

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2015

Leila Lukin

LUSIFERAASIA ILMENTÄVIEN HAIMASYÖPÄSOLULINJOJEN KARAKTERISOINTI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2015 | 60

Katja Fagerlund (FT), Kari Haajanen (FM)

Leila Lukin

LUSIFERAASIA ILMENTÄVIEN HAIMASYÖPÄSOLULINJOJEN KARAKTERISOINTI

Opinnäytetyön aiheena oli karakterisoida lusiferaasileimattujen Capan-1-, Panc-1- ja MiaPaca-2 -haimasyöpäsolulinjojen kasvua ja käyttäytymistä *in vitro* -olosuhteissa. Solulinjojen kasvun karakterisoinnin tavoitteena oli selvittää, vaikuttaako lusiferaasileimaaminen solujen käyttäytymiseen muuttaen solujen luotettavuutta haimasyövän mallinnuksessa. Solujen leimaamisessa on käytetty plasmidi-DNA:ta, jonka avulla lusiferaasientsyymiä ilmentävä geeni saadaan säilymään episomaalisena. Tekniikan avulla geeni ei häiritse solujen kasvua ja käyttäytymistä, eikä geenin ilmentyminen heikkene ajan myötä. Työssä käytettiin kontrollina parentaalilinjoja eli solulinjojen leimaamattomia muotoja.

Lusiferaasileiman toimivuus varmistettiin määrittämällä solujen lusiferaasiaktiivisuus. Solulinjojen kasvua ja käyttäytymistä arvioitiin seuraamalla solujen proliferaatiota useissa aikapisteissä eri solutiheyksillä. Työn viimeisessä vaiheessa käytettiin verrokkiyhdistettä (gemsitabiini) määrittämään solujen reagointi sytotoksiseen yhdisteeseen. Proliferaatiota analysoitiin WST-1- ja CellTiter-Glo -menetelmillä.

Tarkkailujakson aikana havaittiin variaatiota verrattaessa lusiferaasileimattujen solujen ja parentaalisolujen ominaisuuksia, mikä johti tilastollisiin eroavaisuuksiin solujen välillä. Lusiferaasisolulinjat on kasvatettu yhden muokatun solun pohjalta, jonka vuoksi ei voida varmuudella sanoa johtuvatko erot solujen luonnollisesta vaihtelevuudesta vai lusiferaasileimasta. Rinnakkaisten solulinjojen vasteella gemsitabiinille ei ollut merkittäviä eroja. Ottaen huomioon testauksista saadut tulokset ja havaitut eroavaisuudet linjojen välillä, aihe vaatii jatkotutkimuksia.

ASIASANAT:

soluviljely, haimasyöpä, lusiferaasi, proliferaatio, *in vitro*

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 60

Katja Fagerlund (Ph.D.), Kari Haajanen (M.Sc.)

Leila Lukin

CHARACTERIZATION OF PANCREATIC CANCER CELL LINES WITH LUCIFERASE EXPRESSION

The objective of the thesis was to study the proliferation of genetically modified Capan-1, Panc-1 and MiaPaca-2 pancreatic cell lines *in vitro*. The aim was to characterize the proliferation of the cells transfected with luciferase gene and to determine the effects of cell modification. The gene is transfected into the cells by pDNA vectors. The vector is designed for a long-time episomal expression which prevents interference with the cell metabolism and proliferation. Parental cell lines were used as controls.

The function of the gene was verified by determining the luciferase activity. The growth and behaviour of the cell lines were evaluated by monitoring the cell proliferation at different time points with different cell densities. Gemcitabine was used to determine the cells' response to a cytotoxic substance. Proliferation was measured by WST-1 and CellTiter-Glo assays.

As a result, the luciferase activity was found to be suitable for bioimaging in all three cell lines. During the observation period, there was slight variation between the proliferation of the parental and luciferase cell lines, resulting in statistical differences between the cells. Since the modified cell lines are from a single modified cell, it cannot be said whether the results are due to natural variety between the cells or due to the modification. However, when comparing the modified cell lines with the parental lines, the gemcitabine response did not exhibit any statistical difference between any of the cell lines. Based on these results and the differences found between the lines, further studies are needed.

KEYWORDS:

cell culture, pancreatic cancer, luciferase, proliferation, *in vitro*

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 SOLU- JA SYÖPÄBIOLOGIA	10
2.1 Solusykli	10
2.2 Syöpäsolujen synty ja toiminta	11
2.3 Soluviljelmät	12
2.4 Haima	13
2.4.1 Haimasyöpä	14
2.5 Kemoterapia	16
2.6 Bioluminesenssi	17
2.6.1 Lusiferaasileimatut solulinjat	18
3 MENETELMÄT	20
3.1 Soluviljely	20
3.2 Lusiferaasiaktiivisuuden määrittäminen	21
3.3 Proliferaatiomittaukset	22
3.3.1 Solumäärän optimointi	23
3.3.2 Verrokkiyhdisteen testaus	23
3.3.3 Analysointimenetelmät	25
3.4 Muut analysointimenetelmät	26
4 TULOKSET	27
4.1 Lusiferaasiaktiivisuuden määrittäminen	27
4.2 Solumäärän optimointi	28
4.3 Verrokkiyhdisteen testaus	33
4.4 Lisähavainnot	39
5 POHDINTA	43
6 LOPPUPÄÄTELMÄT	47
LÄHTEET	48

LIITTEET

- Liite 1. Opinnäytetyössä käytetyt materiaalit.
- Liite 2. Kasvumediumien valmistus.
- Liite 3. Luc -linjojen solumäärän optimointi.
- Liite 4. Capan-1 -linjat, verrokkiyhdisteen testaus.
- Liite 5. MiaPaca-2 -linjat, verrokkiyhdisteen testaus.
- Liite 6. Panc-1 -linjat, verrokkiyhdisteen testaus.

KUVAT

Kuva 1. Solusykli.	10
Kuva 2. Eri solutyyppejä.	12
Kuva 3. Haiman rakenne. ⁹	13
Kuva 4. Haimasyöpäpotilaiden selviytymisennuste. ¹	15
Kuva 5. Bioluminesenssin periaate.	18
Kuva 6. Lusiferaasileimauksessa käytetty pDNA. ²	19
Kuva 7. Valokuvat Capan-1 -linjoista päivänä yksi.	40
Kuva 8. Kuvat Capan-1 -linjoista päivänä kolme.	40
Kuva 9. Kuvat MiaPaca-2 -linjoista.	41
Kuva 10. Kuvat Panc-1 -linjoista.	42

KUVAAJAT

Kuvaaja 1. Luc-linjojen lusiferaasiaktiivisuus.	27
Kuvaaja 2. Lusiferaasileimatun BxPC3 -solulinjan lusiferaasiaktiivisuus.	28
Kuvaaja 3. Capan-1 -linjan solumäärän optimointi (CTG).	29
Kuvaaja 4. Capan-1 -linjan solumäärän optimointi (WST-1).	30
Kuvaaja 5. MiaPaca-2 -linjan solumäärän optimointi (CTG).	31
Kuvaaja 6. MiaPaca-2 -linjan solumäärän optimointi (WST-1).	31
Kuvaaja 7. Panc-1 -linjan solumäärän optimointi (CTG).	32
Kuvaaja 8. Panc-1 -linjan solumäärän optimointi (WST-1).	33
Kuvaaja 9. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1 -solulinjoihin (CTG).	34
Kuvaaja 10. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1 -solulinjoihin (WST-1).	34
Kuvaaja 11. Gemsitabiinin vaikutus MiaPaca-2 -solulinjoihin (CTG).	35
Kuvaaja 12. Gemsitabiinin vaikutus MiaPaca-2 -solulinjoihin (WST-1).	36
Kuvaaja 13. Gemsitabiinin vaikutus Panc-1 -solulinjoihin (CTG).	37
Kuvaaja 14. Gemsitabiinin vaikutus Panc-1 -solulinjoihin (WST-1).	37
Kuvaaja 15. Capan-1-luc -linjan solumäärän optimointi (CTG).	52
Kuvaaja 16. Capan-1-luc -linjan solumäärän optimointi (WST-1).	52
Kuvaaja 17. MiaPaca-2-luc -linjan solumäärän optimointi (CTG).	53
Kuvaaja 18. MiaPaca-2-luc -linjan solumäärän optimointin (WST-1).	53
Kuvaaja 19. Panc-1-luc -linjan solumäärän optimointi (CTG).	54
Kuvaaja 20. Panc-1-luc -linjan solumäärän optimointi (WST-1).	54
Kuvaaja 21. Verrokkiyhdisteen vaikutus Capan-1 -solulinjaan (CTG).	55
Kuvaaja 22. Verrokkiyhdisteen vaikutus Capan-1 -solulinjaan (WST-1).	55
Kuvaaja 23. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1-luc -linjaan (CTG).	56
Kuvaaja 24. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1-luc -linjaan (WST-1).	56
Kuvaaja 25. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2 -linjaan (CTG).	57
Kuvaaja 26. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2 -linjaan (WST-1).	57

Kuvaaja 27. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2-luc -linjaan (CTG).	58
Kuvaaja 28. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2-luc -linjaan (WST-1).	58
Kuvaaja 29. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1 -linjaan (CTG).	59
Kuvaaja 30. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1 -linjaan (WST-1).	59
Kuvaaja 31. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1-luc -linjaan (CTG).	60
Kuvaaja 32. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1-luc -linjaan (WST-1).	60

TAULUKOT

Taulukko 1. Studentin T-testin luotettavuustasot.	24
Taulukko 2. Studentin T-testin tulokset.	38

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Adenokarsinooma	Rauhasepiteelistä lähtöisin oleva syöpä
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
Episomaalinen	Genomin ulkopuolinen DNA
FBS	Fetal bovine serum, naudan sikiön seerumi
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's media, solukasvatuksessa käytetty medium
Karsinooma	Epiteelikudoksesta lähtöisin oleva syöpä
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu saliini
Proliferaatio	Solujen määrän lisääntyminen kasvun ja jakautumisen kautta
Parentaalilinja	Solulinja, josta jokin toinen linja on lähtöisin
RT	Room temperature, huoneenlämpö
Sytotoksinen	Soluille myrkyllinen

1 JOHDANTO

Haimasyöpä on maailman 12. yleisin syöpä ja sairaus johtaa yleensä kuolemaan. Kyseessä on hyvin vaikeahoitoinen syöpä, sillä sairaus huomataan yleensä vasta myöhäisessä vaiheessa oireiden vähyyden vuoksi. Haimasyöpä syntyy haiman solujen muuntuessa pahanlaatuisiksi ja alkaessa jakautua hallitsemattomasti. Syövän edetessä syöpäsolut muodostavat etäpesäkkeitä muualle kehoon.¹

Potilailta on eristetty haimasyöpäsoluja, joista on valmistettu solulinjoja tutkimustarkoituksiin. Kyseisiä solulinjoja voidaan kasvattaa *in vitro*- tai *in vivo* -olosuhteissa ja käyttää tautimallinnukseen parannuskeinojen kehittämiseksi. Eläinmaailmassa sairauden kehittymisen seuranta voi kuitenkin olla hankalaa ja menetelmät kalliita. Solulinjojen muokkaus mahdollistaa solujen havainnoinnin helposti esimerkiksi luminesenssin avulla. Soluihin liitetään lusiferaasientsyymiä vastaava geeni, jonka seurauksena voidaan käyttää luminesenssia mittaavaa kuvantamismenetelmää.²

Solujen leimaaminen lusiferaasia vastaavalla geenillä on ollut haasteellista, sillä geenin sijoittumista solun genomiin ei ole voitu tarkkaan säädellä. Geeni on voinut sijoittua alueelle, joka häiritsee solun käyttäytymistä, jonka seurauksena tautimalli ei ole enää luotettava. Ongelmana on myös ollut geenin lyhytikäinen ilmentyminen solussa. Opinnäytetyön kohteena olevat lusiferaasileimatut solulinjat on valmistettu tekniikalla, joka hyödyntää plasmidi-DNA:ta solujen leimaamisessa. Plasmidiin on liitetty alue, joka mahdollistaa geenin luennan ja plasmidin säilymisen episomaalisena. Tekniikan ansiosta siirretty geeni ei vaikuta solujen käyttäytymiseen, minkä johdosta tautimalli on luotettavampi. Lisäksi lusiferaasin ilmentyminen solussa ei heikkene ajan myötä.²

Opinnäytetyön tavoitteena oli karakterisoida kyseisellä tekniikalla valmistettujen lusiferaasileimattujen haimasyöpäsolulinjojen kasvua *in vitro* -olosuhteissa. Solulinjoista määritettiin lusiferaasiaktiivisuus, jonka jälkeen tarkasteltiin solujen kasvua kolmessa aikapisteessä eri solutiheyksillä. Solujen käyttäytymistä arvioitiin myös määrittämällä sytotoksisen aineen (gemsitabiini) vaikutus solujen kasvuun.

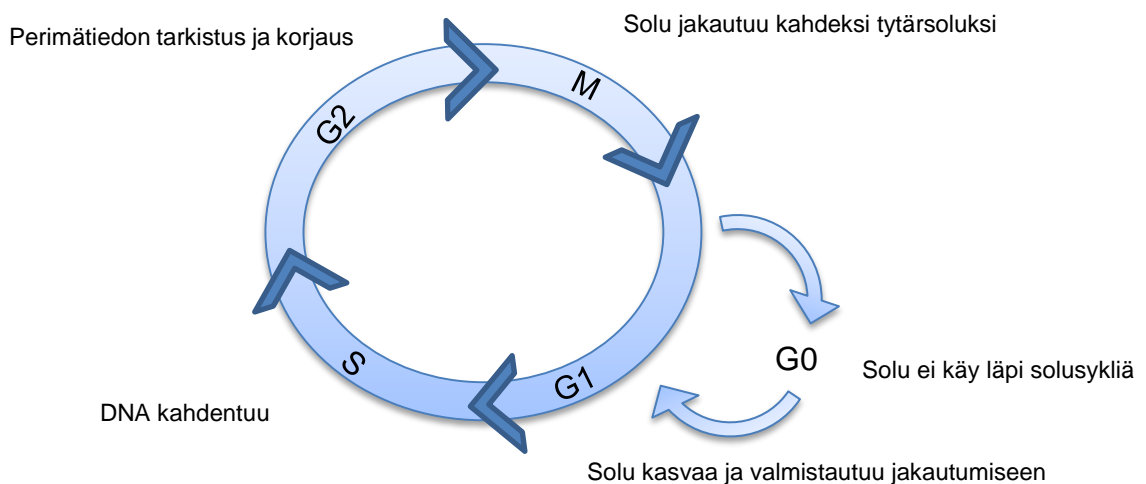
Leimattujen linjojen kasvun kontrollina käytettiin parentaalilinoja. Solujen proliferaatiota analysoitiin CellTiter-Glo ja WST-1 -menetelmillä. Menetelmillä saatuja tuloksia verrattiin muihin tuloksiin, jotka oli saatu tarkkailemalla soluja visuaalisesti tai seuraamalla solujen aggregaattien määrää sekä viabiliteettia.

2 SOLU- JA SYÖPÄBIOLOGIA

Solu- ja syöpäbiologian tietämys on suuressa roolissa pystyttäessä syöpäsairauksien tautimalleja *in vivo* tai *in vitro*. Seuraavassa osiossa on käsitelty opin- näytetyön teoriaa biologian näkökulmasta.

2.1 Solusykli

Solusyklin tavoitteena on tuottaa uusia soluja solujakautumisen kautta. Solusyk- lillä tarkoitetaan solujen elinkiertoa, joka voidaan jakaa neljään vaiheeseen (Kuva 1). G1 -vaiheessa solu kasvaa ja valmistautuu jakautumiseen ja S -vaiheessa DNA kahdentuu. G2 -vaiheessa tarkistetaan geneettisen perimän kahdentumisen onnistuminen ja korjataan mahdolliset virheet. Tarkastuksen jälkeen seuraa M- vaihe eli mitoosi, jossa solu jakautuu kahdeksi identtiseksi soluksi. Kun solu ei käy läpi solusykliä, se on G0 -vaiheessa. Solu voi siirtyä G0 -vaiheeseen esimer- kiksi kasvutekijöiden puuttuessa.³



Kuva 1. Solusykli.

Solujakautuminen on tarkkaan säädelty tapahtuma, jonka säätelystä vastaavat sykliiniproteiinit ja niitä vastaavat proteiinikinaasit. Solusyklin jokaisessa vaiheessa on omat sykliinit, jotka aktivoivat kinaaseja sitoutumalla niihin. Solusyklin säätelyyn osallistuu myös muita proteiineja. Yksi näistä proteiineista on p53, joka voi pysäyttää solusyklin havaitessaan vaurioita DNA:ssa tai ohjata solun ohjelmoituun kuolemaan eli apoptoosiin. ⁴

2.2 Syöpäsolujen synty ja toiminta

Syöpäsolulla tarkoitetaan solua, joka jakautuu hallitsemattomasti ja jonka signaalijärjestelmä on häiriytynyt. Tämä on perimäaineksen muutoksista eli mutaatioista johtuva ilmiö, jota kehon omat korjausmekanismit eivät ole pystyneet korjaamaan. Syöpäsolujen syntyyn vaikuttavat keskeisesti solujen kasvuun ja säätelyyn vaikuttavien geenien vaurioituminen (esimerkiksi vaurio p53 -proteiinissa). Solut eivät enää reagoi ympäristönsä signaaleihin, joten mutatoituneet solut välttävät apoptoosin ja syöpäsolut pääsevät näin lisääntymään. Olennaista syöpäsolujen lisääntymisessä on G₀ -vaiheen estyminen, jonka vuoksi solut pysyvät solusyklistä tauotta. Syöpäsolut muodostavat jakautuessaan kasvaimen sekä syövän edetessä etäpesäkkeitä. Etäpesäkkeet muodostuvat esimerkiksi verenkiertoon päässeistä syöpäsoluista, jotka kiinnittyvät ja alkavat lisääntyä muualla kehossa. Eri syöville on omat tyypillisimmät sijainnit etäpesäkkeille. ⁵

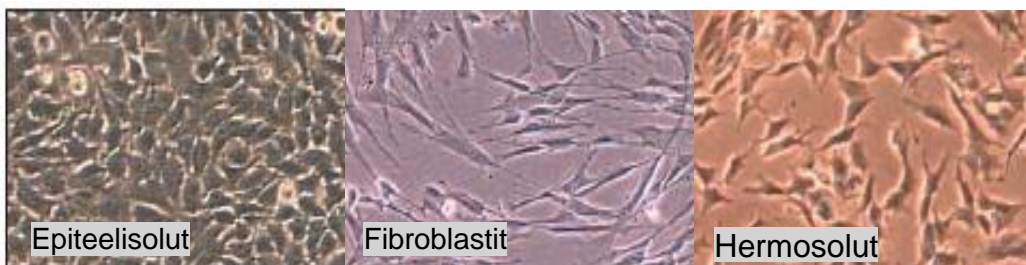
Pahalaatuisen kasvaimen muodostuessa kudokseen voi menettää kykynsä erilaistua, jolloin kasvaimet voivat erota suuresti alkuperäiskudoksesta. Erilaistuminen vaikuttaa keskeisesti solujen toimintaan ja erilaistuneet kasvaimet ovat yleensä vähemmän aggressiivisia. Kun solut menettävät kykynsä erilaistua, ne voivat muuttua ominaisuuksiltaan ja alkaa käyttäytyä alkuperäiselle kudokselle poikkeuksellisesti. Kasvaimet voidaan jaotella kolmeen eri alaryhmään erilaistumisensa perusteella; hyvin erilaistuneisiin (gradus 1), kohtalaisesti erilaistuneisiin (gradus 2) sekä huonosti erilaistuneisiin (gradus 3). ⁵

Syöpäsairaudet voidaan jakaa viiteen pääryhmään niiden lähtökudoksen mukaan. Yleisimmin syöpä on lähtöisin epiteelikudoksesta, jolloin kyseessä on karsinooma. Muita pääryhmiä ovat sarkooma (sidekudos), leukemia (veren valkosolujen esiasteet), lymfooma ja myelooma (lähtöisin immuunijärjestelmästä) ja hermojärjestelmän syövät.⁵

Syöpää aiheuttavia tekijöitä kutsutaan karsinogeneeneiksi. Karsinogeneenejä ovat muun muassa perinnölliset sekä ympäristölliset tekijät, kuten alkoholi, tupakka tai säteily. Sairauden syntyyn on vaikuttanut perinnöllinen tekijä, kuten periytynyt geeni tai alttius karsinogeneille, 10-15 % tapauksista.⁶

2.3 Soluviljelmät

Soluviljelmällä tarkoitetaan samanlaisten solujen linjaa, jota kasvatetaan edelleen kohdekudoksesta erottamisen jälkeen. Viljelmät voidaan jakaa primäärisiin ja sekundäärisiin viljelmiin. Primääriviljelmällä tarkoitetaan suoraan kudoksesta, esimerkiksi kasvaimesta, eristettyjä soluja, joita on eristyksen jälkeen alettu viljelmään. Solujen alkuperäinen kudos määrää niiden morfologian (Kuva 2) ja ne kasvavat isäntäkudoksesta riippuen adherentteina tai suspensiona. Adherentit solut tarvitsevat kiinnittymisalustan kasvaakseen, kun taas suspensiosolut kasvavat vapaina mediumissa. Soluviljelämä vaihtuu sekundääriseen, kun primääriviljelmän kasvua jatketaan eli solut jaetaan kasvamaan edelleen. Sekundääriviljelmän tarkoituksena on taata solujen elinvoimaisuus tarjoamalla niille kasvutilaa jakamalla solut niiden saavutettua hyvän kasvuvaiheen.^{7,8}

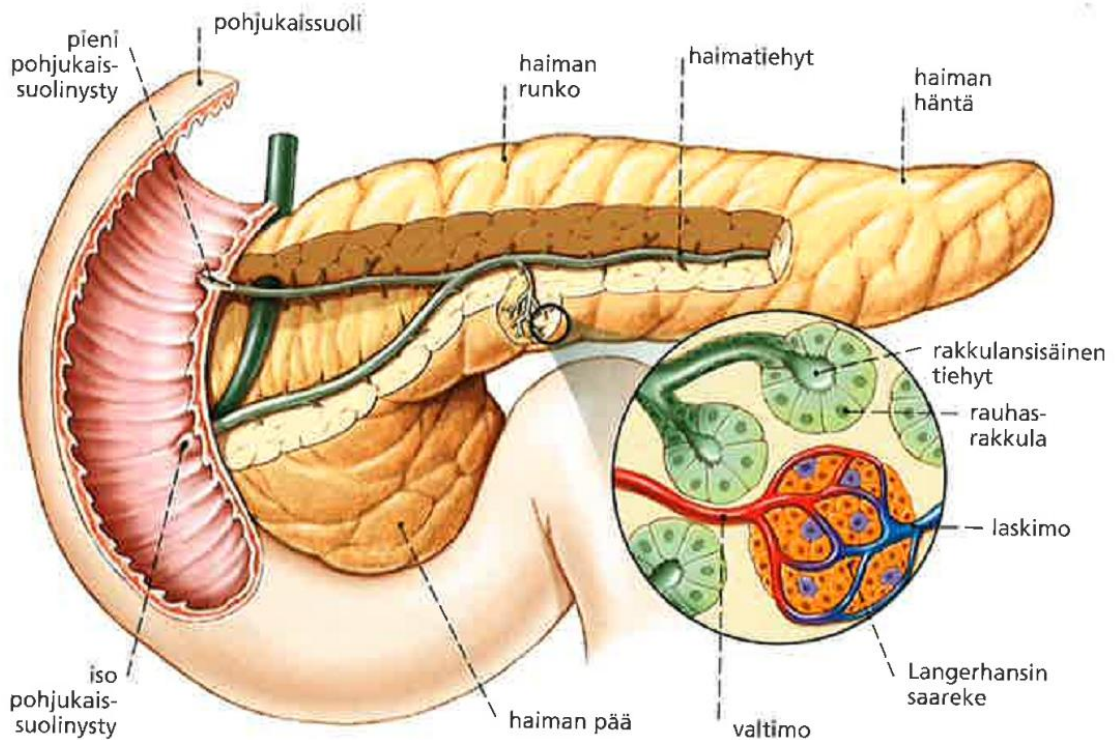


Kuva 2. Eri solutyyppejä.⁸

Solulinjat voidaan jakaa äärellisiin ja jatkuviin solulinjoihin. Äärellisillä solulinjoilla on tietty määrä jakautumiskertoja, riippuen solutyypistä, ja niiden jakautumisaika on 24-96 tuntia. Jatkuvilla solulinjoilla jakautumisten määrä on rajaton ja ne jakautuvat nopeasti, sillä niiden jakautumisaika on 12-24 tuntia. Kasvaimista eristetyt solut omaavat yleensä luontaisesti kyvyn jakautua rajattomasti, mutta ominaisuus voidaan saavuttaa myös kemiallisin menetelmin.⁷

2.4 Haima

Haima on mahalaukun takana sijaitseva elin, jolla on tärkeä rooli ruoansulatuksessa sekä verensokerin säätelyssä. Kooltaan haima on noin 15 cm pitkä ja painaa 100 g. Kyseessä on pitkulainen elin, jonka läpi kulkeva haimatiehyt päättyy pohjukaissuoleen (Kuva 3).



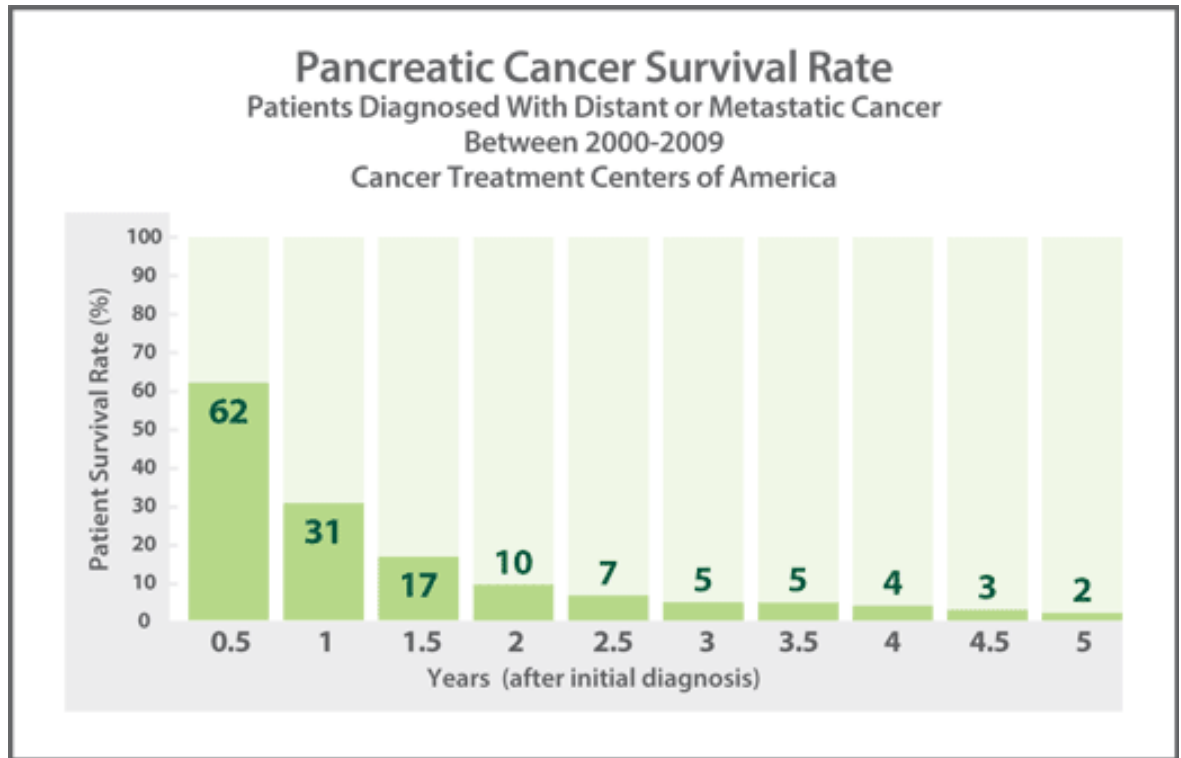
Kuva 3. Haiman rakenne.¹⁰

Ihmiskeho sisältää neljää eri kudostyyppiä; lihaskudosta, hermokudosta, sidekudosta ja epiteelikudosta. Haima on päätyypiltään epiteelikudosta. Epiteelikudos on ihmiskehossa yleinen kudostyyppi, joka koostuu litteistä soluista, jotka kasvavat tiukasti kiinnittyneinä toisiinsa muodostaen tiiviin kudoksen, joka peittää kehon sisä- sekä ulkopintoja. Kudoksen tehtävänä on suojata elintä sekä vastata aineiden kulusta.⁹

Haima sisältää kahta eri rauhasepiteeliä. Eksokriininen kudos vastaa ruoansulatusnesteen tuotosta ja erittää päivittäin litran verran haimanestettä, joka siirtyy ohutsuoleen. Nestettä muodostuu rauhasrakkuloista, joista sitä erittyy haimatiehyn kautta eteenpäin. Ruoansulatusneste sisältää entsyymejä, jotka hajottavat hiilihydraatteja, rasvoja sekä proteiineja. Endokriininen kudos vastaa hormonien (insuliini ja glukakoni) tuotannosta. Kyseisessä kudoksessa on Langerhansin saarekkeet, jotka sisältävät hormoneja tuottavia rauhasoluja. Insuliini laskee verensokeria edesauttamalla glukoosin imeytymistä verenkierrosta. Glukakoni nostaa verensokeria edistämällä glukoneogeneesiä, mikä lisää glukoosin uudelleenmuodostumista. Haiman tuottamien hormonien määrä riippuu verensokerin tasosta.¹⁰

2.4.1 Haimasyöpä

Haimasyöpä on maailman 12. yleisin syöpä, vuonna 2012 uusia tapauksia oli 338 000 maailmanlaajuisesti. Sairaus on yleisin vanhemmilla ihmisillä ja sitä esiintyy harvemmin alle 40 -vuotiailla. Kyseessä on ongelmallinen syöpä, sillä se voi pysyä oireettomana etäpesäkkeiden muodostumiseen asti, mikä vaikeuttaa diagnosointia. Haimasyöpä johtaa usein kuolemaan, sillä viiden vuoden päästä diagnosoinnista selviytymisennuste on 2 % (Kuva 4).¹



Kuva 4. Haimasyöpäpotilaiden selviytymisennuste.¹

Tavallisimmin syöpä kohdistuu haiman eksokriiniseen osaan, jolloin kyseessä on adenokarsinooma. Etäpesäkkeet muodostuvat useimmiten imusolmukkeisiin sekä vatsakalvoon. Ensioireita ovat ylävatsan kipu sekä silmien ja ihon kellastuminen. Kyseessä on vaikeahoitoinen syöpä, sillä yleensä diagnosointi tapahtuu vasta sairauden levittyä. Hoitomenetelmät riippuvat taudin sijainnista ja levinneisyydestä. Parhaimmassa tapauksessa kasvain voidaan poistaa leikkauksella, mutta syövän hoidossa joudutaan usein turvautumaan myös esimerkiksi kemo-terapiaan tai radioaktiivisten aineiden käyttöön. Syövän aiheuttajaa ei ole pystytty identifioimaan, mutta tiedetään syövän syntyyn vaikuttavia riskitekijöitä. Tupakointi, epäterveelliset elämäntavat sekä tietyt sairaudet (haimatulehdus) ovat haimasyövälle altistavia tekijöitä.¹¹

Haimasyöpää sairastaneilta ihmisiltä on eristetty syöpäsoluja tutkimusta varten. Capan-1 on syöpäsolulinja, joka on eristetty 1970 -luvulla 40 -vuotiaasta miehestä, joka on sairastanut haiman adenokarsinoomaa. Solut on eristetty maksassa sijaitsevasta etäpesäkkeestä. Solut ovat tyypiltään epiteelisoluja ja niiden jakautumisaika on 41 tuntia. Kyseessä on adherentti solulinja, jonka vuoksi solut

tarvitsevat kasvaakseen alustan johon kiinnittyä. Solulinja sisältää onkogeenisen K-RAS mutaation sekä mutaation p53 -geenissä. P53 -proteiini säätelee solusykliä ja sillä on tärkeä merkitys apoptoosin käynnistämisessä.^{11,12}

MiaPaca-2 -solulinja on eristetty 65 -vuotiaasta miehestä vuonna 1975, joka on sairastanut haiman erilaistumatonta karsinoomaa. Solut ovat epiteelisoluja ja niiden jakautumisaika on 40 tuntia. Kyseessä on adherentti solulinja, joka sisältää irtonaisia soluja tai soluryhmiä. Panc-1 -solulinja on peräisin 57 -vuotiaasta miehestä, jolta on löydetty haiman adenokarsinooma. Solulinja on adherentti ja solujen jakautumisaika 52 tuntia. Panc-1 -linjan on havaittu sopivan sovelluksiin, joissa hyödynnetään vektoreita solujen geneettisessä muokkauksessa (transfektiio). Myös MiaPaCa-2- ja Panc-1 -solulinjat sisältävät K-RAS mutaation.^{13,14}

2.5 Kemoterapia

Kemoterapia on kemiallisiin aineisiin perustuva syövän hoitomuoto. Kyseisessä hoitomuodossa käytetään sytotoksisia aineita estämään syöpäsolujen kasvua ja jakautumista. Leikkauksen jälkeen kemoterapiaa käytetään ehkäisemään syövän uusiutuminen. Hoidolla voidaan saavuttaa täydellinen paraneminen tai syöpäkasvaimen pientyminen ja kasvun pysähtyminen. Jotkin syövät, kuten haimasyöpä, ovat enemmän resistenttejä kemoterapialle ja näin vaikeahoitaisempia.¹⁵

Kemoterapiassa hyödynnetään yleensä monia eri lääkeaineita samanaikaisesti parhaimman hyödyn saavuttamiseksi. Lääkkeen tyypistä riippuen niiden vaikutus perustuu esimerkiksi solujen jakautumisen tai solujen perimätiedon kopioinnin estoon. Yhdistämällä useita lääkkeitä, jotka ovat spesifisiä eri solunjakautumisen vaiheille, pystytään maksimoimaan hoidon teho. Hoitojakson aikana annostus otetaan tasaisin väliajoin, esimerkiksi kerran kolmessa viikossa. Väliajan määrittää terveen kudoksen kyky parantua ja toipua hoidosta, sillä tavoitteena on vähentää terveen kudoksen vaurioitumista hoidon aikana.¹⁶

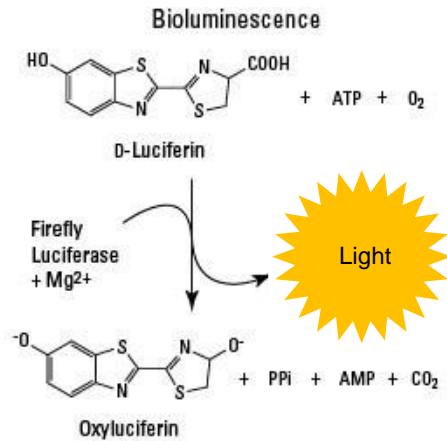
Tarkka hoitokeino valitaan syövän tyypin, sijainnin ja kehitysasteen mukaan ottaen huomioon potilaan ikä ja kunto. Useimmiten lääkeaine annostellaan suonensisäisesti tai oraalisesti kapseleiden avulla. Aineet leviävät verenkierron mukana

koko kehoon, josta ne vaikutustavasta riippuen löytävät kohdesolunsa. Syöpäsolut ovat potilaan omia mutatoituneita soluja, joten niihin kohdistuvat lääkkeet voivat kohdistua myös mm. terveisiin, samassa solusyklin vaiheessa oleviin soluihin. Tästä johtuen kemoterapialla on runsaasti sivuvaikutuksia, kuten hiustenlähtö ja pahoinvointi.¹⁷

Gemsitabiini on kemoterapiassa käytettäviin solusalpajiin kuuluva antimetaboliitti. Antimetaboliitit ovat normaalissa solujen nukleiinihappoaineenvaihdunnassa syntyvien aineiden rakenteellisia vastineita. Aineen sytotoksinen vaikutus perustuu sen kykyyn häiritä DNA:n tai RNA:n synteesiä esimerkiksi syrjäyttämällä jonkin nukleiinihapposynteesissä tarvittavan ainesosan tai estämällä keskeisten entsyymien toiminta. Gemsitabiini voi myös sitoutua syntyneeseen nukleiinihappoon aiheuttaen sen virheellisen toiminnan. Antimetaboliitit estävät tiettyjä kemiallisia reaktioita, joten niiden toiminta on selektiivistä ja ne tuhoavat tietyssä solusyklin vaiheessa olevia soluja.¹⁸

2.6 Bioluminesenssi

Bioluminesenssilla tarkoitetaan yleisesti biologista reaktiota, jossa syntyy näkyvää vihreänkeltaista valoa. Reaktiossa lusiferaasientsyymi hapettaa lusiferiinin, jonka seurauksena syntyy oksilusiferiini virittyä (Kuva 5). Tapahtumaketjussa syntyy energia vapautuu näkyvänä valona ilman lämpötilan vaihteluita. Reaktiosta syntyvästä valoenergiasta noin 10 % kuluu ensimmäisen minuutin aikana, jonka jälkeen valo himmenee hitaammin.¹⁹

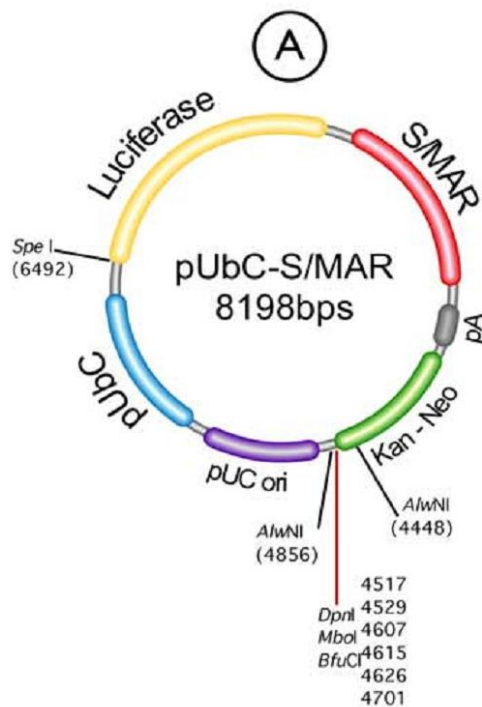


Kuva 5. Bioluminesenssin periaate.²⁰

Bioluminesenssia voidaan hyödyntää esimerkiksi *in vivo*-kuvantamisiin ja solujen proliferaation tutkimiseen. Solujen genomiin liitetään lusiferaasientsyymiä koodaava geeni, jonka seurauksena lusiferiinin läsnäollessa solut vapauttavat valoa. Yleisimmin geeni on peräisin tulikärpäsestä. Lusiferaasileiman avulla voidaan seurata syöpäsolujen käyttäytymistä ja kasvua. *In vivo*-kuvantamisessa lusiferaasileima mahdollistaa taudin seurannan ilman leikkausta tai muita rajoittavia tekijöitä.²¹

2.6.1 Lusiferaasileimatut solulinjat

Työssä käytetyt luc -solulinjat on parentaalisolulinjoista muokattuja lusiferaasileiman sisältäviä haimasyöpäsolulinjoja. Solujen transfektioon on käytettävissä monta menetelmää, josta tehokkain on virusten käyttö DNA -vektorina. Ongelmana virusten avulla leimatuissa linjoissa on geenin hallitsematon sijoittuminen solun genomiin, geenin lyhytikäinen ilmentyminen sekä solun puolustusmekanismit viruksia vastaan. Jos geeni sijoittuu väärään kohtaan genomissa, tuloksena voi olla erilaisia kasvava ja käyttäytyvä solulinja verrattuna parentaalilinjaan. Tällöin solulinja menettää luotettavuuttaan tautimallinnuksessa.^{22,23}



Kuva 6. Lusiferaasileimauksessa käytetty pDNA.²

Kyseisten solulinjojen valmistamisessa on käytetty tekniikkaa, joka ehkäisee solujen transfektiossa esiintyviä ongelmia. Solujen transfektiossa käytetään vektorina plasmidi-DNA:ta, joka sisältää nisäkkäiden kudosspesifisen promoottorin, sekä alueen (S/MAR), joka tunnistaa kromosomissa olevan matriksin ja liittää vektorin kromosomin runkoon mitoosin ajaksi mahdollistaen plasmidin läheisen kontaktin solun jakautumiskoneiston kanssa (Kuva 6). Tuloksena on solulinja, joka säilyttää transfektoidun geenin episomaalisena ja stabiloi sen ekspression. Tällöin solulinja muistuttaa mahdollisimman paljon parentaalilinjaa ja leima ei häviä solujakautumisen yhteydessä.²

3 MENETELMÄT

Opinnäytetyössä käytetyt menetelmät sisältävät solujen kasvatuksen sekä solujen kasvun ja käyttäytymisen analysointiin käytetyt menetelmät.

3.1 Soluviljely

Opinnäytetyön pääpaino oli lusiferaasileimatuissa solulinjoissa. Parentaalilinjoja käytettiin kontrollina lusiferaasileimatuille solulinjoille. Solulinjoja viljeltiin kolme viikkoa ennen validoinnin aloitusta kasvun optimoimiseksi. Soluja kasvatettiin petrimaljoilla (halkaisija 10 cm). Optimointivaiheessa testattiin kahta eri muovilaatua, Greiner- ja BD-muovia. Solujen kasvua seurattiin rinnakkaisilta maljoilta usean viikon ajan mikroskoopin avulla.

FBS on naudan sikiöstä saatavaa seerumia, joka edistää solujen kasvua ja aineenvaihduntaa. Seerumi sisältää monta soluille tärkeää komponenttia, kuten kasvutekijöitä, ravintoaineita ja erilaisia makromolekyylejä. Solukasvun optimointi varmistettiin testaamalla kahta eri seerumilaatua; US origin -seerumia sekä seerumia, jonka lähtömaata ei ole ilmoitettu. US origin -seerumi on oletetusti tasalaatuisempaa, mikä voi vaikuttaa solujen kasvuun.

Tarkkailun tuloksena päädyttiin käyttämään Greiner -muovia sekä tavallista seerumia. Muovilaaduilla ei ollut vaikutusta solujen kiinnittymiseen ja kasvuun. Seerumeilla ero oli havaittavissa ja solujen kasvuvauhti oli hieman heikompi US -seerumissa.

Solut jaettiin niiden saavutettua noin 70 % konfluenssin. Solujen jaossa käytetyt reagenssit oli temperoitu + 37 °C ennen käyttöä. PBS -liuoksen tarkoituksena on pestä solut, jotta vanhassa kasvumediumissa oleva FBS ei vaikuta trypsiinin toimintaan. Trypsiini-EDTA on solujen irrotuksessa käytettävä reagenssi. Trypsiini on entsyymi, joka kykenee hajottamaan solujen sidoksia kasvatusmateriaaliin ja toisiinsa. EDTA:ta käytetään tehostamaan trypsiinin vaikutusta, sillä se pystyy kelatoimaan ioneja, joita solut tarvitsevat muodostaakseen kiinnittymissidoksia.²⁴

Solujen jako:

1. Pesu, 10 ml PBS -liuosta (RT).
2. Solujen irrotus, Trypsiini-EDTA (1x) 2 ml.
3. Inkubointi lämpökaapissa 7-10 min (+37 °C, 5 % CO₂).
4. Kasvumediumia 3 ml (Liite 2).
5. Solujen siirto Falkon -putkeen ja sentrifugointi 133 g, 5 min.
6. Supernatantin poisto.
7. Pelletin suspensointi pieneen määrään kasvumediumia.
8. Solujen jako uudelle maljalle, päälle kasvumediumia 10 ml.

3.2 Lusiferaasiaktiivisuuden määrittäminen

Leimatuille solulinjoille tehtiin lusiferaasiaktiivisuuden määrittäminen ennen validoinnin aloitusta lusiferaasileiman toimivuuden ja intensiteetin selvittämiseksi. Menetelmä perustuu määrittämisessä käytettävän reagenssin, D-lusiferiinin, ominaisuuksiin. Lusiferiinia käytetään tutkimaan lusiferaasigeenin ja -entsyymin ilmentymistä solussa, sillä D-lusiferiini toimii substraattina lusiferaasientsyymille. Jos solu muodostaa kyseistä entsyymiä, D-lusiferiinin lisäyksellä saadaan aikaan luminesenssireaktio. Luminesenssin mittauksella pystytään määrittämään leiman toimivuus.²⁵

Menetelmä

1. Solujen irrotus ja laskeminen
2. Solujen jako valkoreunaiselle 96 -kuoppalevyille. Solu-medium -suspensiota 100 µl/kuoppa.
 - 1) 0 solua/kuoppa
 - 2) 1563 solua/kuoppa
 - 3) 3 125 solua/kuoppa
 - 4) 6 250 solua/kuoppa
 - 5) 12 500 solua/kuoppa
 - 6) 25 000 solua/kuoppa
 - 7) 50 000 solua/kuoppa
 - 8) 100 000 solua/kuoppa
3. D -lusiferiinin lisäys, 20 µl/kuoppa (0,1 mg).
4. Luminesenssin mittaus Victor 2 -levylukijalla.

3.3 Proliferaatiomittaukset

Solujen proliferaatiomittauksia käytetään analysoimaan solujen kasvua ja jakautumista sekä määrittämään eri tekijöiden, esim. sytotoksisen aineen, vaikutus solulinjaan. Solujen kasvu antaa tietoa niiden käyttäytymisestä sekä solujen voimista.

Proliferaation analysointiin on olemassa monta menetelmää, jotka voidaan jakaa neljään kategoriaan. Menetelmät voivat perustua solun aineenvaihdunnan (AlamarBlue, MTT), ATP:n määrän, solujen DNA -synteesin (3H-tymiini) tai solujen kasvuun liittyvien antigeenien mittaamiseen. Tässä työssä käytettävät menetelmät perustuvat solujen metabolisen aktiivisuuden sekä ATP:n määrän analysointiin.²⁶

3.3.1 Solumäärän optimointi

Ensimmäisen validoinnin tarkoituksena oli selvittää optimaalinen solutiheys solulinjoille sekä muodostaa profiili solujen kasvusta. Optimaalinen solutiheys selvitettiin jakamalla soluja 96 -kuoppalevyille viidessä eri pitoisuudessa ja seuraamalla kasvua kolmessa aikapisteessä. Mittauksissa käytettiin kuutta rinnakkaista näytettä ja levyt analysoitiin sekä WST-1- että CTG -menetelmillä. Taustasignaali, eli mediumista ja kuoppalevyn materiaalista muodostunut signaali, eliminoitiin mittaamalla pelkkää kasvumediumia sisältävä kuoppa.

Menetelmä

1. Solujen irrotus ja laskeminen (kts. kappale 3.1).
2. Solujen jako 96-kuoppalevyille mediumissa (200 µl/kuoppa). Työssä käytettiin kolmea aikapistettä (päivät 0, 3 ja 6) ja kahta analysointimenetelmää, joten parentaali- sekä luc -solulinjat viljeltiin molemmat kuudelle levyille. Testaukseen valittiin viisi eri solumäärää sisältävää ryhmää sekä jokaisesta ryhmästä kuusi rinnakkaista.
 - 1) 4 000 solua/kuoppa
 - 2) 6 000 solua/kuoppa
 - 3) 8 000 solua/kuoppa
 - 4) 10 000 solua/kuoppa
 - 5) 12 000 solua/kuoppa

3.3.2 Verrokkiyhdisteen testaus

Validoinnin toisessa osassa tarkoituksena oli tutkia solujen proliferaatiota määrittämällä solujen kasvua inhiboivat aineen (gemsitabiini) vaikutus solulinjojen kasvuun. Reagenssin teho määritettiin neljällä eri pitoisuudella kahdelle eri solutiheydelle. Käytetyt solutiheydet määritettiin validoinnin ensimmäisen vaiheen perusteella. Gemsitabiini liuotettiin 0,1 % DMSO:n, joten työssä käytettiin DMSO:ta sisältävää ryhmää kontrollina (baseline).

Menetelmä

1. Solujen irrotus ja laskeminen (kts. kappale 3.1).
2. Solujen jako 96-kuoppalevyille mediumissa (200 µl/kuoppa). Työssä käytettiin kolmea aikapistettä (päivät 0, 3 ja 6) sekä kahta eri analysointimenetelmää, joten rinnakkaiset solulinjat viljeltiin molemmat kuudelle levyille. Jokaisessa ryhmässä oli kuusi rinnakkaista.
 - 1) 6 000 solua/kuoppa, 0,1 % DMSO (baseline)
 - 2) 6 000 solua/kuoppa, 0,001 µM gemsitabiinia
 - 3) 6 000 solua/kuoppa, 0,01 µM
 - 4) 6 000 solua/kuoppa, 0,1 µM
 - 5) 6 000 solua/kuoppa, 1,0 µM
 - 6) 10 000 solua/kuoppa, 0,1 % DMSO (baseline)
 - 7) 10 000 solua/kuoppa, 0,001 µM
 - 8) 10 000 solua/kuoppa, 0,01 µM
 - 9) 10 000 solua/kuoppa, 0,1 µM
 - 10) 10 000 solua/kuoppa, 1,0 µM

Tulokset analysoitiin Studentin T-testillä, jotta verrokkiyhdisteen vaikutus sekä solulinjojen väliset kasvuerot voitiin arvioida luotettavasti. Testiä käytetään määrittämään, eroaako kaksi toisistaan riippumatonta ryhmää tilastollisesti toisistaan.

Taulukko 1. Studentin T-testin luotettavuustasot.

P-arvo	Luotettavuustaso
<0,05	*
<0,01	**
<0,001	***

P-arvo kertoo, kuinka merkittävä tulos on tilastollisesti. P-arvolla <0,001 tulos on tilastollisesti erittäin merkitsevä, arvolla <0,01 tilastollisesti merkitsevä ja arvolla <0,05 tilastollisesti melkein merkitsevä (Taulukko 1).

3.3.3 Analysointimenetelmät

CellTiter-Glo -menetelmää käytettiin analysoimaan solujen proliferaatiota sekä viabiliteettia. Menetelmä perustuu solujen muodostaman ATP:stä saatavan signaalin mittaamiseen. ATP on solujen energialähde, jota muodostuu aineenvaihdunnan prosesseissa. CTG -menetelmässä käytetään valmista reagenssia, joka sisältää lusiferiinia. Reagenssi hajottaa solun, jolloin ATP -molekyylit vapautuvat ja reagoivat lusiferiinin kanssa hapen ja magnesiumionien läsnäollessa. Reagenssi saa aikaan luminesenssin samanaikaisesti estäen solujen entsyymäattisen, signaalia hajottavan toiminnan. Saatava luminesenssisignaali on suoraan verrannollinen ATP:n määrään.²⁷

Menetelmän avulla voidaan analysoida solujen proliferaatiota sekä sytotoksisuutta. Tässä työssä menetelmää käytettiin muodostamaan solulinjan kasvuprofiili sekä määrittämään gemsitabiinin vaikutus solujen viabiliteettiin.

Menetelmä

1. Mittauspäivänä lisättiin reagenssia 100 µl/kuoppa (CellTiter-Glo Reagent).
2. 2 min ravistelijassa (400 rpm) + 10 min inkubaatio huoneenlämmössä.
3. Luminesenssin mittaus Victor 2 -levylukijalla.

WST-1 -analysointimenetelmää käytettiin rinnakkaisena CTG:n ohella määrittämään solujen proliferaatiota ja viabiliteettia. Menetelmä perustuu WST-1 -reagenssin muodostaman väriaineen absorbanssin mittaamiseen. Väriainetta muodostuu, kun elävät solut hajottavat WST-1 tetrasoliumsuolaa formatsaaniksi. Hajominen tapahtuu mitokondrioista vapautuvan entsyymin toiminnan seurauksena. Väriaineen määrä kuvaa aktiivisten mitokondrioiden määrää, joka on suhteessa elävien solujen kokonaismäärään.²⁸

Menetelmä

1. Mittauspäivänä WST-1 -reagenssin lisäys (5 µl/kuoppa).
2. Kuoppalevyn inkubaatio (2 h, +37 °C, 5 % CO₂).
3. Absorbanssin mittaus Victor 2 -levylukijalla, 450 nm.

3.4 Muut analysointimenetelmät

Solujen kasvua ja käyttäytymistä analysoitiin silmämääräisesti mikroskoopin avulla sekä maljoilta, että kuoppalevyiltä eri määritysten aikana. Kaikista solulinjoista otettiin kuvat, jotta solujen kasvua ja eroavaisuuksia voidaan jälkeinpäin analysoida visuaalisesti.

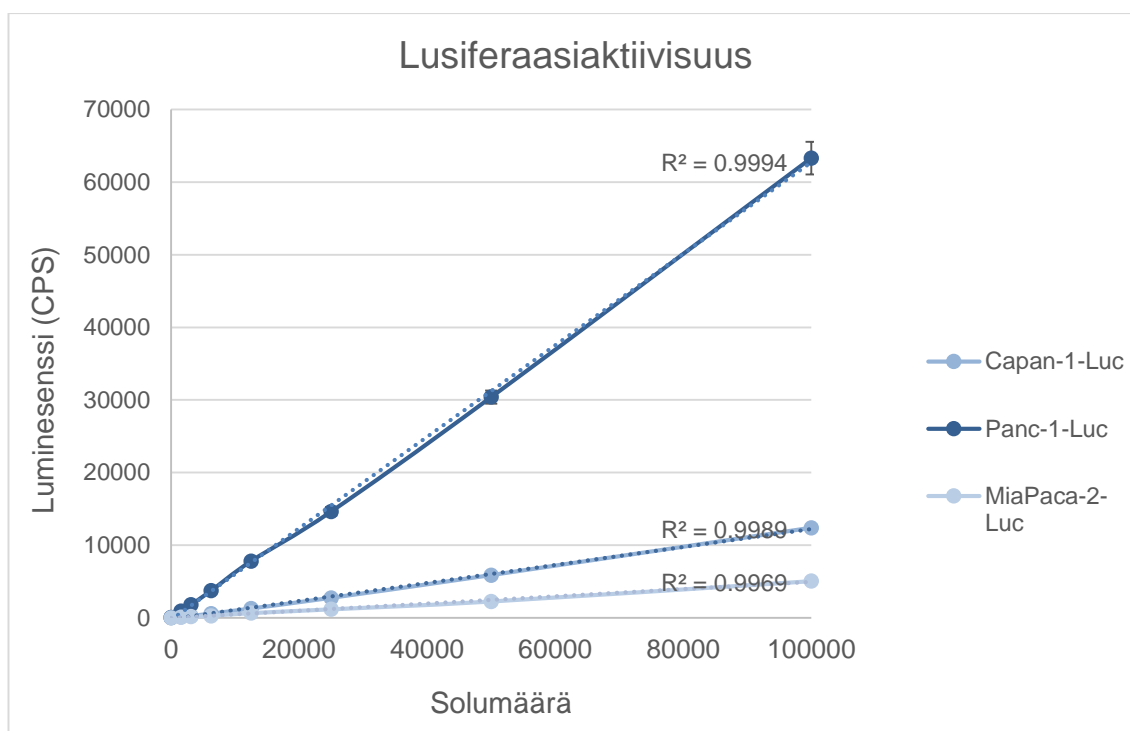
Solujen laskemiseen käytettiin NucleoCounter® NC-200 -laskukonetta, joka sisältää fluoresenssimikroskoopin. Laskukoneessa käytetään kasetteja, jotka sisältävät soluihin tarttuvia, fluoresoivia aineita, joiden avulla kone voi kuvata ja laskea elävät sekä kuolleet solut. Kone määrittää automaattisesti solujen määrän, koon, viabiliteetin sekä aggregaattien prosentuaalisen osuuden. Laskemisen lisäksi tavoitteena oli seurata viabiliteetin ja aggregaattien määrän avulla solulinjojen eroavaisuuksia.²⁹

4 TULOKSET

Osiossa on esitetty solulinjojen karakterisoinnin arvioimisessa käytetyt tulokset.

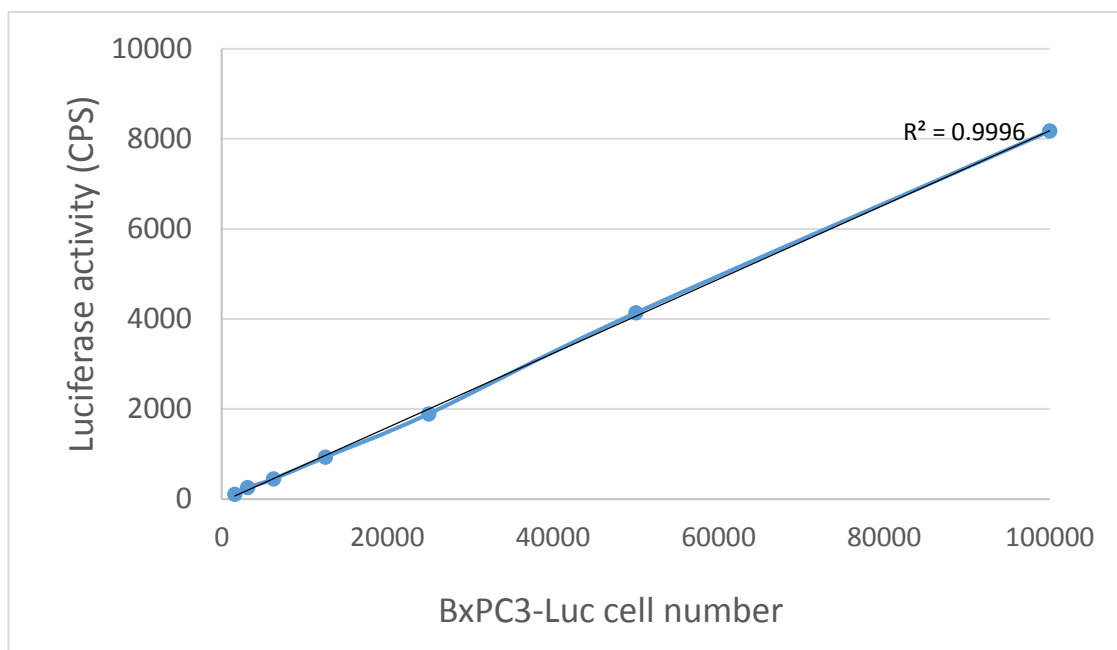
4.1 Lusiferaasiaktiivisuuden määrittäminen

Lusiferaasileiman aktiivisuuden määrittämisestä saatiin tulokseksi luminesenssi solumäärän funktiona (Kuvaaja 1).



Kuvaaja 1. Luc-linjojen lusiferaasiaktiivisuus.

Kuvaajasta nähdään, että soluista saatiin signaali mitattaessa luminesenssia eli todettiin lusiferaasientsyymiin toimivuus soluissa. Signaalimäärittämisavulla voidaan verrata tutkittujen solulinjojen tuloksia *in vitro*- ja *in vivo*-kokeissa käytettyihin lusiferaasileimattuihin solulinjoihin (Kuvaaja 2³⁰). Tuloksista voidaan analysoida, soveltuuko testattu luc-solulinja lusiferaasiaktiivisuutta vaativiin tautimallinnuksiin. Lisäksi testaus todistaa, että tässä menetelmässä luminesenssi on suoraan verrannollinen solumäärään.



Kuvaaja 2. Lusiferaasileimatus BxPC3 -solulinjan lusiferaasiaktiivisuus.

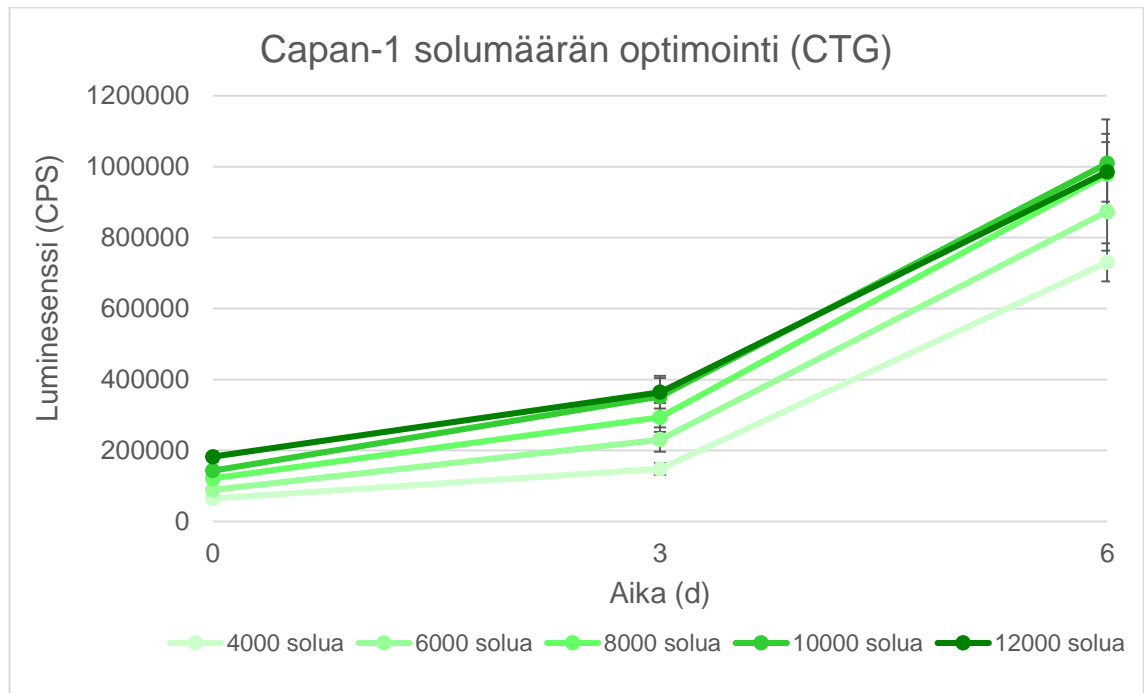
Testaukseen otettiin mukaan myös yksi ryhmä Capan-1 -solulinjaa. Parentaali-linjan lusiferaasiaktiivisuus oli konsentraatiolla 100 000 solua/kuoppa samaa tasoa kuin lusiferaasileimatus linjan ryhmä, jossa oli 15 000 solua/kuoppa.

4.2 Solumäärän optimointi

Testausten tuloksena saatiin määritettyä kasvukäyrät kahdella eri menetelmällä sekä parentaali- että luc -solujen eri solukonsentraatioille. Analysoiduista tuloksista valittiin kaksi eri solumäärää linjojen vertailuun.

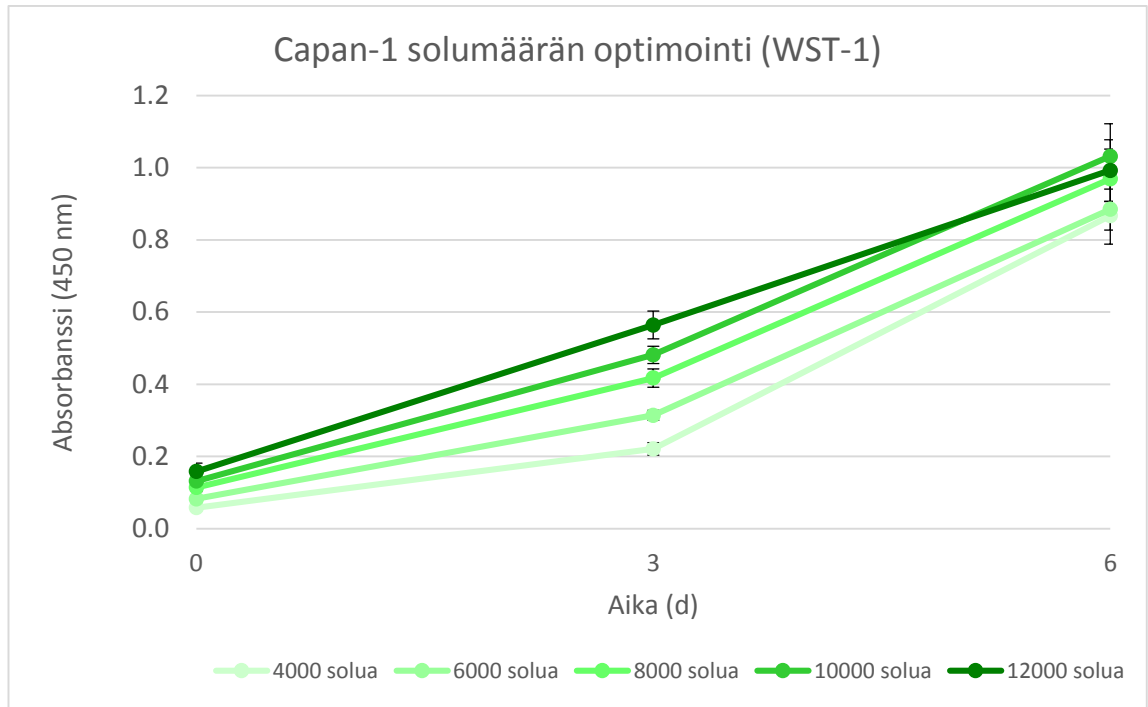
Capan-1

Soluryhmien kasvukäyrät ovat hyvin samankaltaiset sekä Capan-1 -linjalla että Capan-1-luc -solulinjalla. Verrokkiyhdisteen testaukseen valittiin molemmista solulinjoista sama solutiheys, joten tässä osiossa on esitetty vain parentaalilinjain kuvaajat. Luc -linjan kuvaajat ovat liitteessä 3.



Kuvaaja 3. Capan-1 -linjan solumäärän optimointi (CTG).

Molempien analysointimenetelmien tulokset antavat ryhmille samansuuntaiset kasvukäyrät. Ensimmäisten aikapisteiden välillä kasvu on hitaampaa harvemmästä solutiheydestä johtuen, mutta kasvu kääntyy eksponentiaaliseksi (Kuvaaja 3, Kuvaaja 4). Soluryhmien kasvu on tasaista, joskin suurimman solutiheyden käyrä on alenemaan päin viimeisen aikapisteen kohdalla. Tämä viittaa solujen alkavan saavuttaa suurinta mahdollista tiheyttä kuopassa, jolloin niiden elintila vähenee.

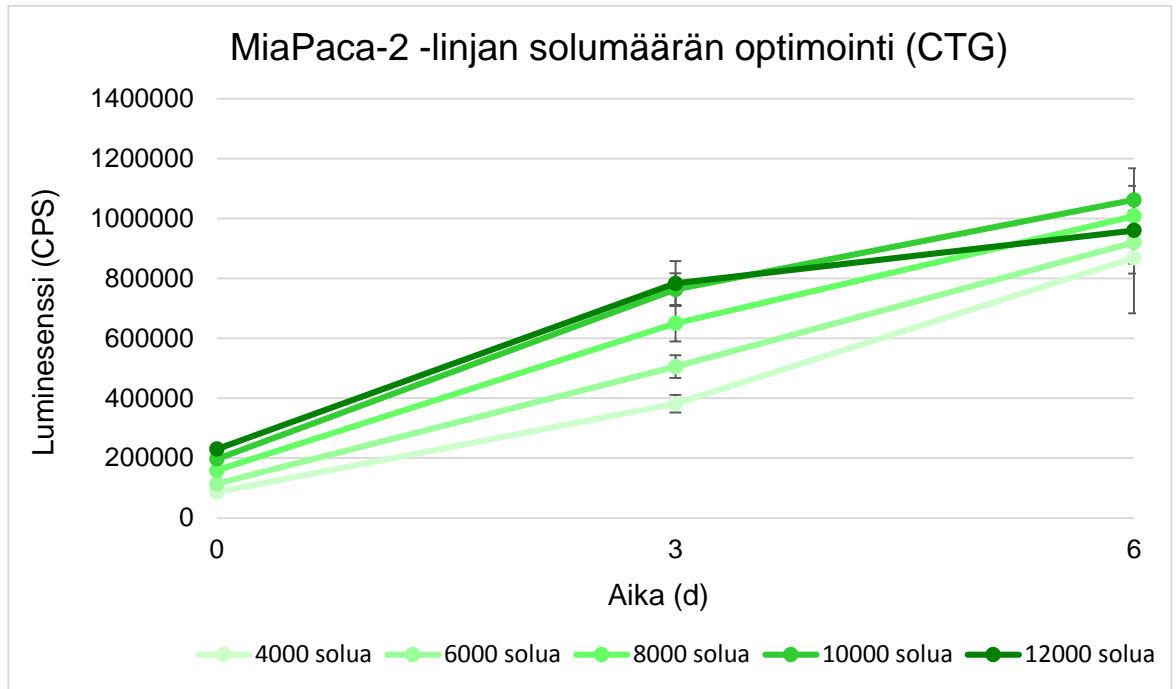


Kuvaaja 4. Capan-1 -linjan solumäärän optimointi (WST-1).

Kasvukäyrien ollessa samankaltaisia, solumäärien valinta tehtiin mikroskoopilla havaittujen erojen perusteella. Ryhmissä, joissa oli 6 000-10 000 solua/ kuoppa, konfluenssi oli ajanjakson aikana sopivin. Pienimmässä ryhmässä konfluenssi jäi alle 70 %, mutta suurimmassa ryhmässä konfluenssi saavutti yli 90 %. Näiden tulosten perusteella molemmille solulinjoille valittiin sopiviksi ryhmiksi 6 000 solua/kuoppa sekä 10 000 solua/kuoppa.

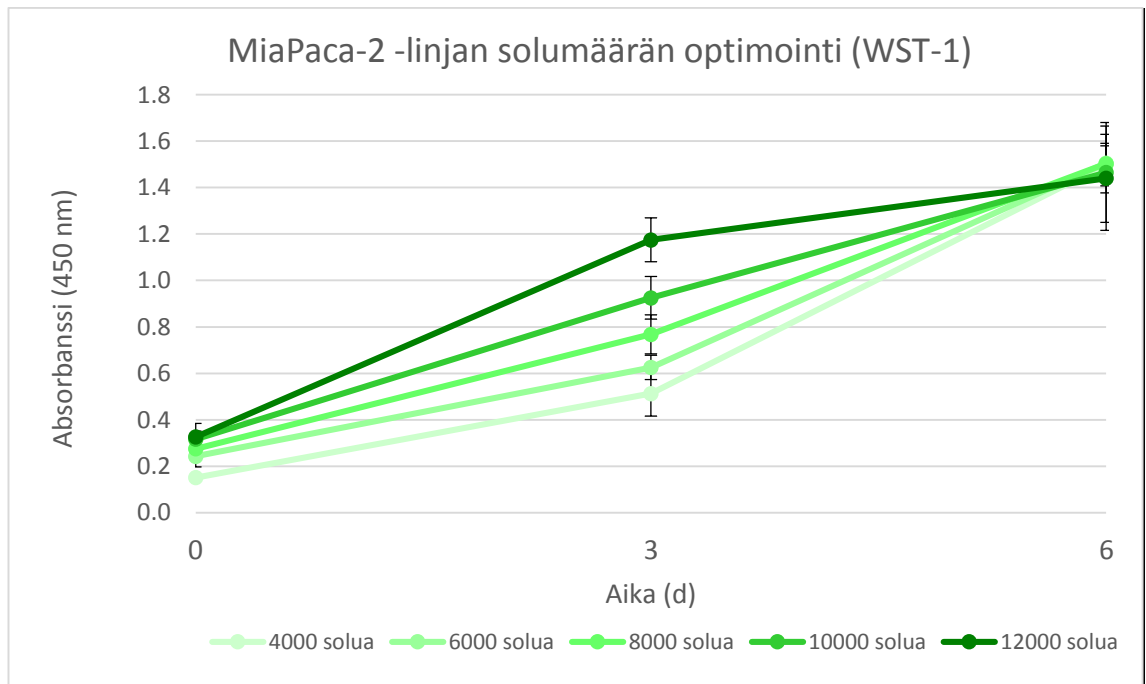
MiaPaca-2

MiaPaca-2 -solulinjat kasvoivat hyvin voimakkaasti tarkkailujakson aikana. Kasvu on tulkittavissa kuvaajista, sillä käyrät lähenevät samaa päätepistettä (Kuvaaja 5, Kuvaaja 6). Tämä viittaa siihen, että solut ovat saavuttaneet pisteen, jossa niiden tiheys on maksimi. Suurimpien soluryhmien kasvu on hidastunut, kun pienempien ryhmien kasvu on kiihtynyt, sillä soluilla on ollut vielä tilaa kasvaa.



Kuvaaja 5. MiaPaca-2 -linjan solumäärän optimointi (CTG).

Leimatun solulinjan kasvu erosi parentaalilinjasta, sillä 4 000 solun ryhmän kasvu oli merkittävästi hitaampaa (Liite 3: Kuvaaja 17, Kuvaaja 18). Tarkasteltaessa levyjä mikroskoopilla, havaittiin kyseisen ryhmän solujen kasvun häiriintyneen liian alhaisesta solutiheydestä.

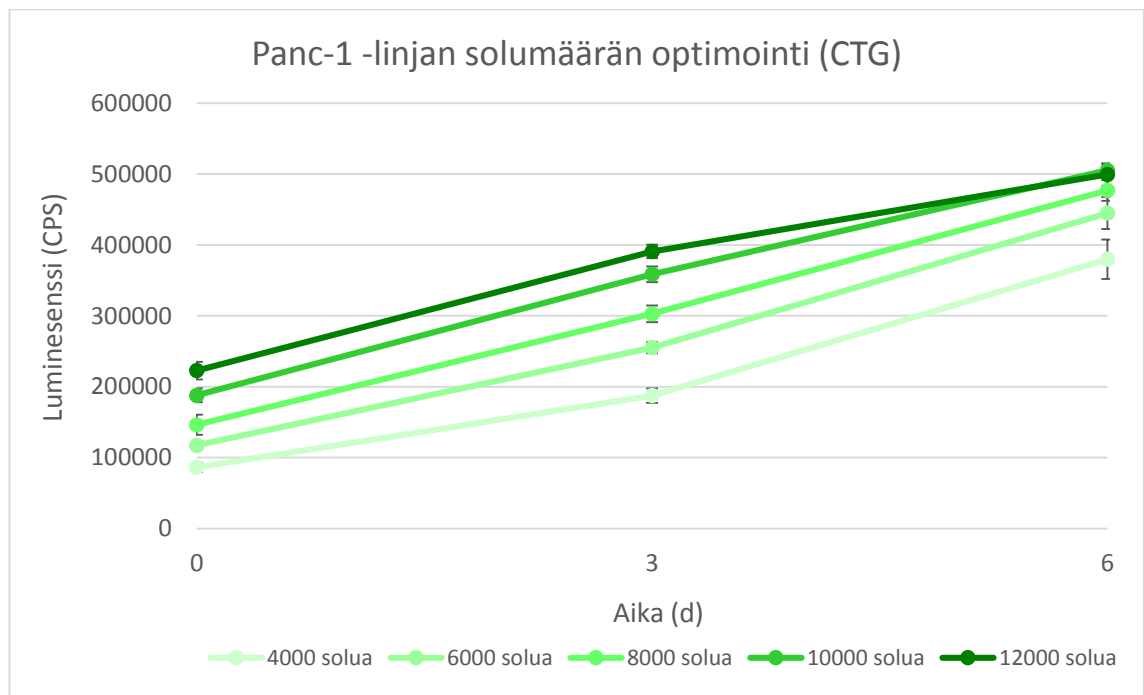


Kuvaaja 6. MiaPaca-2 -linjan solumäärän optimointi (WST-1).

Tarkkailujakson aikana havaittiin, että solut alkavat kasvaa päällekkäin elintilan loppuessa, jonka vuoksi solut kestävät paremmin suurta solutiheyttä. Näiden havaintojen perusteella jatkotesteihin valittiin 6 000 ja 8 000 solun ryhmät.

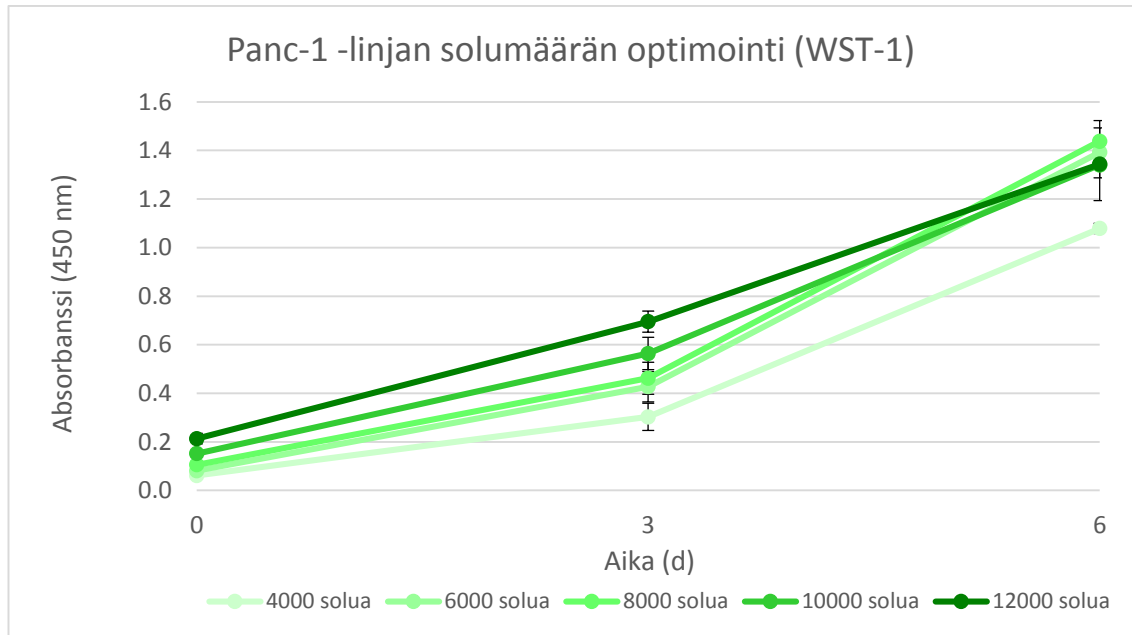
Panc-1

Panc-1 -linjojen solumäärän optimoinnin tuloksena tarkastellaan tässä osiossa parentaalilinjojen kuvaajia (Kuvaaja 7, Kuvaaja 8). Luc -linjojen kuvaajat ovat liitteessä 3.



Kuvaaja 7. Panc-1 -linjan solumäärän optimointi (CTG).

Kuoppalevyjen visuaalinen analysointi osoitti suurimman soluryhmän konfluenssin olevan 100 % viimeisessä aikapisteessä. Alimman soluryhmän kasvu oli muita ryhmiä heikompi alhaisesta solutiheydestä johtuen.



Kuvaaja 8. Panc-1 -linjan solumäärän optimointi (WST-1).

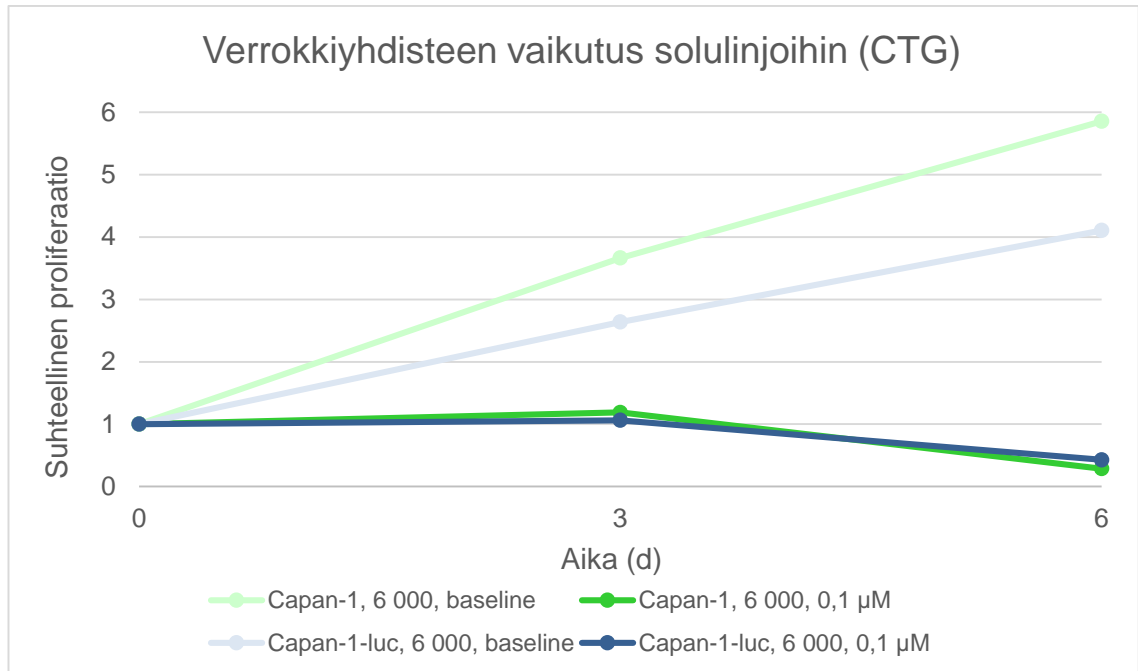
Ryhmistä valittiin ne solutiheydet, joiden konfluenssi oli yli 70 % viimeisessä aikapisteessä. Tulosten perusteella jatkotestauksiin valittiin 8 000 ja 10 000 solun ryhmät.

4.3 Verrokkiyhdisteen testaus

Testauksen tuloksena saatiin määritettyä gemsitabiinin vaikutus solulinjojen proliferaatioon. Solulinjojen vertailuun valittu ryhmä valikoitiin mittaustuloksista piirrettyjen tuloksien perusteella (Liitteet 4-6). Koska solumäärässä voi olla aggregaattien vuoksi hajontaa automaattisesta laskukoneesta huolimatta (NucleoCounter® NC-200), tuloksista laskettiin suhteellinen proliferaatio. Lusiferaasientsyymi itsessään reagoi lusiferiinin kanssa, joten luc -solulinja antaa korkeamman signaalin CellTiter Glo -menetelmää käytettäessä. Laskemalla suhteellinen proliferaatio saadaan tarkemmin vertailtua solulinjojen kasvua.

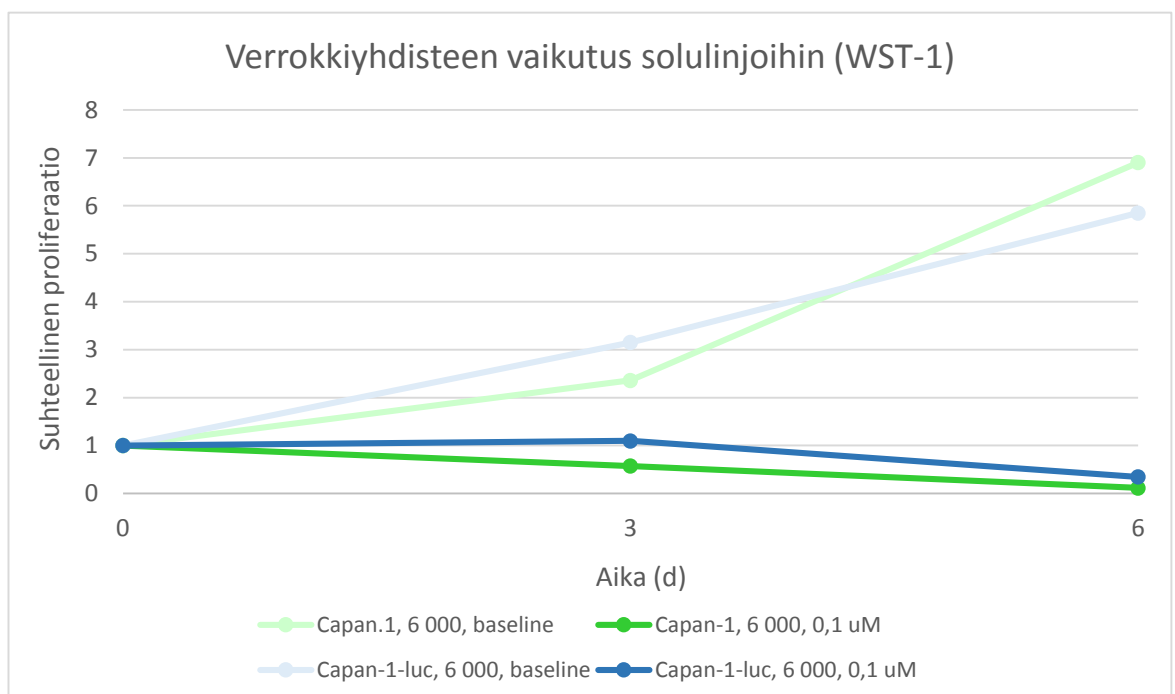
Capan-1

Vertailuun otettiin valitusta solumäärästä gemsitabiinia sisältävä ryhmä, jossa oli pienin tehoava pitoisuus (0,1 μ M). Kuvaajassa on myös kontrollina ryhmä (baseline), joka ei sisältänyt sytotoksista yhdistettä (Kuvaaja 9, Kuvaaja 10).



Kuvaaja 9. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1 -solulinjoihin (CTG).

CTG -menetelmällä analysoituna molempien solulinjojen vaste gemsitabiinille on samanlainen. Kontrolliryhmien kasvukäyrät eroavat toisistaan, sillä parentaalilinjaan kasvu on luc -linjaan verraten voimakkaampaa.

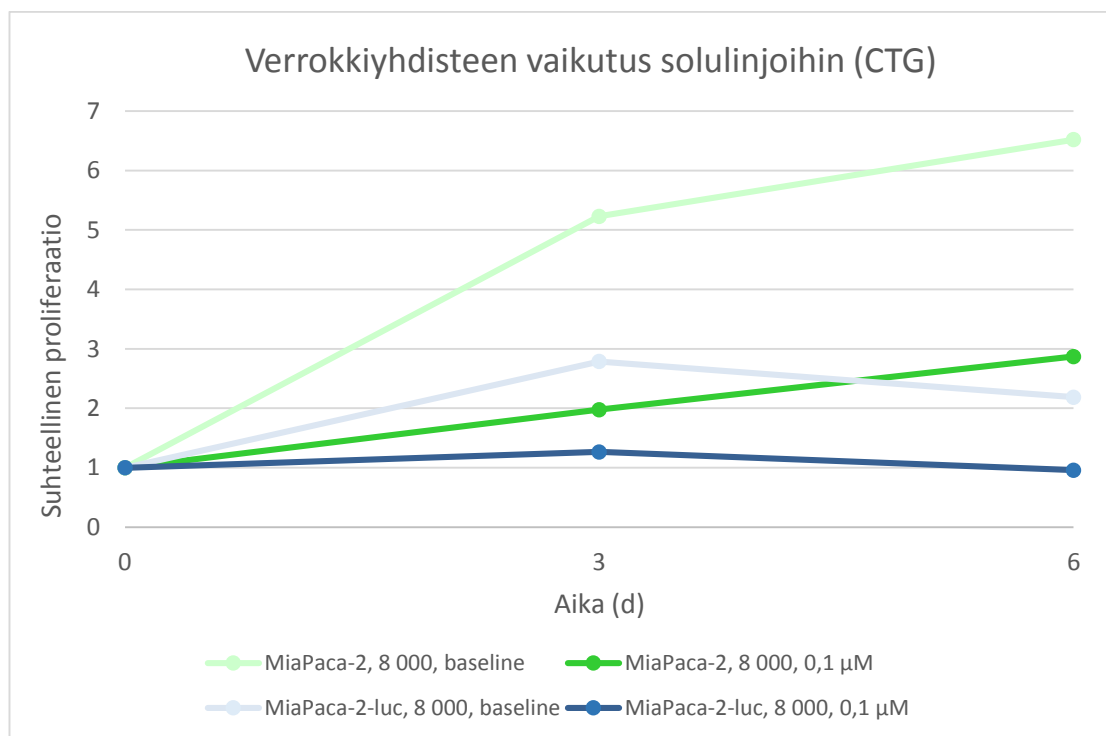


Kuvaaja 10. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1 -solulinjoihin (WST-1).

WST-1 -menetelmällä analysoituna linjojen absorbanssitaset ovat lähellä toisiinsa. Solulinjojen vaste gemsitabiiniin on samansuuntainen, vaikka kontrolliryhmien kasvukäyrissä on hieman eroa. Kontrolliryhmässä parentaalisolulinja kasvaa eksponentiaalisesti, kun leimatun solulinjan kasvu on lineaarista.

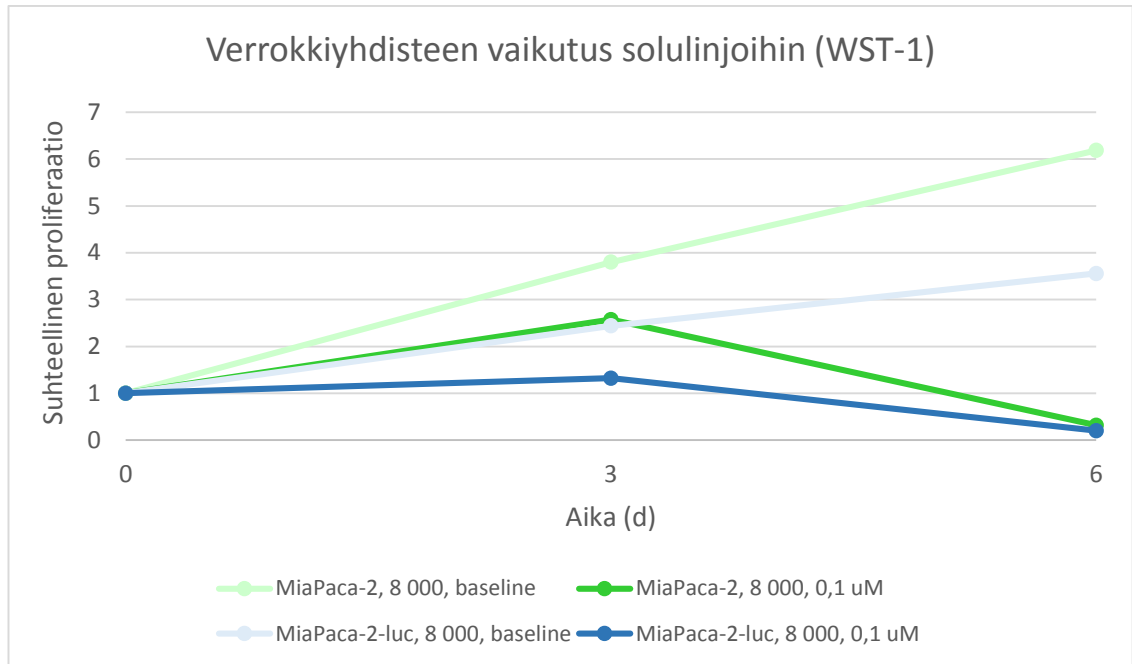
MiaPaca-2

Saaduista tuloksista solulinjojen vertailuun valittiin toinen solutiheyksistä tuloksista piirrettyjen kuvaajien perusteella (Liite 5). Molempien solulinjojen vertailuun otettiin 8 000 solun kontrolliryhmä ja ryhmä, joka sisälsi pienimmän tehokkaan pitoisuuden gemsitabiinia (0,1 μM).



Kuvaaja 11. Gemsitabiinin vaikutus MiaPaca-2 -solulinjoihin (CTG).

CTG -menetelmällä saaduista tuloksista nähdään leimatun solulinjan poikkeavan merkittävästi parentaalilinjasta (Kuvaaja 11). Luc-linjan kasvu on hidastunut kontrolliryhmässä ja lähtee laskuun päivän kolme jälkeen. Viimeisessä aikapisteessä luc -linja antaa heikomman tuloksen, kuin parentaalilinjalla gemsitabiinille altistettu ryhmä. Parentaalilinjalla kontrollin kasvu on erittäin voimakasta.

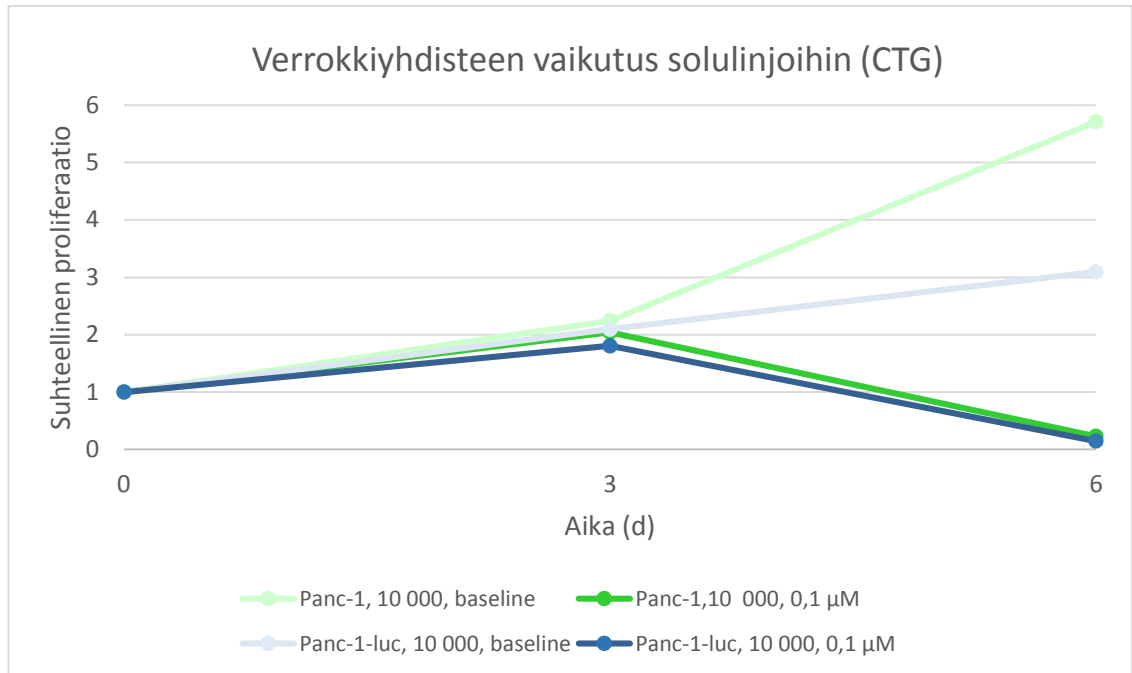


Kuvaaja 12. Gemsitabiinin vaikutus MiaPaca-2 -solulinjoihin (WST-1).

WST-1 -menetelmällä saadut tulokset eroavat erityisesti viimeisessä aikapisteessä rinnakkaisen CTG -tuloksista. Yhdisteelle altistettut ryhmät ovat samassa tilanteessa päivänä kuusi, vaikka parentaalilinjan kasvu on ollut hieman voimakkaampaa (Kuvaaja 12). Myös kontrolliryhmissä parentaalilinjan kasvu on ollut voimakkaampaa, mutta käyrä on samansuuntainen molemmilla linjoilla.

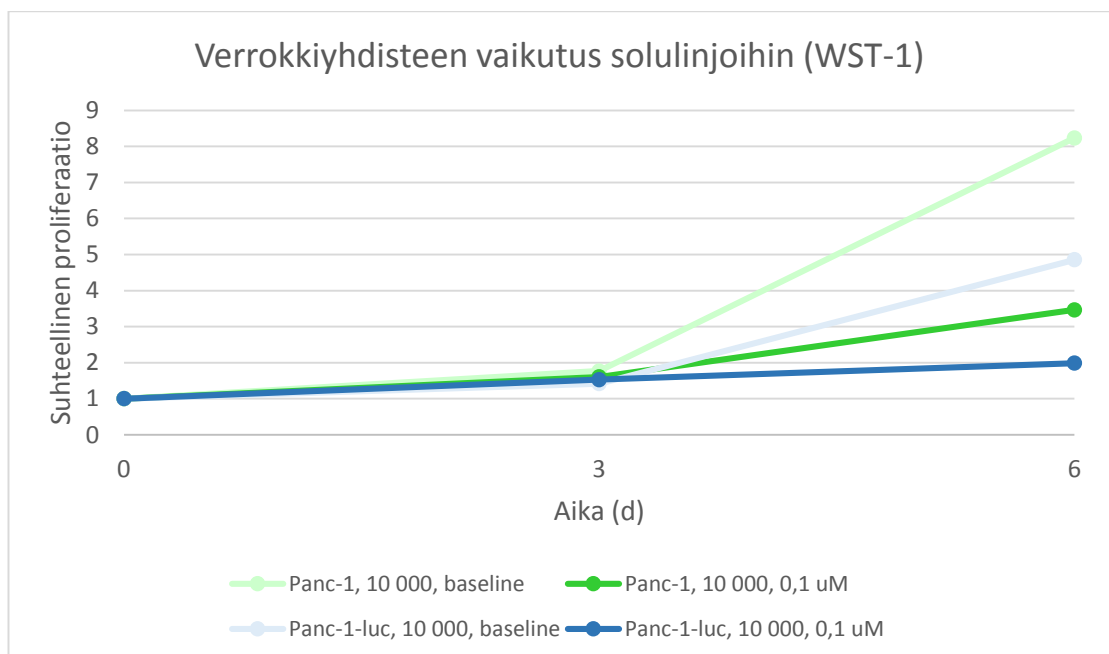
Panc-1

Panc-1 -solulinjojen tulokset käsiteltiin aiemmin mainitulla tavalla. Vertailuun valittiin 10 000 solun ryhmä ja gemsitabiinista pitoisuus 0,1 μM . Tuloksista piirretyt kuvaajat ovat liitteessä 6.



Kuvaaja 13. Gemsitabiinin vaikutus Panc-1 -solulinjoihin (CTG).

Parentaalisolut sekä leimatut solut ovat kasvaneen hyvin samalla tavoin päivään kolme asti. Gemsitabiinilla ei ole merkittävää vaikutusta solujen viabiliteettiin ensimmäisen aikajakson aikana. Päivästä kolme lähtien parentaaliryhmän kasvu on luc -linjaan verraten voimakkaampaa, mutta solulinjojen vaste yhdisteelle on hyvin samankaltainen (Kuvaaja 13).



Kuvaaja 14. Gemsitabiinin vaikutus Panc-1- solulinjoihin (WST-1).

WST-1 -tulokset tukevat rinnakkaisen menetelmän tuloksia ja solut kasvavat samalla tavoin päivään kolme asti (Kuvaaja 14). Kontrolliryhmien kasvu on molemmilla menetelmillä analysoituna samankaltaista ja parentaalisolut kasvavat voimakkaammin. Luc -linja on WST-1 -menetelmän mukaan hieman herkempi gemsitabiinille, mutta molempien yhdisteelle altistettujen ryhmien viabiliteetti on parempi kuin CTG -analyysissa.

Tilastollinen analysointi

Solulinjojen käyttäytymisen eroja testauksen aikana määritettiin Studentin T-testin avulla. Gemsitabiinin vaikutusta analysoitiin vertaamalla yhdisteelle altistetun ryhmän proliferaatiota kontrolliryhmän proliferaatioon molemmissa aikapisteissä (Taulukko 2). Linjojen välisiä eroavaisuuksia määritettiin vertaamalla luc -linjan kontrolliryhmää parentaalilinnan kontrolliryhmään molemmissa aikapisteissä.

Taulukko 2. Studentin T-testin tulokset.

Solulinja	Aikapiste	Luotettavuus-taso
Capan-1	Gemsitabiinin vaikutus päivinä 3 ja 6	CTG:***, *** WST-1; ***, ***
Capan-1-luc	Gemsitabiinin vaikutus päivinä 3 ja 6	CTG:***, *** WST-1: ***, ***
Capan-1 -linjojen vertailu	Luc-linjan kasvun eroavuus päivinä 3 ja 6	CTG:***, *** WST-1: **, *
MiaPaca-2	Gemsitabiinin vaikutus päivinä 3 ja 6	CTG:***, *** WST-1; ***, ***
MiaPaca-2-luc	Gemsitabiinin vaikutus päivinä 3 ja 6	CTG:***, *** WST-1; ***, ***
MiaPaca-2 -linjojen vertailu	Luc-linjan kasvun eroavuus päivinä 3 ja 6	CTG:***, *** WST-1: ***, ***
Panc-1	Gemsitabiinin vaikutus päivinä 3 ja 6	CTG: *, *** WST-1: N/S, ***
Panc-1-luc	Gemsitabiinin vaikutus päivinä 3 ja 6	CTG: *, *** WST-1: N/S, ***
Panc-1 -linjojen vertailu	Luc-linjan kasvun eroavuus päivinä 3 ja 6	CTG: N/S, *** WST-1: *, ***

Tuloksista nähdään gemsitabiinin vaikuttaneen merkittävästi Capan-1 sekä MiaPaca-2 -linjoihin molemmissa aikapisteissä. Panc-1 -linjan vaste yhdisteelle on ensimmäisessä aikapisteessä heikko, sillä tuloksilla ei ole tilastollista merkittävyyttä. Yhdisteen sytotoksinen vaikutus solulinjaan on kuitenkin näkyvissä viimeisessä aikapisteessä. Solulinjojen kontrolliryhmien väliset erot ovat suurimmat MiaPaca-2 -soluilla, sillä linjan eroavat tilastollisesti merkittävästi päivinä kolme ja kuusi.

4.4 Lisähavainnot

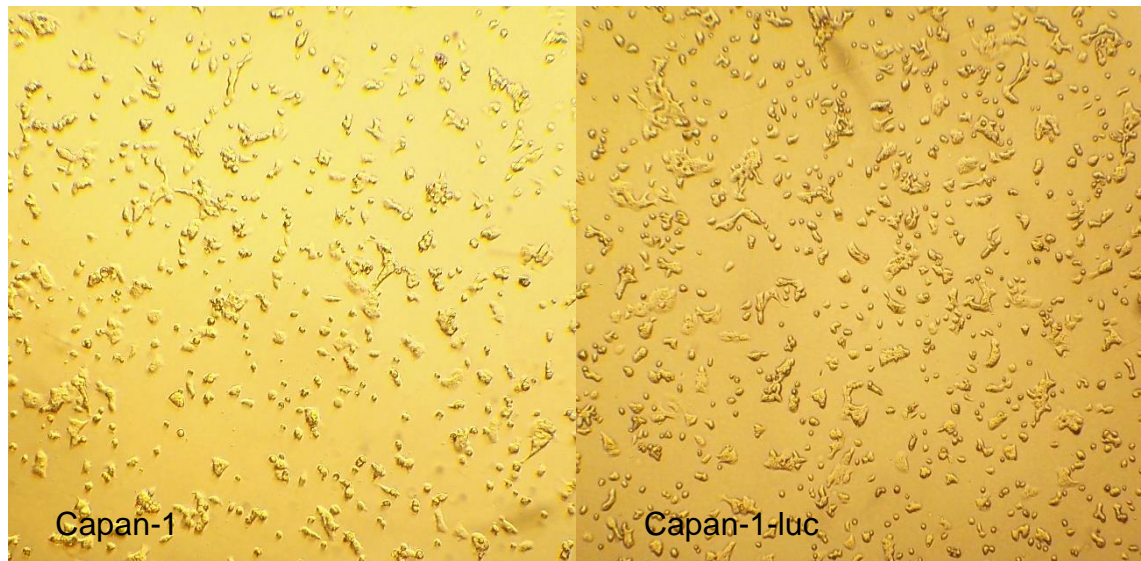
Solulinjoja analysoitiin myös visuaalisesti, sekä seuraamalla solujen viabiliteettia ja aggregaattien määrää.

Capan-1

Solulinjojen viabiliteetissa havaittiin eroja koejakson aikana. Parentaalilinjan viabiliteetti oli kaikilla laskukerroilla välillä 90-93 %, kun taas luc -solulinjan viabiliteetti oli yli 97 %. Solulinjoja käsiteltiin samalla tavoin ja samoilla reagensseilla ulkoisten vaikutusten minimoimiseksi.

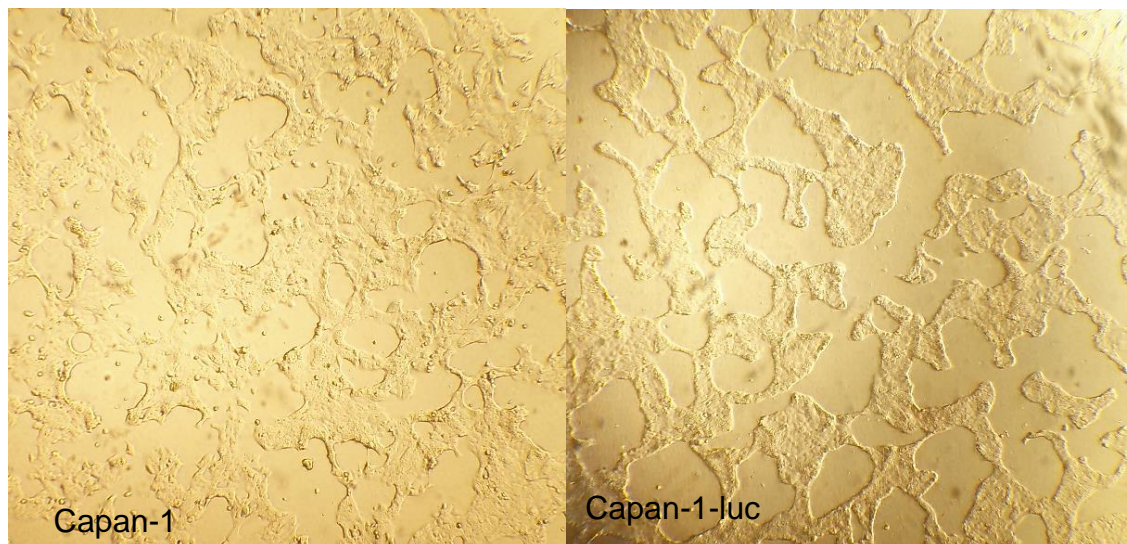
Verrattaessa solujen kykyä tarttua kasvualustaansa sekä toisiinsa, havaittiin eroja solulinjojen välillä. Parentaalilinja vaati pidemmän inkubointiajan (noin kaksi minuuttia enemmän) trypsiinillä irrotukseen maljalta ja solut aggregoituivat helpommin. Kuuden päivän tarkkailujakson aikana luc -solut alkoivat irrota kuoppalevystä saavuttaessaan yli 90 % konfluenssin ja solut keräytyivät rihmoiksi. Parentaalilinjalla tällaista käyttäytymistä ei havaittu.

Solulinjoista otettiin kuvat päivinä yksi ja kolme (24 ja 72 tuntia solujen jakamisesta), jotta soluja voitiin vertailla visuaalisesti.



Kuva 7. Valokuvat Capan-1 -linjoista päivänä yksi.

Ensimmäisessä aikapisteessä solujen välillä ei havaittu eroavaisuuksia kasvussa (Kuva 7). Molemmat linjat ovat alkaneet tarttua kasvualustaansa ja kasvavat saman tyyppisesti.

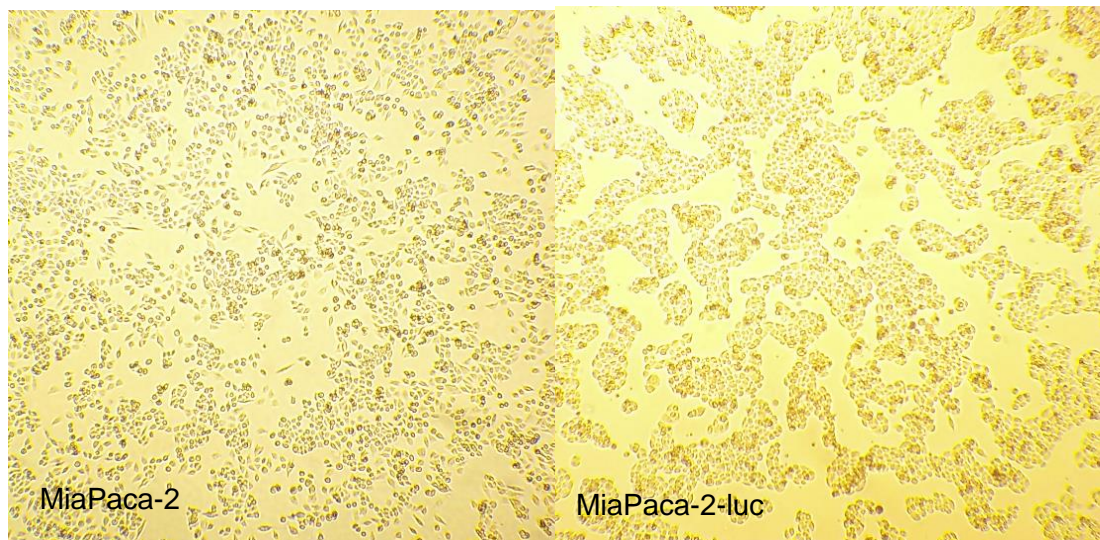


Kuva 8. Kuvat Capan-1 -linjoista päivänä kolme.

Jälkimmäisessä aikapisteessä solujen välillä voidaan sanoa olevan pieniä eroavaisuuksia (Kuva 8). Luc -leimattu linja kasvaa selkeälinjaisemmissa saarekkeissa, jotka ovat yhtenäisiä. Kuva tukee aiemmin tehtyä havaintoa, jonka mukaan luc -linja kerääntyy rihmoiksi saavuttaessaan suuren solutiheyden.

MiaPaca-2

Kasvatuksen aikana solulinjojen välillä havaittiin eroavaisuuksia viabiliteetissa. Luc -linjan viabiliteetti oli alle 90 % ja aleni jopa 40 % käsittelyjen seurauksena. Parentaalilinjan viabiliteetti pysyi yli 90 % samanlaisesta käsittelystä huolimatta.

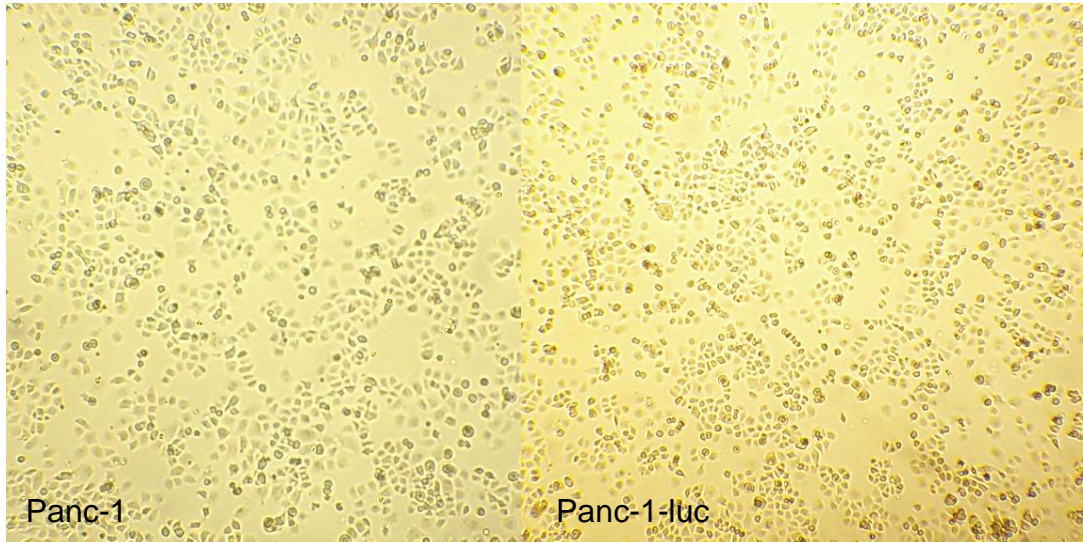


Kuva 9. Kuvat MiaPaca-2 -linjoista.

Soluista otettiin kuvat 48 tuntia jaon jälkeen analysointia varten (Kuva 9). Solulinjojen välillä havaittiin pieniä eroavaisuuksia kasvussa, sillä luc -linja kasvoi selkeämmin saarekkeissa. Parentaalilinja on jakautunut tasaisemmin kasvualustalle.

Panc-1

Solujen välillä ei havaittu selviä eroavaisuuksia käyttäytymisessä tai ulkonäössä. Leimatuilla soluilla oli sama viabiliteetti sekä agregaattien määrä kuin parentaalilinjalla.



Kuva 10. Kuvat Panc-1 -linjoista.

Soluista otettiin kuvat 72 tuntia jaon jälkeen. Solulinjojen välillä ei havaittu eroavaisuuksia (Kuva 10). Kuvassa näkyy molempien solujen erilaistuvan epiteeleille tyypillisiksi pyöreiksi soluiksi. Solut kasvavat tasaisesti kasvupinnalla, eikä solulinjojen välillä ole havaittavissa silmämääräisiä eroja.

5 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli karakterisoida kolmen eri lusiferaasileimatun haimasyöpäsolulinjan proliferaatiota ja käyttäytymistä. Geenin toimivuuden toteamiseksi määritettiin solujen lusiferaasiaktiivisuus. Tulosten mukaan Panc-1 -soluilla on muita huomattavasti korkeampi aktiivisuus, sillä signaali on moninkertainen verrattuna toisiin solulinjoihin. Panc-1 -linja on valmistettu viimeisimmän tekniikan mukaan ja solut osoittautuivat valmistusvaiheessa muita linjoja alttiimmaksi transfektioinnille³¹. Panc-1 -linjan on myös aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu olevan soveltuva transfektioille, joten lusiferaasin vahva ilmentyminen soluissa oli odotusten mukaista¹³.

Solulinjojen lusiferaasiaktiivisuutta verrattiin *in vitro*- ja *in vivo*-mallinuksissa aikaisemmin käytettyyn haimasyöpäsolulinjaan (BxPC3-luc). Vaikka Capan-1- ja MiaPaca-2 -solut antoivat paljon Panc-1 -linjaa matalamman luminesenssisignaalin, havaittiin kyseisten linjojen antavan pitkälti samansuuruisen signaalin BxPC3-luc -solulinjan kanssa. Tästä voidaan olettaa kaikkien kolmen solulinjan muodostaman luminesenssin olevan tasolla, jota pystytään tautimalleissa kuvantamaan.

Opinnäytetyön pääpaino oli verrokkiyhdisteen testauksessa, sillä tulosten perusteella voitiin määrittää solujen vaste sytotoksiselle aineelle aikaisemmin määritetyssä optimaalisessa solutiheydessä. Kaikki solulinjat reagoivat gemsitabiiniin kun pitoisuus ylitti 0,1 μM , jolloin solujen viabiliteetti heikkeni jakautumisen ja kiinnittymisen hidastuessa. Capan-1- ja MiaPaca-2 -linjojen havaittiin olevan herkempiä gemsitabiinille kuin Panc-1 -linjan. Yhdiste ei vaikuttanut suuresti Panc-1 -solujen viabiliteettiin ensimmäisten aikapisteiden välillä ja vaikutus on näkyvässä vasta viimeisessä aikapisteessä. Analysoitaessa solulinjan tulokset Studentin T-testillä, gemsitabiinilla ei havaittu olevan vaikutusta ensimmäisten kolmen vuorokauden aikana, mutta päivänä kuusi testiryhmien ero kontrolliryhmään oli tilastollisesti erittäin merkittävä. Solulinjojen vaste gemsitabiinille oli kirjallisuudesta löy-

dettyjen havaintojen mukainen. Tutkimuksissa on havaittu Panc-1 -solulinjan olevan resistentimpi kyseiselle yhdisteelle verrattuna MiaPaca-2 -soluihin, jotka ovat sensitiivisiä gemsitabiinille.³²

Verrokkiyhdisteen testauksen tulosten perusteella voitiin verrata leimatun solulinjan proliferaatiota parentaalilinjan proliferaatioon. Tavoitteena oli selvittää, eroaako luc -linjan käyttäytyminen parentaalilinjasta kontrolli- tai gemsitabiiniryhmissä. Jos luc -solut käyttäytyvät poikkeavasti tai reagoivat eri tavalla sytotokseen yhdisteeseen kuin parentaalisolut, ei tautimallia voida pitää täysin luotettavana taudin kuvaajana. Testauksissa havaittiin rinnakkaisten solulinjojen antavan gemsitabiinille hyvin samankaltaiset vasteet. Tulosten tilastollinen analysointi osoitti kaikkien luc -linjojen reagoivan yhdisteeseen molemmissa aikapisteissä samalla tavoin parentaalilinjojen kanssa. Capan-1- ja MiaPaca-2 -linjoilla yhdisteen vaikutus oli tilastollisesti erittäin merkittävä kaikissa aikapisteissä, Panc-1 -linjoilla viimeisessä aikapisteessä.

Verrattaessa rinnakkaisten solulinjojen kasvua toisiinsa normaaliolosuhteissa ilman sytotoksisen aineen läsnäoloa, havaittiin linjojen kasvuissa eroavaisuuksia. Kaikille solulinjoille yhtenäistä on parentaalilinjan voimakkaampi kasvu verrattaessa luc -linjaan, joka on nähtävissä selkeästi tulosten pohjalta piirretyistä kuvajista. Tilastollinen analyysi tukee havaintoa, sillä linjojen eroavaisuuksilla on jopa merkittäviä eroja. MiaPaca-2 -linjat eroavat molempien analyysimenetelmien tulosten mukaan tilastollisesti merkittävästi molemmissa aikapisteissä. Capan-1 -linjojen erot ovat suuret analysoituna CTG -menetelmällä, mutta WST-1 -tulosten mukaan linjat eivät eroa tilastollisesti merkittävästi ja päivänä kuusi ero on enää tilastollisesti lähes merkittävä. Panc-1 -linjat ovat kasvaneet ensimmäisten aikapisteiden välillä erittäin samankaltaisesti ja linjojen kasvussa ei ole havaittavissa tilastollisia eroja. Kasvukäyrät muuttuvat eroavaksi viimeisten aikapisteiden välillä solujen määrän kasvaessa, mikä saa linjoissa olevat erot helpommin havaittavaksi. Päivänä kuusi solut eroavat toisistaan tilastollisesti merkittävästi molemmilla menetelmillä analysoituna.

MiaPaca-2 -linjojen kasvu erosi toisistaan eniten testausten aikana. Luc -linja käyttäytyi verrokkiyhdisteen testauksen aikana poikkeavasti verrattaessa proliferaatiokuvaajia solumäärän optimointivaiheesta saatuihin kuvaajiin. Ryhmän, joka ei sisältänyt gemsitabiinia, kasvu on laskenut päivien kolme ja kuusi välillä, vaikka samalla solutiheydellä kasvu on ollut nousevaa aikaisemmassa testauksessa. Linjan poikkeava kasvu osaltaan aiheuttaa merkittävät tilastolliset erot parentaalilinjan ja muokatun linjan välille. Verrokkiyhdisteen testaus olisi aiheellista toistaa MiaPaca-2 -linjojen osalta, sillä tuloksia ei voida pitää täysin luotettavana muutuneen kasvun takia.

CellTiter-Glo on solujen proliferaatiotestauksissa paljon käytetty menetelmä, joka perustuu ATP:n reagointiin lusiferiinin kanssa. Lusiferaasileimatut solulinjat voivat reagoida lusiferiinin kanssa tuottamansa lusiferaasientsyymin takia ja aiheuttaa suuremman luminesenssisignaalin verrattuna parentaalilinjaan. Kyseisen ominaisuuden vuoksi ja linjoja verrattiin suhteellisen proliferaation kautta, jolloin luc -linjojen luminesenssin tasoeroa voitiin vähentää. Menetelmällä saadut tulokset eroavat jonkin verran WST-1:llä saaduista tuloksista, joten CTG -analyysi olisi tulevaisuudessa suositeltavaa optimoida lusiferaasileimatuille solulinjoille, jotta tuloksia voidaan pitää täysin luotettavina.

Solulinjoja seurattiin lisäksi visuaalisesti ja tarkastelemalla laskukoneen antamia tuloksia aggregaateista sekä viabiliteetistä. Havaitut tulokset tukivat muilla menetelmillä saatuja tuloksia. Panc-1 -linjat olivat silmämääräisesti hyvin samannäköisiä ja solujen välillä ei ollut eroja viabiliteetissä tai aggregaattien määrässä. Capan-1 -linjoilla oli pieniä eroavaisuuksia solujen ulkonäössä sekä viabiliteetissä. Luc -solujen viabiliteetti (~90 %) oli toistuvasti hieman parentaalilinjaa huonompi (>97 %). MiaPaca-2 -soluilla oli nähtävissä samoja eroavaisuuksia. Luc -linjan viabiliteetti (43-88 %) oli selvästi alempi verrattuna parentaalilinjaan (>97 %) ja leimatut solut rasittuivat nopeammin käsittelystä. Solujen kasvu erosi visuaalisesti samalla tavoin kuin Capan-1 -solujen, sillä muokatut linjat kasvoivat selkeämmin saarekkeissa. Havainnot luc -solujen alhaisemmasta viabiliteetistä tukevat yllä mainittuja tuloksia parentaalilinjan voimakkaammasta kasvusta testausten aikana.

Lusiferaasileimauksen vaikutusta solujen metaboliaan on tutkittu aiemmin ristiriitaisin tuloksin. Nykyisin käytettävät tekniikat ovat kuitenkin kehittyneempiä ja uusimpien tutkimusten mukaan lusiferaasileimaus on harmitonta soluille. Opinnäytetyössä käytetyt lusiferaasileimatut solulinjat on valmistettu valikoimalla transfektion jälkeen yksittäinen solu, jonka annetaan jakautua. Luc -linja edustaa täten yhden alkuperäisen solun käyttäytymistä ja ominaisuuksia. Yksittäiset solut saattavat erota hieman toisistaan, joten pienien poikkeavuuksien takia solulinjan ei voida sanoa olevan soveltumaton taudin mallinnukseen. Solulinjojen välisten erojen täytyy olla yksiselitteiset ja selkeät, jotta voidaan luotettavasti sanoa erojen johtuvan leimaustekniikan toimimattomuudesta. Luc -linjat valmistanut tutkimusryhmä on määrittänyt geenin vaikutusta solujen kasvuun ja tulosten mukaan linjoilla ei ole merkittäviä eroavaisuuksia.^{33,31}

6 LOPPUPÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön lopputuloksena saatiin määritettyä Capan-1-, Panc-1- ja MiaPaca-2 -solulinjojen lusiferaasiaktiivisuus, proliferaatio sekä vaste sytotoksiselle yhdisteelle. Aktiivisuustestauksen perusteella solulinjat sisältävät toimivan lusiferaasientsyymiä ilmentävän geenin, jonka tuottama luminesenssisignaali soveltuu *in vivo* -kuvantamiseen. Solulinjoille saatiin määritettyä optimaaliset solutiheydet, mikä toimii auttavana tekijänä tulevissa tutkimuksissa.

Verrokkiyhdisteen testauksen tulosten mukaan kaikki muokatut solulinjat antavat käytetylle sytotoksiselle yhdisteelle saman vasteen. Tulos on lupaava tautimalleja ajatellen, sillä solujen täytyy varmuudella vastata alkuperäisiä soluja, jotta tulokset taudin etenemisestä ovat luotettavia. Verrattaessa solulinjojen käyttäytymistä normaaliolosuhteissa, havaittiin soluissa eroavaisuuksia. Erot eri linjojen välillä olivat johdonmukaisia, sillä parentaalilinjojen proliferaation havaittiin olevan voimakkaampaa. Panc-1 -solulinjoissa erot olivat vähäisempiä verrattuina muihin linjoihin. Kyseinen solulinja on uusi ja solujen muokkausmenetelmää on kehitetty eteenpäin solulinjojen välillä.

Testauksista saadut tulokset ovat tekniikan kannalta lupaavia, mutta niiden pohjalta ei voida vetää ehdottomia johtopäätöksiä. Lusiferaasileimatut solulinjat vaativat jatkotestauksia eläinmalleissa, jotta voidaan määrittää niiden luotettavuus taudin kuvaajina.

LÄHTEET

-
- ¹ World Cancer Research Fund International. 2014. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/pancreatic-cancer-statistics>. Viitattu 16.8.2015
- ² Argyros, O.;Ping Wong, S.;Gowers, K.;Harbottle, R. 2012, Genetic Modification of Cancer Cells Using Non-Viral, Episomal S/MAR Vectors for In Vivo Tumour Modelling. Viitattu 30.8.2015.
- ³ Solunetti. 2006. http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solusykli_1/. Viitattu 23.9.2015.
- ⁴ Kimball, J. 2014. <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/CellCycle.html>. Viitattu 23.9.2015.
- ⁵ Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>. Viitattu 24.9.2015.
- ⁶ Syöpäjärjestöt, <http://www.cancer.fi/tietoasoyovasta/syopa/>. Viitattu 16.8.2015.
- ⁷ University of Kent. Biotechnology and Cell Culture. 2015. <https://moodle.kent.ac.uk/external/mod/book/view.php?id=2604&chapterid=160>. Viitattu 24.9.2015.
- ⁸ Cell Types and Culture Characteristics. 2010. Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratory, 2nd edition, Volume 12. Viitattu 28.9.2015.
- ⁹ King D. 2007. Histology. Southern Illinois University School of Medicine. Viitattu 24.9.2015.
- ¹⁰ Useita kirjoittajia. 2009. Opas anatomiaan, H.F Ullman, 309, 335. Viitattu 16.8.2015
- ¹¹ Memorial Sloan Kettering Cancer Center. 2015. <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/capan-1-human-pancreatic-adenocarcinoma-cell-line>. Viitattu 21.8.2015.
- ¹² Deer, E. Gonzalez-Hernandez, J. Coursen, J. Shea, J. Ngatia, J. Scaife, C. Firpo, M. Mulvihill, S. 2010. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*, vol 39, no. 4. Viitattu 28.9.2015.
- ¹³ ATCC. 2014. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1420.aspx?geo_country=fi#generalinformation. Viitattu 28.9.2015.
- ¹⁴ Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., Todaro, G. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer* Vol 15. Viitattu 19.10.2015.
- ¹⁵ American Society of Clinical Oncology. 2015. <http://www.cancer.net/navigating-cancer-care/how-cancer-treated/chemotherapy>. Viitattu 21.8.2015
- ¹⁶ Caley, A.;Jones, R. 2012. The Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. *Surgery Journal*, Volume 30, Issue 4. <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.turkuamk.fi/science/article/pii/S0263931912000166>. Viitattu 21.8.2015
- ¹⁷ Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/chemotherapy/>. Viitattu 21.8.2015

-
- ¹⁸ Elonen, E., 2001, Farmakologia ja toksikologia, Kuopio: Medicina, s. 931-938. Viitattu 21.8.2015
- ¹⁹ De Wet, J.; Wood, K.; DeLuca, M.; Helinski, D.; Subramani, S. 1987. Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology* Vol. 7, No. 2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC365129/pdf/molcellb00074-0169.pdf> Viitattu 23.8.2015
- ²⁰ Protein biology resource library, ThermoFisher Scientific (2015), <http://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/luciferase-reporters.html>. Viitattu 23.8.2015.
- ²¹ Chai, M.; Kim-Fuchs, C.; Angst, E.; Sloan, E. 2013. Bioluminescent Orthotopic Model of Pancreatic Cancer Progression. *Journal of Visualized Experiments*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3734868/>. Viitattu 30.8.2015.
- ²² Dinca, E.; Sarkaria, J.; Schroeder, M.; Carlson, B.; Voicu R.; et al. 2007. Bioluminescence monitoring of intracranial glioblastoma xenograft: response to primary and salvage temozolomide therapy. *Journal of neurosurgery* 107. Viitattu 30.8.2015.
- ²³ Robbinsa, P.; Ghivizzania, S. 1998. *Viral Vectors for Gene Therapy*. *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 80, Issue 1. Viitattu 30.8.2015.
- ²⁴ Wilson, K., Walker, J. 2010. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Seitsemäs painos. Cambridge University Press. Viitattu 19.10.2015.
- ²⁵ D-Luciferin *In Vitro* protocol. 2013. Gold Biotechnology. https://www.goldbio.com/documents/1067/Luciferin+In+Vitro+Book+v1_130418.pdf. Viitattu 13.10.2015.
- ²⁶ Smith, C. 2012. *Cell Proliferation Assays: Methods for Measuring Dividing Cells*. Biocompare.com. <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/>. Viitattu 2.9.2015.
- ²⁷ Promega. 2015. https://fi.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/cell-viability-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/. Viitattu 17.8.2015.
- ²⁸ Kumarasuriyar, A. 2007. <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/40930-Cell-Proliferation-Reagent-WST-1-From-Roche-Applied-Science/>. Viitattu 17.8.2015.
- ²⁹ NucleoCounter NC-200T Application Flyer. 2012. Chemometec. Viitattu 30.11.2015.
- ³⁰ Pharmatest. 2015. Viitattu 20.10.2015
- ³¹ Fagerlund, K. 19.10.2015. Haastattelu. Viitattu 5.11.2015.
- ³² Fryer, R; Barlett, B; Galustian, C; Dalglish, A. 2011. Mechanisms Underlying Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer and Sensitisation by the iMiD™ Lenalidomide. *Anticancer Research*, Vol. 31, No. 11. <http://ar.iiarjournals.org/content/31/11/3747.long>. Viitattu 3.11.2015.
- ³³ Johnson, C; Fisher, T; Hoang, L; Felding, B; Siuzdak, G; O'Brien, B. 2013. Luciferase does not alter metabolism in cancer cells. Springer Science+Business Media New York. https://masspec.scripps.edu/publications/public_pdf/190_johnson_art.pdf. Viitattu 4.11.2015.

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Lot# 0000147119, Exp. 19.10.2017

D-luciferiini, NaCl, Gold Biotechnology, Cat# LUCNA-1, Lot# 1485.090915A

DMEM, 4500 mg glucose/L, 110 mg sodium puryvate/L, HCl, NaHCO₃, Cat# D6546, Lot# RNBD6804, Exp. 09/2016.

DMSO, C₂H₆OS, Sigma-Aldrich, Cat# D2650, Lot# RNBD4320, Exp. 09/2016.

FBS, Heat inactivated, Sigma, Cat# F9665, Lot# 034M3397. Exp. 10/2018.

FBS, Heat inactivated, USA origin, Sigma, Cat# 2442, Lot# 14A138, Exp. 01/2019.

IMDM, (1X), L-Glutamiini, 25 mM HEPES, Gibco, Cat# 21980-032, Lot# 1644429, Exp. 12/2015.

L-Glutamiini, 200 mM, Sigma, Cat# G7513, Lot# RNBD4952, Exp. 06/2016.

PBS (0,0067 M), ilman kalsiumia ja magnesiumia, Lonza, Cat# BE17-516F, Lot# 5MB053, Exp. 04/2017.

Penisilliini/Streptomysiini (100X), Sigma, Cat# PO781, Lot# SLBJ2495V, Exp. 06/2016.

Trypsiini-EDTA (10X), Sigma, Cat# 59418C, Lot# KNBD5052, Exp. 07/2017.

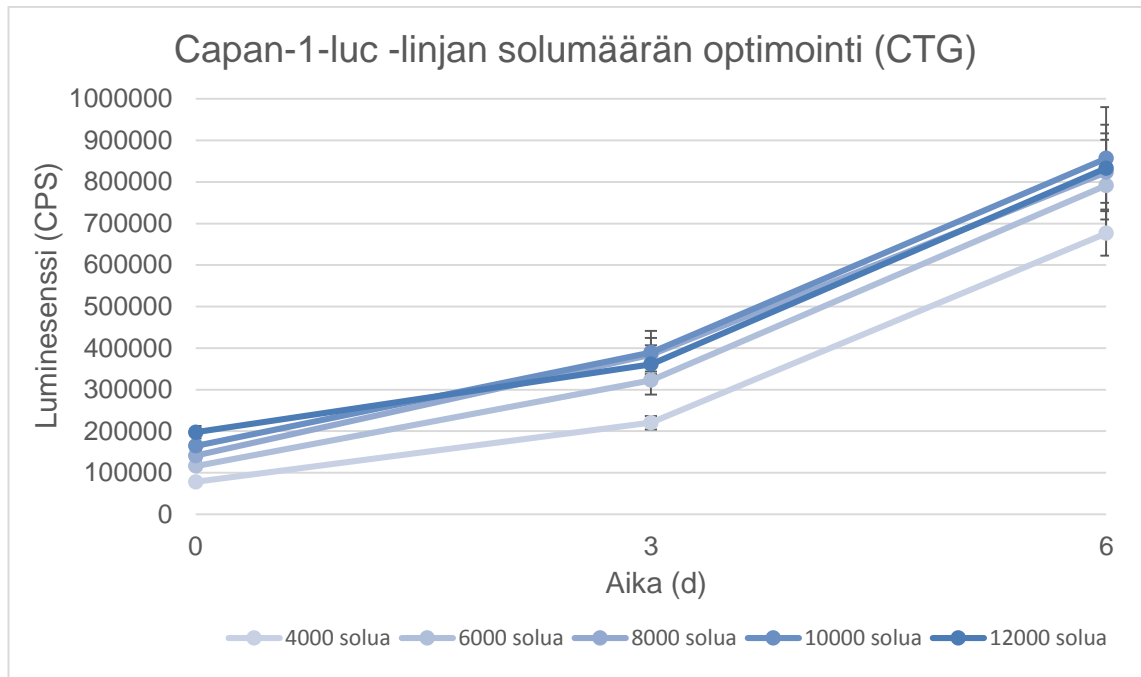
WST-1 Cell Proliferation Reagent, Roche, Lot# 10241600, Exp. 05/2016

Capan-1 -kasvumedium

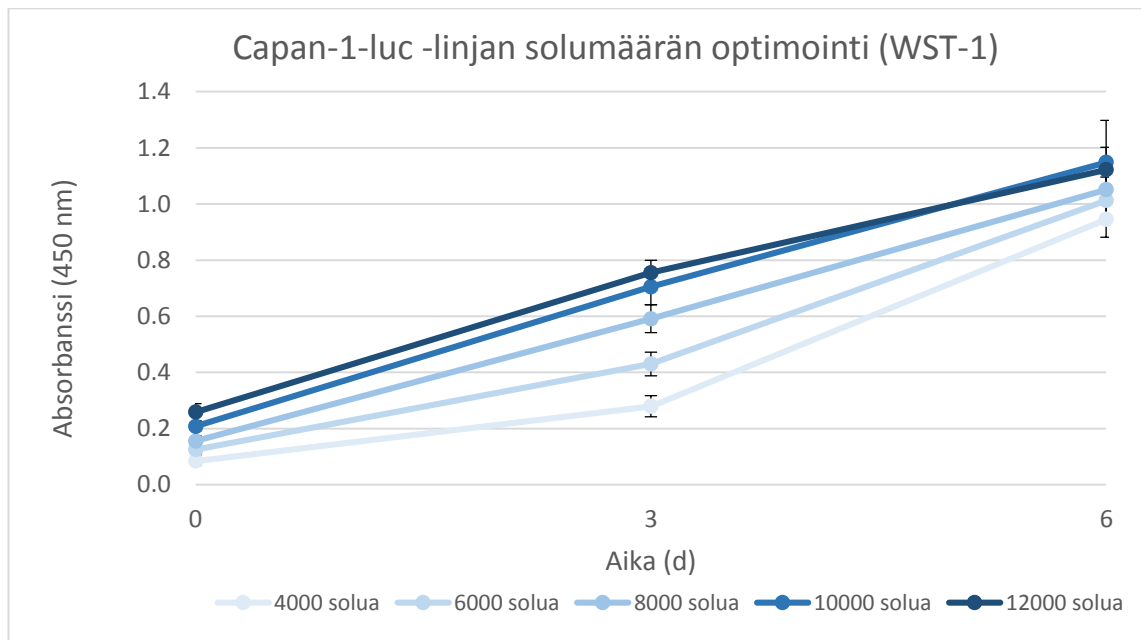
- IMDM
- 20 % FBS
- 1 % antibiootti (penisilliini/streptomysiini)

Panc-1- ja MiaPaca-2 -kasvumedium

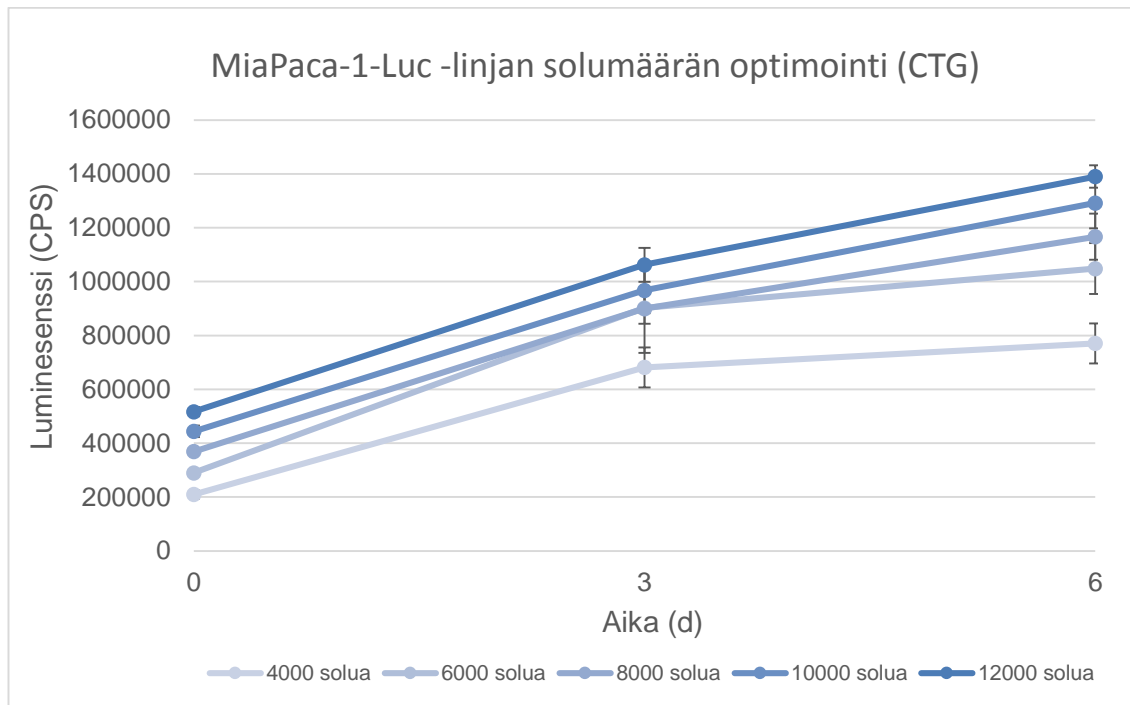
- DMEM
- 10 % FBS
- 1 % antibiootti (penisilliini/streptomysiini)
- 1 % L-glutamiini

Capan-1

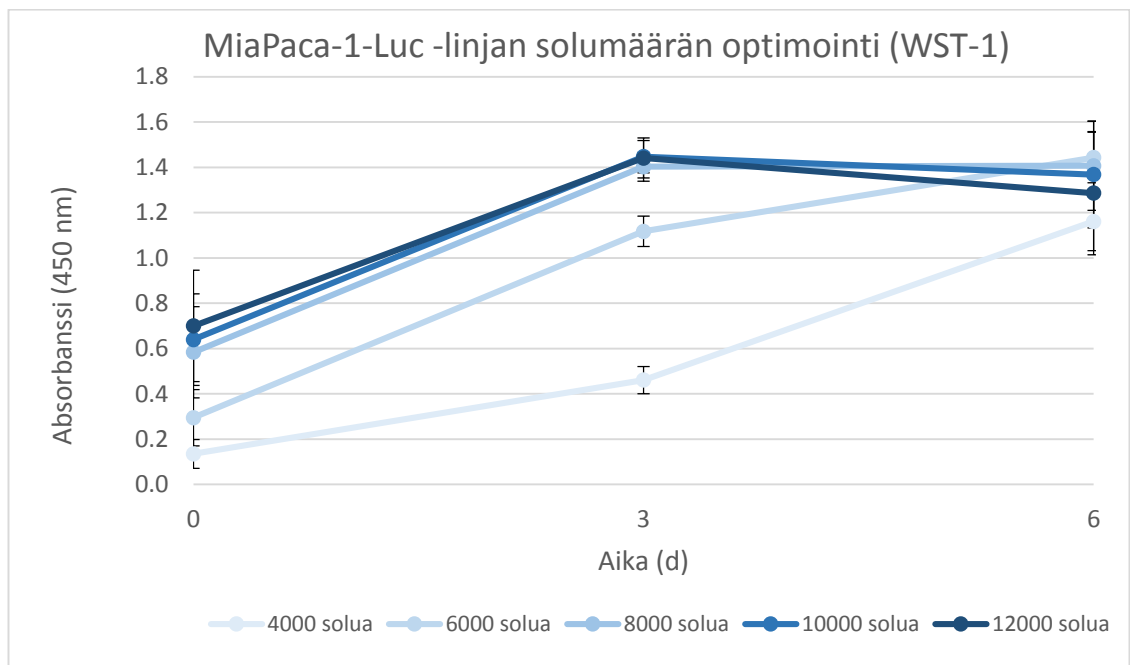
Kuvaaja 15. Capan-1-luc -linjan solumäärän optimointi (CTG).



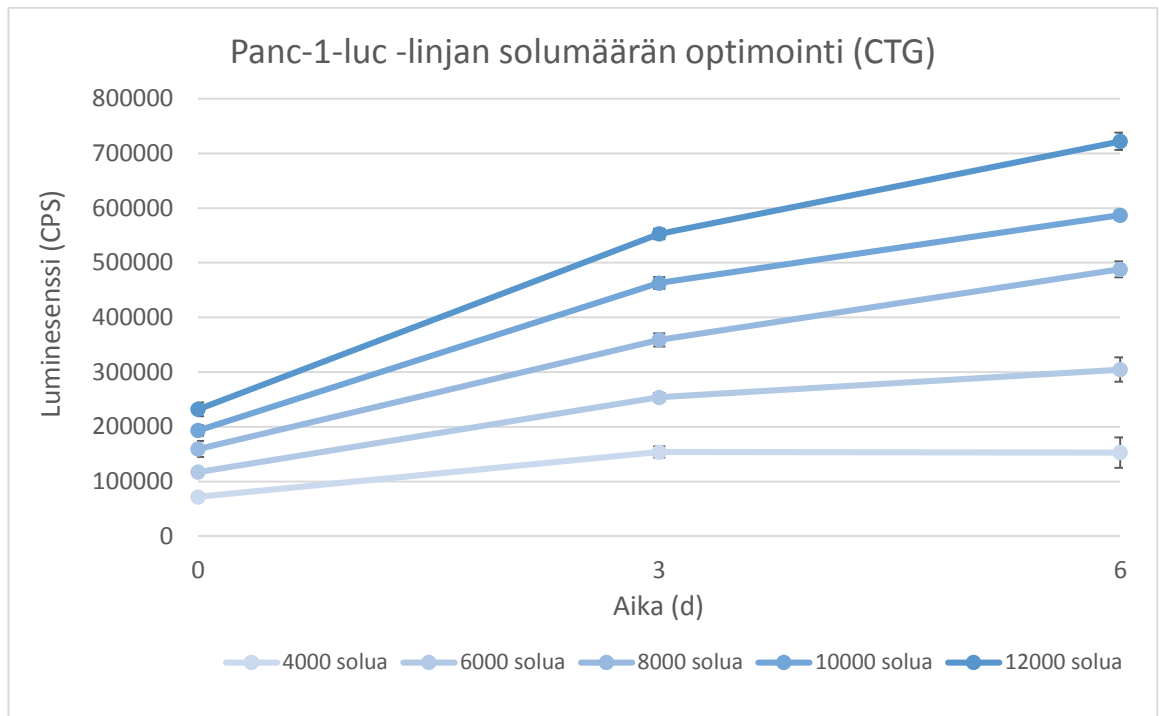
Kuvaaja 16. Capan-1-luc -linjan solumäärän optimointi (WST-1).

MiaPaca-2

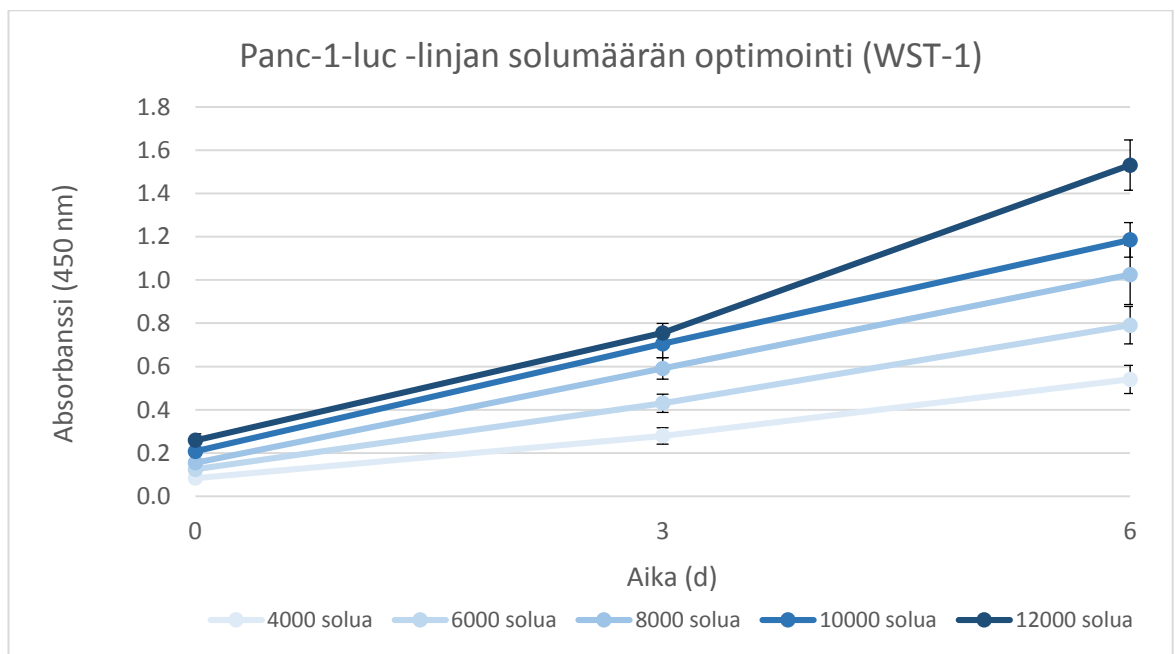
Kuvaaja 17. MiaPaca-2-luc -linjan solumäärän optimointi (CTG).



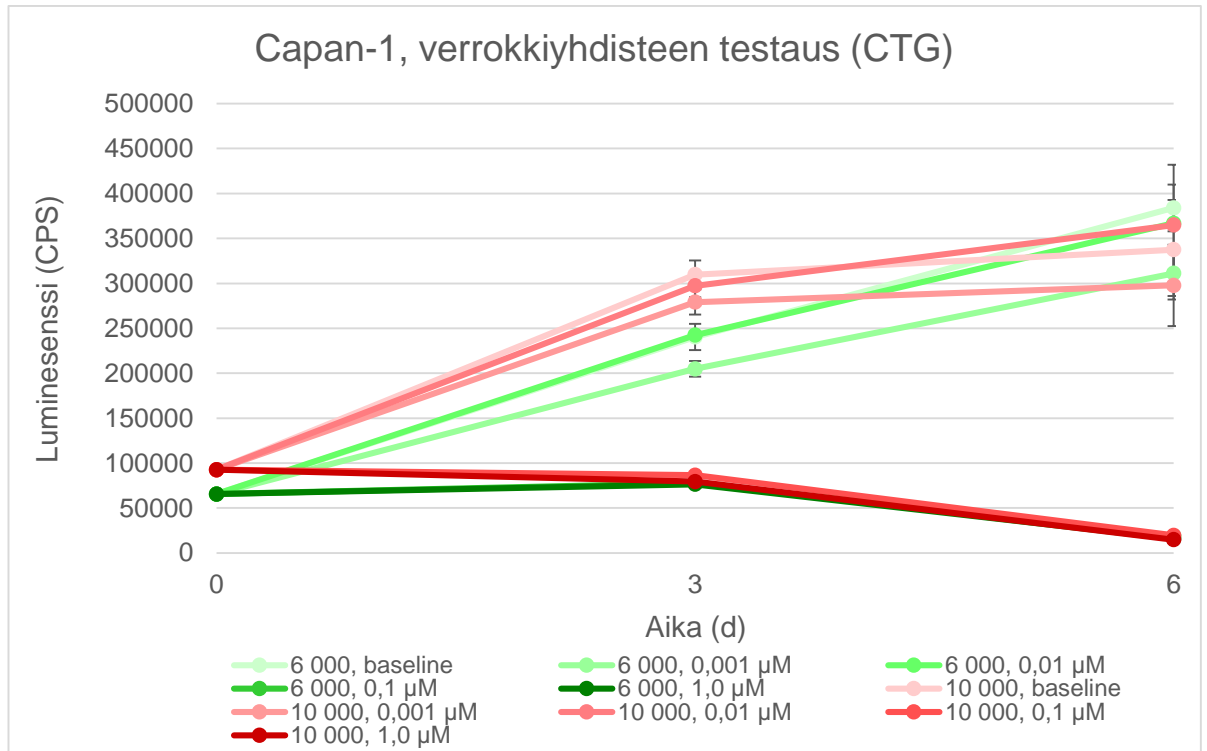
Kuvaaja 18. MiaPaca-2-luc -linjan solumäärän optimointin (WST-1).

Panc-1

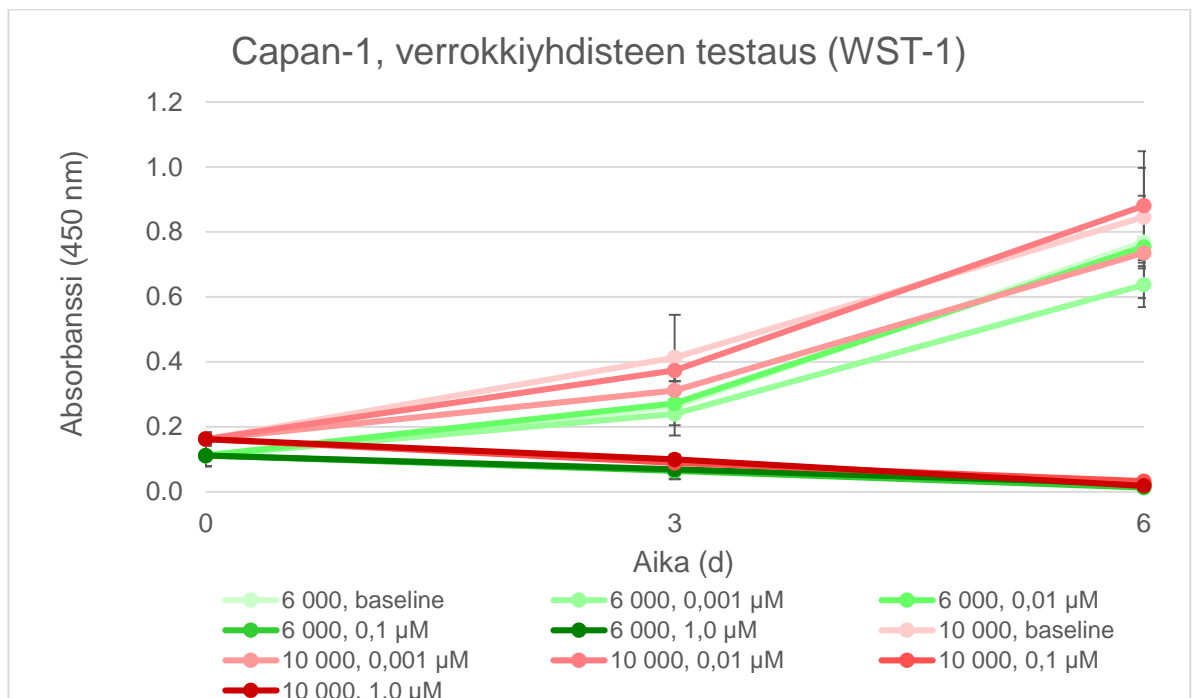
Kuvaaja 19. Panc-1-luc -linjan solumäärän optimointi (CTG).



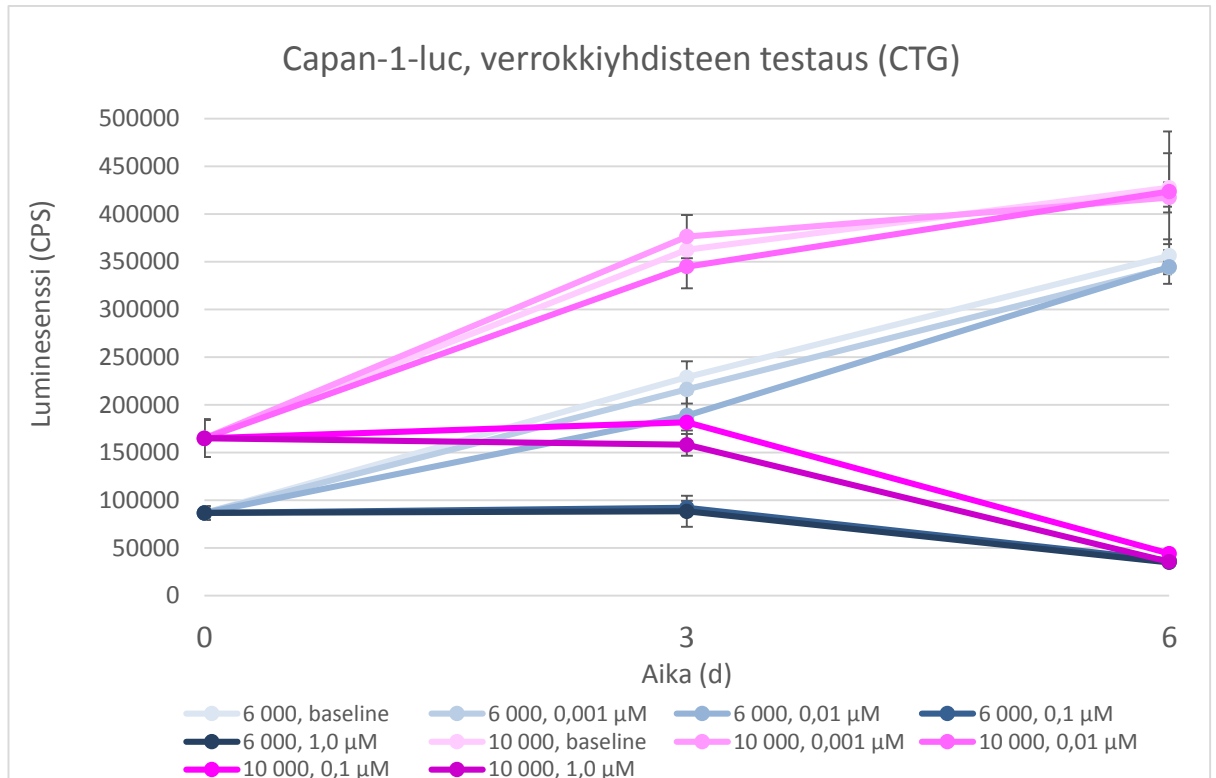
Kuvaaja 20. Panc-1-luc -linjan solumäärän optimointi (WST-1).



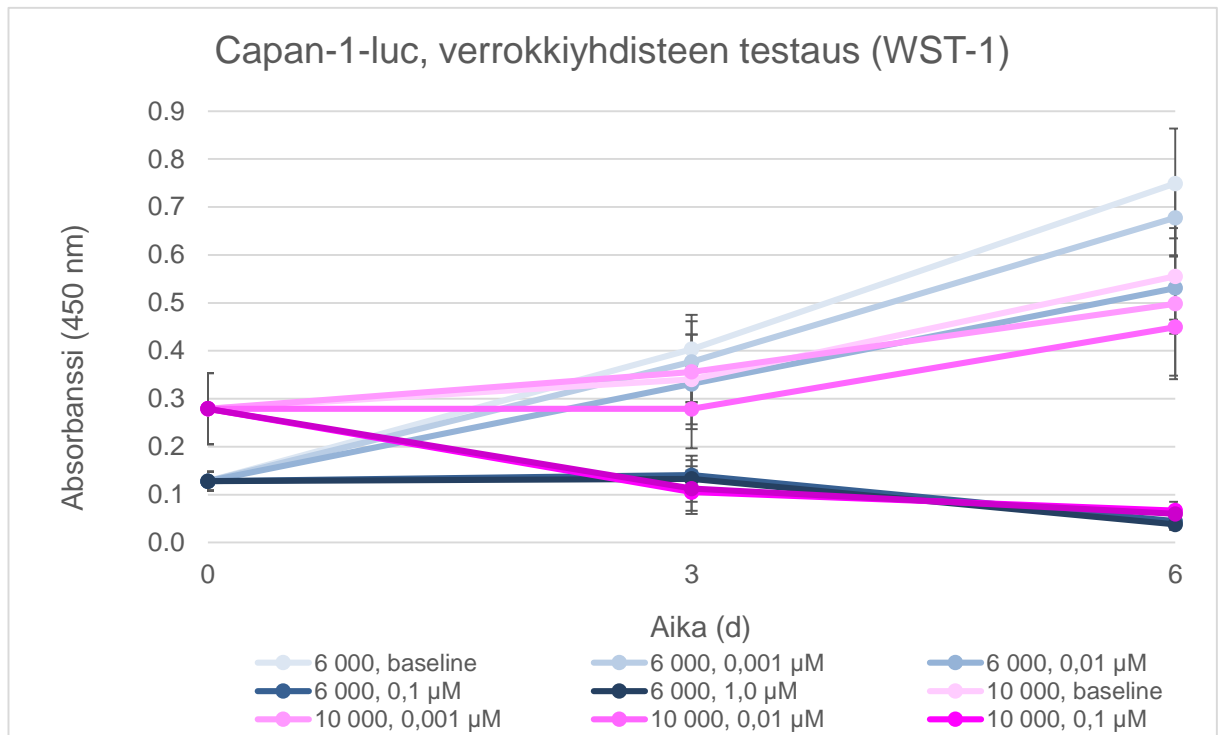
Kuvaaja 21. Verrokkiyhdisteen vaikutus Capan-1 -solulinjaan (CTG).



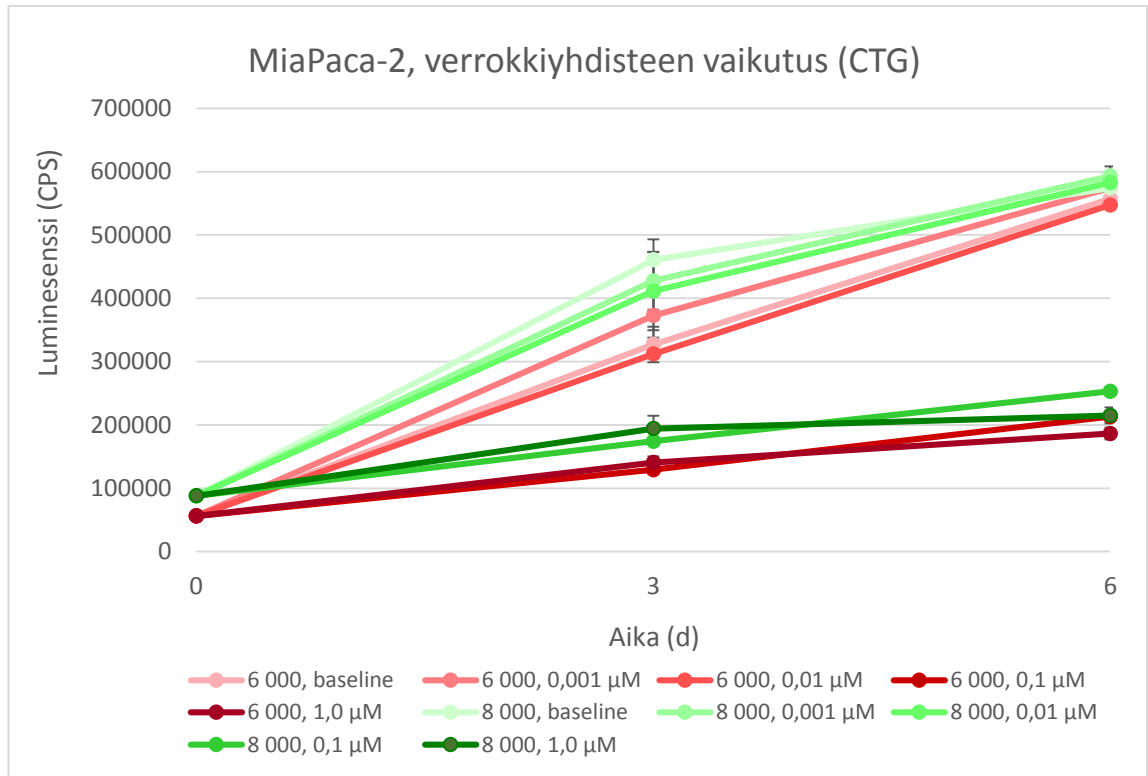
Kuvaaja 22. Verrokkiyhdisteen vaikutus Capan-1 -solulinjaan (WST-1).



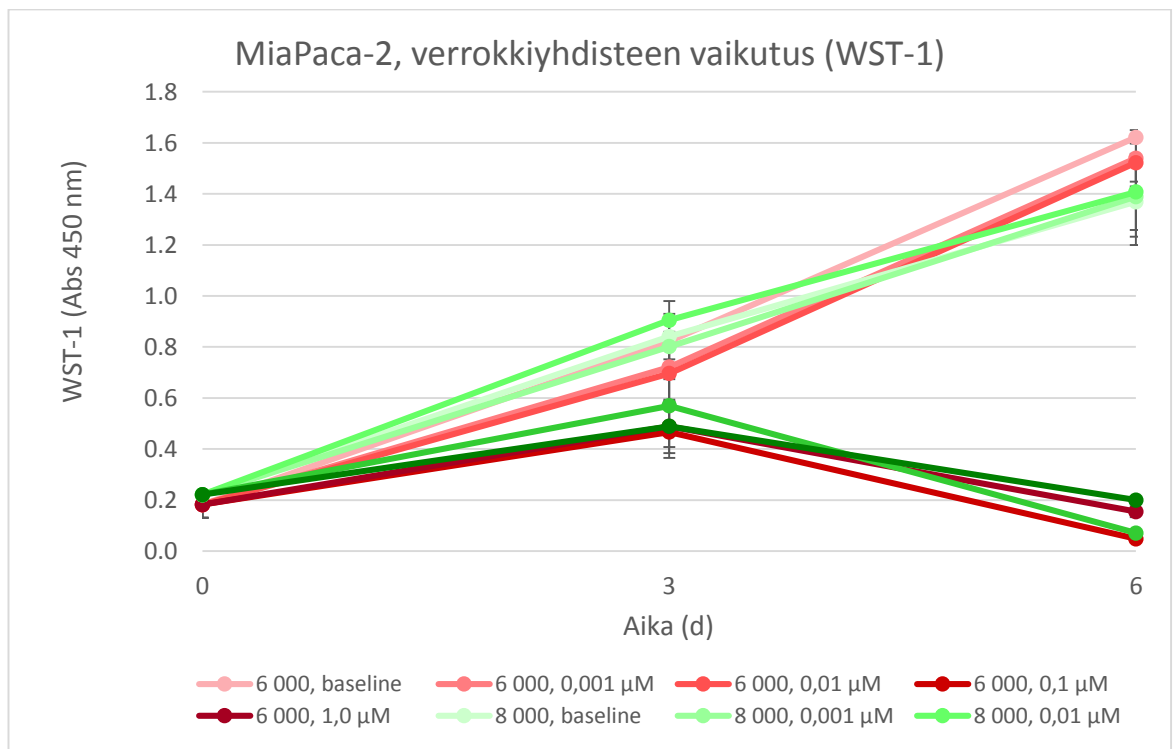
Kuvaaja 23. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1-luc -linjaan (CTG).



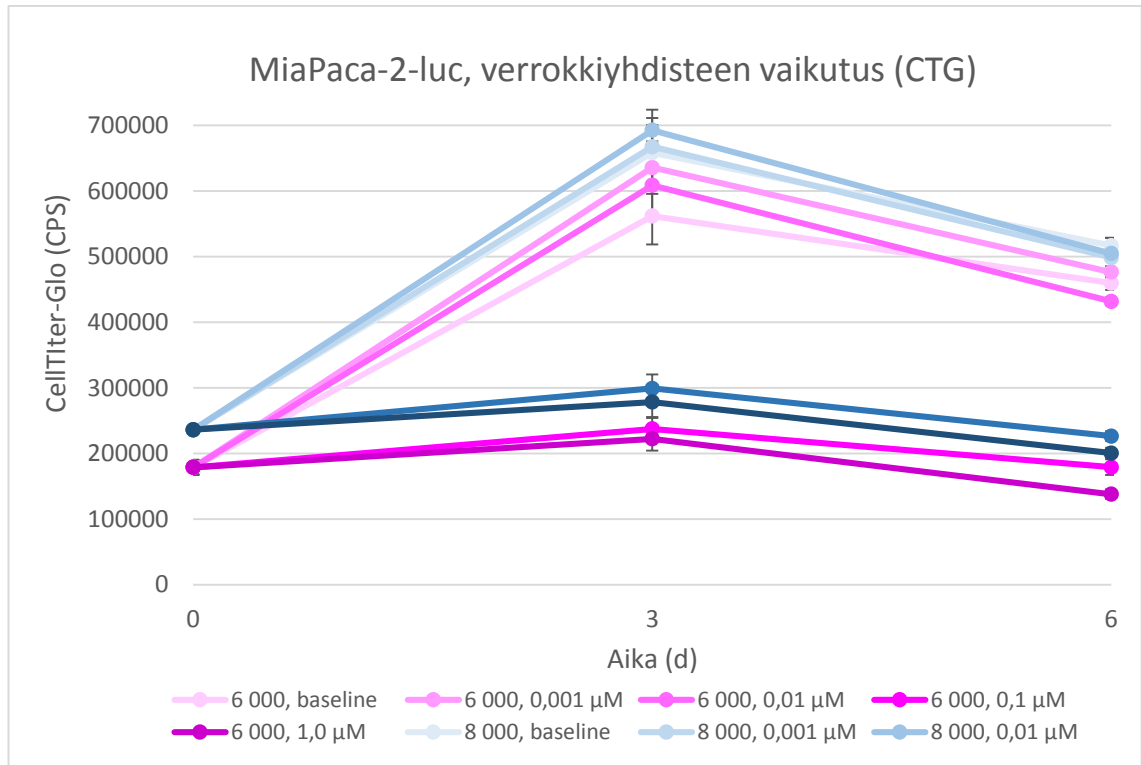
Kuvaaja 24. Gemsitabiinin vaikutus Capan-1-luc -linjaan (WST-1).



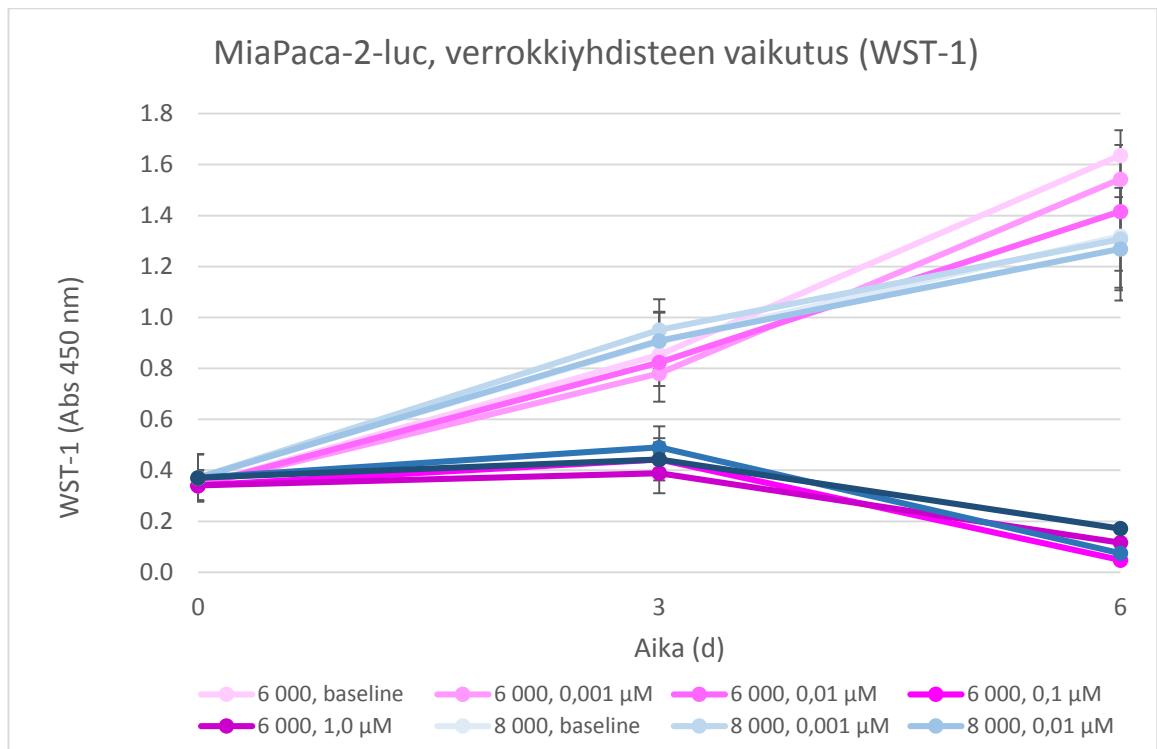
Kuvaaja 25. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2 -linjaan (CTG).



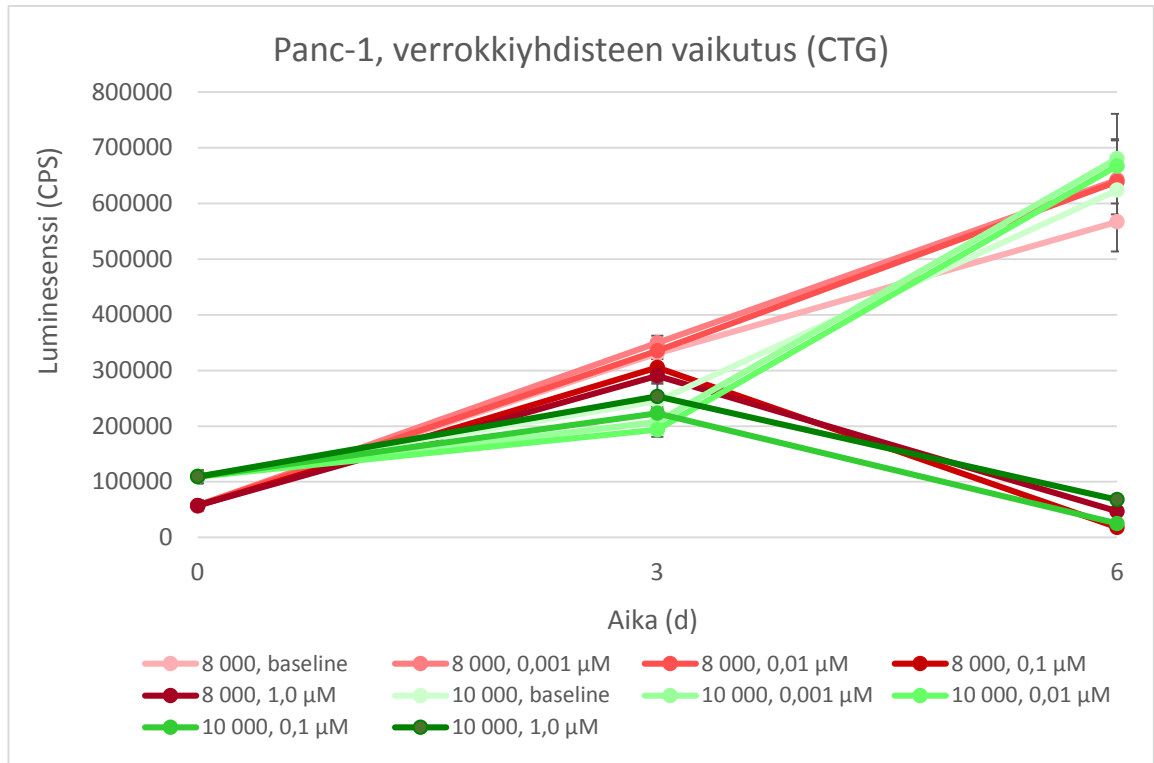
Kuvaaja 26. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2 -linjaan (WST-1).



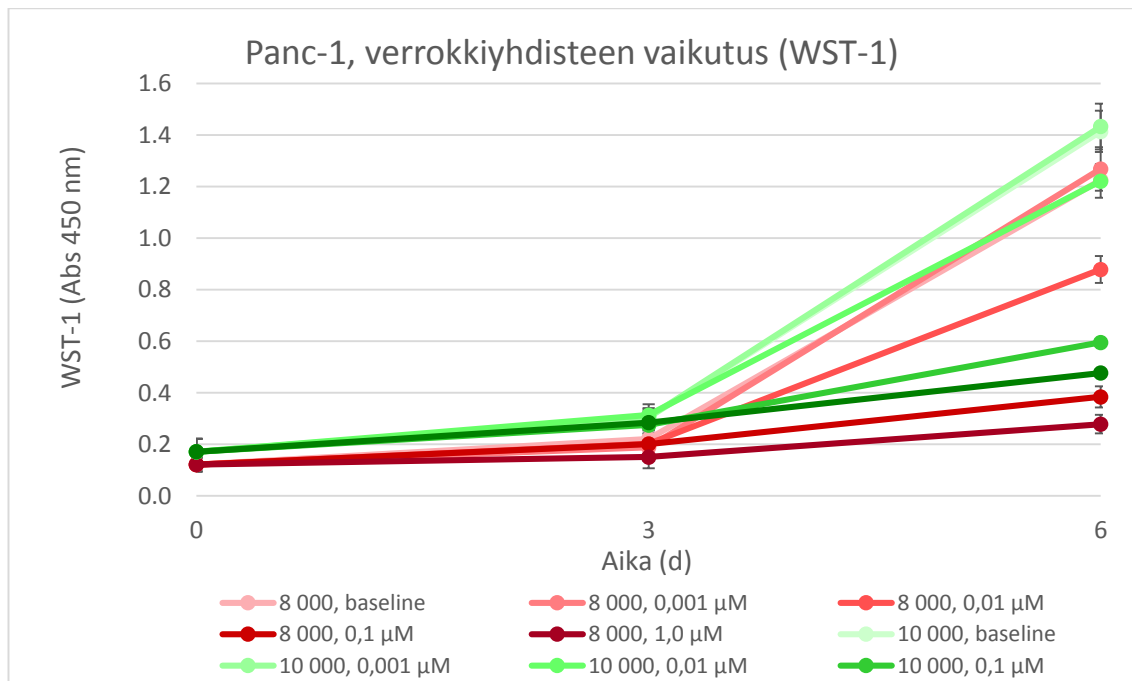
Kuvaaja 27. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2-luc -linjaan (CTG).



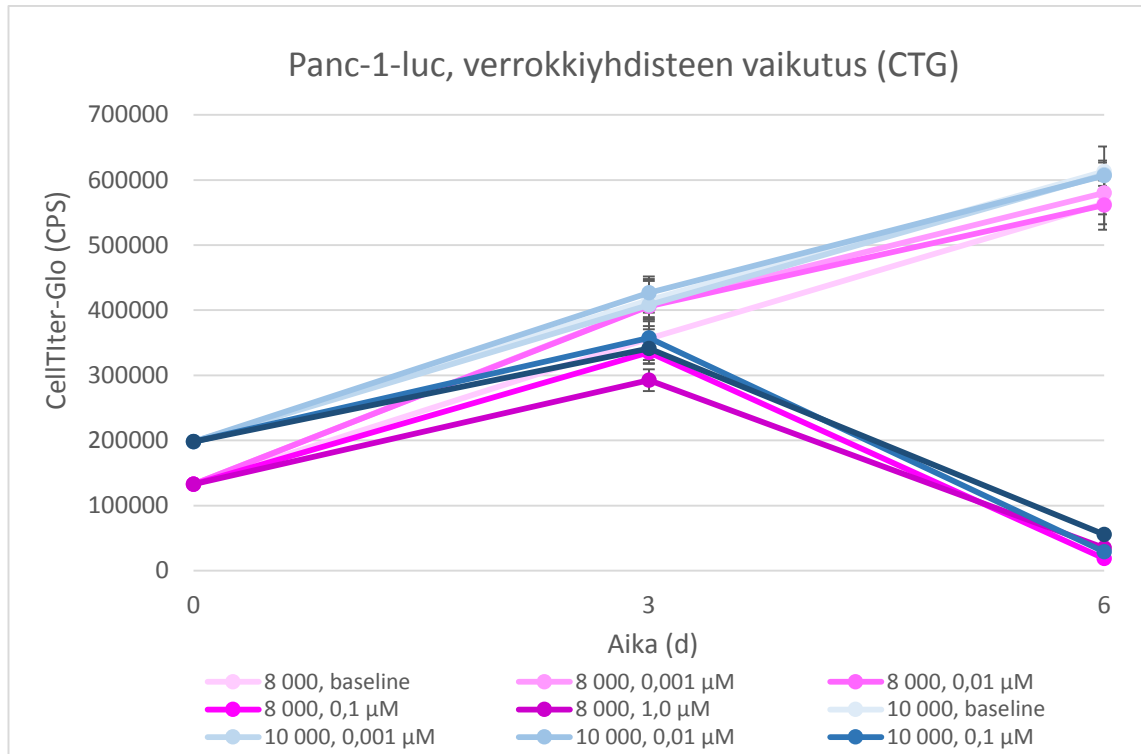
Kuvaaja 28. Verrokkiyhdisteen vaikutus MiaPaca-2-luc -linjaan (WST-1).



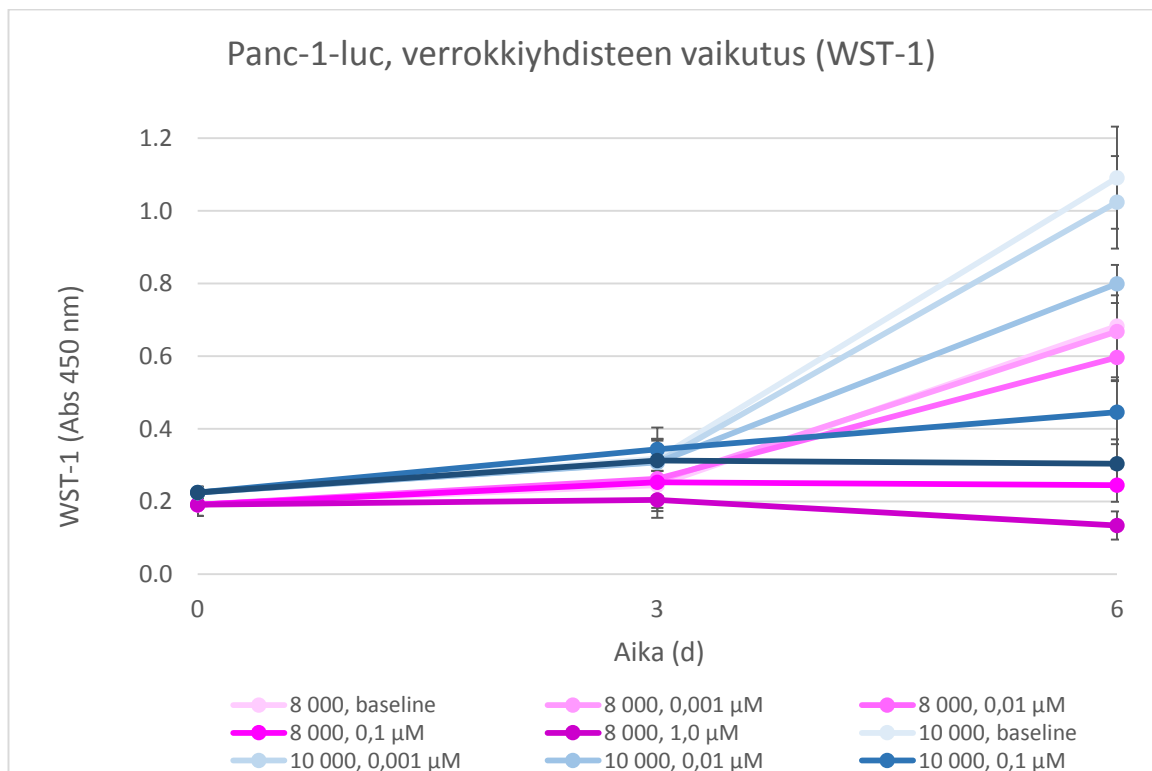
Kuvaaja 29. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1 -linjaan (CTG).



Kuvaaja 30. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1 -linjaan (WST-1).



Kuvaaja 31. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1-luc -linjaan (CTG).



Kuvaaja 32. Verrokkiyhdisteen vaikutus Panc-1-luc -linjaan (WST-1).