

Anoktamiini 7:n ja myoferliinin vuorovaikutus PC-3- soluissa

Biologian
pro gradu -tutkielma

Laatija(t):
Tiia Korpi

18.06.2024
Turku

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Biologia

Tekijä(t): Tiia Korpi

Otsikko: Anoktamiini 7:n ja myoferliinin vuorovaikutus PC-3-soluissa

Ohjaaja(t): Johanna Schleutker, Gudrun Wahsltröm, Päivi Onkamo

Sivumäärä: 53 sivua

Päivämäärä: 18.06.2024

Eturauhassyöpä on miesten toiseksi yleisin syöpätyyppi, joka muodostuu eturauhaskudokseen. Eturauhassyövän ennuste riippuu muun muassa siitä, onko syöpä metastoittainen. Syöpätutkimus yrittää löytää jatkuvasti uusia markkereita, joiden avulla olisi mahdollista tunnistaa aggressiiviset syövät jo aikaisessa vaiheessa.

Anoktamiini 7 on eturauhaskudoksessa ilmentyvä transmembraaniproteiini, jonka on huomattu vaikuttavan eturauhassyövän kehittymiseen ja ennusteeseen. Anoktamiini 7 on eturauhassyövän kannalta potentiaalinen markkeriproteiini, mutta sen toiminnasta eturauhassyövässä ei tiedetä tarpeeksi. Yksi anoktamiini 7:n kanssa vuorovaikuttavasti proteiineista on myoferliini, joka osallistuu moniin solun sisäisiin toimintoihin. Anoktamiini 7:n ja myoferliinin on havaittu vuorovaikuttavan keskenään eturauhassyöpäsoluissa, mutta vuorovaikutuksesta ei tiedetä vielä tarkemmin.

Tutkimukseni tarkoituksena on selvittää, tarvitaanko toista anoktamiini 7:n terminaalista päistä myoferliinin sitoutumiseen. Tämä toteutetaan valmistamalla plasmideja, jotka tuottavat PC-3-soluissa erilaisia ANO7-proteiineja. Plasmideista on poistettu joko ANO7:n N-terminaalinen pää, C-terminaalinen pää tai molemmat. Myös normaalia anoktamiini 7 -proteiinia koodaava plasmidi valmistettiin. Koimmunopresipitaation avulla selvitettiin, minkälaisien konstruktien kanssa myoferliini sitoutuu edelleen anoktamiini 7 -proteiiniin.

Tuloksista ei ole mahdollista päätellä yksiselitteisesti, onko toinen anoktamiini 7:n terminaalista päistä olennainen myoferliinin sitoutumiselle. Ensimmäisessä transfektiossa myoferliiniä saatiin koimmunopresipitaation jälkeen anti-ANO7-blottauksessa eniten näkyviin silloin, kun molemmat ANO7-proteiinin terminaaliset päät oli poistettu. Toisessa transfektiossa myoferliini saatiin vedettyä alas vain silloin, kun transfektio oli toteutettu täyspitkän ANO7-proteiinin sisältävällä plasmidilla.

Vaikka tutkielmassa ei pystytty selvittämään myoferliinin mahdollista sitoutumiskohtaa anoktamiini 7 -proteiinista, saatiin viitteitä siitä, että myoferliini sitoutuu anoktamiini 7:ään myös silloin, kun sen kumpikin terminaalinen pää on poistettu. Myoferliinin ja anoktamiini 7:n välistä interaktiota eturauhassyöpäsoluissa tulee tutkia lisää.

Avainsanat: eturauhassyöpä, anoktamiini 7, myoferliini, PC-3-solut, koimmunopresipitaatio

Sisällysluettelo

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Johdanto | 5 |
| 1.1 | Eturauhassyöpä | 5 |
| 1.2 | Eturauhassyövän kehittyminen ja diagnosointi | 5 |
| 1.3 | Metastaattinen eturauhassyöpä | 7 |
| 1.4 | Eturauhassyövän hoito | 7 |
| 1.5 | Eturauhassyövän ennaltaehkäisy | 9 |
| 1.6 | Anoktamiini 7 | 9 |
| 1.7 | Myoferliini | 12 |
| 1.8 | Anoktamiini 7:n ja myoferliinin vuorovaikutus | 13 |
| 1.9 | Tutkielman tavoite ja hypoteesi | 14 |
| 2 | Aineisto ja menetelmät | 15 |
| 2.1 | PC-3-eturauhassyöpäsolujen ylläpito ja kasvattaminen | 15 |
| 2.2 | Testitransfektio | 15 |
| 2.2.1 | PC-3- solujen transfektio | 15 |
| 2.2.2 | Transfektioitujen solujen koimmunopresipitaatio | 17 |
| 2.2.3 | Western Blot | 18 |
| 2.3 | Plasmidikonstruktien suunnittelu | 20 |
| 2.4 | Plasmidikonstruktien PCR-reaktiot | 20 |
| 2.5 | DNA-pätkien eristäminen | 24 |
| 2.6 | Kloonaus | 24 |
| 2.7 | Bakteerien transformaatio ja plasmidien puhdistus | 24 |
| 2.8 | Plasmidien tarkistus kaksoisdigestiolla | 25 |
| 2.9 | Puhdasviljelmien valmistus | 25 |
| 2.10 | Miniprep- ja midiprep-näytteiden valmistus | 26 |
| 2.11 | PC-3-solujen toinen testitransfektio ja Western Blot | 27 |
| 2.12 | PC-3-solujen varsinainen transfektio, koimmunopresipitaatio ja Western Blot | 28 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.13 | Toinen toisto: PC-3-solujen transfektio, koimmunopresipitaatio ja Western Blot | 30 |
| 2.14 | Viimeinen Western Blot | 31 |
| 3 | Tulokset | 32 |
| 3.1 | Alun testitransfektio | 32 |
| 3.2 | ANO7-proteiinin N- ja C-terminaalisten päiden ennustaminen | 33 |
| 3.3 | Plasmidikonstruktien PCR-reaktiot | 34 |
| 3.4 | Plasmidien tarkistaminen kaksoisdigestiolla | 35 |
| 3.5 | Miniprep- ja midiprep-näytteiden kaksoisdigestiot | 36 |
| 3.6 | Toinen testitransfektio | 37 |
| 3.7 | Ensimmäinen transfektio | 38 |
| 3.8 | Toinen transfektio | 40 |
| 3.9 | Western Blot -toisto | 42 |
| 4 | Pohdinta | 44 |
| 5 | Kiitokset | 48 |
| | Lähteet | 49 |

1 Johdanto

Eturauhassyöpä on maailmanlaajuisesti miehillä toiseksi yleisimmin diagnosoitava syöpätyyppi (Vietri ym. 2021). Eturauhassyöpään sairastuu pääasiassa iäkkäitä miehiä, sillä esimerkiksi Suomessa eturauhassyöpään sairastuneiden keski-ikä on noin 70 vuotta. Ylipaino, runsaasti rasvaa sisältävä ruokavalio sekä tupakointi lisäävät riskiä sairastua eturauhassyöpään, ja vain pieni osa (2–5 %) eturauhasen syövästä on perinnöllisiä. Tästä huolimatta miesten perinnöllisistä syövästä eturauhassyöpä on kaikkein yleisin (Vietri ym. 2021). (Duodecim 2023.)

1.1 Eturauhassyöpä

Eturauhasen syöpä on eturauhaskudoksessa muodostuva syöpä. Eturauhanen on miesten sukupuolirauhanen, joka sijaitsee virtsarakon alapuolella. Sen yksi tärkeimmistä tehtävistä on tuottaa siemennestettä, joka ejakulaation aikana edistää siittiöiden liikkumista eturauhasen läpi kulkevan virtsaputken kautta ulos elimistöstä. Vanhemmilla miehillä esiintyy melko yleisesti eturauhasen hyvänlaatuista liikakasvua, jota esiintyy sekä oireettomana että oireellisena. Hyvänlaatuiseen liikakasvuun liittyvät yleisimmät oireet ovat erilaiset virtsaamisen ongelmat. Liikakasvun lisäksi eturauhaseseen voi muodostua kasvain, jolloin puhutaan eturauhassyövästä. (Terveystalo 2023).

Eturauhassyövän ennuste riippuu sen levinneisyydestä elimistössä sekä syöpäsolujen laadusta. Yleisesti eturauhassyövän ennuste on hyvä, sillä viiden vuoden jälkeen eturauhassyöpään sairastuneista jopa noin 94 % on edelleen elossa (Käypähoito 2024). Metastaattinen eturauhassyöpä huonontaa ennustetta, ja se lisää potilaan riskiä kuolla eturauhassyöpään (Wang ym. 2018).

1.2 Eturauhassyövän kehittyminen ja diagnosointi

Eturauhassyövän esiasetta kutsutaan eturauhasen epiteelinsisäiseksi neoplasiaksi (PIN, engl. prostatic intraepithelial neoplasia), joka muodostuu epiteeliin (Shen & Abate-Shen 2010). Epiteelinsisäisestä neoplasiasta muodostuu vähitellen paikallinen adenokarsinooma ja lopulta

edennyt adenokarsinooma, joka pystyy tunkeutumaan paikallisesti sitä ympäröiviin kudoksiin (Wang ym. 2018). Lopulta paikallisesta eturauhassyövästä voi muodostua metastaatinen eturauhassyöpä, jos paikallinen adenokarsinooma lähettää etäpesäkkeitä muualle elimistöön (Shen & Abate-Shen 2010).

Eturauhassyövän alkuvaiheessa syöpä saattaa olla oireeton, mutta edetessään eturauhassyövän aiheuttamat yleisimmät oireet liittyvät virtsaamisen ongelmiin. Näitä voivat olla esimerkiksi virtsaamisen aloittamisen vaikeudet, lisääntynyt virtsaamistarve tai nokturia eli yövirtsaisuus. Pitkälle edenneen eturauhassyövän oireina saattaa lisäksi olla ongelmat rakon tyhjentämisessä sekä selkäkipu, joka puolestaan johtuu ensisijaisesti luustoon leviävästä eturauhassyövän metastaasista. (Rawla 2019).

PSA-testaus, eli verinäytteestä mitattavan, eturauhaselle tyypillisen antigeenin (engl. prostate-specific antigen) pitoisuuden määrittäminen, on tällä hetkellä käytetyin menetelmä diagnosoida eturauhassyöpä aikaisessa vaiheessa. PSA:n pitoisuus veressä lisääntyy eturauhassyövässä, mutta myös muut sairaudet, kuten eturauhastulehdus, voivat sitä lisätä (Lin ym. 2008). Oireettomien henkilöiden PSA-testaamista ei suositella, sillä seulonta ja siitä seuraava hoito eivät merkittävästi lisää eturauhassyöpään sairastuneiden elinikää. PSA-testaaminen voi itsessään aiheuttaa jopa syöpää suuremmat haitat sekä turhaa yli diagnosointia (Duodecim 2023). Jos PSA-tulos johtaa kudoksetyön ottamiseen, aiheutuu potilaalle mahdollisesti turhaa haittaa (Trabzonlu ym. 2019). Veren PSA-pitoisuuteen voi vaikuttaa myös esimerkiksi ruokavalio, minkä vuoksi korkea PSA-pitoisuus voi olla epäluotettava eturauhassyövän merkki (Ohwaki ym. 2012). Eturauhassyöpää ei seulota Suomessa.

Miehiltä, joilla on virtsaamiseen liittyviä ongelmia, tutkitaan ensimmäisenä eturauhasesta mahdollisia kyhmyjä tunnustelemalla sitä peräsuolen kautta (Käypähoito 2024). Lisäksi tutkitaan myös veren PSA-arvot. Oireellisella miehellä selkeästi koholla oleva PSA-arvo (> 10 µl/l) voi mahdollisesti viitata siihen, että potilaalla on eturauhassyöpä (Duodecim 2023). Eturauhassyövän toteamisessa käytetään myös kaikukuvausta sekä magneettikuvausta, ja lopullinen eturauhassyöpädiagnosi tehdään ottamalla eturauhasesta koepaloja ja tutkimalla niitä (Duodecim 2023).

Koska myös perinnöllisyys vaikuttaa eturauhassyövän riskiin, oireettomalle miehelle voidaan harkita PSA-määrittystä, jos hänen lähisuvussa on esiintynyt eturauhassyöpää (Duodecim 2023). Muutokset PSA-pitoisuudessa voivat tällaisissa tilanteissa johtaa jatkotoimenpiteisiin.

1.3 Metastaattinen eturauhassyöpä

Eturauhassyövän hoitamisen suurin haaste on sen taipumus lähettää etäpesäkkeitä eli metastaaseja. Metastaasissa syöpäsolujen täytyy ensin tunkeutua ympäröivään kudokseen ja joko imusolmukkeen seinämän läpi imusuonistoon tai verisuonen seinämän läpi verenkiertoon päästäkseen muualle elimistöön. Kohteessa syöpäsolujen täytyy tunkeutua uudelleen imusolmukkeen tai verisuonen seinämän läpi uuteen kudokseen. Metastaasin onnistumiseksi syöpäsolujen tulee sopeutua uuteen ympäristöönsä ja muodostaa kasvain. Muodostaakseen etäpesäkkeen ja jatkaakseen kasvua kasvain indusoi uusien verisuonten muodostumista ympärilleen. (Manna ym. 2019).

Metastaattinen eturauhassyöpä lähettää etäpesäkkeitä yleisimmin primäärisen kasvaimen läheisyydessä oleviin imusolmukkeisiin, joista se pääsee lymfaattisen järjestelmän avulla leviämään muualle elimistöön (Manna ym. 2019). Eturauhassyövän metastaasit voivat levitä myös verenkierron mukana. Eturauhassyövästä lymfaattiseen järjestelmään tai verenkiertoon päätyneet etäpesäkkeet metastasoituvat useimmiten luihin, maksaan ja keuhkoihin (Wang ym. 2018).

1.4 Eturauhassyövän hoito

Vaikka eturauhassyöpää diagnosoidaan paljon, useimmiten syöpä löydetään tarpeeksi aikaisin, jolloin syöpä on rajautunut eturauhaseen ja on tällöin helpompi hoitaa. (Rawla 2019). Jos syöpäkasvain on paikantunut pelkästään eturauhaskudokseen eikä ole muodostanut metastaaseja, se on todennäköisesti hoidettavissa paikallisilla hoitokeinoilla. Elämänajan odote on ≥ 10 vuotta tällaisilla potilailla (Rebello ym. 2021). Eturauhassyövän hoitona voi joissain

tapauksissa olla myös pelkkä seuranta, jos mahdolliset hoidot eivät parantaisi syövän ennustetta ja tavoitteena on potilaan hyvä elämänlaatu (Duodecim 2023).

Tällä hetkellä käytetyin hoitomuoto eturauhassyövälle on androgeeninesoterapia eli ADT (Wang ym. 2018). Androgeeninesoterapian haittapuolena on se, että kasvaimen saattaa kehittyä ADT-resistanssi, minkä seurauksena muodostuu primäärinen kastraatioresistantti eturauhassyöpä tai metastaattinen versio siitä (Wang ym. 2018). Nykyään androgeeninesoterapiaa käytetään usein yhdessä jonkin toisen terapiamuodon kanssa (Posdzich ym. 2023).

Eturauhassyöpään sairastuneilla esiintyy monenlaisia oireita itse syövän lisäksi valittujen hoitojen seurauksena. Prostatektomiassa eli eturauhasen poistoleikkauksessa eturauhasen poistetaan kokonaisuudessaan. Poistoleikkaus voi vaikuttaa muun muassa erektion toimintaan sekä virtsan pidätyskykyyn. Eturauhassyövän hoidossa voidaan käyttää myös sädehoitoa, jossa voimakasta ionisoivaa säteilyä kohdennetaan paikallisesti kasvaimen, minkä seurauksena syöpäsolut tuhoutuvat ja aktiivisesti jakautuvat solut vaurioituvat. Säteily vaurioittaa myös elimistön muita nopeasti jakautuvia soluja kuten lymfosyyttejä. Sädehoidon aiheuttamia sivuoireita ovat esimerkiksi virtsaamiseen liittyvät ongelmat sekä suolen ärtyminen. Eturauhassyövän hoidot vaikuttavat haitallisesti myös terveyteen liittyvään elämänlaatuun, sillä esimerkiksi seksuaaliset ja virtsaamiseen liittyvät toiminnot heikkenevät hoitojen edetessä. Myös psykologiset ongelmat, kuten masennus ja ahdistuneisuus, ovat melko yleisiä seurauksia eturauhassyövästä ja sen hoidoista erityisesti pitkälle edenneissä tapauksissa (Watts ym. 2014). (Rebello ym. 2021).

Metastaattisella eturauhassyövällä on huono ennuste (Zhu ym. 2023). Metastaattiset syöpäsolut hankkivat usein uusia mutaatioita, kuten ADT-resistanssin, jota alkuperäisessä kasvaimessa ei ole (Zhu ym. 2023). Tämä vaikeuttaa huomattavasti syövän hoitamista, koska hoidot saattavat tehot vain alkuperäiseen kasvaimen, mutta eivät sen lähettämiin etäpesäkkeisiin.

1.5 Eturauhassyövän ennaltaehkäisy

Kuten aikaisemmin mainittiin, Suomessa miesten eturauhassyöpää ei säännöllisesti seulota. Seulonnasta saatava hyöty syövän löytämiseksi varhaisessa vaiheessa on pieni. Toisaalta seulontatulosten vääränlainen tulkinta voi aiheuttaa yli diagnosointia tai henkistä taakkaa. Jotkin elintavat voivat vaikuttaa eturauhassyöpään sairastumiseen. Esimerkiksi paljon rasvaa sisältävän ruokavalion on havaittu lisäävän eturauhassyövän riskiä, joten ruokavalion sisältämän rasvan määrää vähentämällä voidaan mahdollisesti ennaltaehkäistä eturauhassyöpää (Liss ym. 2019).

Syöpätutkimuksessa yritetään löytää keinoja, joilla syöpään sairastumista voitaisiin ennaltaehkäistä tai se tunnistettaisiin jollain haitattomalla keinolla jo aikaisessa vaiheessa. Lisäksi tavoitteena on löytää uusia hoitokeinoja, jotka tehoaisivat paremmin kasvaimeen haittaamatta potilaan elämänlaatua. Syöpää tutkittaessa etsitään esimerkiksi biomarkkereita, joiden avulla voidaan selvittää elimistön tilaa. Esimerkiksi PSA-biomarkkerin rinnalle yritetään löytää muita biomarkkereita, jotka yhdessä PSA:n kanssa voisivat luotettavammin kertoa esimerkiksi eturauhassyövän aggressiivisuudesta (Saxby ym. 2020).

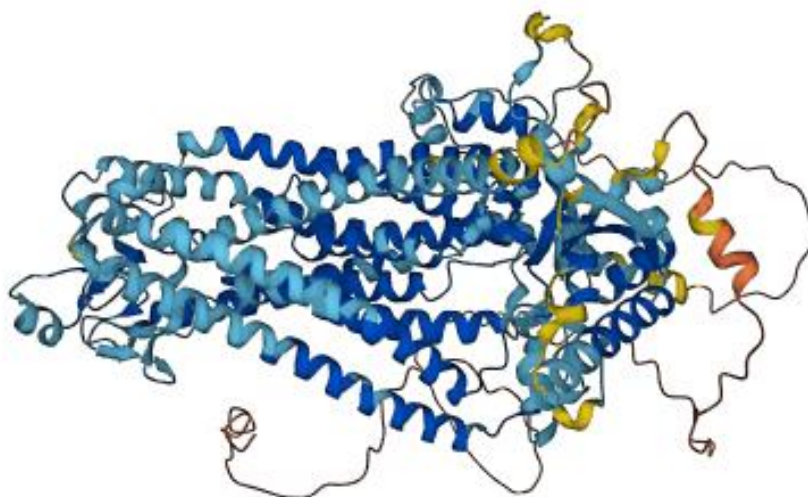
1.6 Anoktamiini 7

Anoktamiini 7 (ANO7) on ihmisen eturauhaskudoksessa tyypillisesti ilmentyvä proteiini, joka kuuluu anoktamiinien geeniperheeseen. Anoktamiini 7 nimettiin alun perin NGEP:ksi (engl. new gene expressed in prostate) eli uudeksi geeniksi, joka ekspressoituu eturauhasessa (Bera ym. 2004). Yhteensä anoktamiineja on kymmenen erilaista, ja ne ovat kaikki transmembraaniproteiineja eli proteiineja, jotka läpäisevät solun membraanin vähintään kerran (Pedemonte & Galietta 2014). Anoktamiineista käytetään myös nimitystä TMEM16-proteiinit. Anoktamiineista osa toimii kalsium²⁺-aktivoituvina kloridi-ionikanavina (Marx ym. 2021), kun taas osa toimii lipidiskramblaaseina tai osallistuu muiden membraaniproteiinien säätelyyn soluissa. (Guo ym. 2021).

ANO7-geeni sijaitsee ihmisen genomissa kohdassa 2q37.3 (Guo ym. 2021). ANO7-geeni koodaa kahta silmukoinniltaan erilaista proteiinia - sytoplasmista proteiinia sekä

polytooppista eli useammin kuin kerran membraanin läpäisevää membraaniproteiinia (National Library of Medicine 2022a). Näistä jälkimmäinen, noin 95 kDa kokoinen ANO7-transmembraaniproteiini on kiinnostava tutkimuskohde eturauhassyövän immunoterapiassa ja diagnosoinnissa, koska sen on huomattu vaikuttavan muun muassa eturauhassyövän kehitykseen (Guo ym. 2021). ANO7-proteiinia voitaisiin mahdollisesti käyttää myös biomarkkerina tai syövän immunoterapian kohteena (Guo ym. 2021). ANO7-proteiinin kolmiulotteisen rakenteen ennuste on kuvattu kuvassa 1.

Anoktamiini 7 -proteiinin kumpikin terminaalinen pää sijaitsee solun sytoplasman puolella (Guo ym. 2021). Anoktamiini 7:n rooli skramblaasina ei ole vielä täysin selvä, mutta sen mahdolliset vuorovaikutukset muiden solunsisäisten proteiinien kanssa saattavat liittyä eturauhassyövän muodostumiseen ja kehittymiseen (Guo ym. 2021). Anoktamiini 7:ltä on aiemmin löydetty vuorovaikutuksia joidenkin vesikkelikuljetusproteiinien kanssa (Kaikkonen ym. 2020), mikä tukee ANO7-proteiinin osallistumista vesikkelikuljetukseen (Guo ym. 2021).



Kuva 1 ANO7-proteiinin ennustettu kolmiulotteinen rakenne. (AlphaFold 2024a)

ANO7:n on havaittu vaikuttavan eturauhassyöpöpotilaiden ennusteeseen. ANO7:n kohonneen RNA-tason ilmenemisen on huomattu korreloivan eturauhassyövän vakavuuden ja ennusteen kanssa (Kaikkonen ym. 2018). Kyseisessä tutkimuksessa ANO7-geeni sekvensoitiin ja

analysoitiin eturauhassyöpään liittyen, ja tutkijat löysivät kaksi ANO7:n SNP-varianttia. Ensimmäinen variantti, eksonissa 1 sijaitseva ennenaikaisen lopetuskodonin aiheuttava mutaatio, vähensi potilaiden eloonjäämisaikaa syöpädiagnoosin jälkeen. Toinen variantti, joka aiheutti proteiinin virheellisen silmukoinnin, lisäsi eturauhassyövän riskiä ja se voitiin liittää metastaattiseen eturauhassyöpään. Kaikkonen ym. (2018) havaitsivat, että korkeat ANO7:n mRNA-pitoisuudet korreloivat vahvasti heikon ennusteen ja korkeamman kuolleisuuden kanssa.

ANO7-proteiinin vähentyneen ilmenemisen on muualla havaittu olevan selkeä ennuste sille, että eturauhaseen sairastuneen potilaan ennuste on huono (Marx ym. 2021). Tutkimuksessaan Marx. ym (2021) huomasivat, että ANO7 ilmenee vahvasti terveissä eturauhasissa. Tämä viittaisi siihen, että ANO7:n ilmeneminen voi vähentyä tai jopa kokonaan hävitä eturauhassyövän muodostumisen ja kehittymisen aikana.

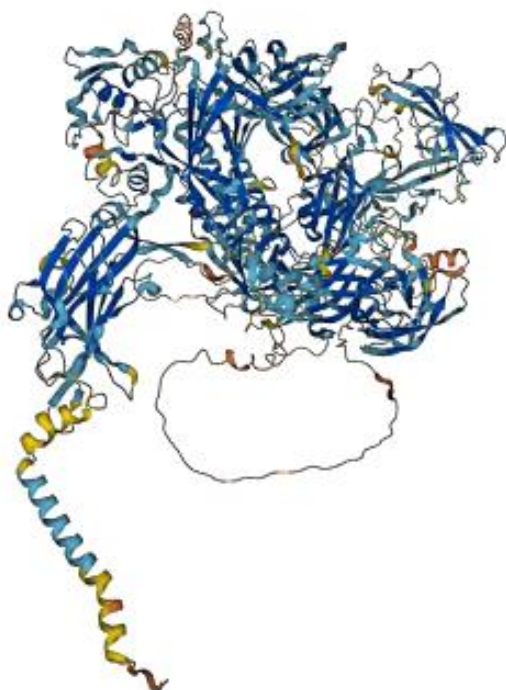
Erilaisten ANO7-proteiinin varianttien välillä on havaittu olevan geneettistä eroa, jolla on vaikutusta riskiin sairastua eturauhassyöpään. Jiang ym. (2023) löysivät tutkimuksessaan eroa afrikkalaisten ja eurooppalaisten ANO7-varianteissa. Afrikkalaisten ANO7-proteiinin rakennemuutokset saattoivat haitata proteiinin toimintaa ja edistää tuumorigeneesiä, mikä vaikuttaa kohonneeseen eturauhassyövän riskiin (Jiang ym. 2023). ANO7-proteiinia koodaavasta geenistä on löydetty useita yhden nukleotidin polymorfismeja eli SNP:jä (engl. single nucleotide polymorphism). Jotkin näistä yhden nukleotidin polymorfismeista voivat aiheuttaa esimerkiksi ANO7:n mRNA:n virheellisen silmukoinnin, mikä puolestaan lisää eturauhassyövän riskiä (Wahlström ym. 2022).

Ristiriitaisten tutkimustulosten vuoksi ANO7-proteiinin toimintaa eturauhassyövässä tulee siis tutkia lisää. Jatkuvasti yritetään löytää uusia markkereita, jotta aggressiiviset syövät olisi mahdollista tunnistaa jo varhaisessa vaiheessa. ANO7-proteiini on potentiaalinen markkeriproteiini, mutta sen toiminnasta ei tiedetä vielä tarpeeksi. Tutkimuksissa mahdollisesti tunnistettavat ANO7:n kanssa vuorovaikuttavat proteiinit voivat auttaa selvittämään, mihin geeni- ja metaboliareitteihin ANO7-proteiini osallistuu ja miten proteiini

toimii eturauhassyövässä. Yksi mahdollisesti ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttava proteiini on myoferliini.

1.7 Myoferliini

Myoferliini on solumembraaniin toisesta päästään ankkuroituva eukaryoottien proteiini, joka kuuluu ferliinien proteiiniperheeseen (Marty ym. 2013). Muita ferliinien perheeseen kuuluvia proteiineja ovat muun muassa dysferliini, joka liittyy lihaksen supistumiseen (National Library of Medicine 2022b) sekä otoferliini, jonka mutaatiot aiheuttavat kuuroutta (National Library of Medicine 2022c). Yhteistä ferliineille on niiden samankaltainen rakenne – ne koostuvat 5–7 C2-domeenista, jotka muun muassa sitovat lipidejä (Marty ym. 2013). Myoferliinia koodaava geeni sijaitsee kromosomissa 10q23.33 (Zhu ym. 2019), ja sen kolmiulotteisen rakenteen ennuste on kuvattu kuvassa 2. Myoferliini on kooltaan noin 230 kDa (Zhu ym. 2019).



Kuva 2 Myoferliiniproteiinin ennustettu kolmiulotteinen rakenne. (AlphaFold 2024b)

Myoferliini osallistuu solujen kasvun, korjausprosessien sekä normaalien toimintojen ylläpitämiseen, sillä se vaikuttaa säätelemällä esimerkiksi vesikkelikuljetusta, solufuusiota, reseptoreista riippuvaista endosytoosia sekä joidenkin reseptorien ilmentymistä (Zhu ym. 2019). Kuten dysferliini, myoferliini sisältää DYSF-domeenin ja sitä ekspressoidaan paljon myoblasteissa eli lihassolujen esiasteissa. Kypsät lihassolut ekspressoivat sekä dysferliiniä että myoferliiniä plasmamembraanilleen (Zhu ym. 2019). Myoferliini osallistuu lihassoluissa muun muassa vesikkelikuljetukseen, mikä on erittäin tärkeää useille lihassolun toiminnoille, kuten solujen jakautumiselle, migraatiolle ja signaloinnin säätelylle (Zhu ym. 2019). Useiden tutkimusten mukaan myoferliinin on havaittu osallistuvan myös useiden eri syöpätyyppien solujen proliferaatioon, invaasioon sekä metastasiaan, minkä vuoksi sitä pidetään tärkeänä sekä lupaavana tutkimuskohteena ja mahdollisena biomerkkiaineena (Leung ym. 2013, Volakis ym. 2014, Zhu ym. 2019).

1.8 Anoktamiini 7:n ja myoferliinin vuorovaikutus

ANO7-proteiinin on havaittu vuorovaikuttavan vesikkelikuljetukseen liittyvien proteiinien kanssa (Kaikkonen ym. 2020). Myös myoferliinin on havaittu osallistuvan vesikkelikuljetuksen ohjaamiseen (Zhu ym. 2019). Anoktamiini 7 ja myoferliini -proteiinit osallistuvat siis osittain samoihin solun toimintoihin, mikä onkin yksi syy siihen, miksi niiden vuorovaikutus on lupaava tutkimuskohde. Syöpäsolujen vesikkelikuljetukseen vaikuttavien tekijöiden on aiemmin havaittu vaikuttavan eturauhassyövän etenemiseen (Hu ym. 2021).

Tutkimusryhmässä, jossa teen pro gradu -tutkielmani, on aiemmin löydetty ko-immunopresipitaation avulla vuorovaikutuksia ANO7-proteiinin ja myoferliinin välillä eturauhassyöpäsoluista. Ko-immunopresipitaatio toteutettiin sellaisilla RWPE-1-soluilla, jotka stabiilisti yli-ilmensivät ANO7-proteiinia. Kaikki ko-presipitoidut proteiinit tunnistettiin massaspektrometrian avulla, ja yksi tunnistetuista proteiineista oli myoferliini. Tämän jälkeen varmistettiin myoferliinin ja ANO7:n ko-immunopresipitaatio käyttämällä sekä anti-ANO7-että anti-MYOF-vasta-aineita. Tulokset validoitiin sekä RWPE-1-soluilla että PC-3-soluilla.

Anoktamiini 7:n ja myoferliinin vuorovaikutuksesta soluissa ei tiedetä tarkemmin, minkä vuoksi se valikoitui pro gradu -tutkielmani aiheeksi.

1.9 Tutkielman tavoite ja hypoteesi

Tutkimukseni tavoitteena on selvittää, onko toinen ANO7-proteiinin terminaalista päistä olennainen myoferliinin kiinnittymiselle. Tämä selvitetään valmistamalla plasmideja, joissa on erilaiset ANO7-proteiinia koodaavat ANO7-geenin konstruktit. Aluksi valmistettiin sellainen plasmidi, jossa on kokonaista ANO7-proteiinia koodaava geeni. Plasmidissa vietyä ANO7-geeniä ja sen tuottaman proteiinin sekä myoferliinin vuorovaikutuksia ei ole aiemmin tutkittu.

Yhdessä valmistetussa plasmidissa on ANO7-geeni, josta puuttuu N-terminusta koodaava osa, mutta muuten geeni on normaali ja koodaa sellaista ANO7-proteiinia, jonka N-terminuksesta eli alkupäästä puuttuu tietty määrä aminohappoja. Toisessa plasmidissa on ANO7-geeni ilman sen C-terminusta koodaavaa osaa. Plasmideita valmistetaan myös sellainen, jonka ANO7-proteiinin kumpikin terminaalinen pää on poistettu.

Pro gradu -tutkielmani hypoteesi on se, että vain toinen ANO7-proteiinin päistä on tärkeä ANO7-proteiinin ja myoferliinin interaktiolle. Kumpikin ANO7-proteiinin päistä on transmembraanialueen ulkopuolella (Das ym. 2008), joten kumpi tahansa terminus on potentiaalinen vaihtoehto myoferliinin kiinnittymiselle.

2 Aineisto ja menetelmät

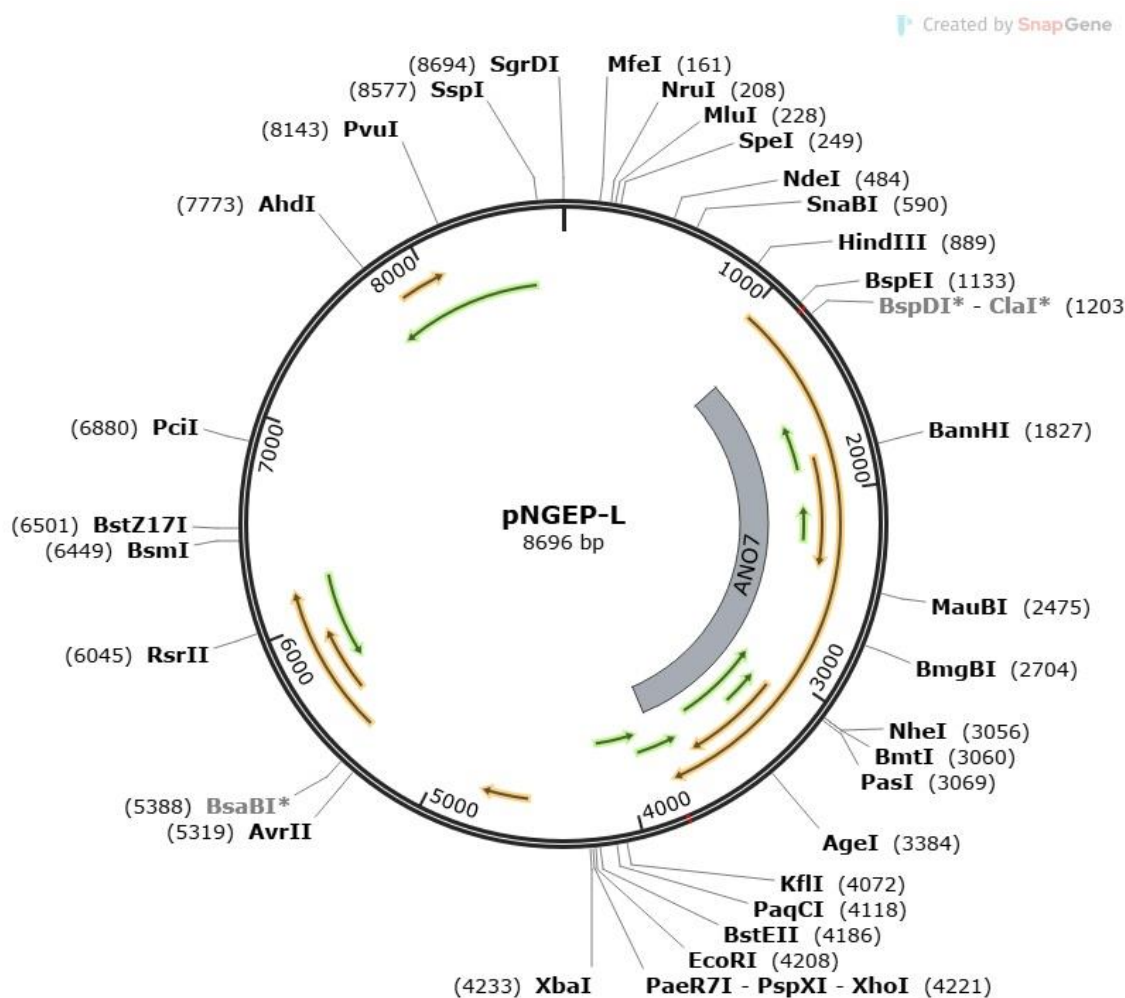
2.1 PC-3-eturauhassyöpäsolujen ylläpito ja kasvattaminen

Pro gradu -tutkielmassa käytettiin eturauhassyövän luuetäpesäkkeestä eristettyjä PC-3-soluja (CRL-1435, ATCC). PC-3-solulinjaa käytetään yleisesti eturauhassyövän tutkimuksissa sekä lääkekehityksessä. PC-3-solut ovat adherentteja soluja, eivätkä ne ilmennä androgeenireseptoreita, minkä vuoksi niitä käytetään erityisesti androgeenistä riippumattoman eturauhassyövän tutkimiseen (van Bokhoven ym. 2003). PC-3-soluja kasvatettiin F-12K-ravintonesteessä 37 °C:ssa 5 % CO₂-pitoisuudessa kasvatuskaapissa. Ravintonesteessä (F-12K 1x Nutrient Mixture, Kaighn's Modification + L-glutamiini, Life Technologies Limited) käytettiin seuraavia lisäravinteita: 10 % naudnan sikiön seerumi (FBS), 100 yksikköä/ml penisilliini ja 100 µg/ml streptomysiini. Työ aloitettiin jakovaiheen p25 (engl. passage) soluilla. Solut irrotettiin trypsiini-EDTA-käsittelyllä ja jaettiin 2–3 kertaa viikossa. Kun kasvatuspullo oli täynnä, solujen jako suoritettiin suhteessa 1:5.

2.2 Testitransfektio

2.2.1 PC-3- solujen transfektio

Tutkielman ensimmäisessä vaiheessa transfektoitiin PC-3-soluja plasmidilla, joka sisälsi kokonaisen ANO7-geenin. Transfektiossa käytettiin pNGEP-L-plasmidia (kuva 3). Kontrolliplasmidina käytettiin pWay20-ErbB4-ICD2-EGFP-plasmidia, jonka avulla voitiin tutkia transfektion tehokkuutta. Kontrolliplasmidi sisälsi vihreää fluoresoivaa proteiinia (engl. green fluorescent protein, GFP) koodaavan geenin, joka onnistuneessa transfektiossa esiintyi fluoresoivana valona Invitrogenin EVOSM5000TM-kuvauslaitteella tarkasteltuna.



Kuva 3 pNGEP-L-plasmidin plasmidikartta. Plasmidia käytettiin PC-3-solujen testitransfektiossa.

Ensimmäisenä tutkimuspäivänä neljälle kasvatusmaljalle siirrettiin jokaiseen 2 646 000 solua F-12K-ravintoneesteeseen. Maljalla olevan nesteen kokonaistilavuus oli 10 ml. Maljaamisen jälkeen maljat siirrettiin kasvatusolosuhteisiin. Seuraavana päivänä solut transfektoitiin aiemmin mainituilla kahdella plasmidilla siten, että kaksi maljaa transfektoitiin ANO7-geenin sisältävällä plasmidilla ja kaksi maljaa kontrolliplasmidilla. Kumpaakin plasmidia transfektoitiin 7,3 µg, ja transfektio suoritettiin ThermoFisher Scientificin Lipofectamine™ 3000 -transfektiooliuoksia sekä -protokollaa käyttäen (ThermoFisher 2024a). Transfektoidut solut siirrettiin takaisin kasvuolosuhteisiin.

Transfektioista seuraavana päivänä kaikki 4 maljaa siirrettiin jälle. Kontrolliplasmidin transfektion onnistuminen arvioitiin EVOSM5000™-kuvauslaitteella. Ravintoneste

poistettiin maljoilta ja maljat pestiin 4 °C pesupuskurilla eli fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (engl. phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4, Thermo Fischer Scientific). Lopuksi maljoille lisättiin 1 % CHAPS -lyyysipuskuria (30 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % CHAPS), johon oli lisätty proteaasi-inhibiittoreita (cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche). Solut irrotettiin maljoilta soluraapalla ja ne sentrifugoitiin 30 minuutin ajan 15 000 rpm 4 °C:ssa (Centrifuge 5424 R, Eppendorf). Proteiinit sisältävä solulysaatti siirrettiin puhtaisiin koeputkiin jäälle. Näytteet valmisteltiin proteiinikonsentraation mittausta varten ThermoFisherin Pierce™ BCA Protein Assay Kit -ohjeiden mukaisesti (ThermoFisher 2024b), minkä jälkeen absorbanssin mittausta suoritettiin 570 nm aallonpituudella (PerkinElmer, Victor X4 -kuoppalevylukija). Näytteiden proteiinipitoisuus laskettiin ThermoFisherin Pierce™ BCA Protein Assay Kit -ohjeiden mukaisesti (ThermoFisher 2024b).

2.2.2 Transfektoitujen solujen koimmunopresipitaatio

Solulysaatteihin lisättiin 1 % CHAPS -lyyysipuskuria siten, että näyte sisälsi 1000 µg proteiinia ja sen kokonaistilavuus oli 700 µl. Ko-immunopresipitaatiossa käytettiin kustomoitua anti-ANO7-vasta-ainetta (AB1853, Thermo Fisher) sekä kontrollivasta-aineena jäniksen gammaglobuliinia (engl. Rabbit Gamma Globulin Control, REF31887, Thermo Fisher Scientific). Toiseen ANO7-plasmidilla transfektoituun näytteeseen lisättiin 2 µg vasta-ainetta ja toiseen 2 µg kontrollivasta-ainetta, ja sama toistettiin kontrolliplasmidilla transfektoituille näytteille. Kaikki näytteet siirrettiin pyörimään sekoittajaan 4 °C:seen yön yli.

Seuraavana päivänä, inkubaation jälkeen, näytteet siirrettiin jäälle. Proteiinien puhdistaminen valmisteltiin neljään putkeen pesemällä 40 µl Dynabeads™-helmiä (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1, Thermo Fischer Scientific) 1 % CHAPS -lyyysipuskurilla magneetilla. 1000 µg proteiinia sisältävät näytteet siirrettiin Dynabeads™-putkiin, jotka siirrettiin neljän tunnin ajaksi 4 °C:seen pyörimään sekoittajaan.

Inkuboinnin jälkeen näytteistä kerättiin magneetilla Dynabeads™-helmet ja supernatantti poistettiin. Helmet huuhdeltiin 1 % CHAPS -lyysispuskurilla. Sama pesu toistettiin neljästi, eli helmet resuspensoitiin lyysispuskuriin, jonka jälkeen helmet kerättiin magneetilla ja puskuuri poistettiin. Neljännen pesun jälkeen näytteet siirrettiin puhtaisiin putkiin ja lyysispuskuri poistettiin magneetilla. Helmet resuspensoitiin 2x Laemmli-puskuriin (Bio-Rad) ja inkuboitiin 50 °C:ssa 15 minuuttia, jolloin helmiin kiinnittyneet proteiinit irtosivat puskuuriin. Näytteet siirrettiin uusiin putkiin, jotka pakastettiin -20 °C:seen.

2.2.3 Western Blot

Tutkimuksen seuraava vaihe sisälsi Western Blot -analyysin, jonka avulla tutkittiin ANO7-proteiinin vuorovaikutuksia myoferliinin kanssa soluissa. Western Blot -analyysia varten koimmunopresipitaationäytteet sekä alkuperäiset lyaatit ajettiin Mini-PROTEAN® TGXTM -geelille (Bio-Rad) ajopuskurissa (engl. 1x Tris-Glycine buffer, 0,1% SDS).

Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria (Nippon Genetics). Geelin kaivoihin ladattiin 30 µg proteiinia jokaisesta lyaatista ja 30 µl immunopresipitaationäytteistä. Proteiinit siirrettiin geeliltä Immobilon®-P-membraanille 4 °C:ssa yön aikana siirtopuskurissa (engl. 1x Tris-Glycine buffer, 20 % EtOH).

Seuraavana päivänä inkuboinnin jälkeen membraani huuhdeltiin vesijohtovedellä, värjättiin Ponceau S -väriaineella (Thermo Scientific) ja skannattiin, minkä jälkeen membraani siirrettiin huoneenlämpöön reilun kahden tunnin ajaksi 5 % maitoliukseen ravistumaan. Maitoliuos oli valmistettu pesupuskuriin eli yksinkertaiseen Tris-puskuroituun suolaliukseen (engl. tris-buffered saline, 1x TBS), johon oli lisätty 0,1 % Tween 20 -liuosta (Bio-Rad).

Membraani siirrettiin koeputkessa sekoittajaan Tris-puskuroituun suolaliukseen (0,1 % Tween 20) valmistettuun 2 % naudan seerumialbumiiniin (engl. bovine serum albumin, BSA) primäärisen vasta-aineen (1:1000 anti-MYOF, Sigma-Aldrich) ja 0,01 % natriumatsidin kanssa yön yli 4 °C:ssa. Seuraavana päivänä membraani pestiin neljästi viiden minuutin ajan pesupuskurilla, jonka jälkeen membraani siirrettiin reilun tunnin ajaksi sekoittumaan 5 % maitoliukseen (0,1 % Tween 20, Tris-puskuroitu suolaliuos) valmistetun sekundaarisen

vasta-aineen (1:20000 Goat Anti-Rabbit IgG, ab97080, Abcam) kanssa. Sekundaarinen vasta-aine sitoutui membraanilla primääriseen vasta-aineeseen. Membraani pestiin neljästi viiden minuutin ajan pesupuskurilla, minkä jälkeen se valmisteltiin kuvausta varten. Valmistelussa käytettiin Advanstan WesternBright™ Quantum -pakettia, jonka ohjeen mukaisesti yhdistettiin 1:1 suhteessa kahta liuosta (engl. WesternBright® Quantum® Luminol/Enhancer Solution ja WesternBright® Peroxide Chemiluminescent Detection Reagent). Seosta pipetoitiin membraanin päälle kahden minuutin ajan edestakaisin. Liuos reagoi membraanin kanssa siten, että luminesenssisignaalin aiheuttava substraatti sitoutui sekundaariseen vasta-aineeseen. Membraani kuvattiin Bio-Radin ChemiDoc-laitteella.

Membraanille suoritettiin seuraavaksi anti-ANO7-vasta-ainevärjäys. Membraani huuhdeltiin viiden minuutin ajan pesupuskurilla, jonka jälkeen se peitettiin Restore™ PLUS Western Blot -puhdistuspuskuriin (Thermo Fischer Scientific) ja inkuboitiin 12 minuutin ajan ravistelussa huoneenlämmössä. Puhdistuspuskurin tehtävänä oli irroittaa membraaniin sitoutuneet primääriset ja sekundaariset vasta-aineet. Membraani käytettiin metanolissa ja huuhdeltiin vesijohtovedellä, minkä jälkeen membraani siirrettiin ravisteluun reilun tunnin ajaksi pesupuskuriin valmistettuun 5 % maitoliuokseen kuten aiemmin. Tämän jälkeen membraani pestiin kolmesti viiden minuutin ajan pesupuskurissa ja siirrettiin putkeen pesupuskuriin valmistettuun 5 % naudan seerumialbumiiniin primäärisen vasta-aineen (1:1000 anti-ANO7, AB1853) ja 0,01 % natriumatsidin kanssa. Putki siirrettiin pyörimään yön yli (4 °C).

Seuraavana päivänä membraani pestiin neljästi viiden minuutin ajan pesupuskurilla. Membraani siirrettiin sekoittumaan 5 % maitoliuokseen sekundaarisen vasta-aineen (1:20000 Goat Anti-Rabbit IgG) kanssa reilun tunnin ajaksi. Membraani huuhdeltiin taas neljästi viiden minuutin ajan pesupuskurilla, ja lopuksi membraani valmisteltiin kuvausta varten WesternBright™ Quantum -paketilla kuten aiemmin. Membraani kuvattiin lopuksi ChemiDoc-laitteella.

2.3 Plasmidikonstruktioiden suunnittelu

Anoktamiini 7 -proteiinin sekvenssi otettiin NCBI-tietokannasta (NP_001357623.1, National Center for Biotechnology Information 2023). Proteiinin transmembraanialueet ennustettiin Tanskan teknillisessä yliopistossa kehitetyn DeepTMHMM-työkalun avulla (Hallgren ym. 2022). Myös muita transmembraanialueiden ennustamiseen tarkoitettuja työkaluja käytettiin vertailuna (SACS Memsat, Split, Emboss). DeepTMHMM-työkalun ennustetta pidettiin todennäköisimpänä, sillä ainoastaan siinä oli esitetty kahdeksan transmembraanialuetta ja muissa niitä oli joko enemmän tai vähemmän. ANO7-proteiinista poistettiin ne aminohapot, joiden arveltiin olevan membraanin ulkopuolella. ANO7:n proteiinisekvenssiä verrattiin sitä koodaavan geenin DNA-sekvenssiin ja sen perusteella valittiin alukkeet, jotka ANO7-konstruktioiden monistamisessa käytettiin.

2.4 Plasmidikonstruktioiden PCR-reaktiot

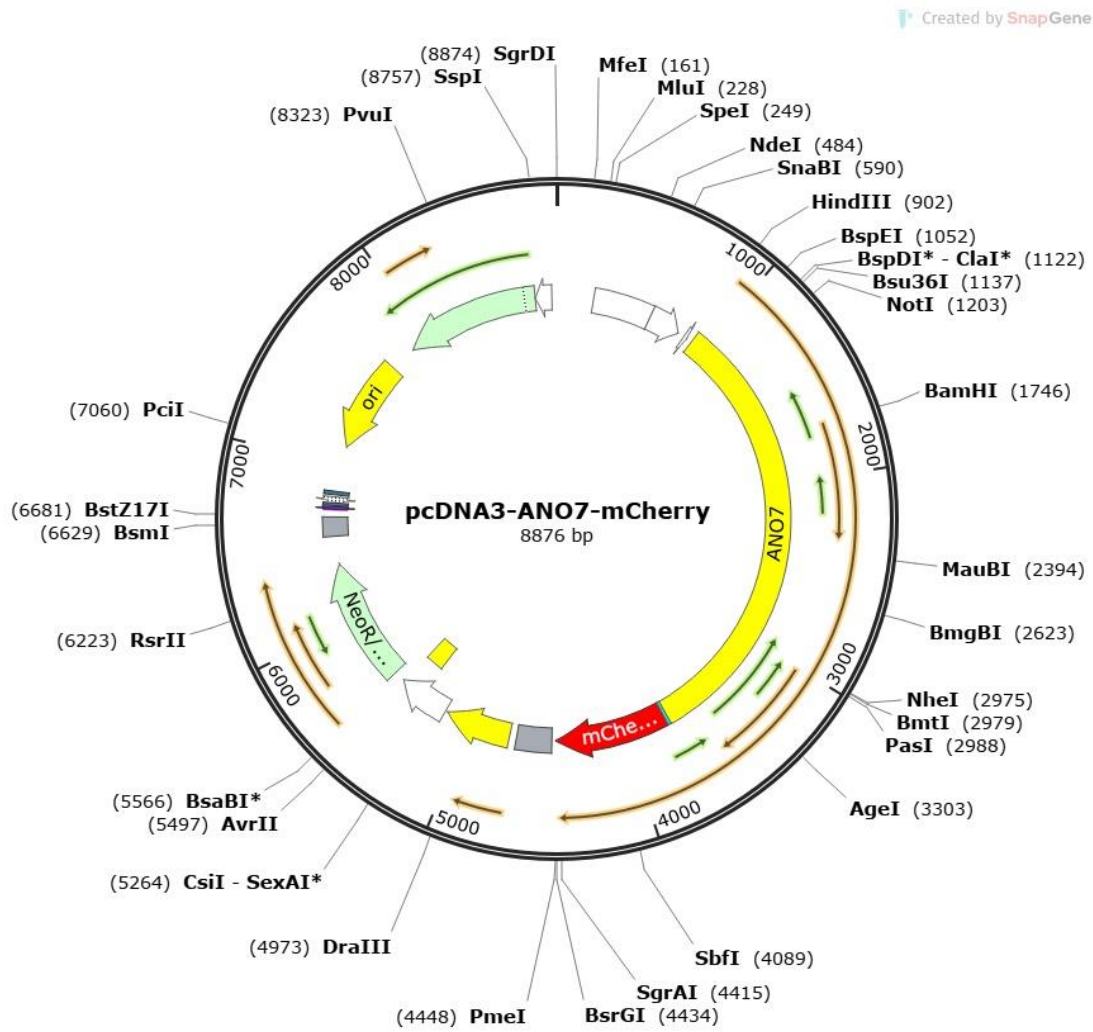
Plasmidin osien monistamiseen käytettiin Phusion® Hot Start Flex DNA -polymeraasia (New England Biolabs). Yhteensä PCR-reaktioita oli kuusi: pelkän vektorin PCR, neljän erilaisen ANO7-geenikonstruktioiden PCR sekä kontrolliplasmidiin liitettävän vihreän fluoresoivan proteiinin geenin (engl. green fluorescent protein, GFP) PCR. PCR-alukkeet valittiin Takara Bion nettisivuilta löytyvän In-Fusion Cloning Primer Design Tool -suunnitteluohjelman avulla (Takara Bio 2023). PCR-alukkeiden sekvenssit esitetään taulukossa 1.

Taulukko 1 Plasmidin osien PCR-reaktioissa käytetyt alukkeet.

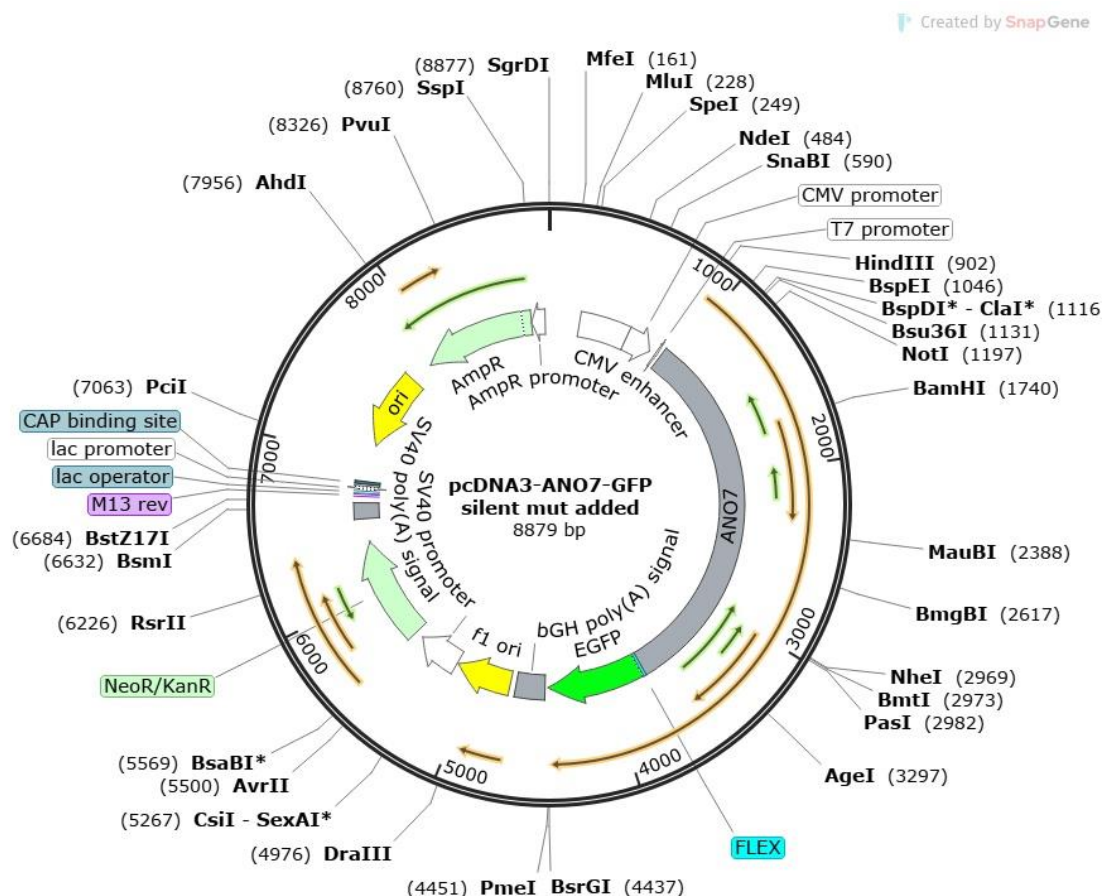
| | Etualuke | Taka-aluke |
|------------------------|--|--|
| Vektori | 5'- GTT TAA ACC CGC TGA TCA GCC TCG -3' | 5'- GGT GGC CGT AAG CTT AAC TAG CC -3' |
| Täyspitkä ANO7 | 5'- AAG CTT ACG GCC ACC ATG CGA ATG GCT GCC ACT G -3' | 5'- TCA GCG GGT TTA AAC TCA CTG CTG CAG CTG GCT GG -3' |
| ANO7 N-deleetio | 5'- AAG CTT ACG GCC ACC ATG CTG GAC CAC GTG CGC -3' | 5'- TCA GCG GGT TTA AAC TCA CTG CTG CAG CTG GCT GG -3' |
| ANO7 C-deleetio | 5'- AAG CTT ACG GCC ACC ATG CGA ATG GCT GCC ACT G -3' | 5'- TCA GCG GGT TTA AAC TCA CTC TGG GAT GTC AGG CAC C -3' |
| ANO7 N- ja C-deleetiot | 5'- AAG CTT ACG GCC ACC ATG CTG GAC CAC GTG CGC -3' | 5'- TCA GCG GGT TTA AAC TCA CTC TGG GAT GTC AGG CAC C -3' |

| | | |
|-----|--|--|
| GFP | 5'- AAG CTT ACG GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG G -3' | 5'- TCA GCG GGT TTA AAC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC -3' |
|-----|--|--|

PCR-reaktiosekset valmistettiin PCR Protocol for Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (M0535) -protokollan mukaisesti 50 µl reaktiolle (New England Biolabs 2023a). Käytettävä templaatti-DNA muissa kuin GFP-geenin PCR:ssä oli pcDNA3-ANO7-mCherry (kuva 4). Vihreän fluoresoivan proteiinin PCR:ssä templaatti-DNA:na toimi pcDNA3-ANO7-GFP (kuva 5). Reaktioissa käytettiin 3,27 ng plasmidi-DNA:ta ja kontrollina nukleaasivapaata vettä. PCR-reaktioissa käytetyt ohjelmat näkyvät taulukossa 2. Lämpötilat alukkeiden kiinnittymiselle PCR:ssä laskettiin NEB Tm Calculator -sovellusta käyttäen (New England Biolabs 2023b) ja muut lämpötilat saatiin polymeeraasin protokollasta. PCR-reaktioiden jälkeen näytteisiin lisättiin Gel Loading Dye Purple 6x -väriainetta (New England Biolabs) ja ajettiin 0,8 % agarosigeelille. Molekyylipainomarkkerina käytettiin Quick-Load® 1 kb PlusDNA Ladder -markkeria (New England Biolabs).



Kuva 4 pcDNA3-ANO7-mCherry-plasmidin plasmidikartta. Plasmidia käytettiin ANO7-geenin PCR-reaktioiden templaattina.



Kuva 5 pcDNA3-ANO7-GFP-plasmidin plasmidikartta. Plasmidia käytettiin vihreän fluoroivan geenin PCR-reaktioiden templaattina.

Taulukko 2 PCR-ohjelmat.

PCR 1:ssä monistettiin käytettävää vektoria. PCR 2:ssa oli kokonainen ANO7-geeni ja PCR 3:ssa ANO7-geeni, josta puuttuu N-terminus. PCR 4:ssä oli ANO7-geeni, josta puuttuu C-terminus ja PCR 5:ssä ANO7-geenistä puuttuu sekä C- että N-terminus. PCR 6:ssa monistetaan kontrolligeeniä eli vihreän fluoroivan proteiinin geeniä.

| | PCR 1 | | PCR 2 ja 4 | | PCR 3 ja 5 | | PCR 6 | |
|---------------------|-------|--------|------------|--------|------------|--------|-------|--------|
| Alkudenaturaatio | 98°C | 30 s | 98°C | 30 s | 98°C | 30 s | 98°C | 30 s |
| 35 sykliä | 98°C | 10 s | 98°C | 10 s | 98°C | 10 s | 98°C | 10 s |
| | 68 °C | 30 s | 66 °C | 30 s | 63 °C | 30 s | 62 °C | 30 s |
| | 72 °C | 90 s | 72 °C | 45 s | 72 °C | 30 s | 72 °C | 15 s |
| Viimeinen ekstensio | 72 °C | 10 min | 72 °C | 10 min | 72 °C | 10 min | 72 °C | 10 min |
| | 4 °C | ∞ | 4 °C | ∞ | 4 °C | ∞ | 4 °C | ∞ |

2.5 DNA-pätkien eristäminen

Monistetut DNA-pätkät leikattiin geeliltä UV-valopöydällä. DNA:n eristäminen suoritettiin NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up -pakkauksen (Macherey-Nagel) ohjeiden mukaisesti. Puhdistuksen jälkeen näytteiden konsentraatiot mitattiin Thermo Scientificin NanoDrop-mittauslaitteella ja näytteet pakastettiin -20°C.

2.6 Kloonaus

Vektorien kloonaukseen käytettiin Takara Bion In-Fusion® HD Cloning Kit -protokollaa. Kloonauksessa käytettiin 50 ng linearisoitua vektoria eli kohdan 2.4. PCR 1:n reaktiotuotetta. Puhdistettua ANO7- tai GFP-geenin PCR-fragmenttia käytettiin emäsparien määrän perusteella 2:1 suhteessa vektoriin. Käytetyt DNA-määrät esitetään taulukossa 3. Kloonausreaktion kokonaistilavuus oli 10 µl. Reaktioita inkuboitiin 15 minuuttia 50 °C lämpöhauteessa, minkä jälkeen ne jäädytettiin jäällä ja pakastettiin -20°C:seen.

Taulukko 3 Kloonausreaktioissa käytetyt DNA-määrät.

Fragmentin pituuden suhde vektorin pituuteen tuli olla 2:1. Vektori oli kooltaan 5348 bp, ja PCR-fragmenttien kokoja verrattiin siihen.

| | Fragmentin koko | Tarvittava DNA-määrä |
|------------------------|-----------------|----------------------|
| Kokonainen ANO7 | 2799 bp | 52,3 ng |
| ANO7 N-deleetio | 1809 bp | 33,8 ng |
| ANO7 C-deleetio | 2631 bp | 49,2 ng |
| ANO7 N- ja C-deleetiot | 1641 bp | 30,7 ng |
| GFP | 717 bp | 13,4 ng |

2.7 Bakteerien transformaatio ja plasmidien puhdistus

Kompetentit bakteerisolut (Stellar Competent Cells, Takara Bio) sulatettiin jäällä, minkä jälkeen jokaista In-Fusion reaktiotuotetta sekoitettiin 2,5 µl yhteen 50 µl bakteerisoluja sisältävään putkeen. Näytteet sekä kontrolliputki siirrettiin jälle 30 minuutin ajaksi, jonka jälkeen niille annettiin 45 sekunnin lämpöshokki 42 °C:ssa. Lämpöshokista putket siirrettiin kahdeksi minuutiksi jälle, putkiin lisättiin 37 °C SOC-ravintonestettä ja niitä inkuboitiin

tunnin ajan 37 °C ravistelijassa. Jokaisesta putkesta siirrettiin sen jälkeen bakteereja kasvatusmaljoille. Aiemmin valmistetuilla kasvatusmaljoilla oli LB-agaria, johon oli lisätty 100 µg/ml ampicilliinia. Bakteerien annettiin kasvaa yön yli 37 °C:ssa.

Pesäkkeen kloonausta varten jokaiselta viideltä näytemaljalta siirrettiin yksi bakteeripesäke kasvatusputkeen. Kasvatusputkissa oli LB-ravintonestettä, johon oli lisätty 100 µg/ml ampicilliinia. Putkien annettiin kasvaa yön yli 37 °C ravistelijassa. Seuraavana päivänä plasmidi-DNA:t puhdistettiin Nucleospin® Plasmid EasyPure -pakkauksen (Macherey-Nagel) protokollan mukaisesti. Puhdistetut DNA-tuotteet pakastettiin -20°C:seen.

2.8 Plasmidien tarkistus kaksoisdigestiolla

Plasmidien tarkastamiseksi käytettiin kahta eri restriktioentsyymiä, SacI ja HindIII. Restriktioreaktiot valmistettiin ThermoFisherin FastDigest-protokollan mukaisesti (ThermoFisher 2024c). Digestoitavan plasmidi-DNA:n määrä oli 500 ng. Restriktioreaktiot suoritettiin 37 °C lämpöhauteessa viiden minuutin ajan, minkä jälkeen reaktioputkiin lisättiin Gel Loading Dye Purple 6x -latausväriä ja näytteet ajettiin 0,8 % agarosigeelille 100 V jännitteellä. Geeli kuvattiin ChemiDoc-laitteella.

2.9 Puhdasviljelmien valmistus

Kohdan 2.7. viimeisen päivän bakteerikasvatuksista tehtiin puhdasviljelmät, jotta voitiin olla varmoja, että lopulliset plasmidit eristettäisiin vain yhdestä bakteerista peräisin olevasta pesäkkeestä. Näytteistä levitettiin bakteereja sauvalla LB-agarmaljoille siksakin muotoon, ja maljat siirrettiin yön yli kasvamaan 37 °C:seen. Seuraavana päivänä joka maljalta siirrettiin yksittäinen pesäke kasvatusputkeen LB-ravintonesteseen (sis. 100 µg/ml ampicilliini) ja uudestaan yön yli 37 °C:seen kasvamaan. Bakteerien annettiin kasvaa noin 16 tunnin ajan, ja lopuksi niistä siirrettiin bakteereja kahteen pakastusputkeen steriilin 60 % glyserolin kanssa ja näytteet pakastettiin -80 °C:seen.

2.10 Miniprep- ja midiprep-näytteiden valmistus

Pakastetuista näytteistä valmistettiin Macherey-Nagelin Nucleospin® Plasmid Transfection-grade -pakkauksen ohjeiden mukaisesti miniprep-näytteet, ja näytteiden DNA-konsentraatio mitattiin NanoDrop-laitteella. Miniprep-näytteet kaksoisdigestoitiiin SacI- ja HindIII-restriktioentsyymeillä kuten kohdassa 2.8. ja pätkät ajettiin 0,8 % agarosigeelille, joka kuvattiin ChemiDoc-laitteella kuten aikaisemmin. Miniprep-näytteet lähetettiin kaupalliseen sekvensointipalveluun sekvensoitaviksi. Sekvensoinnissa käytetyt alukkeet on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4 Inserttien sekvensointiin käytetyt alukkeet.

| Insertti | Käytetyt alukkeet |
|------------------------|--|
| Täyspitkä ANO7 | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-GCAGGTCATCAACAACATGCAG-3' 5'-TGGAATCTTCTTGCCATCCGC-3' 5'-AACTGCAGCACCATTTCAG-3' 5'-TGCTTCCTGGTGTTCAGA-3' 5'-GTGCATGTCTGTTCTGTCCC-3' 5'-GAACAGACATGCACAGGACC-3' 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' |
| ANO7 N-deleetio | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-GCAGGTCATCAACAACATGCAG-3' 5'-TGGAATCTTCTTGCCATCCGC-3' 5'-AACTGCAGCACCATTTCAG-3' 5'-TGCTTCCTGGTGTTCAGA-3' 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' |
| ANO7 C-deleetio | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-GCAGGTCATCAACAACATGCAG-3' 5'-TGGAATCTTCTTGCCATCCGC-3' 5'-AACTGCAGCACCATTTCAG-3' 5'-TGCTTCCTGGTGTTCAGA-3' 5'-GTGCATGTCTGTTCTGTCCC-3' 5'-GAACAGACATGCACAGGACC-3' 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' |
| ANO7 N- ja C-deleetiot | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-GCAGGTCATCAACAACATGCAG-3' 5'-TGGAATCTTCTTGCCATCCGC-3' |

| | |
|-----|--|
| | 5'-AACTGCAGCACCATTTCAG-3' 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' |
| GFP | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3' |

Bakteeriantipulleista, jotka oli pakastettu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen, raaputettiin jokaisesta bakteerista yhteen LB-ravintonestettä (lisätty $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampicilliini) sisältävään kasvatusputkeen. Bakteerien annettiin kasvaa $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ravistelijassa viiden tunnin ajan, minkä jälkeen niitä siirrettiin putkesta jatkokasvatukseen 1000 ml erlenmeyer-pulloon (LB-media, $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ampicilliini). Pullot siirrettiin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ravistelijaan yön yli ja seuraavana päivänä bakteerikasvatuksista valmistettiin midiprep-näytteet Macherey-Nagelin NucleoBond® Xtra Midi Plus Kit -paketin ohjeiden mukaisesti. Midiprep-näytteet digestoitettiin SacI- ja HindIII-entsyymeillä kuten kohdassa 2.8.

2.11 PC-3-solujen toinen testitransfektio ja Western Blot

Ennen varsinaista transfektiota midiprep-plasmideilla niillä tehtiin ensin yksinkertaisempi transfektio- ja Western Blotting -testi. Testitransfektio suoritettiin 12-kuoppalevyllä, jonka viiteen kuoppaan siirrettiin jokaiseen noin $110\text{ }000$ solua ja lisättiin F12-K-kasvatusmediaa siten, että kokonaistilavuudeksi tuli 2 ml . Solujen annettiin kiinnittyä yön yli, jonka jälkeen transfektio tehtiin viidellä eri plasmidilla Scientificin Lipofectamine™ 3000 -transfektiooliuoksia sekä -protokollaa käyttäen kuten kohdassa 2.2.1. Käytetyt plasmidit näkyvät taulukossa 5. Transfektoidut solut siirrettiin yön yli kasvatusolosuhteisiin.

Taulukko 5 Transfektiossa käytetyt plasmidikonstruktit.

N-terminuksen poistamisella tarkoitetaan, että proteiinin ensimmäisen transmembraanialueen ulkopuolista N-terminaalista päätä koodaava geenialue on poistettu. Vastaavasti C-terminuksen poistaminen tarkoittaa, että viimeisen transmembraanialueen ulkopuolista C-terminaalista päätä koodaava geenialue on poistettu.

| Plasmidi | Plasmidin nimi | Geeni, joka plasmidiin on liitetty |
|----------|------------------------------|------------------------------------|
| TP | pcDNA-ANO7 | Kokonainen ANO7 |
| -N | pcDNA-ANO7- Δ 1-331 | ANO7, josta poistettu N-terminus |
| -C | pcDNA-ANO7- Δ 878-933 | ANO7, josta poistettu C-terminus |

| | | |
|-------|----------------------------|--|
| -N,-C | pcDNA-ANO7-Δ1-331-Δ878-993 | ANO7, josta poistettu N- ja C-terminus |
| GFP | pcDNA-EGFP | GFP |

Seuraavana päivänä GFP-plasmideilla transfektoituja soluja tarkasteltiin EVOSM5000TM-kuvauslaitteella. Kaikista kuopista poistettiin media ja ne huuhdeltiin kahdesti kylmällä pesupuskurilla (fosfaattipuskuroitu suolaliuos). Kuoppiin lisättiin 2x Laemmli + β ME -liuosta (Bio-Rad), solut irrotettiin raapimalla ja solut sisältävä liuos siirrettiin eppendorf-putkiin. Näytteille tehtiin sonikaatio Bandelin Sonopuls -laitteella (Am 50 %, ProgNo2, aika 1 minuutti, 3 sekunnin sonikointi ja 3 sekunnin tauko). Proteiinigeelissä käytettiin valmiiksi valettua Mini-PROTEAN® TGXTM- geeliä. Lysaatin proteiinkonsentraatiota ei laskettu, vaan jokaista viittä näytettä ajettiin 30 μ l geelille. Proteiinit siirrettiin geeliltä Immobilon®-P-membraanille 4 °C:ssa yön aikana.

Seuraavana päivänä membraani värjättiin Ponceau S -väriaineella ja kuvattiin skannerilla. Membraani pestiin, siirrettiin maitoliuoksessa ravisteluun ja pestiin uudelleen kuten kohdassa 2.2.3. Vastaavasti membraani siirrettiin anti-ANO7-vasta-aineen (1:1000, 5 % naudan seerumialbumiini, 0,01 % natriumatsidi) kanssa pyörimään yön yli kuten kohdassa 2.2.3.

Aamulla membraani pestiin neljästi viiden minuutin ajan pesupuskurilla. Sekundaarinen vasta-aineliuos valmistettiin kuten kohdassa 2.2.3. Membraani siirrettiin reilun tunnin ajaksi huoneenlämpöön pyörimään vasta-aineliuokseen, minkä jälkeen membraani pestiin neljästi viiden minuutin ajan pesupuskurilla. Membraani valmistettiin kuvausta varten Western Bright TM Quantum Kit -pakkauksella kuten kohdassa 2.2.3 ja se kuvattiin lopuksi ChemiDoc-laitteella.

2.12 PC-3-solujen varsinainen transfektio, koimmunopresipitaatio ja Western Blot

Transfektiota varten viidelle kasvatusmaljalle siirrettiin jokaiselle noin 2 735 000 solua. F12-K-kasvatusmediaa lisättiin siten, että maljalla olevan nesteen kokonaistilavuus oli 10 ml. Maljat siirrettiin kasvatusolosuhteisiin yön yli. Seuraavana päivänä transfektio suoritettiin

Scientificin Lipofectamine™ 3000 -transfektiooliuoksia sekä -protokollaa käyttäen kuten kohdassa 2.2.1. Transfektiossa käytettiin viittä eri plasmidia (taulukko K) ja jokaiselle maljalle transfektoitiin eri plasmidi. Transfektoidut solumaljat siirrettiin yön yli kasvatusolosuhteisiin.

Seuraavana päivänä pcDNA-EGFP-plasmidilla transfektoitua maljaa tarkasteltiin EVOSM5000™-kuvauslaitteella. Maljat siirrettiin jäälle, kasvatusneste poistettiin ja maljat pestiin kahdesti jääkylmällä pesupuskurilla. Maljoille lisättiin lyysispuskuria ja solut raavittiin eppendorf-putkiin kuten kohdassa 2.2.2. Näytteitä fuugattiin täysillä kierroksilla 30 minuuttia +4 °C:ssa (Centrifuge 5424 R) ja supernatantit siirrettiin uusiin eppendorf-putkiin. Solulysaattien proteiinikonsentraatio määritettiin Pierce™ BCA Protein Assay Kit -pakkauksen ohjeiden mukaisesti kuten kohdassa 2.2.2.

Koimmunopresipitaatiota varten näytteiden kokonaistilavuudeksi valittiin 750 µl, ja 1000 µg proteiinia sisältävä määrä näytettä siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen. 1 % CHAPS -lyysispuskuria lisäämällä saavutettiin haluttu kokonaistilavuus. Jokaiseen putkeen lisättiin 2 µg anti-ANO7-vasta-ainetta (AB1853). Putket siirrettiin 4 °C:een pyörimään yön yli. Seuraavana päivänä näytteiden sisältämät, vasta-aineeseen tarttuneet proteiinit puhdistettiin Dynabeads™-helmien avulla kuten osiossa 2.2.2.

Proteiinigeelissä alkuperäisiä näytteitä ja anti-ANO7-vasta-aineella koimmunopresipitoituja näytteitä ajettiin siten, että geelille ladattiin 30 µg proteiinia jokaisesta alkuperäisestä näytteestä ja 30 µl immunopresipitaationäytteistä. Ajon jälkeen proteiinit siirrettiin membraanille kuten osiossa 2.2.3. Aamulla membraani värjättiin Ponceau S -väriaineella ja kuvattiin skannerilla, minkä jälkeen se siirrettiin ravisteluun 5 % maitoliuoksessa. Sen jälkeen membraani pestiin kolmesti viiden minuutin ajan pesupuskurilla, ja membraani siirrettiin anti-MYOF-vasta-aineliuoksen sisältävään putkeen kuten osiossa 2.2.3. Putki siirrettiin 4 °C:een pyörimään yön yli.

Seuraavana päivänä membraani pestiin neljästi viiden minuutin ajan pesupuskurilla. Sekundaarinen vasta-aineliuos (1:20000 Goat Anti-Rabbit IgG) valmisteltiin kuten kohdassa 2.2.3. ja membraani siirrettiin vasta-aineliuoksessa ravistelijaan reilun tunnin ajaksi huoneenlämpöön. Membraani pestiin ja valmisteltiin ChemiDoc-kuvaukseen Quantum Kit -paketilla kuten kohdassa 2.2.3.

Kuvauksen jälkeen membraani pestiin pesupuskurilla ja peitettiin Restore™ PLUS Western Blot -puhdistuspuskuriin paketin ohjeiden mukaisesti kuten kohdassa 2.2.3. Kuten kohdassa 2.2.3., membraani siirrettiin ravisteluun 5 % maitoliuokseen ja pestiin, minkä jälkeen se siirrettiin anti-ANO7-vasta-aineliuoksessa pyörimään yön yli 4 °C:seen. Seuraavana päivänä membraani pestiin jälleen neljästi ja siirrettiin ravistelijaan sekundaarisen vasta-aineen (Goat Anti-Rabbit IgG) kanssa reilun tunnin ajaksi. Membraani pestiin neljästi, valmisteltiin Quantum Kit -paketilla ja kuvattiin ChemiDoc-laitteella kuten aiemmin.

2.13 Toinen toisto: PC-3-solujen transfektio, koimmunopresipitaatio ja Western Blot

Kohdan 2.12. koeasetelma toistettiin uudelleen pienillä muutoksilla. Jokaiselle kasvatusmaljalle maljattiin noin 3 miljoonaa solua ja jokaisella viidellä plasmidilla transfektoitiin kolme maljaa, jotta saatiin riittävästi solulysaattia. Transfektiot, solujen lyysaus ja proteiinikonsentraation mittaaminen suoritettiin samalla tavalla kuin kohdassa 2.12.

Koimmunopresipitaatio ja Dynabeads™-käsittely toistettiin hieman eri tavalla kuin aikaisemmin. Proteiinikonsentraation mittauksen jälkeen, ennen vasta-aineen lisäämistä, 1000 µg proteiinia jokaisesta solulysaatista siirrettiin kolmeen 1,5 ml eppendorf-putkeen yhdessä Dynabeads™-helmien kanssa ja putket siirrettiin 30 minuutin ajaksi 4 °C:seen pyörimään. Tämän jälkeen solulysaatit siirrettiin magneetilla puhtaisiin 1,5 ml putkiin ja Dynabeads™-helmiin tässä vaiheessa tarttuneet proteiinit hävitettiin, jotta ne eivät häiritse varsinaista koimmunopresipitaatiota. Jokaiselle solulysaatille tehtiin kolme eri vasta-ainekäsittelyä: yhteen putkeen lisättiin anti-ANO7-vasta-ainetta, toiseen kontrollivasta-aineeksi Goat Anti-Rabbit IgG ja kolmas sisälsi pelkkää solulysaattia. Putket siirrettiin yön yli pyörimään 4°C.

Koimmunopresipitaatio, proteiinigeelija ja Western Blot suoritettiin kuten kohdassa 2.12. sillä erolla, että käsiteltäviä näytteitä oli nyt enemmän ja membraaneja kaksi. Molemmat membraanit kuvattiin Ponceau S -värjäyksen jälkeen skannerilla ja anti-MYOF- ja anti-ANO7-blottausten jälkeen ChemiDoc-laitteella.

2.14 Viimeinen Western Blot

Osalle kohdassa 2.13. valmistetuille näytteille tehtiin vielä uusi proteiinigeelija ja Western Blot kuten kohdassa 2.12. Western Blot -analyysissä käytettiin niitä näytteitä, joille oli tehty koimmunopresipitaatio ANO7-vasta-aineella sekä solylysaatteja. Myof- ja anti-ANO7-blottausten jälkeen membraanit kuvattiin ChemiDoc-laitteella.

3 Tulokset

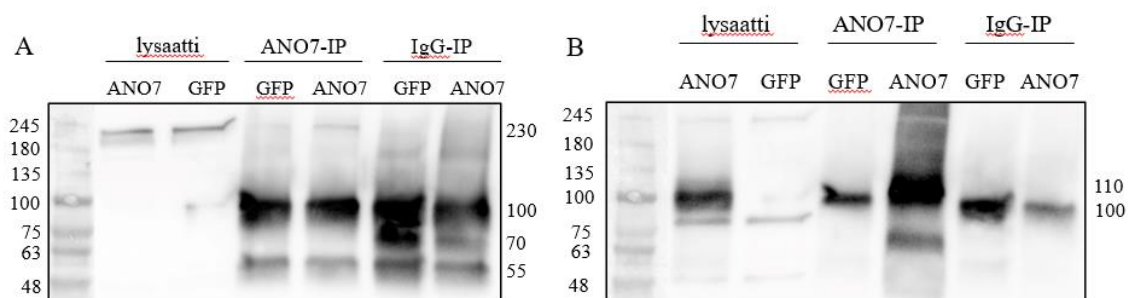
3.1 Alun testitransfektio

Alun testitransfektion tarkoituksena oli selvittää, esiintyvätkö myoferliini ja anoktamiini 7 koimmunopresipitaatiossa yhdessä, kun ANO7 transfektoidaan plasmidissa PC-3-soluihin. Myoferliini on kooltaan 230 kDa, eli proteiinien koimmunopresipitaation onnistuessa 230 kDa proteiini pitäisi näkyä anti-myoferliiniblottauksessa niissä näytteissä, joiden transfektio tehtiin ANO7-geenin sisältävillä plasmideilla. Jos plasmidi tuottaa ANO7-proteiinia soluissa, näkyy anti-ANO7-blottauksessa noin 100 kDa proteiini niissä näytteissä, joiden transfektio tehtiin ANO7-geenin sisältävillä plasmideilla.

Membraanille suoritettiin blottaus myoferliinin sekä anoktamiinin vasta-aineilla (kuva 6). Anti-MYOF-blottauksessa sekä ANO7- että GFP-plasmideilla transfektoitujen solujen lysaateissa näkyy noin 230 kDa kokoinen molekyyli, eli kummassakin lysaatissa on myoferliinia. ANO7-immunopresipitaatiossa ANO7-plasmidilla transfektoidussa näytteessä on selkeä myoferliinisignaali, kun taas GFP-plasmidilla transfektoidussa näytteessä myoferliinin 230 kDa signaali on selkeästi heikompi. IgG-IP-näytteissä ei näy kummassakaan 230 kDa myoferliinin signaalia, mutta muita signaaleja näkyy. ANO7-IP- ja IgG-IP-näytteissä näkyvät pienemmät signaalit ovat todennäköisesti proteiineja, joihin vasta-aine on epäspesifisesti sitoutunut tai vasta-aineiden signaaleja. Jos IgG-molekyylit olisivat denaturoituneet täysin, niiden koko olisi 50 kDa ja 25 kDa. ANO7-proteiini ei kestä 95°C:seen lämmittämistä, minkä vuoksi kaikki geelille ajetut näytteet on lämmitetty vain 50°C:seen. Tämän vuoksi IgG-molekyylit eivät välttämättä ole täysin denaturoituneet ja näkyvät siksi isompana signaalina geelillä.

Anti-ANO7-blottauksessa ANO7-plasmidin lysaatissa näkyy 100 kDa kohdalla vahva signaali, jota ei näy GFP-plasmidilla transfektoiduissa näytteissä. Tämä signaali on ANO7-proteiini. Kummassakin lysaatissa näkyy myös noin 80 kDa signaali, joka on luultavasti jotain epäspesifistä taustaa. ANO7-immunopresipitaatiossa GFP-plasmidilla ainoa näkyvä signaali oli noin 100 kDa, joka todennäköisesti johtuu ANO7-vasta-aineesta. Sama signaali on myös ANO7-IP:n ANO7-näytteessä. ANO7-plasmidin ANO7-immunopresipitaatiossa näkyvät

muut vahvat signaalit ovat kooltaan noin 110 kDa ja 70 kDa. 110 kDa signaali on ANO7-proteiini, kun taas 70 kDa signaali on mahdollisesti jokin ANO7-proteiinin variantti. IgG-koimmunopresipitaatiossa kummallakin plasmidilla näkyy vahva signaali noin 100 kDa kohdalla, mikä aiheutuu todennäköisesti käytetyistä vasta-aineista.



Kuva 6 A. A. ANO7-koimmunopresipitaation Western Blot anti-MYOF-vasta-aineella. Vasemmalla näkyvät numerot ovat molekyylin koko kilodaltoneina (kDa). Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria (Nippon Genetics). B. ANO7-koimmunopresipitaation Western Blot anti-ANO7-vasta-aineella. Vasemmalla näkyvät numerot ovat molekyylin koko kilodaltoneina (kDa). Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria.

3.2 ANO7-proteiinin N- ja C-terminaalisten päiden ennustaminen

DeepTMHMM-työkalun avulla ennustettiin proteiinisekvensistä ANO7-proteiinin ensimmäinen ja viimeinen transmembraanialue sekä niiden ulkopuolelle jäävät aminohapot eli proteiinin N- ja C-terminaaliset päät (kuva 7). Tätä ennustetta verrattiin myös kohdassa 2.3. mainittuihin muiden työkalujen ennusteisiin transmembraanidomeeneista. Lopulliset poistettavat päät jättävät kaikkien neljän ennusteen transmembraanialueiden ensimmäisen ja viimeisen aminohapon lopulliseen proteiiniin.

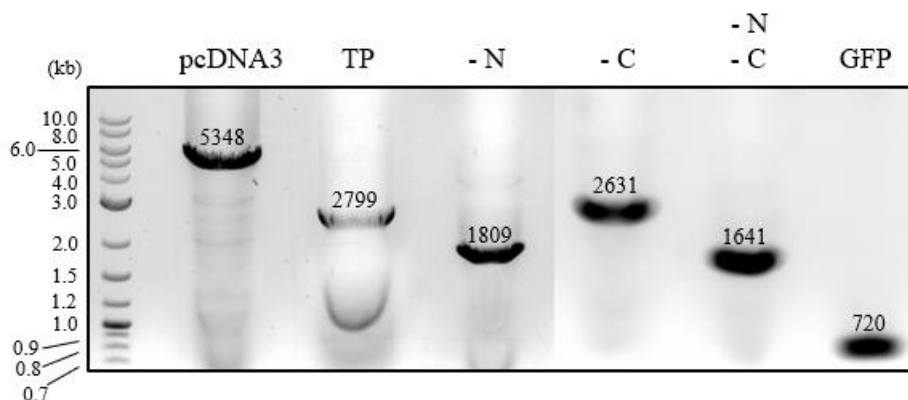
>NP_001357623.1

```
MLRRRAQEEDSTVLIDVSPPEAEKRGSYGSTAHASEPGGQOAAAACRAGSPAKPRIADFVLVWEEDLKLDR
QQDSAARDRTDMHRTWRETFLDNLRAAGLCVDQDQVDQDGNNTVHYALLSASWAVLCYYAEDLRLKPLQE
LPNQASNWSAGLLAWLGI PNVLLEVVPDVPPEYYSCRFRVVKLPRFLGSDNQDTFFTSTKRHQILFEILA
KTPYGHEKKNLLGIHQLLAEGVLSAAFPLHDGPFKTPPEGPQAPRLNQRQVLFQHWARWGKWNKYQLDH
VRRYFGEKVALYFAWLGFYTGWLLPAAVVGTLVFLVGCFLVFSDIPTQELCGSKDSFEMCPLCLDCPFWL
LSSACALAQAGRLFDHGGTVFFSLFMALWAVLLEWYKRRKSATLAYRWDCSDYEDTEERPRPQFAASAPM
TAPNPITGEDEPYFPERSRARRMLAGSVVIVVMVAVVVMCLVSIILYRAIMAVVSRSGNTLLAAWASRI
ASLTGSSVNLVFIILISKIYVSLAHVLTRWEMHRTQTKFEDAFTLKVFIQFVNFYSSPVYIAEFKGRFV
GYPGNYHTLFGVRNEECAAGGCLIELAQELLVIMVGKQVINNMQEVLI PKLKGWWQKFRRLRSKKRKAGAS
AGASQGPWEDDYELVPCGLFDEYLEMVLQFGFVTIFVAACPLAPLFALLNNWVEIRLDARKFVCEYRRP
VAERAQDIGIWFHILAGLTHLAVISNAFLAFSSDFLPRAYYRWTRAHDLRGFLNFTLARAPSSFAAAHN
RTCRYRAFDDDGHSYQTYWNLLAIRLAFVIVFEHVVFSVGRLLDLLVDPDIPE SVEIKVKREYYLAKQAL
AENEVLFGTNGTKDEQPEGSELSSHWTPTVTPKASQLQQ
```

Kuva 7 ANO7-proteiinin (NP_001357623.1, National Center for Biotechnology Information 2022d) proteiinisekvenssi kokonaisuudessaan sekä transmembraanialueet ja proteiinin terminaaliset päät värjättyinä. Harmaalla värjättyä DeepTMHMM-työkalulla ennustetut kahdeksan transmembraanialuetta (Hallgren ym. 2022). Sinisellä värjättyä poistettava N-terminaalinen pää ja keltaisella värjättyä poistettava C-terminaalinen pää.

3.3 Plasmidikonstruktioiden PCR-reaktiot

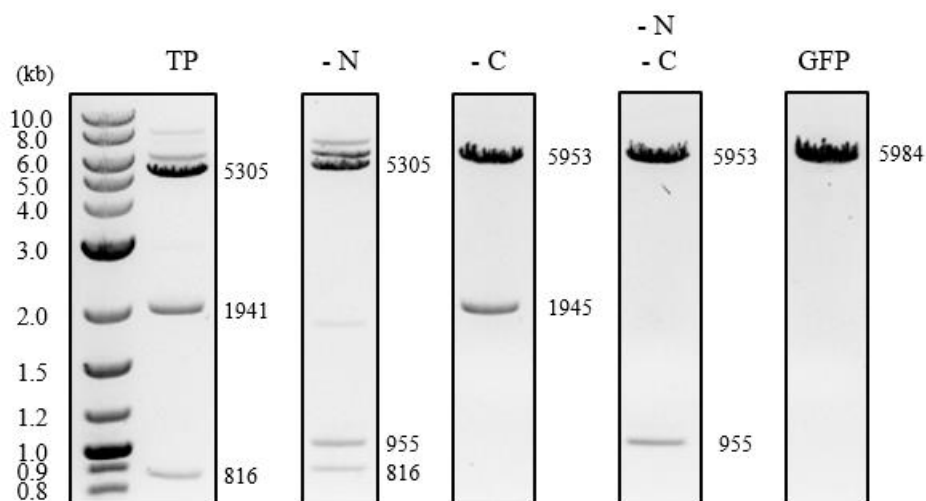
PCR-reaktioiden onnistuminen arvioitiin 0,8 % agarosigeeliltä (kuva 8). Ensimmäisessä reaktiossa monistettiin pcDNA3-vektoria, ja muissa reaktioissa monistettiin vektoriin liitettävää ANO7- tai GFP-inserttikonstruktiota. Kuvaan 8 on merkittynä monistettujen konstruktioiden koot emäksinä. Kuvaan merkitty TP tarkoittaa täyspitkää ANO7-geeniä. -N tarkoittaa, että geenistä on poistettu ANO7-proteiinin N-terminaalista päätä koodaava osa. Vastaavasti geenistä -C on poistettu C-terminaalista päätä koodaava osa, ja -N,-C on poistettu kumpaakin päätä koodaava osa. GFP on GFP:tä koodaava kontrolligeeni.



Kuva 8 PCR-reaktiotuotteet ajettuna 0,8% agarosigeelille. Vasemmalla 1 kb molekyylipainomarkkeri (Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder). Reaktiotuotteiden koot emäksinä näkyvät kuvassa.

3.4 Plasmidien tarkistaminen kaksoisdigestiolla

Plasmidien restriktioreaktioissa käytettiin SacI- ja HindIII-restriktioentsyymejä, koska molemmilla on vähintään yksi restriktiokohta valmistetuissa plasmideissa joko vektorin tai insertin alueella. Yhdessä entsyymit restriktioivat plasmidin vähintään kahdesta kohdasta. Restriktioreaktiotuotteista ajettu geeli ja havaittujen pätkien koot esitetään kuvassa 9. Restriktioreaktiotuotteiden odotetut koot esitetään taulukossa 6. Kaikista näytteistä havaitaan geelillä oikean kokoisia pätkiä. 84 bp ja 88 bp kokoisia pätkiä ei havaita niiden pienen koon vuoksi. Ylimääräiset pätkät, jotka kuvassa näkyvät, johtuvat todennäköisesti epätäydellisestä digestiosta.



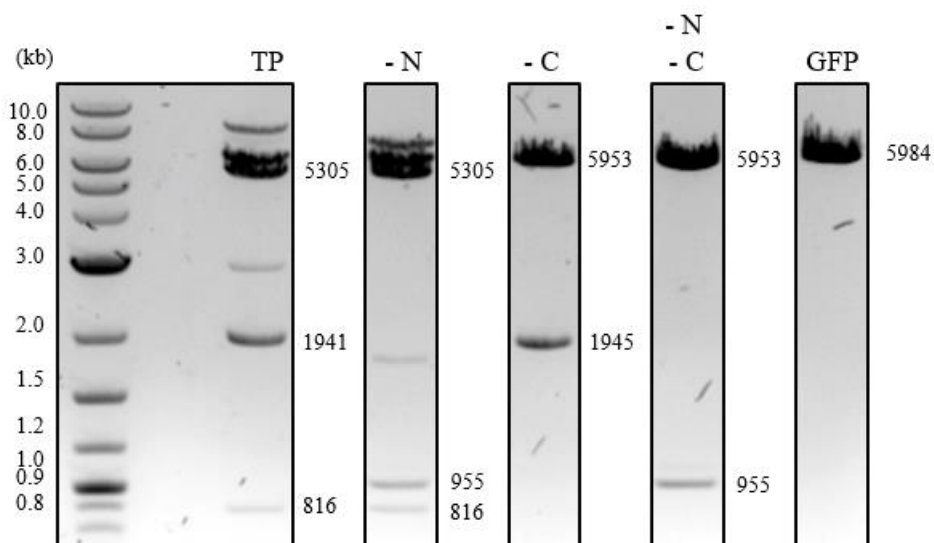
Kuva 9 Re restriktioreaktiotuotteet ajettuna 0,8% agarosigeelille. Vasemmalla 1 kb molekyylipainomarkkeri (Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder). Reaktiotuotteiden koot emäksinä näkyvät kuvassa.

Taulukko 6 SacI- ja HindIII-restriktioentsyymien pilkkomien plasmidifragmenttien odotetut koot.

| Plasmidi | Odotettujen restriktiofragmenttien koot (bp) |
|----------------|--|
| Täyspitkä ANO7 | 5305, 1941, 816, 88 |
| -N | 5305, 955, 816, 84 |
| -C | 5953, 1945, 84 |
| -N,-C | 5953, 955, 84 |
| GFP | 5984, 84 |

3.5 Miniprep- ja midiprep-näytteiden kaksoisdigestiot

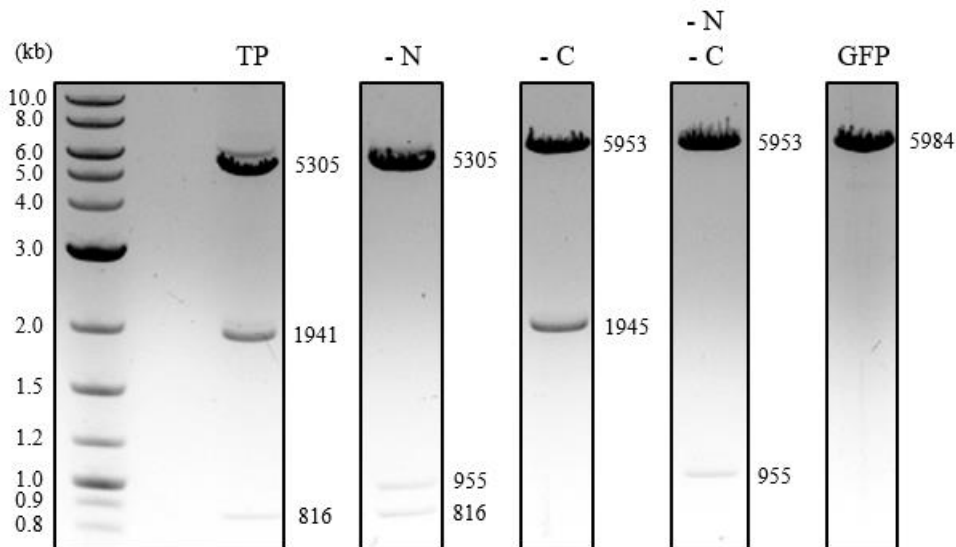
Kun transfektoiduista bakteereista oli ensin valmistettu puhtasviljelmät, niistä valmistettiin miniprep-näytteet. Miniprep-näytteiden restriktioreaktioista ajettu geeli esitetään kuvassa 10. Jokaisesta reaktiosta havaitaan odotettuja vastaavat pätkät. Tässäkin tapauksessa havaitut ylimääräiset pätkät johtuvat siitä, että digestio ei ole ollut täydellistä.



Kuva 10 Miniprep-restriktioreaktiotuotteet ajettuna 0,8% agarosigeelille. Vasemmalla näkyy 1 kb molekyyliainomarkkeri (Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder). Restriktioreaktioista muodostuneet pätkät geelillä ja niiden koot emäksinä näkyvät kuvassa.

Kun miniprep-näytteiden sekvensointitulokset saapuivat, inserttien sekvenssit linjattiin toistensa kanssa, jolloin jokaisesta plasmidista saatiin muodostettua koko insertin kattava sekvenssi. Sekvenssin avulla tarkistettiin, että plasmidien sekvenssit olivat halutunlaiset.

Midiprep-näytteiden kaksoisdigestion tuloksia tarkastellaan 0,8 % agarosigeelillä (kuva 11). Jokaisesta reaktiosta saadaan näkyviin odotetun kokoiset pätkät. Ylimääräisiä pätkiä ei näy muissa kuin täyspitkän ANO7:n näytteessä, jossa näkyvä ylimääräinen pätkä johtuu epätäydellisestä digestiosta.



Kuva 11 Midiprep-restriktioreaktiotuotteet ajettuna 0,8% agarosigeelille. Vasemmalla näkyy 1 kb molekyylipainomarkkeri (Quick-Load® 1 kb Plus DNA Ladder). Restriktioreaktioista muodostuneet pätvät geelillä ja niiden koot emäksinä näkyvät kuvassa.

3.6 Toinen testitransfektio

Toisen testitransfektio tarkoitus on selvittää, tuottavatko valmistetut plasmidit ANO7-proteiinia, kun ne transfektoidaan PC-3-soluihin. Jokainen ANO7-proteiinikonstruktio on eri kokoinen, minkä vuoksi ne näkyvät Western Blotissa eri kokoisina signaaleina.

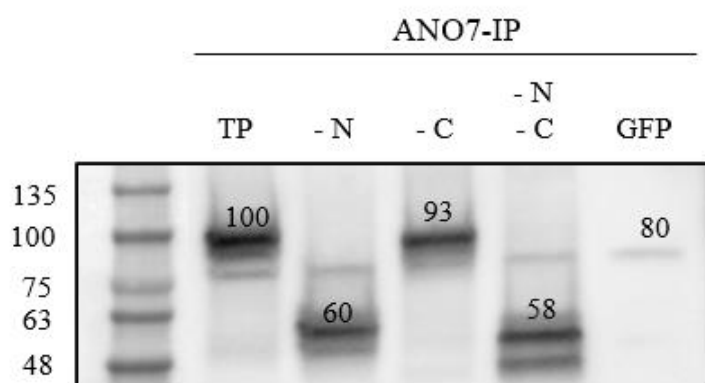
Bioinformatiikkatyökalun (Bioinformatics.org 2024) avulla arvioidut proteiinien odotetut koot esitetään taulukossa 7. Jos proteiinia tuotetaan solussa, pitäisi Western Blotissa näkyä vastaavan kokoinen signaali, kun blottaus on suoritettu ANO7-vasta-aineella.

Taulukko 7 ANO7-proteiinien odotetut koot.

Proteiinien koot on ennustettu bioinformatiikkatyökalulla ja ne on pyöristetty kilodaltonin tarkkuudella.

| Proteiinin rakenne | Proteiinin odotettu koko (kDa) |
|--------------------|--------------------------------|
| Täyspitkä ANO7 | 100 |
| -N | 68 |
| -C | 93 |
| -N,-C | 62 |

Membraanille suoritettiin blottaus anoktamiini 7:n vasta-aineella (kuva 12). Täyspitkän ANO7-geenin sisältävän näytteen vahvin signaali on 100 kDa eli täyspitkää proteiinia tuotetaan. -N-näytteen ANO7-signaali on kooltaan noin 60 kDa eli hieman odotettua pienempi. -C-näytteen ANO7-signaali vastaa odotettua 93 kDa. -N,-C-näytteen ANO7-signaali on kooltaan noin 58 kDa, eli myös hieman odotettua pienempi. Noin 80 kDa kokoinen proteiini näkyy kaikilla plasmideilla, minkä vuoksi sen voidaan olettaa olevan taustasignaali. Proteiinien todellinen liikkuminen geelillä voi riippua esimerkiksi sen kolmiulotteisesta rakenteesta, minkä vuoksi odotetut koot ovat vain arvioita. Voidaan kuitenkin olettaa, että tuotetut proteiinit ovat oikean kokoisia. Kaikissa ANO7-proteiinin sisältävissä näytteissä näkyy ANO7-proteiinin alapuolella kooltaan pienempiä ANO7:n eri proteiinimuotoja.



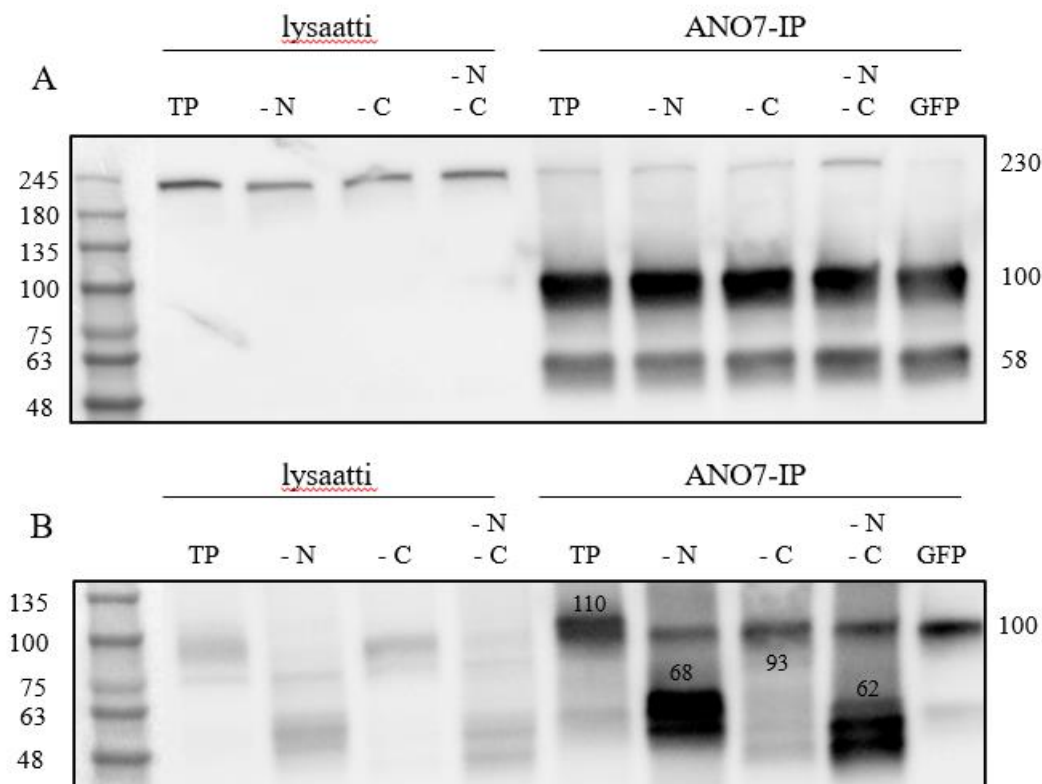
Kuva 12 Lysaattien Western Blot anti-ANO7-vasta-aineella. Vasemmalla näkyvät numerot ovat molekyylin koko kilodaltonneina (kDa). Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria.

3.7 Ensimmäinen transfektio

Koimmunopresipitaation tuloksia tarkasteltiin Western Blotting -menetelmällä. Membraanille suoritettiin blottaus myoferliinin sekä anoktamiini 7:n vasta-aineella (kuva 13). Myoferliinin vasta-aineella blotatessa kaikissa lysaateissa näkyy vahva signaali noin 230 kDa kokoisien molekyylin kohdalla eli kaikki lysaatit sisältävät myoferliinia. Myoferliinia tuotetaan soluissa itsestään, jolloin sitä on vapaana soluissa, eli tulos on odotettu. ANO7-immunopresipitaationäytteissä kaikissa neljässä ANO7-plasmidin transfektionäytteessä näkyy myoferliinin 230 kDa signaali, eli myoferliini koimmunopresipitoituu kaikkien ANO7-

proteiinikonstruktioiden kanssa. Kontrollinäytteessä näkyy myös heikko myoferliinin signaali ANO7-koimmunopresipitaation jälkeen. Kaikissa ANO7-IP-näytteissä näkyy voimakas signaali myös noin 100 kDa sekä 58 kDa kohdalla kuten ensimmäisessäkin testitransfektiossa ja siten nämä signaalit ovat todennäköisesti anti-ANO7-vasta-aineen signaaleja. -N,-C-näytteessä myoferliinin signaali on hieman voimakkaampi kuin muissa ANO7-näytteissä, mikä tarkoittaa, että siinä myoferliiniä on eniten. Myoferliini ei tämän perusteella sitoudu kumpaankaan ANO7-proteiinin terminaaliseen päähän, koska kun sen kumpikin pää on poistettu, koimmunopresipitoituu myoferliini edelleen ANO7-proteiinin kanssa. Myoferliinin sitoutumispaikka ANO7-proteiinissa on siis mahdollisesti jossain keskellä proteiinia.

Anoktamiini 7:n vasta-aineella blotatessa TP- sekä -C-lysaateissa näkyy haalea signaali noin 90 kDa kohdalla. -N- sekä -N,-C-lysaateissa näkyy vahvimmat signaalit 58 kDa kohdalla. ANO7-immunopresipitaationäytteissä kaikilla näytteillä näkyy noin 100 kDa kokoisen molekyylin signaali. Signaali ei ole ANO7, koska se näkyy myös GFP-näytteessä, joka ei sisällä ANO7-proteiinia. Signaali johtuu jostain muusta proteiinista, johon anti-ANO7-vasta-aine on epäspesifisesti sitoutunut ja sitten vetänyt sen alas, tai signaali on vasta-ainemolekyyli. Täyspitkän ANO7:n IP-näytteessä näkyy ANO7-proteiinin signaali noin 110 kDa kohdalla. -N-näytteessä ANO7-proteiinin signaali on noin 68 kDa eli odotetun kokoinen. -C-näytteen vahvin signaali on 100 kDa taustasignaali, mutta sen alapuolella näkyy hyvin haalea 93 kDa ANO7-proteiinin signaali. Saman näytteen lysaatissa on nähtävissä selkeä 93 kDa kokoinen ANO7-proteiini, eli soluissa on sitä tuotettu. -N,-C-näytteen ANO7-signaali on kooltaan noin 62 kDa eli odotetun kokoinen. -N- ja -N,-C-näytteiden ANO7-signaalien alapuolella olevat signaalit ovat samanlaiset kuin 3.6. kohdan testitransfektiossa eli ne ovat ANO7-proteiinin jotain pienempiä muotoja.



Kuva 13 A. ANO7-koimmunopresipitaation Western Blot myoferliinin vasta-aineella. Vasemmalla näkyvät numerot ovat molekyylin koko kilodaltoneina (kDa). Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria. B. ANO7-koimmunopresipitaation Western Blot anoktamiini 7:n vasta-aineella. Vasemmalla näkyvät numerot ovat molekyylin koko kilodaltoneina (kDa). Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria.

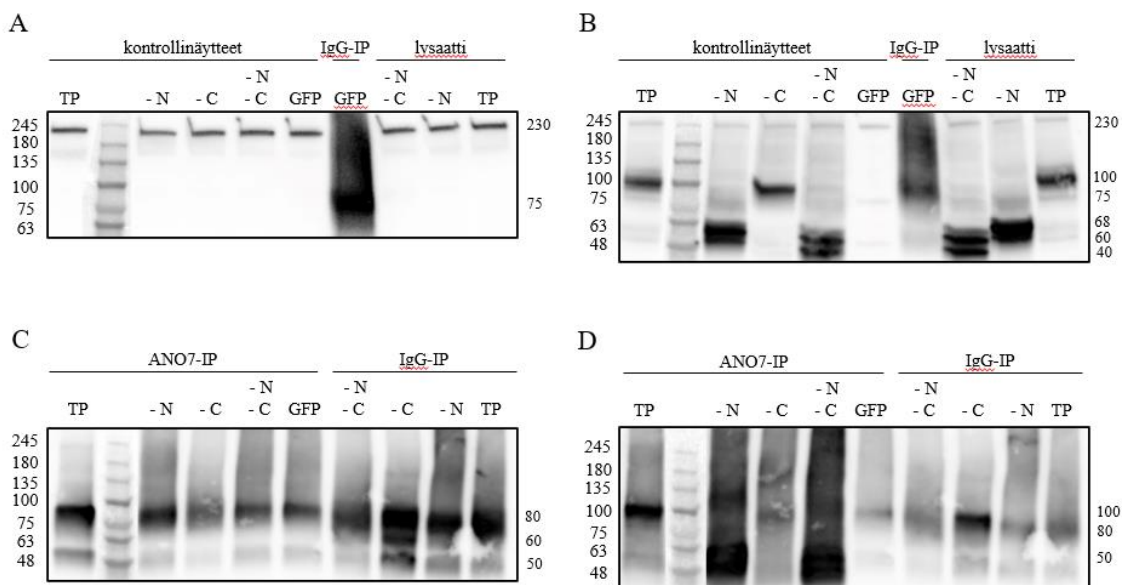
3.8 Toinen transfektio

Koimmunopresipitaation tuloksia tarkasteltiin Western Blotting -menetelmällä. Molemmille membraaneille suoritettiin blottaus myoferliinin sekä anoktamiini 7:n vasta-aineilla (kuva 14). Kuviin on merkitty oikeaan reunaan membraanilla näkyvien signaalien arvioidut koot. Kontrolli- ja lyaattinäytteissä on jokaisessa myoferliinin 230 kDa signaali, ja lisäksi kaikissa näkyy myös ANO7-proteiinin oikean kokoinen signaali anti-ANO7-blottauksessa.

Tutkielmani kannalta tärkein immunopresipitaatio on ANO7-IP. Myoferliinillä blotatessa ainoastaan täyspitkän ANO7-proteiinin kohdalla nähdään hyvin haalea 230 kDa myoferliinin signaali. Muissa ANO7-IP-näytteissä myoferliiniä ei nähdä, eli se ei ole transfektionäytteissä anoktamiini 7:ään sitoutuneena. IgG-IP-näytteissä näkyy noin 50–60 kDa:n välillä

vahvemmat signaalit kuin ANO7-IP-näytteissä. ANO7-IP-näytteistä -C-näytteen noin 80 kDa signaali on heikompi kuin muissa ANO7-IP- tai IgG-IP-näytteissä.

ANO7-vasta-aineella blotatessa kuvassa näkyy täyspitkälle 100 kDa ANO7-proteiinille vahva signaali, minkä vuoksi siinä voidaan olettaa olevan ANO7-proteiinia. IgG-IP:ssä täyspitkän ANO7-proteiinin näytteessä ei ole kyseistä signaalia, eli kokopitkän ANO7-näytteen ANO7-IP:ssä näkyvä 100 kDa on todennäköisesti oikea. -N-proteiinin kokoinen 68 kDa signaali näkyy ANO7-IP-näytteessä. -C-proteiinin odotettu koko on 93 kDa, ja sen kohdalla näkyy hyvin haalea signaali ANO7-IP:ssä. IgG-IP:n -C-näytteessä näkyy noin 93 kDa vahva signaali. Myös -N,-C-näytteessä näkyy odotetun kokoinen 62 kDa signaali. B-kohdan kontrollinäytteissä näkyy samat signaalit -C-näytettä lukuunottamatta. -C-proteiinin hyvin erilainen signaali ANO7- ja IgG-IP:ssä voisi kertoa siitä, että proteiini käyttäytyy poikkeavasti yhdessä immunoglobuliinien kanssa. IgG-IP:n -C-näytteen signaali on selkeästi voimakkaampi kuin muissa näytteissä, mikä voi johtua pipetointivirheestä.



Kuva 14 Western Blot myoferliinin (A,C) ja anoktamiini 7:n (B,D) vasta-aineilla. Vasemmalla näkyvät numerot ovat molekyylin koko kilodaltonneina (kDa). Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria.

A. Kontrollinäytteet, -N,-C-, -N- ja TP-lysaatit sekä IgG-IP GFP-näyte myoferliinin vasta-aineella blotattuna. Vahvin signaali on selkeä myoferliinia vastaava 230 kDa. IgG-IP GFP-näytteessä näkyvä vahva 75 kDa signaali on luultavasti IgG-molekyylejä.

B. Kontrollinäytteet, -N,-C-, -N- ja TP-lysaatit sekä IgG-IP GFP-näyte anoktamiini 7:n vasta-aineella blotattuna. Anoktamiini 7:n signaali näkyy lyaateissa ja kontrollinäytteissä oikeissa kohdissa: TP-näytteessä 100 kDa, -N-näytteessä 68 kDa, -C- näytteessä 93 kDa ja -N,-C-näytteessä 62 kDa. Ylimääräiset signaalit IgG-IP-näytteessä ovat vasta-ainemolekyylejä.

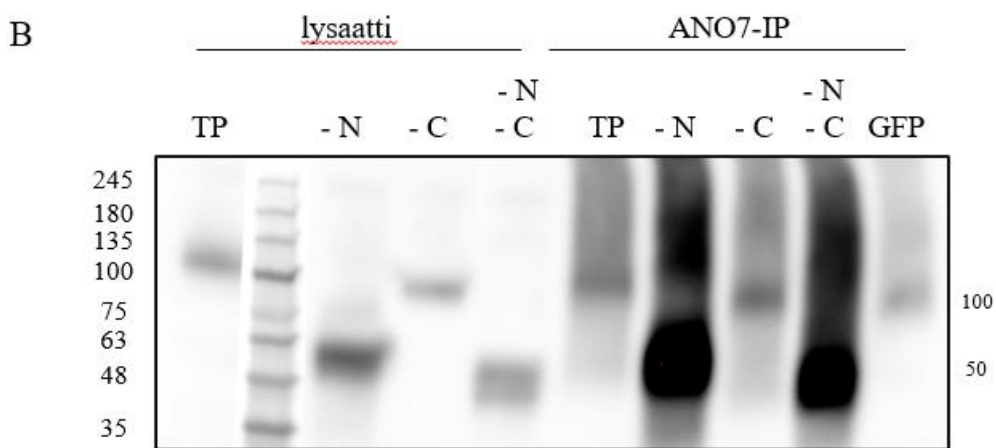
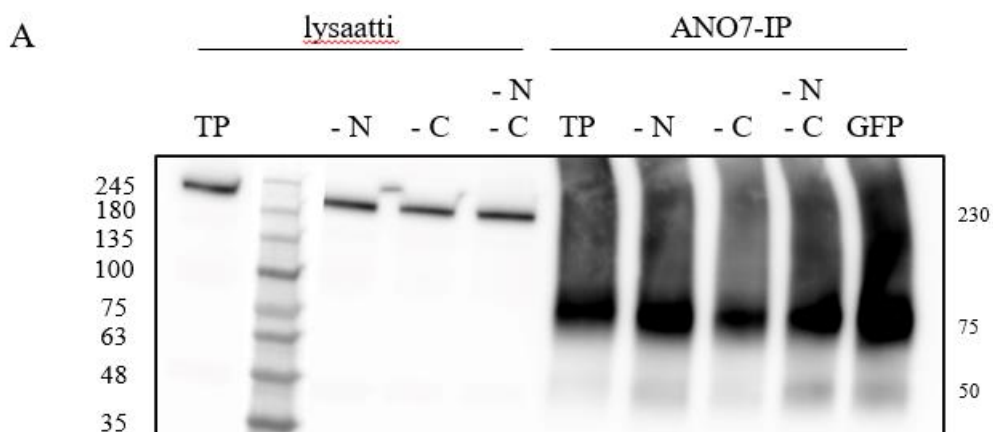
C. ANO7- ja IgG-immunopresipitaationäytteet myoferliinin vasta-aineella blotattuna. Western Blotting on epäonnistunut, koska 230 kDa myoferliini näkyy hyvin haaleana ainoastaan täyspitkän ANO7-näytteen kohdalla ja muissa ANO7-IP-näytteissä ei ollenkaan. Muut kuvassa näkyvät signaalit ovat taustaa sekä vasta-ainemolekyylejä.

D. ANO7- ja IgG-immunopresipitaationäytteet anoktamiini 7:n vasta-aineella blotattuna. Täyspitkää (100 kDa) ANO7-proteiinia saadaan näkyviin ANO7-immunopresipitaationäytteissä. -N- ja -N,-C-näytteissä näkyy myös oikean kokoiset (68 kDa ja 62 kDa) signaalit. ANO7-IP:n -C-näytteessä näkyy hyvin haalea signaali, joka näkyy kirkkaampana IgG-IP:ssä. Signaalit voivat olla esimerkiksi immunoglobuliineja, minkä vuoksi ne ovat erilaiset.

3.9 Western Blot -toisto

Western Blot toistettiin uudestaan, koska toisen transfektion tulokset ovat vaikeasti tulkittavissa ja Western Blot mahdollisesti epäonnistunut. Tuloksia tarkasteltiin Western Blotting -menetelmällä. Membraanille suoritettiin blottaus myoferliinin sekä anoktamiini 7:n vasta-aineella (kuva 15). Kuviin on merkittynä oikeaan reunaan membraanilla näkyvien signaalien arvioidut koot.

Myoferliinin vasta-aineella blotatessa lyaattien signaalit näyttävät vastaavan aiempien toistojen signaaleja, sillä ainoa näkyvä signaali on myoferliinin 230 kDa signaali. ANO7-IP näytteet ovat valitettavasti tässäkin tapauksessa epäselvät, eikä kuvan perusteella pysty päättelemään, missä näytteistä on myoferliinin signaali näkyvissä. ANO7-vasta-aineella blotatessa lyaattien signaalit ovat samanlaiset kuin aiemmissa Western Bloteissa. ChemiDoc-kuvauslaite ei pystynyt tarkentamaan kuvaa, minkä vuoksi myös ANO7-vasta-aineblottauksen kuva on epäselvä. Molekyylipainomarkkeri on kummassakin kuvassa selkeä, sillä se on kuvattu erikseen. Täyspitkän ANO7-näytteen kohdalla näkyy 100 kDa signaali, ja samankokoinen signaali näkyy myös -C- sekä GFP-näytteissä. Signaali ei siis todennäköisesti ole ANO7, koska se näkyy myös GFP-kontrollissa, vaan jokin anti-ANO7-vasta-aineeseen epäspesifisesti sitoutunut proteiini tai vasta-ainemolekyylä. ANO7-IP:n -N-näytteessä on todennäköisesti oikean kokoinen 68 kDa signaali. Myös -N,-C-näytteen signaali on oikeassa 62 kDa kohdassa.



Kuva 15 Western Blot myoferliinin (A) ja anoktamiini 7:n (B) vasta-aineella. Vasemmalla näkyvät numerot ovat molekyylin koko kilodaltoneina (kDa). Molekyylipainomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained -proteiinimarkkeria.

A. Lysaatit ja ANO7-immunopresipitaationäytteet myoferliinin vasta-aineella blotattuna. Vahvimmat signaalit ovat kontrollinäytteissä myoferliinin signaali 230 kDa. ANO7-IP:n näytteissä vahvimmat signaalit kohdissa 75 kDa ja 50 kDa ovat luultavasti vasta-aineita.

B. Lysaatit ja ANO7-immunopresipitaationäytteet anoktamiini 7:n vasta-aineella blotattuna. Lysaatinäytteissä näkyy samoissa kohdissa signaalit kuin ANO7-IP-näytteissä, minkä vuoksi Western Blot anoktamiini 7:n vasta-aineella ei ole onnistunut.

4 Pohdinta

Tutkielmani tarkoituksena on selvittää, vuorovaikuttaako myoferliini PC-3-eturauhassyöpäsoluissa toisen ANO7-proteiinin terminaalisen pään kanssa. Proteiinien välisillä vuorovaikutuksilla on merkittäviä rooleja muun muassa syövän säätelyssä, minkä vuoksi niiden avulla on mahdollista löytää esimerkiksi syöpägenejä sekä lääkkeiden vaikutuskohteita (Ramos ym. 2024). Tutkimusryhmässäni oli aiemmin löydetty anoktamiini 7:n ja myoferliinin välisiä vuorovaikutuksia anoktamiini 7:ää stabiilisti yliekspressoivista eturauhassyöpäsoluista, joissa ANO7 cDNA oli integroituna kromosomiin. Tämän vuoksi proteiinien odotetaan interaktoivan myös silloin, kun ANO7-geeni viedään plasmidissa ohimenevästi ilmentyen soluihin.

β -COP-proteiinin (COPI-proteiinikompleksin alayksikkö) on huomattu sitoutuvan anoktamiini 1 -proteiinin N-terminaaliseen päähän (Lee ym. 2016). β -COP-proteiini säätelee ANO1-proteiininikanavan toimintaa membraanilla (Lee ym. 2016). Muualla on siis havaittu anoktamiinien N-terminaalisen pään olevan olennainen proteiini-interaktiolle, ja siksi myös myoferliini voisi kiinnittyä ANO7-proteiinin N-terminaaliseen päähän. Toisaalta ferliiniperheeseen myös kuuluvan otoferliinin sitoutuminen AHNAK-lihassoluproteiiniin on riippuvainen AHNAK-proteiinin C-terminaalisesesta päästä (Leclère & Dulon, 2023), minkä vuoksi myös myoferliinin tapauksessa sitoutuminen voisi tapahtua proteiinin C-terminaaliseen päähän.

Tutkielmani alussa tehtiin testitransfektio, jolla varmistettiin anoktamiini 7:n ja myoferliinin vuorovaikutus PC-3-soluissa, kun ANO7-geeni transfektoitiin plasmidissa. Vuorovaikutus varmistettiin Western Blotilla, jossa anti-myoferliini-vasta-aineella blotatessa saatiin ANO7-IP:n ANO7-näytteessä näkyviin myoferliinia vastaava signaali. Samalla tavalla käsiteltyssä GFP-plasmidinäytteessä ei näkynyt signaalia. Myoferliini siis ko-immunopresipitoituu plasmidista tuotetun ANO7-proteiinin kanssa. Tutkielmaa varten valmistetuilla plasmideilla toteutettiin testitransfektio, jotta voitiin varmistua siitä, että transfektio niilläkin onnistuu ja Western Blotting anti-ANO7-vasta-aineella toimii.

Ensimmäisen transfektion perusteella ei saada luotettavaa tietoa ANO7-proteiinin ja myoferliinin vuorovaikutuksesta, sillä tulokset eivät ole yksiselitteiset. Kaikkien ANO7-proteiinien mukana on koimmunopresipitaatiossa vedetty alas myoferliinia. Lisäksi myoferliiniä saadaan myös GFP-näytteistä ANO7-IP:ssä. Ylimääräiset signaalit membraaneilla sotkevat ANO7-blottausten tulosten tarkastelua. Pienet erot myoferliinin signaaleissa saattavat selittyä pienillä pipetointivirheillä. Jokaisesta IP-reaktionäytteestä pipetoitiin geelille sama volyyymi proteiinia, mutta pipetoidessa on silti saattanut tulla pieniä eroja näytteiden välillä. Jos pipetointi oli tarpeeksi tarkkaa eikä se selitä signaalien eroja, sitoutuu myoferliini parhaiten ANO7-proteiiniin, kun sen kumpikin terminaalinen pää on poistettu.

Anoktamiini 7 läpäisee membraanin useaan kertaan (Das ym. 2008), joten myoferliinin olisi teoriassa mahdollista sitoutua myös johonkin anoktamiini 7:n solun sisäpuolelle jäävistä transmembraanialueiden välisistä silmukoista. Kun molemmat anoktamiini 7:n terminaaliset päät on poistettu, eivät ne ole estämässä myoferliinin pääsyä sen mahdolliseen sitoutumiskohtaan transmembraanialueiden välisissä lenkeissä. Tämä voisi selittää sen, miksi myoferliinistä saatiin vahvempi signaali siinä transfektiossa, jossa ANO7-proteiinista puuttui kumpikin terminaalinen pää. Toisaalta ANO7-proteiinin molemmat terminaaliset päät ovat vapaina sytosolissa (Das ym. 2008). Vapaina olevat päät sisältävät useampia mahdollisia sitoutumiskohtia ja ne ovat helpommin saatavilla muille proteiineille kuin transmembraanialueiden väliset lyhyemmät lenkit. Siksi arveltiin, että myoferliini sitoutuisi ainakin jollain tavalla ANO7-proteiinin toiseen päähän.

Ensimmäisessä transfektiossa oli mielenkiintoista myös se, että -C-proteiinin lysaatissa oli ANO7-proteiinia, mutta ANO7-IP-näytteessä proteiinia ei havaita. Lysaatissa ollut ANO7-proteiini ei siis jostain syystä näkynyt ANO7-immunopresipitaation jälkeen geelillä. On mahdollista, että kyseinen proteiini ei ole irronnut DynabeadsTM-helmistä immunopresipitaation jälkeen. Kaikki näytteet kuumennettiin 50°C:seen, ja saattaa olla, että tiukasti sitoutuneet proteiinit eivät ole irronneet tässä lämpötilassa. Tavallisesti näytteet kuumennetaan 95°C:seen, mutta ANO7-proteiinin kanssa se ei ole mahdollista. Liian kuumassa lämpötilassa ANO7:stä saadaan Western Blotting -menetelmää käyttäessä epäselvä signaali, ja sen takia kaikki geelille ajatut proteiinit oli lämmitetty vain 50°C:seen.

Toisessa transfektiossa myoferliini saadaan näkyviin ainoastaan täyspitkällä ANO7-proteiinilla, vaikka Western Blot toistettiin ANO7-IP-näytteillä kahdesti. Täyspitkän, -N- ja -N.-C-proteiinien transfektio näyttää onnistuneen, koska kaikista saadaan oikean kokoista proteiinia. Vain -C-näyte vaikuttaa epäonnistuneen, koska oikean kokoista proteiinia ei ole immunopresipitaation jälkeen näkyvissä, vaikka lysaatissa proteiinia esiintyy. Melkein kaikkia ANO7-proteiineja siis saatiin immunopresipitoitua ANO7-vasta-aineella, mutta myoferliiniä ei siitä huolimatta näy missään näytteessä.

Toisessa transfektiossa solulysaatit käsiteltiin DynabeadsTM-helmillä ennen ANO7-immunopresipitaatiota. Käsitteilyn tarkoituksena oli poistaa mahdolliset taustaproteiinit ennen immunopresipitaatiota. Western Blot ei kuitenkaan onnistunut juurikaan paremmin käsitteilyn jälkeen, koska signaalit ovat leveitä ja epäselviä. Voi olla, että immunopresipitaatiossa on tapahtunut jotain, mikä on pilannut näytteet. Lähes kaikissa Western Blot -kuvissa on membraanilla näkyvissä ylimääräisiä signaaleja. Anti-ANO7-vasta-aineeseen sitoutuu immunopresipitaatiossa jonkin verran muita epäspesifisiä proteiineja, jotka myös liikkuvat geelillä ja näkyvät membraanilla anti-ANO7-vasta-aineella blotatessa. ANO7-proteiineja saatetaan myös muokata soluissa translaation jälkeen, minkä seurauksena ANO7-proteiinin erilaiset versiot voivat liikkua geelillä eri tavalla.

Käytetyt anti-ANO7- ja IgG-vasta-aineet liikkuvat myös geelillä, minkä vuoksi ne sekoittavat kuvien tulkitsemista. Jos immunopresipitaatiossa käytetyt anti-ANO7-vasta-ainemolekyylit olisivat denaturoituneet täydellisesti, olisi niistä näkynyt geelillä 25 kDa ja 50 kDa signaalit (Lal ym. 2005). Kyseisiä signaaleja ei kuitenkaan saatu selkeästi näkyviin, mikä tarkoittaa, että molekyyliden denaturaatio oli epätäydellistä ja membraanilla nähtiin vain noin 100 kDa signaali. Vasta-ainemolekyyliden kevyt- ja raskasketjut eivät välttämättä ole irronneet toisistaan, koska kaikki näytteet kuumennettiin vain 50 °C:seen, kun usein kuumennus tapahtuu 95 °C:ssa. Korkeammassa lämpötilassa olisi mahdollisesti saatu vasta-aineen 25 kDa ja 50 kDa signaalit näkyviin. Pienempi kuumennuslämpötila valittiin siksi, ettei ANO7-proteiineja voi kuumentaa liikaa, tai ANO7-proteiinista ei saada näkyviin siistiä signaalia geelille.

Vaikka tässä pro gradu -tutkielmassa ei saatu vastausta sille, onko ANO7-proteiinin toinen terminaalinen pää ehdoton ANO7-proteiinin ja myoferliinin väliselle interaktiolle, saatiin viitteitä siitä, että myoferliini sitoutuu ANO7-proteiiniin myös ilman sen kumpaakaan vapaata terminaalista päätä. Ensimmäisessä transfektiossa myoferliini saatiin näkyviin jokaisella ANO7-proteiinin versiolla, mikä kertoo siitä, ettei ainakaan kaikista olennaisinta osaa myoferliinin ja ANO7:n interaktiolle onnistuttu ANO7-proteiinista paikantamaan. Myoferliinin ja anoktamiini 7:n välistä interaktiota tulee siis tutkia lisää, jotta tarkka sitoutumispaikka on mahdollista selvittää.

5 Kiitokset

Haluan kiittää biolääketieteen laitoksen ohjaajiani Johanna Schleutkeria ja Gudrun Wahlströmiä tutkielmani ohjaamisesta ja mahdollisuudesta toteuttaa tutkielma biolääketieteen laitoksen puolella. Haluan myös kiittää biologian laitoksen puolelta ohjaajaani Päivi Onkamoja kaikesta avusta tutkielmaprosessin aikana. Lisäksi haluan kiittää Niina Santiota, joka toimi tutkielmani alkuvaiheessa ohjaajani.

Kiitos myös Schleutkerin tutkimusryhmän muille jäsenille kaikesta tuesta ja avusta.

Lähteet

AlphaFold Protein Structure Database. 2020a. Anoctamin-7.

<<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q6IWH7> 2022> [Luettu 2.3.2024]

AlphaFold Protein Structure Database. 2020b. Myoferlin.

<<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9NZM1>> [Luettu 2.3.2024]

ATCC. 2023. PC-3 CRL-1435TM. <<https://www.atcc.org/products/crl-1435>> [Luettu 16.1.2023]

Bera TK, Das S, Maeda H, Beers R, Wolfgang CD, Kumar V, Hahn Y, Lee B, Pastan I. 2004. NGEP, a gene encoding a membrane protein detected only in prostate cancer and normal prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9), 3059–3064.

Bioinformatics.org. 2023 Protein Molecular Weight.

<https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html> [Luettu 10.3.2024]

Das S, Hahn Y, Walker DA, Nagata S, Willingham MC, Peehl DM, Bera TK, Lee B, Pastan I. 2008. Topology of NGEP, a prostate-specific cell:cell junction protein widely expressed in many cancers of different grade level. *Cancer research* 68(15), 6306–6312.

Duodecim Terveyskirjasto. 2022. Eturauhassyöpä. *Kustannus Oy Duodecimin verkkopalvelu Terveyskirjasto.fi* <<https://www.terveyskirjasto.fi/dlk00210>> [Luettu 16.1.2023]

Käypä hoito -suositus. 2023. Eturauhassyöpä. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Kardiologisen Seuran asettama työryhmä. <<https://www.kaypahoito.fi/hoi11060>> [Luettu 25.5.2024]

Guo J, Wang D, Dong Y, Gao X, Tong H, Liu W, Zhang L, Sun M. 2021. ANO7: Insights into topology, function, and potential applications as a biomarker and immunotherapy target. *Tissue & cell*, 72, 101546.

Hallgren J, Tsigos KD, Pedersen MD, Armenteros JJA, Marcatili P, Nielsen H, Krogh A, Winther O. 2022. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *BioRxiv* <<https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>>

Hu L, Chen X, Narwade N, Lim MGL, Chen Z, Tennakoon C, Guan P, Chan UI, Zhao Z, Deng M, Xu X, Sung WK, Cheung E. 2021. Single-cell analysis reveals androgen receptor regulates the ER-to-Golgi trafficking pathway with CREB3L2 to drive prostate cancer progression. *Oncogene* 40(47), 6479-6493.

- Jiang J, Soh PXY, Mutambirwa SBA, Bornman MSR, Haiman CA, Hayes VM, Jaratlerdsiri W. 2023. ANO7 African-ancestral genomic diversity and advanced prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases* 10.1038/s41391-023-00722-x.
- Kaikkonen E, Rantapero T, Zhang Q, Taimen P, Laitinen V, Kallajoki M, Jambulingam D, Ettala O, Knaapila J, Boström PJ, Wahlström G, Sipeky C, Pursiheimo JP, Tammela T, Kellokumpu-Lehtinen PL; PRACTICAL Consortium; Fey V, Maehle L, Wiklund F, Wei GH, Schleutker J. 2018. ANO7 is associated with aggressive prostate cancer. *International journal of cancer* 143(10), 2479–2487.
- Kaikkonen E, Takala A, Pursiheimo JP, Wahlström G, Schleutker J. 2020. The interactome of the prostate-specific protein Anoctamin 7. *Cancer biomarkers: section A of Disease markers* 28(1), 91–100.
- Lal A, Haynes SR, Gorospe M. 2005. Clean Western blot signals from immunoprecipitated samples. *Molecular and cellular probes* 19(6), 385–388.
- Leclère JC, Dulon D. 2023. Otoferlin as a multirole Ca²⁺ signaling protein: from inner ear synapses to cancer pathways. *Frontiers in cellular neuroscience* 17, 1197611.
- Lee YS, Bae Y, Park N, Yoo JC, Cho CH, Ryoo K, Hwang EM, Park JY. 2016. Surface expression of the Anoctamin-1 (ANO1) channel is suppressed by protein-protein interactions with β -COP. *Biochemical and biophysical research communications* 475(2), 216–222.
- Leung C, Yu C, Lin MI, Tognon C, Bernatchez P. 2013. Expression of myoferlin in human and murine carcinoma tumors: role in membrane repair, cell proliferation, and tumorigenesis. *The American journal of pathology* 182(5), 1900–1909.
- Lin K, Lipsitz R, Miller T, Janakiraman S. 2008. Benefits and harms of prostate-specific antigen screening for prostate cancer: an evidence update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine* 149(3), 192–199.
- Liss MA, Al-Bayati O, Gelfond J, Goros M, Ullevig S, DiGiovanni J, Hamilton-Reeves J, O'Keefe D, Bacich D, Weaver B, Leach R, Thompson IM. 2019. Higher baseline dietary fat and fatty acid intake is associated with increased risk of incident prostate cancer in the SABOR study. *Prostate cancer and prostatic diseases* 22(2), 244–251.
- Manna F, Karkampouna S, Zoni E, De Menna M, Hensel J, Thalmann GN, Kruihof-de Julio M. 2019. Metastases in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9(3), a033688.

- Marty NJ, Holman CL, Abdullah N, Johnson CP. 2013. The C2 domains of otoferlin, dysferlin, and myoferlin alter the packing of lipid bilayers. *Biochemistry* 52(33), 5585–5592.
- Marx A, Koopmann L, Höflmayer D, Büscheck F, Hube-Magg C, Steurer S, Eichenauer T, Clauditz TS, Wilczak W, Simon R, Sauter G, Izbicki JR, Huland H, Heinzer H, Graefen M, Haese A, Schlomm T, Bernreuther C, Lebok P, Bonk S. 2021. Reduced anoctamin 7 (ANO7) expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer biology & medicine* 18(1), 245–255.
- National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. 2022a. ANO7 anoctamin 7 [*Homo sapiens* (human)] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8291>> [Luettu 16.1.2023].
- National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. 2022b. DYSF dysferlin [*Homo sapiens* (human)] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8291>> [Luettu 16.1.2023].
- National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. 2022c. OTOF otoferlin [*Homo sapiens* (human)] <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9381>> [Luettu 16.1.2023].
- National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. 2022d. Anoctamin-7 isoform 1 [*Homo sapiens*]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001357623.1> [Luettu 20.11.2022]
- New England Biolabs. 2023a. PCR Protocol for Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (M0535). <<https://www.neb.com/en/protocols/2012/09/06/protocol-for-phusion-hot-start-flex-dna-polymerase-m0535>> [Luettu 20.5.2023]
- New England Biolabs. 2023b. NEB Tm Calculator. <<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>> [Luettu 20.5.2023]
- Ohwaki K, Endo F, Kachi Y, Hattori K, Muraishi O, Nishikitani M, Yano E. 2012. Relationship between dietary factors and prostate-specific antigen in healthy men. *Urologia internationalis* 89(3), 270–274.
- Pedemonte N, Galletta LJ. 2014. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). *Physiological reviews* 94(2), 419–459.
- Posdich P, Darr C, Hilser T, Wahl M, Herrmann K, Hadaschik B, Grünwald V. 2023. Metastatic Prostate Cancer-A Review of Current Treatment Options and Promising New Approaches. *Cancers (Basel)* 15(2), 461.

- Ramos RH, de Oliveira Lage Ferreira C, Simao A. 2024. Human protein–protein interaction networks: A topological comparison review. *Heliyon* 10(5), e27278.
- Rawla P. 2019. Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology* 10(2), 63–89.
- Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, Gillessen S, Van der Kwast T, Bristow RG. 2021. Prostate cancer. *Nature reviews, Disease primers* 7(1), 9.
- Saxby H, Mikropoulos C, Boussios S. 2020. An Update on the Prognostic and Predictive Serum Biomarkers in Metastatic Prostate Cancer. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* 10(8), 549.
- Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development* 24(18), 1967–2000.
- Takara Bio. 2022. In-Fusion Cloning Primer Design Tool.
<<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools>>
[Luettu 28.11.2022]
- Terveystalo. 2021. Eturauhasen sairaudet aiheuttavat usein virtsaamisvaivoja.
<<https://www.terveystalo.com/fi/tietopaketti/eturauhanen>> [Luettu 16.1.2023]
- ThermoFisher. 2024a. Protocol: Lipofectamine 3000 Transfection Reagent PC-3 Prostate cancer cells. <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L3000001>>
[Luettu 9.6.2024]
- ThermoFisher. 2024b. Pierce™ BCA Protein Assay Kit User Guide.
<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> > [Luettu 9.6.2024]
- ThermoFisher. 2024c. FastDigest Restriction Enzymes Protocol.
<<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/fastdigest-thermo-scientific.html>> [Luettu 9.6.2024]
- Trabzonlu L, Kulac I, Zheng Q, Hicks JL, Haffner MC, Nelson WG, Sfanos KS, Ertunc O, Lotan TL, Heaphy CM, Meeker AK, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. 2019. Molecular Pathology of High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Challenges and Opportunities. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 9(4), a030403.
- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. 2003. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate* 57(3), 205–225.
- Vietri MT, D'Elia G, Caliendo G, Resse M, Casamassimi A, Passariello L, Albanese L, Cioffi M, Molinari AM. 2021. Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3753.

- Volakis LI, Li R, Ackerman WE 4th, Mihai C, Bechel M, Summerfield TL, Ahn CS, Powell HM, Zielinski R, Rosol TJ, Ghadiali SN, Kniss DA. 2014. Loss of myoferlin redirects breast cancer cell motility towards collective migration. *PloS one* 9(2), e86110.
- Wahlström G, Heron S, Knuuttila M, Kaikkonen E, Tulonen N, Metsälä O, Löf C, Ettala O, Boström PJ, Taimen P, Poutanen M, Schleutker J. 2022. The variant rs77559646 associated with aggressive prostate cancer disrupts ANO7 mRNA splicing and protein expression. *Human molecular genetics* 31(12), 2063–2077.
- Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. 2018. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development* 32(17-18), 1105–1140.
- Watts S, Leydon G, Birch B, Prescott P, Lai L, Eardley S, Lewith G. 2014. Depression and anxiety in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of prevalence rates. *BMJ open* 4(3), e003901.
- Zhu H, Ding Y, Huang H, Lin Q, Chen W, Yu Z. 2014. Prognostic value of genomic mutations in metastatic prostate cancer. *Heliyon* 9(3), e13827.
- Zhu W, Zhou B, Zhao C, Ba Z, Xu H, Yan X, Liu W, Zhu B, Wang L, Ren C. 2019. Myoferlin, a multifunctional protein in normal cells, has novel and key roles in various cancers. *Journal of cellular and molecular medicine* 23(11), 7180–7189.