



Biologisesti aktiivisen R-Spondin-1-proteiinin tuotto ja puhdistus

Janne Kärnä

OPINNÄYTETYÖ
Toukokuu 2019

Laboratoriotekniikan koulutus

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratoriotekniikan koulutus

KÄRNÄ, JANNE:

Biologisesti aktiivisen R-Spondin-1-proteiinin tuotto ja puhdistus

Opinnäytetyö 45 sivua, joista liitteitä 11 sivua
Toukokuu 2019

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston BioMediTechin Proteiiniidynamiikan tutkimusryhmälle Suolen signaloinnin epigenetiikka - tutkimusryhmän toimeksiannosta. Työn tavoitteena oli kehittää menetelmä R-Spondin-1-proteiinin tuottamiseksi omassa laboratoriossa. Työn tarkoituksena oli tuottaa proteiinia ensisijaisesti mammaalisoluissa ja toissijaisesti hyönteissoluissa, sekä varmistaa puhdistettujen tuotteiden biologinen aktiivisuus kokeellisesti.

Tuotettu proteiini on tarpeellinen osa suolen kantasolujen kasvatuksessa. Ilman proteiinin läsnäoloa kantasolut erilaistuvat spontaanisti suolen eri rakennesoluiksi. Suolen organoidien *in vitro* -kasvatuksessa saa proteiinin läsnäolo aikaan kryptien kehittymisen ja kasvun organoideissa.

Proteiinia ekspressoitiin HEK-293 mammaalisoluissa sekä Sf9-, High Five- ja Tni-FNL-hyönteissoluissa. Tuotettu proteiini puhdistettiin affiniteetikromatografialla siihen liitetyn Twin-Strep-puhdistuskahvan avulla. Lopuksi tuotetun proteiinin biologinen aktiivisuus varmistettiin viljelemällä ihmisen ohutsuolen organoideja ja laskemalla organoideihin kasvaneiden kryptien lukumäärät. Samalla verrattiin itse tuotetun proteiinin aktiivisuutta kaupallisesti saatavilla olevaan proteiiniin.

Työn ensisijainen tavoite saavutettiin ja tuotetun proteiinin biologinen aktiivisuus todettiin kaupalliseen tuotteeseen verrattavaksi. Aktiivisuustestissä 1000 ng/ml pitoisuudella itse tuotetun proteiinin aktiivisuus oli noin 85% kaupallisen proteiinin aktiivisuudesta. Toissijaista tavoitetta ei saavutettu, sillä hyönteissoluissa tuotetun proteiinin määrä jäi pieneksi ja se lopulta kadotettiin täysin puhdistusvaiheessa.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

KÄRNÄ, JANNE:

Production and Purification of Biologically Active R-Spondin-1 Protein

Bachelor's thesis 45 pages, appendices 11 pages

May 2019

The objective of this study was to develop a method for in-house production of R-Spondin-1 protein. The purpose was to express the protein primarily in mammalian cells and secondarily in insect cells, and to empirically verify the biological activity of the purified protein.

The protein is a necessary component in growing intestinal stem cells. Without its presence, the intestinal stem cells spontaneously differentiate into various structural cells of the intestine. When intestinal organoids are grown *in vitro*, the presence of R-Spondin-1 causes the organoids to form and grow crypts.

The protein was expressed in HEK-293 mammalian cells and Sf9, High Five & Tni-FNL insect cells. Twin-Strep-tag was attached to the protein for affinity chromatography purification. The biological activity was verified by growing human intestinal organoids and counting the average amount of crypts grown per organoid.

The primary goal was achieved. The biological activity of the in-house protein produced in mammalian cells was approximately 15% lower than the activity of a commercial product with 1000 ng/ml concentration. The secondary goal of insect cell expression was not achieved. The yield of the insect cell expressions did not meet expectations and the protein was ultimately lost during purification.

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	7
2	R-SPONDIN-1-PROTEIINI	8
	2.1 Proteiinin ominaisuudet	8
	2.2 R-Spondin-1 suolen organoidien kasvatuksessa	8
3	PROTEIININ KLOONAUS JA PUHDISTUS	10
	3.1 Bakmidi ja bakulovirus	10
	3.2 Proteiinin puhdistus affiniteetikromatografialla	11
4	TYÖN SUORITUS	12
	4.1 Työn eteneminen	12
	4.2 Kloonaus, plasmidin monistus ja sekvensointi	13
	4.3 Bakulovirus ja tuotto hyönteissoluissa	13
	4.3.1 Bakulovirus P1 ja P2	13
	4.3.2 Ensimmäiset tuotot Sf9, High Five ja Tni-FNL -soluissa	16
	4.3.3 Bakuloviruksen tiitteri ja toiset tuotot vaihtelevilla virusmäärillä	17
	4.4 Tuotto mammaalisoluissa	18
	4.4.1 Tuotto transfektioreagenssilla	18
	4.4.2 Tuotto bakuloviruksella	18
	4.5 Proteiinin puhdistus	19
	4.6 Tuotetun proteiinin laadunvarmistus	19
	4.6.1 Massaspektrometrianalyysi	19
	4.6.2 Proteiinin biologisen aktiivisuuden varmistus	21
5	TULOKSET	22
	5.1 Bakuloviruksen tiitteri	22
	5.2 Proteiinituottojen ja puhdistusten tulokset	22
	5.2.1 Hyönteissolutuotot	22
	5.2.2 Mammaalisolutuotot	26
	5.3 Massaspektrometrianalyysin tulokset	27
	5.4 Proteiinin biologisen aktiivisuuden tulokset	28
6	POHDINTA	30
	LÄHTEET	32
	LIITTEET	35
	Liite 1. RSPO1-pBVboost plasmidikartta ja insertin aminohapposekvenssi	35

Liite 2. Sekvensoinnissa ja bakmidi-PCR:ssä käytettyjen alukkeiden sekvenssit	36
Liite 3. Näytteenkäsittelyprotokolla massaspektrometrille	37
Liite 4. Massaspektrometrianalyysin tulokset.....	39
Liite 5. Organoidien kasvatuskokeen tulokset.....	43

LYHENTEET JA TERMIT

CNCA	varausneutraloitu kimeerinen avidiini
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
EGF	epidermaalinen kasvutekijä, soluviestintään liittyvä proteiini
Enterosyytti	ohutsuolen pintakudoksen yleisin solutyyppe
Gentamysiini	antibiotti
IPTG	isopropyyl β -D-1-tiogalaktopyranosidi, proteiinin tuoton indusoinnissa käytettävä laktoosianalogi
Krypta	ohutsuolen limakalvon kantasoluja sisältävä rakenneosa
MOI	multiplicity of infection, transduktiossa käytettävien virusten ja solujen lukumäärien suhde
Noggin	soluviestintään liittyvä proteiini
PBS	fosfaattipuskuri
Tris	tris(hydroksimetyyli)aminometaani
VSV-G	vesikulaarinen stomatiitti Indiana -viruksen G-proteiini
WPRES	metsämurmelin hepatiittiviruksen posttranskriptionaalinen säätelytekijä
X-gal	5-bromi-4-kloori-3-indolyyli- β -D-galaktopyranosidi, sini- valkoseulonnassa käytettävä laktoosianalogi

1 JOHDANTO

R-Spondin-1 (RSPO1) –proteiini toimii säätelytekijänä kantasolujen erilaistumisessa. Se osallistuu solujen Wnt/ β -kateniinisignaalointiin Wnt-agonistina, aiheuttaen β -kateniinin kertymistä tumaan ja vaikuttaen geeniekspressioon. (Kim ym. 2006, 23–24.) Proteiinin on havaittu vaikuttavan merkittävästi ohutsuolen kasvuun. Sen läsnäolo saa suolen kryptissa olevat kantasolut jakaantumaan ilman että ne erilaistuvat muiksi suolen rakennesoluiksi. (Kim ym. 2005, 1256).

Työ suoritettiin Tampereen yliopiston Proteiinidynamiikan tutkimusryhmälle Suolen signaloinnin epigenetiikka –tutkimusryhmän toimeksiannosta. Proteiinia käytetään tutkimustyössä jatkuvasti ja sen ostaminen kaupalliselta valmistajalta on merkittävä vuosittainen kuluerä. Työn tavoitteena oli kehittää kustannustehokas menetelmä proteiinin tuottamiseksi omassa laboratoriossa.

Tarkoituksena oli tuottaa proteiinia erilaisissa soluissa ja vertailla menetelmien lopputuotteiden aktiivisuutta. Proteiinia tuotettiin ensisijaisesti mammaalisoluissa (FreeStyle 293-F, Human Embryonic Kidney), mutta myös hyönteissoluissa (Sf9, High Five ja Tni-FNL) tuottoa kokeiltiin ja menetelmiä verrattiin keskenään. Proteiini puhdistettiin Twin-Strep-tagin avulla affiniteettikromatografialla ja sen aktiivisuus varmistettiin kokeellisesti.

2 R-SPONDIN-1-PROTEIINI

2.1 Proteiinin ominaisuudet

R-Spondin-1 (roof plate-specific spondin-1, RSPO1) on yksi neljästä R-Spondin-perheen proteiinista. Proteiini koostuu 243 aminohaposta ja sen laskennallinen koko on noin 27 kDa, mutta posttranslaationaalisien glykosylaation vuoksi se ajautuu SDS-PAGE-geelillä pelkistävässä olosuhteissa noin 40 kDa kokoisena (Peprotech 2017). Ihmisellä sitä koodaava geeni sijaitsee kromosomissa 1. RSPO1 vaikuttaa solujen geeniekspressioon Wnt/ β -kateniinisignalointireitin kautta tehostamalla Wnt:n aktiivisuutta. (de Lau, Snel & Clevers 2012, 3–4; Sato & Clevers 2013, 1190.)

Wnt/ β -kateniinisignalointi on eräs solujen välisen viestinnän väylä. β -kateniini on proteiini, jolla on kaksi hyvin erilaista tehtävää. Solulimassa β -kateniini osallistuu solujen väliseen adheesioon yhdessä E-kadheriinin kanssa. Solulimassa vapaana oleva β -kateniini päätty nopeasti sitä hajottavan proteiinikompleksin kohteeksi. Wnt on solun ulkopuolinen proteiini, joka säätelee β -kateniinia hajottavan kompleksin toimintaa. Se sitoutuu solukalvossa oleviin kiharareseptoreihin (engl. Frizzled), mikä saa aikaan β -kateniinia hajottavan kompleksin inaktivoitumisen. Kun vapaan β -kateniinin määrä solun sisällä kasvaa, se pääsee kertymään solulimaan ja edelleen siirtymään tumaan toteuttamaan toista tehtäväänsä. Tumassa se aktivoi kohdegeenien transkription irrottamalla geenien promoottorialueelle sitoutuneen repressorin. (Valenta, Hausmann & Basler 2012, 2714–2715.)

2.2 R-Spondin-1 suolen organoidien kasvatuksessa

Organoidit ovat kolmiulotteisia, yksinkertaistettuja miniversioita jostakin elimestä, kuten esimerkiksi ohutsuoletta. Organoidien kasvua voidaan säädellä niille annettavilla tarvittavilla kasvutekijöillä. Niiden avulla on mahdollista suorittaa kokeita elävällä kudoksella *in vitro*. (Wallach & Bayrer 2017, 180–181.)

Ohutsuolen kantasolut sijaitsevat kryptiksi kutsutuissa kuopissa suolen nukkalisäkkeiden välissä. Jakautuessaan solut alkavat kulkeutua kryptasta ylöspäin kohti suolen pintaa ja nukkalisäkkeitä, erilaistuen samalla enterosyyteiksi ja muiksi suolen rakennesoluiksi. Kryptissa sijaitseva RSPO1 ylläpitää solujen "kantasoluisuutta" (engl. stemness), kun taas ilman sitä solut alkavat erilaistua. (Sato & Clevers 2013, 1190.)

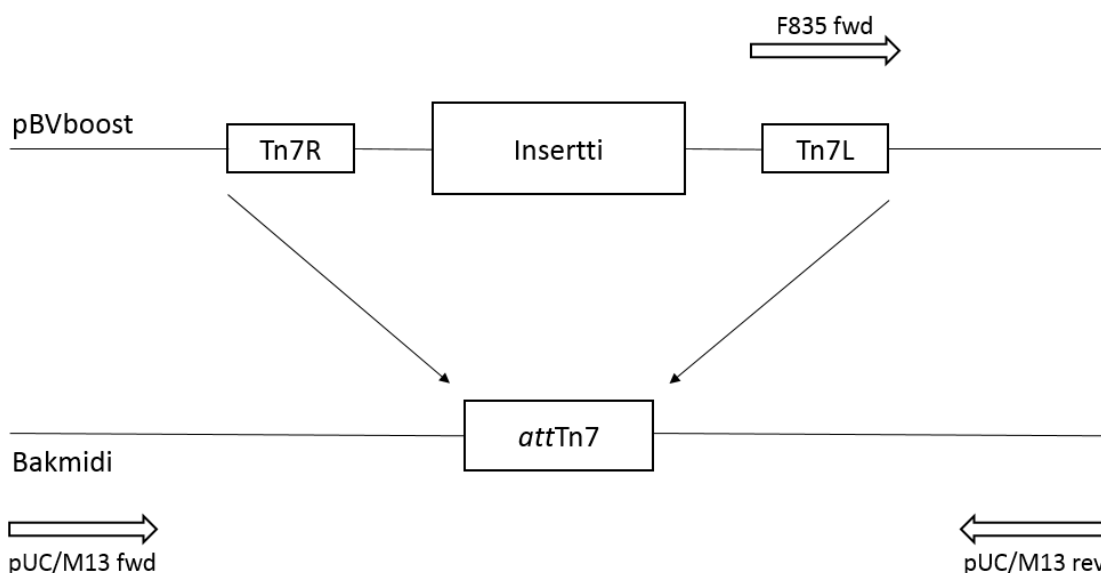
3 PROTEIINIIN KLOONAUUS JA PUHDISTUS

3.1 Bakmidi ja bakulovirus

Bakmidi eli bakulovirus-sukkulavektori on hyönteissolujen kanssa käytettävä ekspressiovektori. Bakmidi sisältää bakuloviruksen genomia, joten hyönteissoluihin transfektoinnin seurauksena solut alkavat tuottaa bakulovirusta. Tuotettu virus voidaan kerätä ja sitä voidaan käyttää edelleen uusien solujen transdukointiin. (Invitrogen 2002, 1–3.)

Bakmidiin voidaan liittää haluttu ekspressoitava geeni esimerkiksi Bac-to-Bac-menetelmällä. Menetelmässä käytettävä DH10Bac *E. coli* -kanta sisältää bakmidin sekä avustajaplasmidin, johon on koodattu bakmidin käsittelyyn tarpeellisia geneja. Bakmidissa on Tn7 transposonille spesifinen mini-*att*Tn7 elementti, johon transposoni voi liittää halutun geenin (kuviot 1). Geeni transformoidaan bakteeriin luovuttajaplasmidissa, johon se on kloonattu transposonin tarvitsemien Tn7R ja Tn7L -alueiden väliin. Bakmidissa on myös geenit antibiootti- ja sini-valkoseulontaa varten. (Invitrogen 2002, 3.)

Transposition onnistuminen voidaan tarkistaa eristetyistä bakmidista PCR:llä. Onnistuneen transposition jälkeen PCR-reaktiossa monistuu F835 forward ja pUC/M13 reverse -alukkeiden välinen alue, joka on pituudeltaan noin 200 emäsparia. Ilman inserttiä monistuu pUC/M13 forward ja reverse -alukkeiden välinen, noin 325 emäsparin pituinen alue. (Airenne, Makkonen, Mähönen & Ylä-Herttua 2011, 288–289). Alukkeiden kiinnittymiskohdat on merkitty kuvioon 1 ja alukkeiden sekvenssit on kirjattu liitteeseen 2.



Kuvio 1. Insertin transpositio pBVboost-vektorista bakmidiin. Kuvioon on merkitty myös transposition onnistumisen PCR-varmistukseen käytettävien alukkeiden kiinnittymiskohdat. (Airenne ym. 2011, 289, mukailtu.)

3.2 Proteiinin puhdistus affiniteettikromatografialla

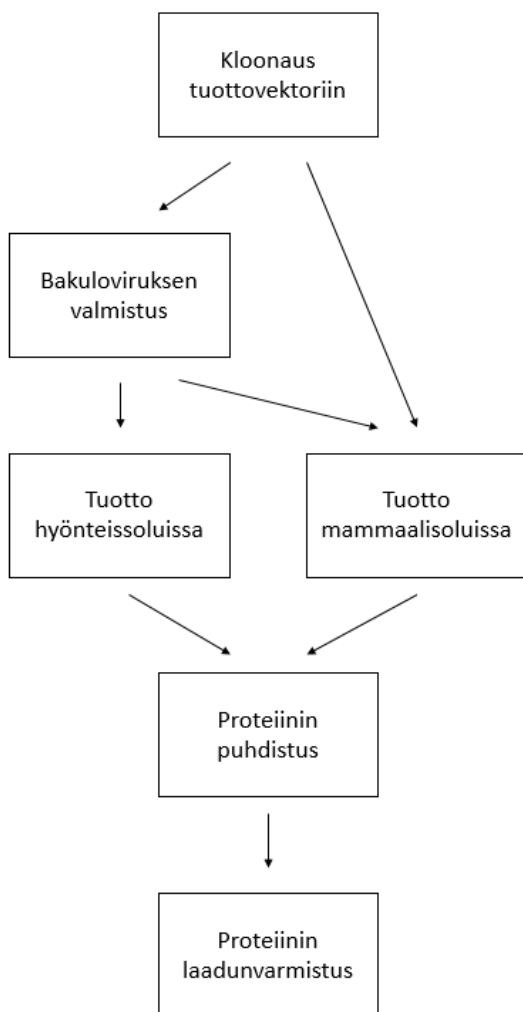
Affiniteettikromatografia perustuu tiettyjen molekyylien kykyyn sitoutua toisiinsa spesifisesti. Affiniteettikromatografiassa kiinteä faasi koostuu polymeeriin sidotuista yhdisteistä, joiden ligandeina toimivat proteiinit. Spesifisen sitoutumisen ansiosta ylimääräinen aines voidaan helposti huuhdella pylväästä puskurilla, jättäen jäljelle vain pylvääseen sitoutuneen proteiinin. Lopuksi proteiini voidaan eluoida pylväästä esimerkiksi eluentin pH:n tai ionivahvuuden muutoksella, tai lisäämällä pylvääseen riittävästi ligandia, joka pylvääseen kiinnittyessään syrjäyttää siihen kiinnittyneet proteiinit. (Campbell & Farrell 2009, 127.)

Affiniteettikromatografiaa voidaan hyödyntää tehokkaasti fuusioproteiinien puhdistuksessa. Proteiinin aminohappoketjun toiseen päähän liitetään jokin puhdistuskahva, esimerkiksi His-tag tai Twin-Strep-tag. Puhdistuskahvan ja kahvalle spesifisen affiniteettipylvään avulla saadaan proteiini puhdistettua tehokkaasti, sillä sopivissa olosuhteissa korkean spesifisyyden vuoksi pylvääseen kiinnittyy hyvin vähän epäpuhtauksia puhdistuskahvallisten proteiinien lisäksi. (Campbell & Farrell 2009, 383.)

4 TYÖN SUORITUS

4.1 Työn eteneminen

Työn eteneminen on kuvattu kuviossa 2. Työhön valittiin ekspressiovektoriksi pBVboostFGII-WPRE-VSV-G-plasmidi. Sen sisältämä WPRE-sekvenssi tehostaa proteiinin tuottoa parantamalla transgeenin ekspressiotehokkuutta (Zufferey, Donello, Trono & Hope 1999, 2888), kun taas VSV-G-sekvenssi parantaa plasmidin transfektiotehoa (Okimoto, Friedmann & Miyanojara 2001, 233). Hyönteissolutuotto tapahtui bakuloviruksen avulla. Samaa virusta käytettiin myös mammaalisolutuottoihin, minkä lisäksi mammaalisoluja transfektoitiin kationisiin lipideihin perustuvalla menetelmällä. Tuotetut proteiinit puhdistettiin affiniteetikromatografialla ja lopuksi tuotteen laatu varmistettiin kokeellisesti.



KUVIO 2. Työn eteneminen pääpiirteittäin.

4.2 Kloonaus, plasmidin monistus ja sekvensointi

Geeni tilattiin synteettisenä pDONR211-vektorissa. Puhdistusta varten proteiinin C-terminuksessa on enterokinaasin katkaisukohta ja Twin-Strep-tag-puhdistuskahva. Katkaisukohta mahdollistaa puhdistuskahvan irrottamisen valmiista proteiinista enterokinaasilla, mikäli kahvan todetaan haittaavan proteiinin aktiivisuutta.

Geeni kloonattiin Gateway-menetelmällä ekspressiovektoriin käyttäen Invitrogenin Gateway-kloonaukettia. Vektorina käytetyssä plasmidissa on selektiomarkkerina gentamysiini-resistenssi. Liitteessä 1 on kuvattu vektorin plasmidikartta kloonauksen jälkeen.

Kloonattua plasmidia monistettiin transformoimalla se kemiallisesti kompetentteihin Invitrogen One Shot TOP10-soluihin ja viljelemällä soluja 200 ml tilavuudessa LB-liemessä. Monistettu plasmidi eristettiin ja puhdistettiin Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Midi Plus EF -kitillä. Puhdistettu plasmidi eluoiitiin lopulta 800 µl tilavuuteen TE-puskuriin, ja sen pitoisuudeksi mitattiin Thermo Scientificin NanoDrop One -laitteella 972,6 ng/µl. Puhdistetun plasmidin laatu varmistettiin sekvensoimalla. Sekvensoinnissa käytettiin plasmidille sopivia pFG-alukkeita (liite 2). Sekvensoinnin suoritti Tampereen yliopiston BioMediTechin sekvensointipalvelu.

4.3 Bakulovirus ja tuotto hyönteissoluissa

4.3.1 Bakulovirus P1 ja P2

Bakuloviruksen valmistusta varten tuotettiin bakmidi transformoimalla pBVboost-vektorissa oleva geeni DH10Bac-soluihin Bac-to-Bac Baculovirus Expression System -protokollan (Life Technologies Corporation 2015, 26–29) mukaan. Insertin onnistunutta transpositioa arvioitiin alustavasti sini-valkoseulonnan avulla. Bakmidi-DNA eristettiin valkoisista pesäkkeistä ja transposition onnistuminen varmistettiin PCR:llä. PCR-alukkeina käytettiin pUC/M13 forward

ja reverse sekä F835 forward -alukkeita. PCR-reaktiot pipetoitiin taulukon 1 mukaan.

TAULUKKO 1. PCR-reaktioiden pipetointitaulukko

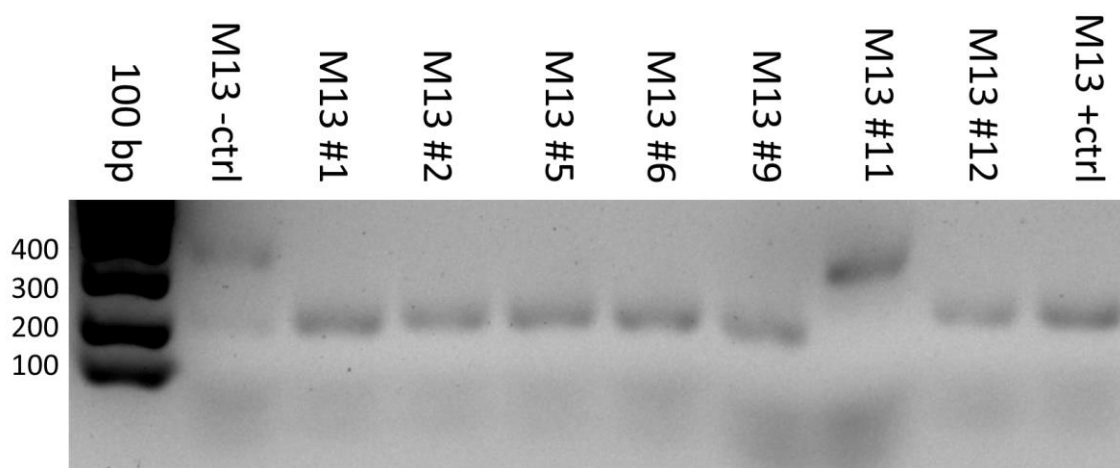
100% DMSO	5 µl
10x Dynazyme-puskuri	5 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
F835 Forward -aluke	2 µl
pUC/M13 Forward -aluke	2 µl
pUC/M13 Reverse -aluke	2 µl
Bakmidi-DNA	3 µl
Dynazyme II DNA polymeraasi	1 µl
H ₂ O, PCR-laatu	29 µl
Yhteensä	50 µl

Käytetty lämpötilaohjelma on kirjattu taulukkoon 2.

TAULUKKO 2. Bakmidien PCR-varmistuksessa käytetty lämpötilaohjelma.

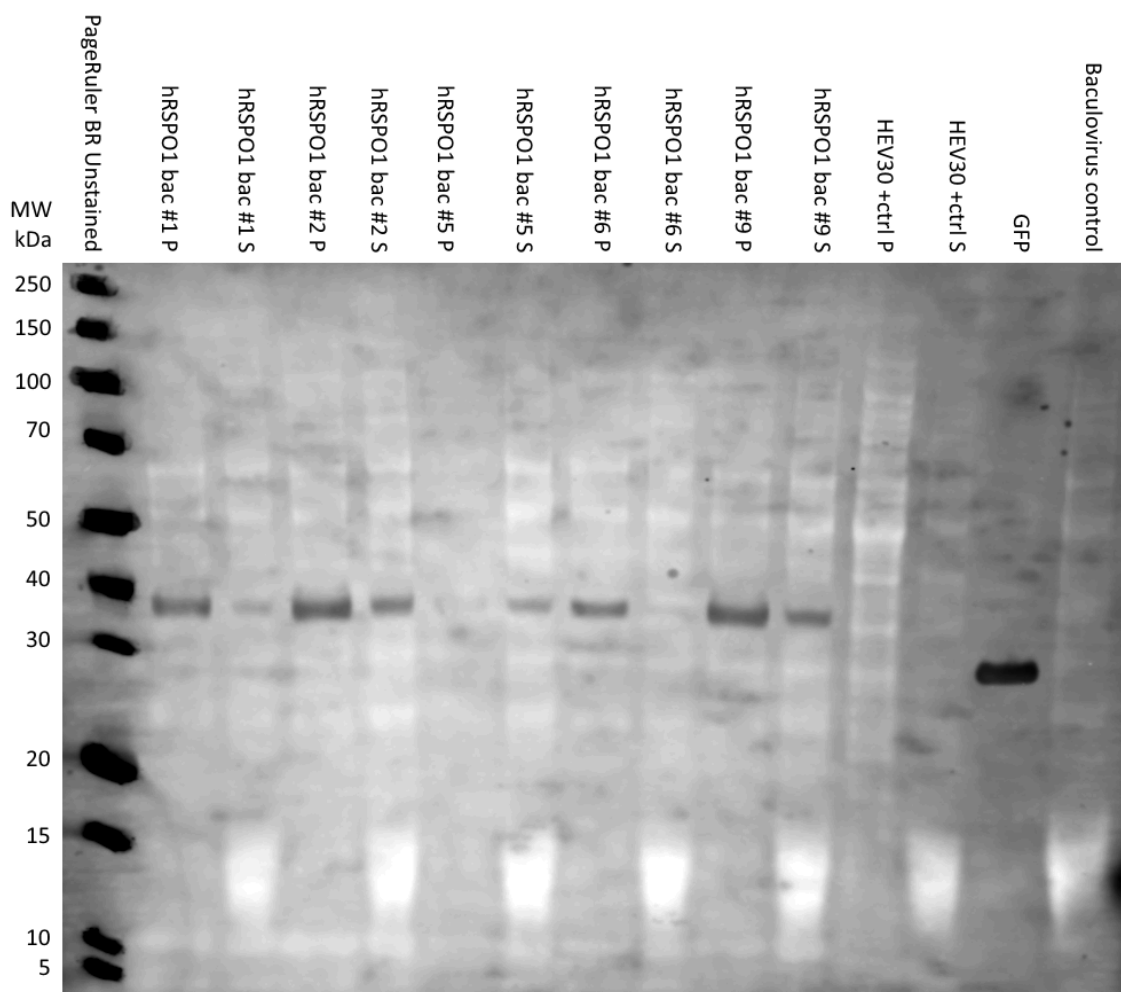
95 °C	4 min	
95 °C	30 s	25 x
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	hold	

Geelikuvan (kuva 1) perusteella bakmidi #11 ei ollut käyttökelpoinen. Transfektioon valittiin bakmidit #1, #2, #5, #6 ja #9. Lisäksi mukaan otettiin positiiviseksi kontrolliksi laboratoriossa aiemmin käytetty ja toimivaksi todettu bakmidi. Primäärivirus (P1) tuotettiin transfektoimalla bakmidit Sf9-hyönteis-soluihin 6-kuoppalevyllä käyttäen Invitrogen Cellfectin II -transfektioagenssia.



KUVA 1. Bakmidien agarosigeelielektroforeesi. Negatiivisen kontrollin ja näytteen #11 noin 325 emäsparin kokoiset bandit viittaavat epäonnistuneeseen transpositioon.

Sekundäärivirus (P2) valmistettiin monistamalla P1 virusta suuremmassa 50 ml tuottotilavuudessa. P2 virus kerättiin sentrifugoimalla soluja 5 minuuttia 500 g voimalla. Supernatantit jäivät sentrifugoinnin jälkeen vielä sameiksi, joten ne suodatettiin 0,22 μm kalvon läpi ennen jatkokäyttöä. P2 pelleteistä ja supernatanteista otettiin näytteet western blottia varten (kuva 2).



KUVA 2. Bakulovirus P2 western blot. Detektoitu StrepTactin Oyster 645 konjugaatilla, joka sitoutuu tuotetun proteiinin TwinStrep-kahvaan. Mukana TwinStrep-tagillinen GFP. Proteiineihin sitoutunut konjugaatti näkyy kuvassa tummina bandeina. Kuvattu Odyssey CLx-laitteella.

4.3.2 Ensimmäiset tuotot Sf9, High Five ja Tni-FNL -soluissa

Proteiinin tuottoa (P3) varten käytettiin soluja 200 ml, 2×10^6 solua/ml. Puhtaiden solulinjojen ylläpidosta vastasi laboratorion vakiohenkilökunta, joka jakoi solut valmiiksi sopiviin eriin solujen eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. Solujen transduktointiin käytettiin 10 ml suodatettua P2 #9 supernatanttia.

Neljän vuorokauden kasvatuksen jälkeen supernatantit erotettiin soluista sentrifugoimalla 15 minuuttia 12000 g voimalla ja säilöttiin 4 °C lämpötilaan odottamaan puhdistusta. Solupelletit resuspensoitiin noin 40 ml:aan StrepTactin XT -affiniteettipylvään sitoutuspuskuria (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) ja pakastettiin.

4.3.3 Bakuloviruksen tiitteri ja toiset tuotot vaihtelevilla virusmäärillä

Bakulovirus #9 konsentroidiin 10 ml:sta P2 supernatanttia. 15 ml sentrifuugiputken pohjalle pipetoitiin 2 ml 25% w/v sakkaroosia endotoksiinivapaassa PBS-puskurissa ja P2 virus lisättiin päälle varoen sekoittamasta kerroksia. Putkea sentrifugoitiin 24 tuntia 5000 g voimalla, minkä jälkeen neste pipetoitiin varovasti putkesta pois. Putken pohjalle laskeutuneet virukset resuspensoitiin varovasti 200 µl:aan endotoksiinivapaata PBS-puskuria, jolloin tilavuudeksi muodostui 1:50 alkuperäisestä.

Konsentroidun viruksen tiitteri mitattiin BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kitin protokollan (Clontech Laboratories, Inc. n.d., 5–10.) mukaisesti. Työvaiheet, joissa neste pipetoitiin pois kaivoista, suoritettiin erityisesti varoen solumaton rikkomista pipetin kärjellä. Lisäksi nesteet pipetoitiin pois enintään kahdesta kuopasta kerrallaan, jotta solut eivät ehtisi kuivua ennen seuraavan nesteen lisäämistä. Peroksidaasisubstraatin lisäyksen jälkeen levyä inkuboitiin huoneenlämmössä yön yli.

Viruksen tiitterin määrittämisen jälkeen tehtiin Sf9, High Five ja Tni-FNL soluilla uudet P3 tuotot käyttäen eri MOI (multiplicity of infection) arvoja. MOI kuvaa virusten määrää suhteutettuna solujen määrään. Tuotot tehtiin neljällä eri MOI:lla, tilavuus oli kaikissa tapauksissa 50 ml ja solujen määrä 2e6 solua/ml. Taulukkoon 3 on listattu soluille lisätyn P2 virusstokin määrät ja lasketut MOI-arvot. Koska P2 virusta #9 ei ollut enää riittävästi, käytettiin virusta #2 ja oletettiin sen tiitterin olevan samaa luokkaa #9:n kanssa. Vertailun vuoksi ensimmäisten tuottojen MOI oli noin 1,3.

TAULUKKO 3. Tuottoihin käytetyt virustilavuudet ja laskennalliset MOI-arvot

P2 virusstokin tilavuus ml	MOI
7,7	1
1	0,13
0,5	0,065
0,2	0,024

Tuotot kerättiin 3 vuorokauden jälkeen, supernatantit erotettiin soluista sentrifugoimalla ja niistä otettiin näytteet western blottia varten.

4.4 Tuotto mammaalisoluissa

4.4.1 Tuotto transfektioreagenssilla

Proteiinin tuottoa varten kasvatettiin FreeStyle 293-F -soluja suspensiokasvatuksena 30 ml tilavuudessa. Kasvatusmediaan käytettiin FreeStyle 293 Expression Mediumia. Soluja kasvatettiin 37 °C lämpötilassa 125 RPM tasoravistelussa. Inkubaattorin ilman CO₂-pitoisuudeksi säädettiin 8%. Solujen elävyyden ja lukumäärän määrittämiseen käytettiin Invitrogen Countess -solulaskuria. Solut jaettiin 2-3 päivän välein tuoreeseen kasvatusmediaan 0,2–0,4e6/ml solutiheyteen.

Solut transfektoitiin FreeStyle MAX-transfektioreagenssilla valmistajan protokollan mukaan (ThermoFisher Scientific 2017, 1–3). Transfektioon käytettiin edellisenä päivänä jaettuja soluja, joiden määräksi laskettiin 1,5e6/ml. 20 ml soluja sentrifugoitiin pohjaan ja resuspensoitiin noin 29 ml:aan tuoretta kasvatusmediaa. DNA-lipidikompleksin lisäyksen jälkeen kasvatustilavuudeksi tuli noin 30 ml ja solutiheydeksi 1,0e6/ml. Tuotot kerättiin 7 vuorokauden kasvatuksen jälkeen erottelemalla solupelletti ja supernatantti toisistaan.

4.4.2 Tuotto bakuloviruksella

Hyönteissolujen lisäksi bakulovirus soveltuu myös mammaalisolujen transduktioon (Airenne, Laitinen, Mähönen & Ylä-Herttuala 2009, 1). Tuottoa

varten solut jaettiin edellisenä päivänä ja transduktiohetkellä solutiheydeksi laskettiin $1,3e6/ml$. Soluja inkuboitiin virusten kanssa 2 tuntia inkubaattorissa, minkä jälkeen solut sentrifugoitiin pelletiksi ja resuspensoitiin puhtaaseen kasvatukseen. Tuotot kerättiin 4 vuorokauden kasvatuksen jälkeen.

4.5 Proteiinin puhdistus

Proteiinin puhdistus suoritettiin affiniteettikromatografialla käyttäen 5 ml StrepTactin XT Superflow affiniteettipylvästä ja GE Healthcaren ÄKTA Start nestekromatografia. Ennen pylvääseen latausta näytteisiin lisättiin $1 \mu g/ml$ CNCA sitomaan näytteiden seassa mahdollisesti olevaa biotiinia, jotta biotiini ei sitoudu pylvääseen ja estä näytteen sitoutumista.

Näytteet ladattiin pylvääseen 2 ml/min virtausnopeudella ja läpivirtaus kerättiin talteen. Latauksen jälkeen pylväs pestiin 6 CV (column volume, pylvään tilavuus) sitoutuspuskurilla ja proteiini eluoiitiin niin ikään 6 CV eluutiopuskurilla 2 ml fraktioihin. Eluoinnin jälkeen pylväs regeneroitiin ajamalla sen läpi 4 CV 10 mM NaOH:a ja pesemällä se 8 CV sitoutuspuskurilla.

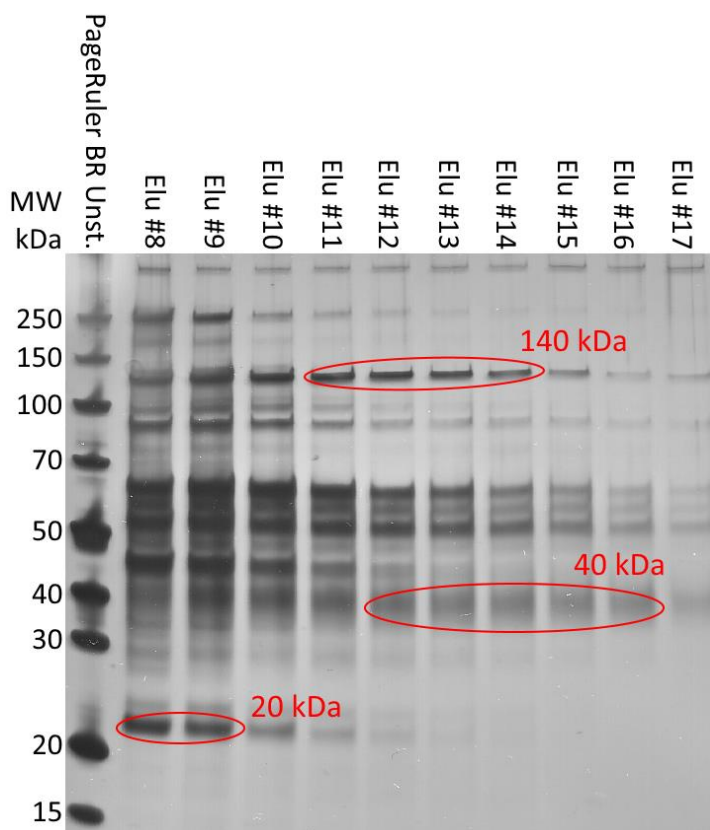
4.6 Tuotetun proteiinin laadunvarmistus

4.6.1 Massaspektrometrianalyysi

Tuotettujen proteiinien massaspektrometrasta tunnistusta varten proteiinit ajettiin SDS-PAGE-geelille ja geelit hopeavärjättiin Thermo Scientific Pierce Silver Stain Kitillä. Tutkittavaksi halutut bandit leikattiin irti geelistä ja näytteiden hopeaväri poistettiin Farzin Gharahdaghin ym. (1999, 602) kuvaamalla menetelmällä.

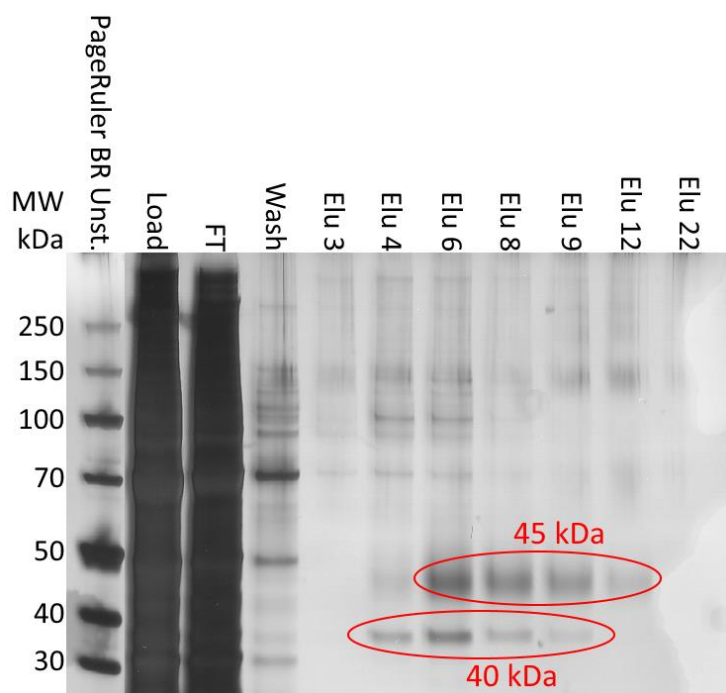
Hopeaväriin poiston jälkeen geelinpaloissa olevat proteiininäytteet denaturoitiin tris(2-karboksietyyli)fosfiinilla (TCEP) ja jodiasetamidilla, minkä jälkeen näytteet pilkottiin trypsinoimalla. Näytteenkäsittelyprotokolla on kuvattu tarkemmin liitteessä 3. Käsitellyt näytteet ajettiin Eksigent 425 NanoLC -laitteistolla käyttäen detektorina Sciex TripleTOF 5600+ -massaspektrometria siten, että joka toinen näyte oli puhdasta ajopuskuria. Ensin ajettiin koko näytesarja, minkä jälkeen kaikista näytteistä ajettiin duplikaatit.

MS-analyysi tehtiin kuudelle eri näytteelle. Kolme näytettä otettiin yhteen poolattujen bakulovirus P2 supernatanttien affiniteetikromatografiapuhdistusten eluutiofraktioista (kuva 3). 40 kDa näyte valittiin koska P2 supernatanttien western bloteissa näkyi positiivista signaalia hieman alle 40 kDa kohdalla. 140 kDa ja 20 kDa näytteet valittiin, koska ne näkyivät geelillä vahvana ja haluttiin selvittää mitä ne mahdollisesti ovat.



KUVA 3. MS-näytteiksi valitut bandit yhteen poolattujen bakulovirus P2 supernatanttien affiniteetikromatografiapuhdistuksen eluutiofraktioista. Hopeavärjätty SDS-PAGE-geeli.

Kaksi muuta näytettä otettiin yhteen poolattujen mammaalisolutuottojen affiniteetikromatografiapuhdistuksen eluutiofraktioista (kuva 4).



KUVA 4. MS-näytteet mammaalisolutuottojen puhdistuksen eluutiofraktioista. Geelillä pylvääseen ladattu näyte (Load), latauksessa pylvään läpi virrannut näyte (FT), pesufraktion näyte (Wash) ja näytteitä eluutiofraktioista. Hopeavärjätty SDS-PAGE-geeli.

4.6.2 Proteiinin biologisen aktiivisuuden varmistus

Tuotteen biologisen aktiivisuuden varmistuksesta vastasi FT Keijo Viirin johtaman suolen signaloinnin epigenetiikka -tutkimusryhmän henkilökunta. Testiä varten kasvatettiin suolen organoideja ryhmän käyttämän protokollan mukaisesti. Organoidit jaettiin liekillä pienennetyllä pasteurpipetillä pipetoiden ylös-alas irrallisiksi soluiksi kuoppalevyille ja soluille lisättiin kasvuun tarvittavat EGF, noggin ja RSPO1. (Viiri 2018a.)

Testissä vertailtiin itse tuotetun ja kaupallisen RSPO1:n kykyä tuottaa uusia kryptia laskemalla organoideihin kasvaneiden kryptien määrät eri RSPO1-pitoisuuksilla (300, 1000 ja 2000 ng/ml). Negatiivisena kontrollina organoideja kasvatettiin lisäämällä niille vain EGF ja noggin, jolloin ilman RSPO1:n läsnäoloa solut erilaistuvat spontaanisti enterosyyteiksi ja kuolevat 3-4 vuorokauden kuluessa. (Viiri 2018a.)

5 TULOKSET

5.1 Bakuloviruksen tiitteri

Virustiitteri IFU/ml lasketaan kaavalla (1).

$$\text{IFU/ml} = n \times lk \times 40 \quad (1)$$

missä n on infektiokosten lukumäärien keskiarvo ja lk on laimennoskerroin. Kerroin 40 tulee käytetystä viruksen tilavuudesta 1/40 ml (25 μ l). Taulukkoon 4 on listattu fokusten lukumäärät ja niille lasketut keskiarvot kuopissa -4 ja -5.

TAULUKKO 4. Virustiitterimäärityksen fokusten lukumäärät rinnakkaisissa kuopissa ja niille lasketut keskiarvot.

Laimennoskerroin	Fokusten lukumäärät			Keskiarvo
10^{-4}	25	30	43	32,7
10^{-5}	4	3	4	3,7

Kaavan (1) mukaan tiitteriksi saadaan -4 laimennoksia käyttäen

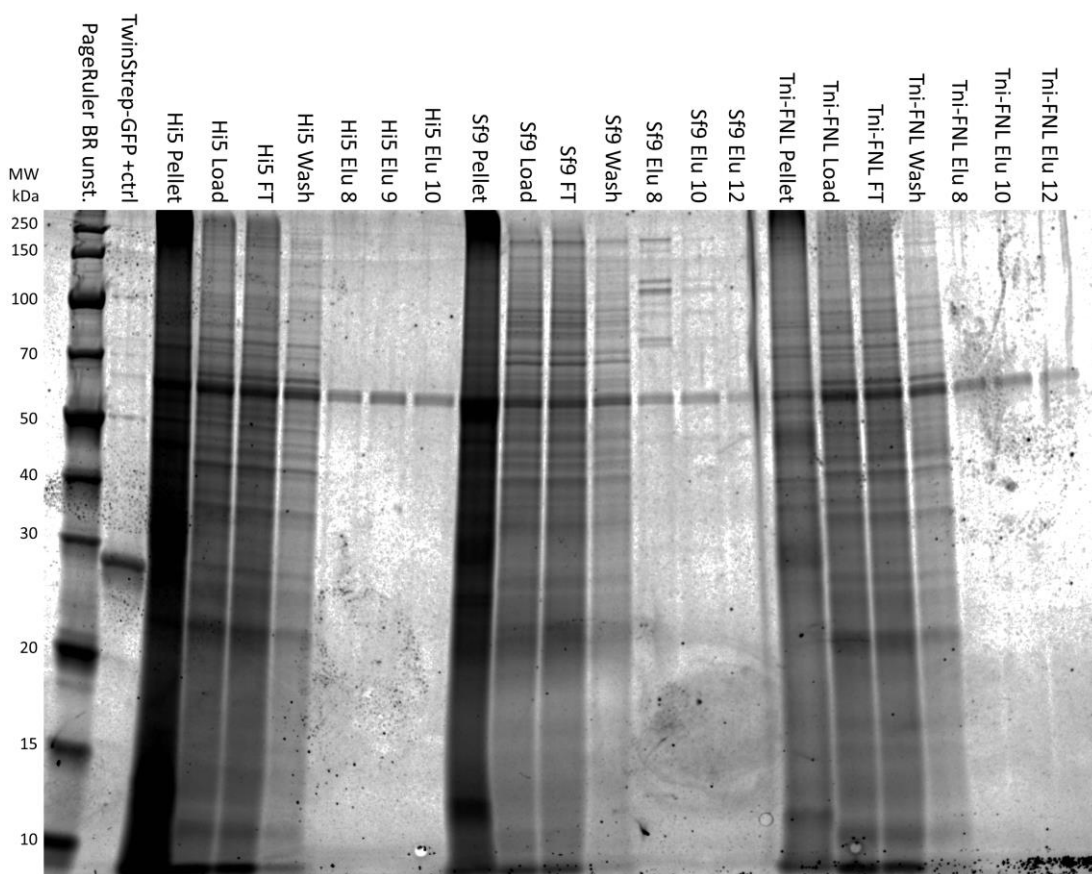
$$\text{IFU/ml} = 32,7 \times (10^{-4})^{-1} \times 40$$

$$\text{IFU/ml} \approx 1,3 \times 10^7$$

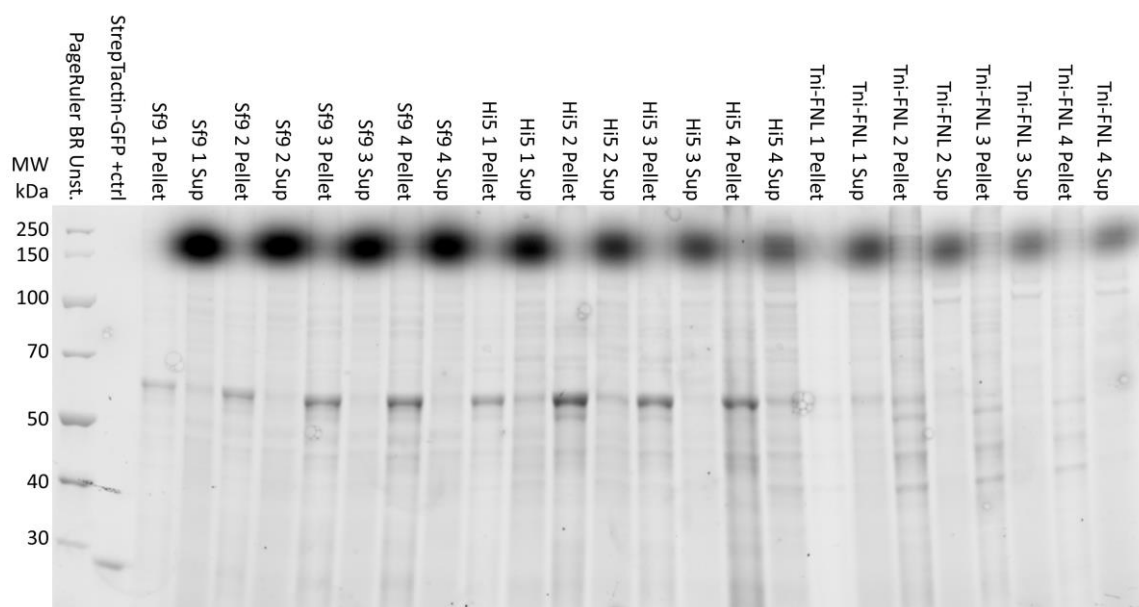
5.2 Proteiinituottojen ja puhdistusten tulokset

5.2.1 Hyönteissolutuotot

Kuvassa 5 on Oriole-värjätty geeli ensimmäisten 200 ml hyönteissolutuottojen affiniteetikromatografiapuhdistuksesta.



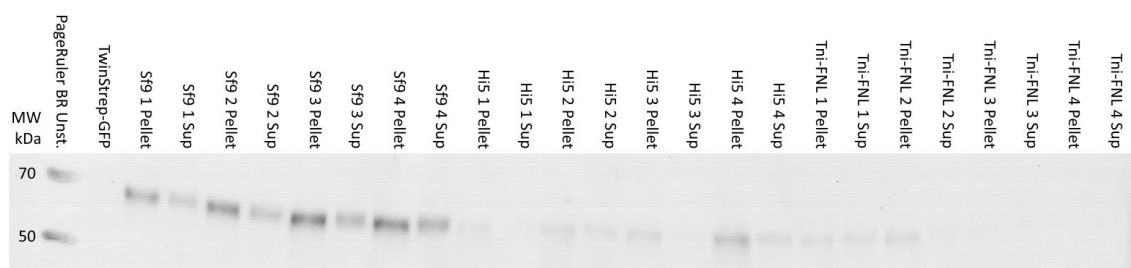
KUVA 5. Oriole-värjätty geeli hyönteissoluntuottojen affiniteettikromatografia-puhdistuksista.



Kuvassa 6 on pelletti- ja supernatantinäytteet 50 ml hyönteissoluntuotoista eri virusmäärillä Bio-Rad Criterion TGX Stain-Free -geelillä.

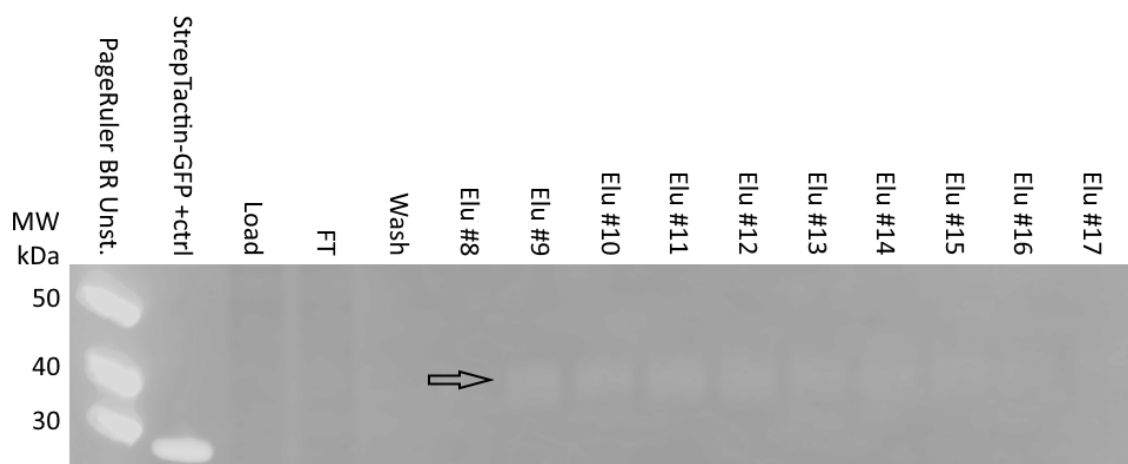
KUVA 6. Pelletti- ja supernatanttinäytteet hyönteissolutuotoista vaihtelevilla virusmäärillä. Numero solun nimen perässä kertoo käytetyn MOI-arvon: 1 = 1; 2 = 0,13; 3 = 0,064; 4 = 0,025.

Kuvassa 7 on kuvan 6 geeli western blotattuna. Blot varmistaa sen, että kuvien 5 ja 6 geeleillä näkyvät bandit ovat bakulovirusta.

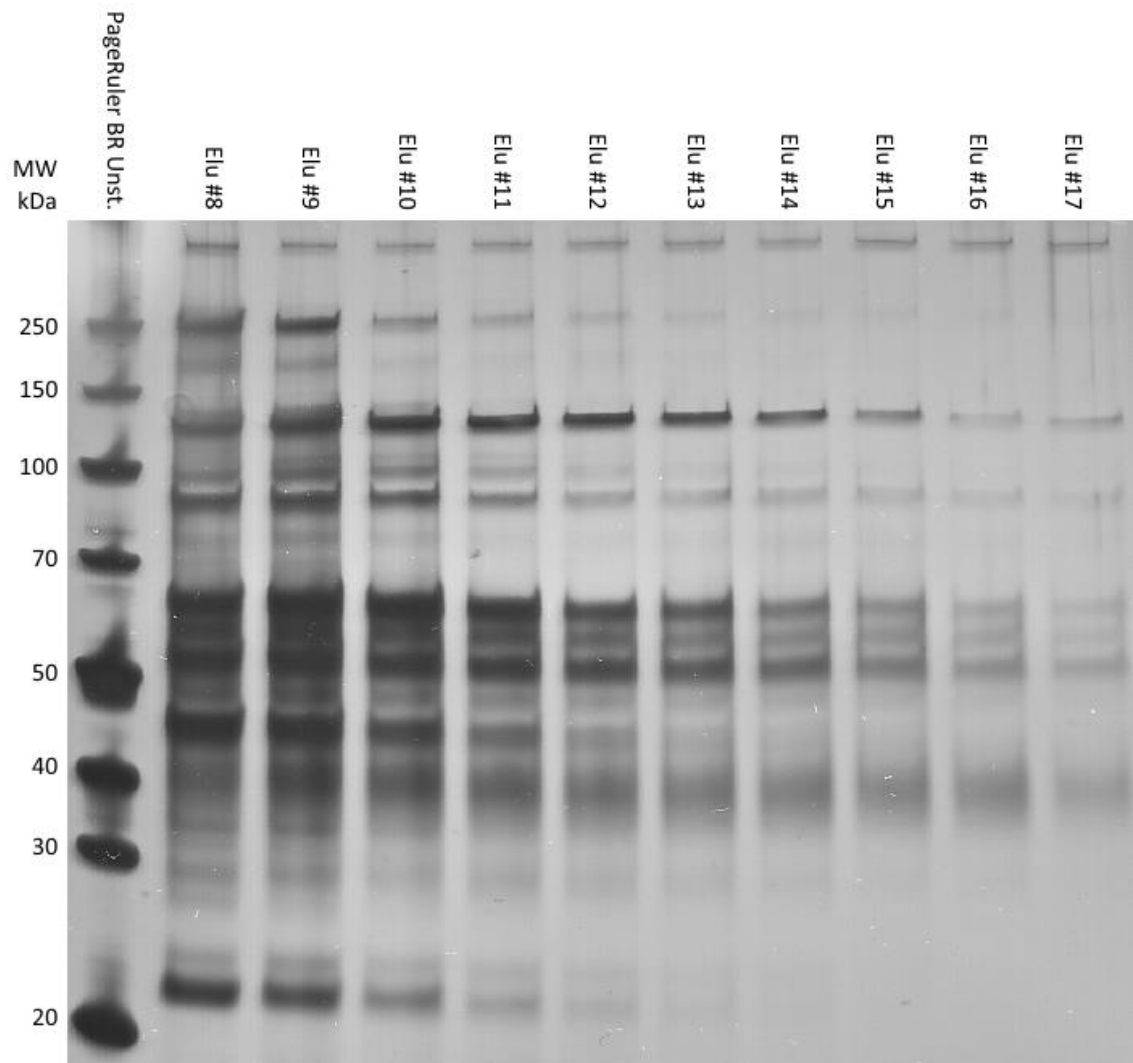


KUVA 7. Western blot kuvan 6 geelistä. Primäärivasta-aine Baculovirus gp64 (AcV5), mouse monoclonal IgG2b, Santa Cruz Biotechnology. Sekundäärivasta-aine Goat Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase, Sigma.

Koska P2 bakulovirusten western blotissa (kuva 2) näkyy signaalia StrepTactin Oyster 645 konjugaatilla detektoituna, koottiin niiden supernatantit yhteen ja tehtiin niille affiniteettikromatografiapuhdistus. Puhdistuksesta tehtiin western blot (kuva 8) ja hopeavärjäys (kuva 9).

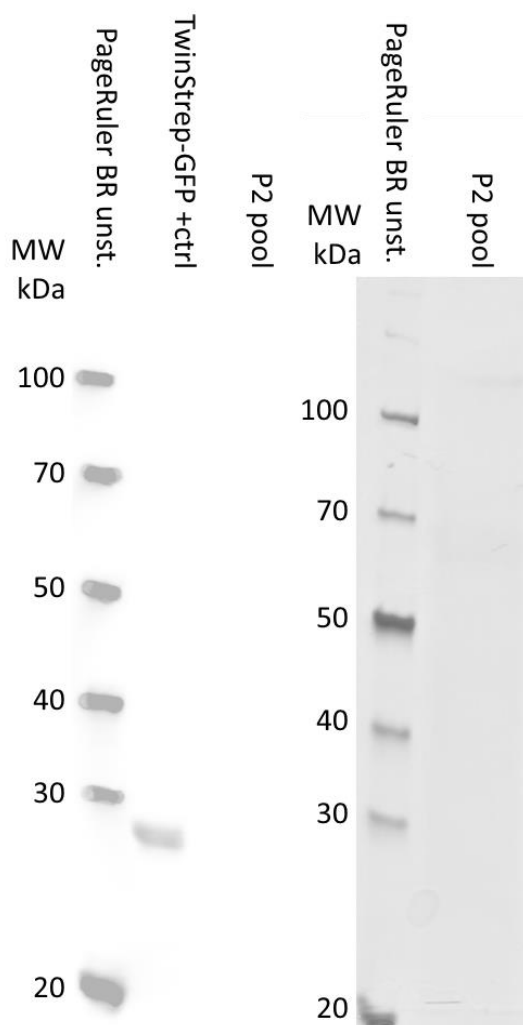


KUVA 8. P2 poolin puhdistuksen western blot. Detektoitu StrepTactin Oyster 645 konjugaatilla. Nuolen kohdalla on havaittavissa heikko signaali eluutiofraktioissa 9-16.



KUVA 9. P2 poolin puhdistuksen eluutiofraktioiden hopeavärjäys. Affiniteetti-kromatografiasta huolimatta eluutiofraktioissa on paljon epäpuhtauksia.

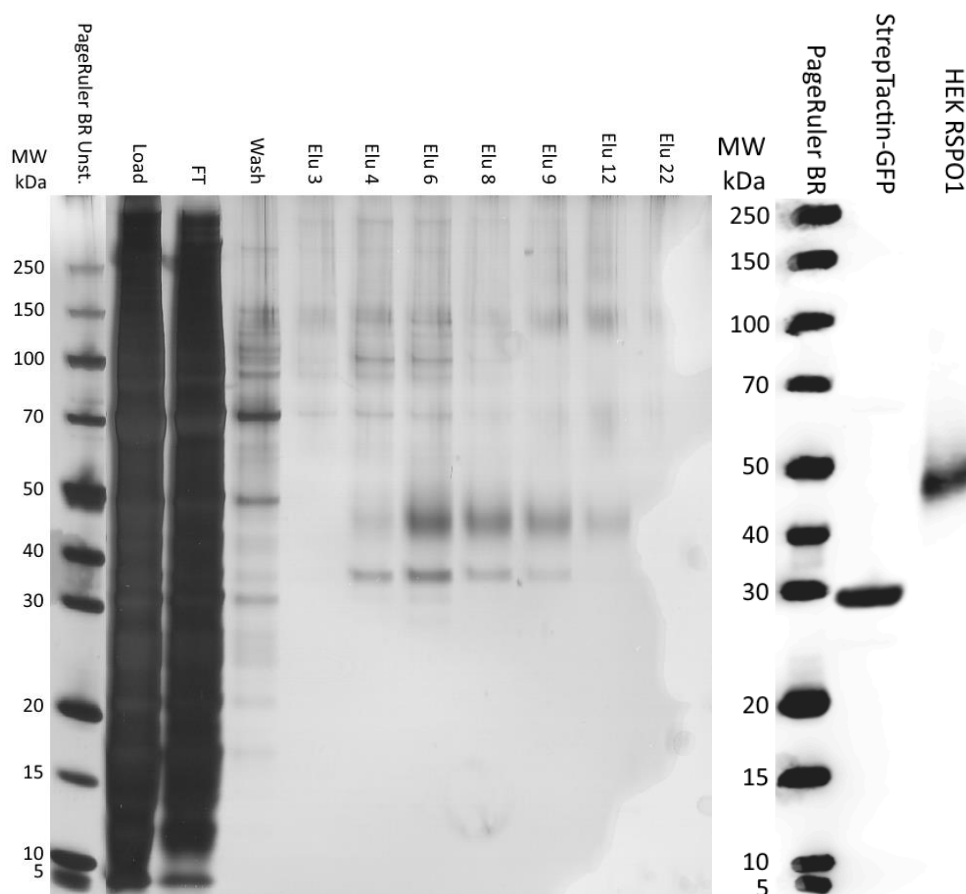
Eluutiofraktiot yhdistettiin ja tuotetta pyrittiin konsentroimaan lyofilisoimalla. Kuivattu näyte liuotettiin uudelleen 2 ml tilavuuteen vettä, mutta näytteestä ei enää saatu näkymään geelillä mitään (kuva 10).



KUVA 10. P2 pool lyofilisoinnin ja uudelleen liuotuksen jälkeen. Vasemmalla western blot detektoituna StrepTactin Oyster 645 konjugaatilla, oikealla hopeavärjätty geeli.

5.2.2 Mammaalisolutuotot

Kuvassa 11 vasemmalla on hopeavärjätty geelikuva yhteen poolattujen mammaalisolutuottojen affiniteetikromatografiapuhdistuksesta. Eluutiofraktiot 4-12 koottiin yhteen ja proteiini vaihdettiin eluutiopuskurista fosfaattipuskuriin käyttäen Sartorius VivaSpin Turbo 15 -sentrifuugisuodatinta 30k MWCO suodatinkoolla. Samalla tuote konsentroidiin noin 1,1 ml lopputilavuuteen. Lopulliseksi proteiinikonsentraatioksi mitattiin 0,261 mg/ml. Sekaan lisättiin 0,1% BSA, minkä jälkeen tuote jaettiin 20 µg alieriin ja säilöttiin -80 °C lämpötilaan.



KUVA 11. Vasemmalla mammaalisolutuottojen affiniteetikromatografiapuhdistuksen geelikuva hopeavärjätynä. Oikealla puhdistetun ja konsentroidun tuotteen western blot detektoituna StrepTactin Oyster 645 konjugaatilla.

5.3 Massaspektrometrianalyysin tulokset

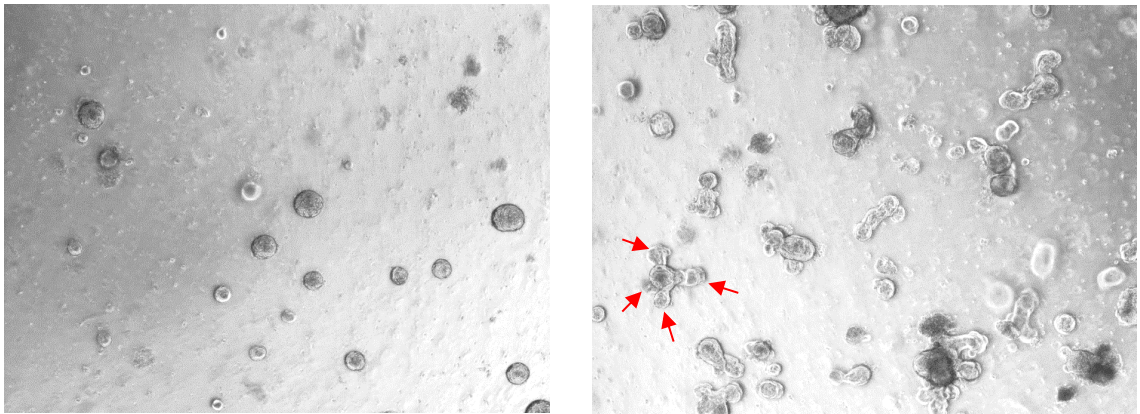
Kaikissa MS-näytteissä oli huomattavia määriä keratiinikontaminaatiota. Mahdollinen lähde näytteiden keratiinille oli geelien hopeavärjyksen poistossa käytetyt reagenssit. Käytetyt reagenssit olivat yleisessä käytössä, eivätkä erityisesti massaspektrometriaan varattuja. Keratiinia on mm. hiuksissa ja ihossa, joten kontaminaatio tapahtuu hyvin helposti.

Kontaminaatiosta huolimatta mammaalisolutuoton 45 kDa ja P2 poolin 40 kDa proteiineista löytyi merkittäviä määriä RSP01:lle spesifisiä peptidejä. Mammaalisolutuoton 40 kDa näytteen rinnakkaisista näytteistä toisesta löytyi myös pieniä määriä RSP01:lle spesifisiä peptidejä, mutta toisesta ei. Kyse on todennäköisesti näytteen kontaminaatiosta. Todennäköisesti mammaalisolujen

40 kDa proteiini on glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi. Tarkemmat analyysitulokset on kirjattu liitteeseen 4.

5.4 Proteiinin biologisen aktiivisuuden tulokset

Koska hyönteissolutuotoista ei saatu puhdistettua havaittavia määriä proteiinia, käytettiin aktiivisuuskokeissa vain mammaalisoluissa tuotettua proteiinia. Organoideja kasvatettiin 72 tuntia, minkä jälkeen niistä laskettiin muodostuneet kryptat. Kuvassa 12 on nähtävillä ero organoideissa RSPO1 kanssa ja ilman 48 tunnin kasvatuksen jälkeen.



KUVA 12. Esimerkkikuvat organoideista 48 tunnin kasvatuksen jälkeen. Vasemmalla negatiivinen kontrolli, jossa oli mukana EGF ja noggin mutta ei RSPO1, oikealla EGF + noggin + itse tuotettu RSPO1 1000 ng/ml. Punaisilla nuolilla on merkitty yhteen organoidiin kasvaneet neljä kryptaa. (Viiri 2018b.)

Kolmen vuorokauden kasvatuksen jälkeen laskettiin jokaisesta organoidista niihin kasvaneiden kryptien lukumäärät. Taulukkoon 5 on kirjattu kryptien lukumäärien keskiarvo per organoidi eri RSPO1 pitoisuuksilla. Tarkat laskut on kirjattu liitteeseen 5.

TAULUKKO 5. Organoideihin kasvaneiden kryptien lukumäärien keskiarvot.

	300 ng/ml	1000 ng/ml	2000 ng/ml
Itse tuotettu RSP01	5,36	5,48	5,85
Kaupallinen RSP01	5,73	6,41	5,94

Itse tuotetulla RSP01:lla kryptien määrät olivat hieman pienempiä kaupalliseen verrattuna, mutta tulokset ovat verrattain lähellä toisiaan.

6 POHDINTA

Työn tavoitteena oli kehittää kustannustehokas menetelmä proteiinin tuottamiseksi omassa laboratoriossa. Tarkoituksena oli tuottaa proteiinia erilaisissa soluissa ja vertailla menetelmien lopputuotteiden aktiivisuutta. Tavoite ja tarkoitus täyttyivät osittain. Proteiinia saatiin tuotettua mammaalisoluissa ja tuotteen aktiivisuus osoitettiin kokeellisesti, joskin tuotto hyönteissoluissa epäonnistui. Mammaalisolutuotto oli kuitenkin työn ensisijainen tarkoitus, joten työ voidaan katsoa siltä osin onnistuneeksi.

Hyönteissolutuotossa kohdattiin useita ongelmia. Ensimmäiset vastoinkäymiset tulivat P3-tuottojen kohdalla. Proteiinia ei tuottunut riittävän suuria pitoisuuksia, jotta se olisi näkynyt geelillä tai western blotilla. Syynä tähän saattoi olla esimerkiksi epäoptimaalinen viruskonsentraatio. Ensimmäisessä tuotossa käytetty protokolla oli todettu toimivaksi useissa aiemmissa proteiinituotoissa, mutta eri proteiinien optimaaliset tuotto-olosuhteet saattavat poiketa toisistaan. Tuottoa pyrittiin optimoimaan pienemmillä viruskonsentraatioilla, jotta solut saisivat kasvaa enemmän ennen kuin virus infektoi ne, mutta niistä toimenpiteistä ei ollut apua.

P2-tuotoista puhdistettu proteiini katosi lyofilisoinnin aikana. Syynä tähän oli mahdollisesti proteiinin saostuminen liukenemattomaan muotoon. Mammaalisolutuottojen konsentroidinnissa käytettiin sentrifuugisuodatinta paremmalla menestyksellä. Hyönteissolutuotto jäi myös huomattavan epäpuhtaaksi affiniteettikromatografian jälkeen (kuva 9).

Hyönteissolutuottoa ei enää pyritty optimoimaan enempää ajan puutteen vuoksi. Hyönteissolutuottoa ei myöskään pidetty niin tärkeänä työn onnistumisen kannalta, sillä pääpaino oli alusta alkaen mammaalisolutuotossa. Vaikka hyönteissoluissa tuotettua proteiinia ei päästyäkään testaamaan solujen kasvatuksessa, voitiin geelikuvista havaita proteiinin rakenteellisia eroja hyönteis- ja mammaalisolutuottojen välillä. Mammaalisoluissa tuotettu proteiini kulkeutui geelillä noin 5 kDa suurempaan, mikä viestii proteiinin erilaisesta

posttranslationalisesta muokkauksesta eri soluissa. Näiden erojen vaikutus proteiinin biologiseen aktiivisuuteen jäi selvittämättä.

Mammaalisolutuoton osalta työ onnistui paljon paremmin. Kahdella 30 ml tuottotilavuudella proteiinia saatiin tuotettua ja puhdistettua yhteensä hieman alle 300 µg, mistä saatiin kohtalainen määrä 20 µg käyttöeriä. Mikäli proteiinia tuotetaan jatkossa säännöllisesti, on kannattavaa tehdä tuottoa varten stabiili solulinja, jotta vältetään puhtaiden solujen transfektoinnin työvaiheilta. Tulevia tuottoja varten tuottotilavuutta voidaan myös skaalata suuremmaksi.

Vaikka tuotettu proteiini ei ollut täysin puhdasta, epäpuhtaudet eivät näennäisesti vaikuttaneet organoidien kasvuun. Epäpuhtauksista voidaan pyrkiä pääsemään eroon puhdistusvaiheessa eluimalla tuote pylväästä nousevalla biotiinikonsentraatiolla. Tämä saattaa saada aikaan sen, että pylvääseen epäspesifisesti sitoutunut proteiini eluoituu ulos eri aikaan varsinaisen puhdistuskahvallisen tuotteen kanssa. Proteiini voidaan myös pyrkiä puhdistamaan tarkemmin esimerkiksi kokoerottelukromatografialla, mutta onnistuneiden kasvatuskokeiden valossa se ei liene tarpeellista.

LÄHTEET

Airenne, K. J., Laitinen, O. H., Mähönen, A. J. & Ylä-Herttuala, S. 2009. Transduction of Vertebrate Cells with Recombinant Baculovirus. *Cold Spring Harbor Protocols* 4 (3).

Airenne K. J., Makkonen K-E., Mähönen A. J. & Ylä-Herttuala S. 2011 Baculoviruses Mediate Efficient Gene Expression in a Wide Range of Vertebrate Cells. Teoksessa Merten O-W., Al-Rubeai M. (toim.) *Viral Vectors for Gene Therapy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 737. USA: Humana Press, 279–302.

Campbell, M. & Farrell, S. 2009. *Biochemistry*. 6. painos. Kanada: Thomson Brooks/Cole.

Clontech Laboratories, Inc. N.d. BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit User Manual. Protocol No. PT3153-1. Version No. 072213.

de Lau, W.B.M., Snel, B. & Clevers, H. 2012. The R-spondin protein family. *Genome Biology*. 13 (242).

Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S. & Mische, S. M. 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20 (3), 601–605.

Invitrogen Ltd. 2002. *Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques*. Instruction Manual. Date 022702.

Kim, K. A., Kakitani, M., Zhao, J., Oshima, T., Tang, T., Binnerts, M., Liu, Y., Boyle, B., Park, E., Emtage, P., Funk, W. D. & Tomizuka, K. 2005. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science* 309 (5738), 1256–1259.

Kim, K. A., Zhao, J., Andarmani, S., Kakitani, M., Oshima, T., Binnerts, M. E., Abo, A., Tomizuka, K. & Funk, W. D. 2006. R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle* 5 (1), 23–26.

Life Technologies Corporation. 2015. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. User Guide. Publication Number MAN0000414. Revision A.0.

Okimoto, T., Friedmann, T. & Miyanohara, A. 2001. VSV-G Envelope Glycoprotein Forms Complexes with Plasmid DNA and MLV Retrovirus-like Particles in Cell-free Conditions and Enhances DNA Transfection. *Molecular Therapy* 4 (3), 232–238.

Peprtech, Inc. 2017. RUO Cytokines, Growth Factors & Cytokines, Recombinant Human R-Spondin-1. Luettu 1.3.2019. <https://www.peprtech.com/en/recombinant-human-r-spondin-1>

Sato, T. & Clevers, H. 2013. Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science* 340 (6137), 1190–1194.

Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. 2012. The many faces and functions of β -catenin. *The EMBO Journal* 31 (12), 2714–2736.

Viiri, K. dosentti, FT. 2018a. R-Spondin aktiivisuustesti. Sähköpostiviesti. Luettu 9.10.2018.

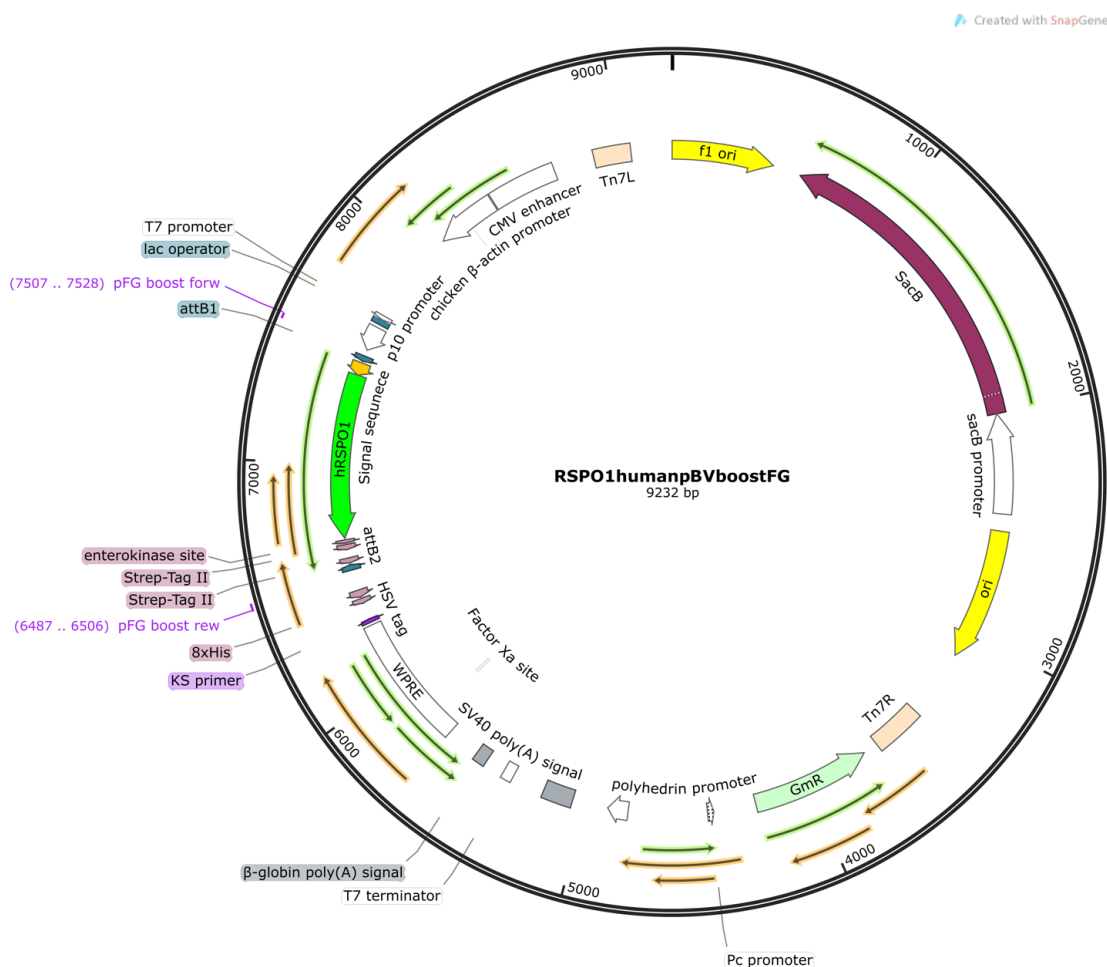
Viiri, K. dosentti, FT. 2018b. bud assays. Sähköpostiviesti. Luettu 19.10.2018.

Wallach, T. & Bayrer, J. R. 2017. Intestinal Organoids: New frontiers in the study of intestinal disease and physiology. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 64 (2), 180–185.

Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D. & Hope, T.J. 1999. Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors. *Journal of Virology* 73 (4), 2886–2892.

LIITTEET

Liite 1. RSPO1-pBVboost plasmidikartta ja insertin aminohapposekvenssi



Signal sequence

MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGKRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGC
 LKSPKLFILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFS
 HNFCTKCKEGLYLHKGRCPACPEGSSAANGTMECSPAQCCEMSEWSPWG
 PCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPE
 GQKRRKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSRRRKGGQQQQQQGTVGPL
 TSAGPAGS**DDDDK**SA**WSHPQFEK**GGGSGGGSGGSA**WSHPQFEK***

EK site, **Strep-TagII**

Liite 2. Sekvensoinnissa ja bakmidi-PCR:ssä käytettyjen alukkeiden sekvenssit

pFG Forward: 5' – CAA TCA AAG GAG ATA TAC CAC G – 3'

pFG Reverse: 5' – TCG ACC TGC AGG CGC GCC GA – 3'

pUC/M13 Forward: 5' – GTT TTC CCA GTC ACG AC – 3'

pUC/M13 Reverse: 5' – CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'

F835 Forward: 5' – CTC CAT TTC CAC CCC TCC CA – 3'

Liite 3. Näytteenkäsittelyprotokolla massaspektrometrille

1 (2)

1.	Lisää $\leq 75 \mu\text{l}$ 25 mM TCEP : 50 mM TEAB 1:1 (niin että geeli peittyy)	TCEP = Tris (2-karboksietyyli)fosfiini TEAB = Trietyyliammonium-bikarbonaatti
2.	Inkuboi ravistelussa $+60 \text{ }^\circ\text{C}$ tunnin ajan	
3.	Poista supernatantti ja lisää $25 \mu\text{l}$ 10 x jodiasetamidi. Inkuboi ravistelijassa huoneenlämmössä foliolla peitettynä 30 min	
4.	Poista supernatantti ja kuivaa näyte lisäämällä $100 \mu\text{l}$ 50 mM TEAB : ACN 1:1	ACN = asetonitrili
5.	Poista supernatantti ja kuivaa näyte vakuumikonsentraattorissa	
6.	Liuota trypsiini ($25 \mu\text{g}$) lisäämällä $1000 \mu\text{l}$ 50 mM TEAB	
7.	Lisää $1 \mu\text{g}$ trypsiiniä ($=40 \mu\text{l}$) näytteeseen. Inkuboi jäällä 10 min	
8.	Lisää näytteisiin 50 mM TEAB niin, että näytteet peittyvät	
9.	Sulje putket parafilmillä ja laita putket $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ravistelijaan 16 tunnin ajaksi	
10.	Siirrä trypsiiniliuos uuteen putkeen	
11.	Lisää geelinpaloille $100 \mu\text{l}$ 50 % ACN / 5 % FA ja siirrä ravistelijaan (HL) 30 minuutiksi	FA = muurahaishappo

12.	Siirrä ultraäänihauteeseen 5 minuutin ajaksi. Siirrä liuos samaan putkeen trypsiiniliuoksen kanssa	
13.	Lisää geelinpaloille 100 µl 50 % ACN / 5 % FA ja siirrä ravistelijaan (HL) 30 minuutiksi	
14.	Siirrä ultraäänihauteeseen 5 minuutin ajaksi. Siirrä liuos samaan putkeen trypsiiniliuoksen kanssa	
15.	Kuivaa vakuumikonsentraattorissa	
16.	Liuota näytteet 14 µl ajopuskuria.	2 % ACN, 0,1 % FA Vorteksointi ja ravistelu 15 min HL
17.	Siirrä näytteet näytevialeihin	

Liite 4. Massaspektrometrianalyysin tulokset

1 (4)

20 kDa

20 kDa

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	40.78	40.78	41.8	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	40
2	35.62	35.62	39.7	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	29
3	17.70	21.70	25.2	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	17
4	17.00	17.00	34.5	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	17
5	4.08	5.35	17.6	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	6
6	3.44	3.44	8.6	sp P35030 TRY3_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	HUMAN	5
7	2.00	10.71	11.2	sp P48668 K2C6C_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3	HUMAN	11
8	1.68	2.92	7.3	sp P07477 TRY1_HUMAN	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	HUMAN	9

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	42.12	42.12	40.2	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	35
2	36.35	36.35	36.1	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	26
3	22.00	26.00	33.7	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	22
4	22.00	22.00	32.4	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	18
5	8.34	8.34	10.5	sp P07477 TRY1_HUMAN	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	HUMAN	12
6	6.00	10.10	19.1	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	7
7	6.00	8.00	12.5	sp P35030 TRY3_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	HUMAN	5
8	2.00	2.09	0.9	sp Q9Y5Y6 ST14_HUMAN	Suppressor of tumorigenicity 14 protein OS=Homo sapiens GN=ST14 PE=1 SV=2	HUMAN	2
9	1.82	1.82	5.5	sp Q06830 PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	HUMAN	1
10	1.41	1.41	0.3	sp Q9H2D6 TARA_HUMAN	TRIO and F-actin-binding protein OS=Homo sapiens GN=TRIOBP PE=1 SV=3	HUMAN	1

40 kDa

40 kDa

results were not found

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	12.72	12.7	26.0	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	10
2	8.66	8.66	18.5	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	13
3	7.86	7.86	34.6	sp Q2MKA7 RSPO1_HUMAN	R-spondin-1 OS=Homo sapiens GN=RSPO1 PE=1 SV=1	HUMAN	7
4	4.19	4.19	30.0	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	8
5	3.08	5.53	19.1	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	5

6	1.84	1.84	6.6	sp P35030 TRY3_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	HUMAN	1
7	1.54	1.54	12.2	sp P13929 ENOB_HUMAN	Beta-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO3 PE=1 SV=5	HUMAN	1
8	1.04	1.04	14.2	RRRRRsp P13645 K1C10_HUMAN	REVERSED Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	

130 kDa

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	23.85	23.85	35.7	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	16
2	20.07	20.07	36.6	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	14
3	11.33	11.33	28.6	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	10
4	7.36	9.73	24.6	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	9
5	4.00	4.00	24.4	sp P06733 ENO1_HUMAN	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	HUMAN	2
6	2.07	3.73	20.3	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	4

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	27.01	27.01	32.8	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	18
2	19.77	19.77	27.7	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	15
3	10.42	10.42	26.8	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	10
4	7.86	10.78	23.6	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	10
5	2.87	3.10	9.7	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	3

40 kDa HEK

40 kDa HEK

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	90,03	90,03	64,4	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	72
2	65,91	65,91	58,9	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	60
3	50,05	51,29	61	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	42
4	48,06	60,11	60,1	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	45
5	18,03	27,09	43	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	17
6	18,01	36,02	42,9	sp P48668 K2C6C_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3	HUMAN	29
7	10,01	36,02	38,3	sp P13647 K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	HUMAN	25
8	8,07	8,07	19	sp Q01105 SET_HUMAN	Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3	HUMAN	4
9	6,38	6,38	10,5	sp P07477 TRY1_HUMAN	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	HUMAN	7
10	6	6	11,8	sp P35030 TRY3_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	HUMAN	4
11	4,01	23,1	33,4	sp P08779 K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4	HUMAN	14
12	4	21,08	30,8	sp Q04695 K1C17_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2	HUMAN	13
13	2	34,04	44,3	sp P04259 K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5	HUMAN	27

14	2	2	0,2	sp Q8IZQ1 WDFY3_HUMAN	WD repeat and FYVE domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=WDFY3 PE=1 SV=2	HUMAN	1
15	2	2	10	sp P81605 DCD_HUMAN	Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	HUMAN	1
16	2	2	4,5	sp P04406 G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	HUMAN	1
17	1,08	1,08	0,8	sp O43150 ASAP2_HUMAN	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ASAP2 PE=1 SV=3	HUMAN	1

40 kDa HEK

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	60,62	60,62	62,4	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	60
2	37,96	37,96	49,8	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	47
3	33,76	33,92	56,5	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	34
4	26,74	35,1	57,4	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	33
5	13,53	15,52	39,2	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	14
6	6,01	11,24	28,6	sp P13647 K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	HUMAN	16
7	4,1	12,45	32,1	sp P08779 K1C16_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4	HUMAN	10
8	3,78	3,78	7,3	sp P07477 TRY1_HUMAN	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	HUMAN	6
9	3,21	11,04	27,1	sp P04259 K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5	HUMAN	20
10	2,54	2,54	15,2	sp Q01105 SET_HUMAN	Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3	HUMAN	1
11	1,74	1,74	4,5	sp P04406 G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	HUMAN	1
12	0,98	3,51	7,6	sp P35030 TRY3_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	HUMAN	4
13	0,43	0,43	1,3	sp Q8N7P1 PLD5_HUMAN	Inactive phospholipase D5 OS=Homo sapiens GN=PLD5 PE=2 SV=2	HUMAN	1
14	0,35	7,13	30,3	sp Q04695 K1C17_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2	HUMAN	8
16	0,21	0,21	2,7	sp Q2MKA7 RSPO1_HUMAN	R-spondin-1 OS=Homo sapiens GN=RSPO1 PE=1 SV=1	HUMAN	0
18	0,08	9,74	25	sp P02538 K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3	HUMAN	15
19	0,05	0,05	0,8	sp Q99666 RGPDS5_HUMAN	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 5/6 OS=Homo sapiens GN=RGPDS5 PE=1 SV=3	HUMAN	0

45 kDa HEK

45 kDa HEK

N	Unused	Total	%Cov	Accession#	Name	Species	Peptides (95%)
1	51,36	51,36	50,8	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	59
2	37,95	37,95	43,5	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	44
3	26,06	26,07	40,3	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	27
4	21,31	27,96	36,3	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	27
5	19,77	19,77	35,7	sp Q2MKA7 RSPO1_HUMAN	R-spondin-1 OS=Homo sapiens GN=RSPO1 PE=1 SV=1	HUMAN	24
6	10,34	14,05	40,5	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	15
7	6,6	14,04	26,4	sp P13647 K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	HUMAN	17

8	4,02	14,13	25,9	sp P02538 K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3	HUMAN	19
9	2,56	2,56	12,6	sp P07477 TRY1_HUMAN	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	HUMAN	5
10	2	2	2,7	sp Q8NDI1 EHBP1_HUMAN	EH domain-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=EHBP1 PE=1 SV=3	HUMAN	1
11	2	2	0,7	sp O75970 MPDZ_HUMAN	Multiple PDZ domain protein OS=Homo sapiens GN=MPDZ PE=1 SV=2	HUMAN	1

45 kDa HEK

N	Unused	Total	%Cov	Accession #	Name	Species	Peptides (95%)
1	56,12	56,12	47,2	sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	HUMAN	59
2	44,49	44,49	47,1	sp P13645 K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6	HUMAN	53
3	25,87	25,96	43,8	sp P35527 K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	HUMAN	28
4	23,35	38,87	38,2	sp P35908 K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	HUMAN	31
5	20,33	20,33	36,1	sp Q2MKA7 RSPO1_HUMAN	R-spondin-1 OS=Homo sapiens GN=RSPO1 PE=1 SV=1	HUMAN	33
6	16,1	20,42	33,9	sp P02533 K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	HUMAN	15
7	10	10	15,4	sp P07477 TRY1_HUMAN	Trypsin-1 OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=1 SV=1	HUMAN	9
8	6,84	22,15	26,1	sp P13647 K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	HUMAN	14
9	4,03	22,75	23,4	sp P48668 K2C6C_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3	HUMAN	17
10	2	4	8,1	sp P07478 TRY2_HUMAN	Trypsin-2 OS=Homo sapiens GN=PRSS2 PE=1 SV=1	HUMAN	5
13	0,08	0,08	3,9	sp Q9UK76 JUPI1_HUMAN	Jupiter microtubule associated homolog 1 OS=Homo sapiens GN=JPT1 PE=1 SV=3	HUMAN	0
15	0,06	0,07	3,5	sp Q96BQ5 CC127_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 127 OS=Homo sapiens GN=CCDC127 PE=1 SV=1	HUMAN	0
16	0,06	0,06	1,2	sp P21709 EPHA1_HUMAN	Ephrin type-A receptor 1 OS=Homo sapiens GN=EPHA1 PE=1 SV=4	HUMAN	0
18	0,05	0,05	2,1	sp Q8N608 DPP10_HUMAN	Inactive dipeptidyl peptidase 10 OS=Homo sapiens GN=DPP10 PE=1 SV=2	HUMAN	0
19	0,05	0,05	1,2	sp Q6P158 DHX57_HUMAN	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57 OS=Homo sapiens GN=DHX57 PE=1 SV=2	HUMAN	0
20	0,05	0,05	1,5	sp P51843 NROB1_HUMAN	Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1 OS=Homo sapiens GN=NROB1 PE=1 SV=2	HUMAN	0

Liite 5. Organoidien kasvatuskokeen tulokset

1 (3)

Taulukkoon on kirjattu jokaiselle organoidille kasvaneet kryptabudit eri RSPO1-pitoisuuksilla. Lisäksi on laskettu organoidien lukumäärä, kryptabudien kokonaismäärä ja kryptabudien lukumäärien keskiarvot erikseen eri RSPO1-pitoisuuksille.

Itse tuotettu

	300 ng/ml		1000 ng/ml		2000 ng/ml	
	Field 1	Field 2	Field 1	Field 2	Field 1	Field 2
	3	10	4	2	3	2
	4	7	3	6	7	2
	4	4	3	3	7	3
	3	6	6	15	7	6
	5	9	6	4	7	7
	9	6	2	7	3	2
	2	5	7	13	2	5
	4	4	3	3	7	15
	7	3	4	5	4	4
	3	2	3	4	4	4
	3	4	3	8	8	10
	2	10	9	5	4	5
	3		2	3	3	2
	7		6	7	9	2
	7		7	8	9	5
	4		3	10	9	6
	8		7	6	5	3
	2		9	6	6	9
	8		6	4	8	8
	6		3	7	8	8
	4		15	5	1	15
	7		4	9	2	8
	6		4	3	9	
	3		4	5		
	4		3	8		
	9		5	3		
			12	7		
			6	3		
			3	3		
			3			
			1			
Organoidien lukumäärä	26	12	31	29	23	22
Kryptien lkm yhteensä	127	70	156	172	132	131

Kryptabudeja
keskimäärin per
organoidi

4,884615 5,833333

5,032258 5,931034

5,73913 5,954545

Kryptabudeja
keskimäärin per
organoidi, field 1 ja 2
keskiarvo

5,358974

5,481646

5,846838

Kaupallinen

300 ng/ml		1000 ng/ml		2000 ng/ml	
Field 1	Field 2	Field 1	Field 2	Field 1	Field 2
2	11	4	2	4	6
3	3	14	4	2	7
2	5	4	5	8	8
5	3	2	2	3	3
2	13	5	17	2	7
3	3	9	4	1	8
5	7	6	6	6	5
7	11	6	4	5	4
9	3	2	8	4	2
5	2	3	3	5	3
6	3	9	10	6	2
5	10	3	2	5	7
5	4	6	3	4	6
7	6	3	4	8	6
4	11	7	7	13	7
4	4	2	12	19	4
2	4	3	10	5	6
1	5	5	12	6	2
9	5	5	6	2	4
9	6	4	6	6	7
4		2	3	7	4
3		5	7	4	6
10		5	7	5	2
11		9	9	3	6
13		15	13	3	5
3		12	9	2	5
7		6	6	13	2
7		5	9	14	2
7		6	10	16	5
		4		5	12
		13		4	4

45

3 (3)

4 5
 3 5
 5 9
 8 2
 4 4
 2 4
 6 10
 6 11
 6 10
 6 11
 6 10
 5
 6
 10
 4

Organoidien lukumäärä	29	20	31	29	43	37
Kryptien lkm yhteensä	160	119	184	200	259	217

Kryptabudeja keskimäärin per organoidi	5,517241	5,95	5,935484	6,896552	6,023256	5,864865
--	----------	------	----------	----------	----------	----------

Kryptabudeja keskimäärin per organoidi, field 1 ja 2 keskiarvo	5,733621		6,416018		5,94406	
---	----------	--	----------	--	---------	--