic creation?**

As per my knowledge, this is the first promising scientific attempt at non-pH changed lingonberry wine development that studies the impact of conventional (*Saccharomyces cerevisiae*) and non-conventional (*Torulaspota delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima*) yeasts on chemical composition and flavour profile, Shania explains. An earlier study attempted to create lingonberry wine and profile volatile flavours using another non-conventional yeast but detected an off taste.

### **What is their importance?**

Lingonberries have a challenging flavour profile due to their intense sourness and bitterness. This leads to a decrease in consumer acceptability of non-sugar added lingonberry products. Fermentation of lingonberries after benzoic acid decrease leads to advantageous usage of pre-existing desirable bitter flavour. This could increase marketability of an abundant Nordic resource with antioxidants, vitamins (C, A, and E), fibres, and minerals. Future studies should focus on improvement of fermentation process to eliminate oxidation, decrease time, and scale-up the process, Shania states.

## **A study on the chemical composition of old Finnish apple cultivars for quality cider.**

*The drawback in cider making is the selection of apples with quality yield. In her master's thesis study, Okwum Ada investigates certain characteristics of native apples that make them good for cider. Fermentation of old native apple cultivars with selected yeast strains produced high amounts of ethanol and organic acids thereby showing potential for quality ciders.*

### **Okwum Ada Obianuju**

Supervisor: Docent. Oskar Laaksonen, D.Sc. (tech) Niina Kelanne  
FOOD DEVELOPMENT

Ada has recently produced ciders from old Finnish apple cultivars that are grown at St. Mary's parish garden Turku, she is currently studying the residual sugars, ethanol, organic acids, and color properties. Apple ciders were prepared by adding *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii* yeast strains to the apple juices.

“Differences in the chemical composition of apple cultivars, such as organic sugars and acids and type of yeast used impact the quality of the final ciders product.” Ada explains.

*S. cerevisiae* and *T. delbrueckii* yeast strains were found to have a distinctive impact on the apple ciders, one of the cultivars with an initial Brix's value of 11.5 fermented with *S. cerevisiae* produced 5.3—6.6 percent ethanol. *T. delbrueckii* however produced a slightly lower percentage of ethanol (5.7—6.0).

Another cultivar with an initial Brix's value of 9.2 had ethanol percent from 4.3— 4.6 and 4.0—4.5 for ciders with *S. cerevisiae* and *T. Delbrueckii*, respectively. Malic acid, succinic acid, and quinic acid were identified to be dominant organic acids in the fermented juices by both yeast strains while citric acid was observed in lower concentration.

### **Toward better apple ciders production**

Although the chemical composition of these apple cultivars are currently been investigated in this present study the sensory properties of the fermented juice need to be studied to make them suitable for commercial cider production.

“The results obtained from this experiment will provide new knowledge about the possibility of producing high-quality apple ciders commercially using native Finnish apple cultivars” says Ada.

## **Production of vinegar from apple peels – potential of using different yeast species**

*Approximately 21.6 % of fruit production is wasted, partly as side streams from food industry that manufacture several products. Master's student Elsa Xifre successfully produced apple cider vinegar out of apple peels coming from juice production. To do so, three different species of yeast were first used, resulting in slightly different ethanol levels and final acetic acid contents.*

### **Elsa Xifre Pujol**

Supervisors: D.Sc. (tech.) Niina Kelanne, Doc. Oskar Laaksonen  
FOOD DEVELOPMENT

In her master's thesis project, Elsa Xifre aimed to find a way to valorize apple peels, which, otherwise, would have been waste, by making vinegar. Three fermentation strategies were first used in the production of alcoholic apple peel beverage, to detect any difference on their performance and on the final product. Elsa determined that there were differences among yeast, regarding ethanol content.

### **How is vinegar produced and how can yeast species affect?**

Generally, vinegar is a product obtained after an alcoholic fermentation followed by an acetic fermentation of a raw material. The first fermentation is performed by yeast, while the second one is performed by acetic acid bacteria. In this study, the raw material was apple peels from Aleksanteri variety, locally cultivated in the garden of St Mary's Parish. The three inoculated yeast strains were *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbureckii* and *Lachancea thermotolerans*. Finally, acetic acid bacteria were obtained from an unpasteurized and unfiltered apple cider vinegar.

During the alcoholic fermentation yeast use sugars from the raw material to produce ethanol. Clear differences were already detected after alcoholic fermentation.

- Samples inoculated with *S. cerevisiae* had the highest ethanol content after alcoholic fermentation, followed by *L. thermotolerans/S. cerevisiae* and *T. delbrueckii*, Elsa tells.

- During the acetic fermentation, previously produced ethanol is converted into acetic acid. Latest results indicate that different contents of acetic acid were obtained depending on the yeast species, she continues

The next and final step is to analyze volatile compounds of the obtained vinegar to determine if yeast species have also an impact on these.

World population is expected to keep growing, demanding an increase of 60-70% of food production. This, along with the precarious environmental conditions that surround us, makes feeding this population an enormous challenge.

- Chemical composition of waste products derived from food industry still has a market value. Therefore the scientific community is getting interested in finding ways of valorizing this waste and turn it into viable new food products. Hopefully in the future more people will be aware of this situation and will be more committed to finding new solutions and following a circular economy plan, Elsa states.

## **Novel Screening Process and Investigating of Fermentation Kinetics to Optimizing the Health Promoting Potential of Food Fermentation Strains**

*Zeynep Öztürk, who is doing her Master's Thesis in Food Development, has been screening lactic acid bacteria in faba concentrate and oat flour and oat concentrate media for their optimal fermentation and health-promoting potential. She is also monitoring and profiling fermentative performance, growth kinetics, acidification, metabolite production, and health-focused functions such as degradation of fibers and antinutrients during fermentation in food-like media.*

### **Zeynep Öztürk**

Supervisors: Ph.D. Hanna-Leena Alakomi, Ph.D. Riikka Juvonen, Doc. Oskar

Laaksonen

FOOD DEVELOPMENT

Zeynep Öztürk is working to create healthier, more delicious, and more sustainable plant-based food using the power of fermentation. Initially, Öztürk used chemically defined media to characterize functional features for pulse and cereal fermentations of selected strains. Öztürk screened different types of bacteria using a special and novel tool called the Bioscreen in different growth media, including faba, oat concentrate, and oat flour-based media, to determine their suitability for fermentation and health-improvement effects by breaking down certain parts of the food and making them easier to digest.

### **Selected strains and their consortium show promise in plant-based fermented foods**

Öztürk carefully monitored the growth of these selected strains and the fermentation process by measuring several parameters, including growth rate, acidification, and metabolite production. She found that most of the selected lactic acid bacteria strains grew well in food-based media, indicating their ability to utilize these growth substrates.

During the fermentation process, Öztürk observed an increase in the number of viable cells of some selected strains, indicating active growth. She also found that the media underwent some acidification, primarily due to the lactic acid produced by the bacteria.

In addition to acid production, Öztürk expects to find production of several metabolites, including organic acids which contribute to the sensory properties of the fermented foods. After the fermentation process, she also expects reducing in the phytic acid content, which can inhibit the absorption of minerals in the body.

### **Monitoring fermentation and investigating health promoting effects still continues**

Faba and oat are rich in fiber and protein, making them ideal for health-conscious consumers. However, their consumption can be limited by factors such as indigestibility and high phytic acid content. Fermentation has been shown to improve the nutritional quality and digestibility of these foods while also enhancing their flavor and texture.

Öztürk is examining the effectiveness of lactic acid bacteria in breaking down fiber and other substances that may be challenging for our bodies to metabolize. This study offers potential to create novel, healthier, and more sustainable food products that can benefit both consumers and the environment.

## **Master's thesis study examines differences in the lipid profiles of plant-based meat alternatives.**

*Novel plant-based meat alternatives are a group of products based on plant sources of protein including soy, peas, oats, and a variety of beans, developed to mimic the appearance, texture, and sensory attributes to meat. As a part of the Newplant project, Master's student Samantha Hedwig Wadiyo compared the nuclear magnetic spectrums of the lipid profiles of 178 samples including plant-based meat alternatives, their raw ingredients, and animal meat sourced products available in the Finnish market. The preliminary results highlighted the polar lipids present, identifying fava beans, peas, oats, and soy as key protein sources with relatively higher amounts of polyunsaturated fatty acids, and triacylglycerols.*

### **Wadiyo Samantha Hedwig**

Supervisors: D.Sc. (Tech) Kang Chen, Assist. Prof. Maaria Kortensniemi, Prof. Kati Hanhineva

FOOD DEVELOPMENT (TECH)

The study compared the protein source of the product, that is, which plant or animal source it was from, as well as the level of processing; from unprocessed/minimally processed to highly processed products. The product type, for example tofu, nuggets, balls, minced products among others, was also considered. The products were based on 13 plant-based protein sources, 4 animal-based protein sources, and 11 product types. Samantha found that moderately and highly processed fava beans, peas, oats, and soy protein-based products showed interesting results in regard to lipid content.

Ball-type products and tofu showed a relatively higher amount of polyunsaturated fatty acids. Additionally, balled and nugget samples, as well as products sourced from peas and oats showed a relatively higher quantity of total triglycerides, including omega-3 and omega-6. Among the animal sourced, salmon stood out, showing a higher amount of polyunsaturated fatty acids similar to the balled products and tofu. Additionally, salmon showed a greater amount of docosahexanoic acids, which was also observed in products made from oats.

### **The future of novel plant-based foods**

Samantha found that the rising concerns about human health, population growth, climate change, and animal welfare has heralded a transition in the nutritional and dietary concerns globally. More individuals are concerned about the healthiness, nutritional value, and quality of the foods that they consume, leading to an increased popularity of alternative diets, notably vegetarianism, and veganism.

Samantha explains that the food industry is invested in research towards the development of healthier and ethically produced alternatives, as well as improve on the already existing market offerings to meet the changing needs of the population. As more individuals shift towards a more plant-based diet, there is heightened interest in the structure and formulation of plant-based meat alternatives, with the goal of determining their efficacy as a replacement for protein and other nutrients abundant in animal meat.

Samantha plans to continue this study, thereby contributing to the growing field of plant-based food research and provide insight into the development of new, healthier food options.

## **The sensory study offers insights into the taste and texture of commercial plant-based meat alternatives.**

*While taste and texture are the main determinants driving consumer purchase behavior of plant-based meat analogs, there is limited research on their sensory characterization, especially the commercially available ones. Master's student Stella Kpaduwa characterized taste and texture attributes of commercial plant-based meat analogs from two categories: mildly processed and refined plant-based foods. Understanding the sensory attributes of these commercial products provide valuable information for manufacturers to develop plant-based meat analogs that are like conventional meat and support sustainability.*

### **Onyinyechi Stella Kpaduwa**

Supervisors: Ph.D., Docent Oskar Laaksonen, Prof. Kati Hanhineva  
FOOD DEVELOPMENT

The findings of the study suggest that the sensory characteristics of plant-based meat analogs can vary significantly depending on the ingredients, protein sources, processing methods, and cooking techniques used. Some products showed similarity to the taste and/or texture of meat more closely than others, while some had distinct tastes and textures that are not meat-like but may appeal to different consumers. Kpaduwa identified important sensory attributes of plant-based meat alternatives including sweetness, saltiness, umami, chewiness, moistness, and rubbery. Samples with higher levels of umami had a more meat-like taste than others, especially the fermented samples with a characteristic bitter taste. On the other hand, samples with higher crumbliness, graininess, and softness were less meat-like in texture compared to samples with higher chewiness and moistness.

“The sensory characteristics of plant-based meat alternatives are crucial to their success in the marketplace. Hence, manufacturers need such information to develop more diverse and innovative plant-based meat products to increase consumer acceptance”, explains Kpaduwa.

In this study, ten panelists were recruited and trained to use the descriptive-analytical method to evaluate commercial plant-based meat analogs by comparing their taste and texture to references. The products were prepared by simple cooking methods like frying (without oil) and boiling according to the manufacturer's instructions. Contrary to previous studies, Kpaduwa did not use animal meat as a reference because of the dissimilarity of the samples. However, she identified attributes identical to those from previous studies. This study is part of Professor Kati Hanhineva's Newplant project focused on the health benefits of plant-based foods and the development of novel foodstuffs.

“So far, we have characterized nine commercial plant-based meat analogs from mildly processed and refined plant-based foods and the data analysis is ready. Next, we will organize another sensory characterization focusing more on the refined category to investigate the influence of isolates and concentrates on taste and texture attributes of the products”, says Kpaduwa.

By understanding how different ingredients, protein sources/types, and processing methods affect the taste and texture of these products, we can work towards creating plant-based meat analogs that are more appealing and satisfying for consumers. The outcomes of this study have important implications for the plant-based food industry, which has seen a surge in demand in recent years as consumers gain interest in more sustainable and healthy alternatives to traditional meat products.



## **Erikoistyöopiskelija tutkii lupiinin fermentoinnin mahdollisuuksia**

*Makealupiini on Suomessa huonosti tunnettu kasviproteiinin lähde. Lupiinista valmistettua fermentoitua juomaa voidaan käyttää korvaamaan maitotuotteita. Malviina Nikola tutkii diplomityössään bioreaktorilla suoritetun fermentoinnin vaikutusta makealupiinista valmistettuun kasvijuomaan. Alustavat tulokset osoittavat fermentoinnin onnistuvan maitohappobakteereilla.*

### **Malviina Nikola**

Ohjaajat: FM Jasmin Raita, TkT Niina Kelanne, FT Oskar Laaksonen, Prof. Kati Hanhineva  
FOOD DEVELOPMENT

Fermentointia käytetään yleisesti elintarvikkeiden säilyvyyden, tuotteen ravintoarvojen ja aistinvaraisten ominaisuuksien parantamiseen. Nikola tutkii maitohappofermentoinnin vaikutuksia makealupiinin siemenistä valmistettuun kasvipohjaiseen juomaan. Fermentoinnissa käytetään *Lactiplantibacillus Plantarum* -maitohappobakteereita. Nikola analysoi fermentoidut lupiinijuomat kaasukromatografilla sokeri- ja happokoostumuksien määrittämiseksi. Fermentoinnin onnistumista tarkasteltiin myös pH-arvon muutoksen avulla. Alustavien tulosten mukaan fermentointi vaikuttaa merkittävästi tuotteen sokeri- ja happokoostumukseen.

Makealupiinia on toistaiseksi käytetty enimmäkseen eläinten rehuna. Kyseinen lajike on eri kuin pientareilta tuttu myrkyllinen komealupiini, joka tunnetaan myös vieraslajina. Makealupiinin siementen korkea proteiinipitoisuus tekee siitä haastajan tuontisoijalle, herneille sekä muille kasviproteiinin lähteille. Lupiininsiemenet kuitenkin vaativat teknologista prosessointia kuten fermentointia ravintoarvojen ja aistinvaraisten ominaisuuksien parantamiseksi.

- Fermentoinnit aloitettiin tekemällä testieriä pulloissa, mutta nyt olemme siirtymässä bioreaktorilla fermentoimiseen. Bioreaktorin avulla pystymme paremmin seuraamaan lupiinimaidossa tapahtuvia muutoksia fermentoinnin ajan, Nikola toteaa.

Nikolan työ on osa isompaa tutkimusprojektia, jossa tutkitaan kasviperäisiä elintarviketuotteita monin eri menetelmin. Tutkimusprojekti keskittyy terveysvaikutusten tutkimiseen ja uusien kasvipohjaisten elintarvikkeiden kehittämiseen. Tuloksia on vielä niukasti, sillä työ on vielä kesken. Tulokset tulevat tarkentumaan tulevaisuudessa.

## **Perustutkimus valottaa mekanismeja taudinaiheuttajien taudinaiheuttamiskyvyn taustalla**

*Vain osa solujen perinnöllisestä eli geneettisestä materiaalista on aktiivisessa käytössä yksittäisellä ajanhetkellä. Verner Nissilä osoitti pro gradu -työssään, että kahden erillisen geeniryppään aktiivisuus määräytyy spirokeettabakteereissa kahden proteiinin, CarD:n ja DksA:n, vuoropuheluna.*

### **Verner Nissilä**

Ohjaaja: Dosentti Georgi Belogurov  
BIOKEMIA

Valtaosa bakteerien geneettisestä eli perinnöllisestä materiaalista on tallentuneena valtaviin DNA-kromosomeihin. Bakteerien kromosomeissa on keskimäärin joitain tuhansia genejä eli toiminnallisia jaksoja, joista kukin sisältää ohjeen geenituotteen eli toiminnallisen molekyylin tuottamiseksi. Verner Nissilä osoitti pro gradu -työssään CarD- ja DksA-proteiinien ohjaavat sitä, kuinka aktiivisia erilaiset geenit ovat soluissa.

— Käytin kokeissani kahdenlaisia lyhyitä DNA-jaksoja, jotka esiintyvät spirokeetoilla hyvin erityyppisten geenien edellä: toinen jakso esiintyy tyypillisesti ennen ribosomaalisia genejä, toinen taas ennen joitain tavalliseen metaboliaan liittyviä genejä, Nissilä kuvaa tutkimusasetelmaansa.

Genejä edeltävät DNA-jaksot, promoottorit, vaikuttavat ratkaisevasti siihen, kuinka aktiivinen niiden jälkeinen geeni on. Nissilä tuotti laboratoriossa DNA-jaksoja, joissa kahden erilaisen promoottorin jälkeen DNA:han istutettiin geeni, jonka RNA-kopion kertymistä oli helppo seurata reaaliajassa.

— Jotta perinnöllinen tieto on mahdollista saada aktiiviseen käyttöön, pitää siitä tehdä ensin kopioita. RNA-polymeraasiksi kutsuttu entsyymi kopioi koko ajan pieniä pätkiä kromosomien DNA:ta RNA:ksi, ja vasta näissä RNA-molekyyleissä perinnöllinen tieto on sellaisessa muodossa, jossa solu pystyy käyttämään sitä aktiivisesti.

— Jotkin promoottorit ovat rakenteeltaan sellaisia, että RNA-polymeraasi löytää niiden luo tehokkaammin. Tämän vuoksi tehokkaampien promoottoreiden läheisyydessä olevista geneistä tuotetaan verrattain suuri määrä RNA-kopioita. Paljon kopioituneet geenit vaikuttavat solun toimintaan voimakkaasti, Nissilä havainnollistaa tutkimuksen tieteellistä taustaa.

### **CarD ja DksA hienosäätävät RNA:n tuotantoa**

Tutkimuksessa osoitettiin, että tavallinen ja ribosomaalinen promoottori toimivat soluissa eri tavalla: RNA-polymeraasi sitoutuu hanakammin promoottoriin, joka tyypillisesti edeltää ribosomaalisia genejä. Nissilä kuitenkin huomauttaa, että tilanne on harvoin soluissa näin yksinkertainen:

— Saimme osoitettua, että kaksi tutkimaamme proteiinia, CarD ja DksA, vaikuttavat RNA-polymeraasin tehokkuuteen eri tavalla näiden kahden promoottorin kohdalla. Tulokset eivät yksinään muuta käsitystämme spirokeetoista, mutta jatkotutkimuksissa saatamme löytää mekanismeja, jotka selittävät bakteerien taudinaiheuttamiskykyä aiempaa paremmin, Nissilä iloitsee.

## **Äidinmaidon vasta-ainekoostumuksen vaikutus lapsen HPV-infektion kehitykseen**

*Äidinmaidon koostumus vaihtelee eri ihmisillä ja muun muassa eri mikrobeja vastaan olevien vasta-aineiden määrät maidossa voivat poiketa suuresti äidinmaitojen välillä. Turun yliopistossa pro gradu -tutkielmaansa tekevä Josefiina Mäkinen pyrkii selvittämään, ovatko HPV16 vasta-aineet yleisiä äidinmaidossa ja onko niiden määrällä vaikutusta varhaislapsuuden HPV-infektion syntyyn ja kehitykseen.*

### **Josefiina Mäkinen**

Ohjaajat: Dos. Vuokko Loimaranta, Prof. emer. Stina Syrjänen, Prof. Karolina Louvanto  
MOLEKYYLIBIOTIETEET, BIOKEMIA

Ihmisen papilloomavirukset (human papilloma virus, HPV) ovat yleisiä limakalvo- ja ihoinfektioita aiheuttavia DNA-viruksia. HPV-infektiot ovat usein oireettomia ja paranevat spontaanisti, mutta infektio voi myös kroonistua. HPV-virukset voidaan jakaa suuren ja pienen riskin HPV-tyyppeihin niihin liittyvän syöpäriskin mukaan. HPV16 on suuren riskin HPV-virus, jolla on vahva yhteys erityisesti kohdunkaulan syöpään. Lapsi voi saada HPV tartunnan äidiltään synnytyksen yhteydessä, mutta tällä hetkellä ei ole tarkkaa tietoa siirtyykö äidin HPV-vasta-aineita lapselle tai mikä on niiden merkitys lapsen HPV-infektiolle. Osana Turun yliopiston Hammaslääketieteen laitoksen ja TYKS:n Naistentautien yhteistä HPV-infektion luonnollista taudinkulkua selvittävää pitkittäistutkimusta, lähdimme selvittämään äidin HPV16 vasta-aineiden erittymistä äidinmaitoon. Nyt analysoidut äidinmaitonäytteet oli kerätty lasten ollessa noin kahden kuukauden ikäisiä.

Lapsen immuunijärjestelmä kehittyä täysin toimivaksi vasta syntymän jälkeen. Äidinmaidon sisältämät vasta-aineet suojaavat lasta infektioilta ja auttavat lapsen oman immuunijärjestelmän kehityksessä. Äidinmaidon koostumus on vahvasti yksilöriippuvaista, mikä huomattiin myös tässä tutkimuksessa, kun Mäkinen aloitti selvittämään noin 100 äidinmaitonäytteestä immunoglobuliini A (IgA) vasta-aineiden kokonaismäärää. Sekretorinen IgA on suurin äidinmaidossa ilmenevä vasta-aineryhmä ja tässä tutkimuksessa analysoiduissa äidinmaitonäytteissä oli keskimäärin IgA vasta-aineita noin 500 µg/ml, mutta vaihtelu eri näytteiden välillä oli huomattava (vaihteluväli 100–1000 µg/ml).

Vasta-aineiden kokonaismäärän mittaamisen jälkeen lähdimme pystyttämään ja optimoimaan HPV16 spesifistä ELISA-määrittystä (eng. **E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) äidinmaitonäytteille. Määrittelyn optimointi on tällä hetkellä loppusuoralla ja sen valmistuttua aloitamme HPV16 spesifit vasta-ainemääritykset samoista äidinmaitonäytteistä. Tulokset tuovat täysin uutta tietoa HPV-infektioiden immuunivasteesta oireettomilla, imettävillä äideillä ja äidinmaidon mahdollisesta merkityksestä lapsen HPV-infektiolle.

## Darpiini-sitojamolekyylien potentiaali lääkeaineina

*Suunnitellut ankyriinotoistoproteiinit eli darpiinit (engl. Designed ankyrin repeat protein, DARPIn) ovat tiettyyn molekyyliarakenteeseen tarkoin sitoutuvia molekyyliä. Pro Gardu työssään Iida Payne on löytänyt useita darpiineja, jotka kiinnittyvät kohteeksi valittuun mCherry-proteiiniin. Hän on fuusioinut kaksi darpiinia yhteen luoden kahteen eri rakenteeseen samanaikaisesti sitoutuvan molekyylin.*

### Iida Payne

Ohjaaja: Dr. Tuomas Huovinen, Dr. Bryce Nelson ja Dr. Ralf Paul  
MOLEKYYLIBIOTIETEET, BIOKEMIA

Iida Payne tutkii työssään darpiineja, jotka ovat spesifisesti tiettyyn rakenteeseen sitoutuvia molekyyliä. Spesifisen sitoutumiskyvyn ansiosta darpiineja voidaan käyttää useaan eri sovellukseen diagnostiikasta mahdollisiin syöpälääkkeisiin. Tutkimuksessaan Payne on löytänyt useita darpiineja, jotka sitoutuvat malliantigeeniksi valittuun mCherry-proteiiniin. Darpiinien metsästys tapahtui faaginäyttökäsi kutsutulla menetelmällä bakteeriviruksista, bakteriofaageista, joiden genomeihin oli lisätty erilaisia darpiineja tuottavia geenejä, Payne toteaa. Darpiinikirjasto, jota Payne käytti työssään on kehitetty Turun yliopistolla tohtori Tuomas Huovisen toimesta. Darpiinikirjastosta on mahdollista löytää sitoja teoriassa mille tahansa rakenteelle.

### Darpiineista vasta-aineiden korvaajiksi?

Darpiinit ovat melko yksinkertaisia molekyyliä sekä pienikokoisia rakenteeltaan. Varsinkin jos niitä vertaa vasta-aineisiin, jotka ovat yhtäläillä spesifisesti sitoutuvia molekyyliä, Payne jatkaa. Darpiinien tuottaminen onkin helpompaa ja edullisempaa kuin vasta-aineiden. Payne pitää tätä jo hyvänä syynä tutkia darpiinien käyttömahdollisuuksia lääkeaineina vasta-aineiden tapaan. Oleellisimmaksi asiaksi darpiini tutkimuksessaan Payne kuitenkin nostaa mahdollisuuden linkittää kaksi tai useampi darpiini yhteen molekyyliin luoden multispesifisen lääkeaineen. Tällöin useasta darpiinista fuusioitunut molekyyli pystyy samanaikaisesti sitoutumaan eri kohteisiin tai vaihtoehtoisesti saman molekyylin eri kohtiin nostoen näin sitoutumisen vahvuutta.

Tutkimuksissaan Iida Payne on onnistuneesti linkittänyt kaksi eri mCherry-proteiiniin sitoutuvaa darpiinia yhdeksi molekyyliksi. Kahden eri darpiinin fuusioiminen yhteen molekyyliin on jo todistettu mahdolliseksi, Payne riemuitsee. Tulevaisuudessa Paynen mukaan on vielä syytä tutkia, miten darpiinien yhdisteleminen vaikuttaa sitojien luonteeseen. Seuraavaksi tutkimuksen alla onkin miten pitkäikäisiä yhteen linkitetty darpiinit ovat verrattaen yksittäisiin ja pysyykö sitoutumisen voimakkuus samana kuin yksittäisillä darpiineilla?

Darpiineja voidaan käyttää inhiboimaan signaalinvälitysreittejä tai yhtäläillä aktivoimaan niitä. Toisaalta voi olla myös mahdollista linkittää darpiiniin jokin toinen lääkeaine, jonka darpiini sitoutuessaan ohjaa oikeaan kohteeseen. Darpiineita tullaankin jo lähivuosina näkemään markkinoilla lääkeaineina, Payne ennustaa.

## **Maitorauhaskudoksen 3D-rakenteen tarkempi tuntemus avuksi syöpätutkimukselle?**

*Ihmisen maitorauhasen kolmiulotteinen rakenne tunnetaan melko huonosti, sillä maitorauhanen on paksun rasvakudoksen ympäröimä, mikä häiritsee mikroskopiaa. Kudoksen rasva täytyy saada kirkastettua läpinäkyväksi, jotta maitorauhasen 3D-rakenteiden tutkiminen onnistuisi pintaa syvemmillä. Turun yliopistossa erikoistytään suorittava Suvi-Riitta Sulander kuvantaa maitorauhaskudoksen tiehyiden haaroittumisrakenteita.*

### **Suvi-Riitta Sulander**

Ohjaajat: Dos. Emilia Peuhu ja FT Markus Peurla  
BIOKEMIA

Sulander tutkii erikoistyössään uuden kudostarkastusmenetelmän, FUnGI:n (Fructose, urea and glycerol for imaging), tehokkaasti kirkastaa ihmisen rintakudosta. Työssä hyödynnetään uudenlaista, ns. light sheet -mikroskopiaa, joka mahdollistaa jopa halkaisijaltaan senttimetrien kokoisten, kolmiulotteisten (3D) kudosten kuvaamisen.

-Erilaisia kudosten tarkastusmenetelmiä on useita, joista osa vie aikaa jopa kuukausia toimiakseen. Halusin selvittää, soveltuuko vain noin viikon kestävä FUnGI-menetelmä rintakudoksen tarkastamiseen. Se toimikin varsin hyvin, sillä pystyimme kuvaamaan kokonaisia TDLU-rakenteita 3D-muodossa, Sulander iloitsee.

Maitorauhaskudos koostuu eri suuntiin haarautuneista tiehyistä, joiden päissä on ”viinirypäletertun kaltaisia”, TDLU-rakenteiksi (Terminal ductal lobular unit) kutsuttuja yksiköitä. Maito muodostuu näissä rakenteissa imetyksen aikana.

-Tutkimusryhmämme on kiinnostunut TDLU-yksiköiden rakenteesta ja mittasuhteista, joita ei toistaiseksi ole tunnettu. Aikaisemmin käytössä ollut ns. CUBIC-kudostarkastusmenetelmä on hidas ja lisäksi kutsuu kudosta, jolloin yksityiskohtien kuvaaminen vaikeutuu ja mittasuhteet vääristyvät. Uusi FUnGI-menetelmä kirkasti kudosta hyvin ja säilytti myös oikeat mittasuhteet, Sulander selittää.

Tutkimusryhmä saa tutkittavan kudost materiaalin rintojen pienennysleikkauksista sekä potilailta, joilla on diagnosoitu rintasyövän esiaste (duktaalinen karsinoma *in situ*). Tulevaisuudessa tarkemman 3D-rakenteen ymmärtäminen voi hyödyttää myös rintasyöpätutkimusta, sillä pääosa rintasyövästä saa alkunsa TDLU-yksiköistä.

### **3D-soluviljelmä tutkimuksen tukena**

Lisäksi Sulander on vertaillut oikean maitorauhaskudoksen tiehytrakenteiden mittasuhteita tutkimusryhmän kasvattamiin ihmisen maitorauhasorganoideihin.

-Organoidit ovat laboratoriossa yksittäisistä soluista alkunsa saaneita 3D-soluviljelmiä. Niitä käytetään apuna tutkittaessa kudosta eri menetelmin. Havaittiin työssäni, että ihmisen maitorauhaskudoksen organoidista kasvavat haarakkeet muistuttavat pitkälti alkuperäisen kudoksen TDLU:n haarojen mittasuhteita, mikä tukee hyvin organoidien käyttöä rauhasen kasvun mallintamisessa, Sulander kertoo.

Jatkossa Sulander jatkaa tulostensa analysointia.

## **Nisäkässolunäyttötekniikan yhdistäminen satunnaismutageneesilla luotuihin vasta-ainekirjastoihin antaa suuntaa uudentalaiselle *in vitro* affiniteettimaturaatiomenetelmälle**

*Vasta-aineiden kehitysprosesseissa vaaditaan usein vasta-aineen lääkinällisten ominaisuuksien parantamista eli in vitro affiniteettimaturointia. Erikoistyössään Elisa Lankinen pyrki selvittämään, voidaanko terapeuttisen vasta-aineen lääkinällisiä ominaisuuksia parantaa käyttämällä nisäkässolunäyttötekniikan ja satunnaismutageneesin yhdistelmää. Alustavista tuloksista nähdään ominaisuuksien parantuneen ainakin joissain varianteissa.*

### **Elisa Lankinen**

Ohjaajat: DI Olli Huhtinen ja FT Antti Kulmala

MOLEKULAARINEN BIOTEKNOLOGIA JA DIAGNOSTIIKKA

Erikoistyössään, Orion oyj:llä, Elisa Lankinen on testannut *in vitro* affiniteettimaturaation suorittamista nisäkässolunäyttötekniikan avulla ilmennetyillä vasta-ainekirjastoilla, joissa anti-gelsoliini vasta-aineen kohdemolekyyliä sitovaan osaan aiheutettiin satunnaisia mutaatioita virhealttiin polymeerasiketjureaktion (engl. error-prone PCR) avulla. Nisäkässolunäyttötekniikassa vasta-ainegeeni on kohdennetusti integroitu solun genomiin, jolloin se pystyy ilmentämään ulkopuolisesta DNA:sta peräisin olevia vasta-aineita pinnallaan. Tähän mennessä Lankinen on onnistunut rikastamaan mutanttikirjastoista vasta-ainevariantteja, joiden jotkin lääkinälliset ominaisuudet ovat parantuneet verrattuna alkuperäiseen vasta-aineeseen.

– Vasta-aineiden *in vitro* affiniteettimaturointia varten on kehitetty monia erilaisia menetelmiä, joista useat kuitenkin ovat hyvin kalliita ja aikaa vieviä. Satunnaismutageneesi on yksinkertainen keino, jonka avulla voidaan kasvattaa vasta-ainekirjaston monimuotoisuutta, ja mikäli nisäkässolunäyttötekniikkaa hyödyntämällä parantuneet vasta-ainevariantit voidaan seuloa tehokkaasti, kehitetyn strategian avulla voidaan tarjota vaihtoehtoinen ratkaisu helpottamaan vasta-aineen affiniteettimaturaation suunnitteluprosessia, Lankinen toteaa.

### **Läkinällisiltä ominaisuuksiltaan parantuneiden vasta-ainevarianttien valikointi mutanttikirjastoista**

Kun mutaatioita aiheutetaan vasta-ainegeeniin satunnaismutageneesin avulla, voivat mahdolliset muutokset sen lääkinällisissä ominaisuuksissa muuttua sekä hyödylliseen että haitalliseen suuntaan. Nisäkässoluissa toimivan tehokkaan laadunvalvonnanprosessin perusteella kuitenkin uskotaan, että nisäkässolunäyttötekniikalla pystyisi suodattamaan heikoimmin suoriutuvat vasta-ainevariantit pois valintaprosessin aikana.

– Jotta voidaan tehdä selkeämpiä johtopäätöksiä testatun strategian käyttötehokkuudesta, on olennaista tuottaa ja karakterisoida joitain variantteja lääkinällisten ominaisuuksien selvittämiseksi. Eri selektiovaiheista on myös valittu sekvensoitavaksi vasta-aineen ominaisuuksiltaan erilaisia solupopulaatioita, jotta nähdään, millaisia mutaatioita eri mutanttikirjastoissa rikastumisen aikana esiintyy, Lankinen päättää.

## **Pro Gradu -tutkija kehittää vasta-aineita sinilevämyrkyn ei-kilpailevaan määrittämiseen**

*Saksitoksiiniin niin kuin muidenkin sinilevämyrkkyjen esiintymisen vesistöissä ennustetaan yleistyvän tulevaisuudessa ilmastonmuutoksen ja rehevöitymisen myötä. Siksi niiden tunnistaminen nopeasti ja luotettavasti vesinäytteestä olisi hyödyllistä. Nykyisin käytössä olevat menetelmät vastaavat tähän tarpeeseen. Turun yliopiston opiskelija Eetu Maaranen kehittää uudenlaista määrittämistä, jossa hyödynnettäisiin kahden vasta-aineen samanaikaista sitoutumista saksitoksiiniin – tosin mutkan kautta.*

### **Eetu Maaranen**

Ohjaajat: MSc Sultana Akter, Prof. Urpo Lamminmäki

MOLEKULAARINEN BIOTEKNOLOGIA JA DIAGNOSTIIKKA

Eetu Maaranen tutkii, miten kaksi vasta-ainetta voisi sitoutua samanaikaisesti saksitoksiiniin eli erääseen sinilevien ja siimaeliöiden tuottamaan hermomyrkkyyn. Nykyiset määrittämiset perustuvat kilpailevaan määrittämismuotoon, jossa signaali tuotetaan käänteisesti eli määrittämässä ei mitata suoraan saksitoksiinin pitoisuutta vaan leimattua kilpailevaa molekyyliä. Tämän määrittämismuodon huono puoli on se, että määrittämisen tarkkuus kärsii alhaisilla pitoisuuksilla. Nyt kehitettävässä määrittämässä asia olisi toisin:

– Ei-kilpailevassa määrittämässä signaali ilmentää suoraan saksitoksiinin pitoisuutta. Tämän kiistattomana etuna on signaalin tarkkuus alhaisista pitoisuuksista lähtien, Maaranen valaisee.

Tähän mennessä Maaranen on tuottanut ensimmäistä vasta-ainetta *E. Coli* -bakteerissa ja testannut sen sitoutumisominaisuuksia. Kehitystyössä on ilmennyt kuitenkin vastoinkäymisiä ja esimerkiksi vasta-aineen tuotto ei ole yltänyt halutulle tasolle. Vastoinkäymiset kuuluvat kuitenkin asiaan ja ratkaisuja niihin mietitään ja testataan aktiivisesti.

### **Uudenlaista näkökulmaa määrittämiseen**

Maaranen kehityksessä olevan määrittämisen avaintekijä on erityisen immuunikompleksia tunnistavan vasta-aineen hyödyntäminen määrittämässä. Saksitoksiini-molekyylin pinta-ala on niin pieni, ettei siihen voi suoraan sitoutua samanaikaisesti kahta vasta-ainetta, jotka saksitoksiiniin verrattuna ovat hyvin suuria. Siksi toinen määrittämässä käytettävä vasta-aine sitoutuu saksitoksiiniin ja ensimmäisen vasta-aineen yhdessä muodostamaan kokonaisuuteen – eli immunokompleksiin.

– Immunokompleksin hyödyntäminen kohteena pelkän saksitoksiinin sijaan on nerokas keino kiertää kolmiulotteisen sitoutumispinta-alan rajoite. Sopivan anti-immuunikompleksi vasta-aineen löytäminen on haaste, mutta uskon onnistuvani siinä tutkimusprojektini aikana, Maaranen toteaa.

Mikäli ei-kilpailevan määrittämisen kehitystyö onnistuu, se osoittaa anti-immuunikompleksi-vasta-aineiden arvokkuuden sellaisissa määrittämässä, jossa kohdemolekyylin pinta-ala on pieni. Kehitystyön onnistuminen olisi lisäksi arvokas asia tulevaisuuden vesistöjen käytön ja tutkimuksen kannalta.

## **Pikatesti nopeuttaa tekonivelinfektioiden toteamista**

*Tekonivelen infektio on hengenvaarallinen komplikaatio. Nivel voi kipeytyä myös muusta syystä ja siksi sen tunnistaminen tekonivelpotilaalle on ensiarvoisen tärkeää. Infektio voidaan kuitenkin todeta tehokkaasti nivelnesteenäytteestä ja tätä varten Pro gradu -työtään tekevä Akseli Jokela kehittää nopean ja edullisen lateraalivirtauspikatestin kliinisen päätöksenteon tueksi.*

### **Akseli Jokela**

Ohjaaja: FM Tuomas Näreoja

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Jokela kehittää tutkimuksessaan pikatestiä, jolla voidaan tunnistaa nivelnesteessä esiintyviä tulehdukseen viittaavia antibakteerisia merkkiaineita nopeasti jo leikkauksen aikana. Infektioissa näiden merkkiaineiden pitoisuudet nousevat nopeasti korkealle ja on helppo havaita. Vastaavaa pikatestiä on saatavilla kaupallisestikin, mutta hintataso ja testin luotettavuus estää sen käytön. Jokela pyrkiikin tuottamaan kaikki testin kehittämiseen käytettävät komponentit itse, jotta parhaat diagnostiset suositukset voitaisiin ottaa käyttöön Suomessa julkiselle sektorille. Kehitettävän testin edullisuus johtuu merkkiaineita tunnistavien vasta-aineiden tuottamisesta rekombinantti DNA-tekniikkaa käyttäen. Testin luotettavuutta ja tuloksen tulkintaa helpottaa UCNP-leimoihin ja lukijalaitteeseen perustuva mittausteknologia, joka antaa hoitavalle lääkärille yksiselitteisen tuloksen.

### **Bakteereista edullisiin vasta-aineisiin**

Jokela käyttää tutkimuksessaan merkkiaineiden tuottamiseen *Escherichia coli* -kolibakteeria, jonka perimään on kloonattu merkkiaineita tuottavia geenisekvenssejä. Koska kyseisten merkkiaineiden tavoitteena on bakteerien tuhoaminen useilla eri mekanismeilla, olisi niiden tuottaminen sellaisenaan mahdotonta bakteerisoluihin. Siksi bakteerin merkkiaineita tuottavaan geenisekvenssiin on lisätty osa, jolloin tuotetussa merkkiaineessa on leikattava lisäosa ja täten se ei teoriassa käyttäydy antibakteerialisena sellaisenaan. Käytännössä on huomattu teorian olleen oikeassa ja kasvatetut solut ovat pysyneet elinvoimaisina.

Infektion tunnistamiseen käytettäviä merkkiaineita,  $\alpha$ -defensiinejä, havaitaan neljää erilaista nivelinfektioissa. Näistä kolme ovat lähes identtisiä aminohappojärjestyksen perusteella. Tämän takia niitä tunnistavia vasta-aineita on paitsi helpompi tuottaa, mutta myös in-house tuotto on halvempaa verrattaessa kaupallisesti ostettaviin vasta-aineisiin.

### **Pikatesti mahdollistaa nopean ja tarkan diagnoosin**

Lateraalivirtausmääritykset ovat viimeistään tulleet tutuksi kotona tehtävien koronatestien kautta. Perinteisestä pikatestistä poiketen kehitteillä oleva testi mahdollistaa tarkan pitoisuuden määrittämisen nopeasti ulkoisen lukijan avulla, jolloin silmämääräistä tulkintaa ei tarvita. Tämä mahdollistaa lääkärille helpon tavan erottaa nykyisin epäselväksi jääneet tapaukset joko aseptiseksi tulehdukseksi tai infektioksi helpottaen ja nopeuttaen potilaiden hoidon saantia.



## **Erikoistyöopiskelija selvittää mikrofluidiikan käyttömahdollisuuksia biotulostamisessa**

*Kolmiulotteisen biotulostamisen merkitys on suuressa kasvussa bio- ja lääketieteen sovellusten kehittämisessä. Kolmen biomateriaalin tulostussovellusta turkulaisessa Brinter yrityksessä on tutkinut erikoistyötä tekevä Niko Peltonen, jonka tulokset optimoivista sovelluksista mikrofluidiikkaa hyväksikäyttäen osoittavat aiheen mahdollisuudet tieteen kehityksessä.*

### **Niko Peltonen**

Ohjaajat: D.Sc. (Tekn.) Sanna Turunen ja M.Sc. (Tekn.) Dhayakumar Rajan Prakash  
BIOKEMIA

Peltonen tutkii alginaatti-biomateriaalin tulostussovelluksia Brinter yrityksen Triaxial-tulostuspäällä käyttäen hyväksi mikrofluidiikkakasetteja. Yrityksen kehittämän Triaxial-tulostuspään tärkein ominaisuus on kolmen materiaalin saman aikainen tulostaminen, mitä tutkimuksessa muokattiin kolmella erilaisella fluidiikkakasetilla; passiivisella sekoittajalla, monisuuttimella ja rakosuuttimella. Tähän mennessä Peltonen on onnistunut osoittamaan suunniteltujen fluidiikkakasettien potentiaalinen alginaatin tasaisessa sekoittumisessa tulostuksen aikana.

—Alginaatti biomateriaalina on erittäin tärkeä osa kolmiulotteista biotulostamista ja sen kehitystä sen erittäin hyvien ominaisuuksien ansiosta. Alginaatin ominaisuuksien muokkaaminen kalsiumkloridi (CaCl<sub>2</sub>)-käsittelyllä tulostusta ennen, sen aikana ja jälkeen mahdollistavat erilaisten rakenteiden muodostamisen, Peltonen toteaa.

### **Elimien tulostamista tulevaisuudessa?**

Peltonen käyttää tutkimuksessa alginaattia tulostusmateriaalina, joka on yleisesti käytetty biomateriaali bio- ja lääketieteellisessä tutkimuksessa, kuten kudosteknologiassa ja lääkeaineiden annostelussa, sen monikäyttöisyyden ja haitattomuuden ansiosta. Yksi merkittävimmistä alginaatin eduista on kuitenkin sen vuorovaikutus CaCl<sub>2</sub>:n kanssa, mikä mahdollistaa materiaalin rakenteen kiinteyden säätelyn.

—Alginaatti on melko paljon tutkittu biomateriaali, mutta Brinterin tarjoamat tulostuksen sovellussaatavuudet mahdollistavat aivan uudenlaisen tekniikan tulostaa useampaa eri tavalla muokattua alginaattia saman aikaisesti. Tähän ominaisuuteen lisätynä vielä erilaisten mikrofluidiikkakasettien käyttö tarjoaa uudenlaista tekniikkaa ja sovelluksia, Peltonen sanoo toiveikkaana.

Tutkimusyhteisön tavoitteena on onnistua tulostamaan toimivia elimiä eläville organismeille tulevaisuudessa.

—Hienoahan olisi onnistua tekemään jotain merkittäviä tutkimushavaintoja auttaakseen yhteisön edistymistä tavoitteissa. Erikoistyöni on kuitenkin mittakaavassa pieni osa kehitystä, mutta varmasti jotain uutta ja hyödyllistä siitä jäi jälkeen, Peltonen kertoo.

Jatkossa Peltonen aikoo saada erikoistyöprojektinsa valmiiksi ja sen jälkeen työllistyä häntä kiinnostavalla alalla.

## Työkaluja ja menetelmiä proteiinimodifikaatioiden tutkimiseen

*Translaation jälkeen proteiineihin kohdistuu lukuisia modifikaatioita, joista yksi on ubikitinaatio eli ubikitiiniketjujen kiinnittyminen proteiiniin. Turun yliopiston opiskelija Veera Luukkonen on kehittänyt pro gradu -työssään Åbo Akademiassa menetelmiä ubikitinaation detektoimiseen syöpäsoluissa ja kudoksissa.*

### **Veera Luukkonen**

Ohjaajat: FT Gabriela Martínez-Chacón, Dos. Annika Meinander  
MOLEKULAARINEN BIOTEKNOLOGIA JA DIAGNOSTIIKKA

Ubikitinaatio säätelee laajaa soluprosessien kirjoa proteiinien hajottamisesta DNA-vaurioiden korjaamiseen ja solusyklin etenemiseen. Metioniini 1-ubikitiiniketjut säätelevät solunsisäistä tulehdussignalointia ja siihen tarvittavien transkriptiotekijöiden aktivoitua. Luukkonen on lopputyössään tuottanut työkaluja ja kehittänyt menetelmiä, joiden avulla metioniini 1-ubikitiiniketjuja pystytään syöpäsoluissa sekä terveiden ja kroonisesta koliitista kärsivien hiirten paksusuolinäytteissä.

—Olemme tuottaneet soluissa vasta-ainetta ja metioniini 1-ubikitiiniketjuille spesifistä sitojaproteiinia, joita voidaan käyttää juuri näiden tietyyppisten ketjujen tunnistamiseen erilaisissa näytteissä. Metioniini 1-ubikitiinilla on tärkeä rooli tulehduksessa ja sen on esimerkiksi havaittu olevan edellytys tulehdusvasteen muodostumiselle karpäsen suolistotulehduksessa. Lisäksi olemme kiinnostuneita siitä, vaikuttaako metioniini 1-ubikitinaatio syövän syntyyn ja kehitykseen. Jotta voisimme tutkia näitä mekanismeja tarkemmin, tarvitsemme siihen työkaluja ja tutkimusmenetelmiä, Luukkonen kertoo.

### **Tulevaisuuden tavoitteena ihmisen biopsioiden tutkiminen?**

Luukkonen käyttää työssään alun perin syöpäpotilaista eristettyjä soluja, joita kasvatetaan laboratorio-olosuhteissa tutkimustarkoituksessa. Käsittelemällä soluja esimerkiksi sytokiineilla tai inhibiittoreilla voidaan mallintaa samankaltaisia tulehdusvasteita, joita ihmiskehossakin tapahtuu normaalisti ja sairauksien myötä. Lisäksi näytteitä kerätään kroonisesta suolistotulehduksesta kärsivien hiirten paksusuolesta.

—Kroonisen tulehduksen aiheuttaa yliaktiivinen tulehdussignalointi, joka johtaa tulehdusta ja solujen selviytymistä edistävien geenien ilmentymiseen. Myös syövässä nähdään tätä samaa ilmiötä. Metioniini 1-ketjut ovat olennainen osa tätä signalointia.

Edessä on kuitenkin vielä tehtävää menetelmien hiomisen suhteen.

—Menetelmämme vaativat vielä optimointia luotettavien tulosten saamiseksi. Tällä hetkellä käytetyt solu- ja hiirimallit ovat kuitenkin hyvä ensiaskel siihen, että tulevaisuudessa voisimme käyttää näitä menetelmiä metioniini 1-ubikitiiniketjujen detektoimiseen ihmisnäytteistä, kuten paksusuolen biopsioista, Luukkonen sanoo.

Ubikitinaatiota ja sen roolia tutkimalla olisi mahdollista tunnistaa proteiineja, jotka kielivät luotettavasti vakavasta tulehduksesta. Tulevaisuudessa tällaisia proteiineja voisi ehkä käyttää suolistosairauksien tai aikaisen vaiheen syövän diagnosoinnissa.

## **The ON-switch to feeling pain: prospective biological molecules boosting pain sensation and possibility to reduce animal experimentation for future studies.**

*Yasmin Alameldin in collaboration with Orion Pain team has confirmed the association of two proteins, called, Ror2 and Wnt5A in a form of pain termed Neuropathic pain: long-standing pain with elusive causes. She also validated a human cell line that represents a suitable model to study these targets in-vitro, with less reliance on animal testing. Direct healthcare costs of neuropathic pain eclipse more than any other condition including cancer and heart failure. Exploring the biological relevance causing such persistent painful states can help overcome the burden.*

### **Yasmin Alameldin**

Supervisors: Ph.D. Miguel Morales and M.Sc. Marja Rantanen  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

### **The mystery of neuropathic pain**

Pain provides a crucial biological function, by warning the body against damage or life-threatening complications. But too much of it can ravage and disrupt the life of many people, the case with neuropathic pain. Apart from nerve damage and its long-term persistence, little remains known on neuropathic pain. To resolve this issue, a better understanding of the condition at the molecular and cellular levels is required.

### **Ror2 and Wnt5A to disentangle the enigma of neuropathy**

Recently, it became evident that Ror2 and wnt5A are potential suspects in pain development. Through the detection and quantification of messenger RNA (mRNA) and protein levels, Yasmin observed an abnormal amount of both molecules in rat models with nerve injury representing neuropathic pain. She also located Ror2 protein on the neural extensions of nerve cells, proposing its involvement in the pain perception circuit. Finally, she was also able to identify a cell line, called IMR-32, that can be used for future target validation studies. Yasmin ponders “The use of *in-vitro* models reduces time, effort and cost, and since the cell line is of human origin, there is a higher confidence rate in translating the results into clinics”.

### **Future outlook**

The data Yasmin generated is only an opening for future studies and further validations. She explains “The results we attained are only from small-scale observations, we need to further explore the function and exact mechanism of action underlying these data, to critically implicate the involvement of both proteins in pain as well as for drug development”.

## Lähitestaus nopeuttaa ja helpottaa virustestien saatavuutta

*Sytomegalovirus on herpesvirusten lahkoon kuuluva virus, joka infektoi suuren osan ihmisistä. Suurimmalle osalle infektio on vaaraton ja lähes oireeton, mutta vastasyntyneille tai immuunipuutteisille henkilöille sytomegalovirusinfektio voi kuitenkin olla hengenvaarallinen. Tarkkojen ja nopeiden lähitestien kehittäminen mahdollistaisi tulevaisuudessa viruksen laajemman testauksen. Tutkimuksessaan biotekniikan maisteriopiskelija Niina-Elina Kärkkäinen on kehittänyt veri- sylki- ja virtsanäyttemateriaaleille näytteen käsittelyvaiheita, jotka soveltuvat virusten nukleiinihappojen lähitestaukseen.*

### Niina-Elina Kärkkäinen

Ohjaaja: Ville Veikkolainen, PhD ja Mikko Aaltoranta, MSc

MOLEKULAARINEN BIOTEKNIikka JA DIAGNOSTIIKKA

Kärkkäinen tarkasteli tutkimuksessaan sytomegalovirusta, joka voi tarttua raskauden aikana äidiltä lapselle ja aiheuttaa synnynnäisiä kehitysvikoja. Yleisimpiä kehitysvikoja ovat kuulon heikkeneminen ja neurologiset vammat. Virus on hyvin laajalle levinnyt, jonka vuoksi olisi tärkeää, että virus diagnosoidaan ja tunnistetaan mahdollisimman aikaisin. Tällöin mahdollisten kehitysvikojen, kuten kuulovaurioiden, syntyä voitaisiin seurata ja ehkäistä herkemmin.

Sytomegalovirusta on testattu paljon vasta-ainetesteillä, mutta nykyisin kvantitatiivinen polymeerasiketjureaktio (*engl.* quantitative polymerase chain reaction, qPCR) on yleisin testimenetelmä viruksen tunnistamiseen. Nukleiinihappotestit, joilla pystytään määrittämään viruksen DNA, ovat yleensä herkempiä ja tavoittavat ajankohtaisen infektion tarkemmin. Näytteiden lähitestaus olisi kuitenkin helpompaa nopealla menetelmällä, joka ei vaadi lämpösyklitystä qPCR:n tapaan. Tähän on suositeltu uudenlaista nukleiinihappojen monistusmenetelmää, isotermistä amplifikaatiota, joka mahdollistaisi nopeamman testauksen qPCR -menetelmään verrattuna.

—Isotermiäinen amplifikaatio ei vaadi näytteen lämpösyklitystä, kuten qPCR-reaktio. Tällöin voidaan hyödyntää yksinkertaisempaa ja edullisempaa laitteistoa, jonka lisäksi reaktio on valmis jo noin 30 minuutissa. Tämän vuoksi isotermiäinen amplifikaatio mahdollistaa hyvin sytomegaloviruksen ja muiden mahdollisten virusanalyttien lähitestauksen. Nopeat ja edulliset pikatestit soveltuisivat hyvin sytomegaloviruksen testaukseen myös laajemmassa mittakaavassa, Kärkkäinen pohtii.

### Pikatestejä myös nukleiinihappojen tunnistamiseen?

Yleisimmät näyttemateriaalit sytomegaloviruksen tutkimuksessa ovat olleet veri, virtsa ja sylki. Nämä ovat kuitenkin haastavia näyttemateriaaleja, sillä ne inhiboivat usein diagnostiikan mittauksia. Kärkkäinen pyrki tutkimuksessaan vähentämään inhibiittorien vaikutusta testin toiminnassa, ja samalla parantamaan sytomegaloviruksen tunnistamista näyttemateriaalista.

—Näyttemateriaalien inhibiittorien vähentäminen onnistui mm. erilaisten näytelaimennosten ja inkubaatioiden avulla. Verinäytteessä haasteena oli hemoglobiini, mutta esimerkiksi punasolujen erotus muusta näyttemateriaalista antoi lupaavia tuloksia. Sytomegalovirus infektoi usein valkosoluja, joten niiden erotus punasoluista voi parantaa viruksen tunnistamista näytteestä, Kärkkäinen sanoo toiveikkaana.

Tulokset näyttivät lupaavilta, ja lähitestaukseen soveltuvia näytteen käsittelyvaiheita kehitettiin onnistuneesti.

—Olen erittäin tyytyväinen etenkin virtsa- ja sylkinäytteiden käsittelymenetelmiin. Lisäksi näiden näyttemateriaalien testaus ei vaadi invasiivista näytteenottoa. Verinäytteiden kanssa oli enemmän haasteita, mutta myös niihin löydettiin toimivia ratkaisuja. Tutkimukseni perusteella kaikki näyttemateriaalit sopivat hyvin sytomegaloviruksen lähitestaukseen, Kärkkäinen innostuu.

## **Established tissue model shed light for pain drug development**

*Pain is the most common reason why people seek medical help. With colleagues at Orion Corporation at Turku, master's student Juulia Allgaier established a tissue model that can be used to study pain related phenotypes and possible pain reducing drugs. The model provides a living organism-kind model and thus a possibility to find new pain drugs without animal studies.*

### **Juulia Allgaier**

Supervisors: Ph.D. Miguel Morales and Ph.D. Andrii Domanskyi  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Allgaier investigates dorsal root ganglia (DRG), which contain and support neurons that are responsible of sensing pain. The young scientist was able to establish DRG explant culture which means that DRG is removed from a rat and grown in a nutrient medium. This allows pain phenotypes and effects of drugs to be investigated outside the animal, speeding up drug development and reducing the use of animals in preclinical research.

—Growing explants start to produce neurites, which are the protrusions of neurons responsible of carrying pain sensation further to the brain. This neurite growth is called sprouting, and it is increased in pain conditions. On the contrary, reduction of sprouting may be associated with decreased pain sensation, Allgaier explains.

Molecule called the nerve growth factor (NGF) has notable effect on sprouting during the time neurons are developing. Allgaier observed that explants sprouted better with NGF than without NGF at least during the first six days in culture. However, at the end of experiment the explants reached the same sprouting amount regardless of NGF, suggesting that explants lacking NGF start to produce growth factors by themselves.

To quantify her results, Allgaier also needed to develop a method that tracks the growing neurites and allows to measure the sprouting in explants that are grown in different conditions, such as with NGF and without NGF.

### **The model reveals ways to help people suffering from pain in the future**

The effect of NGF on sprouting is caused by its binding to tyrosine receptor kinase A (TrkA). There are several ways to prevent the effect of NGF, for example, by using a drug that blocks the NGF molecule binding to its receptor. The molecule that blocks the receptor is called inhibitor. Allgaier found out that one such TrkA inhibitor slows down the sprouting more efficiently than only the absence of NGF. This suggests that in the future TrkA inhibitor drugs could be used to reduce sprouting and that way reduce pain in patients. Indeed, such drugs have already been tested in clinical trials.

Allgaier also used modified viruses to transfer genetic material in DRG explant's cells. In this project a gene that encodes a fluorescent protein emitting green light was successfully transferred into explants. This fascinating result means that modified viruses can be used to carry genes encoding therapeutic proteins into the patient's DRG neurons to relief pain.

—I think that DRG explants that allow to model tissue- and living-like conditions possess countless number of opportunities useful for pain and drug research, Allgaier strengthens.

## **Paraneeko lateraalivirtaustestin herkkyys magneeteilla?**

*Pro Graduansa Turun yliopistolla tekevä Oskari Nääjärvi kehittää uudentyyppistä magneettista tapaa muodostaa testiviiva lateraalivirtaustestissä. Lateraalivirtaustestit, joihin lähes jokainen tutustui koronan myötä, ovat pitkään perustuneet samaan lähestymistapaan. Tällä hetkellä tutkimuksessa on osoitettu, että ulkoisella magneettikentällä on mahdollista kerätä näyte testiviivaksi.*

### **Oskari Nääjärvi**

Ohjaaja: FM. Kirsti Raiko

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Nääjärven tarkoitus on parantaa lateraalivirtaustestin herkkyyttä käyttämällä magneettisia nanopartikkeleita. Partikkelien pinnalla olevat vasta-aineet tunnistavat sairautta tai tilaa osoittavan merkkiaineen, joka voi olla peräisin esimerkiksi veri- tai sylkinäytteessä. Nämä partikkelit kerätään ulkoisella magneettikentällä mitattavaksi testiviivaksi, kun nykyisissä lateraalivirtaustesteissä testiviiva on kiinteä viiva vasta-aineita.

Korona-aikana viimeisetkin tutustuivat lateraalivirtaustesteihin, joista aiemmin tuttu sovellutus oli ollut lähinnä raskaustesti. Testissä merkkiaine kiinnittyy testiviivalle ja merkkiaineen läsnäolon osoittaa leima-aine. Leima voidaan havaita esimerkiksi punaisena värinä tai mitata erillisellä mittalaitteella. Tällaisen kotitestin lähestymistapa on siis kiinteä testiviiva, jolle eri komponenteista koostuva mitattava rakenne muodostuu.

### **Uutta näkökulmaa toteutukseen**

– Nääjärvi kuvailee, etteivät magneettiset partikkelit lateraalivirtaustestissä ole mitenkään uusi asia, mutta tarkentaa niitä käytetyn lähinnä mitattavina leima-aineina. ”On kiehtovaa olla kehittämässä täysin uutta lähestymistapaa testiviivan muodostamiseksi.”

Magneettipartikkeleja hyödyntävän testin oletetaan parantavan testien herkkyyttä.

– Partikkelien pyöreä muoto lisää pinta-alaa, johon merkkiaineet voivat tarttua. Lisäksi tavanomaisessa testissä komponentit liikkuvat nestevirran mukana, jolloin niiden kiinnittymiseen testiviivalle on varsin lyhyt aika. Nyt komponentit voidaan yhdistää jo aiemmin, sillä kiinteää viivaa ei ole. Kolmanneksi pesuvaihetta voidaan tehostaa. Mitattavan testin herkkyyttä parannetaan aina pesuvaiheella, joka huuhtoo testiltä pois kiinnittymättömät komponentit, jotka muutoin häiritsisivät mittausta. Liian voimakas pesu pyyhkisi myös testiviivan, mutta nyt komponentit pysyvät magneettisesti, Nääjärvi kuvailee.

### **3D-tulostaminen mahdollisti tarvittavat testikasetit**

Käytettävät testikasetit on jo kehitetty. Magneetit on upotettu testikasettiin ja tällä hetkellä testillä voidaan kerätä magneettipartikkelit testiviivaksi.

– Toistaiseksi emme kykene vielä mittaamaan näytteitä, sillä signaalin mittauksessa on paljastunut yllättäviä ongelmia. Kun tämä ongelma on ratkaistu, siirrymme mittaamaan kilpirauhasen toimintaa säätelevää TSH-hormonia, jolle testiä varsinaisesti suunnitellaan.

## **Menetelmä uudenlaisten sitojaproteiiniyhdistelmien kehittämiseen**

*Erilaisia sitojaproteiineja, kuten vasta-aineita, käytetään muun muassa lääkeaineina ja diagnostisten testien reagensseina. Toisinaan sitojaproteiineja voi olla tarpeen yhdistää, sillä niiden ominaisuudet voivat olla parempia yhdessä kuin yksin. Pro gradu -tutkielmassaan Jasmin Toukoniemi on kehittänyt menetelmän, jolla sitojaproteiineja voidaan yhdistää toisiinsa.*

### **Jasmin Toukoniemi**

Ohjaaja: Ph.D. Tuomas Huovinen

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Jokaisen elimistöstä löytyy tuhansia vasta-aineita, jotka pystyvät tunnistamaan erilaisia taudinaiheuttajia, allergeeneja ja vierasaineita erittäin tarkasti ja sitoutumaan niihin. Luontaisen tarkan sitoutumiskykynsä sekä muiden monipuolisten ominaisuuksiensa vuoksi vasta-aineita käytetäänkin esimerkiksi sitojaproteiineina diagnostisissa testeissä sekä lääkeaineina. Joissain tapauksissa tai käyttökohteissa vasta-aineiden ominaisuudet eivät välttämättä ole täysin toivotunlaisia. Niiden sitoutuminen kohteeseen saattaa olla liian heikkoa. Tällaisissa tilanteissa voi olla tarpeen yhdistää kaksi erilaista sitojaproteiinia toisiinsa sitoutumisominaisuuksien parantamiseksi.

Pro gradu -tutkielmassaan Toukoniemi kehitti menetelmän, jolla vasta-aineista ja suunnitelluista ankyriinitoistoproteiineista, DARPiineista (*engl.* designed ankyrin repeat protein, DARPin) voidaan tehdä uudenlaisia sitojaproteiiniyhdistelmiä.

– DARPiinit ovat yksi sitojaproteiiniluokka, joka kehitettiin vaihtoehdoksi vasta-aineille. Ne on suunniteltu luontaisesti soluissa esiintyvien ankyriiniproteiinien perusteella. DARPiinit ovat rakenteeltaan yksinkertaisempia kuin vasta-aineet, mutta ne pystyvät tunnistamaan ja sitoutumaan esimerkiksi taudinaiheuttajiin samalla tavalla kuin vasta-aineet, Toukoniemi selittää.

### **Miten menetelmä toimii?**

Kehitetyn menetelmän peruseriaate on se, että yksittäisistä sitojaproteiineista luodaan toisiinsa yhteensopivia osia, jotka pystytään myöhemmin liittämään yhteen. Syntyneen sitojaproteiiniyhdistelmän ominaisuudet riippuvat siitä, mitkä osat liitetään yhteen.

Tulokset osoittavat menetelmän toimivaksi, sillä vasta-aine ja DARPiini saatiin onnistuneesti yhdistettyä yhdeksi toiminnalliseksi sitojaproteiiniksi. Alustavat tulokset myös viittaavat siihen, että yhdistelmäproteiinin ominaisuudet ovat yksittäistä vasta-ainetta parempia. Lisätutkimuksia kuitenkin tarvitaan vielä varmistamaan, millaisia ominaisuuksia sitojaproteiiniyhdistelmillä tarkalleen on.

– Tulevaisuudessa sitojaproteiiniyhdistelmiä voitaisiin mahdollisesti hyödyntää monenlaisissa käyttökohteissa, esimerkiksi koronavirustaudin diagnosointiin käytettävässä pikatestissä tai uudenlaisten lääkeaineiden kehittämisessä, Toukoniemi kertoo.

## **More stable antibodies in the fight against diseases**

*Antibodies are proteins in our bodies that fight diseases with their unique features- Researchers use these properties to diagnose diseases and develop new drugs. Bolouri has made a new antibody library which is a collection of more stable antibodies with smaller structures. In this study, the mutations were designed to create novel antibodies.*

### **Shahrzad Bolouri**

PhD Eeva-Christine Brockmann, Professor Urpo Lamminmäki  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Individually folded domains form the structure of an antibody. A disulfide bridge naturally stabilizes each of these domains, which is the linkage between two cysteines stabilizing the higher order in antibodies, Bolouri describes. We have added an extra disulfide bridge to single chain variable fragments (scFv), the smallest antibody fragment that can bind to an antigen. The disulfide bridge sits between the two antigen-binding domains to increase stability.

An antibody recognizes different antigens via six specific sites on its structure. These are called complementary determinants regions. Herceptin, a current breast cancer treatment, is used as the framework for this library. This antibody recognizes the human epidermal growth factor receptor-2. Bolouri has created mutations in five CDRs of this specific antibody and has diversified the existing ones to generate antibodies that no longer bind to the original target. From this collection of diverse sequences, researchers can develop antibodies capable of binding to various new targets, Bolouri explains. The diversity from light chain CDR amounts to 11520 different clones, but the final library will include both heavy and light chains resulting in an even higher diversity rate.

Genes coding the CDRs were amplified and joined using simultaneous LguI digestion and ligation for seamless cloning to form complete antibody-coding sequences. Next, we clone the genes into a vector which is a suitable biological carrier to transfer antibody-coding genes to *E. coli*. This process results in the display of the antibodies on bacteriophages to make the final library.

### **Antibody libraries: a cure for cancer?**

Antibody libraries are a great tool both in diagnostics and drug development. In the past decades, antibodies were at the center of attention for drug discovery as six therapeutic antibodies are among the top ten best-selling drugs in the US, and more than 80 antibodies are used as therapeutic agents after clinical trial approvals.



## Vasta-aineiden kehitys gelsoliiniamyloidoosiin

*Vasta-aineet ovat immuunisolujen tuottamia proteiineja, joita immuunijärjestelmä käyttää tunnistamaan elimistölle tuntemattomia eliöitä. Vasta-aineita ja niiden osia voidaan hyödyntää monessa eri sovelluksessa kuten diagnostiikassa ja lääkeaineina. Erikoistyötään Turun Yliopistossa tekevä Ines Auravuo on kehittänyt vasta-aineita perinnölliseen gelsoliiniamyloidoosiin hoitoon.*

### **Ines Auravuo**

Ohjaajat: Ph.D. Tuomas Huovinen, Prof. Urpo Lamminmäki, M.Sc. Laura Leimu  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Erikoistyötään viimeistelevä Ines Auravuo on onnistunut parantamaan vasta-aineen sitoutumista 8 kDa gelsoliinifragmenttiin. Gelsoliinifragmentteja muodostuu ja kertyy ihmisen kehoon perinnöllisessä gelsoliiniamyloidoosissa. Taudin aiheuttaa mutaatio gelsoliinigeenissä, mikä johtaa gelsoliinin pilkkoutumiseen erikokoisiksi fragmenteiksi. Yksi muodostuneista fragmenteista on 8 kDa kokoinen gelsoliinifragmentti, joka saostuu amyloidisäikeiksi aiheuttaen taudin oireet. Taudin oirekuva on laaja, mutta keskeisimpiin oireisiin kuuluvat ääreishermoston ongelmat, ihon löystyminen ja sarveiskalvon verkkomainen rappeuma. Tällä hetkellä tautiin ei ole hoitokeinoa ja hoito perustuu oireidenmukaiseen hoitoon.

Vasta-aineita kehitellään lääkkeiksi erilaisiin sairauksiin huimaa vauhtia ja ne ovatkin yksi yleisimmistä lääkeaineryhmistä uusissa lääkkeissä. Vasta-aineiden käyttöä on tutkittu myös erilaisten amyloidoosisairauksien hoidossa. Lääkekäytössä vasta-aineen on tärkeä olla stabiili ja tuottotasojen olla riittävät vasta-aineiden korkeiden tuotantokustannusten vuoksi. Lisäksi vasta-aineen affiniteetilla, eli sillä kuinka vahvasti vasta-aine sitoutuu kohteeseensa, on erityisesti merkitystä terapeuttisissa vasta-aineissa. Terapeuttisen vasta-aineen korkea affiniteetti mahdollistaa pienemmät annokset ja vähentää lääkkeiden sivuvaikutuksia.

### **Terapeuttiset vasta-aineet amyloidoosien hoidossa**

Auravuo on tutkimuksessaan keskittynyt parantamaan 8 kDa gelsoliinifragmenttiin sitoutuvan vasta-aineen ominaisuuksia. Koska fragmentti ja sen syntyminen aiheuttavat taudin etenemisen ja oireet, voisi kehitetystä vasta-aineesta saada lääkkeen sairauden hoitoon.

—Vaikka mahdollisesta lääkkeestä saatava hyöty on sairauden harvinaisuuden vuoksi pieni, antaa tehty tutkimus tietoa vasta-aineiden käytöstä ja kehityksestä amyloidoosien hoidossa. Tutkimuksesta saatavaa tietoa voidaankin mahdollisesti tulevaisuudessa hyödyntää esimerkiksi Alzheimer-lääkkeitä kehittäessä, Auravuo toteaa toiveikkaana.

Auravuo aikoo jatkaa tutkimusta karakterisoimalla kehitettyjen vasta-aineiden stabiilisuutta, sitoutumista gelsoliinin ja muita ominaisuuksia. Käytännön sovellutukset ovat Auravuon mukaan vielä kaukana, mutta alustavat tulokset ovat olleet lupaavia.

## **Generation of novel specific tools for cancer diagnosis and follow-up**

*With approximately 18.1 million people struggling with cancer around the world, it is the second leading cause of death among the individuals. Cancer diagnosis and treatment is hence one of the most crucial areas of study in the life sciences. In this study conducted at the University of Turku, we discovered novel specific tools that are beneficial in cancer diagnosis and treatment follow-up.*

### **Narges Moradi**

Supervisors: Urpo Lamminmäki, Hanna Sanmark, Maija Hollmén  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

When dealing with cancer for a long time, our immune system might turn against us. The tumor can alter the immune system cells to protect itself, leading to emergence of a group of white blood cells called immunosuppressive cells. Antibodies are a group of molecules that are produced by our immune system to help battling diseases. Nevertheless, they can also be produced in a laboratory and outside of the human body. Antibodies are great tools to measure disease markers in the blood, providing information on the disease status based on the marker concentration. Moreover, antibodies are useful tools, as they bind to specific targets and can cause biological alterations in the body upon binding. Bexmarilimab is an antibody drug in clinical trial, that binds to a protein on the surface of the immunosuppressive cells. Upon this binding, the immunosuppressive cell is reprogrammed to a normal immune system cell and contributes to beating the tumor.

The target protein on the surface of the immunosuppressive cells, is also available in our blood and it considerably increases in cancer. Therefore, its concentration in the blood, is a marker of how progressive the cancer has become and how successful the treatment is. In this study, we searched a huge pool of inhouse-generated antibodies to find a few that specifically bind the target protein on the surface of immunosuppressive white blood cells in cancer. The newly discovered antibodies were used to develop a cancer diagnostic kit, which captures and measures the concentration of the marker protein in patient blood samples, providing information on the patient status. These novel antibodies were all unique in structure, demonstrated strong binding levels similar to that of commercial antibodies, and bound to different parts of the target protein and therefore did not interfere with the activity of the already existing antibody drug against this target.

The dosing of bexmarilimab, a very promising drug in clinical trial, will be optimized using our newly developed cancer diagnostics kit. These findings contribute to bexmarilimab's journey of entering the real world and hopefully affecting the lives of therapeutically eligible cancer patients and caregivers.

### **Reference**

Hollmén, M., Figueiredo, C. R., Jalkanen, S. (2020) New tools to prevent cancer growth and spread: a 'Clever' approach. *Br J Cancer* **123**: 501–509.

## **Discovery of specific antibodies to develop a diagnostic assay for human rhino viral infections.**

*Human rhino viral (HRV) diseases continue to be underdiagnosed. There are no available immunodiagnostic methods as there are no antibodies that recognize a broad range of HRVs. Master's student Adeesha Herath discovered some promising fragment antibody-binding (Fabs) that recognize the desired targets by Fab phage display library technique. The discovered Fabs are interesting candidates for further development into a diagnostic assay for HRV.*

### **Adeesha Herath**

Supervisorst: Prof. Urpo Lamminmäki and Dr. Eeva-Christine Brockmann and Dr. Petri Susi

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Viral respiratory infections rank top among reasons for more frequent clinical visits and have a considerable negative impact on society. Herath discovered some promising Fabs that recognize the most conserved region of HRVs that could give raise to broad-range antibodies detecting several rhino viral serotypes. HRV accounts for more than half of the viral respiratory infections and annually there are millions of absences from work and school. Diagnosis of HRV diseases are commonly made empirically due to lack of rapid, cost effective, on-site laboratory testing that gives reliable results over a clinically useful period. Existing diagnostic tests mainly based on nucleic acid techniques and lack of antibodies that recognize a broad range of HRVs limits any immunodiagnostic approach.

Conventionally antibodies are made by animal immunization. The Nobel Prize awarded phage display technology allows the discovery of antibodies from phage repositories called phage display libraries. We used the phage display libraries (recently developed at the University of Turku) to discover antibodies. A region of HRV 3C protease that has not changed over a period was selected as the target. A peptide (small segment of the protein) at the target site of the protein (3C protein) and 3C protease were were alternatively used in the affinity selection technique called bio panning to select specific antibodies from phage display libraries. Then, the specific site on the 3C protein was altered by a desired mutation to change the target sit and used in excess as a blocker to prevent isolation of antibodies with unwanted specificities in second approach.

Herath screened Fabs to confirm the enrichment of antibodies against 3C protein and 3C peptide. Initially, a total of 976 Fab clones were primarily tested and based on the binding strength, chose 8 of the most promising Fabs that bound both the 3C protein and peptide. These Fabs will be tested on viral infected cell lines using immunofluorescence microscopy for further confirmation, Herath says. The Fabs that recognize the desired target epitope are interesting candidates for further development into a diagnostic assay for HRV. Moreover, the study has the potential to give directions to develop rapid and cost-effective immunodiagnostic platforms for the broad range of HRV to find better solutions for existing challenges in the clinical field.

## Lupaavia tuloksia tarkempaan ennusteeseen

*Turun yliopistossa erikoistytään tekevä Sylvia Remes kehitti onnistuneesti vasta-aineita, jotka saattavat mahdollistaa tarkempia ennusteita pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomaa sairastaville potilaille ja vaikuttaa hoitopäätöksiin.*

### **Sylvia Remes**

Ohjaajat: Prof. Urpo Lamminmäki ja Dr. Sami Ventelä

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Työssään Remes kehitti vasta-aineita pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomien (eng. head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) tutkimukseen. Pään ja kaulan alueen syövät ovat maailmanlaajuisesti seitsemänneksi yleisimpiä syöpiä ja HNSCC-tapaukset kattavat niistä yli 90 %. Näiden syöpien selviytymisennuste on parantunut vuosien mittaan vain marginaalisesti, eikä biomerkkiaineita HNSCC-tapausten seulontaan, diagnostiikkaan tai ennusteisiin ole käytössä. Kuitenkin vielä julkaisemattoman tutkimuksen mukaan EPLIN-proteiinin (eng. epithelial protein lost in neoplasm) toisen alamuodon, EPLIN- $\alpha$ , ilmentyminen on voitu liittää näiden syöpien aggressiiviseen käytökseen, mikä herättää toiveita tarkempien ennusteiden muodostamiseen potilaille.

—EPLIN on ennustetun rakenteensa mukaan monimutkainen, ja siinä on laskostuneiden osien lisäksi myös ”rakenteettomia” kohtia. Vasta-aineiden kehitys suoraan EPLIN-proteiinin  $\alpha$ -muotoa vastaan oli jo aiemmin todettu haastavaksi, joten päätimme kehittää sitojia  $\beta$ -muodon tunnistukseen. Yhdistämällä näillä sitojilla saatava informaatio jo kaupallisesti saatavilla olevan molempia muotoja tunnistavan vasta-aineen antaman informaation kanssa, saadaan tieto myös  $\alpha$ -muodon läsnäolosta tutkittavassa näytteessä, Remes kertoo.

### **Parempia ja vakaampia vasta-aineita jo olemassa olevista**

Vasta-aineiden kehitystä Remes ei ole aloittanut tyhjästä, sillä yksinkertaisia sitojamuotoja oli jo löydetty ennen työn aloitusta. Näitä Remes käytti lähtökohtana uuden ja vakaamman vasta-ainekirjaston luomiseen, josta valittiin parhaat  $\beta$ -muotoa tunnistavat vasta-ainekandidaatit faaginäyttötekniikkaa hyödyntämällä.

—Vasta-ainekirjastossa oli lopulta kymmeniä miljoonia sitojia. Faaginäyttötekniikalla voidaan isostakin määrästä potentiaalisia vasta-aineita seuloa parhaat sitojat nopeasti. Tämän jälkeen valitut vasta-aineet voidaan tuottaa helposti bakteerisoluiissa jatkoanalyysijä ja sovelluksia varten, Remes kehuu.

Työssä päästiin lopulta tavoitteeseen ja seitsemästä vasta-aineesta saatiin lupaavia tuloksia. Vasta-aineista erityisesti neljällä oli toivotunlaisia sitoutumisominaisuuksia. Lopullinen määränpää on kuitenkin vasta edessä.

—Vasta-aineita on vielä testattava niiden suunnitellussa lopullisessa käyttötarkoituksessa, eli potilaiden kudokset näytteiden värjämisessä. Tämä käytännön sovellutus on merkittävä, sillä toivotusti se tuo tarkempaa tietoa potilaalle määritettävään ennusteeseen, ja tulevaisuudessa ehkä jopa hoitomuotoon, Remes toivoo.

## **Finding clinically relevant strains of *C. diphtheriae* using MALDI-TOF**

*During the project I investigated how to identify clinically relevant strains of C. diphtheriae using mass spectrometry and found two potential approaches. As C. diphtheriae is divided into 4 biovars based on the severity of the illness they cause and only strains which express diphtheria toxin actually cause the disease, I used these two pieces of information to develop the two approaches.*

### **Lucas Backström**

Ohjaajat: MSc Alex-Mikael Barkoff, MSc (tech.) Aapo Knuutila  
BIOTECHNOLOGY (TECH.)

### **The project in a nutshell and why it matters**

We found two possible approaches for identifying clinically relevant strains of *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *C. diphtheriae* causes diphtheria which is a potentially fatal infection mostly affecting children under the age of 15 years. It is divided into four biovars: gravis, mitis, intermedius and belfanti in descending order of severity. In our first approach we tried to use metabolic differences between the biovars of *C. diphtheriae*, in order to distinguish between them from one another. In the second approach we tried to break down diphtheria toxin in order to measure it, which would allow us to identify the *C. diphtheriae* strains that cause cases of severe diphtheria.

### **How did we do?**

We were unsuccessful in reliably distinguishing between the different biovars based on their metabolic differences. However, our preliminary results indicated that we were at least partly successful in breaking down and then measuring diphtheria toxin. Ultimately, more research is needed to establish the validity of these two identification approaches.

### **How did we do this?**

Since the normal detection range of the MALDI-TOF device is between 0-21 kDa, we had to first break down diphtheria toxin (58 kDa) in order to measure it. We did this by using mercaptoethanol, urea, and SDS. We used a similar approach when utilizing the metabolic differences between the biovars of interest (gravis, mitis and intermedius). Our idea was to first grow *C. diphtheriae* strains on a special agar, allowing for immediate separation of biovar intermedius. Then we hoped to separate between biovar gravis and mitis, by exposing these two remaining strains to starch which only gravis was able to break down into measurable pieces.

## **Parempaa diagnostiikkaa munasarjasyövälle**

*Munasarjasyöpä diagnosoidaan usein vasta myöhäisessä vaiheessa, mikä vaikeuttaa taudin hoitamista ja johtaa matalaan eloonjäämisasteeseen. Uniogen Oy:ssä opinnäytetyötään tekevä Olli Kokko on selvittänyt olemassa olevan munasarjasyöpätestin muuntamista uudenlaiseen muotoon, jossa testi olisi nopeampi suorittaa ja helpompi ottaa käyttöön sairaalalaboratorioissa.*

### **Olli Kokko**

Ohjaaja: DI. Eero Aarikka  
BIOTEKNIikka (DI)

Opinnäytetyössään Kokko muunsi olemassa olevan munasarjasyöpätestin uuteen muotoon, jossa testiin tarvittava aika on noin puolet aiemman testin suorittamiseen vaadittavasta ajasta. Uudessa testissä mitattava biomarkkeri on sama kuin vanhassa testissä, mutta vaihtamalla testissä käytettävää tekniikkaa se on helpompi ottaa käyttöön sairaalalaboratorioissa.

Perinteisesti munasarjasyövän diagnostiikassa hyödynnetään verenkierron CA125-proteiinin pitoisuutta. Munasarjasyöpään liittyy usein veren CA125-pitoisuuden kasvaminen, mutta kohonnut CA125-pitoisuus liittyy myös muihin vähemmän vaarallisiin ja helpommin hoidettaviin tauteihin kuten endometrioosiin. Tämä vaikeuttaa kyseisen biomarkkerin hyödyntämistä munasarjasyövän diagnosoinnissa. Munasarjasyöpään liittyy kuitenkin muutoksia CA125-proteiinin glykosylaatioissa ja havaitsemalla nämä muutokset voidaan munasarjasyöpäpotilaat erottaa muista potilaista. Alkuperäinen ja työssä kehitetty testi hyödyntävätkin juuri tätä muuntuneen glykosylaation havaitsemista.

Alkuperäinen testi on kaivonpohjamääritys, jossa mitattavana signaalina käytetään aikaerotteista fluoresenssia. Testiin vaadittavien reaktioiden nopeutta kasvatettiin muuntamalla kaivonpohjamääritys magneettipartikkelipohjaiseksi. Tällöin testin suorittamiseen kuuluva aika lyheni. Luminesenssia mittaavat laitteet ovat sairaalalaboratorioissa yleisempiä kuin aikaerotteista fluoresenssia mittaavat laitteet, joten vaihtamalla mitattava signaali kemiluminesenssiin testi voidaan ottaa helpommin käyttöön useammassa laboratoriossa.

### **Luotettavampia diagnooseja?**

Glykovariantin mittaamiseen pohjautuvista testeistä voi olla tulevaisuudessa paljon hyötyä esimerkiksi munasarjasyövän aikaisemmassa havaitsemisessa. Tällöin syöpähoidot voitaisiin aloittaa nopeammin ja täten parantaa potilaiden eloonjäämisen mahdollisuutta. Lisäksi glykovariantin mittaamisella voitaisiin mahdollisesti vähentää väärin syöpädiagnoosien määrää.

## **Teknologia syöpämutaatioiden havaitsemiseksi automatisoitii menestyksekkäästi**

*Syövän varhainen havaitseminen on onnistuneen hoidon kannalta ensiarvoisen tärkeää. Geno1 teknologia on täysin uudella tavalla suunniteltu näytteenvalmistus menetelmä sekvensointia varten, minkä avulla pystytään löytämään DNA:ssa olevat syöpämutaatiot. Diplomityötä tekevä Nea Laine on automatisoinut Geno1 teknologiaa Genomill Oy:ssa, ja tulokset ovat olleet onnistuneita.*

### **Nea Laine**

Ohjaaja: Dos. Juha-Pekka Pursiheimo  
BIOTEKNIikka (DI)

Laine onnistui automatisoimaan Geno1 teknologian koko laboratorioprosessin, mukaan lukien magneettipartikkeleihin perustuva DNA-kirjastojen puhdistukset ja reagenssien esikäsitteilyt.

—Saadut tulokset olivat täysin vertailukelpoisia manuaaliseen prosessiin. Samalla automatisointi vähensi ihmisen tekemää työmäärää, minimoi virheet sekä säästi aikaa. Siten Geno1 prosessin automatisointi teki teknologiasta entistä luotettavamman, toistettavamman ja kustannustehokkaamman, Laine toteaa.

Geno1 teknologia mahdollistaa syöpämutaatioita sisältävien geenialueiden tutkimisen suoraan veren soluvapaasta DNA:sta. Siten syöpämutaatiot voidaan luotettavasti tutkia potilaan verinäytteestä, jolloin näytteenotto on hyvin yksinkertaista ja potilaalle helppoa.

—Geno1 teknologialla valmistetut DNA-kirjastot sekvensoidaan uuden sukupolven DNA sekvensointi alustoilla. Sekvensointitiedoista eli DNA:n nukleinihappojärjestyksestä etsitään näytteissä mahdollisesti olevat syöpämutaatiot Geno1 tietojenkäsittely algoritmien avulla. Tällä teknologialla syöpämutaatiot pystytään löytämään jo varhain, mikä on potilaan onnistuneen hoidon kannalta erittäin tärkeää, Laine kertoo.

Laine toteutti Geno1 teknologian automatisoinnin Opentronsin OT-2 pipetointirobotilla, jota ohjattiin Python ohjelmointirajapinnan avulla. Geno1 teknologiaa voidaan kuitenkin toteuttaa helposti myös muilla nesteenkäsittelyroboteilla.

—Käyttämällä isompia nesteenkäsittelyrobotteja tai jakamalla työnkulun eri vaiheet erillisiin robotteihin, voidaan yhä useampia näytteitä käsitellä samanaikaisesti. Tämä alentaa kustannuksia yhtä potilasnäytettä kohden ja samalla myös nopeuttaa tulosten saamista, Laine pohtii.

Jatkossa robotiikkaa voidaan käyttää yhä enemmän Geno1 teknologiaa toteuttaessa.

## **Uusi pikatesti mahdollistaa munasarjasyövän aikaisemman ja varmemman diagnoosin**

*Pikatestit ovat koronapandemian myötä lähteneet nousukiitoon. Diplomityötään Turun yliopistossa tekevä Kaisa Leppä kehittää pikatestiä munasarjasyövän diagnosoinnin työkaluksi. Tavoitteena on nopeuttaa, aikaistaa sekä tarkentaa munasarjasyövän diagnoosia. Tähänastiset tulokset ovatkin olleet hyvin lupaavia.*

### **Kaisa Leppä**

Ohjaaja: TkT Iida Martiskainen

BIOTEKNIikka DI

Leppä tutkii diplomityössään mahdollisuutta kehittää munasarjasyövän diagnosointiin soveltuvaa pikatestiä. Työn aikana hän on tutkinut useita eri testejä, joista osa mittaa yhtä tunnettua syöpämerkkiainetta, ja osa eri merkkiaineiden yhteenliittymiä. Muutama näistä syövän erottelevista testeistä onkin jo saatu toimimaan. Jatkossa Lepän tutkimuksessa on vielä edessä testien optimoimista sekä suorituskyvyn määrittämistä.

### **Pikatesti nopeuttaa diagnoosin saamista**

Lateraalivirtausmääritykset eli pikatestit ovatkin tulleet monelle tutuksi koronan kotitestien myötä, mutta myös raskaustesti toimii samalla periaatteella. Perinteisessä pikatestissä näytteen lisäämisen jälkeen muodostuvat värilliset viivat, joista tulkitaan, onko testitulokset positiivinen vai negatiivinen. Tällainen testi ei kuitenkaan kerro mitään näytteessä olevan mitattavan merkkiaineen määrästä, ja lisäksi tuloksen tulkinta on katsojan silmässä. Kehitettävässä testissä käytettävillä uusilla valoa tuottavilla leimapartikkeleilla ja mittalaitteella on mahdollista saada tarkka mittaustulos.

—Tämä munasarjasyövän pikatesti ei suinkaan ole tarkoitettu kotikäyttöön, vaan ammattilaiskäyttöön vastaanotolla. Näytteiden analysointi on nykyään hyvin paljon keskittetty keskuslaboratorioihin, joten tulosten saamisessa voi kestää jopa päiviä. Toisaalta köyhemmissä maissa resursseja näytteiden säilyttämiselle ja kuljettamiselle ei välttämättä ole ollenkaan. Kehitettävä pikatesti mahdollistaisi potilaan testaamisen jo lääkärikäynnin aikana, Leppä selittää.

### **Syöpädiagnostiikan kehitykselle on tarvetta**

Munasarjasyöpä on toiseksi yleisin gynekologinen ja kymmenenneksi yleisin naisten syöpä. Munasarjasyöpä on usein alussa oireeton, joten sen diagnoosi tapahtuu usein liian myöhäisessä vaiheessa, jolloin syöpä on ehtinyt leviämään ja ennuste on huono. Diagnoosia vaikeuttaa myös se, että syöpäsoluista erittyvät syöpämerkkiaineet voivat olla koholla myös jonkin muun sairauden, kuten endometrioosin takia.

—Syöpädiagnostiikkaa kehitetään jatkuvasti. Yhtenä uutena mielenkiinnon kohteena on merkkiaineiden sokerosien muutokset syöpäsoluissa. Tätä muuttunutta sokerosaa mittaamalla syöpä pystytään paremmin erottamaan muista sairauksista. Lisäksi diagnoosi saadaan aiemmin, sillä osa muutoksista tapahtuu syövän aikaisissa vaiheissa, Leppä kertoo.

Diagnostiikka on jatkuvasti kehittyvä ala, mutta pikatestit ovat tulleet jäädäkseen. Varsinkin syöpädiagnostiikan puolella on aina tarvetta uusille ratkaisuille.



## **Herkkä määrittäminen mahdollistaa lyhyiden nukleinihappokohteiden pienempien pitoisuuksien mittaamisen**

*Uudenlainen määrittäminen mahdollistaa lyhyiden nukleinihappokohteiden herkemman mittaamisen. Turun yliopistossa diplomityötään tekevän Maiju Liimataisen kehittämä määrittäminen on askel kohti mikro-RNA:iden hyödyntämistä diagnostisena merkkiaineena ja syövän varhaisempaa diagnostiikkaa.*

### **Maiju Liimatainen**

Ohjaaja: DI Saara Kuusinen

BIOTEKNIikka DI

Liimatainen on kehittänyt uudenlaista taustasignaalin poistoon pohjautuvaa määrittäystä mikro-RNA:iden pitoisuuksien mittaamiseen. Kompleksin siirrolla saavutettiin jopa viisisataa kertaa herkempi määrittäminen verrattuna vastaavaan määrittämiseen, jossa kompleksia ei siirretä. Tulos on lupaava askel mikro-RNA:iden mittaamiseen soveltuvan määrittäksen kehittämisessä.

Mikro-RNA:iden tarkkaan mittaamiseen on kiinnostusta, sillä mikro-RNA:t ovat lupaavia diagnostisia merkkiaineita. Esimerkiksi syövässä geenien ekspressio ja sitä säätelevien mikro-RNA:iden pitoisuudet muuttuvat. Nämä pitoisuudet muuttuvat usein jo syövän varhaisessa vaiheessa, ennen kuin sairauden oireet ilmenevät. Tästä syystä mikro-RNA-pitoisuuksien mittaaminen voisi mahdollistaa syövän varhaisemman diagnostiikan, ja varhainen diagnostiikka antaa etumatkaa syövän hoitoon. Mikro-RNA:ita kiertää verenkierron mukana ja ne ovat kudosspesifisiä, joten niiden avulla saadaan tietoa myös syövän sijainnista. Käytännössä kuitenkin mikro-RNA:iden alhaiset pitoisuudet ja pieni koko vaikeuttavat mittaamista. Nyt tehdyssä tutkimuksessa löytyi ratkaisu herkkyuden parantamiseksi.

–Yksi määrittäksen herkkyyttä rajoittavista tekijöistä on taustasignaalin taso. Osa käytetystä leimasta sitoutuu epäspesifisesti esimerkiksi määrittäskaivon pohjaan, ja tämän aiheuttama taustasignaali häiritsee mittausta ja vaikeuttaa pienien pitoisuuksien erottamista luotettavasti. Nyt kehitetyssä määrittäksessä herkkyyttä parannetaan siirtämällä kohteen ja leiman muodostaman kompleksin sijoittamiselta toiselle. Kompleksi pystytään irrottamaan ensimmäiseltä sijoittamiselta niin, etteivät epäspesifisesti sitoutuneet leimat irtoa. Irrotettu kompleksin siirretään ja sidotaan toiselle sijoittamiselle, ja epäspesifisesti sitoutuneet leimat jäävät ensimmäiselle sijoittamiselle. Tällä tavalla pääsemme eroon häiritsevistä taustasignaaleista, ja herkkyys paranee, Liimatainen kuvaa määrittäksen toimintaperiaatetta.

Kompleksin siirtoon perustuvia määrittämenetelmiä on aikaisemmin sovellettu proteiineilla ja pidemmillä DNA-kohteilla, mutta periaate on osoitettu nyt toimivaksi lyhyemmällä nukleinihappokohteilla. Tulosten merkittävyyttä rajoittaa vielä käytetyn kohteen erot mikro-RNA:ihin verrattuna.

–Määrittäksessä käytetty kohdemolekyylillä on DNA:ta ja 34 nukleotidia pitkä, kun taas tyypillinen mikro-RNA on 22 nukleotidin mittainen. Näimme kuitenkin tärkeänä osoittaa määrittäisperiaatteen toimivaksi hieman pidemmällä kohteella. Määrittäminen on tarkoitus tulevaisuudessa soveltaa vielä lyhyemmille kohteille, Liimatainen kertoo.

## **Uusi edullisempi, nopeampi ja skaalattavampi menetelmä kehitetty syövän aikaiseen diagnosointiin ja seurantaan**

*Syövän diagnosointiin tarkoitettusta menetelmästä saatiin edullisempi, nopeampi ja skaalattavampi. Pieneen biotekniikan startup-yritykseen, Genomillille, tehdyssä diplomityössä kehitettiin menetelmää, jolla voidaan diagnosoida syöpää erityisesti sen aikaisessa vaiheessa.*

### **Rita Ojaniemi**

Ohjaaja: Dos. Juha-Pekka Pursiheimo  
BIOTEKNIikka

Tutkimuksessa onnistuttiin tekemään syövän diagnosointimenetelmästä edullisempi, nopeampi ja skaalattavampi. Yhä useampi näyte voidaan nyt käsitellä samanaikaisesti, jolloin säästetään aikaa ja rahaa.

Lopputyön tutkimuksen tarkoituksena oli parantaa nukleiinihappodiagnostiikkaa jokaisen potilasnäytteen merkaavalla tunnistussilmukalla. Tunnistussilmukka on nukleiinihappoketju, jolla on tunnettu emäsjärjestys. Silmukka kiinnittyy keinotekoisesti rakennettuun kompleksiin, joka taas kiinnittyy näytteessä olevaan soluvapaaseen DNA:han, jossa on kliinisesti kiinnostavia mutaatioita. Mutaatiot voivat olla esimerkiksi syövän aiheuttamia. Tämän jälkeen silmukka-kohde-kompleksia voidaan monistaa mm. polymeerasiketjureaktion avulla. Kaupallisessa sekvensoinnissa selvitetään monistuneiden tuotteiden emäsjärjestys, jolloin syntyneestä datasta voidaan poimia tunnettu silmukka ja sitä potilasta vastaava mutaatio.

-Menetelmän avulla potilasnäytteet voidaan yhdistää jo menetelmäprotokollan aikaisessa vaiheessa, jolloin reagensseja kuluu vähemmän. Siten menetelmä yksinkertaistuu, näytekohtaiset kustannukset pienenevät ja lisäksi voidaan vähentää työhön kuluva aikaa, Ojaniemi kertoo.

### **Diagnostiikan maailma aukeaa**

Sovelluksia menetelmälle löytyy myös muualta kuin syövän diagnostiikasta. Menetelmää voidaan käyttää mahdollisesti myös antibioottiresistenttien bakteerien diagnosoimiseen. Erityisesti markkinat pyörivät kuitenkin syövän aikaisen vaiheen diagnosoinnissa ja jälkiseurannassa. Syövän aikainen diagnosointi parantaa huomattavasti parantumisen mahdollisuuksia.

-Tällä menetelmällä on mahdollista muuttaa maailmaa, Ojaniemi toteaa. Tulevaisuus näyttää kuinka suureksi Genomillin arvo voikaan vielä nousta.

-Yrityksen iskulauseena toimii ”impossible is nothing” ja siihen täällä todellakin uskotaan, Ojaniemi iloisesti möläyttää.

## **Organoidit osoittautuivat lupaavaksi soluviljelymenetelmäksi syöpälääketutkimukseen**

*Kehittyvä syöpätutkimus vaatii uusia ja innovatiivisia soluviljelymenetelmiä solujen todenmukaisempien elinolosuhteiden mallintamiseksi. Misvik Biology Oy:ssä diplomityötään suorittava Eetu Välimäki on onnistuneesti kehittänyt ja hyödyntänyt kasvainorganoidien viljelymenetelmää immunologisten syöpälääkkeiden vaikutusten tutkimiseksi.*

### **Eetu Välimäki**

Ohjaaja: Dr. Juha K. Rantala  
BIOTEKNIikka (DI)

Diplomityössä hyödynnettyä soluviljelymenetelmää kehitettiin immunologisten syöpähoitojen tehokkuuden ja kohdentamisen edistämiseksi sekä lääkeaineiden ja immuunijärjestelmän eri solujen vuorovaikutusten ymmärtämiseksi. Välimäki käytti työssään perinteisen kaksiulotteisen viljelymenetelmän sijaan edistyneempää kolmiulotteista (3D) menetelmää, mikä mahdollistaa kasvainympäristön todenmukaisemman mallintamisen. Tässä 3D-viljelymenetelmässä monikuoppalevyn kaivojen pohjaan muodostettuihin pinnoitteisiin kiinnittyneet syöpäsolut muodostivat kasvainkudosta jäljitteleviä 3D-rakenteita eli organoideja, joita käytettiin immunologisten syöpälääkevasteiden määrittämisessä. Määrittystä varten Välimäki lisäsi organoidiviljelmiin eri syöpälääkkeitä sekä kasvainta vastaan taistelevia immuunisoluja, minkä jälkeen hän selvitti organoideissa sekä immuunisolujen toiminnassa tapahtuneita muutoksia.

— Organoidien viljelymenetelmä ja sitä hyödyntävät määritykset onnistuivat työn aikana hyvin, vaikka samankokoisten organoidien muodostamisessa ilmeni pieniä haasteita, jotka pitäisi vielä ratkaista, Välimäki toteaa.

### **Koneoppimistyökalu lääkeherkkyysmääritysten kuva-analyysien tueksi**

Soluviljelymenetelmän lisäksi Välimäki ohjelmoi mikroskooppikuvien analysoimiseen koneoppimistyökalun, jonka avulla organoideista otetut kuvat ryhmiteltiin organoidien rakenteen mukaan eri fenotyyppeihin. Koneoppimistyökalu opetettiin erottamaan kuvista runsaasti immuunisoluja sisältäneet organoidit, mikä mahdollisti immuunisolujen toimintaa aktivoivien lääkeaineiden tunnistamisen.

— Alun perin tarkoitus olisi ollut opettaa koneoppimistyökalu tunnistamaan useampia fenotyyppejä, mutta erilaisista lääkevasteista saatiin määrityksen aikana vähän dataa. Kuitenkin jatkossa kerätyn kuvadatan myötä on koneoppimistyökalu mahdollista opettaa tunnistamaan yhä useampia fenotyyppejä, Välimäki kertoo.

Koneoppimistyökalua ja organoidien viljelymenetelmää on hyödynnetty Välimäen diplomityön jälkeen onnistuneesti, vaikka menetelmän optimoimiseen etsitään vielä ratkaisua.

## **3D-tulostetulla kasetilla eristettyä ja puhdistettua DNA:ta**

*3D-tulostamisen hyödyntämistä diagnostisten kasettien valmistuksessa ja kehitystyössä hidastaa vähäinen tieto nestetiiviiden rakenteiden tulostamisesta. Junes pyrkii diplomityössään valmistamaan 3D-tulostamisen keinoin nestekäsittelyyn soveltuvan kasetin ja testaamaan sitä tosikäytössä DNA:n eristykseen ja puhdistukseen.*

### **Helea Junes**

Ohjaajat: TKT Satu Lahtinen ja Prof. Tero Soukka  
BIOTEKNIikka DI

Junes kehittää työssään 3D-tulostettavaa kasettia, jonka avulla voidaan toteuttaa potilasnäytteen DNA:n eristys ja puhdistus automaattisesti. Tähän mennessä Junes on onnistuneesti suunnitellut ja valmistanut nestetiiviisti toimivan kasettikonseptin sekä rakentanut analysaattorin kasetin toimintojen automatisointiin. Alustavien tulosten perusteella kasetilla saa eristettyä DNA:ta, mutta kasetin suorituskyvyssä on vielä optimoitavaa.

-DNA:n eristys ja puhdistus on kriittinen näytteen esikäsittelyaskel sellaisissa diagnostisissa testeissä, jotka perustuvat taudinaiheuttajan DNA:n monistukseen. Kaikille Covid-19-pandemian aikana tutuksi tulleet koronan PCR-testit ovat juuri tällaisia testejä. Jotta näytteen esikäsittelyn vaativia testejä voitaisiin soveltaa vieritestaukseen, kuten matkustajien seulontaan lentokentillä, on kehitettävä testikasetteja, joihin on integroitu näytteen esikäsittely, Junes kertoo.

Nestekäsittelykasetit valmistetaan perinteisesti teollisilla valmistusmenetelmillä, kuten ruiskuvalulla, jotka soveltuvat parhaiten suurien erien valmistamiseen. Nopeaan kehitystyöhön ne eivät taivu.

-3D-tulostus tarjoaa nopean väylän valmistaa ja testata useita kasettikonsepteja lyhyessä ajassa. Kynnys kokeilla villimpiäkin ideoita, jotka muuten jäisivät pöytälaatikkoon, on tällöin matalampi. 3D-tulostuksella on siten potentiaali tuottaa enemmän ja isompia innovaatioita, Junes maalaillee.

### **3D-tulostetut kasetit diagnostisten testien tulevaisuus?**

-Ennen vuosituhanen vaihdetta oli vielä suuria lupauksia 3D-tulostamisesta ja sen tuomista uusista mahdollisuuksista. Realiteetit kuitenkin paljastuivat, kun huomattiin lisäävän valmistuksen tuovan mukanaan uudenlaisia haasteita ja rajoitteita, Junes kertoo.

Täysin nestetiiviiden rakenteiden ja kappaleiden 3D-tulostaminen edellyttää niin tulostusmateriaalien kuin -menetelmien optimoimista.

-Pintajännitettä poistavat nesteet aiheuttavat lisää ongelmia, etenkin jos kokonaisuudessa on liikkuvia osia. Täysin nestetiiviis suorituskyky on onnistuttu saavuttamaan kasetissa, mutta se on ollut tämän työn suurin haaste, Junes sanoo.

Työn seuraavassa vaiheessa kasettiin ja analysaattoriin pyritään integroimaan varsinainen testi, eli puhdistetun DNA:n monistaminen ja patogeenin havaitseminen näytteestä.

## Uusi testi parantamaan sydäninfarktin diagnostiikkaa

*Sydäninfarktin diagnosointi on haastavaa, koska mikään nykyisistä diagnostisista työkaluista ei pysty tarkasti tunnistamaan sydäninfarktipotilaita. Turun yliopistossa erikoistyötä tekevä Tuulia Tuominen on kehittänyt lupaavan uuden laboratoriotestin, joka voi tulevaisuudessa mahdollistaa sydäninfarktipotilaiden tunnistuksen nopeammin ja tarkemmin.*

### **Tuulia Tuominen**

Ohjaajat: Apulaisprofessori Saara Wittfooth ja DI Selma Salonen  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Kun sydäninfarktia epäillään, potilaan verestä mitataan sydänperäisten troponiinien pitoisuus. Nykyinen laboratoriotesti havaitsee kohonneen troponiinipitoisuuden sydäninfarktipotilaissa, mutta myös monissa muissa potilasryhmissä. Tämä tekee sydäninfarktipotilaiden tunnistamisesta haastavaa. Tuominen on kehittänyt uuden laboratoriotestin, joka pystyy erottamaan sydäninfarktipotilaat munuais- ja eteisvärinäpotilaista. Nykyisellä laboratoriotestillä tämä ero ei ole yhtä selkeä.

—Tämän uuden testin avulla yksi verinäyte riittää erottamaan sydäninfarktille ominaisen akuutin troponiinipitoisuuden nousun kroonisesti koholla olevasta pitoisuudesta. Tulevaisuudessa tämä voi mahdollistaa infarktipotilaiden nopeamman diagnosoinnin, Tuominen kertoo.

Sydänperäiset troponiinit ovat sydänlihaksen proteiineja. Nykyään tiedetään, että sydänperäiset troponiinit vapautuvat sydäninfarktin aikana verenkiertoon pitkinä molekyyleinä. Kaikissa muissa potilasryhmissä, joita on tähän mennessä tutkittu, verenkierrosta löytyvät sydänperäiset troponiinit ovat pilkkoituneet pieniksi molekyyleiksi.

—Nykyään sairaaloissa käytössä olevat laboratoriotestit mittaavat sekä pitkiä että lyhyitä troponiini-molekyylejä. Kehittämämme uusi laboratoriotesti mittaa vain pitkiä muotoja, joita vapautuu sydäninfarktin aikana. Tällä tavalla voidaan tarkemmin tunnistaa sydäninfarktipotilaat, Tuominen täsmentää.

### **Vaikuttava suorituskyky erityisen leimateknologian avulla**

Tyypillisesti laboratoriotestien pitää pystyä tunnistamaan hyvin pieniä analyyttipitoisuuksia potilasnäytteistä. Laboratoriotestissä käytettävä leimateknologia vaikuttaa paljon siihen, kuinka pieniä pitoisuuksia pystytään havaitsemaan luotettavasti. Pitkiä sydänperäisen troponiinin muotoja mittaava testi on jo aikaisemmin kehitetty Turun yliopistolla, mutta sen avulla ei voitu mitata tarpeeksi matalia pitoisuuksia. Erikoistyössään Tuominen on kehittänyt aikaisempaa vastaavan mutta herkemmän testin käyttämällä erittäin tehokasta leimateknologiaa. Tämä erityinen leimateknologia mahdollistaa erittäin pienten pitoisuuksien luotettavan mittaamisen.

—Alustavat tulokset ovat hyvin lupaavia. Uskon, että tätä aihetta tullaan tutkimaan hyvin perusteellisesti lähivuosina, Tuominen ennustaa.

## **CA19-9 and CA15-3 glycovariants – Promising way to monitor lung cancer**

*Promising biomarkers for monitoring lung cancer was found while studying different glycoprotein levels in lung cancer follow-up samples. Saara Sahlman, a masters student from university of Turku found in her thesis that certain glycovariant levels in blood follow the lung cancer progression. This could be used to follow cancers response to treatment and help to focus on more efficient therapy methods. Leading to better outcomes in lung cancer treatments.*

### **Saara Sahlman**

Supervisor: M. Sc. Shruti Jain

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Sahlman studied different glycovariant levels from three different glycoproteins in lung cancer patients EDTA plasma samples. She found three CA19-9 and one CA15-3 promising glycovariants that show great potential for monitoring lung cancer treatment. Following these glycovariants in patients' blood it could be possible to monitor used therapy methods and focus on using most effective ones. Also, possible resistance for used treatments could be detected earlier.

### **What is new?**

Glycoproteins are proteins that are modified in a process called glycosylation. Different sugar moieties are attached to the target protein, and highly affect the protein's functions. Numerous glycoproteins are used for lung cancer detection. However they can be found in other conditions and from healthy individuals. That is why they are not specific. In cancer cells this glycosylation process is twisted and these changed sugar moieties are specific to the cancer. By detecting these altered glycoproteins, called glycovariants, more specific method can be developed. These different sugar moieties can be detected with certain protein group, called lectins.

Sahlman used lectins' ability to detect different glycovariants when she developed a simple immunoassay to detect different glycovariants of CA19-9, CA15-3 and CA125 glycoproteins in lung cancer patients EDTA plasma samples. Highly sensitive nanoparticle based technology was used, where these lectins were coated on fluorescent nanoparticles to improve the detection ability of the immunoassay. Samples were collected from patients during their cancer treatment and Sahlman studied which glycovariant levels followed best the progress of the cancer.

### **What benefits does lung cancer monitoring bring?**

Lung cancer is the second most common cancer in the world in both sexes combined. It also causes most cancer related deaths worldwide. There are numerous methods to treat lung cancer, but they do not all work on all patients. This is why it is important to monitor the progress of cancer during therapy. If the cancer is not responding to treatment as hoped it is possible to try some other method. Cancers also have an ability to form resistance to different treatments. When monitoring the cancer, this resistance could be detected earlier and new therapy forms could be used when needed.

## **Uusi tutkimustieto munuaispotilaista tarkentaa sydäninfarktin diagnostiikkaa**

*Munuaispotilaiden kohonnut troponiini T:n pitoisuus aiheuttaa haasteita munuaistautia sairastavien sydäninfarktin tunnistamisessa. Erikoistyössään Emilia Kaipainen tutki munuaispotilaiden troponiini T:n pitkän ja pilkkoutuneen muodon määriä. Munuaistaudissa troponiini T on pilkkoutuneessa muodossa ja nykyisillä troponiini T -testeillä se voi johtaa virheelliseen diagnoosiin sydäninfarktista.*

### **Emilia Kaipainen**

Ohjaajat: Apulaisprofessori Saara Wittfooth, DI Selma Salonen  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Troponiini T on osa sydänlihassolujen troponiinikompleksia, jota vapautuu verenkiertoon sydänlihaksen vaurioituessa. Troponiini T:n kohonnut pitoisuus potilaalla aiheuttaa epäilyn sydäninfarktista. Laajasti käytössä olevien, kaikkia troponiini T:n muotoja tunnistavien testien perusteella ei kuitenkaan voida tietää, johtuuko kohonnut troponiini T:n pitoisuus munuaistaudista vai sydäninfarktista.

Loppuvaiheen munuaistaudissa kohonnut troponiini T:n pitoisuus veressä johtuu molekyylin pilkkoutuneista muodoista, kun taas sydäninfarktin akuutissa vaiheessa molekyyli on pitkässä muodossa. Troponiini T on koholla myös munuaistaudin aikaisemmissa vaiheissa, mutta molekyylin muodosta ei ole ollut aiemmin tutkimustietoa.

Erikoistyötään Turun yliopistossa tekevä Emilia Kaipainen tutki aikaisemman vaiheen munuaistaudissa esiintyviä troponiini T:n muotoja. Kaipainen kehitti työssään kaikkia troponiini T:n muotoja mittaavan testin. Tarkoitus oli saada testistä mahdollisimman samankaltaisia tuloksia antava kuin kaupallinen troponiini T -testi.

—Testin kehittämisessä oli jonkin verran haasteita, mutta testistä saatiin kehitettyä sellainen, että se antaa samankaltaisia tuloksia näytteistä kuin kaupallinen testi, Kaipainen kertoo.

### **Kohti tarkempaa sydäninfarktin diagnostiikkaa**

Kaipainen käytti kehittämäänsä testiä ja aikaisemmin Turun yliopistossa kehitettyä pitkää troponiini T:tä mittaavaa testiä munuaispotilaiden plasmanäytteiden analysoimiseen. Tutkimuksessa saatiin selville, että munuaispotilaiden veressä on pääosin troponiini T:n pilkkoutuneita muotoja. Pitkää muotoa tunnistava troponiini T -testi on siis tarkempi sydäninfarktin diagnosointiin.

Kaipaisen kehittämä troponiini T -testi ja aikaisemmin kehitetty pitkää muotoa mittaavaa troponiini T -testi hyödyntävät käänteisviritteisiä nanopartikkeleita, joilla saavutetaan erittäin hyvä herkkyys eli testit pystyvät mittaamaan hyvin pieniä pitoisuuksia luotettavasti.

—Erittäin herkälle pitkää troponiini T:tä tunnistavalle testille on ehdottomasti tarvetta diagnostiikassa ja toivottavasti tulevaisuudessa sydäninfarktin diagnosointi on tarkempaa myös munuaispotilailla, Kaipainen toteaa toiveikkaana.