

MONDAY 13TH - FRIDAY 17TH APRIL

---

# Nuoret Tutkijat Young Scientists 2026

**Bioteknologian laitos**  
**Department of Life**  
**Technologies**



**UNIVERSITY  
OF TURKU**

Acharya Kamal  
Ahonen Melissa  
Andersin Ella  
Archi Shucheta  
Balasooriya Mudiyansele  
Navanjana  
Bekečová Adela  
Dagar Ritu  
Doan Phong  
Enkhkhuyag Bilguun  
Esposito Clelia  
Fatima Faiqa  
Helin Susanna  
Hilke Niilo  
Hirvonen Eetu  
Hitihami Mudiyansele  
Kavindya  
Hyytiäinen Mira  
Jokinen Juulia  
Jylhä Aino  
Järvi Alina  
Kauraala Aarne  
Keinänen Maisa  
Khan Awais  
Kierikka Kari  
Kivistö Vilma  
Koivu Hanna  
Korhonen Ville  
Kumpulainen Victoria  
Kuosmanen Konsta  
Lehtisalo Susanne  
Leskinen Ester  
Majaniemi Milla  
Majuri Noora  
Mittra Koushik  
Moglia Amanda

Nikula Matilda  
Niskanen Emmi  
Ojaniittu Evelina  
Orkola Sonja  
Parviainen Matleena  
Parvinen Irene  
Peltoniemi Emilia  
Pietarinen Nuutti  
Pikkarainen Maisa  
Prittinen Sanni  
Pursimo Satu  
Qadeer Abdul  
Rahmani Sajad  
Rouvinen Adèle  
Räisänen Anna  
Saarelainen Inka  
Saarinen Tytti  
Saario Eveliina  
Seppälä Loviisa  
Setola Julia  
Tanskanen Nenna  
Tavi Paavo  
Tervomaa Pinja  
Tiusanen Tiia  
Tomberg Tutta  
Uitto Leevi  
Uusitupa Sanni  
Vahtola Iida  
Varonen Saga  
Veijola Emmi  
Virtanen Ella  
Urban Herceg Bruna  
Willgren Kristiina  
Wirtzenius Veera  
Ylikangas Pinja  
Zafar Sameera

---

---

## **TAPAHTUMAN AVAUS / EVENT OPENING**

Maanantai / Monday 13.4.2026 8<sup>30</sup>  
Alhopuro auditorium, Medisiina D

---

---

## **SEMINAR SESSIONS**

Maanantai / Monday 13.4.2026 – perjantai / Friday 17.4.2026  
8<sup>30</sup> onwards  
Alhopuro auditorium, Medisiina D

---

---

## **POSTER SESSION**

Keskiviikko / Wednesday 15.4.2026 12<sup>15</sup> – 14<sup>15</sup>  
Tiedonkolu, Medisiina D

---

---

Pharmacy, Itäinen Pitkäkatu 4, Turku, 20520



## **Experts in Biosynthetic APIs**

*Service provider for pharmaceutical manufacturers  
with 40+ years of expertise in biomanufacturing processes*

member since 2024



*Ready to learn more?*

<https://care4living.fi>



**8<sup>30</sup> Tapahtuman avaus / Event opening– Prof. Paula Mulo**Session host: *Oona Nieminen*« 1 » 8<sup>35</sup>**Amanda Moglia**

Generation of novel anthracycline analogs by combinatorial biosynthesis

BIOCHEMISTRY

« 2 » 8<sup>55</sup>**Ester Leskinen**

Antibioottien teollinen tuotanto: Daptomysiinin tuotantoprosessin optimointi

BIOMOLEKYYLIEN TUOTANTO (DI)

« 3 » 9<sup>15</sup>**Maisa Pikkarainen**Production of natural products in *Escherichia coli*

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

« 4 » 9<sup>35</sup>**Aarne Kauraala**

Optimizing the transient production of Topoisomerase II via FACS selection of Sf9 insect cell line

BIOMOLECULAR PRODUCTION (TECH.)

9<sup>55</sup> – 10<sup>15</sup> TAUKO / BREAKSession host: *Aleksi Nuutila*« 5 » 10<sup>15</sup>**Paavo Tavi**

Unorthodox DNA-binding by spirochetal RNA polymerase: Implications for transcriptional regulation and genome navigation

BIOCHEMISTRY

« 6 » 10<sup>35</sup>**Kari Kierikka**Ligand specificity of *Borrelia burgdorferi* BmpD and its potential as a carrier for novel drugs for specific treatment against Lyme borreliosis

BIOCHEMISTRY

« 7 » 10<sup>55</sup>**Tutta Tomberg**Structural and functional characterisation of GNAT2 acetyltransferases in *Synechocystis* sp.PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*

BIOCHEMISTRY

« 8 » 11<sup>15</sup>

**Maisa Keinänen**

Bispesifisen darpiinifuusion kehittäminen proteiinien kromatografiseen puhdistukseen  
BIOMOLEKYYLIEN TUOTANTO (DI)

11<sup>35</sup> – 12<sup>40</sup> TAUKO / BREAK

---

« III »

**MAANANTAI / MONDAY 13.4. 12<sup>40</sup> – 14<sup>00</sup>**

---

Session host: *Liisa Pösö*

« 9 » 12<sup>40</sup>

**Emilia Peltoniemi**

Development of H5 specific ELISpot and B cell flow cytometry to investigate memory B cell responses induced by avian influenza A H5N8 vaccination  
CELL BIOLOGY

« 10 » 13<sup>00</sup>

**Nenna Tanskanen**

TBEV-infektion serologinen tunnistaminen: NS1- ja E-proteiinien hyödyntäminen ELISA-testissä  
BIOKEMIA

« 11 » 13<sup>20</sup>

**Shucheta Nazia Archi**

Optimizing methods to study associations between genetic variations, clinical outcomes, and treatment response in patients with juvenile idiopathic arthritis  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 12 » 13<sup>40</sup>

**Pinja Tervomaa**

Thermogenic activation of human adipose tissue spheroids and its impact on batokine secretion  
CELL BIOLOGY

14<sup>00</sup> – 14<sup>20</sup> TAUKO / BREAK

---

« IV »

**MAANANTAI / MONDAY 13.4. 14<sup>20</sup> – 15<sup>40</sup>**

---

Session host: *Emmi Virtanen*

« 13 » 14<sup>20</sup>

**Hanna Koivu**

Fecal Carriage of ESBL Producing *Escherichia coli* in Southwest Finland  
CELL BIOLOGY

« 14 » 14<sup>40</sup>

**Inka Saarelainen**

Pitkät ei-koodaavat RNA:t okasolusyövässä  
SOLUBIOLOGIA

« 15 » 15<sup>00</sup>

**Matleena Parviainen**

Nanostructured lipid carriers for enhancing oral bioavailability of small molecules by evading intestinal efflux transporters

BIOCHEMISTRY

**15<sup>20</sup> Alumnin puheenvuoro / Alumni talk**

***Mikko Huhtakallio 3PBIOVIAN***

---

---

« V »

**TIISTAI / TUESDAY 14.4. 8<sup>30</sup> – 9<sup>50</sup>**

---

---

Session host: *Oskar Haavisto*

« 16 » 8<sup>30</sup>

**Tytti Saarinen**

3D-tulostetun mikrofluidisen testikasetin kehitys vieritestaukseen

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 17 » 8<sup>50</sup>

**Konsta Kuosmanen**

Biopohjaisista polymeereistä 3D-tulostettu toiminnallinen testikasetti syöpädiagnostiikkaan

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 18 » 9<sup>10</sup>

**Susanne Lehtisalo**

Monianalyttinen lateraalivirtausimmunomääritys raudanpuutteen tunnistamiseen

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 19 » 9<sup>30</sup>

**Eveliina Saario**

Lateraalivirtaustestin tehostaminen polystreptavidini-testiviivalla

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

**9<sup>50</sup> – 10<sup>10</sup> TAUKO / BREAK**

---

---

« VI »

**TIISTAI / TUESDAY 14.4. 10<sup>10</sup> – 11<sup>30</sup>**

---

---

Session host: *Ida Bäckström*

« 20 » 10<sup>10</sup>

**Saga Varonen**

Improving cardiac troponin autoantibody detection

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 21 » 10<sup>30</sup>

**Emmi Niskanen**

Long cardiac troponin forms in endurance athletes

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 22 » 10<sup>50</sup>

**Bruna Vrbn Herceg**

Development and optimization of a lectin-based rapid test using FastEV®-enriched extracellular vesicles and glycoprotein for improved prostate cancer detection

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 23 » 11<sup>10</sup>

**Sanni Prittinen**

Detection of MUC1 glycovariant for early diagnosis of bladder cancer using lateral flow immunoassay

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

11<sup>30</sup> – 12<sup>30</sup> TAUKO / BREAK

---

---

« VII »

TIISTAI / TUESDAY 14.4. 12<sup>30</sup> – 14<sup>00</sup>

---

---

Session host: *Imran Mahmud*

« 24 » 12<sup>30</sup>

**Adela Bekečová**

Development of a Bioaffinity Assay Employing SpyTag-SpyCatcher Technology and Designed Ankyrin Repeat Proteins for Keratin-7 Detection

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 25 » 12<sup>50</sup>

**Satu Pursimo**

3D streptavidin surfaces for higher capacity and enhanced kinetics in solid-phase immunoassays

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 26 » 13<sup>10</sup>

**Julia Setola**

Development of different capture and release methods in the complex transfer immunoassay for the Alzheimer's disease biomarkers

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 27 » 13<sup>30</sup>

**Clelia Esposito**

Ultra-sensitive sandwich immunoassay for Alzheimer's disease biomarker using upconverting nanoparticles detection

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

14<sup>00</sup> – 14<sup>20</sup> TAUKO / BREAK

---

---

« VIII »

TIISTAI / TUESDAY 14.4. 14<sup>20</sup> – 15<sup>40</sup>

---

---

Session host: *Sara Simonen*

« 28 » 14<sup>20</sup>

**Susanna Helin**

Immunokomplekseja hyödyntävä testi hormonien havaitsemiseksi

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 29 » 14<sup>40</sup>

**Emmi Veijola**

Prototyypitestin kehitys hengitystieinfektion taudinaiheuttajalle mariPOC-testijärjestelmään

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 30 » 15<sup>00</sup>

**Alina Järvi**

Lateraalivirtaustesti liukoisen Clever-1-molekyylin havaitsemiseen hyperferritinemian diagnostiikassa  
BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

**15<sup>20</sup> Alumnin puheenvuoro / Alumni talk**  
*Etví Juntunen, Olo Health Oy*

---

---

« IX »

**KESKIVIikko / WEDNESDAY 15.4. 8<sup>30</sup> – 9<sup>50</sup>**

---

---

Session host: *Karoliina Solin*

« 31 » 8<sup>30</sup>

**Vilma Kivistö**

Haihtuvat yhdisteet suomalaisista päärynälajikkeista valmistetuissa mehuissa ja siidereissä  
ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

« 32 » 8<sup>50</sup>

**Iida Vahtola**

Maltoosinegatiivisen hiivan ja glykolipidipohjaisen säilöntäaineen käyttö alkoholittoman oluen valmistuksessa  
ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

« 33 » 9<sup>10</sup>

**Veera Wirzenius**

Sellupohjaiseen teknologiaan perustuvan kofeiinituotteen valmistus Active Ingredient Delivery System -teknologialla  
ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

« 34 » 9<sup>30</sup>

**Kristiina Willgren**

Appelsiininkuorista viinietikkaa – biomassahävikin hyödyntäminen elintarvikekäyttöön  
ELINTARVIKEKEMIA

**9<sup>50</sup> – 10<sup>10</sup> TAUKO / BREAK**

---

---

« X »

**KESKIVIikko / WEDNESDAY 15.4. 10<sup>10</sup> – 11<sup>10</sup>**

---

---

Session host: *Cong Ding*

« 35 » 10<sup>10</sup>

**Koushik Mitra**

Phenolic Characterization of Finnish-Grown Grapes  
FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

« 36 » 10<sup>30</sup>

**Muhammad Awais Khan**

Discovering the impact of different cultivation factors on the phenolic composition of raspberries  
FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

« 37 » 10<sup>50</sup>

**Kavindya Sandeepanie Gunathilaka**

Phenolic composition of alcoholic beverages and vinegars produced from apple juice and pomace-based fermentation

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

11<sup>10</sup> – 12<sup>15</sup> Lunch break

Poster session 12<sup>15</sup> – 14<sup>15</sup> Tiedonkolu, MedisiinaD

14<sup>15</sup> – 14<sup>30</sup> TAUKO / BREAK

---

---

« XI »

**KESKIVIIKKO / WEDNESDAY 15.4. 14<sup>30</sup> – 15<sup>50</sup>**

---

---

Session host: *Artur Sannikov*

« 38 » 14<sup>30</sup>

**Eetu Hirvonen**

Nopea kalan laadun määrittäminen tekoälypohjaisen sensorin avulla

ELINTARVIKEKEHTIYS (DI)

« 39 » 14<sup>50</sup>

**Loviisa Seppälä**

Sivuvirtamateriaalien hyödyntäminen ja prosessin optimointi paisutettujen elintarvike-ekstrudaattien valmistuksessa

ELINTARVIKEKEHTIYS (DI)

« 40 » 15<sup>10</sup>

**Matilda Nikula**

Maitohappofermentoinnin vaikutus porkkanan ja lantun haihtuviin aromiyhdisteisiin

ELINTARVIKEKEMIA

15<sup>30</sup> **Alumnin puheenvuoro / Alumni talk**

*Sarianna Koivula, Piiliset (Finnsusp Oy)*

---

---

« XII »

**TORSTAI / THURSDAY 16.4. 8<sup>30</sup> – 9<sup>50</sup>**

---

---

Session host: *Dzmitry Paturemski*

« 41 » 8<sup>30</sup>

**Anna Räisänen**

Impact of phytase treatment and heating on functionality of pea and faba bean protein concentrates

BIOMOLECULAR PRODUCTION (TECH.)

« 42 » 8<sup>50</sup>

**Kamal Acharya**

Oil purification (stripping) by a solvent free aluminum oxide-based procedure

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

« 43 » 9<sup>10</sup>

**Bilguun Enkhkhuyag**

NMR based metabolomics study on interspecific hybrid strawberries  
FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

« 44 » 9<sup>30</sup>

**Balasooriya Mudiyansele Navanjana**

Analysis of volatile compounds in cell-cultured coffee  
FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

9<sup>50</sup> – 10<sup>10</sup> TAUKO / BREAK

---

« XIII »

**TORSTAI / THURSDAY 16.4. 10<sup>10</sup> – 11<sup>30</sup>**

---

Session host: *Otso Turunen*

« 45 » 10<sup>10</sup>

**Noora Majuri**

The role of GM-CSF in microglial amyloid- $\beta$  turnover in a mouse Alzheimer's disease model  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 46 » 10<sup>30</sup>

**Sameera Zafar**

Deciphering the Molecular Changes of MDP- and GMP-Derived Monocytes in Response to M-CSF and GM-CSF Stimulation  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

« 47 » 10<sup>50</sup>

**Sajad Rahmani**

Embiggin Function and Regulation in Human and Murine Macrophages  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

« 48 » 11<sup>10</sup>

**Ritu Dagar**

Crosstalk between SHANK3 and VEGF signaling in endothelial cells  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

11<sup>30</sup> – 12<sup>30</sup> TAUKO / BREAK

---

« XIV »

**TORSTAI / THURSDAY 16.4. 12<sup>30</sup> – 13<sup>50</sup>**

---

Session host: *Iida-Maria Rantanen*

« 49 » 12<sup>30</sup>

**Victoria Kumpulainen**

Impact of Epstein-Barr Virus Infection on the Therapeutic Response to PI3KCA Inhibition in Gastric Cancer  
MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

« 50 » 12<sup>50</sup>

**Milla Majaniemi**

Targeting tumor-stroma interactions in prostate cancer using 3D co-culture systems  
MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 51 » 13<sup>10</sup>

**Muhammad Abdul Qadeer**

Cell based *in vitro* gut model to study the impact of microbiome derived metabolites

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

« 52 » 13<sup>30</sup>

**Melissa Ahonen**

Chemical synthesis and mass spectrometric detection of microbiome derived N-acyl amides

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

13<sup>50</sup> – 14<sup>10</sup> TAUKO / BREAK

---

« XV »

TORSTAI / THURSDAY 16.4. 14<sup>10</sup> – 15<sup>30</sup>

---

Session host: *Eba Itafa*

« 53 » 14<sup>10</sup>

**Ella Andersin**

Role of thioredoxins in regulating cyanobacterial bioenergetics under changing light conditions

MOLECULAR PLANT BIOLOGY

« 54 » 14<sup>30</sup>

**Ville Korhonen**

A control interface proof-of-concept for continuous photobioreactor systems: Balancing between autotrophic growth and 3-hydroxybutyrate production

SUSTAINABLE BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES (TECH.)

« 55 » 14<sup>50</sup>

**Leevi Uitto**

Characterization of the most prominent *Synechocystis* sp. PCC6803 strains engineered for 3-hydroxybutyrate production

BIOMOLECULAR PRODUCTION (TECH.)

15<sup>10</sup> **Alumnin puheenvuoro / Alumni talk**

*Heta Mattila, University of Turku*

---

« XVI »

PERJANTAI / FRIDAY 17.4. 8<sup>30</sup> – 9<sup>50</sup>

---

Session host: *Emilia Kärkkäinen*

« 56 » 8<sup>30</sup>

**Irene Parvinen**

Mikroepäpuhtauksien poisto teollisista jätevesistä Suomessa

BIOMOLEKYYLIEN TUOTANTO (DI)

« 57 » 8<sup>50</sup>

**Adele Rouvinen**

Perunaproteiini-isolaatin rakenteen muokkaaminen ja umamin korostaminen

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

« 58 » 9<sup>10</sup>

**Aino Jylhä**

Kasvipohjaisten proteiini-rikkaiden tuotteiden vaikutukset ihmisen suolistomikrobiomiin: *In Vitro*-analyysi

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

« 59 » 9<sup>30</sup>

**Ella Virtanen**

Entsyymikäsittelyn vaikutukset kaura- ja ruisjuomien ominaisuuksiin

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

**9<sup>50</sup> – 10<sup>10</sup> TAUKO / BREAK**

---

---

« XVII »

**PERJANTAI / FRIDAY 17.4. 10<sup>10</sup> – 11<sup>30</sup>**

---

---

Session host: *Irene Callus*

« 60 » 10<sup>10</sup>

**Phong Doan**

Functional Characterization of extra Disulfide-Stabilized VHH variants for Phage Display Libraries Construction

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 61 » 10<sup>30</sup>

**Faiqa Fatima**

Establishment of Stable Recombinant Protein Expression in CHO Cells Using a PiggyBac Transposon Platform

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 62 » 10<sup>50</sup>

**Pinja Ylikangas**

Biomarker Discovery with Oxford Nanopore Sequencing and Phage Display

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

« 63 » 11<sup>10</sup>

**Sonja Orkola**

Implementation of a novel mammalian cell display platform to enable the production of ultra-stable and biophysically favourable antibodies

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

**11<sup>30</sup> – 12<sup>30</sup> TAUKO / BREAK**

---

---

« XVIII »

**PERJANTAI / FRIDAY 17.4. 12<sup>30</sup> – 13<sup>50</sup>**

---

---

Session host: *Sami Oksanen*

« 64 » 12<sup>30</sup>

**Evelina Ojaniittu**

Estradioli-immunokompleksivasta-aineiden affiniteettimaturaatio uuden sukupolven sekvensointimenetelmää hyödyntäen

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 65 » 12<sup>50</sup>

**Tiia Tiusanen**

Anti-immunokompleksisten Fab-fragmenttien kehittäminen estradiolin ei-kilpailevaa määritystä varten

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 66 » 13<sup>10</sup>

**Mira Hyytiäinen**

Vasta-aineiden spesifinen kohdentaminen *Borrelia burgdorferi* -bakteerin pintaproteiini C:hen (OspC) ja sen konservoituneeseen C-terminaaliseen päähän Lymen taudin diagnostiikan tehostamiseksi

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 67 » 13<sup>30</sup>

**Sanni Uusitupa**

Keratiini 7 eristäminen ja sen sitojien validointi

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

**13<sup>50</sup> – 14<sup>10</sup> TAUKO / BREAK**

---

---

« XIX »

**PERJANTAI / FRIDAY 17.4. 14<sup>10</sup> – 15<sup>20</sup>**

---

---

Session host: *Susanna Lammi*

« 68 » 14<sup>10</sup>

**Niilo Hilke**

Prosessiparametrien muutoksen karakterisointi streptavidini-kuoppalevytuotannossa

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 69 » 14<sup>30</sup>

**Juulia Jokinen**

Käänteisviritteisten nanopartikkelien pinnoitusmenetelmän optimointi ja validointi eri immunomäärityksissä

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

« 70 » 14<sup>50</sup>

**Nuutti Pietarinen**

API:n spektrofotometrisen pitoisuusmäärityksen kehitys ja validointi

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

**15<sup>10</sup> Loppusanat / Final words – Prof. Kaisa Linderborg**



**TuT**  
Turun  
tieteentekijät

**Focus on your research  
We'll handle the rest**

**Join the community of University of Turku Researchers, Teachers and Lecturers**

**Legal Advice & Advocacy:**

- o Protecting your rights in working life.

**Career Services:**

- o Support for your professional development and training.

**Security:**

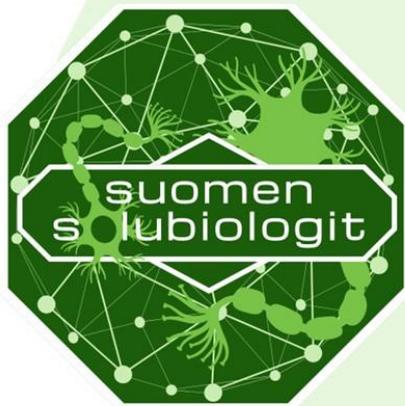
- o Unemployment fund and insurance coverage included.

**Local Support:**

- o Access to shop steward services at your workplace.



**Scan to join Turun tieteentekijät (TuT) today!**



*Toimimme solu- ja molekyylibiologien,  
sairaalasolubiologien sekä solubiologiaan  
liittyvillä aloilla työskentelevien  
henkilöiden välisenä yhdyssiteenä*

**TUEMME**

Alan tutkimusta  
ja koulutusta

**JÄRJESTÄMME**

Tieteellisiä  
seminaareja

**JULKAISEMME**

Solubiologi-  
lehteä



[www.suomensolubiologit.fi](http://www.suomensolubiologit.fi)  
[suomensolubiologit@gmail.com](mailto:suomensolubiologit@gmail.com)





**Turku PET**  
CENTRE

Are you interested on science and  
looking for career possibilities?

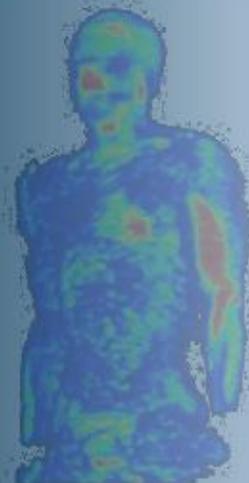
## In Turku PET Centre

we provide research opportunities in the fields of

- Physics and biophysics
- Chemistry, radiochemistry, and biochemistry
- Instrumentation and software development
- Molecular biology, human biology, and integrative biology
- Preclinical and clinical imaging with variety of methods
- Mathematical modelling and data analyses

Do not hesitate to contact us if  
you have an idea that you would  
like to pursue. We will find the  
right person to help you!

Research Service Manager  
Kari Kalliokoski, Turku PET Centre  
[kari.kalliokoski@utu.fi](mailto:kari.kalliokoski@utu.fi)



## Generation of novel anthracycline analogs by combinatorial biosynthesis

Amanda Moglia

Supervisors: PhD Rongbin Wang, Prof. Mikko Metsä-Ketelä

BIOCHEMISTRY

Anthracyclines are glycosylated microbial secondary metabolites widely used as chemotherapeutic agents against various cancer types. Despite their efficacy as anticancer agents, the clinical use of anthracyclines is limited by dose-dependent and irreversible cardiotoxicity. Evidence suggests that anthracycline cardiotoxicity results from the combination of double-stranded DNA breaks stemming from poisoning of topoisomerase II, and chromatin damage resulting from histone eviction. Recent studies indicate that generation of cardiotoxicity-free anthracyclines would be possible by producing analogs that only induce histone eviction.

Anthracyclines are primarily produced by filamentous, Gram-positive soil-dwelling *Streptomyces* bacteria. Genes required for the biosynthesis of anthracyclines are colocalized within the bacterial genome and organized into biosynthetic gene clusters (BGCs). Anthracycline BGCs contain genes for the formation of an anthracycline backbone as well as genes encoding tailoring enzymes to generate structural diversity. As sugar moieties play a crucial role in anthracycline bioactivity, a particularly important tailoring step is glycosylation mediated by glycosyltransferases.

The field of synthetic biology provides a promising alternative to traditional semisynthetic approaches for engineering anthracycline biosynthetic pathways and generating novel natural products. In this study, a combinatorial biosynthesis strategy is applied by combining genes from different BGCs to generate novel cardiotoxicity-free anthracyclines in *Streptomyces*. A previously established synthetic biology platform is employed to develop anthracycline analogs with arimetamycin A sugars attached to a non-cognate aglycone. Arimetamycin A contains two rare sugar moieties, L-brasiliose and L-lemonose, which are critical for its high anticancer activity. The platform already involves gene cassettes for the synthesis of different anthracycline aglycones but constructs for the biosynthesis of arimetamycin sugars and appropriate glycosyltransferases are being cloned in *Escherichia coli* according to the BioBricks assembly standard. The constructs will subsequently be conjugated into *Streptomyces coelicolor* M1152  $\Delta matAB$  for compound production.

Keywords: anthracyclines, BioBricks, chemotherapeutic agents, combinatorial biosynthesis, secondary metabolites, *Streptomyces*, synthetic biology

## **Antibioottien teollinen tuotanto: Daptomysiinin tuotantoprosessin optimointi**

**Ester Leskinen**

Ohjaajat: FT. Benjamin Nji Wandji, Prof. Mikko Metsä-Ketelä

### **BIOMOLEKYYLIEN TUOTANTO (DI)**

Streptomykeetit ovat gram-positiivisten bakteerien suku, jota esiintyy maaperässä monenlaisissa ympäristöissä. Bakteerisuvun tekee kiinnostavaksi sen kyky tuottaa bioaktiivisia sekundaarimetaboliitteja, kuten antibiootteja. Sekundaarimetaboliittien tuotannosta vastaavat biosynteettiset geeniklusterit, jotka aktivoituvat muun muassa ympäristön aiheuttamasta stressistä.

Daptomysiini on *Streptomyces roseosporus* -bakteerin tuottama syklinen lipopeptidiantibiootti, minkä biosynteesi etenee ei-ribosomaalisen peptidisyntetaasin katalysoimana. Daptomysiiniä käytetään gram-positiivisten bakteerien hoitoon, kuten vankomysiinille resistentin *Staphylococcus aureuksen* sekä metisilliinille resistentin *Staphylococcus aureuksen* hoitoon. Daptomysiini koostuu 13 aminohaposta, joista kymmenen muodostavat polypeptidiketjun ja kolme muodostavat eksosyklisen sivuketjun. Sivuketju päättyy tryptofaaniin, mihin erilaisissa daptomysiineissa on sitoutunut eripituisia rasvahappoja.

Daptomysiinin teollisen tuoton ongelma on useiden erilaisten yhdisteiden muodostuminen. Biosynteesi käynnistyy entsyymien aktivoitumisella rasvahappoja, mutta reaktiosta vastaava entsyymi voi aktivoida halutun dekanonihapon lisäksi muita rasvahappoja, jolloin syntyy daptomysiini analogeja. Analogien muodostumista voidaan ehkäistä syöttämällä dekanonihappoa kasvatukseen. Dekanonihappo on kuitenkin toksinen tuotantokannalle, mikä monimutkaistaa fermentointiprosessia. Teollisen kannankehityksen avulla on saavutettu kanta, joka sietää dekanonihappoa paremmin.

Työn tarkoituksena oli optimoida teollisen tuotantokannan fermentointiprosessi 15 L bioreaktorissa, kiinnittäen erityisesti huomiota dekanonihapon lisäämiseen. Tuottoa seurattiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla. Rihmaston tilavuutta seurattiin päivittäin, jotta dekanonihapon syöttöä voitiin tarvittaessa muuttaa. Optimoimalla teollisen kannan tuotantoprosessi saavutettiin 67 % parannus daptomysiinin saantoon.

Asiasanat: streptomykeetti, *Streptomyces roseosporus*, daptomysiini, dekanonihappo, bioreaktori

# Haluamme sinun työskentelevän mielekkäissä ja koulutustasi vastaavissa tehtävissä.

## Tuemme jäseniämme monipuolisesti työnhaun ja työuran eri vaiheissa.

Olitpa sitten aloittamassa työnhakua ja pohtimassa omaa osaamistasi, jo hyvässä vauhdissa hakemustesi kanssa, menossa työhaastatteluun tai jo työssä, urapalveluistamme on varmasti hyötyä juuri sinulle!

## Tarjoamme opiskelijajäsenillemme esimerkiksi seuraavia urapalveluita:

- Monipuolisia koulutuksia ja webinaareja työnhakuun sekä uralla etenemiseen
- Työkaluja oman osaamisen tunnistamiseen ja sanoittamiseen
- Kaikille avoimen Loimulaisten alojen avoimet työpaikat -palvelun
- Opintojen vaiheeseen liitetyt palkkasuosituksset
- Mahdollisuuden osallistua mentorointiohjelmaan opintojen loppupuolella

Lisäksi **Opiskelija-** ja **OpiskelijaPlus-**tasoilla tarjoamme henkilökohtaista uravalmentajan työnhaku-, ura- ja palkkaneuvontaa.

Lue lisää  
[loimu.fi/tyossa-opiskelijana](https://loimu.fi/tyossa-opiskelijana)



Tarjoamme opiskelijajäsenillemme laadukkaita urapalveluita

[www.loimu.fi](https://www.loimu.fi)

- 📍 loimunopiskelijat
- 📌 loimunpromot
- 👤 Loimulaiset-ryhmä



## Production of natural products in *Escherichia coli*

Maisa Pikkarainen

Supervisors: PhD. Rongbin Wang, Prof. Mikko Metsä-Ketelä

### MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Natural products have been widely used in medicine and drug discovery for their bioactive properties and chemical diversity. One significant class of natural products, aromatic polyketides or type II polyketides, have been used as antimicrobial and anticancer agents, and their natural producers are mainly gram-positive *Streptomyces* soil bacteria. The global threat of multi-drug resistance bacteria poses a demand for discovery of novel antibiotics. However, traditional bioactivity-guided screening of microbial culture extracts is hindered by the high probability of rediscovering known metabolites and the inability to activate cryptic biosynthetic pathways that may produce novel chemical entities.

Synthetic biology driven complete pathway refactoring in an amenable microbe can be considered as a promising frontier in microbial natural product discovery, which allows for rational design, modularity, and control. In particular, *Escherichia coli* has been used for production of natural products because of advantages such as rapid growth rate, easy culture conditions, metabolic plasticity, and multiple tools to genomic and genetic engineering. Even though there are also challenges, for instance, the fact of *E. coli* being a gram-negative bacterium and failure of expressing soluble proteins from gram-positive bacteria.

To address this issue, this study exploits a type II polyketide synthase *ant* operon from the gram-negative bacterium *Photobacterium luminescens*, which has been successfully expressed in *E. coli*, enabling high-level production of the octaketide intermediate SEK4/4b in the *E. coli* K-12 MG1655 Marionette chassis using a non-T7 RNA polymerase promoter system. This system enables precise control over transcription with vaster dynamic range and scalable induction. Additional biosynthetic genes were introduced to extend the pathway to produce the key intermediate (S)-DNPA in many aromatic polyketide biosynthetic pathways. The yield of (S)-DNPA was optimized before moving forward on the synthetic route to tailoring steps of the pathway of pharmacologically relevant natural products. Assembly of the pathways is being carried out with BioBricks assembly.

Keywords: drug discovery, *Escherichia coli*, gram-negative bacteria, metabolic engineering, natural products, polyketide synthase, type II polyketides

## Optimizing the transient production of Topoisomerase II via FACS selection of Sf9 insect cell line

Aarne Kauraala

Supervisors: Doc. Pedro Esteves Dinis, Prof. Mikko Metsä-Ketelä

BIOMOLECULAR PRODUCTION (TECH.)

Topoisomerase II (TopoII) is a large (~170-180 kDa) ATP dependent enzyme that transiently alters DNA topology via short-lived DNA breaks, relaxing supercoils and decatenating interlinked DNA knots that are formed during replication. Because TopoII is essential for chromosome segregation during cell division, it is a viable target for anticancer drugs. Common TopoII targeting drugs, such as anthracyclines and etoposide, act as TopoII poisons, stabilizing the transient TopoII-DNA cleavage complex and leading to persistent double-strand breaks. Inhibiting TopoII activity leads to the arrest of cell cycle and activation of apoptosis pathways in rapidly dividing cancer cells. Despite the efficiency of TopoII targeting drugs, they commonly exhibit severe cardiotoxicity among other side effects due to damage to healthy proliferating cells as well. Purification of TopoII is therefore essential for *in vitro* mechanistic studies that would allow for the characterization of drug/enzyme interactions, in an effort to minimize known side effects.

This study aims to improve the transient expression of human TopoII in insect cells to create a higher yielding production strain. Sf9 insect cell cultures have high innate variability, leading to different expression profiles. Selecting for the higher expressing cells, we can create a more capable cell line from the natural variance between the cells. The target cell line for optimization was Sf9 insect cells, and they were transiently transfected with human *topoII* construct in the pOpIE2 backbone using polyethylenimine (PEI). The transfected cells were analyzed with flow cytometry using in frame fluorescent reporter protein (GFP) to determine the expression level and transfection efficiency percent.

In this study, the DNA:PEI ratio was optimized to improve the transient transfection efficiency. After establishing optimal conditions, fluorescence activated cell sorting (FACS) was used to isolate the highest expressing subpopulation. These enriched cells were re-cultured and subjected to a subsequent round of FACS to further select the best performers and to remove false positives. The ultimate goal of the study was to generate an improved Sf9 strain sub-line with consistently elevated TopoII expression.

Keywords: Topoisomerase II, FACS, transient transfection, Sf9

## Unorthodox DNA-binding by spirochetal RNA polymerase: Implications for transcriptional regulation and genome navigation

Paavo Tavi

Supervisors: Assoc. Prof. Georgiy Belogurov

BIOCHEMISTRY

Transcription initiation in the clinically important bacterial phylum Spirochaetota exhibits unique structural and functional adaptations that differ from the *Escherichia coli* paradigm. This study investigates the unusual non-sequence-specific DNA binding of *Spirochaeta africana* RNA polymerase (RNAP) holoenzyme and its role in promoter search and transcription. Using Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA), we demonstrate that *S. africana* RNAP forms characteristic supershifted complexes with promoter DNA and binds with high affinity to non-promoter DNA. These interactions are mediated by *S. africana*  $\sigma$ -factor and are preserved in cross-species holoenzyme complexes containing *E. coli* RNAP. Truncation and  $\sigma$ R4 region swap analysis reveal that while  $\sigma$ -NCR and  $\sigma$ R4 regions abolish DNA binding by spirochetal  $\sigma$  alone, they do not prevent the formation of non-specific complexes by RNAP holoenzyme, although the  $\sigma$ R4 region swap reduces supershifted complex formation. These observations are consistent with a recent cryo-EM structure of dimeric *S. africana* RNAP holoenzyme-DNA complex where the  $\sigma$ R4 region and the RNAP  $\alpha$ 2CTD contact the DNA minor groove in a non-sequence-specific manner.

Functional implications of these observations were investigated in fluorogenic light-up aptamer *in vitro* transcription assay. The spirochetal system exhibits remarkable resistance to molecular crowding and viscosity and yet shows high sensitivity to DNA template supercoiling compared to *E. coli*.

These observations suggest a promoter search mechanism prioritizing facilitated 1D-diffusion in *S. africana* over 3D-diffusion dominant in *E. coli*. Increased non-specific affinity extends the DNA residence time and sliding lengths of RNAP, allowing larger segments of DNA to be scanned per binding event. We propose that spirochetal RNAP reliance on 1D-diffusion is related to the highly elongated shape of the spirochetal cell featuring 1:100 width-to-length ratio. Given a nucleoid that extends the entire length of the cell, such an adaptation may optimize genome navigation within crowded, highly elongated morphology.

Keywords: DNA-binding, facilitated diffusion, non-sequence-specific DNA binding, promoter search, RNA polymerase, Spirochaetota, transcription, transcription initiation

## Ligand specificity of *Borrelia burgdorferi* BmpD and its potential as a carrier for novel drugs for specific treatment against Lyme borreliosis

Kari Kierikka

Supervisors: FM Mikko Huhtala, PhD Mia Åstrand, Prof. Tiina A. Salminen

### BIOCHEMISTRY

Lyme borreliosis (LB) is the most common vector-borne disease in the Northern hemisphere. The disease is caused by a bacterium complex *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) that is transmitted to humans by *Ixodes* species ticks. The incidence of LB has increased significantly during the last decade, mostly due to environmental factors, such as climate change. LB is treatable with broad-spectrum antibiotics; however, patients may suffer from side-effects of the antibiotics and post-treatment Lyme disease syndrome (PTLDS). Due to these side-effects of current treatment and increased prevalence of LB, more effective and specific treatment options for LB are needed.

*B. burgdorferi* s.l. complex consists of related spirochete bacteria that share distinct structural and metabolic traits. Importantly, *B. burgdorferi* s.l. bacteria lack *de novo* synthesis and salvage pathways of purine nucleosides and instead rely on ATP-binding cassette (ABC) transporters and associated substrate-binding proteins (SBP) for acquisition of these nutrients from the host. Basic membrane protein D (BmpD) of *B. burgdorferi* has recently been shown to be a SBP that binds purine nucleosides. The aim of this study is to elucidate the structural basis of the binding mode and specificity of BmpD and its potential as transporter of RNA polymerase (RNAP) inhibitors with antimicrobial activity.

Intrinsic differential scanning fluorimetry (nanoDSF) analysis of a ligand 1,*N*<sup>6</sup>-ethenoadenosine ( $\epsilon$ A) showed minimal thermal shift compared to adenosine, while in initial isothermal titration calorimetry (ITC) experiments binding was not detected at all. Still, the complex was successfully crystallized, and the structure was solved at 1.5 Å resolution. With this novel structure, the substrate specificity of BmpD can be further elaborated considering this ligand's weak thermophysical binding behaviour. The study will be continued with *in silico* analysis of *B. burgdorferi* RNA polymerase. Using the new structure, new compounds will be screened *in silico* for binding to both BmpD and RNAP.

Keywords: *B. burgdorferi*, drug transport, ITC, Lyme borreliosis, nanoDSF, RNA polymerase inhibitor, substrate-binding protein, X-ray crystallography

## Structural and functional characterisation of GNAT2 acetyltransferases in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*

Tutta Tomberg

Supervisors: Dr Minna Konert, Doc. Anastassios C. Papageorgiou, Prof. Paula Mulo

BIOCHEMISTRY

Protein acetylation is one of the most common post-translational modifications across all domains of life. In acetylation, an acetyl group is transferred either to the free N-terminal  $\alpha$ -amino group of protein or to the  $\epsilon$ -amino group of a lysine side chain by N-terminal acetyltransferases or lysine acetyltransferases, respectively. Recently discovered plastid-associated GCN5 (General Control Non-repressible 5)-related N-acetyltransferases (GNATs) have been shown to exhibit dual enzymatic activity as both N-terminal and lysine acetyltransferases. Among the plastid-associated GNATs, GNAT2 has a cyanobacterial origin. Recent studies have indicated that GNAT2 plays an important role in regulating photosynthesis through the modification of photosynthetic proteins. Specifically, GNAT2 has been shown to perform both N-terminal and lysine acetylation on several chloroplast proteins and to influence light harvesting in plants and cyclic electron flow in cyanobacteria.

The aim of this study was to determine the first crystal structures of *Synechocystis* sp. PCC6803 (*SynGNAT2*) and *Arabidopsis thaliana* GNAT2 (*AtGNAT2*) in apo form and in ternary complex with a synthetic N-terminal substrate peptide and acetyl coenzyme A. Another aim was to characterise the enzymatic activity of these proteins using *in vitro* activity assays with N-terminal substrate peptides derived from known GNAT2 *in vivo* targets.

Expression, purification, and crystallisation conditions for recombinant *AtGNAT2* were successfully optimised. The apo structure of *AtGNAT2* was determined by X-ray crystallography at high resolution (1.50 Å). In contrast, expression, purification, and crystallisation of recombinant *SynGNAT2* protein proved challenging due to limited protein solubility. However, crystallisation trials produced small crystals that may allow the *SynGNAT2* structure to be determined in the future. Together, the structures of *AtGNAT2* and *SynGNAT2* will provide valuable structural and evolutionary insights into the mechanisms of GNAT2-mediated acetylation in photosynthesis.

Keywords: acetyltransferase, *Arabidopsis thaliana*, enzyme structure, GNAT2, *in vitro* acetylation, N-terminal acetylation, photosynthesis, protein crystallisation, *Synechocystis* sp. PCC6803



## Täydennä lääkekaappiasi kotitesteillä ja seuraa hyvinvointiasi

Testeillä mittaat esimerkiksi ferritiini-, D-vitamiini- ja kokonaiskolesterolisasi sekä selvität mahdollisen virtsatietulehduksen, kellakian, influenssan ja streptokokin.

Saatavilla Prismoista, K-Citymarketeista ja apteekeista!

Tutustu testeihin osoitteesta: [hyvinvointitestit.fi](http://hyvinvointitestit.fi)



Tuotteet D-vitamiini-, ferritiini- ja virtsatietulehdustesti ovat CE-merkittyjä lääkinällisiä laitteita, CE0123 valmistaja Hangzhou Ai Test Biotech Co., Ltd.  
Tuote kokonaiskolesterolitestistä on CE-merkitty lääkinällinen laite, CE0197 valmistaja DFI CO, Ltd.

## SCIENTIFIC EXCELLENCE FOR IVD

Empowering diagnostics with trusted antibodies and antigens for over 30 years  
[hytest.fi](http://hytest.fi)



## **Bispesifisen darpiinifuusion kehittäminen proteiinien kromatografiseen puhdistukseen**

**Maisa Keinänen**

Ohjaaja: Dos. Tuomas Huovinen

BIOMOLEKYYLIEN TUOTANTO (DI)

Tällä hetkellä käytössä olevat natiivien proteiinien puhdistusprosessit perustuvat monivaiheisiin kromatografiamenetelmiin, jotka voivat vaikuttaa negatiivisesti puhdistettavan proteiinin saantoon ja ominaisuuksiin. Tässä diplomityössä pyrittiin luomaan vaihtoehtoinen ratkaisu proteiinien puhdistukseen, tähdäten suoraviivaiseen, mutta hellävaraiseen puhdistusstrategiaan. Työssä keskiössä oli bispesifisen kytkinperiaatteella toimivan ankyriinotoistoproteiinin kehittäminen. Kytkinperiaatteella tarkoitetaan molekyylin kykyä sitoutua vain yhteen ligandiin kerrallaan. Fuusioproteiini suunniteltiin spesifiseksi kohdeproteiinille sekä eluenttina toimivalle GST-proteiinille.

Työssä hyödynnettiin eri molekyylibiologian menetelmiä darpiinifuusion rakentamiseen. Sekvenssi kloonattiin faagivektoriin ja suotuisia klooneja selektoitiin faaginäyttötekniikalla hyödyntäen streptavidinihelmiä. Selektiokokeet suunniteltiin niin, että ne suosivat bispesifisiä kytkinperiaatteella toimivia darpiineja, joilla on suurempi affiniteetti GST-proteiinille kuin kohdeproteiinille. Faaginäytöllä rikastetut darpiinifuusioiden kloonattiin ekspressiovektoriin ja yksittäisten kloonien sitoutumista analysoitiin. Yksittäiskloonianalyysin perusteella valittiin muutama suotuisa klooni, joita tuotettiin isommassa mittakaavassa *E. coli* soluissa. Darpiinifuusioiden sidottiin kromatografiapylväisiin ja niiden käyttäytymistä analysoitiin kohdeproteiinin affiniteettipuhdistuksessa.

Sekvensointitulosten perusteella darpiinifuusioiden saatiin onnistuneesti rakennettua. Faaginäyttötekniikkakokeiden tulosten perusteella pystyttiin tekemään johtopäätöksiä darpiinifuusioiden kyvystä sitoa sekä kohdeproteiinia että GST-eluenttia. Streptavidinihelmien todettiin kuitenkin olevan liian 2-ulotteinen sitoutumisympäristö darpiinifuusioiden selektioon, mikä johti uusien 3-ulotteisten affiniteettipylväiden kehittämiseen.

Vaihtoehtoisten sitojien hyödyntäminen proteiinien puhdistuksessa kykenisi karsimaan tällä hetkellä käytössä oleviin tekniikoihin liittyviä rajoitteita, kuten liian ankarat eluutio-olosuhteet tai kohdeproteiinin geenitekniikan muokkauksen. Lopputuloksena saataisiin aikaisempaa suoraviivaisempi ja hellävaraisempi tapa puhdistaa natiiviproteiineja.

Asiasanat: Affiniteettikromatografia, Ankyriinotoisto, bispesifinen, darpiini, faaginäyttötekniikka, fuusioproteiini, proteiinien puhdistaminen, selektio

# Työpaikka

## myynnin ja markkinoinnin parissa

Nuppulinnan laboratoriopalvelu Oy etsii solubiologian alan ammattilaista asiakaspalveluun, myyntiin ja markkinointiin.

### Tehtäviin kuuluu

- Yhteydenpito patologian laboratorioihin jotka sijaitsevat Suomessa, Ruotsissa, Norjassa, Tanskassa ja Baltian maissa.
- Tuotetiedustelujen käsittely sekä yhteydenpito valmistajien suuntaan
- Tehtävään valitun pitää myös opetella toimiston tilaus- ja lähetysprosessit ja tuurata toimistonhoitajaa tarvittaessa.

### Hakijalta edellytetään

- Suomen ja englannin kielen taitoa. Muiden markkina-alueen kielten osaaminen on plussaa.
- Ajokorttia ja valmiutta matkustaa mainituilla alueilla.
- Immunohistokemian hyvää tuntemusta.

Työpaikka sijaitsee Tuusulan Kellokoskella. Työn opettelu vaatii paikalla oloa ainakin alkuun. Myöhemmin osittainen etättyö on mahdollista ja jopa välttämätöntä työmatkojen aikana.

### Lisätiedot ja hakemukset

Harri Kämäräinen  
nuppulinna@dlc.fi  
0405305480 (klo 9-15 välisenä aikana)



## **Development of H5 specific ELISpot and B cell flow cytometry to investigate memory B cell responses induced by avian influenza A H5N8 vaccination**

**Emilia Peltoniemi**

Supervisors: Docent Pekka Kolehmainen, MSc. Milja Belik, Docent Laura Kakkola

### **CELL BIOLOGY**

Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus has caused several outbreaks in domestic and wild birds globally, creating the need for a vaccine preventing human transmission. Zoonotic influenza A H5N8 vaccine by Seqirus was approved in 2023 to protect against H5 subtype influenza A viruses, including the highly pathogenic clade 2.3.4.4b H5N1 avian influenza virus infection. The B cell responses this vaccine induces have not been extensively investigated. Thus, the aim of this study was to set up and optimize hemagglutinin H5-specific ELISpot and B cell flow cytometry analyses to investigate B cell responses induced by the H5N8 vaccine.

Frozen Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from H5N8-vaccinated and non-vaccinated individuals were used for setting up the methods. For ELISpot, PBMCs were incubated for five days with R848 (a TLR7/8 agonist) and IL-2 to stimulate memory B cells into antibody-secreting cells (ASCs). Subsequently, ASCs specific for recombinant proteins H5 and H1, and the H5N1 vaccine (based on the A/Indonesia/05/2005 strain), as well as for SARS-CoV-2 S1-protein, and total IgG, were detected on coated ELISpot plates. The optimization of ASC detection was attempted using a two-step detection with biotin and streptavidin-alkaline phosphatase, and the results were compared with those of one-step detection with alkaline phosphatase. However, one-step detection proved sufficient, as well as methodologically more straightforward. For H5-specific B cell flow cytometry, PBMCs were labelled with anti-CD3, anti-CD19, and anti-IgD. The H5-specific cells were detected with dual-labelling using Lightning-Link AF647, and PE-conjugated recombinant HA1-subunit of H5. To achieve optimal detection, the optimization included testing T-cell depletion and different amounts of dual-labelled H5.

As a result, we were able to set up functional H5-specific ELISpot and memory B cell flow cytometry analyses. In ELISpot, SARS-CoV-2 S1-specific ASCs were detected in all study participants, and the number of H5- and H5N1-vaccine-specific responses were clearly increased in H5N8-vaccinees. In the memory B cell flow cytometry analysis, the number of H5-specific memory B cells was four times higher in the vaccinated samples than in the non-vaccinated samples. In conclusion, these developed analyses provide a functional tool to investigate memory B cell responses induced by the H5N8 vaccination.

**Keywords:** B cell, ELISpot, flow cytometry, H5, vaccine

## **TBEV-infektion serologinen tunnistaminen: NS1- ja E-proteiinien hyödyntäminen ELISA-testissä**

**Nenna Tanskanen**

Ohjaajat: Dos. Pekka Kolehmainen, Dos. Laura Kakkola

BIOKEMIA

Puutiaisaiivotulehdusvirus (engl. tick-borne encephalitis virus, TBEV) aiheuttaa ihmiselle yleensä lievän kuumeisen infektion. Osa potilaista saa keskushermosto-oireisen vakavan aivotulehduksen. Flaviviruksiin kuuluvalla TBE-viruksella on kolme alatyyppeä: eurooppalainen, siperialainen ja kaukoitainen. Suomessa esiintyy eurooppalaista ja siperialaista alatyyppeä. TBE-virusta vastaan on rokote, jossa inaktivoidut TBE-virukset saavat aikaan immuunireaktion viruksen E (envelope)-proteiinia vastaan. TBEV:n NS1 (non-structural 1) proteiinia erittyy verenkiertoon virusinfektion aikana aiheuttaen E-immuniteetin lisäksi NS1-immunivasteen infektoituneilla henkilöillä. Puutiaiset levittävät TBE-virusta, joka on endeeminen 27 Euroopan maassa, ja ilmastonmuutoksen myötä puutiaiset ja TBEV leviävät uusille alueille. Suomessa TBEV-tapaukset ovat lähes kolminkertaistuneet verrattuna vuoteen 2015, kuten myös rokotetuilla esiintyvät läpäisyinfektiot. Rokotekattavuuden lisääntyessä olisi tärkeää pystyä erottamaan infektoituneet henkilöt rokotetuista.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa TBEV proteiineja ja pystyttää niiden avulla serologiset menetelmät TBEV-infektion ja -rokotteiden aikaansaamien immuunivasteiden analysoimista varten. Tutkimuksessa käytettiin Expi293 suspensiosolujärjestelmää NS1- proteiinien tuottoon. E-proteiini tuotto oli aiemmin jo tehty yhteistyötahon toimesta. Tuotettujen proteiinien puhtaus ja koko määritettiin SDS-PAGE- ja immunoblottausmenetelmillä. NS1- ja E-proteiinien immunogeenisuus ja vasta-aineiden esiintyvyys määritettiin ELISA-testillä. Kontrollivasta-aineita varten immunisoitiin yksi kani NS1-proteiinilla ja toinen kani kaupallisella rokotteella.

CD33-sekreetiosignaalin avulla saatiin tuotettua NS1-proteiini liukoisena, mikä mahdollisti proteiinien puhdistamisen. NS1- ja E-proteiiniin pohjautuen pystytettiin ELISA-määritykset proteiini-spesifisten vasta-ainevasteiden tunnistamiseksi. Kahden ELISA-määrityksen yhdistelmä mahdollisti infektoituneiden ja rokotettujen serologisen erottelun. Kanien immunisaatiossa tuotetut anti-TBEV rokote ja anti-NS1 antiseerumit tunnistavat spesifisti kohdeproteiiniensa ja osoittautuivat siten sopiviksi kontrollireagensseiksi.

Avainsanat: TBEV, serologia, NS1, puutiaisaiivotulehdusvirus, vasta-aineet

**Optimizing methods to study associations between genetic variations,  
clinical outcomes, and treatment response in patients with juvenile  
idiopathic arthritis**

**Shucheta Nazia Archi**

Supervisors: Prof. Qiushui He, Johanna Teräsjarvi

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is an autoimmune disease seen in children younger than 16. The immunological background of JIA is driven by dysregulated activation of innate and adaptive immune pathways, where pro-inflammatory cytokines such as Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) play a central role. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine encoding genes contributes to its pathogenesis. JIA is often treated with TNF- $\alpha$  and IL-6 inhibitors. However, the response to such biologic treatments of patients varies and may be linked to certain SNPs. To associate cytokine levels and genotype, identification of these SNPs and quantification of cytokines from stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients are important.

In this project, 6 and 5 relevant SNPs of *TNF- $\alpha$*  and *IL-6* receptor genes were targeted based on their reported associations with response to biological medication and with the expression of the encoded proteins. PCR primers were designed using NCBI primer blast. PCR conditions were optimized to amplify segments of DNA containing one or multiple of the target SNPs. The optimization scheme for the PBMC stimulation assay has been made targeting starting density of cells, stimulating agents and their concentration, and incubation time before measuring cytokines.

All *TNF- $\alpha$*  SNPs and 4 of the *IL-6R* SNPs were successfully amplified by PCR and sequenced by Sanger sequencing. A Finnish cohort of 108 JIA DNA samples were analyzed and compared to 99 healthy Finns from the 1000 Genome Project. Results show that the genetic fingerprint between oligoarthritis and polyarthritis are very similar which vastly differs from enthesitis-related arthritis. In *IL-6R*, SNPs rs4329505 (T/C) ( $p = 0.007$ ) and rs11265618 (C/T) ( $p = 0.006$ ), the presence of minor alleles is associated with more active disease based on the number of biological medications needed. Moreover, minor alleles in rs12083537 (A/G) and rs4329505 (T/C) are associated with higher likelihood of polyarthritis ( $p = 0.039$ ) and extended oligoarthritis ( $p = 0.024$ ) respectively. No statistically significant correlations were found in the *TNF- $\alpha$*  SNPs. More in-depth analysis of genetic information can reveal details of these associations and may aid in treatment decisions.

Keywords: biologics, cytokines, rs11265618, rs12083537, rs4329505, SNP.

## **Thermogenic activation of human adipose tissue spheroids and its impact on batokine secretion**

**Pinja Tervomaa**

Supervisors: Doc. Francisco M. Acosta, Prof. Kirsi A. Virtanen, MSc Johanna Örling

CELL BIOLOGY

Obesity and related metabolic diseases are creating a global, rapidly expanding health pandemic. Currently, there are only few effective and precise treatments to face and prevent these diseases in the long term. Accordingly, activating the thermogenic brown adipose tissue (BAT) has risen as interesting therapeutic target. BAT activation has been connected to better cardiometabolic health but the reasons behind that are not fully comprehended. Recently, BAT has been recognized as an endocrine organ that secretes variety of bioactive molecules, referred to as batokines, which may mediate some of the BAT activation induced benefits. These secreted proteins are increasingly considered as important mediators of communication between BAT and other tissues including liver, skeletal muscle and nervous systems as well as regulators of BAT's own activity. This thesis investigate the secretion of four well-known batokines, neuroregulin 4, chemokine ligand-14, meteorin-like and interleukin-6, from human brown adipose (BA) spheroids after thermogenic stimulation. The aim is to show with spheroid model that human BA secretes batokines when activated. For that, 3D cell culture models were grown from the primary brown adipose cells of three, healthy donors. Following differentiation, the spheroids were treated with cAMP. Medium of treated spheroids were collected and batokine concentrations were quantified with ELISA. Lipolysis assay and western blots were performed to ensure differentiation and activation of BA spheroids. The results showed that meteorin-like and interleukin-6 were secreted whereas neuroregulin 4 could not be detected. The intensity of BA activation by cAMP affected the amount of secretion, and the increased activity was confirmed by Western blot analysis. Treatments with 1 mM cAMP for both 24 and 72 hours indicated to be the most effective concentration for stimulating BA spheroids. Furthermore, the lipolysis assay showed cAMP to be the most efficient activator. This thesis suggests that activation of human BA increases the secretion of batokines. The effects of other tissues on BAT and vice versa need further studies to fully understand the BAT's possible beneficial health impact. Overall, targeting BAT for its endocrine functions to treat obesity related metabolic diseases seems promising.

**Keywords:** brown adipocytes, spheroids, secretion, batokines, neuroregulin 4, chemokine ligand-14, meteorin-like, interleukin-6

## Fecal Carriage of ESBL Producing *Escherichia coli* in Southwest Finland

**B. Sc. Hanna Koivu**

Supervisors: Doc. Marianne Gunell, Ph. D. Heidi Isokääntä

### CELL BIOLOGY

Beta-lactam ( $\beta$ -lactam) antibiotics are commonly used against infections caused by *Escherichia coli* (*E. coli*) and other bacterial species. *E. coli* is common in the microbiota of the gut, but when it acquires virulence genes it becomes pathogenic and can cause various infections. Upon acquiring resistance genes to antibiotics *E. coli* becomes a hard-to-treat worldwide public health problem. Extended-spectrum beta-lactamases, **ESBLs**, are  $\beta$ -lactamase enzymes (e.g. CTX-M, TEM, SHV) produced by bacteria that contain **bla-genes** in their genome, and inactivate  $\beta$ -lactam antibiotics.

The aim was to determine ESBL prevalence in resistant Gram-negative rod-like hosts, particularly *E. coli*, in southwestern Finland and to investigate which *Enterobacteriaceae* family species presently produce ESBL. Antimicrobial susceptibility of these ESBL-strains was further studied using disc diffusion tests.

ESBL screening was performed on routinely collected fecal samples from patients with gastrointestinal infection symptoms in Turku University Hospital, in January 2026. A total of 393 samples were cultured on chromogenic plates. Pure cultures were prepared from all ESBL screening- positive isolates (76 in total, 81 strains) and identified with MALDI -ToF mass spectrometry. DNA was extracted with 5% Chelex. ESBL-genes, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub>, were detected by multiplex PCR followed by agarose gel electrophoresis.

The PCR confirmed ESBL-carrier prevalence was 19,3 % (76/393), of which 46% (of 81 strains) were *E.coli*, **CTX-M**-type  $\beta$ -lactamases comprised 49% of the *E.coli* ESBL-types and 24% of the non-*E.coli* strains. **TEM**-type-  $\beta$ -lactamases comprised 9% and 13% respectively, and only one non-*E.coli* colony had a single **SHV**-type  $\beta$ -lactamase. Phenotypic susceptibility was performed with 17 antibiotics by disc diffusion on all 48 *E. coli* and/or all ESBL-positive samples. Co-resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides were detected in 8,65% (34/393) and 0% (0/393) of the ESBL *E. coli* strains, respectively. No carbapenem resistance was observed.

Keywords: antimicrobial resistance, disc diffusion, extended spectrum beta-lactamases, ESBL, *E. coli*, fecal carriage, intestinal microbes, resistance

**Pitkät ei-koodaavat RNA:t okasolusyövässä****Inka Saarelainen**

Ohjaajat: Dos. Liisa Nissinen, Prof. Veli-Matti Kähäri

SOLUBIOLOGIA

Ihon levyepiteelikarsinooma eli okasolusyöpä on keratinosyyttiperäinen syöpä, jonka merkittävin riskitekijä on pitkäaikainen ja kumulatiivinen altistuminen auringon ultraviolettisäteilylle. Okasolusyöpä on yleisin metastasoiva ihosyöpä, ja levinneeseen tautimuotoon liittyy selvästi heikentynyt ennuste. Tutkimuksen tavoitteena oli tunnistaa uusia, spesifisiä ja potentiaalisia terapeuttisia kohteita sekä biomarkkereita kasvaimen kasvun sekä leviämisen estämiseksi sekä okasolusyövän hoidon kehittämiseksi.

Pitkillä ei-koodaavilla RNA-molekyyleillä on osoitettu olevan keskeinen rooli okasolusyövän patogeenisissä sekä kasvaimen kasvun ja leviämisen säätelyssä. Aikaisemmin on osoitettu, että *LINC01558* -geeni koodaa pitkää ei-koodaavaa RNA:ta, joka assosioituu niin kutsuttuun invaasioklusteriksi määriteltyyn proteiinikompleksiin. Tässä tutkimuksessa analysoitiin okasolusyöpäsoluissa esiintyvän *LINC01558* -geenin roolia syöpäsolujen kasvussa sekä elinkyvyyssä, migraatiossa ja invaasiossa sekä arvioitiin keskeisten signaalintireittien regulaatiota geenin hiljentämisen jälkeen. *LINC01558* -geenin vaikutuksia tutkittiin okasolusyövän primaarisilla solulinjoilla UT-SCC-12A ja UT-SCC-118 sekä metastaattisilla solulinjoilla UT-SCC-59A ja UT-SCC-115.

Tulokset osoittivat, että *LINC01558* -geeni vaikuttaa merkittävästi okasolusyöpäsolujen kasvuun ja elinkykyisyyteen. *LINC01558* hiljentäminen johti solujen kasvun ja elinkyvyn vähenemiseen myöhemmillä aikapisteillä. Migraatio- ja invaasioanalyysien perusteella hiljeneminen myös vähensi solujen liikkuvuutta ja invasiivisuutta, mikä korostaa geenin roolia syövän aggressiivisuuteen liittyvissä prosesseissa. Lisäksi geenin hiljentäminen aiheutti merkittäviä muutoksia keskeisten signaalintireittien aktiivisuudessa, mikä ilmeni fosforyloidun Akt:n, P38 MAPK:n sekä ERK1/2:n ilmentymisen vähenemisenä. Tulosten valossa, *LINC01558* saattaa toimia potentiaalisena terapeuttisena kohteena okasolusyövän hoidossa, mutta sen kliinisen hyödyn arvoitinta edellyttää lisätutkimuksia.

Asiasanat: Ihosyöpä, Keratinosyytti, Okasolusyöpä, Pitkä ei-koodaava RNA, UV-säteily

## Nanostructured lipid carriers for enhancing oral bioavailability of small molecules by evading intestinal efflux transporters

Matleena Parviainen

Supervisors: Dr. Johanna Aho, Prof. Dr. Vimalkumar Balasubramanian

BIOCHEMISTRY

Oral delivery remains to this date as the most convenient, cheapest, and preferred non-invasive drug delivery route. However, certain physiochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients (APIs) present significant challenges for effective oral delivery, one of which being their affinity for efflux transporters in the intestinal enterocytes. This active transport in the small intestine can limit the absorption of efflux transporter substrate APIs. Nanostructured lipid carriers (NLCs) have shown potential as drug carrier systems for oral delivery due to their capacity for active loading, protection against the harsh gastrointestinal environment, and cell membrane permeability. The objective of this study was to study the capability of NLC drug delivery systems in evading intestinal efflux transporters *in vitro*.

Two model compounds, ritonavir (RTV) and Bayer molecule A (BayA), both of which have shown notable efflux *in vitro*, were encapsulated in NLCs formulated from glyceryl distearate and oleic acid or propylene glycol monocaprylate. The manufacturing process consisted of pre-emulsifying lipids, APIs, surfactant, and aqueous phase at high temperatures through mixing, followed by ultrasonication to form nanoscale particles. The permeability of the loaded NLCs ( $P_{app\ A\rightarrow B}$  and  $P_{app\ B\rightarrow A}$ ) and efflux ratio (ER) were measured in human colorectal adenocarcinoma cell line (caco-2) assay and compared with permeability of free API. RTV-loaded NLCs were tested in 2 $\mu$ M and 10 $\mu$ M RTV concentrations and BayA-loaded NLCs in 10 $\mu$ M BayA concentrations in the caco-2 assay.

The results showed a clear increase in permeability ( $P_{app\ A\rightarrow B}$ ) and a decrease in ER for BayA-loaded NLCs compared to the free API, whereas the NLC formulation for RTV only showed mild evidence of increased  $P_{app\ A\rightarrow B}$  and reduced ER at 2  $\mu$ M, but inconclusive results at 10  $\mu$ M. This preliminary proof-of-concept study suggests that NLC formulations can have an effect on permeability *in vitro*, though the effect is likely to vary based on the API and its properties. More comprehensive studies are needed for establishing a better understanding of the underlying mechanisms.

Keywords: caco-2, formulation, intestinal efflux, nanostructured lipid carriers, oral bioavailability

## **3D-tulostetun mikrofluidisen testikasetin kehitys vieritestaukseen**

**Tytti Saarinen**

Ohjaajat: TkT. Iida Martiskainen, Prof. Ville Jokinen

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Mikrofluidisia testikasetteja hyödynnetään yhä laajemmin in vitro -diagnostiikassa ja vieritestauksessa (point-of-care, POC), sillä ne mahdollistavat pienten nestemäärien hallitun käsittelyn kompakteissa järjestelmissä ja nopean diagnoosin tekemisen esimerkiksi vastaanottotilanteessa ilman laajaa laboratoriolaitteistoa. Mikrofluidisten testikasettien kehitystä hidastavat perinteisiin valmistusmenetelmiin liittyvät korkeat prototyypikustannukset sekä rakenteiden toiminnallisuuden ennustamisen haasteet. Lisäävä valmistus, kuten stereolitografinen (SLA) 3D-tulostus, tarjoaa mahdollisuuden nopeaan ja joustavaan prototyyppien kehitykseen mikrofluidisten rakenteiden kehityksessä.

Tämän diplomityön tavoitteena oli suunnitella ja valmistaa mikrofluidinen testikasettirakenne nestekäsittelyyn ja arvioida sen toiminnallisuutta virtaus- ja sekoitusominaisuuksien näkökulmasta. Testikasetit valmistettiin stereolitografisella 3D-tulostuksella, ja mikrokanavien pintojen hydrofiilisyyttä muokattiin vesihöyryplasmakäsittelyllä passiivisen kapillaarivirtauksen mahdollistamiseksi. Valmistettujen rakenteiden geometriaa karakterisoitiin pyyhkäisyelektronimikroskopiolla (SEM), ja kasettien toimivuutta arvioitiin virtaus- ja sekoituskokeilla.

Tulokset osoittivat, että vaikka mikrokanavat olivat SEM-kuvauksen perusteella geometrisesti avoimia jo 150 µm leveydestä alkaen, toistettavasti toimiva virtaus ja kasetin toiminnallisuus saavutettiin vasta 300 µm leveissä kanavissa. Plasmakäsittely lisäsi merkittävästi pintojen hydrofiilisyyttä ja mahdollisti kapillaarivirtauksen mikrokanavissa useiden viikkojen ajan käsittelyn jälkeen. Kehitetyssä kasettirakenteessa nesteet voitiin yhdistää ja sekoittaa passiivisesti kapillaarivirtauksen avulla, ja lopullinen kasettiversio mahdollisti virtauksen ja sekoittumisen suurimmassa osassa testatuista kaseteista.

Tulokset osoittavat, että stereolitografinen 3D-tulostus yhdistettynä pintojen plasmakäsittelyyn soveltuu mikrofluidisten testikasettien iteratiiviseen kehittämiseen ja nestekäsittelyrakenteiden optimointiin.

Avainsanat: mikrofluidiikka, in vitro -diagnostiikka, vieritestaus, 3D-tulostus, stereolitografia, plasmakäsittely, kapillaarivirtaus

## **Biopohjaisista polymeereistä 3D-tulostettu toiminnallinen testikasetti syöpädiagnostiikkaan**

**Konsta Kuosmanen**

Ohjaajat: TkT Iida Martiskainen, FT Ville Jokinen

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Lateraalivirtaustestit ovat laajasti käytettyjä vieritestausmenetelmiä niiden nopeuden, helppokäyttöisyyden ja kustannustehokkuuden vuoksi. Ne soveltuvat hyvin tilanteisiin, joissa halutaan saada nopeita tuloksia ilman monimutkaisia laitteistoja tai toimenpiteitä. Lateraalivirtaustestit ovat kuitenkin usein heikompia kuin laboratoriomenetelmät herkkyuden ja kvantitatiivisen tarkkuuden osalta. Testien herkkyuden parantaminen on siis tärkeää, jotta myös pieninä pitoisuuksina esiintyvät syöpään liittyvät biomarkerit voidaan havaita luotettavasti.

Toiminnallisilla testikaseteilla voidaan yksinkertaistaa ja nopeuttaa testin suorittajan työvaiheita. Toiminnallisuutta tarvitaan erityisesti herkissä monivaiheisissa määrittelyissä, joissa esimerkiksi näytteen kulku ja pesuliuoksen lisäys voidaan integroida osaksi testikasetin rakennetta. Testikasetteja voidaan valmistaa 3D-tulostamalla, mikä mahdollistaa kasetin rakenteen nopean kehittämisen ja muokattavuuden. Tulostuksessa voidaan käyttää biopohjaisia hartseja, jotka tarjoavat ympäristön kannalta kestävämmän vaihtoehdon perinteisille fossiilipohjaisille hartseille.

Tämän työn tavoitteena oli kehittää 3D-tulostettu kapillaaritäyttyvä toiminnallinen testikasetti, johon lateraalivirtaustesti voidaan integroida määrittelyksen yksinkertaistamiseksi. Työn tavoitteena oli myös tutkia soveltuvatko biopohjaiset hartsit diagnostisten kasettien 3D-tulostukseen.

Testikasetit 3D-tulostettiin käyttäen stereolitografiatekniikkaa, joka mahdollistaa korkean resoluution rakenteiden luomisen. Tulostetut kasetit plasmakäsiteltiin pinnan hydrofiilisyyden lisäämiseksi, jotta kapillaaritäytyminen olisi mahdollista.

Työn tämänhetkissä tuloksissa biopohjaisista hartseista onnistuttiin valmistamaan testikasettirakenteita stereolitografialla. Hartseilla saavutettiin resoluutio, jolla pystyttiin tulostamaan luotettavasti 400 µm:n kanavia. Plasmakäsittelyllä onnistuttiin lisäämään pinnan hydrofiilisyyttä. Jatkossa valmiiseen testikasettiin pyritään integroimaan lateraalivirtausmäärittelymunasarjasyöpään liittyvän CA125-biomarkkerin glykovariantin tunnistamiseen.

Asiasanat: testikasetti, vieritestaus, 3D-tulostus, biopohjaiset hartsit, mikrofluidistiikka, plasmakäsittely

## **Monianalyyttinen lateraalivirtausimmunomääritys raudanpuutteen tunnistamiseen**

**Susanne Lehtisalo**

Ohjaajat: TkT. Iida Martiskainen, DI. Miikka Ekman

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Raudanpuute on maailman yleisin mikroravinnepuutos, joka syntyy elimistön rautavarastojen ehtyessä. Nykyiset raudanpuutteen biomarkkerit eivät kuitenkaan yksiselitteisesti osoita rautavarastojen ehtymistä, sillä niiden luotettavuus heikkenee tulehduksen läsnä ollessa. Useita rautastatusta kuvaavia biomarkkereita sekä tulehdusmarkkerin yhdistävä testi voisi parantaa raudanpuutetestin diagnostista spesifisyyttä yksittäisiin biomarkkereihin verrattuna. Tällainen testi soveltuisi potilasläheiseen diagnostiikkaan ja voisi parantaa esimerkiksi verenluovuttajien soveltuvuuden arviointia.

Työn tavoitteena oli kehittää monianalyyttinen lateraalivirtaustesti raudanpuutteen diagnostiikkaan kliinisesti relevanttien analyyttipitoisuuksien havaitsemiseksi. Työssä kehitettiin dipstick-testilastu transferriniin (Tf) ja albumiiniin (Alb) määrittämiseen, ja tutkimusprojektissa aiemmin kehitettyä liukoisen transferriniinireseptorin ja ferritiiniin duplex-testiä hyödynnettiin rinnakkaisena lastuna lopullisessa testissä. Analyytit mitattiin erillisiltä testialueilta erivärisillä käänteisviritteisillä nanopartikkeleilla. Tf- ja Alb-määritykset optimoitiin vertailemalla erilaisia kaupallisia vasta-ainepareja, analyytti- ja näytelaimennoksia, puskurivariantteja sekä testikomponentteja.

Vasta-aineparien vertailussa löydettiin Tf-määritykseen yhdistelmä, joka tuotti vahvan spesifisen signaalin. Alb-vasta-ainepareilla havaittiin kuitenkin merkittävää epäspesifistä sitoutumista, jota voitiin vähentää optimoimalla määrityspuskurin natriumkloridipitoisuutta. Laimennoskokeet osoittivat, että näytteet on laimennettava voimakkaasti analyyttipitoisuuksien saamiseksi mitattavalle alueelle (1:1000 Tf:lle ja 1:10 000 Alb:lle). Jatkossa tutkitaan analyyttien mahdolliset ristireaktiot ja arvioidaan Tf/Alb-testin suorituskyky potilasnäytteillä vertaamalla tuloksia kaupallisiin määritysmenetelmiin. Testi vaatii jatkokehitystä näytelaimennustarpeen vähentämiseksi sekä leimakonjugaattien integroimiseksi konjugaattityynylle, jotta testi soveltuisi potilasläheiseen diagnostiikkaan.

Asiasanat: albumiini, lateraalivirtaustesti, monianalyyttinen testi, potilasläheinen diagnostiikka, raudanpuute, transferrini

## Lateraalivirtaustestin tehostaminen polystreptavidiini-testiviivalla

Eveliina Saario

Ohjaaja: FT Kirsti Raiko

### BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Herkkyys ja nopeus ovat tärkeitä piirteitä kvantitatiivisille lateraalivirtaustesteille. Lateraalivirtauslastuilla testiviiva sijaitsee huokoisella nitroselluloosa-membraanilla, jossa yksittäiset sitojamolekyylit sitoutuvat huokosten pinnoille ja huokosten sisälle jää tyhjää tilaa. Testin sitojakapasiteettia voisi kasvattaa käyttämällä polymerisoitua sitojaa, joka täyttäisi myös huokokset. Mitä huokoisempi membraani on, sitä nopeammin neste kulkee, ja sitä nopeammaksi testin saa. Analyytin tai siihen sitoutuneen vasta-aineen sitoutumista testiviivaan voidaan maksimoida hyödyntämällä streptavidiinin (SA) ja biotiinin välistä nopeaa reaktiokinetiikkaa, jolloin on mahdollista käyttää hyvin nopeaa membraania. Työn tarkoituksena oli tutkia mahdollisuutta kasvattaa lateraalivirtauslastun testiviivan kapasiteettia käyttämällä polymerisoitua streptavidiinia (poly-SA) ja sitä, miten tämä vaikuttaa määrittämisen suorituskykyyn.

Kaikissa määrittämissä käytettiin leimana poly(akryylihapolla) (PAA) päällystettyjä NaYF<sub>4</sub>, Yb<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>-käänteisviritteisiä nanopartikkeleita (UCNP), joiden pinnalle konjugoitiin analyytistä riippuva sitoja. Poly-SA-testiviivaa verrattiin normaaliin SA-testiviivaan käyttämällä analyyttinä biotinyloitua BSA:ta (bio-BSA) pitoisuuksissa 0,1–100 ng/ml. Poly-SA-testiviivan käyttöä immuunimäärittämissä tutkittiin tyreotropiini-määrittämisellä, jolla tutkittiin biotinyloidun vasta-aineen (bio-Mab) määrää, ja sydänperäinen troponiini I(cTnI)-määrittämisellä, jolla tutkittiin leiman määrää, näytetyynyn kokoa ja vapaan PAA:n vaikutusta testin suorituskykyyn. cTnI-määrittäystä testattiin sekä puskurilla että plasmalla.

Signaali-taustasuhteen perusteella toimivimmaksi todettiin valmistajan suosittama maksimi 200 ng/cm poly-SA-määrä testiviivalla, ja reaktiokoostumukseksi 10 ng bio-Mab, 50 ng UCNP:tä ja 25 µl näytettä. Reaktion kokonaistilavuus oli 40 µl. Toimivin näytetyynyn pituus oli 8 mm. Poly-SA-testiviivan avulla pystyttiin havaitsemaan 100 kertaa pienempiä bio-BSA-pitoisuuksia kuin tavallisella SA-testiviivalla. Poly-SA:lla variaatiokertoimet olivat tavallista SA:ta matalammat. cTnI-määrittämisellä 5 ng/L-pitoisuus havaittiin signaalitaustasuhteella 7. Tulokset tukevat määrittämisen kehittämisen jatkamista.

Asiasanat: biotinyloitu vasta-aine, lateraalivirtaustesti, polystreptavidiini, UCNP, vieritestaus

## Improving cardiac troponin autoantibody detection

Saga Varonen

Supervisor: M.Sc. (Tech.) Helea Junes

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Cardiac troponin (cTn) is a widely used biomarker in the diagnosis of acute myocardial infarction. When myocardial tissue is damaged, cTn molecules are released into the bloodstream, leading to a detectable elevation in circulating cTn levels. Cardiac troponin-specific autoantibodies (cTnAAbs) are estimated to be present in 5-20% of the population. Their presence can interfere with cTn-detecting immunoassays by falsely reducing or elevating the measured signal, possibly causing a delay or error in diagnosing a patient. An immunoassay for detecting cTnAAbs has been developed and is routinely used, but it is limited by high and variable background signals, complicating the separation between cTnAAb-positive and negative samples. This study aimed to improve cTnAAb detection by reducing both the intensity and variability of the background signal, while also increasing the specific signal in cTnAAb-positive samples.

The label molecule was changed from europium chelates to upconverting nanoparticles (UCNPs) to achieve highly sensitive analyte detection. The assay conditions were optimized to reduce nonspecific binding by adjusting tracer incubation time and the concentrations of NaCl and polyacrylic acid (PAA) in the tracer assay buffer. Assay performance was evaluated in the absence of a biological sample and by analyzing known cTnAAb-positive and negative samples.

The results from this study suggest the UCNPs bind nonspecifically to cTn molecules, which prevents the assay from separating cTnAAb-positive samples from negatives. In the absence of a biological sample, the use of UCNPs for analyte detection resulted in a signal-to-background ratio of 2 370. To reduce the nonspecific binding, the most effective approach was found to be increasing the PAA concentration in the tracer assay buffer. When the PAA concentration was increased from 0.05% to 2.5%, the target signal-to-background ratio of 1.0 was reached in the absence of a biological sample. When analyzing known cTnAAb-negative samples, the average signal-to-background ratio reduced from 14.2 (n=4) to 5.0 (n=6). Despite improvements achieved by increasing PAA concentration, nonspecific binding remains a challenge when analyzing cTnAAbs in biological samples, and further research is required.

**Keywords:** cardiac troponin, cardiac troponin-specific autoantibodies, immunoassay, nonspecific binding, upconverting nanoparticles

## Long cardiac troponin forms in endurance athletes

Emmi Niskanen

Supervisors: MSc. Sara Simonen, Associate Prof. Saara Wittfooth

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Cardiac troponin I (cTnI) and T (cTnT) are standard biomarkers in acute myocardial infarction (AMI) diagnostics. When the heart muscle tissue is injured, cardiac troponins are released as intact and fragmented molecules to the circulation. Besides AMI, elevated cardiac troponin levels are also common in other situations, such as after physically strenuous exercise. Previous research suggests that intact and mildly fragmented “long cTnT” forms are predominant in the early stages of AMI whereas small fragments are released after strenuous exercise. Currently, there is limited research on long cTnT release in endurance athletes. The aim of this study was to investigate long cTnT concentrations in marathon runners.

Lithium-heparin plasma samples were obtained from marathon runners (n=53) before and after a marathon. The samples were analyzed with a novel investigational in-house long cTnT immunoassay and a commercial high-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) assay that detects both fragmented and non-fragmented cTnT forms. Median values (25<sup>th</sup> – 75<sup>th</sup> percentiles) are reported and non-parametric Wilcoxon rank sum test was used to compare the pre- and post-race groups.

Troponin concentrations in marathon runners were lower with the long cTnT assay (pre-race: 0.6 (0.6-0.6) ng/l, post-race: 0.6 (0.6-0.7) ng/l,  $p = 0.0065$ ) compared to the commercial hs-cTnT assay (pre-race: 6.0 (5.0-9.5) ng/l, post-race: 10.0 (6.0-15.0) ng/l,  $p = 0.0001$ ). The differences between pre- and post-marathon concentrations were statistically significant with both assays, but concentrations with the new long cTnT assay were overall very low. These findings indicate that only very small concentrations of long cTnT forms are present after hard endurance exercise.

**Keywords:** cardiac troponins, long cardiac troponin T forms, endurance athletes, marathon running, acute myocardial infarction, immunoassay



Fysioline on vuonna 1991 perustettu tamperelainen hyvinvointialan edelläkävijäyritys. Fysiolinen tuotevalikoima sisältää lääkkeitä ja apteekkituotteita, kuntosali- ja kuntoiluvälineitä sekä kuntoutusvälineitä ja -robotiikkaa.

**fysioline**  
live well.

revvity

## **Development and optimization of a lectin-based rapid test using FastEV®-enriched extracellular vesicles and glycoprotein for improved prostate cancer detection**

**Bruna Vrban Herceg**

Supervisors: PhD Khirul Islam, PhD Iida Martiskainen

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Prostate cancer (PCa) remains one of the most prevalent malignancies among men worldwide, thus highlighting the need for rapid diagnostic tools that make it capable of improving early detection. Urinary extracellular vesicles (EVs) and glycoproteins represent a potential source of cancer-associated biomarkers, particularly because of the glycosylation pattern changes on their surface due to disease progression. This study aimed to develop and optimize a lectin–antibody based lateral flow immunoassay (LFIA) to distinguish malignant cases from controls by targeting glycan alterations on EVs and glycoproteins.

We aimed to translate well-plate assay that used C192-WGA-EuNP into LFIA format. The assay design was carried out using immobilized wheat germ agglutinin (WGA) lectin as a capture on the test line, while C192 (a clone of anti-cancer antigen CA19.9) antibody-coated upconverting nanoparticles (UCNPs) that served for signal generation. Preliminary experiments were performed using urine samples from healthy individuals, patients with benign prostate hyperplasia (BPH) and PCa patients to evaluate signal generation, signal-to-background ratio and distinguishing between different samples. In this phase, developed rapid test demonstrated detectable signal using WGA-C192-UCNP combination, indicating that lectin-mediated capture of glycosylated targets in urine is feasible. Statistical analysis of the preliminary dataset did not reveal significant differentiation between clinical groups under the current assay conditions ( $p \approx 0.616$  for healthy vs cancer samples). This outcome suggests that further optimization of assay parameters is required to improve diagnostic discrimination.

Future work will be focused on systematic optimization of assay conditions and on the signal generation from the samples containing EVs enriched using FastEVs® technology (University of Helsinki). Combining glycoprotein and EVs results is expected to improve biomarker assay specificity. Overall, this study demonstrates the feasibility of lectin-based LFIA for glycan detection on the surface of EVs and glycoproteins. Lectin is cheap and widely selective. It could possibly establish a foundation for further development of rapid EVs and glycoprotein-based diagnostics for PCa.

**Keywords:** diagnostics, extracellular vesicles, glycoproteins, lectin, LFIA, optimization, prostate cancer

## **Detection of MUC1 glycovariant for early diagnosis of bladder cancer using lateral flow immunoassay**

**Sanni Prittinen**

Supervisors: Doctoral Researcher Imran Mahmud, Post doc Khirul Islam

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Bladder cancer (BlCa) is the most common malignancy of the urinary tract, causing a significant burden on patients and health-care systems, with an estimated incidence of 614,298 cases and 220,596 deaths worldwide in 2022, ranking it as the ninth most common cancer. BlCa faces highest recurrence rate among all cancers, highlighting the need for more effective diagnostic tools to improve long-term monitoring and early diagnosis. Current standard diagnostic methods, such as cytology and cystoscopy are highly invasive and lack sufficient sensitivity and specificity, leading to missed diagnoses. Although there are FDA-approved urine tests currently available, they are also limited by low sensitivity and specificity, and early diagnosis of BlCa remains a major challenge. Therefore, non-invasive and more specific diagnostic tests are needed to complement the current gold-standard methods.

The glycan structures of the MUC1 glycoprotein are aberrantly glycosylated in BlCa, and specific antibodies can be used to recognize these altered sugar moieties. This study aimed to develop a lateral flow immunoassay (LFIA) using a previously unexplored combination of glycoepitope-recognizing antibodies: the Ma695 (CA15.3) antibody Fab2 fragment as the capture reagent and the CA19.9 antibody (C241) conjugated to upconverting nanoparticles (UCNPs) as the tracer. Targeting the MUC1 glycovariant rather than protein epitopes or individual glycovariants, together with the use of urine as a biofluid, may enhance the test's cancer specificity and improve discrimination, particularly between clinically challenging benign and malignant cases.

The developed assay exhibited an analytical sensitivity of 2.85 U/mL with a 15-min readout time. Clinical samples from bladder cancer patients ( $n = 9$ ), individuals with benign prostatic hyperplasia ( $n = 9$ ), and healthy controls ( $n = 9$ ) were analyzed. BlCa samples showed a 7.2-fold increase compared with healthy controls ( $p = 0.0008$ ) and a 2.9-fold increase compared with benign individuals ( $p = 0.02$ ). More samples are required to further evaluate the clinical implications of this test but based on the current findings, this glycovariant assay may have the potential to serve as a reliable and rapid test for BlCa, potentially improving early diagnosis and differential diagnosis of BlCa.

**Keywords:** bladder cancer, lateral flow immunoassay, CA15.3, CA19.9, upconverting nanoparticles, MUC1 glycovariant

## Development of a Bioaffinity Assay Employing SpyTag-SpyCatcher Technology and Designed Ankyrin Repeat Proteins for Keratin-7 Detection

Adela Bekečová

Supervisors: Kirsti Raiko, PhD., Doc. Tuomas Huovinen

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Designed ankyrin repeat proteins (DARPin)s represent novel binders that serve as alternatives to antibodies, offering comparable specificity, high stability, and ease of production. Their oriented, site-specific immobilisation onto label molecules can be achieved by using the SpyTag-SpyCatcher linking platform, in which SpyTag and SpyCatcher form a stable isopeptide bond under different conditions. Upconversion nanoparticles (UCNPs), lanthanide-doped nanocrystals that exhibit anti-Stokes luminescence, serve as highly sensitive labels with minimal optical background. This project focuses on developing a bioaffinity assay that employs DARPin)s targeting keratin-7, a novel biomarker for inflammatory bowel disease, with SpyTag-SpyCatcher technology and UCNPs as labels.

SpyCatcher-DARPin fusion proteins were expressed in *E. coli* and purified by affinity and size-exclusion chromatography. UCNPs (NaYF<sub>4</sub>, doped with 17% Yb<sup>3+</sup> and 3% Er<sup>3+</sup>) were coated with poly(acrylic acid) (Mw 2000) and conjugated with SpyTag and SpyCatcher-DARPin fusion proteins using different concentrations of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC). Dynamic light scattering (DLS) was used to evaluate the hydrodynamic diameter and polydispersity index (PdI) of the conjugates prepared at different EDC concentrations.

The yield of purified SpyCatcher-DARPin fusion protein was 3.3 mg. For SpyTag-functionalised UCNPs, the hydrodynamic diameter increased with increasing EDC concentration, from 65.6 nm (PdI 0.25) at 5 mM EDC to 94.7 nm (PdI 0.31), 117.5 nm (PdI 0.40), and 135.6 nm (PdI 0.44) at 10, 20, and 30 mM EDC, respectively. A similar trend was observed for UCNPs-SpyCatcher conjugates, with sizes of 82.7 nm (PdI 0.35), 107.8 nm (PdI 0.42), 134.4 nm (PdI 0.30), and 245.3 nm (PdI 0.30) at 5, 10, 20, and 30 mM EDC, respectively.

These results provide a foundation for the continued development of an assay to investigate the properties and compatibility of UCNPs with SpyTag-SpyCatcher technology and DARPin binders.

Keywords: bioaffinity assay; keratin-7; SpyTag-SpyCatcher; DARPin)s; upconversion nanoparticles

### **3D streptavidin surfaces for higher capacity and enhanced kinetics in solid-phase immunoassays**

**Satu Pursimo**

Supervisors: MSc. Roope Korkea-aho, Ph.D. Satu Lahtinen, Prof. Tero Soukka

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

The streptavidin-biotin system is commonly used in solid-phase immunoassays to immobilize biomolecules. The conventional streptavidin (SA) coatings form two-dimensional surfaces which may limit binding site accessibility due to steric hindrance and mass transport limitations. Polystreptavidin (polySA) coatings can instead create a more three-dimensional architecture that may improve binding site accessibility and increase binding capacity. The aim of this study was to evaluate whether polySA surfaces can increase the solid-phase surface binding capacity and improve the performance of solid-phase immunoassays.

SA and polySA surfaces were prepared using direct and indirect coating strategies. Indirect coatings utilized biotinylated bovine serum albumin (bio-BSA) and thyroglobulin (bio-Tg) as anchoring layers. Binding capacity of the surfaces was assessed using europium-labelled biotin (Eu-biotin) and europium-labelled biotinylated IgG antibodies (Eu-bio-IgG). The functional performance and kinetics were evaluated using a troponin I immunoassay with time-resolved fluorescence detection at various incubation times.

PolySA had consistently higher binding capacity than conventional SA. Surface measurements showed 6.5- and 4-fold increases with Eu-biotin and Eu-bio-IgG, respectively, while solution measurements showed corresponding increases of 2.9- and 2.3-fold. Improvements in immunoassay performance were more moderate with approximately 1.3–1.5-fold increase in assay response but kinetic analysis showed consistently faster binding for polySA surfaces at all incubation times. Indirect coating strategies produced comparable or slightly reduced performance depending on the anchor protein and its biotinylation degree. Overall, the results indicate that polySA substantially enhances solid-phase surface binding capacity while maintaining functional immunoassay performance, supporting their use for improving assay kinetics.

**Keywords:** Immunoassay, streptavidin, polystreptavidin, surface coating, binding capacity, kinetics, troponin I, time-resolved fluorescence

## **Development of different capture and release methods in the complex transfer immunoassay for the Alzheimer's disease biomarkers**

**Julia-Aurora Setola**

Supervisors: M.Sc. Risto Jokinen, Ph.D. Kirsti Raiko

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease and leading cause of dementia. Phosphorylated Tau-181 protein (pTau-181) is a specific biomarker for Alzheimer's disease, but its concentrations in the blood are extremely low, therefore an extremely sensitive and specific assay is needed. Non-specific binding from the detection antibodies and antibody-antibody interactions are sensitivity limiting factors in conventional immunoassays. The aim of this study is to overcome the limitations by using an immune complex transfer (ICT) immunoassay. The ICT immunoassay is a two-step assay in which immunocomplexes are transferred from a first plate to a second plate. Thus, aiming to leave all non-specific binding on the first plate and allow for extremely sensitive background-free detection of complete immunocomplexes on the recapture plate. The aim of this study was to develop a highly sensitive ICT immunoassay for p-Tau-181 and achieve a limit of detection (LoD) of <1 ng/L.

In the ICT immunoassay, pTau-181 specific oligonucleotide-antibody conjugates were immobilized with biotinylated oligonucleotides. Antibody coated upconverting nanoparticles (UCNP's) were utilized in the detection. The formed complexes were eluted by specific oligonucleotides. The recapture on the second plate was done with immobilized Tau-specific antibodies. To achieve the highest elution and recapture efficiency, parameters affecting assay performance were studied, including the amount of eluting component, incubation times, and elution solution composition.

The assay reached a limit of detection (LoD) of 0.6 ng/L. In the first capture plate the elution efficiency was 48 % and recapture efficiency of the eluted complexes was 26 % in a spiked sample buffer (100 ng/L). The assay background signals were decreased close to the instrumental background signals on the recapture plate.

In the study the results indicate that the used platform in the ICT immunoassay is a highly promising method for detecting pTau-181 with extremely high sensitivity.

**Keywords:** Alzheimer's disease, immune complex transfer assay, oligonucleotides, phosphorylated Tau-181, upconverting nanoparticles

## **Ultra-sensitive sandwich immunoassay for Alzheimer's disease biomarker using upconverting nanoparticles detection**

**Clelia Esposito**

Supervisors: Risto Jokinen

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Alzheimer disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease affecting, which is estimated to affect 139 million people by 2050. The growing prevalence and severity of AD is pushing the research for tests capable of detecting early AD, giving better quality of life to the patients and easing the healthcare system burden. Biochemically, AD is characterized by formation of amyloid plaques and synaptic loss, with the presence of tau pathology and neurofibrillary tangles. Tau pathology results from hyperphosphorylated tau protein (p-Tau), with isoforms 181, 217 and 231 more common than others. P-tau can be detected in the cerebrospinal fluid and, at lower concentration in blood, years before symptoms onset, making it a favorable biomarker for the early detection of AD.

The aim of this project is the optimization of an ultra-sensitive sandwich immunoassay able to reliably detect the presence of p-tau 181 in plasma, using upconverting nanoparticles (UCNPs) as a label, which provides the ability of the test to be measured again, in time, without signal decay. The target limit of detection (LOD) is 1 pg/mL, thus aligning the assay to the commercially available Quanterix Simoa.

The sandwich immunoassay was performed using streptavidin coated plates, biotinylated antibody, blockers and spiked pTau181 in healthy plasma samples. One UCNP core has been acquired from Uniogen, it was coated with either polyacrylic acid (PAA) or C4 (Uniogen's surface), and then conjugated with Anti-Tau-mAb. Each has been individually optimized in the assay, requiring different amounts and steps to achieve low sensitivity.

With both labels, the signal to background ratio for 10 pg/ml was 1,50. For 1 pg/mL, the assay was not always reliable in the detection. The test was able to detect, with both labels, 1 pg/mL of pTau181 but the resolution in the 1-10 pg/mL range needs improvement, ensuring that all the values within the range are well defined and distinguishable.

**Keywords:** Alzheimer Disease, biomarker, immunoassay, pTau181, sandwich immunoassay, UCNP, ultra-sensitive detection, upconverting nanoparticle.

## **Immunokomplekseja hyödyntävä testi hormonien havaitsemiseksi**

**Susanna Helin**

Ohjaajat: FM Irene Callus, FM Ida Bäckström, Dos. Janne Leivo

### **BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)**

Hormonit ovat umpirauhasista erittyviä molekyyliä, jotka toimivat kehossa hitaan viestintäjärjestelmän välittäjä-molekyyliinä. Hormoneilla on merkittävä rooli kehon normaalissa toiminnassa, sillä ne osallistuvat moniin kehon aineenvaihduntaprosesseihin. Niitä esiintyy veressä vapaana aktiivisena muotona ja erilaisiin kantajaproteiineihin sitoutuneena epäaktiivisena muotona. Pienen molekyylikoon hormonien testaus on haastavaa, ja testauksessa käytetäänkin nykyään pääosin kilpailevaa immunomääritystä tai massaspektrometriaa. Näiden testausmenetelmien ongelmana on joko rajoittunut herkkyys tai liian monimutkainen ja kallis rutiinikäyttöön soveltumaton testaus. Hormonitestauksessa onkin tarve sensitiiviselle ja spesifiselle hormonin vapaata muotoa havaitsevalle ja vieritestaukseen soveltuvalle testille.

Pienmolekyylien havaitsemiseksi erilaisissa immunomääritystestiformaateissa on kehitetty erilaisia menetelmiä, joista yhtenä on immunokompleksivasta-aineiden hyödyntäminen. Immunokompleksivasta-aineet ovat immunokompleksia eli vasta-aineen ja siihen sitoutuneen analyysin muodostamaa rakennetta tunnistavia vasta-aineita, jotka eivät tunnista kumpaakaan osatekijää yksinään. Työn tarkoituksena oli löytää tietyn hormonin ja sitä tunnistavan sitojavasta-aineen muodostamaa immunokompleksia tunnistava Fab-fragmentti hyödyntämällä faaginnäyttökäytännöitä, ja kehittää uudenlainen testi hormonien havaitsemiseksi. Kehitetty testi hyödyntää sitojavasta-ainetta ja immunokompleksia tunnistavaa Fab-fragmenttia hormonin tunnistamiseksi, ja sen pitoisuuden määrittämiseksi.

Työssä onnistuttiin löytämään halutun hormonin immunokompleksia tunnistava Fab-fragmentti, ja luomaan uudenlainen immunokompleksivasta-aineita hyödyntävä testi. Löydetyin fragmentin EC50-arvo oli erittäin alhainen ollen pikomolaarisella (pM) tasolla, ja se on verrattavissa aiemmin löydettyihin muihin pienikokoisiin hormoneja tunnistavien immunokompleksivasta-aineiden vastaaviin arvoihin. Testikehityksen ja optimoinnin jälkeen selkeää sitoutumista havaittiin testissä nanomolaarisen (nM) tason hormonipitoisuuksilla. Testille luotiin onnistuneesti standardisuora sekä saatiin viitteitä hormonipitoisuuden ja reaktion tapahtumisnopeuden yhteydestä.

Asiasanat: Fab-fragmentti, hormoni, immunokompleksivasta-aine, immunomääritys, uudenlainen testi

## **Prototyypitesti kehitys hengitystieinfektion taudinaiheuttajalle mariPOC-testijärjestelmään**

**Emmi Veijola**

Ohjaaja: FT Janne Koskinen

### **BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)**

Hengitystieinfektiot ovat maailman yleisin sairaus. Infektion aiheuttajan tunnistaminen on keskeistä oikean diagnoosin ja antimikrobilääkehoitopäätöksen kannalta. Tämän diplomityön kohteena olevan bakteeriperäisen taudinaiheuttajan diagnosointi on kuitenkin haastavaa, sillä nykyisillä menetelmillä on merkittäviä rajoitteita. PCR on erittäin herkkä menetelmä ja se voi havaita bakteerin DNA:ta myös tilanteissa, joissa aktiivista infektiota ei enää ole. Serologinen diagnostiikka puolestaan perustuu vasta-ainevasteeseen, joka kehittyy viiveellä ja voi säilyä pitkään. Siksi yksittäisen näytteen tulkinta on usein epävarmaa. Antigeeniosoitus välttäisi muiden menetelmien rajoitteet, sillä se olisi todennäköisesti spesifinen akuutille ja tartuttavalle tautivaiheelle. Tällaisia automatisoituja, nopeaan ja hajautettuun diagnostiikkaan soveltuvia testejä ei kuitenkaan ole markkinoilla. Saatavilla on vain muutamia lateraalivirtaustekniikkaan perustuvia testejä, jotka eivät ole laajassa käytössä ja joista on vähän julkaistua tietoa.

Tämän diplomityön tavoitteena oli kehittää prototyypitesti hengitystieinfektion taudinaiheuttajalle mariPOC-testijärjestelmään. mariPOC on automatisoitu in vitro -diagnostiikkajärjestelmä, joka perustuu antigeenin immunometriseen määrittämiseen vasta-ainereagensseilla ja kaksoisfotoniviritteisen fluoresenssin mittaamiseen kiinteäfaasipohjaisessa reaktiossa. Työssä arvioitiin eri vasta-aineiden soveltuvuutta määrittämiseen, optimoitiin mikropartikkelien pinnoitus- ja reaktio-olosuhteita sekä tutkittiin määrittämisen analyttistä suorituskykyä. Menetelmän herkkyyttä arvioitiin analysoimalla signaalivastetta suhteessa bakteeripitoisuuteen ja määrittämällä alustava havaitsemisraja. Lisäksi kehitetyn prototyypin suorituskykyä verrattiin kahteen kaupalliseen lateraalivirtaustestiin.

Kehitetty prototyypitesti vaikuttaa lupaavalta. Se tuotti spesifisen signaalivasteen kohdeantigeenille. Vasta-ainevalinnan ja pinnoitusprotokollan optimointi paransivat signaali-taustasuhdetta ja testin herkkyyttä. Tulokset osoittavat, että mariPOC-järjestelmään kehitetty antigeenipohjainen prototyypitesti on teknisesti toteuttamiskelpoinen ja tarjoaa potentiaalisen vaihtoehdon nopeaan ja automatisoituun hengitystieinfektioiden diagnostiikkaan. Alustavien tulosten perusteella uusi testi on vähintään yhtä herkkä kuin kaupallisesti saatavilla olevat testit.

Asiasanat: antigeenitesti, hengitystieinfektiot, immunomääritys, in vitro -diagnostiikka, mariPOC, pikatesti, vieritestaus

## **Lateraalivirtaustesti liukoisen Clever-1-molekyylin havaitsemiseen hyperferritinemian diagnostiikassa**

**Alina Järvi**

Ohjaajat: TkT Iida Martiskainen, Dos. Maija Hollmén

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Clever-1, toiselta nimeltään Stabilin-1, on monitoiminnallinen puhdistajareseptori. Clever-1:tä koodavan *STABI*-geenin puuttumisen on havaittu aiheuttavan hyperferritinemiaa, joten Clever-1:tä voitaisiin käyttää biomarkkerina sen diagnosointiin.

Clever-1:tä havaitsevalla lateraalivirtaustestillä pystyttäisiin havaitsemaan ja poissulkemaan *STABI*-mutaatio nopeasti, mikä helpottaisi hyperferritinemian diagnostista strategiaa. Työn tavoitteena oli kehittää käänteisviritteisiä nanopartikkeleita leimana käytävä lateraalivirtaustesti, jolla pystytään nopeasti ja kvantitatiivisesti havaitsemaan Clever-1:tä potilaan plasmanäytteestä ja jonka suorituskyky vastaisi entsyymivälitteistä immunomäärittystä.

Lateraalivirtaustesti toteutettiin ei-kilpailevana immunomäärityksenä, jossa käytettiin Clever-1:tä tunnistavaa sitoja- ja leimavasta-ainetta. Lateraalivirtaustestiä optimoitiin useiden määritysparametrien suhteen. Optimoidulla testillä määritettiin standardikuvaaja sekä potilasnäytepaneeli (n=8).

Clever-1-lateraalivirtaustestin analyttinen havaitsemisraja oli 2,0 ng/ml, joka on 8,0 ng/ml alhaisempi kuin entsyymivälitteisellä immunomäärityksellä. Lateraalivirtaustestimäärityksen tulokset korreloivat positiivisesti entsyymivälitteisen määrityksen kanssa, vaikkakin tuloksissa havaittiin huomattavaa variaatiota ja lateraalivirtaustestin arvot olivat systemaattisesti korkeampia.

Tämä tutkimus osoittaa Clever-1-lateraalivirtaustestin olevan mahdollista kehittää kliinisesti käyttökelpoiseksi. Menetelmä vaatii kuitenkin vielä jatkokehitystä määrityksen tarkkuuden parantamiseksi. Tällaisella testillä voisi olla tulevaisuudessa tärkeä rooli hyperferritinemian diagnostiikassa. Lisäksi Clever-1:n yhteyttä on tutkittu useissa muissakin sairauksissa, joten määrityksellä voisi olla myös muita kliinisiä sovelluskohteita.

Asiasanat: Clever-1, hyperferritinemia, immunomääritys, käänteisviritteiset nanopartikkelit, lateraalivirtaustesti, Stabilin-1

## Haihtuvat yhdisteet suomalaisista päärynälajikkeista valmistetuissa mehuissa ja siidereissä

Vilma Kivistö

Ohjaajat: Dos. Niina Kelanne, Dos. Oskar Laaksonen

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

Päärynä (*Pyrus spp.*) on ravitsemuksellisesti arvokas hedelmä, jota voidaan hyödyntää sekä tuoreena että jalostettuna esimerkiksi fermentoitujen juomien valmistuksessa. Pohjois-Euroopassa, erityisesti Suomessa, kiinnostus paikallisten hedelmälaajikkeiden hyödyntämiseen siiderintuotannossa on kasvanut viime vuosina, mutta suomalaisten päärynälajikkeiden soveltuvuudesta siiderin valmistukseen on vielä vähän tutkimustietoa. Aiemmassa tutkimuksessa tarkasteltiin julkaisemattomista päärynän jalostuslinjoista valmistettujen juomien fenolista koostumusta ja aistinvaraisia ominaisuuksia. Näiden päärynälajikkeiden haihtuvia yhdisteitä ei kuitenkaan ole aiemmin tutkittu kattavasti.

Tämän työn tavoitteena on selvittää, miten suomalaiset päärynälajikkeet ja fermentaatiossa käytetyt hiivakannat *Saccharomyces cerevisiae* ja *Torulaspota delbrueckii* vaikuttavat päärynäjuomien haihtuvien yhdisteiden koostumukseen. Tutkimuksessa analysoitiin 17 suomalaisesta päärynälajikkeesta valmistettuja mehuja ja niistä fermentoituja siidereitä sekä neljä kaupallista päärynäsiideriä vertailuaineistona. Haihtuvat yhdisteet analysoitiin headspace-kiinteäfaasiuuttoon ja kaasukromatografia-massaspektrometriaan perustuvalla analyysimenetelmällä, ja tuloksia tarkastellaan tilastollisin menetelmin, kuten pääkomponenttianalyysillä ja varianssianalyysillä.

Tunnistetut haihtuvat yhdisteet kuuluivat pääasiassa estereihin, alkoholeihin, aldehydeihin ja haihtuviin rasvahappoihin. Osa yhdisteistä esiintyi sekä mehu- että siiderinäytteissä, mutta siiderinäytteissä havaittiin laajempi joukko yhdisteitä kuin mehuissa. Fermentoiduissa näytteissä korostuivat erityisesti estereihin ja korkeampiin alkoholeihin kuuluvat yhdisteet. Tutkimus lisää ymmärrystä päärynälajikkeiden soveltuvuudesta fermentoitujen juomien valmistukseen ja tukee kotimaisten päärynäpohjaisten juomien kehittämistä.

Asiasanat: päärynä, haihtuvat yhdisteet, siideri, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii*

## **Maltoosinegatiivisen hiivan ja glykolipidipohjaisen säilöntäaineen käyttö alkoholittoman oluen valmistuksessa**

**Iida Vahtola**

Ohjaajat: FM Kaj Kostander, Dos. Oskar Laaksonen

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

Alkoholittoman oluen suosio on kasvanut merkittävästi maailmanlaajuisesti, mikä on lisännyt tarvetta kehittää tuotantomenetelmiä, jotka takaavat sekä miellyttävän aistinvaraisen laadun että mikrobiologisen turvallisuuden. EU-lainsäädännön mukaan alkoholiton olut voi sisältää korkeintaan 0,5 tilavuusprosenttia etanolia. Alkoholittomuus saavutetaan käyttäen joko fyysistä tai biologista prosessia, joista biologisten menetelmien suurimpana haasteena on ei-toivottujen makuun vaikuttavien yhdisteiden muodostuminen ja perinteisen oluen makujen puuttuminen tai vajavaisuus. Fyysisten menetelmien haasteita ovat suuret kustannukset etenkin investointivaiheessa, ja mahdollinen maun heikkeneminen haihtuvien yhdisteiden menettämisen vuoksi. Lisäksi alkoholittoman oluen säilyvyys on haaste korkeampien ravinnepitoisuuksien ja matalamman etanolipitoisuuden vuoksi, mikä lisää tarvetta pastöroinnille tai säilöntäaineiden käytölle.

Diplomityössä tutkittiin alkoholittoman oluen valmistusta biologisella menetelmällä hyödyntäen maltoosinegatiivista hiivaa ja kuumaa mäsäysohjelmaa. Neljä koenäytettä valmistettiin esitestauksissa optimoidun reseptin pohjalta: yksi näyte perinteisellä oluthiivalla, kolme maltoosinegatiivisella erikoishiivalla. Lisäksi glykolipidipohjaisen säilöntäaineen soveltuvuutta pastöroimattoman alkoholittoman oluen mikrobiologisen laadun turvaamiseen arvioitiin valmistamalla kolme näytettä, joista yksi toimi kontrollina ilman säilöntäainetta, yksi sisälsi perinteisiä säilöntäaineita (natriumbentsoaatti ja kaliumsorbaatti) ja yksi glykolipidipohjaisen säilöntäaineen. Näytteiden aistinvarainen laatu arvioitiin Pivot-CATA-kuvailumenetelmällä, ja etanolipitoisuudet analysoitiin GC-FID-menetelmällä.

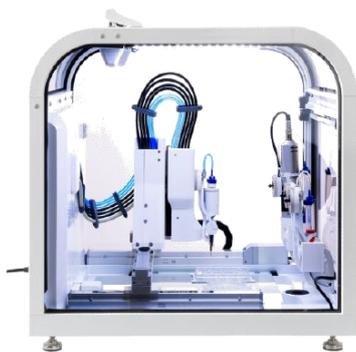
Maltoosinegatiivisella hiivalla valmistetut oluet olivat aistinvaraisesti makeampia, hunajaisempia ja sameampia kuin perinteisellä hiivalla valmistetut vertailuoluet. Heikot hapot natriumbentsoaatti ja kaliumsorbaatti osoittautuivat tehokkaimmiksi säilöntäaineiksi suositelluilla pitoisuuksillaan, kun taas glykolipidipohjainen säilöntäaine tarjosi heikomman säilöntätehon tutkituissa pitoisuuksissa. Tulokset viittaavat siihen, että glykolipidipohjaisten säilöntäaineiden antimikrobista vaikutusta voidaan mahdollisesti tehostaa korkeammilla pitoisuuksilla, mikä edellyttää jatkotutkimuksia.

Asiasanat: aistinvarainen arviointi, alkoholiton olut, mikrobiologinen turvallisuus

# Innovating in food & pharma *with speed, power, and precision.*

WWW.OPESCORP.COM

AM TECHNOLOGIES  
BY BRINTER



## One Robot. Every Material. Earth or orbit

Modular multi-material 3D printing platform  
from research to advanced manufacturing:

- Liquids and bioinks with living cells
- Viscous materials & Pastes
- Food and Biomaterials
- Engineering plastics and Silicones
- Combinations like flexible bio-electronics



Modular  
design



Unlimited  
materials



Ease of  
Use



Surface of  
your  
choice



Clean  
working

Stay tuned and follow our LinkedIn, loads of interesting news coming!



Contact



BrinterAM

Brinter AM Technologies Oy  
Itäinen Pitkätie 4 A  
20520 Turku, Finland

# *Apetit*



**JANOSTA  
TEKUIHIN**

## **Sellupohjaiseen teknologiaan perustuvan kofeiinituotteen valmistus Active Ingredient Delivery System -teknologialla**

**Veera Wirzenius**

Ohjaajat: Janne Järvenpää, Dos. Oskar Laaksonen

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

Nootropiinituotteiden kysynnän kasvu on lisännyt tarvetta nopeasti imeytyville kofeiinivalmisteille, jotka ovat vaihtoehto perinteisille kiinteille annosmuodoille. Tämän diplomityön tavoitteena oli kehittää Opes Corporation Oy:lle sellupohjaiseen Active Ingredient Delivery System -teknologiaan perustuva kofeiinituote. Keskeinen haaste tuotekehityksessä oli kofeiinin heikko liukoisuus huoneenlämpöiseen veteen, mikä rajoittaa sen käyttöä nestemäisissä tuotteissa. Tavoitteena oli tarkastella erityisesti liukoisuuteen vaikuttavia tekijöitä ja liukoisuutta parantavia teknologioita, sekä arvioida näiden sovellettavuutta tähän tuotekehitysprosessiin ja sellupohjaiseen annosteluratkaisuun.

Työssä tutkittiin tuotekehityskokeiden avulla muun muassa kofeiinin liukoisuutta, liuksen käyttäytymistä erilaisten apuaineiden kanssa, liuksen painettavuutta, reseptin stabiilisuutta, sekä pH:n vaikutusta limakalvoärsytykseen. Työssä todettiin, että kofeiinin liukenemistä voidaan parantaa erityisesti hydrotrooppisilla apuaineilla, joista natriumbentsoaatti osoittautui tehokkaimmaksi. Natriumbentsoaatti parantaa kofeiinin liukoisuutta monikymmenkertaiseksi muodostamalla hydrotrooppisen kofeiini-bentsoaatti-kompleksin.

Lisäksi arvioitiin sellupohjaisen annosalustan soveltuvuutta ja tuotteen imeytymisteknistä toimintaa nopean liukenemisen näkökulmasta HPLC-analyysien kautta. Sellupohjainen, ohut ja huokoinen annoskorti yhdistettynä nestemäiseen matriisiin mahdollistaa kofeiinin vapautumisen minuuteissa, mikä tukee bukkaalista imeytymistä. Suun limakalvolta imeytyvien tuotteiden kannalta nopea liukeneminen ja suuri kontaktipinta-ala ovat keskeisessä asemassa. Painotekniikka (silkkipaino) soveltuu hyvin matriisin tasalaatuisen levittämiseen ja mahdollistaa tarkat ja toistettavat annoskoot.

Tulosten perusteella tunnistettiin tekijät, jotka mahdollistavat kofeiinin tehokkaan liukenemisen, stabiilin matriisin muodostamisen ja tasalaatuisen annostelun. Tämän työn avulla pystyttiin tuottamaan teknologisesti toimiva ja aistinvaraisesti miellyttävä tuote, jonka kofeiinipitoisuus voidaan toteuttaa 20–80 mg annosta kohden. Tulosten perusteella tuoteperheen kehitys on mahdollista.

Avainsanat: bukkaalinen imeytyminen, kofeiini, liukoisuus, natriumbentsoaatti silkkipainotekniikka, sellupohjainen annostelujärjestelmä, tuotekehitys

## **Appelsiininkuorista viinietikkaa – biomassahävikin hyödyntäminen elintarvikekäyttöön**

**Kristiina Willgren**

Ohjaajat: Dos. Oskar Laaksonen, Dos. Matti Ruuskanen, Dos. Niina Kelanne

### **ELINTARVIKEKEMIA**

Appelsiinien elintarvikekäytön seurauksena syntyy vuosittain useita tonneja kuoria ja muuta kiinteää ainesta sisältävää biomassahävikkiä, jolle olisi hyvä löytää käyttötarkoituksia ympäristön saastumisen vähentämiseksi. Yksi mahdollisuus on viinietikan valmistus, jossa hiivat tuottavat biomassasta etanolia ja tämän jälkeen etikkahappobakteerit edelleen etanolista etikkahappoa. Tämän tutkielman tarkoituksena on selvittää, miten appelsiininkuorimassaa voidaan hyödyntää viinietikan valmistukseen, miten viinietikan fermentaatioaika vaikuttaa lopputuotteen ominaisuuksiin ja millaisia erot appelsiininkuorimassasta sekä tuorepuristetusta appelsiinimehusta tehtyjen viinietikoiden välillä ovat.

Appelsiininkuorimassa pestiin ja murskattiin, minkä jälkeen kuorimassa lämpökäsiteltiin vesihauteessa sekä entsyymaattisesti hydrolysoitiin sellulaasilla, pektinaasilla ja lakkaasilla sokeripitoisuuden lisäämiseksi. Tuorepuristettu mehu sekä esikäsitelty kuorimassa suodatettiin ja saatujen mehujen sokeripitoisuus säädettiin samaksi. Mehuille tehtiin etanolifermentaatiot pulloissa ja lopulta viinietikkafermentaatiot bioreaktoria käyttäen. Etikkahappobakteerit kerättiin pastöroimattomasta viinietikasta. Kuorimassoista määritettiin sokeripitoisuus ennen ja jälkeen esikäsitelyyn, ja viineistä seurattiin käymisen aikana sokeripitoisuutta ja fermentaation päätyttyä määritettiin etanolipitoisuus. Viinietikkafermentaation aikana seurattiin pH:n, hapen osapaineen ja sameuden muutosta, ja lopputuotteista määritettiin etikkahappopitoisuus sekä muut orgaaniset hapot. Viinietikkafermentaation keston (1 vs. 2 viikkoa) vaikutusta lopputuotteen ominaisuuksiin tutkittiin.

Sokeripitoisuuden nousu kuorimassassa oli vähäistä esikäsitelyjen jälkeen. Etanolipitoisuus oli suurempi tuorepuristetuista mehuista tehdyissä viineissä verrattuna kuorimehusta tehtyihin viineihin (keskiarvo 7,6 % vs. 6,2 %). Etikkahappofermentaatiot onnistuivat paremmin kuorimehuviineissä verrattuna mehuviineihin (etikkahappopitoisuuden keskiarvo 2,6 % vs. 1,7 %). Pidemmän ajan (2 vk) fermentoituneissa viinietikoissa ei ollut suurempi viinietikkapitoisuus verrattuna lyhyemmän ajan (1 vk) fermentoituneisiin. Kokonaisuudessaan viinietikkaa saatiin tehtyä kuorista etikkahapon saannon perusteella paremmin kuin pelkästä tuorepuristetusta mehusta.

Asiasanat: appelsiini, biomassahävikki, entsyymihydrolyysi, fermentaatio, viinietikka

## Phenolic Characterization of Finnish-Grown Grapes

**Koushik Mitra**

Supervisors: Dos. Oskar Laaksonen, Assoc. Prof. Maaria Kortnesniemi

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

Climate change is opening up northern areas like Finland for viticulture. Grape quality, including their color and health benefits, depends heavily on their phenolic compounds, such as anthocyanins, flavonols, and hydroxycinnamic acids. While the phenolics in traditional commercial grapes are well-documented, very little is known about table grapes grown in Finland's unique environment, which features a short growing season compensated by long day lengths and abundant sunshine. This study aims to explore the phenolic profile of Finnish-grown hybrid grapes and compare it to commercial table grapes to evaluate how Nordic climatic conditions affect their chemistry.

To analyze these compounds, anthocyanins were extracted from homogenized grape samples using an acidified alcohol solution made of methanol and hydrochloric acid. In parallel, flavonols and hydroxycinnamic acids were separated using ethyl acetate. The extracts were subsequently analyzed using high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector. Furthermore, liquid chromatography-mass spectrometry analyses are being conducted to confirm the exact identities of the compounds.

Preliminary results showed a major difference in the anthocyanin composition between the Finnish and imported grapes. The commercial varieties exhibited complex mixtures of pigments, containing up to ten major anthocyanin compounds, including glycosides of cyanidin and malvidin, as well as late eluting acylated derivatives. In contrast, the Finnish grape displayed a distinctly simple anthocyanin profile, with its pigmentation almost entirely dominated by a single major compound.

These initial findings suggest that the Nordic growing conditions, along with hybrid genetics, strongly shape the chemistry of the grape, resulting in a highly concentrated but simpler anthocyanin profile. Ongoing quantification of flavonols and hydroxycinnamic acids will further characterize the samples. Together, these data will provide a comprehensive understanding of the nutritional value and potential of cultivating table grapes in Finland.

**Keywords:** anthocyanins, climate change, high-performance liquid chromatography, phenolic compounds, table grapes, viticulture

**SALONEN**  
1905

# ENERGIAT VÄHISSÄ?

## HAUKKAA TUPLASTI ISOMPI VÄLIPALA

UUTUUSMAKU  
OHRA-TUPLA



RUOKAA  
OMASTA  
MAASTA



LEIPOMO SALONEN • SYNTYNYT LEIPOMAAN

## **Discovering the impact of different cultivation factors on the phenolic composition of raspberries**

**Muhammad Awais Khan**

Supervisors: Doc. Ying Zhou, Doc. Ye Tian, Doc. Oskar Laaksonen

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

Raspberries (*Rubus idaeus*) are one of the most valuable berry crops in Europe, valued globally not only for their organoleptic properties but high content of health benefiting phenolic compounds like anthocyanins, ellagitannins, and flavonols. Phenolic compounds in raspberries are greatly impacted by genetic, environmental stresses, and culture practices, which lead to significant variability in phenolic profiles and the sensorial properties of the fruit.

This study investigates the combined influence of how cultivation systems and fruit ripening affect the phenolic composition among the different red raspberry cultivars (Agat, Borgund, Glen Ample, and Ninni). Fruits were cultivated under three systems (open-field roots in ground, open-field roots in pot, and tunnel cultivation roots in pot) and harvested at early, optimal and late ripeness. Phenolic compounds were extracted using an optimized solvent protocol and analyzed by HPLC-DAD and LC-MS.

Preliminary results from the Agat cultivar at optimal ripeness indicated that the major anthocyanin compounds, mainly cyanidin-3-O-sophoroside and cyanidin-3-O-glucoside, were highest in open-field roots grown in soil and lowest in tunnel-cultivated potted samples. This suggests that unrestricted root growth and full light exposure may enhance anthocyanin biosynthesis. In contrast, the contents of phenolic acids and flavonols from open-field in-ground samples gradually declined with increasing ripeness, peaking at the early harvest stage. While these results are currently limited to a single cultivar, they reveal a clear differential response, cultivation system primarily drives anthocyanin accumulation, whereas harvest timing critically determines phenolic acid and flavonol profiles. Ongoing analysis across all four cultivars will provide a more comprehensive basis for optimizing both growing systems and harvest schedules to enhance the nutritional quality of raspberries produced under Nordic growing conditions.

**Keywords:** Raspberry, phenolic compounds, anthocyanins, phenolic acids, flavonols, cultivation factors, LC, MS

## **Phenolic composition of alcoholic beverages and vinegars produced from apple juice and pomace-based fermentation**

**Kavindya Sandeepanie Gunathilaka**

Supervisors: M.Sc. Qizai Wang, Doc. Oskar Laaksonen

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

Apple is among the most widely consumed fruits worldwide and is used as a raw material for a variety of processed products, including juices, alcoholic beverages, and vinegars. The production of apple juice generates large amounts of pomace as a by-product. Apple pomace differs from juice in its chemical composition and is particularly rich in structural polysaccharides and phenolic compounds. Despite this potential, comparative studies evaluating the phenolic composition of fermented products derived from juice and pomace-based material remain limited.

This study aims to evaluate the phenolic profile of alcoholic beverages produced from three apple cultivars that are not yet widely commercialized (Antonovka, Turso and Yltöisten Sitruunaomena) and three raw material compositions: (i) pure apple juice; (ii) juice–pomace mixture; and (iii) pomace–water mixture. In total, the samples included 1 juice sample, 27 vinegar samples and 27 alcoholic beverage samples.

Samples were prepared using direct filtration with a 0.2µm polytetrafluoroethylene syringe filter. Quantitative analysis of phenolic compounds was performed using high-performance liquid chromatography, while compound identification was carried out using mass spectrometry. Chromatographic data were statistically processed to perform comprehensive comparisons between the samples.

A total of 25 phenolic compounds were tentatively identified in the analyzed samples. Hydroxycinnamic acids were the predominant phenolic group, particularly caffeoylquinic acid derivatives such as 5-*O*-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), 4-*O*-caffeoylquinic acid, caffeic acid and 4-*O*-p-coumaroylquinic acid. Principal component analysis of the vinegar samples revealed cultivar-dependent variation, with the highest phenolic content observed in samples produced from ‘Yltöisten Sitruunaomena’. Hydroxycinnamic acids accounted for the largest proportion of phenolics, while flavonols and dihydrochalcones contributed smaller fractions.

These findings will demonstrate the influence of cultivar and substrate composition on the phenolic profiles of apple-based beverages and vinegars and support the valorization of apple pomace as a value-added fermentation ingredient.

**Keywords:** apple pomace, apple vinegar, by-product valorization, hydroxycinnamic acids, phenolic compounds, polyphenols

## Nopea kalan laadun määrittäminen tekoälypohjaisen sensorin avulla

Eetu Hirvonen

Ohjaajat: DI Meeri Santikko, Dos. Oskar Laaksonen

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

Itämeressä elävä silakka (*Clupea harengus membras*) on Suomessa kaupallisesti merkitsevä kala. Silakan matka avomereltä myytäväksi on pitkä, ja kalan säilyvyysikä on varsin lyhyt. Kalankäsittelyn eri vaiheessa on tärkeää, että kalan laatu säilyy, ja että kylmäketju ei katkea missään vaiheessa, jolloin laatu heikkenee. Tietoa kenttäolosuhteisiin soveltuvista kalan laadun vaihtelua mittaavasta teknologiasta on niukasti saatavilla.

Tutkimuksen tavoitteena oli jatkokehittää metalli-oksidi sensorin (MOx-sensori) luotettavuutta ja sen neuroverkon laajentamista hyödyntäen kehittyneempiä analyysejä. Tutkimuksessa mitattiin silakan erilaisia kemiallisia muutoksia kylmäsäilytyksen (2 – 4 °C, 0 – 10 päivää) aikana, Vertailuna tehtiin mittauksia huoneenlämmössä (20 – 22 °C, 0 – 3 päivää) pilaannutetuista silakoista. Tutkimuksessa käytettiin Boschin BME688 -sensoria ja BME AI Studion neuroverkkoa todentamaan kalan pilaantumisaste. Sensoridatan oikeudellisuuden varmistamiseksi tehtiin samasta kalaerästä yhtäaikaisesti yksittäisten haihtuvien yhdisteiden semikvantitatiivinen määrittäminen, joka tehtiin kaasutilan kiinteän faasin uutolla yhdistettynä kaasukromatografia-massaspektrometriaan (HS-SPME-GC-MS). Neuroverkkopohjaisen MOx-sensorin jatkokehitys on osa Blue Products 3.0.-projektihanketta, joka toteutettiin yhteistyössä Turun yliopiston ja Turun ammattikorkeakoulun kanssa.

Huoneenlämmössä säilyneiden kalafileiden laatu heikkeni hyvin nopeasti, mikä todettiin kaikilla menetelmillä. Kalan pilaantumisasteen arvioiminen huoneenlämmössä aiheutti epäluotettavuutta sensorilla, mikä todettiin haihtuvien yhdisteiden määrittäksen perusteella rikkiyhdisteiden ja amiiniyhdisteiden runsaasta muodostumisesta. Sensorin resistanssin laskiessa pilaantumisyhdisteiden määrä oletetaan kasvavan mitä kauemmin kalaa säilytetään. Kylmäsäilytetyjen silakkafileiden HS-SPME-GC-MS- analyysistä huomattiin, että dimetyylidisulfidi suhteellisen määrän kasvu myöhäisessä vaiheessa oli varhainen pilaantumisen markkeri, jolle myös sensorin neuroverkko oli todennäköisesti herkkä. Kaloja haistelevalla sensorilla on paljon kehityspotentiaalia, mutta jatkotutkimusta tarvitaan erityisesti selektiivisyyden testaamiseen sekä eri yhdisteillä että kaloilla, jotta neuroverkko oppisi indikoimaan paremmin kalan pilaantumista.

Avainsanat: silakka, kuha, MOS-sensori, HS-SPME-GC-MS, säilyvyys, TVB-N, PV, Nuoret tutkijat 2026



**Premium Pick for Nature Lovers**

# Ωmega7<sup>®</sup>

Sisäistä kosteutusta kehollesi – luonnollisesti.

## MEMBRASIN<sup>®</sup>

NEVER A DRY MOMENT.

**arΩmtech**  
SCIENCE OF NATURAL VITALITY

## **Sivuvirtamateriaalien hyödyntäminen ja prosessin optimointi paisutettujen elintarvike-ekstrudaattien valmistuksessa**

**Loviisa Seppälä**

Ohjaajat: Dos. Oskar Laaksonen, Dos. Annelie Damerou, Prof. Kaisa Linderborg

### **ELINTARVIKEKEHITYS (DI)**

Omenamehun puristeen ja panimomäskin kaltaiset elintarviketeollisuuden sivuvirrat ovat ravitsemuksellisesti ja kiertotalouden kannalta arvokkaita, mutta vajaasti hyödynnettyjä raaka-aineita. Tämän diplomityön tavoitteena oli toteuttaa laboratoriomittakaavan kaksiruuviekstruusiolaitteiston (Three-Tec ZE 12 HMI, ruuvin halkaisija 12 mm) käyttöönottoa ja tutkia näiden kuitupitoisten sivuvirtojen hyödyntämistä kuivien ja paisutettujen elintarvike-ekstrudaattien valmistuksessa. Ekstruusiosprosessin ensisijaisena päämääränä oli saavuttaa lopputuotteen mahdollisimman voimakas paisuminen ja sitä kautta ilmava sekä rapea rakenne. Erityisenä kiinnostuksen kohteena oli selvittää sivuvirtojen vaikutuksia prosessin hallittavuuteen ja ekstrudaattien lopullisiin fysikaalisiin ja aistinvaraisiin ominaisuuksiin.

Laitteiston käyttöönoton ja perusparametrien (kuten ruuvinopeuden, lämpötilaprofiilin, jauheen- ja nestesyötön) optimoinnin jälkeen tutkimuksessa käytettiin ruispohjaista reseptiä, johon lisättiin eri pitoisuuksilla omenamehun puristetta tai panimomäskiä. Näitä seoksia vertailtiin rukiiseen referenssinäytteeseen. Ekstruusiosprosessin aikana seurattiin ja rekisteröitiin suutinpaineen sekä massan lämpötilan muutoksia. Valmiista ekstrudaateista määritettiin poikittainen paisumiskerroin ja tilavuustiheys. Fysikaalisia mittauksia täydennettiin koulutetun raadin toteuttamalla kuvailevalla aistinvaraisella arvioinnilla.

Sivuvirran tyypillä ja pitoisuudella on ratkaiseva vaikutus prosessoitavuuteen ja rakenteen tavoiteltuun paisumiseen. Fysikaalisista mittauksista laskettu poikittainen paisumiskerroin osoitti viiden prosentin omenamehun puristeen lisäyksen tuottavan suurimman paisunnan. Kymmenen prosentin lisäyksellä kerroin pysyi vielä hyväksyttävällä tasolla, mutta korkeimmat lisäysmäärät, kuten 15 % omenamehun puristetta ja 7 % panimomäskiä, romahduttivat paisunnan ja tuottivat tiheimmät rakenteet. Laitetulosten rinnalla aistinvaraisella profiloinnilla todennetaan havaittujen rakennemuutosten ja sivuvirtojen tuomien makuominaisuuksien heijastuminen tuotteiden koettuun tekstuuriin ja kokonaislaatuun. Kokonaisuudessaan työ osoittaa, että vaikka kuitupitoisten sivuvirtojen käyttö asettaa tiukat teknologiset rajat maksimilisäysmäärille paisunnan ylläpitämiseksi, jo verrattain pienillä pitoisuuksilla voidaan tehokkaasti muokata ruispohjaisten ekstrudaattien fysiikkaa, rakennetta sekä makuprofiilia.

Asiasanat: aistinvarainen arviointi, ekstruusio, kiertotalous, omenamehun puriste, paisuminen, panimomäski, ruis

## Maitohappofermentoinnin vaikutus porkkanan ja lantun haihtuviin aromiyhdisteisiin

Matilda Nikula

Ohjaajat: Dos. Oskar Laaksonen, Dos. Niina Kelanne

### ELINTARVIKEKEMIA

Maitohappofermentoinnilla on muinaiset juuret elintarvikkeiden säilönnässä. Fermentointi voi parantaa säilyvyyden lisäksi tuotteen ravitsemuksellisia sekä aistinvaraisia ominaisuuksia. Maitohappofermentoinnin aikana bakteerit metaboloivat raaka-aineesta erilaisia haihtuvia ja haihtumattomia yhdisteitä, jotka luovat fermentoiduille tuotteille ominaisen flavorin.

Työn tavoitteena oli tutkia miten maitohappofermentointi eri bakteerikannoilla vaikuttaa porkkanan (*Daucus carota*) ja lantun (*Brassica napus* L. ssp *rapifera*) haihtuviin aromiyhdisteisiin. Tutkimuksessa fermentointiin käytettiin kolmea kaupallista hapatetta, joissa oli *Lactoplantibacillus plantarum* -kantaa joko yksin tai yhdessä *Lactocaseibacillus rhamnosus* - tai *Pediococcus pentosaceus* -kannan kanssa. Työssä selvitettiin myös miten raaka-aineen muoto; raaste tai kuutio, vaikuttaa fermentoidun tuotteen haihtuviin yhdisteisiin.

Haihtuvat aromiyhdisteet ovat pieniä ja kevyitä molekyyliä, jotka voivat tuottaa hajuaistimuksen päästessään kosketuksiin hajuepiteelin kanssa. Yhdessä kemosuonon ja maun kanssa haihtuvat yhdisteet tuottavat ruuan flavorin. Haihtuvien yhdisteiden tutkimiseen käytettiin HS-SPME-GC-MS - (Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography Mass Spectrometry) menetelmää. Tulosten tilastollisessa tarkastelussa käytettiin pääkomponenttianalyysiä ja PLS-DA- (Partial Least Squares Discriminant Analysis) malleja.

Maitohappofermentointi muutti merkittävästi raaka-aineiden haihtuvien aromiyhdisteiden koostumusta, erityisen voimakas muutos havaittiin lantussa. Lantun sulfidipitoisuus laski merkittävästi fermentoinnin seurauksena. Porkkanaan muodostui erityisesti alkoholeja fermentoitaessa. Pääkomponenttianalyysissä selvisi, että käytetyt hapatteet eivät juurikaan eronneet toisistaan vaikutuksiltaan haihtuviin aromiyhdisteisiin. Sen sijaan suurempi merkitys oli sillä, oliko raaka-aine raastettu vai kuutioitu, ja kuinka pitkään raaka-aineita oli säilytetty kylmässä ennen fermentointeja.

Asiasanat: haihtuvat aromiyhdisteet, HS-SPME-GC-MS, lanttu, maitohappofermentointi, porkkana

**Atria**<sup>®</sup>

PERHETILOILTA VUODESTA 1903

**BRÄMHULTS  
VITAMIN  
WATER**

## **Impact of phytase treatment and heating on functionality of pea and faba bean protein concentrates**

**Anna Räsänen**

Supervisors: M.Sc. Anni Kortekangas (VTT), M.Sc. Martina Lille (VTT)

BIOMOLECULAR PRODUCTION (TECH.)

Pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba*) are promising plant-based protein sources due to their favourable nutritional profiles and functional potential in food applications. However, their high phytic acid content can impair mineral bioavailability and alter techno-functional properties relevant to food processing. Based on previous findings, it has been hypothesized that phytate degradation will increase cation availability and have effect on viscosity and gel network formation during heating. High cation availability is expected to induce salting-out aggregation, reducing viscosity at elevated salt concentrations. Understanding these phenomena may offer opportunities for controlled structure formation in food applications.

This study investigated how phytase treatment and heating influence the functionality of pea and faba bean protein concentrates, with emphasis on network formation, aggregation and viscosity. Phytase treatment was used to degrade intrinsic phytate in pea and faba bean raw materials. The effect of phytase treatment on heat-induced viscosity of pea and faba bean dispersions was analysed with Rapid Visco Analyser (RVA). External calcium addition was used to determine the contribution of released cations to viscosity change.

Results showed that phytase treatment had opposite effects on viscosity of pea and faba bean protein concentrates. Phytase treatment decreased the viscosity of pea protein concentrate and increased the viscosity of faba bean protein concentrate in comparison to non-enzyme treated ingredients. Heat treatment additionally induced aggregation in phytase treated protein concentrates and reduced the viscosity of the soluble fraction, with the effect being more pronounced in the pea samples than in the faba bean samples. Calcium addition had a dose-dependent similar effect on viscosity of the protein concentrates to that of the phytase treatment. Based on these results, phytic acid degradation by phytase has opposite effects on heat-induced viscosity of pea and faba bean samples, and the impact is at least partly related to cations released during phytase treatment.

**Keywords:** faba bean, pea, phytase, protein concentrate, techno-functional properties, viscosity

## Oil purification (stripping) by a solvent free aluminum oxide-based procedure

Kamal Acharya

Supervisors: PhD Eija Ahonen, Doc. Annelie Damerou, Prof. Kaisa Linderborg

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

Edible oils are primarily composed of triacylglycerols and can be stripped of other minor components, making the oil a blank matrix to study the oxidation and rancidity of lipids.

This study aimed to evaluate the effectiveness of aluminum oxide-based stripping in removing minor components, lipid oxidation products, and tocopherols of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) oil and microalgae (*Schizochytrium sp*) oil. The peroxide value and *p*-Anisidine value were measured before and after stripping. Tocopherol content in both non-stripped and stripped samples was analyzed with ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Headspace solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry was employed for the analysis of volatiles and secondary oxidation products. Both non-stripped and stripped samples were incubated at 45 °C for 27 hours to accelerate the oxidation. Thin-layer chromatography techniques were applied to identify the lipid classes.

The peroxide value (meq/kg) and *p*-anisidine of non-stripped Baltic herring oil decreased from  $2.57 \pm 0.08$  to  $0.69 \pm 0.09$ , and from  $11.042 \pm 1.29$  to  $1.38 \pm 0.14$ , respectively, and similar depletion was observed in microalgae oil. The total tocopherol content in non-stripped microalgae oil,  $7738.0 \pm 765.0$  mg/kg, declined to  $1070.8 \pm 86.2$  mg/kg after stripping. Similarly, in Baltic herring oil, the total tocopherol concentration reduced from  $1188.15 \pm 109.87$  mg/kg to  $208.4 \pm 45.1$  mg/kg. In the oxidized state, volatiles formed due to the decomposition of hydroperoxides, such as 1-octen-3-one, 2-butenal, and 2-pentenal, in the stripped oil showed a higher peak area. However, fewer volatiles, such as nonanal, octanal, and 1-octen-3-ol, were present in non-oxidized oils with less abundance, indicating a mild oxidation. Interfacial tension was found to be the same for all samples. Stripping significantly decreased levels of phospholipids and free fatty acids. Overall, from the reduced peroxide value, *p*-Anisidine value, and total tocopherol content in oil after stripping, it can be concluded that the aluminum-oxide-based approach for stripping is applicable for the removal of minor components. Moreover, the removal of minor components and the increase in incubation temperature accelerate oxidation and volatile formation, as expected.

Keywords: edible oil, stripping, oxidative stability, tocopherol, volatile



## **NMR based metabolomics study on interspecific hybrid strawberries**

**Bilguun Enkhkhuyag**

Supervisors: MSc. (Tech) Carla Vecenâncio da Silva, Doc. Niina Kelanne, Doc. Oskar Laaksonen, Assoc. Prof. Maaria Kortensniemi

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

The breeding of garden strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) began in the 18<sup>th</sup> century in Europe. Today, allelic diversity from two wild sister species, *F. chiloensis* and *F. virginiana*, is being reintroduced to the strawberry for the purpose of enhancing agronomic traits such as fruit quality, disease resistance, and resilience to environmental change. The aim of this research is to characterize the chemical composition of new interspecific hybrids to help find the most potential ones for further breeding into commercial cultivars.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, known for its high reproducibility, quantitative and qualitative nature, is a robust tool widely applied in metabolomics. NMR spectroscopy provides a comprehensive analysis of metabolites in organisms, with detailed overview of the complete metabolic profile. In this study, polar metabolites (such as amino acids, organic acids, phenolics and sugars) were extracted and analyzed with <sup>1</sup>H NMR.

NMR-based metabolomics workflow combined with multivariate data analysis was used to investigate the metabolite composition of 167 individual hybrids, cultivar ‘Aho’ and six commercial cultivars (‘Honeoye’, ‘Korona’, ‘Lumo’, ‘Polka’ and ‘Ria’). The results demonstrated the metabolite variation between and within progeny groups, subgroups and individuals.

**Keywords:** *Fragaria* × *ananassa*, interspecific hybrids, metabolomics, NMR, strawberry

## **Analysis of volatile compounds in cell-cultured coffee**

**Balasooriya Mudiyansele Navanjana**

Supervisors: Doc. Jukka-Pekka Suomela, Doc. Annelie

Damerau, M.Sc. (tech.) Priscilla Ollenu-Chuasam, Doc. Rischer Heiko,

Ph.D. Heikki Aisala

FOOD DEVELOPMENT (TECH.)

Coffee aroma is a significant factor for the quality and consumer acceptance of coffee. The aroma of coffee arises from a complex mixture of volatile compounds formed in coffee beans. Increasing challenges in traditional coffee production have driven the exploration of alternative solutions for coffee cultivation. Cell-cultured coffee can be identified as an emerging alternative for traditional land-grown coffee. Earlier studies have given insights on volatile compounds in roasted cell cultured coffee. Even though, there is still limited information available on the effect of storage condition and epigenetic modifications on volatile profile of cell-cultured coffee and how comparable it is with volatile composition of land-grown coffee. To evaluate the sensory potential and technological feasibility to use it as a successful alternative, it is important to understand aroma forming precursors and volatile compounds of cell-cultured coffee.

In this study, volatile compounds of cell-cultured coffee and land-grown green *Coffea arabica* beans were analyzed using headspace-solid-phase micro extraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). The study focused on two phases, which are analyzing volatile compounds in cell-cultured coffee stored under different conditions, including refrigerated, frozen and freeze-dried, and the analysis of volatile profiles of epigenetically modified cell-cultured coffee compared to land-grown green coffee.

Differences in volatile compound profiles were observed under the analyzed storage conditions. Alcohols, such as 1-hexanol and 1-heptanol, were present in fresh samples but absent in frozen and freeze-dried samples. Freeze dried samples showed comparatively higher preservation of some key volatiles, including aldehydes such as hexanal, heptanal and octanal, identified in the fresh samples. However, some volatiles were lost even in the freeze-dried samples. The next phase will focus on analyzing the volatile profiles of epigenetically modified cell-cultured coffee. Epigenetic modifications may affect metabolic pathways involved in production of aroma precursors and volatile compounds. Investigating these effects could contribute to optimizing aroma characteristics in cell-cultured coffee.

**Keywords:** cell-cultured coffee, coffee aroma, GC-MS, volatile compounds, volatile profiling

## The role of GM-CSF in microglial amyloid- $\beta$ turnover in a mouse Alzheimer's disease model

Noora Majuri

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Alexander Mildner

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Microglia are resident immune cells located in the brain parenchyma that maintain central nervous system homeostasis by clearing harmful particles through phagocytosis under both steady-state and pathological conditions. In Alzheimer's disease (AD), a neurodegenerative disease characterized by progressive accumulation of lipid-rich amyloid- $\beta$  plaques, microglia initially play a protective role by clearing amyloid- $\beta$  aggregates to preserve neuronal function. However, during the course of pathogenesis, sustained microglial activation drives microglia towards a dysfunctional phenotype, defined by impaired phagocytic ability and intracellular lipid droplet accumulation. The cytokine granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) has demonstrated a promising therapeutic benefit for AD, but the precise mechanism underlying this effect is unclear. This study investigates whether modulated microglial function by GM-CSF would potentially allow more efficient amyloid- $\beta$  clearance and plaque destruction.

To address this, an *in vitro* phagocytosis assay was conducted with primary mouse microglia. The cells were exposed to GM-CSF or control cytokines in the presence of amyloid- $\beta$ . A complementary *ex vivo* experiment was performed using organotypic brain slice cultures. Additionally, GM-CSF was administered to AD mice to evaluate the effect under physiological conditions. Subsequent imaging, quantification, flow cytometry and transcriptional analyses were used to assess functional and phenotypical changes.

The phagocytosis assay revealed increased amyloid- $\beta$  uptake with GM-CSF supplementation. Additionally, immunofluorescence analysis showed altered amyloid- $\beta$  plaque size in the mouse cerebral cortex in *ex vivo* experiments. These findings suggest that GM-CSF could restore microglial function and promote efficient amyloid- $\beta$  clearance, revealing a potential therapeutic strategy for AD.

Keywords: Alzheimer's disease, GM-CSF, microglia, amyloid- $\beta$ , phagocytosis

## **Deciphering the Molecular Changes of MDP- and GMP-Derived Monocytes in Response to M-CSF and GM-CSF Stimulation**

**Sameera Zafar**

Supervisors: Dr. Alexandar Mildner, Hans Bergman

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Monocytes are a critical part of the innate immune system. They are the first responders in an immune response as they are recruited from the bloodstream to the inflamed tissues, where they differentiate into monocyte-derived macrophages or dendritic cells (moDCs). However, an inflammatory reaction can cause an imbalance in monocyte numbers and alter their developmental origin. As opposed to conventional understanding, recent data indicates that monocytes arise from two distinct progenitors, monocyte-dendritic cell progenitors (MDPs) and granulocyte-monocyte progenitors (GMPs), which show unique molecular signatures and functional properties. In addition, the balance between MDP- and GMP-derived monocytes can further be influenced by the presence of cytokines. Although several *in vitro* and *in vivo* studies have investigated the effects of the cytokines, macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on monocytes, these studies have generally treated monocytes as a homogeneous population, without considering their diverse developmental origins. Consequently, current datasets may be contaminated by the simultaneous presence of two functionally distinct monocyte lineages. Here, by using flow cytometry, cell sorting, transgenic mouse models, and real-time qPCR, we characterize the heterogeneity of monocytes derived from MDP and GMP progenitors and examine how M-CSF and GM-CSF influence their transcriptional and phenotypic programs *in vitro*. Overall, our results show that M-CSF and GM-CSF distinctly shape monocyte phenotype. Compared with M-CSF, GM-CSF drives a more antigen-presenting profile, marked by increased expression of major histocompatibility complex II (MHCII) and CD11c. GM-CSF was further effective in supporting MDP-derived monocyte development, while M-CSF functions mainly on GMP-derived cells.

Together, these findings highlight that the cellular origin is a key factor of how monocytes respond to growth-factors. These results may help explain why different inflammatory settings preferentially recruit or expand particular monocyte subsets and why cytokine-directed interventions can yield different outcomes.

**Keywords:** cytokines, GM-CSF, GMP-derived, granulocyte-monocyte progenitors, immune system, inflammation, M-CSF, MDP-derived, monocyte-dendritic cell progenitors, monocytes

## **Embigin Function and Regulation in Human and Murine Macrophages**

**Sajad Rahmani**

Supervisors: Johanna Jokinen, Ph.D., Elina Siljamäki, Ph.D., Prof. Jyrki Heino, M.D., Ph.D.

### MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Macrophages are highly plastic innate immune cells that can adopt a wide range of phenotype states in response to environmental cues, existing on a dynamic spectrum of activation. Previously, macrophages have been categorized as the pro-inflammatory M1 (classically activated) and the anti-inflammatory M2 (alternatively activated) macrophages. However, this dichotomy oversimplifies the full heterogeneity of macrophages observed *in vivo*, including the M2a (wound healing) and M2d (tumor-associated) subtypes, among many others.

Embigin is a highly glycosylated transmembrane protein and the founding member of the basigin family. A key function of embigin is serving as an ancillary protein for some monocarboxylate transporters (MCTs). Notably, it has been demonstrated to associate with MCT2 and to form a heterodimeric complex with MCT1, facilitating its trafficking to the plasma membrane. Embigin is expressed in a wide range of cell types, including immune cells such as bone marrow progenitors, T cells, and myeloid cells.

This study aims to investigate the expression and possible functions of embigin in macrophages, as it is currently an understudied topic. This research employs bulk and single-cell RNA sequencing, western blotting, immunofluorescence staining, and lactate assay analyses to unravel the expression and potential functions of embigin in various subtypes of macrophages at the transcript, protein, and metabolite levels.

RNA sequencing revealed that human THP-1-derived M2-like macrophages upregulate embigin by 47% at the transcript level compared to the M1-like cells. Additionally, MCT1, MCT8, and MCT6 are upregulated while MCT4, MCT2, and MCT10 are downregulated in the M2-like phenotype. Furthermore, western blots demonstrate that human M2a macrophages have the highest embigin expression at the protein level among the other M2 subtypes. In addition, transcriptome experiments carried out on mouse peritoneal macrophages suggest that SMOC1, a molecular regulator of cell-matrix interactions, is upregulated in the embigin knockout mice. Together, these findings suggest a potential role for embigin in regulating tumor-associated macrophages.

**Keywords:** embigin, macrophage subtypes, monocarboxylate transporters, SMOC1

## **Crosstalk between SHANK3 and VEGF signaling in endothelial cells**

**Ritu Dagar**

Supervisors: Megan Chastney, Prof. Johanna Ivaska

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

SHANK (**SH3** and multiple **ankyrin** repeat domains) family proteins, such as SHANK1, SHANK2, and SHANK3, are postsynaptic density (PSD) scaffolding proteins that play essential roles in synapse formation, signal transduction, and structural organization of neuronal synapses in the brain. Among them, SHANK3 has been extensively studied in the nervous system, with mutations strongly associated with neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorder and intellectual disability. In addition to its presence in neuronal tissues, according to the Human Protein Atlas, SHANK3 is also expressed abundantly in non-neuronal cells, such as endothelial cells. However, its functional role there remains largely unknown compared to its brain counterpart.

Endothelial cells line blood vessels and give rise to the blood vasculature through vasculogenesis- the formation of a primitive blood vessel network- and angiogenesis- the formation of new blood vessels from existing ones. One of the key regulators of these processes is Vascular endothelial growth factor (VEGFR2), a potent angiogenic factor that promotes endothelial cell survival under stress conditions, migration and proliferation by interacting with downstream signalling proteins including ERK (extracellular signal-regulated kinase) and AKT/PKB (Protein kinase B).

Since SHANK3 has been associated with the regulation of both AKT and ERK1/2 signaling pathways *in vivo*, and these pathways are central to VEGF-mediated endothelial responses, it is possible that SHANK3 may influence VEGF-driven cytoskeletal remodeling and cell-cell junction dynamics in endothelial cells. This thesis therefore investigates the potential crosstalk between SHANK3 and VEGF signaling pathways, including downstream proteins such as ERK and AKT, in endothelial cells.

**Keywords:** AKT, angiogenesis, endothelial cells, ERK, SHANK3, signaling proteins, vasculogenesis, VEGF

## **Impact of Epstein-Barr Virus Infection on the Therapeutic Response to PI3KCA Inhibition in Gastric Cancer**

**Victoria Kumpulainen**

Supervisors: Adj. Professor Silvia Gramolelli, M.Sc. Lorenza Cutrone

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

Gastric cancer (GC) is the fifth most common tumor malignancy and the third leading cause of cancer-related death globally. Based on molecular characterization, GC is categorized into four distinct subtypes: Epstein-Barr virus (EBV)-positive, microsatellite unstable (MSI), genetically stable (GS), and chromosomally unstable (CIN). Notably, around 80% of EBV-positive cases harbor Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gene mutations, indicating a putative target for precision medicine. Alpelisib is an  $\alpha$ -specific PI3K inhibitor that has demonstrated significant antitumor activity in preclinical studies and is approved by the Food and Drug Administration for the treatment of PIK3CA-mutated advanced breast cancer.

In this study, the PIK3CA-mutated AGS gastric adenocarcinoma cell line was used in EBV-infected (EBV+) and non-infected (EBV-) conditions to evaluate Alpelisib response. We utilized crystal violet staining, western blotting, and RT-qPCR to assess differential protein and gene expression. To investigate viral resistance determinants, we hypothesize that the Latent Membrane Protein 1 (LMP1) oncogene confers resistance to Alpelisib. Furthermore, we characterized the effects of long-term Alpelisib exposure on EBV+ cells, specifically assessing replication stress, DNA damage, and viral gene expression profiles following chronic drug exposure.

Our results indicate that both EBV- and EBV + cells exhibit dose-dependent inhibition; EBV+ cells show significantly higher tolerance. In EBV cells, LMP1 expression increased Alpelisib tolerance. RT-qPCR results showed that LMP1 and ZEBRA, the gene responsible for lytic cycle switch in EBV, were significantly decreased between EBV+ cells resistant to Alpelisib and the non-resistant strain. Western blot analysis showed a significant increase in DNA damage in EBV+ cells resistant to Alpelisib compared to the control.

This work demonstrates that Alpelisib is an effective inhibitor of cell viability in gastric cancer cells with PIK3CA mutation, especially in the non-infected cells. Non-infected cells expressing only LMP1 do not exhibit a prominent difference in Alpelisib response, suggesting that there might be other viral components involved in resistance. Further research is essential to investigate combination therapies to overcome viral-mediated resistance.

**Keywords:** Gastric cancer, PIK3CA mutation, Epstein-Barr, Alpelisib, LMP1, crystal violet, targeted therapy

## Targeting tumor-stroma interactions in prostate cancer using 3D co-culture systems

Milla Majaniemi

Supervisor: Doc. Astrid Murumägi

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Prostate Cancer (PC) is the most common cancer in men in Finland, and a leading cause of cancer-related deaths worldwide. While standard-of-care treatments often yield good responses in localized PC, advanced and metastatic disease remains largely incurable.

The tumor microenvironment (TME) is a niche surrounding the tumor that supports and drives cancer progression. Within the TME, tumor stroma forms the major structural and functional compartment that actively interacts with cancer cells to provide protection and meet metabolic demands. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are a non-cancerous group of cells found in the stroma. CAFs are known to play a role in all stages of cancer, from tumorigenesis to disease progression, affecting drug responses and driving therapy resistance. Given the high abundance of CAFs in the stroma and their critical roles in tumor biology, uncovering these interactions is fundamental to understanding the biology behind PC and developing treatment strategies that are effective also at advanced disease stages.

The aim of this project was to develop a PC:CAF 3D co-culture model that captures *in vivo*-like cell-cell interactions, that conventional 2D cultures lack. The project included establishing the co-culture model, refining 3D imaging protocols, creating a quantitative analysis pipeline and validating the developed platform by investigating PC:CAF interactions under drug treatment. By integrating wet-lab experiments with image-based analysis, this project aimed to improve our understanding of tumor-stroma interactions in PC with focus on how these interactions contribute to cell behavior, disease progression and drug resistance.

The results demonstrate that this method enables characterization of PC:CAF interactions in 3D. Quantitative analysis is possible both on spheroid and single cell levels, focusing on morphological, phenotypical and spatial features. Drug screens performed with PC:CAF co-cultures show altered responses compared with PC monocultures, highlighting the importance of complex co-culture models that consider tumor-stroma interactions and reflect the complexity of the TME.

Keywords: cancer-associated fibroblasts, drug response, image-based analysis, prostate cancer, tumor-stroma interactions, 3D co-culture

## **Cell based *in vitro* gut model to study the impact of microbiome derived metabolites**

**Muhammad Abdul Qadeer**

Supervisors: Doc. Santosh Lamichhane, Adj. Prof. Kati Juuti-Uusitalo, Prof. Matej Oresic

### **MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY**

The human gut microbiota modulates host immune system development and metabolism through the production of bioactive metabolites. Emerging studies suggest that dysregulation of microbiome-associated metabolites, particularly bile acids and lipids, leads to autoimmune disorders such as Type 1 Diabetes (T1D). However, it is unclear how these metabolites interact with the host intestinal physiology.

This study aims to develop an *in vitro* co-culture model of the two adenocarcinoma cell lines, Caco-2 and HT29, to mimic the host intestinal physiology. The effect of microbiome-derived metabolites will be studied on intestinal epithelial barrier integrity and villi formation. The cell model will be optimized to better mimic the host gut environment by using different seeding densities to generate a physiology-relevant monolayer representing the tight junction, villi, and mucus production. Fecal water from the islet autoantibody-positive and healthy patients will be exposed to the apical side of the transwell insert to study the effects of metabolites on cells.

Zonula occludens-1 and villin are markers of the barrier junction and epithelial differentiation; these will be stained using immunofluorescence staining, imaged using a confocal microscope, while mucin production will be evaluated using Muc-2 DNA polymerase chain reaction. Moreover, untargeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis will be performed from apical and basolateral compartments of the transwell to study downstream metabolic changes. The results from this study will provide insight into how microbiota derived metabolite modulates intestinal epithelial function and contribute to the development of T1D.

**Keywords:** gut microbiome, microbiome-derived metabolites, intestinal epithelial barrier; Caco-2/HT29 co-culture model, type 1 diabetes, immunofluorescence imaging; LC-MS/MS metabolomics, transwell cell model.

## **Chemical synthesis and mass spectrometric detection of microbiome derived N-acyl amides**

**Melissa Ahonen**

Supervisor: Prof. Matej Orešič

MOLECULAR SYSTEMS BIOLOGY

N-acyl amides (NAAs) are endogenous cell signaling molecules that regulate numerous physiological responses in the body, particularly in the brain and central nervous system. The vast diversity within this group arises from the combination of different amine head groups with acyl tail groups that can vary in length and unsaturation. Compounds within this extensive group have been linked with multiple biological processes, such as regulation of pain, inflammation, appetite, stress, and anxiety. Despite growing interest in NAAs, their biological functions, receptors, as well as biosynthesis and degradation pathways are still often unknown.

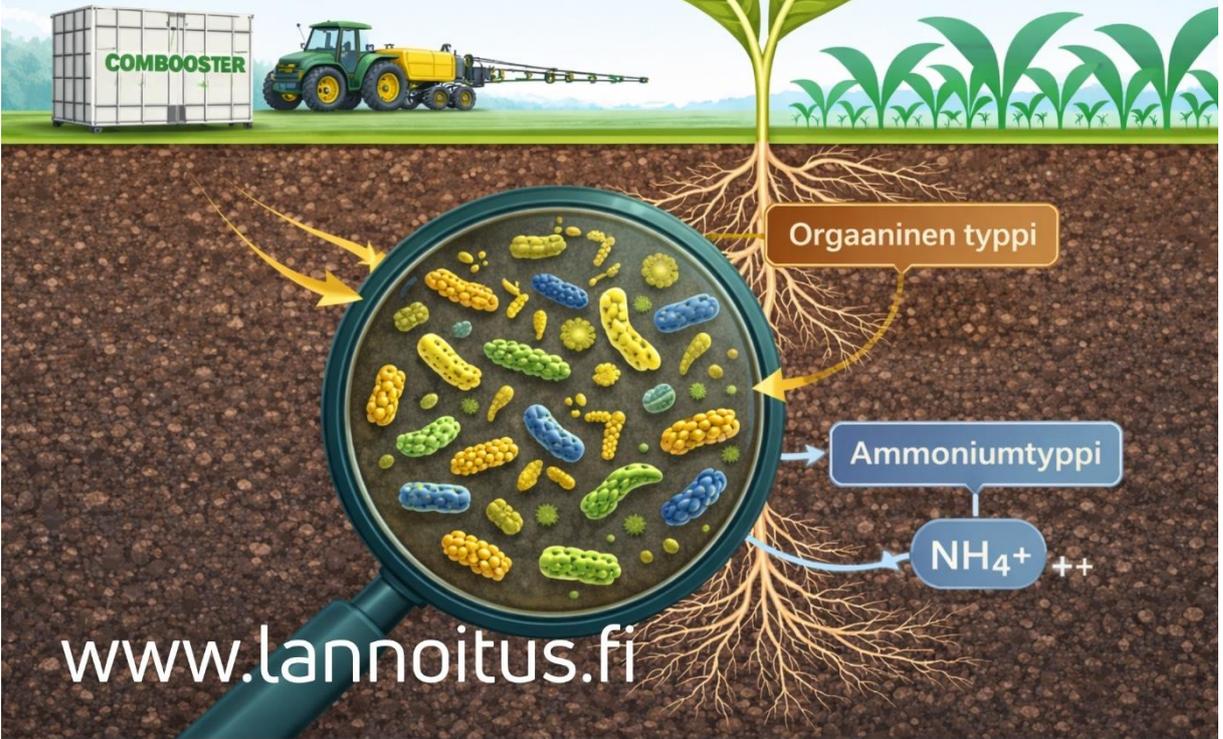
Recent research has accumulated strong evidence for gut microbiome-derived NAAs, that can potentially influence the host physiology as well. Notably, it has been shown that human gut microbes are enriched in NAA synthase genes and NAAs produced by them are structurally similar to their endogenous counterparts. Furthermore, these microbiome-produced intestinal NAAs have been shown to play a role in host physiology through gut–brain signaling.

The aim of this thesis was to chemically synthesize NAAs as qualitative standards and to utilize them in detection of human gut microbiome-derived NAAs. Well-characterized standards are fundamental to discovering NAAs from biological samples with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technology. The synthesized standards were validated with LC-MS/MS and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The chemical synthesis was successful and the synthetic standards were used in qualitative analysis.

Targeted LC-MS/MS was utilized in detection of 48 NAAs from human fecal samples (n=40). The cohort consisted of 5,5-year-olds with equal representation of both sexes. Out of the 48 targeted NAAs, 32 were reliably detected. While there was no statistically significant difference in the abundance of NAAs between the sexes, these results demonstrated the utility of synthetic NAA standards together with optimized targeted LC-MS/MS method in detection of microbiome-derived NAAs in biological samples.

**Keywords:** chemical synthesis, gut microbiome, mass spectrometry, n-acyl amides, nuclear magnetic resonance spectroscopy

# COMBOOSTER



## Role of thioredoxins in regulating cyanobacterial bioenergetics under changing light conditions

Ella Andersin

Supervisors: Ph.D. Laura Wey, Docent Lauri Nikkanen

MOLECULAR PLANT BIOLOGY

Cyanobacteria use intricate regulatory networks to maintain photosynthetic efficiency under changing environmental conditions, such as fluctuating light. Thioredoxins are small, ubiquitous, redox-active proteins that regulate the activity of their target proteins through reversible thiol-disulfide exchange reactions and play an important role in cellular redox signalling networks. However, while more well-studied in plants, the role of specific thioredoxins and their targets in cyanobacteria remain largely unknown. The aim of this study was to investigate the roles of thioredoxins TrxB and TrxQ in regulating bioenergetics in *Synechocystis* sp. PCC 6803 under changing light conditions.

To characterise the roles of TrxB and TrxQ, knockout mutant strains lacking these thioredoxins were analysed and compared with their corresponding wild type. Cell growth was observed under fluctuating light to test if the mutants could acclimate to changing light conditions. To analyse oxygen production and consumption during alternating light intensities, real-time oxygen exchange was monitored by using membrane inlet mass spectrometry. Additionally, proton motive force dynamics were studied using electrochromic shift measurements and the redox state of TrxB under different light conditions was analysed through thiol alkylation and mobility shift assays.

$\Delta$ trxB and  $\Delta$ trxQ strains were able to maintain growth under fluctuating light, whereas growth of the wild type was inhibited. Chemical disruption of thiol redox regulation resulted in enhanced oxygen consumption during both dark adaptation and high light phases. This could be also seen in  $\Delta$ trxB during high light. The increase in oxygen consumption was mainly independent of flavodiiron protein activity, suggesting the involvement of respiratory terminal oxidases. The disruption of thiol exchange reactions also resulted in decreased proton motive force and increased thylakoid conductivity in wild type cells, while  $\Delta$ trxB displayed a weaker response. These results indicate that thiol redox regulation contributes to controlling oxygen-consuming pathways and bioenergetic processes in *Synechocystis* sp. PCC 6803, and that TrxB likely participates in this regulation.

Keywords: bioenergetics, cyanobacteria, fluctuating light, photosynthesis, respiration, *Synechocystis* sp. PCC 6803, thioredoxins

## **A control interface proof-of-concept for continuous photobioreactor systems: Balancing between autotrophic growth and 3-hydroxybutyrate production**

**Ville Korhonen**

Supervisors: M. Sc Lauri Kakko, Assoc. Prof. Pauli Kallio

SUSTAINABLE BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES (TECH.)

Cyanobacteria have been engineered for the photoautotrophic production of industrially relevant chemicals, including the bioplastic precursor 3-hydroxybutyrate (3HB) directly from atmospheric CO<sub>2</sub>. While 3HB production has been primarily studied in batch experiments, the potential of continuous production remains underexplored. Although current photobioreactor instrumentation supports continuous processes, it requires a more flexible and user-friendly configuration to realize its full potential. This study aims at (i) developing a proof-of-concept control interface for managing photosynthetic production across different growth modes and (ii) investigating the balance between cellular growth and 3HB production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 during continuous high-density cultivation.

The interface under development brings configuration, data aggregation, and visualization together into a centralized control panel for the customized commercial photobioreactor (MC 1000-OD; PSI), working in cooperation with automated feedback control to ensure stable culture conditions. The interface allows users to set up the experiments visually, translating protocols into valid configurations operable by the equipment. By automating tasks that were previously manual, the interface makes experiments more reproducible and straightforward to monitor, which is important for evaluating strain performance and for moving toward adaptive process optimization applications.

Validation is currently underway using the most efficient 3HB producer strains engineered at UTU, grown under nutrient-controlled continuous-mode with cultivation parameters (200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> light, 3% CO<sub>2</sub>, 30°C) aligned for metabolic comparability with recent research. At the same time, a high-throughput HPLC quantification method without sample derivatization is being developed. Together, these results will provide valuable insights into the cyanobacterial production dynamics in continuous production modes, promoting the development of more efficient, scalable photobiological bioprocesses.

**Keywords:** 3-hydroxybutyrate, bioprocess control, continuous cultivation, growth-production trade-off, photobioreactor, *Synechocystis*

## **Characterization of the most prominent *Synechocystis* sp. PCC6803 strains engineered for 3-hydroxybutyrate production**

**Leevi Uitto**

Supervisors: Assoc. Prof. Pauli Kallio

BIOMOLECULAR PRODUCTION (TECH.)

Cyanobacteria turn sun's light energy and atmospheric CO<sub>2</sub> into metabolic products that often have technological applications. Polyhydroxybutyrate (PHB) is an energy storage molecule which can be used as a biodegradable and biocompatible thermoplastic. 3-hydroxybutyrate (3HB) is a monomer form of PHB and producing it instead of PHB offers the benefit of being secreted into the growth medium, which makes downstream processing much easier and increases production efficiency.

In this thesis the main goal is to characterize three most prominent *Synechocystis* sp. PCC6803 strains genetically engineered for production of 3HB. The strains were selected from a previously constructed and screened library based on productivity. The characterization is done by culturing the strains for 21 days and taking samples once every second day to see how the cells grow and produce 3HB. In addition to culturing cells in standard nutrient rich BG11, nutrient limitation in the form of phosphate starvation (BG11-P) is conducted to see the influence on growth and productivity. Phosphate starvation has been shown to increase flux towards 3HB precursor acetyl-CoA in cyanobacteria. To study expression plasmid stability in long-term cultivation, the highest-producing strain is analyzed for growth and 3HB productivity in successive batch cultures carried out in the absence of antibiotics. All cultures have the same conditions, 200 µmol light and 3% CO<sub>2</sub>, and all are done in four parallels to obtain statistically relevant information and to see variance between cultures.

All the strains cultured in BG11 grew, but not uniformly and the strain considered highest-producing grew the least. None of the strains cultured in BG11-P grew. The growth between parallels was not perfectly uniform. All phosphate starved cells bleached and lost their photosynthetic capabilities after a week. All strains cultured in BG11 stayed green until the end, but all showed signs of stress after two weeks. Quantitative HPLC analytical system for measuring 3HB directly from the collected culture samples is now being developed to find appropriate analytical column and run conditions to reach sufficient resolution and sensitivity.

**Keywords:** 3-hydroxybutyrate, cyanobacteria, HPLC, nutrient limitation, photobiological production, strain characterization

## **Mikroepäpuhtauksien poisto teollisista jätevesistä Suomessa**

**Irene Parvinen**

Supervisors: Doc. Kati Thiel

BIOMOLEKYYLIEN TUOTANTO (DI)

Euroopan unionin uusi yhdyskuntajätevesidirektiivi 2024/3019 kiristää jätevesiin kohdistuvia käsittelyvaatimuksia. Direktiivi asettaa puhdistamoille mikroepäpuhtauksien poistovelvoitteen, jota seurataan indikaattoriaineiden avulla. Mikroepäpuhtauksien poistokustannuksista 80% suunnataan yrityksille laajennetun tuottajavastuun kautta. Tämän seurauksena yritykset osallistetaan tuotteiden elinkaaren aikana syntyneiden mikroepäpuhtauksien poistoon.

Tässä diplomityössä tutustumme jäteveden puhdistukseen, jätevedenpuhdistusta koskevaan lainsäädäntöön, potentiaalsiin mikroepäpuhtauksien puhdistusmenetelmiin, sekä niihin liitettäviin ympäristöparametreihin. Mikroepäpuhtauksia on rutiininomaisesti havaittu kaikissa Euroopan unionin vesissä. EU:n jätevesissä eniten käsiteltäviä vaativista mikroepäpuhtauksista suurin osa on peräisin lääkeaineista, kuten antibiooteista, sekä kosmetiikasta.

Työssä käsitellään mikroepäpuhtauksien puhdistumista nykyisessä puhdistusprosessissa ja etsitään ratkaisuja paremman poistotehokkuuden saavuttamiseksi. Työn aikana selvitettiin aktiivihilikäsittelyn lisäksi kahden uuden puhdistusmenetelmän, fotokatalyyysin ja syklodekstriinikuidun, kykyä poistaa valittua hydrofobista mikroepäpuhtautta valituista teollisuuden jätevesistä.

Tulokset osoittivat aktiivihiihen olevan tehokas menetelmä mikroepäpuhtauden poistoon, mutta sen tehon heikkenevän huomattavasti mikroepäpuhtauden hydrofobisuuden heiketessä. Fotokatalyyysi ei kyennyt hajottamaan mikroepäpuhtautta, kun syklodekstriinikuitu kykeni tähän matalissa määrin. Tulokset osoittavat mikroepäpuhtauksien laajan kirjon ja eriävien ominaisuuksien vaativan useampia puhdistusmenetelmiä direktiivin puhdistusvaatimusten saavuttamiseksi, eivätkä tutkitut puhdistusmenetelmät kykene tähän yksin, vaikka ne voivat soveltua erinomaisesti tietyille yksittäisille mikroepäpuhtauksille.

Asiasanat: mikroepäpuhtaudet, jätevedenpuhdistus, puhdistusmenetelmät, yhdyskuntajätevesidirektiivi, kuormitus

## **Perunaproteiini-isolaatin rakenteen muokkaaminen ja umamin korostaminen**

**Adèle Rouvinen**

Ohjaajat: Dos. Oskar Laaksonen, Dos. Marika Kalpio

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

Kasviproteiinien kysyntä ja tarve ovat nousussa ilmasto-ongelmien lisääntymisen ja väestön kasvun myötä, sillä eläinperäiset proteiinit eivät enää riitä vastaamaan kysyntää. Jotta kasviproteiinit pystyisivät korvaamaan eläinperäiset proteiinit, on niiden oltava korkealaatuisia. Siksi kasviproteiinien laadun kehittäminen on tärkeää.

Tutkimuksen tavoitteena oli muokata kaupallisen perunaproteiini-isolaatin rakennetta ja korostaa umamia. Perunaproteiini-isolaatin on havaittu vaativan joissakin sovelluksissa koostumuksen optimointia, jotta suutuntuma olisi mahdollisimman miellyttävä ja käyttömahdollisuudet laajenisivat. Umamin vahvistaminen taas lisäisi isolaatin soveltuvuutta eläinproteiinien korvikkeeksi sekä voisi mahdollistaa suolan vähentämisen tietyissä tuotteissa.

Suutuntumaa pyrittiin muokkaamaan erilaisilla käsittelyillä, kuten entsyymaattisilla hydrolyyseillä kaupallisten proteaasien avulla, UV- ja ultraäänikäsittelyillä, mekaanisella jauhamisella ja näiden eri yhdistelmillä. Umamia pyrittiin korostamaan entsyymaattisilla käsittelyillä käyttäen kaupallisia proteaaseja. Rakennetta analysoitiin partikkelikokoanalyyseillä laserdiffraktiometrillä ja umamia vapaiden aminohappojen määrittelyllä erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla fluoresenssidetektorilla (UHPLC-FLD). Tämän lisäksi osalle näytteistä tehtiin rakenteen ja maun aistinvaraiset arvioinnit koulutetulla raadilla.

Planeettakuulamylyllä jauhaaminen paransi partikkelikokoanalyyysien ja aistinvaraisten arviointien tulosten perusteella suutuntumaa merkittävästi, ja oli kaikista menetelmistä toimivin. Umamin korostamisessa tehokkaimpia olivat reaktioajoiltaan pisimmät hydrolyysit Protamexilla sekä Protamexin ja Flavourzymen yhdistelmällä.

Sekä planeettakuulamylyn että hydrolysoivien entsyymien käyttö on mahdollista teollisessa mittakaavassa, mutta menetelmien optimointi on tarpeen erityisesti skaalauksen osalta ja erityisesti planeettakuulamylyn käyttöparametrit ja toimivuus vaativat lisätutkimusta.

Avainsanat: aistinvarainen arviointi, aminohappoanalyysi, entsyymaattinen hydrolyysi, isolaatti, partikkelikoko, perunaproteiini, rakeisuus, ultraäänikäsittely, umami, ultraviolettikäsittely



• • • •

(x<sup>+</sup>)

• • •

TEK

*Me tekniikan takana*

~~~~~

+



# Työelämän pyörteissä mukana

## Kasvipohjaisten proteiinirikkaiden tuotteiden vaikutukset ihmisen suolistomikrobiomiin: *In Vitro* -analyysi

Aino Jylhä

Ohjaajat: Prof. Kati Hanhineva, Dos. Matti Ruuskanen

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

Tämänhetkisen ruokajärjestelmän tulee muuttua vastaamaan nykypäivän ja tulevaisuuden tarpeita. Kasvipohjaiset tuotteet tarjoavat kestävämmän ratkaisun ympäristölle ja ihmisille. Vaikka kasvipohjaiset proteiinirikkaat tuotteet ovat kasvattaneet suosiotaan kuluttajien keskuudessa, vaaditaan enemmän tietoa niiden ravitsemuksellisesta laadusta sekä vaikutuksista ihmisen suoliston toimintaan. Prosessoinnilla voidaan vaikuttaa kasvipohjaisten tuotteiden ravintoarvoihin, sulamiseen suolistossa ja aistittaviin ominaisuuksiin. Prosessointi kasvipohjaisten tuotteiden välillä vaihtelee suuresti. Tutkimustavoitteena oli ymmärtää, kuinka prosessointi ja raaka-aine kasviproteiinituotteissa vaikuttaa suolistomikrobistoon.

Tutkimuksessa mallinnettiin kasvipohjaisten tuotteiden fermentaatiota paksusuolella *in vitro* suolistomallilla. Näytteinä käytettiin kymmentä kasvipohjaista proteiinirikasta tuotetta, jotka esiintyvät pohjoismaisessa ruokavaliossa. Tuotteet jaoteltiin raaka-aineen ja prosessoinnin perusteella eri ryhmiin. Fermentaation aikana bioreaktorista kerättiin näytteet 0 h, 6 h ja 24 h kohdalla NGS-sekvensointia (eng. *next generation sequencing*) varten. Metagenomiikka-analyysissä sekvenssien taksonominen tulkinta suoritettiin Metaphlan4-ohjelmistolla ja tilastolliset analyysit tehtiin R:llä hyödyntäen miapaketia. Yhteyksiä metaboliittien ja taksojen välillä kartoitettiin biklusteroinnilla.

Alfadiiversiteetti väheni fermentaation aikana 0 h – ja 24 h -näytteiden välillä. Kaikissa näytteissä fermentaation kesto ja raaka-aine olivat suurimmat mikrobiyhteisön taksonomiseen koostumukseen vaikuttavat tekijät. Prosessoinnin vaikutukset näkyivät ainoastaan tarkastellessa näytteitä raaka-ainekohtaisesti. Prosessointiasteeseen yhdistettävät muutokset olivat tilastollisesti merkittäviä prosessoimattoman ja prosessoitujen kauratuotteiden sekä edamamepapujen ja tofun välillä. Härkäpapu- ja hernetuotteiden kohdalla prosessoinnin vaikutukset mikrobiston koostumukseen eivät olleet tilastollisesti merkittäviä.

Raaka-aine ja fermentaation kesto olivat selkeimmät suolistomikrobiston muutoksia ohjaavat tekijät. Prosessoinnin vaikutukset olivat merkittäviä tuotekohtaisesti, minkä takia yleistysten tekeminen prosessoinnista on haastavaa.

Asiasanat: kasvipohjaiset proteiinirikkaat tuotteet, metagenomiikka, prosessoidut elintarvikkeet, suolistomikrobiomi

## **Entsyymikäsittelyn vaikutukset kaura- ja ruisjuomien ominaisuuksiin**

**Ella Virtanen**

Ohjaajat: DI Nuwandi Jayasenthu Kankanamge Dos. Oskar Laaksonen, Dos.  
Niina Kelanne

ELINTARVIKEKEHITYS (DI)

Kasvipohjaisten juomien kysyntä on jatkuvassa kasvussa terveydellisistä ja ekologisista syistä. Erityisesti kaurasta valmistetut viljajuomat ovat jo vakiinnuttaneet asemansa, mutta ruispohjaisia juomia ei ole markkinoilla. Viljajuomien prosessointi maitomaisiksi ja kuluttajaa miellyttävät aistinvaraiset ominaisuudet vaativat usein rakenteen ja koostumuksen muokkaamista entsyymien avulla. Tässä diplomityössä tutkittiin erilaisten entsyymikäsittelyjen vaikutusta kaura- ja ruisjuomien sokerikoostumukseen. Tavoitteena oli löytää optimaalisia entsyymikäsittelyjä ja niiden yhdistelmiä, jotka tuottaisivat mahdollisimman sopivia tuotteita maitohappofermentointia varten.

Tutkimuksessa valmistettiin kaura- ja ruisjuomanäytteitä eri viljapitoisuuksilla, ja niitä käsiteltiin useilla kaupallisilla entsyymeillä. Käsittelyissä käytettiin eri entsyymiyhdistelmiä sekä -annostuksia. Käytettyihin entsyymeihin lukeutuivat muun muassa  $\alpha$ -amylaasi, glukoamylaasi,  $\beta$ -amylaasi,  $\beta$ -glukanaasi, sellulaasi ja proteaasi. Näytteistä tutkittiin muutoksia fruktoosin, glukoosin, sakkaroosin, maltoosin ja maltotriooosin pitoisuuksissa. Näytteet analysoitiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (high-performance liquid chromatography, HPLC) ja haihduttavalla valonsirontadetektorilla (evaporative light scattering detector, ELSD).

Tulokset osoittivat, että kaupallinen  $\beta$ -amylaasia sisältävä entsyymivalmiste tuotti selkeästi suurimmat maltoosipitoisuudet sekä kaura- että ruisjuomissa. Sen sijaan  $\alpha$ - ja glukoamylaasilla sekä sellulaasilla käsiteltyihin näytteisiin syntyi enemmän glukoosia. Kokonaisuudessaan ruisjuomanäytteissä havaittiin korkeampia sokeripitoisuuksia kaurajuomiin verrattuna. Tutkimus osoittaa, että oikeanlaisella entsyymien valinnalla ja yhdistelemällä voidaan kohdennetusti muokata viljajuomien sokeriprofiilia halutunlaiseksi tulevaisuuden elintarvikekehityksessä.

Asiasanat: Kaurajuoma, ruisjuoma, entsyymikäsittely, HPLC, ELSD, nestekromatografia, sokerikoostumus



## ENHANCE YOUR RESEARCH

with Triolab as a partner

- A comprehensive selection of innovative solutions from several different manufacturers
- Professional product support and own technical support organization

*Contact us and let's discuss about possibilities of enhancing your research!*



**Laura Aulu**  
Product Specialist  
laura.aulu@triolab.fi  
+358 50 476 7950



**Katri Suutari**  
Product Specialist  
katri.suutari@triolab.fi  
+358 50 536 5420



**Antti Mattila**  
Sales Manager  
antti.mattila@triolab.fi  
+358 44 493 7532

## **Functional Characterization of extra Disulfide-Stabilized VHH variants for Phage Display Libraries Construction**

**Phong Doan**

Supervisors: M.Sc. Adeesha Herath & Prof. Urpo Lamminmäki

MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

The Variable Heavy domain of Heavy chain (VHH) is a single-domain antibody fragment derived from camelids heavy-chain-only antibodies. The absence of a light chain has led to evolutionary structural adaptations in VHHs, resulting in several unique characteristics. The antigen-binding site, paratope, is formed exclusively by three complementarity-determining regions (CDRs) unlike with conventional antibody that is made from two. Its unique paratope allows it to access difficult epitopes that conventional antibodies cannot. Furthermore, VHHs show enhanced solubility, high conformational stability, improved tissue penetration, and reduced immunogenicity. However, despite their intrinsic stability, many VHHs do not possess the biophysical stability required for therapeutic or research applications. One reason stems from the lack of light chain, which normally forms a hydrophobic interface with the heavy-chain variable domain. In VHHs, this interface can leave hydrophobic residues exposed, potentially promoting aggregation or reducing stability under certain conditions. VHH provides new frontier in the field of antibody research and development.

In this study, eight VHHs frameworks that have been structural analysed to contain additional disulfide bridges in between CDR3 and framework region 2 or CDR1, are evaluated in terms of expression and stability. Synthesises VHHs fragments transformed into *E. coli*. VHHs are then produced and purified using His-tag purification with Ni-NTA- and Size-exclusion chromatography. Stability is analysed using NanoTemper: Prometheus Panta. Additionally, different codon optimization strategies are compared to determine whether they significantly influence transformation efficiency and protein production.

Two out of eight VHHs frameworks have shown good stability. VHH 6raf possessed highest melting temperature of 84.44 °C and showing almost no aggregation during unfolding. Another promising framework, VHH 7qbg, while having an average melting temperature for VHHs of 75.27 °C but displaying high stability and minimal aggregation. The remaining VHHs exhibited lower stability. In the future, most promising candidates will be selected as templates for construction of a VHH phage library with selected residues in CDR regions are randomized.

**Keywords:** VHH, antibody engineering, stability, disulfide bonds library construction, phage display

## **Establishment of Stable Recombinant Protein Expression in CHO Cells Using a PiggyBac Transposon Platform**

**Faiqa Fatima**

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

### **MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS**

The generation of high-producing cell lines is extremely desirable for producing recombinant antibodies. This study aimed to optimize the expression and screening processes for high-producing cell lines to enable rapid identification.

Chinese hamster ovary (CHO) cells exhibit various characteristics that make them promising candidates for producing recombinant proteins. The process of developing high-yield stable cell lines includes transfection, selection, adaptation, and screening. This is a very laborious and time-consuming method, so different approaches should be optimized to facilitate the process. Different transfection reagents, presence and absence of hyperactive piggyBac transposase, and construct designs were assessed for their effects on the protein yield and expression efficiency of the cell line. Flow cytometry was used to analyze the cell population and compare the screening process with and without Spy-linked technology.

With ExpiFectamine CHO, the yield was nearly three times more for 11N11 antibody and was nearly 11 times more for 9E10 as compared to Expi FectoPro reagent with Expi Fectamine 293 far behind. The hyperactive PiggyBac transposase increased the yield by approximately 3 times in the construct without the internal ribosome entry site (IRES) and Blastocidin resistance gene (BlsR). Whereas in the case of the construct with IRES BlsR the yield dropped by its addition. After the antibiotic selection, the viability of the construct with transposases first declined and then rose as compared to the construct without transposases. Flow cytometry analyses predicted that Spy-linked technology could be a promising candidate for adaptor-based screening of high-producing for transient and stable integrated cell lines.

**Keywords:** Antibiotic selection, Blastocidin resistance gene (BlsR), Cell line development, CHO cells, Expi Fectamine CHO, Flow cytometry, Hyperactive piggyBac transposase, Internal ribosome entry site (IRES), PiggyBac transposon system, Spy-linked technology



**Yhdessä kohti tarkempaa,  
nopeampaa ja älykkäämpää  
diagostiikkaa**

Harjoittelu- ja opinnäytepaikkaa voi  
tiedustella nettsivujemme kautta

unio<sup>gen</sup>

**AB**  **ENZYMES**  
an ABF Ingredients Company

## **Biomarker Discovery with Oxford Nanopore Sequencing and Phage Display**

**Pinja Ylikangas**

Supervisors: Janne Leivo (Ph.D, Doc.)

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

Phage display is commonly used in vitro selection technique in diagnostic applications, as it can be used for selecting antibodies with desired properties. A gene of interest is fused with a phages' coat protein to display the antibody on the surface of a phage. When constructing components of a diagnostic test, phage display is often utilized to improve the specificity and binding properties of antibodies. Phages with most desirable binding properties are manually picked for further evaluation. However, manual approach often misses valuable, rare binders as only individual colonies from a large library can be picked. In this study, deep sequencing technology was employed to sequence the phage display selection rounds for more extensive analysis of antibody sequences.

The aim of this study was to combine phage display with Oxford Nanopore deep sequencing technology to find antibody sequences specific to pancreatic cancer tumors secretome. It was hypothesized that Oxford Nanopore technology could offer new approach to biomarker discovery to identify rare antibodies specific to a novel biomarker. By utilizing Oxford Nanopore technology in phage display, traditional single-colony screening could be replaced with deep sequencing. Traditional screening does not give comprehensive information about library composition or sequence motifs. Instead, deep sequencing enables fast quantification of all antibody sequences in the entire selection round, allowing analysis of the diversity and enrichment tracking between selection rounds.

Phage display selection rounds were done utilizing pancreatic cancer cell lines and pre-diagnostic patient samples. Patient samples (n=40) were pooled into three different time points based on the time of collection: 0-6 months, 6-12 months, and +12 months before pancreatic cancer diagnosis. Samples of patients with benign tumors were used as a negative control.

After bioinformatic processing of the Oxford Nanopore deep sequencing data, nearly 300 unique antibodies that occur more than once were identified and found to be present in all patient samples despite the progression of disease. A total of 49 antibody sequences were identified, which were enriched closer to the time of diagnosis.

**Keywords:** phage display, biomarker discovery, pancreatic cancer, Oxford Nanopore, deep sequencing

## **Implementation of a novel mammalian cell display platform to enable the production of ultra-stable and biophysically favourable antibodies**

**Sonja Orkola**

Supervisors: MSc Susanna Lammi, Ph.D. Eeva-Christine Brockmann, Prof. Urpo Lamminmäki

### MOLECULAR BIOTECHNOLOGY AND DIAGNOSTICS

The stability of antibody fragments, single-chain fragment variables, can be improved by the addition of an interdomain disulphide bridge. These disulphide-stabilised antibody fragments (ds-scFv) are more stable than their parental versions, which makes them suitable candidates for therapeutics. They can also be utilised in bi- or multivalent antibody constructs. Previous work in the department has provided a novel position for the disulphide bridge, at position H100B-L44 between the CDRH3 and CDRL1 for a trastuzumab-based antibody fragment.

Mammalian cell display can be used in the enrichment and selection of antibody libraries. It is especially suited for the selection of ds-scFv-based libraries due to the eukaryotic cell's ability to efficiently form disulphide bonds and eliminate the aggregation tendency of antibody fragments. However, the removal of a natural intradomain disulphide bond allows ds-scFvs to be expressed and characterised also with phage display.

In this study, five point-mutated ds-scFv variants with the novel disulphide bridge position are produced and their performance is compared to their parental ds-scFv. The point mutations are introduced by PCR cloning to positions L36 or L46, where the amino acid side chains come in close contact with the intradomain disulphide bridge. The five variants are first tested for their display level and antigen binding capabilities using phage display. Based on these results, selected variants will then be produced with a mammalian cell line and evaluated, before a pooled library is created with error-prone PCR with the mutant variants and parental ds-scFv as templates. This library will then be displayed with a novel mammalian cell display platform and sorted using fluorescence-activated cell sorting.

Preliminary results with phage display immunoassays suggest that all five variants have sufficient antigen-binding level, and the mutated residues do not significantly lower display level, when compared with the parental ds-scFv. All five variants will therefore be used in further experiments as described.

**Keywords:** antibody, antibody engineering, ds-scFv, FACS, mammalian cell display, phage display, scFv, trastuzumab

## **Estradioli-immunokompleksivasta-aineiden affiniteettimaturaatio uuden sukupolven sekvensointimenetelmää hyödyntäen**

**Evelina Ojaniittu**

Ohjaaja: PhD Eeva-Christine Brockmann

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Estradioli on estrogeeneihin kuuluva steroidihormoni, jonka tehtävänä on edistää biologisten naisten sekundääristen sukupuoliominaisuuksien kehittymistä, sekä osallistua kuukautiskierron säätelyyn. Lisäksi estradioli on yhteydessä useisiin sairauksiin ja sen roolia eri kliinisissä tiloissa on tarve tutkia edelleen. Nykyiset käytettävät menetelmät, kilpailevat immunomääritykset ja massaspektrometria, eivät pysty vastaamaan kaikkiin estradiolin määritysvaatimuksiin. Erityisesti estradiolin pienten pitoisuuksien määrittäminen on hankalaa. Nykyisten menetelmien haasteisiin vastauksena on aiemmin kehitetty ei-kilpaileva immunomääritys, joka perustuu estradiolin ja sen sitojavasta-aineen muodostamaan immunokompleksin tunnistavaan immunokompleksi-vasta-aineeseen.

Tämän diplomityön yhtenä tavoitteena oli parantaa estradioli-immunokompleksi-vasta-aineen affiniteettia, mikä mahdollistaisi aiempaa herkemmän estradiolimäärityksen. Affiniteettimaturaatioprosessi toteutettiin rikastamalla satunnaismutaatioita sisältävä vasta-ainekirjasto faaginäyttötekniikalla eri estradiolipitoisuuksia käyttäen ja seulomalla valikoituneita variantteja parhaiden sitojien löytämiseksi. Perinteinen kokeellinen seulonta on kuitenkin työlästä ja satunnaisuuteen perustuvaa, joten työn toisena tavoitteena oli kehittää uuden sukupolven sekvensointimenetelmä Oxford Nanopore -sekvensointiin nojaava uudenlainen seulontamenetelmä. Uusi seulontamenetelmä tehtiin kokeellisen menetelmän rinnalla, jotta voitiin tutkia uuden menetelmän toimivuutta. Uudessa seulontamenetelmässä sekvensoitiin faaginäyttötekniikan selektiokierroksesta saadut näytteet, ja eri varianttien rikastumista tutkimalla valittiin parhailta vaikuttavat variantit kokeelliseen analyysiin.

Työssä löydettiin usea aikaisemman määrityksen suorituskykyä parantava estradioli-immunokompleksi-vasta-ainevariantti. Parhaan variantin EC50-arvo oli 284 pM, kun aikaisemman määrityksen EC50-arvo oli 326 pM. Affiniteetiltaan parhaimmat variantit löydettiin uudella seulontamenetelmällä, joten sen kehittäminen todettiin onnistuneeksi. Uusi menetelmä avaa mahdollisuuden toteuttaa seulonta aiempaa kattavammin ja löytää harvinaisiakin sitojia.

Asiasanat: affiniteettimaturaatio, estradioli, faaginäyttötekniikka, immunokompleksivasta-aine, uuden sukupolven sekvensointi

## **Anti-immunokompleksisten Fab-fragmenttien kehittäminen estradiolin ei-kilpailevaa määrittystä varten**

**Tiia Tiusanen**

Ohjaajat: FM Ida Bäckström, FM Irene Callus

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Naishormonin eli estradiolin mittaukset ovat keskeisiä naisten terveydenhuollossa, sillä ne vaikuttavat kuukautiskierron säätelyyn ja ovat tärkeitä hedelmällisyystudkimuksissa. Kaikki nykyisin käytössä olevat hormonien immunomääritykset perustuvat kilpailevaan määrittysperiaatteeseen. Ne ovat herkkyydeltään rajallisia ja alttiita ristireaktioille. Massaspektrometriaan perustuvat menetelmät puolestaan ovat kalliita ja monimutkaisia eivätkä sovellu rutiininomaiseen tai suurten näytemäärien analysointiin. Estradiolin luotettava mittaaminen edellyttää uusia analyysimenetelmiä.

Optimaalinen vaihtoehto hormonien mittaamiseen olisi ei-kilpaileva immunomääritys, jossa immunomäärityksen spesifisyyttä lisäisi kahden tunnistuskohdan hyödyntäminen. Ei-kilpailevan immunomäärityksen etuna on myös signaalin mittaustapa, jossa signaalin voimakkuus kasvaa hormonipitoisuuden noustessa. Tämä mahdollistaa hyvin pienten pitoisuuksien mittaamisen, mikä on kliinisissä hormonimäärityksissä välttämätöntä. Estradiolin ei-kilpailevan immunomäärityksen kehittäminen edellyttää uusia vasta-aineita.

Tässä tutkimuksessa tavoitteena on kehittää anti-immunokompleksinen Fab-fragmentti, joka tunnistaa estradiolin ja sitä sitovan vasta-aineen muodostaman immunokompleksin. Kehitettävä Fab-fragmentti sitoutuu spesifisesti tähän kompleksiin eikä erikseen sen komponentteihin. Hormoneilla on pienen kokonsa vuoksi vain yksi tunnistuskohta, minkä vuoksi niille ei voida kehittää perinteistä ei-kilpailevaa immunomääritystä. Anti-immunokompleksiset vasta-aineet tarjoavat ratkaisun tähän ongelmaan mahdollistamalla ei-kilpailevan määrittysperiaatteen myös pienimolekyylisille hormoneille. Fab-fragmenttien valinta toteutetaan faaginäyttökniikalla, joka mahdollistaa spesifisten fragmenttien eristämisen laajasta kirjastosta. Tutkimuksen odotetaan tuottavan spesifisiä anti-immunokompleksisia Fab-fragmentteja, joita voidaan hyödyntää estradiolimääritysten kehittämisessä.

Avainsanat: ei-kilpaileva immunomääritys, estradioli, Fab-fragmentti, immunokompleksi, steroidihormoni

**Vasta-aineiden spesifinen kohdentaminen *Borrelia burgdorferi* -bakteerin pintaproteiini C:hen (OspC) ja sen konservoituneeseen C-terminaaliseen päähän Lymen taudin diagnostiikan tehostamiseksi**

**Mira Hyytiäinen**

Ohjaajat: FM Oskar Haavisto, FT Kirsti Raiko

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Punkkien levittämä borrelioosi eli Lymen tauti on yleisin vektorivälitteinen sairaus pohjoisen pallonpuoliskon alueilla. Borrelioosi-infektiota aiheuttaa ryhmä bakteereja, joita kutsutaan yhteisnimityksellä *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Taudin odotetaan yleistyvän tulevaisuudessa ilmastonmuutoksen seurauksena. Pitkälle edennyt infektio voi aiheuttaa vakavia neurologisia oireita. Taudin aikainen diagnosointi ja antibiootihoidon nopea aloittaminen on siten ensiarvoisen tärkeää. Perinteisesti borreliosin diagnosointiin käytetään serologisia testejä, jotka havaitsevat elimistön infektiota vastaan kehittämiä vasta-aineita. Nämä testit eivät kuitenkaan pysty havaitsemaan tautia varhaisessa vaiheessa, eivätkä kykene erottamaan aktiivista infektiota aiemmasta infektiosta.

Tutkimuksen tavoitteena on kohdentaa vasta-ainesitoja bakteerin pintarakenteisiin antigeenipohjaista havaitsemista varten potilaan vasta-aineiden havaitsemisen sijaan. Tavoitteena on ratkaista serologisten testien rajoitteita. Sitojakehitys kohdennetaan *Borrelia*-bakteerin ulkoiseen pintaproteiini C:hen (OspC). OspC on mielenkiintoinen kohde sitojakehitykselle, koska sen on havaittu olevan immunoreaktiivinen ja sitä ilmentyy infektion alkuvaiheessa.

Tutkimuksessa vasta-ainesitoja kohdennettiin OspC:hen faaginäyttötekniikan avulla. Neljän rikastamiskierroksen jälkeen 567 yksittäistä kloonia eristettiin ja seulottiin immunomäärityksillä. Näistä klooneista 110 reagoi spesifisesti, joista 38 valittiin sekvensoitavaksi. Vasta-aineiden sekvensoinnilla tunnistettiin 14 uniikkia kloonia, joita vertailtiin annos-vastakokeella. Parhaat 6 kloonia puhdistettiin affiniteetti- ja kokoerottelukromatografian avulla jatkotutkimuksia varten.

Asiasanat: Lymen tauti, borrelioosi, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, OspC, vasta-ainekehitys, faaginäyttötekniikka, diagnostiikka



## OSALLISTUJAKSI LÄÄKETUTKIMUKSEEN?

Kliininen tutkimus on keskeinen osa lääkekehitystä.

Tutkimushenkilönä pääset ainutlaatuisella tavalla tutustumaan lääkekehityksen kliiniseen vaiheeseen ja siihen, miten turvallisuutta, tehoa ja annostusta arvioidaan käytännössä.

Saat lisäksi tietoa omasta terveydestäsi ja tutkimuksen keston ja toimenpiteiden mukaisen korvauksen.



Lue lisää:



**CRST**  
Part of LINK MEDICAL

Joukahaisenkatu 2b D, Turku  
Energiakatu 4, Helsinki  
[www.osallistulaaketutkimukseen.fi](http://www.osallistulaaketutkimukseen.fi)

## Keratiini 7 eristäminen ja sen sitojien validointi

Sanni Uusitupa

Ohjaajat: Dos. Tuomas Huovinen, Dos. Lauri Polari

### BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Keratiinit ovat hydrofobisia proteiineja, jotka muodostavat välikokoisia säikeitä ja toimivat epiteelisolujen tukirakenteina. Keratiini 7 on mahdollinen merkkiaine tulehdukselliselle suolistosairaudelle ja sen toteamiseksi ollaan kehittämässä kliinistä testiä. Keratiini 7 detektiovasta-aineiden spesifisyyttä ei ole paljon tutkittu. Ihmisellä on 54 erilaista keratiinia ja niiden rakenteet ovat samankaltaisia, joten ristireaktiivisuutta saattaa esiintyä. Työn tavoitteina oli kehittää tuotto- ja puhdistusprotokollaa keratiinien tuottoon *E. colissa* sekä tutkia ovatko keratiini 7 tunnistavat vasta-aineet ristireaktiivisia muiden keratiinien kanssa.

Työssä tuotettiin *E. colissa* kahdeksaa keratiinia, jotka olivat keratiini 5, keratiini 6B, keratiini 7, keratiini 8, keratiini 17, keratiini 18, keratiini 19 ja keratiini 20. Näihin kaikkiin oli lisätty kuuden histidiinin sekvenssi eli His-tag. Keratiinien puhdistuksessa käytettiin affiniteetti- ja kokoerottelukromatografiaa. Puskureissa oli korkea ureapitoisuus keratiinien liukoisuuden parantamiseksi. Keratiini 7 sitojien ristireaktiivisuutta tutkittiin tekemällä Western blot -määityksiä keratiineja tuottaneiden solujen solumassasta ja puhdistetuista keratiineista. Ristireaktiivisuusprofiili tutkittiin viidestä kaupallisesta ja kahdesta Turun yliopistossa kehitetystä vasta-aineesta, sekä kahdesta Turun yliopistossa kehitetystä vasta-aineelle vaihtoehtoisesta sitojaproteiinista, joita kutsutaan ankyriinistoitoproteiineiksi tai darpiineiksi.

Kaikkia kahdeksaa keratiinia saatiin tuotettua ja puhdistettua samalla protokollalla, mutta niiden tuottotasot vaihtelivat. Varsinkin keratiinien 5 ja 7 saannot olivat alhaisempia kuin muiden. Ristireaktiivisuustutkimuksessa havaittiin, että useat keratiini 7:n sitojat tunnistavat myös joitain muita keratiineja. Varsinkin keratiinit 5, 6B ja 19 ristireagoivat useiden sitojien kanssa ja jotkin sitojat tunnistivat kaikkia kahdeksaa keratiinia.

Keratiinien tuotto- ja puhdistusprotokollaa voisi vielä parantaa saannon kasvattamiseksi. Puskuriliuoksen koostumusta optimoimalla tuotettuja keratiineja on mahdollista käyttää immunologisissa tutkimuksissa. Tämän työn tulokset auttavat kehittämään keratiinien diagnostiikkaa ja samalla tukevat näitä sitojia hyödyntävää perustutkimusta.

Avainsanat: keratiini, tulehduksellinen suolistosairaus, Western blot, ristireaktiivisuus

## **Prosessiparametrien muutoksen karakterisointi streptavidiini- kuoppalevytuotannossa**

**Niilo Hilke**

Ohjaaja: Laura Nurmi FM

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Streptavidiinin ja biotiinin välinen voimakas sitoutuminen on immunomäärityksissä laajalti hyödynnetty ja tutkittu ilmiö. Streptavidiinilla pinnoitettuun kiintokantajaan voidaan sitoa käyttötarkoituksen mukaan biotinyloitu vasta-aine tai jokin muu biotinyloitu partikkeli. Yleisin käytetty kiintokantaja immunomäärityksissä on polystyreenistä valmistettu 96-kuoppainen mikrotiitterilevy.

Revivity valmistaa ja markkinoi streptavidiini-kuoppalevyjä tutkimukseen ja terveydenhuollon käyttöön. Tuotanto voisi kuitenkin olla sujuvampaa ja kustannustehokkaampaa. Työn tavoitteena on tehostaa levytuotantoa kasvattamalla valmistettavaa eräkokoja. Lisäksi tuotannonsuunnittelusta tehdään joustavampaa pidentämällä sallittuja inkubointiaikoja.

Levyjen tulee olla tasalaatuisia ja täyttää niille määritellyt hyväksymiskriteerit, jotta niiden haluttu toiminta asiakkaalla voidaan taata. Eräkoon kasvatuksessa kriittisin muuttuja oli pinnoitukseen käytetyn streptavidiiniliuoksen säilyvyys läpi pidennetyin prosessin. Karakterisointi tehtiin simuloimalla suuremman eräkoon valmistusta valituilla aikapisteillä. Inkubointiaikojen pidennys testattiin myös aikapisteillä, ja lisäksi otettiin huomioon muuttuneiden parametrien yhteisvaikutus. Aikapisteet valittiin yrityksen aikaisempien tutkimusten ja toiveiden mukaan.

Valmiit kuoppalevyt analysoitiin noudattamalla yrityksen vakiintuneita laadunvalvontakäytäntöjä. Levyistä mitattiin homogeenisuus suorittamalla niillä Delfia-määritys, jonka jälkeen signaaleja vertailtiin aikaisempien tuotantoerien tuloksiin.

Asiasanat: erätuotanto, Delfia, homogeenisuus, mikrotiitterilevy, stabiilisuus, streptavidiini

## Käänteisviritteisten nanopartikkelien pinnoitusmenetelmän optimointi ja validointi eri immunomäärityksissä

Juulia Jokinen

Ohjaajat: FT Kirsti Raiko ja FM Tuulia Tuominen

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Käänteisviritteiset nanopartikkelit (UCNP) ovat leimamolekyylejä, jotka tuottavat viritysvaioa korkeaenergisempää valoa mahdollistaen erittäin herkkien immunomääritysten kehittämissen. Hydrofobisuus rajoittaa UCNP:iden käyttöä, ja ne voidaankin pinnoittaa hydrofiilisillä ligandeilla, kuten poly(akryylihapolla)(PAA), mutta pinnoitusprosessin on havaittu vaikuttavan merkittävästi UCNP:iden käyttäytymiseen immunomäärityksissä. Työn tavoitteena on validoida uusi UCNP:iden yksivaiheinen PAA-pinnoitusmenetelmä hyödynnettäväksi eri immunomäärityksissä sekä optimoida jo käytössä olevaa pinnoitusmenetelmää.

UCNP:t pinnoitettiin PAA:illa yksivaiheisella sekä kaksivaiheisella ligandinvaihdolla, ja konjugoitiin vasta-aineella karbodi-imidi-reaktiolla käyttäen 2,5; 5; 10 ja 20 mM EDC-pitoisuuksia. Dynaamisella valonsironnalla (DLS) arvioitiin UCNP:iden hydrodyaamista kokoa ja aggregoitumista ennen ja jälkeen konjugoinnin. Pinnoitusmenetelmien vaikutusta tutkittiin sydänperäisen troponiini T:n (cTnT) heterogeenisessä sandwich-immunomäärityksessä plasmanäytteillä.

Yksivaiheisen ja kaksivaiheisen ligandinvaihdon jälkeen UCNP:t olivat kooltaan  $45,4 \pm 0,3$  nm ja  $42,7 \pm 0,2$  nm, ja aggregoituminen oli vähäistä polydispersiteetti-indeksin ollessa  $0,22 \pm 0,01$  ja  $0,08 \pm 0,01$ . Konjugaation jälkeen koot ja polydispersiteetti-indeksit kasvoivat. Analyyttinen herkkyys laski konjugaation EDC-pitoisuuden kasvaessa, ja oli yksivaiheisella menetelmällä pinnoitetuilla UCNP:eillä 0,03–0,38 ng/L cTnT:tä, ja kaksivaiheisella 0,08–0,18 ng/L cTnT:tä. Immunomäärityksessä signaalivaste oli lineaarinen ja plasmanäytteiden saanto noin 70 % molemmilla pinnoitusmenetelmillä.

Tulosten perusteella yksivaiheisella ligandinvaihdolla pinnoitetut UCNP:t soveltuvat tutkittuun määrittämiseen, mutta pinnoituksen toistettavuuden arviointi vaatii lisätutkimusta. Lisäksi validointia tullaan jatkamaan vielä muilla analyyteillä. Tulevaisuudessa menetelmän optimoinnilla voidaan pyrkiä parantamaan yksivaiheisen pinnoituksen toistettavuutta ja yksinkertaistaa kaksivaiheista pinnoitusmenetelmää.

Avainsanat: dynaaminen valonsironta, immunomääritys, luminesenssi, käänteisviritys, nanopartikkeli, pintakemia

## **API:n spektrofotometrisen pitoisuusmäärityksen kehitys ja validointi**

**Nuutti Pietarinen**

Ohjaaja: Ft. Heidi Hyytiä

BIOTEKNISET JÄRJESTELMÄT (DI)

Lääkeaineen vaikuttavan aineen (API) pitoisuuden luotettava määrittäminen on keskeinen osa lääkekehitystä, laadunvarmistusta ja viranomaisarviointia, sillä pitoisuudella on suora vaikutus potilasturvallisuuteen ja valmisteen tehoon. Opes Corporationin kehittämä uusi, suun limakalvoille annosteltava paperipohjainen kiintokantaja edellyttää analyttistä menetelmää, jonka avulla API voidaan määrittää täsmällisesti ja toistettavasti haastavasta näytematriisista. Tämän työn tavoitteena on kehittää UV/VIS-spektrofotometriaan perustuva menetelmä API:n pitoisuuden määrittämiseksi ja validoida se myöhemmin ICH Q2(R2) -ohjeen mukaisesti.

Työssä on tähän mennessä määritetty tutkittavan yhdisteen absorptiomaksimi mittaamalla puhdasta API:a eri pitoisuuksissa 190–400 nm alueella 10 mM fosfaattipuskurissa (pH 7,5). Lisäksi on arvioitu matriisivaikutuksia uuttamalla paperipohjaista kiintokantajaa ilman API:a erilaisissa uutto-olosuhteissa (sonikointi- ja ravistusajat). Uutteista valmistettiin 1:10 laimennokset ja ne suodatettiin 0,22 µm ruiskusuodattimen läpi ennen analysointia. Mittaukset suoritettiin UV/VIS-spektrofotometrillä käyttäen määritettyä absorptiomaksimia (260 nm). Tämän jälkeen on optimoitu uutto-olosuhteita uuttamalla tunnetun pitoisuuden API-tuotteita 10 mM fosfaattipuskuriin useissa erilaisissa uutto-olosuhteissa. Uutteet on laimennettu, suodatettu ja analysoitu 260 nm aallonpituudella, ja näytteiden pitoisuudet on määritetty viidestä pitoisuustasosta muodostetun standardisuoran avulla Beer–Lambertin lain mukaisesti.

Seuraavaksi työssä arvioidaan kehitetyn menetelmän suorituskyky määrittämällä sen lineaarisuus, oikeellisuus, toistettavuus, spesifisyys, herkkyys sekä määrittämis- ja kvantitointirajat. Lopuksi menetelmä validoidaan ICH-vaatimusten mukaisesti, jotta se voidaan ottaa käyttöön tuotteen prosessikontrollissa.

**Asiasanat:** absorptiomaksimi, kalibraatio, matriisivaikutus, pitoisuusmäärittäminen, spektrofotometria, uutto-olosuhteet, UV/VIS-spektroskopia



**UNIVERSITY  
OF TURKU**

**Mukana Nuoria Tutkijoita tukemassa  
In support of Young Scientists**

**AB Enzymes Oy**

**Apetit Oyj**

**Aromtech Oy**

**Atria Suomi Oy**

**Biokasvu Oy**

**Brinter AM Technologies Oy**

**Care4Living Oy**

**Co-Test Finland Oy**

**CRST Oy**

**Eckes-Granini Finland Oy Ab**

**Fysioline Oy**

**Hartwall Oy Ab**

**Hytest Oy**

**Jalostaja Oy**

**Leipomo Salonen Oy**

**Loimu ry**

**Nuppulinnan laboratoriopalvelu Oy**

**Opes Corporation Oy**

**Rewity, Wallac Oy**

**Suomen Solubiologit ry**

**Tekniikan Akateemiset ry (TEK)**

**Tommi Orkola**

**Tornion Panimo Oy**

**Triolab Oy**

**Turku PET Centre**

**Turun tieteen tekijät ry**

**Uniogen**