

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2012

Jan Vikström

TEHOSEULONTATULOSTEN VALIDOINTI RINTASYÖPÄSOLUISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Jan Vikström

TEHOSEULONTATULOSTEN VALIDOINTI RINTASYÖPÄSOLUISSA

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpätyyppi. Pääkasvain saadaan usein poistettua kokonaan, mutta etäpesäkkeet vaikeuttavat syövän hoitamista levitessään kehossa. Rintasyövässä tyypillisiä etäpesäkkeiden paikkoja ovat keuhkot, luusto, maksa sekä aivot.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli validoida RNA-interferenssi –tehoseulonnan tulokset mahdollisten rintasyövän etäpesäkkeiden muodostamiseen vaikuttavien kohdegeenien tunnistamiseksi.

Etäpesäkkeiden muodostumisessa on tärkeässä asemassa epiteeliomesenkymaalinen muuntuminen (EMT), jossa epiteelisolut muuntuvat mesenkymaalisten solujen kaltaisiksi. Tämä mahdollistaa syöpäsolujen liikkumisen ja etäpesäkkeiden muodostumisen kauas pääkasvaimesta. Epiteeliomesenkymaalisen muuntumisen paljon käytettyinä merkkeinä ovat E-kadheriinin ekspressiotason lasku ja vimentiniin ekspressiotason nousu. Lisäksi on tunnistettu transkriptiotekijöitä, jotka edistävät epiteeliomesenkymaalista muuntumista.

Tehoseulonta, jonka kohteena oli vimentiniin vaikuttavat geenit, oli tehty aiemmin mesenkymaalisessa erittäin metastaattisessa MDA-MB-231(SA)-solulinjassa. Tulosten validoimiseksi kohdegeenejä hiljennettiin RNA-interferenssin avulla MDA-MB-231(SA)-soluissa. Näiden hiljennysten vaikutus E-kadheriinin, vimentiniin, sekä transkriptiotekijöiden Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, sekä Foxc2 mRNA-tasoon tutkittiin qRT-PCR:n avulla.

Tutkimus antaa tietoa rintasyövän etäpesäkkeiden muodostumisen säätelystä. Tulokset osoittivat, että kohdegeenit säätelevät vimentiniin mRNA-ekspressiota, sekä vaikuttavat tunnettujen epiteeliomesenkymaalisen muuntumisen merkkeihin. Opinnäytetyö oli osa laajempaa tutkimusta ja saatujen tulosten kliinisen käytettävyyden arviointiin tarvitaan lisätutkimuksia.

ASIASANAT:

rintasyöpä, etäpesäke, geenien hiljennys, polymeraasiketjureaktio

Jan Vikström

VALIDATION OF HIGH-THROUGHPUT SCREEN RESULTS IN BREAST CANCER CELLS

Breast cancer is the most common cancer among women. Although the primary tumour can usually be completely removed, distant metastases complicate the treatment as the cancer continues to spread in the body. Typical sites of breast cancer metastases are the lungs, bones, liver, and brain.

The aim of this thesis was to validate the results of a high-throughput RNAi screen in order to identify possible target genes affecting breast cancer metastasis.

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) has a key role in cancer metastasis. During EMT epithelial cells become more mesenchymal-like. This phenomenon enables cancer cells to move and metastasize away from the primary tumour. Downregulation of E-cadherin and upregulation of vimentin are widely used markers of EMT. In addition, several transcription factors have been shown to promote epithelial to mesenchymal transition.

A high-throughput screen targeting vimentin regulating genes was previously performed in the highly metastatic mesenchymal MDA-MB-231(SA) cell line. To validate the results, the target genes were silenced by RNA interference in MDA-MB-231(SA) cells. The effects on the mRNA expression of E-cadherin, vimentin and transcription factors Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 and Foxc2 were analysed by qRT-PCR.

This study gives insights to the regulation of breast cancer metastasis. The results showed that the target genes regulate vimentin mRNA expression as well as affect the levels of known EMT markers. This thesis was a part of wider research project and further studies will be needed to estimate the clinical relevance of the present results.

KEYWORDS:

breast cancer, metastasis, gene silencing, polymerase chain reaction

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
2 SYÖPÄ	7
2.1 Yleistä	7
2.2 Syövän kehitys	8
2.2.1 Etäpesäkkeiden synty	9
2.3 Rintasyöpä	10
2.3.1 Rintasyövän diagnosointi	10
3 EPITELIOMESENKYMAALINEN MUUNTUMINEN	12
3.1 E-kadheriini	12
3.2 Vimentini	13
3.3 Transkriptiotekijät	13
4 RNA-INTERFERENSSI	15
5 MENETELMÄT JA MATERIAALIT	17
5.1 Solut	17
5.2 PCR	17
5.2.1 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	19
6 TYÖN SUORITUS	21
6.1 RNA-eristys	23
6.2 qRT-PCR	24
6.2.1 cDNA-synteesi	24
6.2.2 Taqman [®] qRT-PCR	25
7 TULOKSET	27
7.1 E-kadheriini	27
7.2 Vimentini	28
7.3 Snail	29
7.4 Slug	30
7.5 ZEB1	31
7.6 ZEB2	32
7.7 Foxc2	33
8 PÄÄTELMÄT	35
LÄHTEET	37

KUVIOT

Kuvio 1. Epiteeliperäisen syövän synty.	9
Kuvio 2. SiRNA:n aiheuttama RNA-interferenssi.	15
Kuvio 3. PCR:n toimintaperiaate.	18
Kuvio 4. CDH1:n suhteellinen mRNA-ekspressio.	27
Kuvio 5. VIM:n suhteellinen mRNA-ekspressio.	28
Kuvio 6. SNAI1:n suhteellinen mRNA-ekspressio.	29
Kuvio 7. SNAI2:n suhteellinen mRNA-ekspressio.	30
Kuvio 8. ZEB1:n suhteellinen mRNA-ekspressio.	31
Kuvio 9. ZEB2:n suhteellinen mRNA-ekspressio.	32
Kuvio 10. FOXC2:n suhteellinen mRNA-ekspressio.	33

TAULUKOT

Taulukko 1. Näytetaulukko.	20
Taulukko 2. Reaktioseos käänteistranskriptiolle.	25
Taulukko 3. PCR-ohjelma.	25
Taulukko 4. Reaktioseos qRT-PCR:lle.	25

SANASTO

cDNA	Komplementaarinen DNA, engl. complementary DNA, mRNA:sta käänteistranskriptiolla tehty DNA-jakso
Ekspressio	Ilmentyminen
EMT	Epiteliomesenkymaalinen muuntuminen, engl. epithelial to mesenchymal transition
MDA-MB-231(SA)	Luustoon etäpesäkkeitä muodostava rintasyöpäsolulinja
Metastaasi	Etäpesäke
mRNA	Lähettilä-RNA, engl. messenger RNA, välittää tiedon tuotettavista proteiineista ribosomeille
qRT-PCR	Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR, engl. quantitative real-time PCR
RNAasi	RNA:ta pilkkova entsyymi
Transkriptio	RNA:n muodostuminen DNA:sta

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turussa VTT:n lääketieteellisen biotekniikan yksikössä dosentti Kristiina Iljinin johtamassa syövän systeemibiologiaa tutkivassa tutkimusryhmässä. Se oli osa laajempaa tutkimusta, jonka tarkoitus on tutkia rintasyöpäsoluissa tapahtuvia muutoksia etäpesäkkeiden muodostumisen yhteydessä. Tutkimuksen myötä saadaan tietoa etäpesäkkeiden synnystä ja saatetaan löytää uusia kohdegeenejä rintasyövän hoitoon. Opinnäytetyön tarkoitus oli validoida tehoseulonnan avulla löydettyjen geenien toimintaa *in vitro*.

Rintasyöpää hoidetaan ensisijaisesti leikkaushoidolla ja etäpesäkkeet tekevät hoitamisesta haastavaa levitessään ympäri kehoa. Nykyisten tutkimustulosten mukaan etäpesäkkeiden muodostumisessa tärkeä rooli on epitelimesenkymaalisisella muuntumisella, jossa syöpäsolu muuntuu epiteelisolusta mesenkymaalisen solun kaltaiseksi. Tämä prosessi mahdollistaa solujen irtoamisen primäärikasvaimesta, niiden leviämisen kehoon verenkierron mukana ja lopulta etäpesäkkeiden muodostuksen. Muuntuminen voidaan havaita muun muassa tiettyjen solun tukirangan proteiinien ilmentymisessä tapahtuvista muutoksista. On olemassa myös tunnettuja transkriptiotekijöitä, jotka vaikuttavat epitelimesenkymaalisen muuntumisen syntyyn. (Alberts ym., 2002; Rintasyöpä; Voulgari & Pintzas, 2009)

Tässä tutkimuksessa oli aikaisemmin tehoseulonnan avulla tunnistettu epitelimesenkymaalisisella muuntumisessa tärkeiden proteiinien ilmentymistä mahdollisesti sääteleviä geenejä. Rintasyöpäsoluista hiljennettiin näitä kohdegeenejä RNA-interferenssin avulla ja hiljentämisen vaikutus erään tukirangan proteiinin, vimentiniin, tuottoon ja epitelimesenkymaaliseen muuntumiseen vaikuttaviin transkriptiotekijöihin varmennettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella polymeraasiketjureaktiolla.

2 SYÖPÄ

2.1 Yleistä

Tavallisesti monisoluisessa organismissa, kuten ihmisessä, solut toimivat hallitusti yhteistyössä. Soluja ohjaavat signaalit saavat ne lepäämään, jakaantumaan, erilaistumaan ja jopa kuolemaan, riippuen siitä mikä on organismille parasta. Joka päivä miljardeittain soluja mutatoituu, jonka seurauksena yksittäinen solu voi pystyä jakaantumaan kiivaammin kuin muut ympäristön solut ja johtaa syövän syntyyn. (Alberts ym., 2002)

Eri syövillä on erilaisia ominaisuuksia, joiden eri yhdistelmiä esiintyy tyypistä riippumatta kaikilla syövillä. Syöpäsolun jakaantuminen ei ole rajoitettua, kuten normaaleilla soluilla, joilla jakaantuminen loppuu, kun tietty määrä jakaantumiskertoja on tullut täyteen eli kun solu vanhenee. Jakaantumiskertojen määrä riippuu solutyypistä. Syöpäsolut taas pystyvät jakaantumaan loputtomasti välittämättä ohjaavista signaaleista sekä välttämään apoptoosia ja erilaistumista. Ne ovat geneettisesti epästabiileja, jolloin mutatoituminen tehostuu. Eri syövillä tapahtuu erilaisia muutoksia genomia suojaavissa geeneissä. Tyypillistä syöpäsoluille on myös invasiivisuus eli kyky hyökätä ja levitä ympäröivään kudokseen. Lisäksi ne pystyvät selviytymään ja kasvamaan kaukana pääkasvaimesta muodostaen etäpesäkkeitä eli metastaaseja. (Alberts ym., 2002)

Syövän vaarallisuus perustuu pohjimmiltaan kahden tekijän yhteisvaikutukseen; syöpäsolujen jakaantumisen rajoittamattomuuteen sekä niiden invasiivisuuteen. Epänormaali solu, joka ei pysty jakautumaan ympäristöönsä nopeammin, ei tee huomattavaa vahinkoa huolimatta solun muista ominaisuuksista. Jos jakaantuminen ei ole rajoitettua, voi sen tuloksena syntyä kasvain. (Alberts ym., 2002)

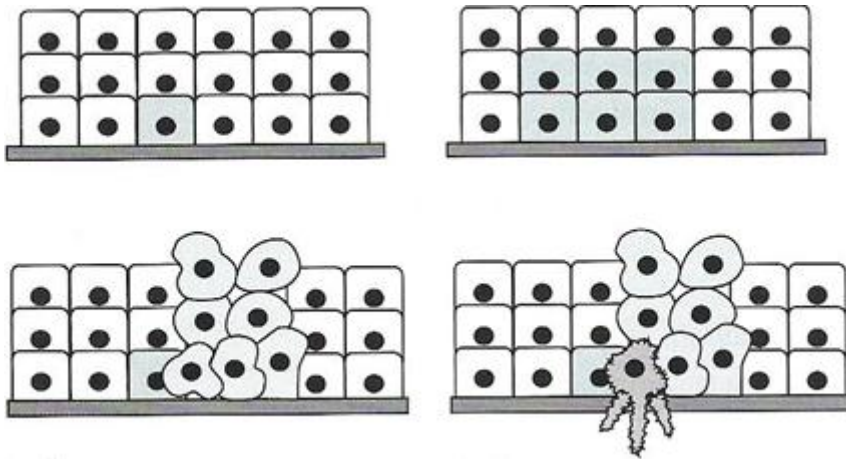
Kasvain on hyvänlaatuinen, jos sen solut ovat liittyneenä yhdeksi massaksi. Usein potilas paranee täydellisesti, kun tällainen kasvain poistetaan kirurgisesti. Kasvainta kutsutaan syöväksi vain silloin, kun se on pahanlaatuinen ja kasvaimen solut pystyvät tunkeutumaan ympäröivään kudokseen. Tähän liittyy kyky irtautua, tunkeutua verenkiertoon tai imusuonistoon, sekä muodostaa etäpesäkkeitä. (Alberts ym., 2002)

Syövät luokitellaan niiden alkuperän mukaan riippuen kudoksesta ja solutyypistä. Epiteelisoluista lähtöisin olevat syövät ovat karsinomia, kun taas sidekudos- tai lihassoluista peräisin olevia kasvaimia kutsutaan sarkoomiksi. Näihin laajoihin kategorioihin sisällyttömiin syöpiin kuuluvat leukemiat eli veri- ja hermosoluista alkunsa saaneet syövät. (Alberts ym., 2002)

2.2 Syövän kehitys

Solujen mutaatiota tapahtuu ihmiskehossa koko elämän ajan ja tästä näkökulmasta katsoen voisikin olettaa, että syövän kehittyminen olisi enemmänkin sääntö kuin poikkeus. Normaalit solut eivät kuitenkaan muutu syöpäsoluiksi yhdellä kertaa, vaan se vaatii monia toisistaan riippumattomia muutoksia, esimerkiksi mutaatiota vaaditaan useissa geeneissä usean jakaantumisen myötä ennen solun kehittymistä syöpäsoluksi. (Alberts ym., 2002)

Solunjakaantumisten ja edelleen uusien mutaatioiden myötä mutaatiot kumuloituvat niin, että lopulta kaikkein tehokkaimmin jakaantuvat solut ovat määrävässä asemassa kasvaimessa. Yksi hyvänlaatuisen kasvaimen soluista voi muuntua pahanlaatuiseksi ja muodostaa alun syöväälle. Epiteeliperäisen syövän syntyä on havainnollistettu kuviossa 1. (Alberts ym., 2002)



Kuvio 1. Epiteeliperäisen syövän synty. (Muokattu Heino & Vuento, 2007 s. 316)

2.2.1 Etäpesäkkeiden synty

Etäpesäkkeet tekevät syövästä haastavan hoidettavan ja usein tappavan. Etäpesäkkeiden muodostus on syövän ominaisuuksista pelätyin ja vähiten tunnettu moniosainen prosessi. Levitäkseen syöpäsolujen on pystyttävä irtoamaan kasvaimesta, tunkeuduttava ympäröiviin kudoksiin ja veri- tai imusuonistoon, sekä muodostettava uusia (etä)pesäkkeitä. Kaikki nämä tapahtumat ovat itsessään hyvin monimutkaisia. (Alberts ym., 2002; Eger & Mikulits, 2005)

Normaalisti epiteelikudoksen solut ovat vahvasti kiinnittyneinä toisiinsa. Aluksi syöpäsolun on irrottauduttava kasvaimesta ja siirryttävä ympäröivään kudokseen. Kyetäkseen tähän, on solujen adheesiomekanismeissa oltava häiriöitä. Nämä mekanismit pitävät normaalit solut kiinnittyneinä toisiinsa. Yksi adheesiomekanismien muutos on epiteeliomesenkymaalinen muuntuminen. Vain harva syöpä kykenee leviämään ja kehittämään metastaaseja. Pieni osa pahanlaatuisista soluista onnistuu pääsemään verisuonistoon ja näistä vielä pienempi osa selviytyy muodostamaan metastaaseja. (Alberts ym., 2002; Voulgari & Pintzas, 2009)

2.3 Rintasyöpä

Rintasyöpä on yleisin syöpätyyppi naisilla. Vuosittain rintasyöpä diagnosoidaan yli 4000 suomalaisnaisella, pääasiassa yli 45-vuotiailla. Se on harvinaisempi miehillä, mutta joka vuosi myös noin kymmenellä suomalaismiehellä todetaan rintasyöpä. (Rintasyöpä)

Tavallisesti pahanlaatuisen kasvaimen kehittyminen kestää useita vuosia. Rinnasta syöpä voi leviätä muihin kudoksiin etäpesäkkeiksi veri- tai imusuonistoa pitkin useimmiten keuhkoihin, maksaan, luustoon ja aivoihin. Rintasyövän käytetyin hoitomuoto on leikkaus ja etäpesäkkeet vaikeuttavat huomattavasti hoitoa. (Rintasyöpä)

Rinta koostuu suurimmaksi osaksi rasvakudoksesta, rintarauhasista ja rintatiehyistä. Rintatiehyiden tehtävänä on yhdistää rintarauhaset, joiden tuottama maito kulkee nänniin tiehyitä pitkin. Näiden lisäksi rinnassa on imusuonia, jotka kuljettavat imunestettä imusolmukkeisiin. Imusolmukkeet taas muodostavat ryppäitä, joita lähellä rintaa on esimerkiksi soliskuopassa. Rintasyövästä voidaan erottaa kaksi yleisintä tyyppiä syöpäsolujen kehittymispaikan perusteella; duktaalinen ja lobulaarinen. (Rintasyöpä)

Tiehytperäinen eli duktaalinen rintasyöpä saa alkunsa rintatiehyissä. Duktaalinen rintasyöpä on yleisin rintasyövän tyyppi (noin 70 prosenttia tapauksista) ja siinä syöpä kehittyy rintatiehyessä, josta syöpäsolut leviävät tiehyttä ympäröivään kudokseen. Lobulaarinen rintasyöpä on rauhasperäinen ja se esiintyy duktaalista syöpää useammin molemmissa rinnoissa. (Rintasyöpä)

2.3.1 Rintasyövän diagnosointi

Rintasyövän toteamisessa tärkeimmässä roolissa ovat mammografiat eli rintojen röntgentutkimukset, joiden avulla myös arvioidaan ja seurataan rintasyöpää. Yleensä röntgentutkimuksessa molemmat rinnat kuvataan kahdesta kulmasta ja lääkäri etsii kuvista mahdolliset kasvaimet ja muut muutokset kudoksissa. (Rintasyöpä)

Mammografiakuvista tehty alustava rintasyövän diagnoosi varmistetaan neulabiopsian avulla. Neulabiopsiassa epäillyltä syöpäalueelta otetaan neulalla kudoksenäyte, jonka sisältämiä soluja mikroskopoimalla patologi vahvistaa syöpädiagnoosin. (Rintasyöpä)

Myös rintasyövän tyyppi ja erilaistumisaste eli gradus määritetään koepalasta. Erilaistumisasteella eli graduksella verrataan kasvaimen ja normaalin kudoksen eroavaisuuksia. Gradus jaetaan luokkiin I-III, joista gradus I on lähimpänä normaalia kudosta ja sen ennuste on yleensä paras. Mammografian ja neulabiopsian lisäksi voidaan tehdä vielä ultraäänitutkimuksia, jolloin saadaan parempi kuva kasvaimen luonteesta. (Rintasyöpä)

3 EPITELIOMESENKYMAALINEN MUUNTUMINEN

Epiteliomesenkymaalisella muuntumisella (EMT, engl. epithelial-mesenchymal transition) tarkoitetaan epiteelisolujen muuntumista mesenkymaalisten solujen kaltaisiksi. EMT:llä ja sen käänteisilmiöllä (MET) on tärkeä rooli sikiönkehityksessä. Sillä on myös todettu olevan vaikutusta syövän leviämiseen ja metastaasien muodostumiseen. (Voulgari & Pintzas, 2009)

Epiteelikudoksen solut ovat tiiviisti kiinni toisissaan keratiinien ja erityisten solukalvoja toisiinsa liittävien sidosten seurauksena. Epiteelisolut kasvavat ankkuroituneena eli niiden liike väliaineessa on vähäistä, mistä johtuen ne eivät ole invasiivisia. (Voulgari & Pintzas, 2009)

Mesenkymaalisilla soluilla taas on liikkumiseen vaadittavia ominaisuuksia. Solu-soluvuorovaikutus on vähäistä, kun taas solujen ja soluväliaineen välillä on liikkumista edistävä vuorovaikutus. Mesenkymaalisilla soluilla on suuri potentiaali tunkeutua ympäröivään kudokseen. (Voulgari & Pintzas, 2009)

Molemmilla solutyypeillä on tyypillisesti ilmentyviä proteiineja, joita ovat esimerkiksi E-kadheriini (epiteliaaliset solut) ja vimentini (mesenkymaaliset solut). Näiden lisäksi on tunnistettu epiteliomesenkymaalisen muuntumisen syntyyn vaikuttavia transkriptiotekijöitä, kuten Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, ja Foxc2. (Voulgari & Pintzas, 2009)

3.1 E-kadheriini

Kadheriinit ovat joukko proteiineja, jotka toimivat välittäjänä solu-soluadheesiossa selkärankaisten kudoksissa. E-kadheriini ilmentyy erityisesti erityyppisissä epiteelisoluissa ja sen päätehtävänä on auttaa liittämään solujen aktiinitukirangot toisiinsa. (Alberts ym., 2002)

E-kadheriinin puuttumisen on todettu monissa ihmisen syövissä yhdistyvän huonoon ennusteeseen. Kasvainten muodostuminen ja metastaasien synty on yhteydessä sen vähäiseen ilmentymiseen. (Voulgari & Pintzas, 2009)

3.2 Vimentiini

Vimentiini kuuluu välikokoisiin säikeisiin (engl. intermediate filaments eli IF), jotka ovat ryhmä solun tukirangan proteiineja. Niiden tehtävä on tukea solujen rakennetta ja lisätä solujen kestävyttä. Vimentiini ilmentyy erityisesti mesenkymaalisissa soluissa, joissa se muodostaa solua tukevia säikeitä. Vimentiinin on todettu olevan tärkeä tekijä myös solun liikkumiselle. (Heino & Vuento 2007; Ivaska, 2011)

Vimentiinin on todettu ekspressoituvan invasiivisissa ihmisen karsinomasolulinjoissa. Rintasyövän kohdalla sen korkea ekspressio on verrannollinen huonon selviytymisennusteen kanssa. (McInroy & Määttä, 2007)

3.3 Transkriptiotekijät

Transkriptiotekijät osallistuvat geenien toiminnan (transkription) säätelyyn mutkikkaiden mekanismien avulla, joita ei vielä täysin tunneta (Suominen ym., 2010). Useiden transkriptiotekijöiden on havaittu vaikuttavan epителиomesenkymaalisen muuntumisen syntyyn.

Snail ja Slug ovat tunnettuja E-kadheriinin repressoreja eli niiden ilmentyminen heikentää E-kadheriinin ekspressiota. Lisäksi ne ovat tärkeitä epителиomesenkymaalisen muuntumisen indusoijia eli aiheuttajia. Niiden ilmentyminen on merkki syövän aggressiivisuudesta, esimerkiksi duktaalissa rintasyövässä Snail- ja Slug-ekspressio viittaa etäpesäkkeisiin. (Micalizzi ym., 2010)

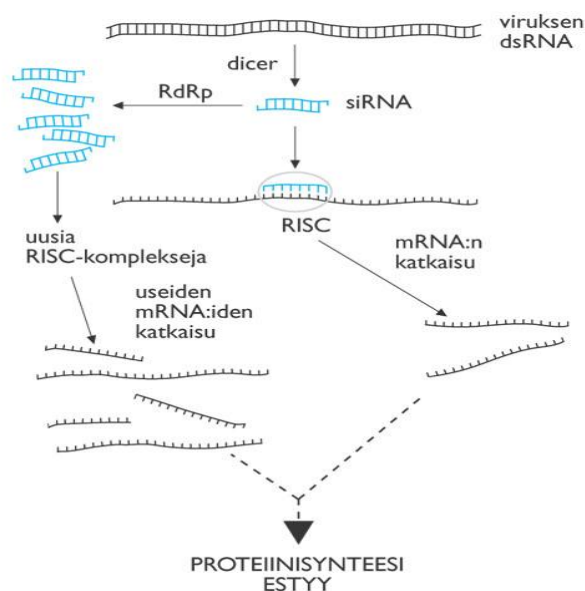
ZEB1:n on todettu edistävän metastaasien syntyä rintasyövässä. ZEB2:n on todettu ilmentyvän voimakkaasti monissa E-kadheriininegatiivisissa ihmisen karsinomasolulinjoissa. Molemmat geenit repressoivat E-kadheriinia ja aiheuttavat syövän invasiivisuutta. (Takeyama ym., 2010; Comijn ym., 2001)

Foxc2 ilmentyy erityisesti metastaattisissa syöpäsoluissa. Sen on todettu aktivoivan EMT:tä ja metastaasien syntyä rintasyövässä. Se ei kuitenkaan vaikuta E-kadheriinin tuottoon mRNA-tasolla, vaan ohjailee syntyvää E-kadheriinia. (Mani ym., 2007)

4 RNA-INTERFERENSSI

RNA-interferenssi eli RNAi (engl. RNA interference) on evoluution tuloksena eukaryooteille syntynyt geenien toimintaa säätelevä puolustusmekanismi.

Se suojaa solua viruksilta ja lisäksi solu voi säädellä sillä omien geeniensä toimintaa. Esimerkiksi kaksinauhaisilta RNA-viruksilta (dsRNA-virus, engl. double stranded RNA virus) suojautuessaan solu pilkkoo viruksesta peräisin olevan kaksinauhaisen RNA:n dicer-entsyymillä siRNA:ksi (engl. small interfering RNA), joka on useimmiten 21 nukleotidiparin mittainen. Näillä kaksijuosteisilla RNA pätkillä on kahden nukleotidin pituiset yksinauhaiset päät 3'-päissä. Se sitoutuu toisella nauhallaan moniosaiseen RISC-kompleksiin (engl. RNA-induced silencing complex), joka pilkkoo siRNA:n sen osana olevalla entsyymillä. Tämä siRNA-RISC-kompleksi sitoutuu spesifisesti mRNA-nauhaan ja katkaisee sen. Tällöin se estää mRNA:n translaation. Solut pystyvät myös tuottamaan lisää siRNA:ta käyttäen apuna RNA-ohjauksista RNA-polymeraasia (RdRp, engl. RNA-directed RNA polymerase). Kuviossa 2 on havainnollistettu siRNA:n aiheuttaman RNA-interferenssin periaate. (Suominen ym. 2010; Lee & Kumar, 2009)



Kuvio 2. SiRNA:n aiheuttama RNA-interferenssi. (Suominen ym., 2010 s. 37)

RNA-interferenssi voidaan saada aikaan myös synteettisellä siRNA:lla. Se on paljon käytetty tapa geenien hiljentämiseen. Sillä on myös suuri potentiaali terapeuttisissa sovelluksissa ja sen käyttömahdollisuuksia tutkitaan monissa sairauksissa. Solujen jakaantuminen vaimentaa sen tehoa ja lopulta estää hiljentämisen kokonaan jo alle 2 viikossa. Kliinisissä sovelluksissa kuljetus varsinkin syvällä oleviin kudoksiin on hankalaa. (Lee & Kumar, 2009)

Synteettinen siRNA on nettovaraukseltaan negatiivinen ja sen on päästävä soluun lipikaksoiskerroksen läpi, jonka päät ovat myös negatiivisesti varautuneet. SiRNA:n kuljetukseen soluihin käytetään pääasiassa kolmea tapaa; transfektio, elektroporaatio ja virusvektorit. (Hung ym., 2009)

Transfektiossa siRNA sidotaan kantajaan, joka auttaa sen solukalvon läpi. Yksi tavallinen keino on käyttää liposomeja, joiden lipikaksoiskerroksen sisään siRNA kapseloituu. On myös kehitetty synteettisiä polymeeripohjaisia nanopartikkeleja. Niiden avulla päästään parempaan tehokkuuteen ja samalla sytotoksisuus vähenee. Monia muitakin kantajia, esimerkiksi kolesterolia, on mahdollista käyttää. (Hung ym., 2009)

Elektroporaatiossa käytetään hyväksi solukalvon fosfolipidien päiden negatiivista varausta. Lyhyen elektronisen pulssin aiheuttama lämpö saa solukalvon lipidit orientoitumaan niin, että hetkellisesti solu päästää sisäänsä kuljetettavaa ainetta, tässä tapauksessa siRNA:ta. (Hung ym., 2009)

Virusvektorit ovat tyypillisesti peräisin retro-, adeno-, AAV- (adeno-associated virus) tai lentiviruksista. Ne on suunniteltu kuljettamaan siRNA soluihin, joihin transfektio on hankalaa. (Hung ym., 2009)

5 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

5.1 Solut

Tutkimuksessa käytettiin tyypiltään mesenkymaalista MDA-MB-231(SA)-solulinjaa. Se on luometastaattinen variantti MDA-MB-231-solulinjasta, joka taas on eristetty myöhäisen vaiheen rintasyöpäpotilaan keuhkopussin nestepurkaumasta. (Pollari ym., 2010)

5.2 PCR

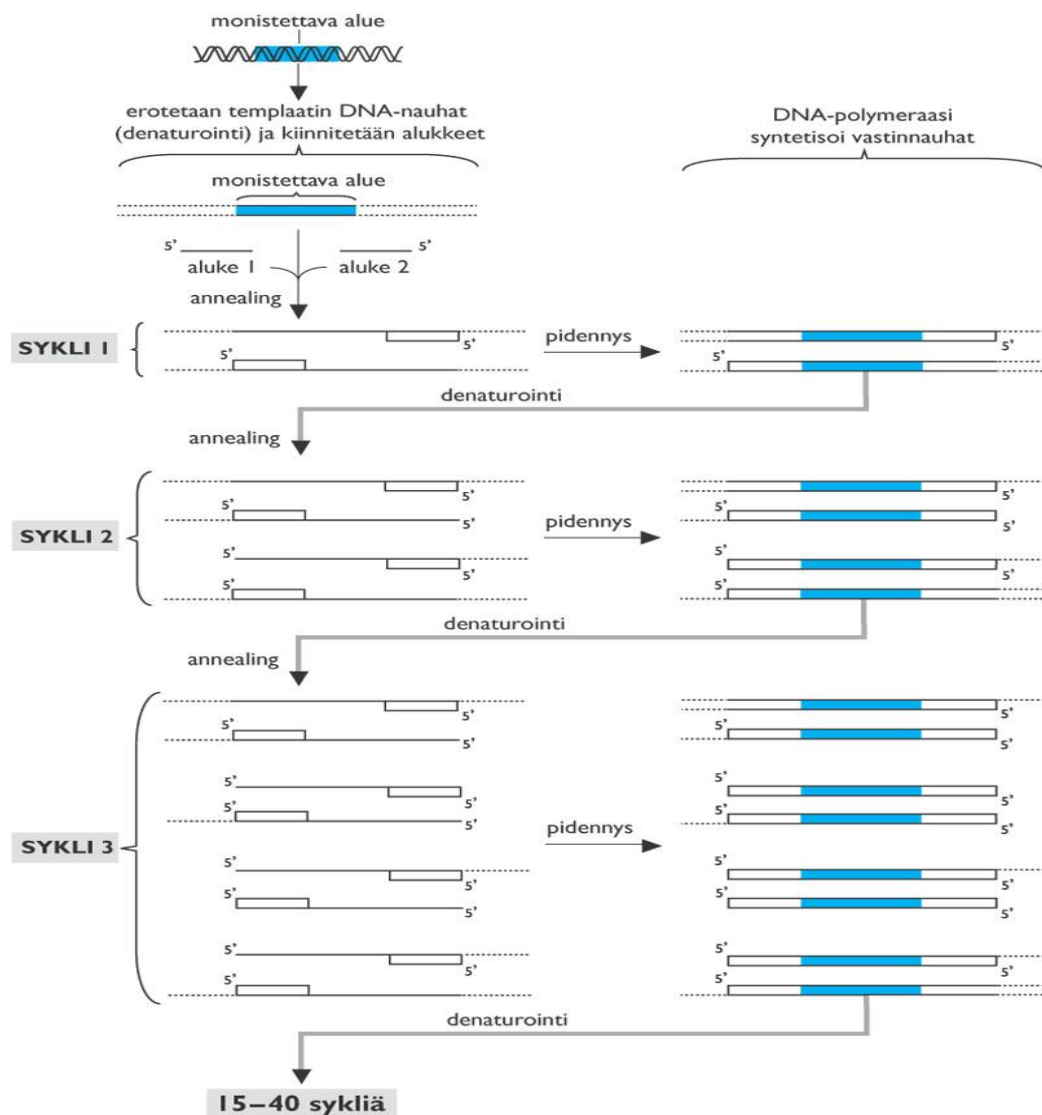
Polymeraasiketjureaktio eli PCR (engl. polymerase chain reaction) on DNA-jaksojen monistamiseen käytetty tekniikka. Reaktiossa käytetään alukkeita, templaattia, DNA-polymeraasia ja nukleotideja kopioiden aikaansaamiseksi. (Suominen ym., 2010)

Alukkeet (engl. primer) ovat lyhyitä synteettisiä yksinauhaisia DNA-fragmentteja. Ne rajaavat monistettavan DNA-jakson kiinnittyen sen vastakkaisiin pätyihin kaksijuosteisen DNA:n eri nauhoihin. Tätä kaksijuosteista DNA:ta, jonka jaksoa monistetaan, kutsutaan templaatiksi. (Suominen ym., 2010)

DNA-polymeraasi toimii nukleotidien kiinnittäjänä. Käytetyin on Taq-polymeraasi, joka on eristetty *Thermus aquaticus* -bakteerista. Muitakin DNA-polymeraaseja, kuten Pfu- ja Vent- polymeraaseja käytetään, sillä Taq-polymeraasi tekee paljon virheitä. Menetelmät on usein optimoitu kuitenkin Taq-polymeraasille, joten siitä on kehitetty parempia versioita. (Suominen ym., 2010)

PCR-sykli koostuu kolmen reaktion sarjasta; denaturointi, annealing ja ekstensio. Yksi sykli tuottaa kahdesta DNA-juosteesta neljä juostetta. Denaturoinnissa templaatti-DNA muutetaan kaksinauhaisesta yksinauhaiseksi kuumentamalla. Lämpötilaa lasketaan, jolloin alukkeet kiinnittyvät templaattiin (annealing-reaktio). Lämpötilaa nostetaan taas pidennysreaktiota varten. Pidennysreaktiossa eli ekstensiossa DNA-polymeraasi liittää nukleotideja

templaatin mukaisesti alukseen 3'-päästä lähtien. Nauhojen valmistuttua lämpötilaa nostetaan jälleen, jotta nauhat irtoaisivat (denaturaatio). DNA-polymeraasi toimii denaturaatioon asti, joten ensimmäisen syklin tuotteet ovat pidempiä kuin itse templaatti. Toisessa syklissä syntyy näistä tuotteista templaatin kokoiset tuotteet ja ne monistuvat eksponentiaalisesti, kun sykliä toistetaan. Varsinainen templaatti jatkaa pidempien tuotteiden tuottamista syklien edetessä, mutta niiden määrä jää hyvin pieneksi. PCR:n toimintaperiaate on esitetty kuviossa 3. (Suominen ym., 2010)



Kuvio 3. PCR:n toimintaperiaate. (Suominen ym., 2010 s. 157)

Käänteistranskriptio-PCR eli RT-PCR (engl. reverse transcription PCR) on menetelmä, jossa RNA käännetään cDNA:ksi ennen PCR-reaktiota. Soluista eristetty mRNA käännetään käänteistranskriptaasin avulla cDNA:ksi. Lämpötila nostetaan käänteistranskriptaasille sopivaksi, joka tuottaa ensimmäisen cDNA-jakson. Lämpötilaa nostetaan tämän jälkeen niin, että DNA-RNA-hybridit denaturoituvat. Syntynyttä cDNA-juostetta käytetään PCR-reaktioiden templaattina. (Suominen ym., 2010)

5.2.1 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

Perinteisessä PCR-reaktiossa tuotetta voidaan tutkia reaktioiden tapahduttua. Reaaliaikaisen PCR:n (engl. real time PCR) etuna on, että tuotteiden määrää voi havainnoida reaktioiden tapahtuessa (reaaliaikaisesti). Havainnointi perustuu merkkiaineeseen, joka sitoutuu tuotteeseen. Sitoutuessaan kohteeseensa merkkiaineen lähettämä fluoresenssi mitataan. (Suominen ym., 2010)

PCR on todella herkkä menetelmä, jonka tulokset vaihtelevat pientenkin häiriötekijöiden tuloksena. Näitä voivat olla esimerkiksi muutokset näytteiden käsittelyssä ja olosuhteissa. Tämän vuoksi tuotteiden kvantitatiivinen määrittäminen on haastavaa. Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR-reaktiossa eli qRT-PCR:ssä (engl. quantitative real time PCR) nimensä mukaisesti tuotteita kuitenkin tutkitaan kvantitatiivisesti. Kvantitointi on joko suhteellista tai absoluuttista. Suhteellisessa metodissa verrataan kohde- ja referenssigeenien määriä, kun referenssiä on kaikissa näytteissä. Absoluuttisessa tavassa verrataan kopiointisuhdetta näytteen ja tunnetun kohteen välillä. (Suominen ym., 2010)

Referenssinä käytettyä β -aktiinia (geeni ACTB) on solun tukirangassa suunnilleen yhtä paljon kaikissa soluissa. Jos siRNA tappaa paljon soluja, voi tietyn geenin mRNA-taso vääristyä. Vertaamalla β -aktiiniin tämä ero voidaan mitätöidä.

Taqman[®] qRT-PCR –metodissa käytetään merkkiaineena fluoresoivaa Taqman[®]-koetinta. Taqman[®]-koetin koostuu 5'-päähen kiinnittyneestä fluoresoivasta leimasta ja sammuttajasta (engl. quencher) 3'-päässä. Sitoutumattoman koettimen sammuttaja pitää fluoresenssitason matalana. Sitoutuessaan kohteeseensa koetin katkeaa Taq-polymeraasin ansiosta. Fluoresoiva leima irtoaa sammuttajasta, jolloin signaali voimistuu. Koetin irtoaa samalla kohdejuosteesta, jolloin ekstensio jatkuu templaatin loppuun asti. Sillä ei siis ole vaikutusta PCR:n tuottamien kopioiden määrään. Sykliä jatkuessa fluoresenssi kasvaa kloonien määrän kasvaessa. (Applied Biosystems)

6 TYÖN SUORITUS

Tässä työssä validoitiin aiemmin tehoseulonnan avulla tunnistettuja mahdollisia vimentiniin ilmentymistä metastaattisissa rintasyöpäsoluissa sääteleviä geenejä. Näitä geenejä hiljennettiin MDA-MB-231(SA) soluissa siRNA:n avulla ja hiljennyksen aiheuttamia muutoksia tutkittiin qRT-PCR menetelmän avulla. Lisäksi tutkittiin epitelimesenkymaaliseen muuntumiseen tunnetusti vaikuttavien SNAI1-, SNAI2-, ZEB1-, ZEB2- ja FOXC2-geenien ohjaamien transkriptiotekijöiden käyttäytymistä.

Vimentiniä mahdollisesti sääteleviä geenejä oli kolme (VSG1, VSG2 ja VSG3) ja kunkin hiljentämiseen käytettiin kahta eri siRNA:ta (A tai B). Taulukossa 1 on esitetty näytteet ja geenit, joihin siRNA:n vaikutusta tutkittiin.

Taulukko 1. Näytetaulukko.

siRNA	tutkittava proteiini	detektorikoetin
scrambled	E-kadheriini	CDH1
siVIM	E-kadheriini	CDH1
VSG1_A	E-kadheriini	CDH1
VSG1_B	E-kadheriini	CDH1
VSG2_A	E-kadheriini	CDH1
VSG2_B	E-kadheriini	CDH1
VSG3_A	E-kadheriini	CDH1
VSG3_B	E-kadheriini	CDH1
scrambled	Vimentini	VIM
siVIM	Vimentini	VIM
VSG1_A	Vimentini	VIM
VSG1_B	Vimentini	VIM
VSG2_A	Vimentini	VIM
VSG2_B	Vimentini	VIM
VSG3_A	Vimentini	VIM
VSG3_B	Vimentini	VIM
scrambled	Snail	SNAI1
siVIM	Snail	SNAI1
VSG1_A	Snail	SNAI1
VSG1_B	Snail	SNAI1
VSG2_A	Snail	SNAI1
VSG2_B	Snail	SNAI1
VSG3_A	Snail	SNAI1

VSG3_B	Snail	SNAI1
scrambled	Slug	SNAI2
siVIM	Slug	SNAI2
VSG1_A	Slug	SNAI2
VSG1_B	Slug	SNAI2
VSG2_A	Slug	SNAI2
VSG2_B	Slug	SNAI2
VSG3_A	Slug	SNAI2
VSG3_B	Slug	SNAI2
scrambled	Zeb1	ZEB1
siVIM	Zeb1	ZEB1
VSG1_A	Zeb1	ZEB1
VSG1_B	Zeb1	ZEB1
VSG2_A	Zeb1	ZEB1
VSG2_B	Zeb1	ZEB1
VSG3_A	Zeb1	ZEB1
VSG3_B	Zeb1	ZEB1
scrambled	Zeb2	ZEB2
siVIM	Zeb2	ZEB2
VSG1_A	Zeb2	ZEB2
VSG1_B	Zeb2	ZEB2
VSG2_A	Zeb2	ZEB2
VSG2_B	Zeb2	ZEB2
VSG3_A	Zeb2	ZEB2
VSG3_B	Zeb2	ZEB2
scrambled	Foxc2	FOXC2
siVIM	Foxc2	FOXC2
VSG1_A	Foxc2	FOXC2
VSG1_B	Foxc2	FOXC2
VSG2_A	Foxc2	FOXC2
VSG2_B	Foxc2	FOXC2
VSG3_A	Foxc2	FOXC2
VSG3_B	Foxc2	FOXC2

Negatiivisen kontrollina käytettiin muunneltua siRNA:ta (engl. scrambled siRNA), joka on muokattu siten, että se ei aiheuta minkään ihmisen proteiinia koodaavan mRNA:n pilkkoutumista. Sen tarkoituksena on havainnoida siRNA:n kuljetuksen soluun aiheuttamat muutokset. Positiivisena kontrollina käytettiin VIM-geeniä hiljentävää siRNA:ta. Jos se ei saa aikaan ekspressiotason

muutosta, siRNA:n kuljetuksessa soluun on häiriö. Vertaamalla kontrolleihin nähdään näytegeenien hiljentämisen vaikutus.

Taqman[®] qRT-PCR:n avulla nähtiin hyvin tarkkaan hiljentymisen vaikutukset tutkituissa näytteissä. Aluksi soluista eristettiin kitin avulla totaali-RNA, joka käännettiin cDNA:ksi ennen reaaliaikaista-PCR:ää.

6.1 RNA-eristys

RNA eristettiin solulysaateista Qiagenin RNeasy Mini Kitin avulla valmistajan ohjeen mukaan.

Soluja kasvatettiin kuoppalevyillä. Aluksi kasvatusliuos imettiin pois kuopista ja solut hajotettiin pipetoimalla kuoppiin 300 µl RLT-puskuria, jossa oli 1:100 β-merkaptotetanolia RNAasien inhiboimiseksi. Solut raavittiin irti pohjasta pipetin kärjellä ja siirrettiin eppendorf-putkiin.

Lysaatit homogenisoitiin vetämällä ne neulan läpi kymmenen kertaa. Homogenisoituihin lysaatteihin lisättiin 1 tilavuus 80 % etanolia, joka sekoitettiin lysaattiin tarkasti pipetin avulla RNA:n saostamiseksi. Näyte siirrettiin keräysputkessa olevaan kolonniin ja sentrifugoitiin 30 s, 10 000 rpm, jolloin RNA sitoutuu kolonnin membraaniin.

Membraania pestiin epäpuhtauksien poistamiseksi ensin 700 µl RW1-puskuria ja sentrifugoitiin 30 s, 10 000 rpm. Tämän jälkeen se pestiin kahdesti 500 µl RPE-puskuria ja sentrifugoitiin 30 s ja 2 min, 10 000 rpm. Toisella pitkällä sentrifugoinnilla kuivatettiin membraani eluutiota haittaavien etanolijäämien poistamiseksi. Kolonni siirrettiin uuteen keräysputkeen ja sentrifugoitiin 1 min, 13 200 rpm, RPE-puskurin jäämien poistamiseksi.

RNA eluointiin membraanilta RNAasittomalla vedellä. Kolonni siirrettiin eppendorf-putkeen ja membraanille pipetoitiin 20 µl vettä. Inkuboitiin 1 min huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin 1 min, 10 000 rpm. Eluointi toistettiin, jolloin näytetilavuudeksi saatiin 40 µl.

RNA-pitoisuudet ja puhtaus varmistettiin Thermo Fischer Scientificin Nanodrop 1000 –laitteella. Näyte pipetoidaan vastaanottavan valokuitukaapelin päähän. Toinen valokuitukaapeli (lähettävä) tulee mittauksen aikana kiinni näytteeseen, joka toimii siltana kaapeleiden välillä. Laite analysoi vilkkuvan xenon-lampun lähettämän valon sen kuljettua näytteen läpi. (Thermo Fischer Scientific)

Nollanäytettä (vesi) ja RNA-näytteitä pipetoitiin mittauspäälle 1 µl. Näytteistä mitattiin absorbanssi 260 ja 280 nm aallonpituudella, joiden suhdetta 260/280 käytetään RNA:n puhtauden arvioinnissa. Puhtaan RNA:n suhdeluku on noin 2.

6.2 qRT-PCR

6.2.1 cDNA-synteesi

Puhdistetusta RNA:sta syntetisoitiin cDNA:ta käänteistranskription avulla. RNA-näytteen maksimimäärä käänteistranskriptioreaktiossa oli 10 µl ja haluttu RNA-pitoisuus näytteessä oli 100–1000 ng. Mitattujen RNA-konsentraatioiden perusteella laskettiin tarvittavat määrät vettä ja RNA-näytettä.

Jos esimerkiksi haluttu RNA-konsentraatio oli 500 ng/10 µl ja eristetyn RNA:n konsentraatio 171,57 ng/µl, saatiin RNA-näytteen tilavuus kaavalla:

$$c_1V_1 = c_2V_2$$
$$V_1 = \frac{c_2V_2}{c_1} = \frac{500 \text{ ng}/10 \text{ µl} \times 10 \text{ µl}}{171,57 \text{ ng}/\text{µl}} = 2,9 \text{ µl}$$

Laskun termit ovat: c_1 on eristetyn RNA:n konsentraatio, c_2 on RNA:n loppukonsentraatio näytteessä, V_2 on näytteen kokonaistilavuus ja V_1 on pipetoitavan puhdistetun RNA:n määrä. Vettä lisättiin niin, että näytteen kokonaistilavuudeksi saatiin 10 µl.

Yhteen RT-reaktioon tarvittava määrä reaktioseosta (master mix) oli 10 µl. Reaktioseoksen koostumus on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Reaktioseos käänteistranskriptiolle.

Tilavuus (µl)	Reagenssi
2	(10x) RT-puskuri
0,8	(25x) dNTP
2	(10x) RT satunnaisalukkeet
1	Käänteistranskriptaasientsyymi
0,5	RNAasi-inhibiittori (40 U/µl)
3,7	H ₂ O

Reaktioseos (10 µl), RNA-näyte ja vesi (yhteensä 10 µl) pipetoitiin PCR-putkiin. PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. PCR-ohjelma.

Lämpötila (°C)	Aika
25	10 min
37	120 min
85	5 s
4	Jatkuva

Ajon jälkeen cDNA:t säilytettiin -20 °C:ssa.

6.2.2 Taqman[®] qRT-PCR

Saadut cDNA-näytteet (20 µl) laimennettiin 1:10 lisäämällä 180 µl vettä. Taqman[®]-reaktioseoksen koostumus yhdelle reaktiolle on taulukossa 4.

Taulukko 4. Reaktioseos qRT-PCR:lle.

Tilavuus (µl)	Reagenssi
5	(2x) PCR universal master mix
0,75	Aluke (forward) (4 µM)
0,75	Aluke (reverse) (4 µM)
1	Koetin
2	DNA-näyte
0,5	H ₂ O

Kuoppalevyille pipetoitiin 2 μ l cDNA-näytettä ja 8 μ l reaktioseosta, jokaisesta tehtiin kolme rinnakkaisnäytettä. Kuoppalevy peitettiin tarrakalvolla ja sitä säilytettiin + 4 °C:ssa ennen ajoa. Ajossa käytettiin Applied Biosystems'in 7900 HT-laitetta.

Näytteiden analysointiin käytettiin suhteellista metodia ja referenssigeeninä oli β -aktiini (ACTB).

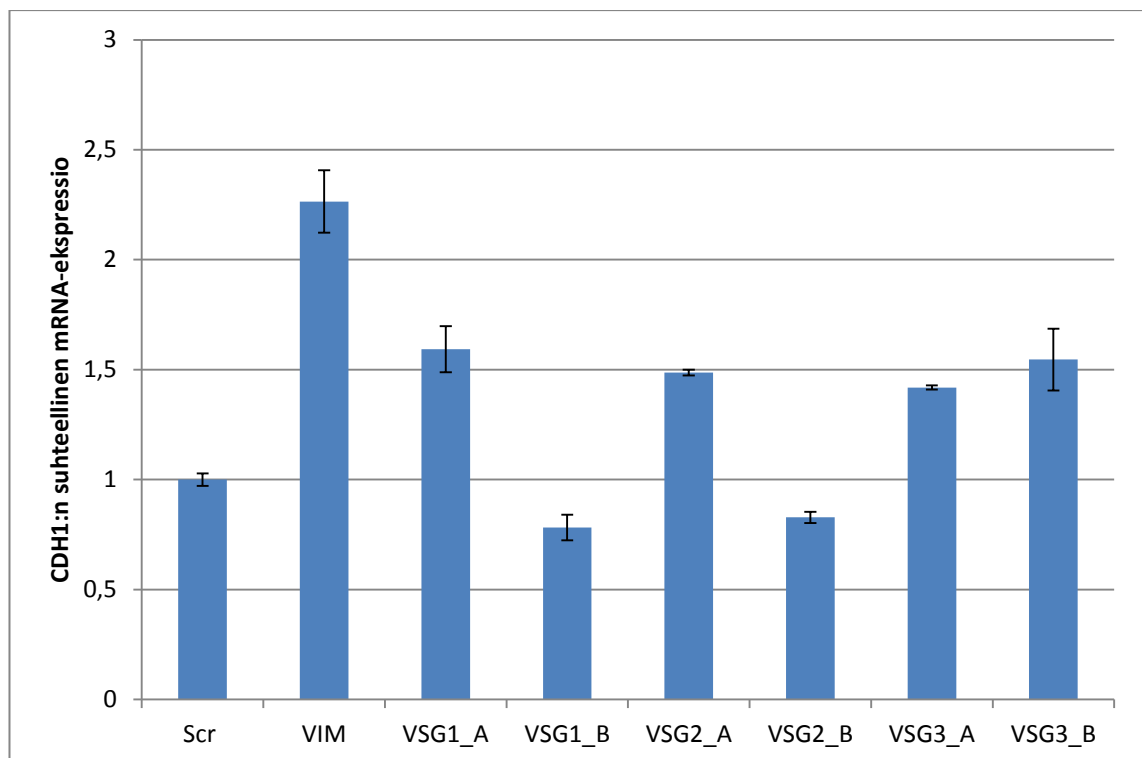
7 TULOKSET

E-kadheriinin (CDH1) lisääntyminen tarkoittaa solujen muuntuneen epiteelisolujen suuntaan (MET). Vimentinin (VIM) lisääntyminen taas kertoo EMT:n kaltaisista muutoksista. Tulosten perusteella VIM:n hiljentäminen selvästi nosti CDH1:n ekspressiota.

Transkriptiotekijöiden ekspressiotasojen oletettiin nousevan VIM-geenin hiljennyksen myötä. Näin kävikin ZEB1-geeniä lukuun ottamatta kaikille transkriptiotekijöille.

7.1 E-kadheriini

Kuviossa 4 on esitetty CDH1:n (E-kadheriini) suhteelliset mRNA-ekspressiotasot ja rinnakkaisnäytteiden väliset hajonnat. Scrambled-kontrollin rinnakkaisnäytteet muodostavat suhteellisen arvon 1, johon näytteiden tasoja voidaan verrata.

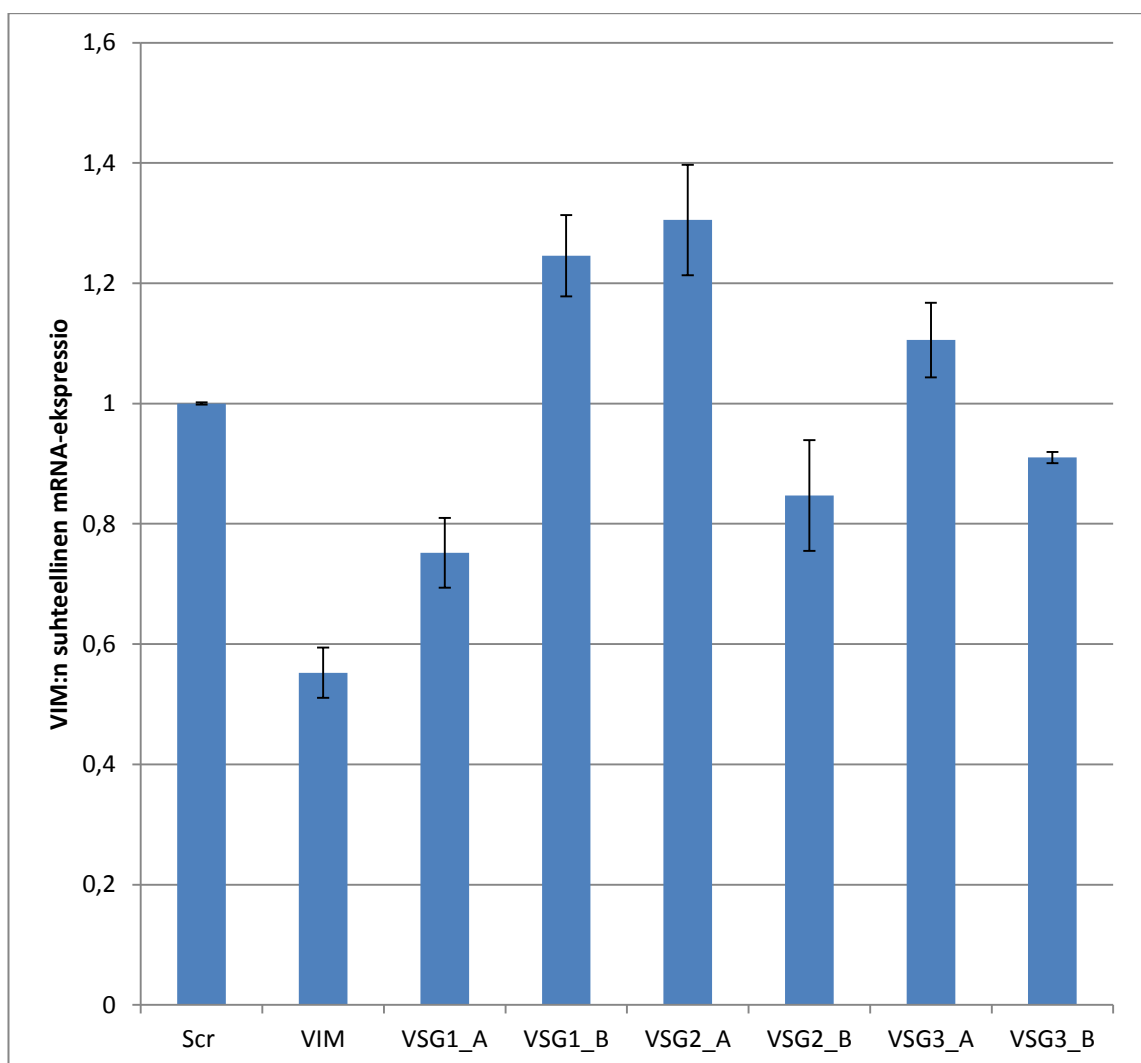


Kuvio 4. CDH1:n suhteellinen mRNA-ekspressio.

Tulokset näyttivät, että VIM-geenin hiljennys on saanut aikaan E-kadheriinin ekspression nousun noin 2,3-kertaiseksi. Käytetyistä siRNA:ista VSG1_A (1,59), VSG2_A (1,49), VSG3_A (1,42) ja VSG3_B (1,55) nostavat myös E-kadheriinin tasoa. VSG1_B (0,78) ja VSG2_B (0,83) siRNA:t taas laskevat sitä.

7.2 Vimentiini

Kuviossa 5 on esitetty VIM:n (vimentiini) suhteelliset mRNA-ekspressiotasot ja rinnakkaisnäytteiden väliset hajonnat.

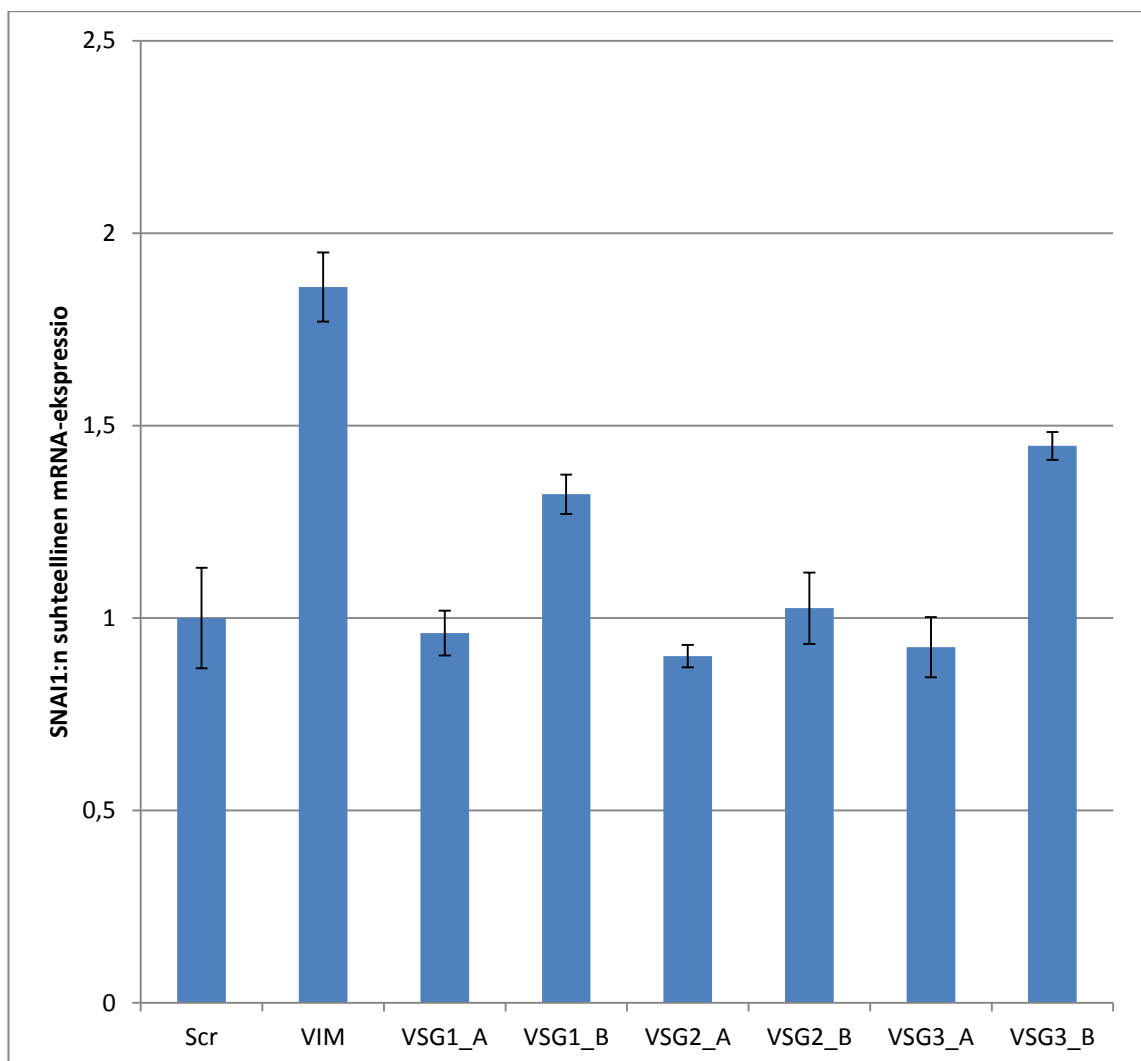


Kuvio 5. VIM:n suhteellinen mRNA-ekspressio.

Vimentinin ekspressio on vähentynyt positiivisessa kontrollissa ja on lähes puolet (0,55) scrambled-kontrollin tasosta. VSG1_B (1,25), VSG2_A (1,31), sekä VSG3_A (1,11) siRNA:t nostavat vimentinin tasoja. VSG1_A (0,75) ja VSG2_B (0,85) siRNA:t taas laskevat tasoja.

7.3 Snail

Kuviossa 6 on esitetty SNAI1:n suhteelliset mRNA-ekspressiotasot ja rinnakkaisnäytteiden väliset hajonnat.

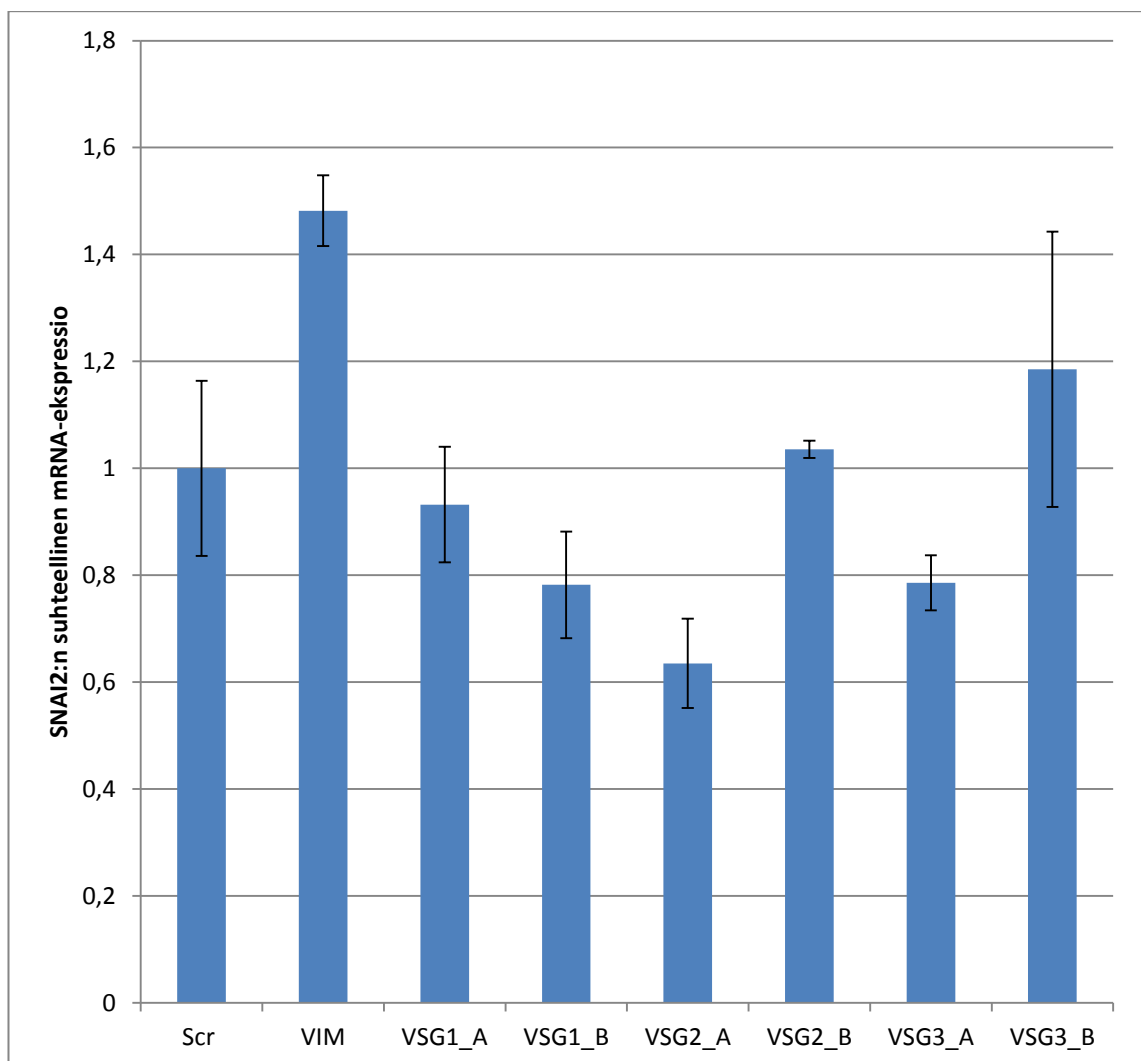


Kuvio 6. SNAI1:n suhteellinen mRNA-ekspressio.

VIM-geenin hiljennys on saanut aikaan SNAI1:n ekspressiotason nousun (1,86). VSG1_B (1,3), VSG2_B (1,03) sekä VSG3_B (1,45) siRNA:t ovat myös nostaneet SNAI1:n tasoja. Vastaavasti SNAI1:n tasoja ovat laskeneet siRNA:t VSG1_A (0,96), VSG2_A (0,90) sekä VSG3_A (0,92).

7.4 Slug

Kuviossa 7 on esitetty SNAI2:n suhteelliset mRNA-ekspressiotasot ja rinnakkaisnäytteiden hajonnat.

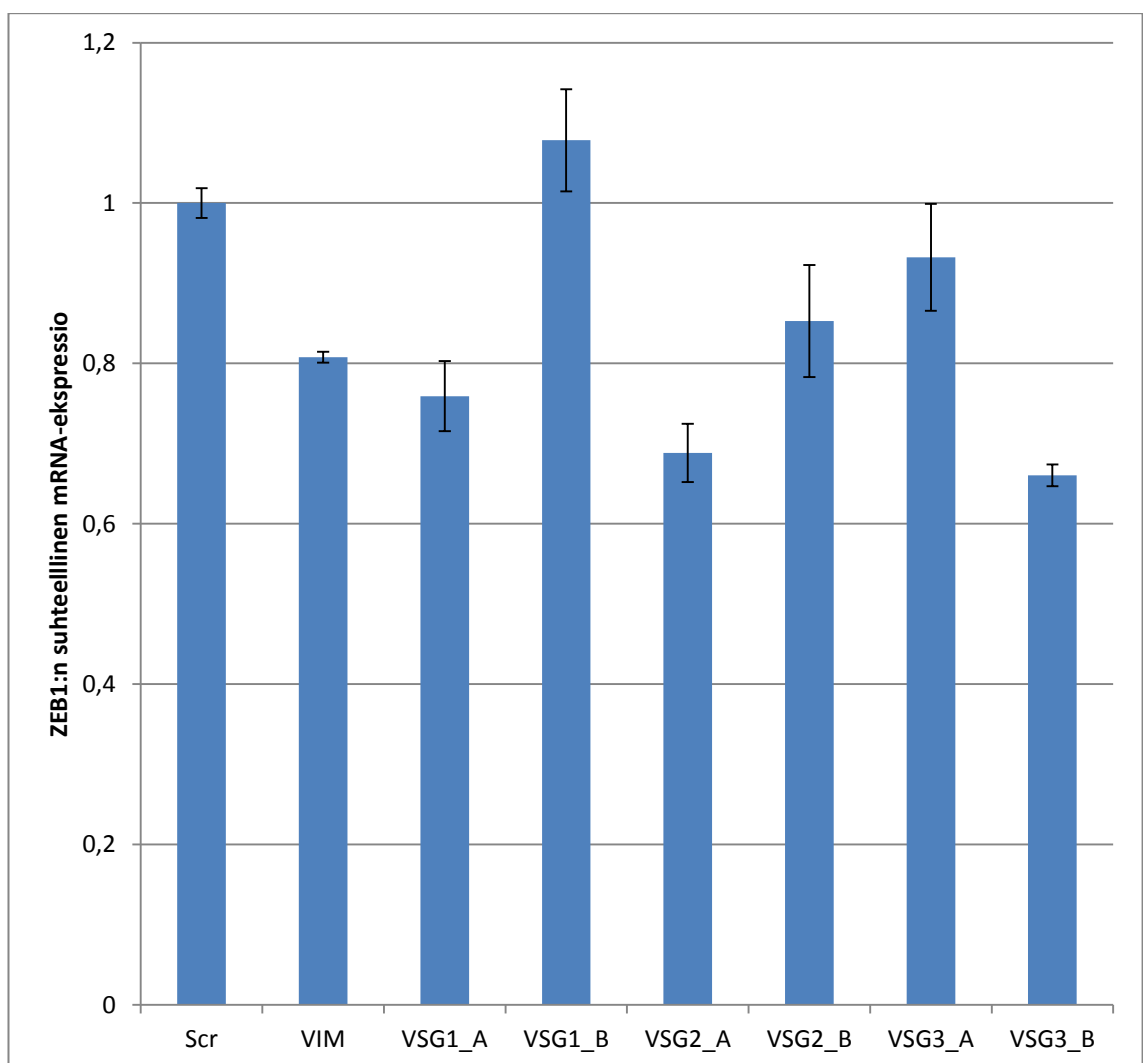


Kuvio 7. SNAI2:n suhteellinen mRNA-ekspressio.

VIM-geenin hiljennys on saanut aikaan SNAI2:n ekspression nousun. Sen on saanut aikaan myös siRNA:t VSG2_B (1,04) ja VSG3_B (1,19). VSG1_A (0,93), VSG1_B (0,78), VSG2_A (0,64), VSG3_A (0,79) siRNA:t ovat heikentäneet SNAI2:n tasoja.

7.5 ZEB1

Kuviossa 8 on esitetty ZEB1:n suhteelliset mRNA-ekspressiotasot ja rinnakkaisnäytteiden hajonnat.

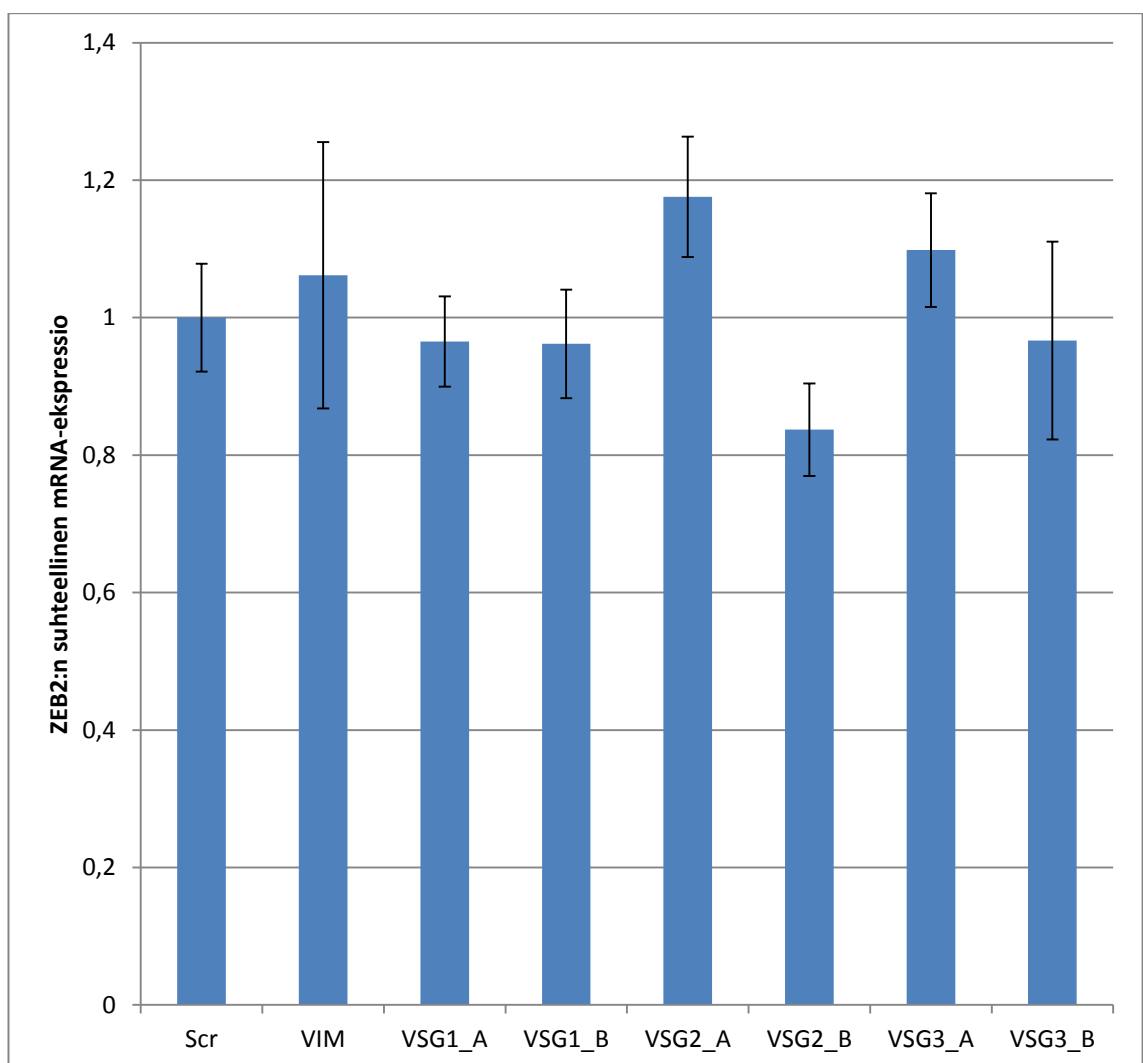


Kuvio 8. ZEB1:n suhteellinen mRNA-ekspressio.

VIM-geenin hiljennys on laskenut ZEB1:n ekspressiota. Näytteistä ainoastaan VSG1_B (1,08) on nostanut ZEB1:n tasoa. VSG1_A (0,76), VSG2_A (0,69), VSG2_B (0,85), VSG3_A (0,93), VSG3_B (0,66) siRNA:t laskevat ZEB1:n tasoa.

7.6 ZEB2

Kuviossa 9 on esitetty ZEB2:n suhteelliset mRNA-ekspressiotasot ja rinnakkaisnäytteiden hajonnat.

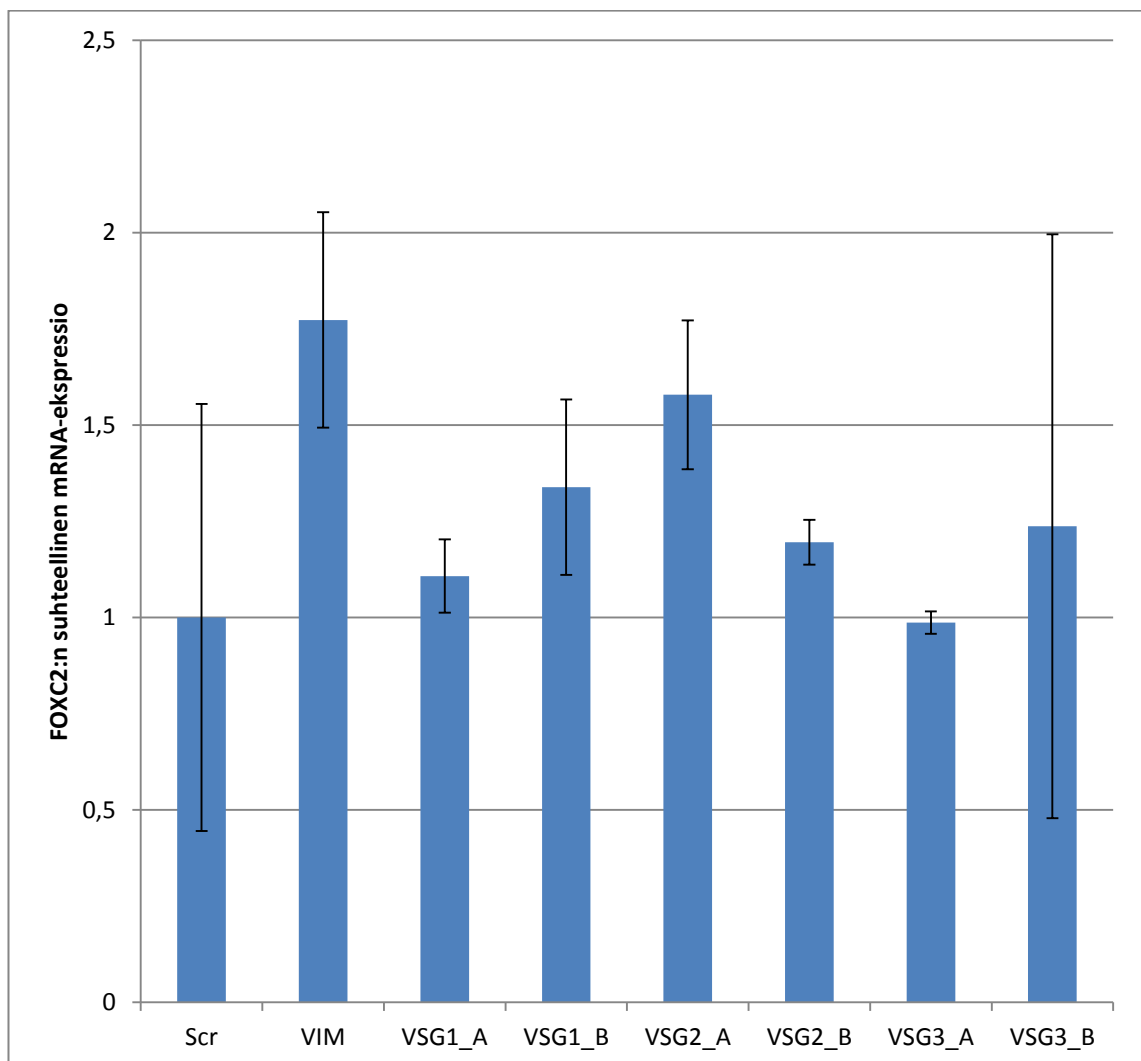


Kuvio 9. ZEB2:n suhteellinen mRNA-ekspressio.

VIM-geenin hiljennys on nostanut vain vähän (1,06) ZEB2:n tasoa ja rinnakkaisnäytteiden hajonta on suuri. VSG2_A (1,18) ja VSG3_A (1,10) siRNA:t nostavat myös ZEB2:n tasoa. Muilla siRNA:illa VSG1_A (0,97), VSG1_B (0,96), VSG2_B (0,84) sekä VSG3_B (0,97) on ollut päinvastainen vaikutus. On myös huomioitava, että VIM-kontrollin ja VSG3_B:n rinnakkaisnäytteiden hajonnat ovat suuria.

7.7 Foxc2

Kuviossa 10 on esitetty FOXC2:n suhteelliset mRNA-ekspressiotasot ja rinnakkaisnäytteiden hajonnat.



Kuvio 10. FOXC2:n suhteellinen mRNA-ekspressio.

VIM-geenin hiljennys on nostanut FOXC2:n ekspressiota. Ainoastaan VSG3_A (0,99) on laskenut FOXC2:n ekspressiota. Muut siRNA:t VSG1_A (1,11), VSG1_B (1,34), VSG2_A (1,58), VSG2_B (1,20), sekä VSG3_B (1,24) taas saivat aikaan ekspressiotason nousun. On kuitenkin huomioitava, että kontrollien ja VSG3_B:n rinnakkaisnäytteiden hajonnat ovat erityisen suuria.

8 PÄÄTELMÄT

Opinnäytetyön tavoitteena oli validoida tiettyihin geeneihin kohdistuvan RNA-interferenssin vaikutusta epителиomesenkymaalisisessa muuntumisessa tärkeissä rooleissa olevien vimentiniin, E-kadheriiniin, sekä useiden transkriptiotekijöiden ekspression.

Tavoitteessa onnistuttiin kokonaisuudessaan hyvin kaikkien geenien kohdalla. Ainoastaan muutamassa tapauksessa rinnakkaisnäytteiden hajonta on suurta mitä ilmeisimmin pipetointivirheen vuoksi. Näiden näytteiden kohdalla analyysit tulisi toistaa.

VIM-geenin hiljennys sai aikaan E-kadheriiniin kohdalla odotetun mRNA-tason nousun ja toisaalta vimentiniin mRNA-tason laskun. Nämä tulokset ovat yhteneviä epителиomesenkymaalisen muuntumisen periaatteen kanssa.

SNAI1- ja SNAI2-geenien mRNA-ekspressiotasot nousevat VIM-geenin hiljennyksen myötä positiivisessa kontrollinäytteessä ja myös joidenkin siRNA:iden kohdalla. VSG1_B, VSG2_B sekä VSG3_B nostavat SNAI1-geenin ekspressiota. Näistä VSG2_B ja VSG3_B nostavat myös SNAI2:n ekspressiota. Myös ZEB2- ja FOXC2-geenien mRNA-ekspressiotasot nousevat VIM-geenin hiljentämisen myötä. VSG2_A ja VSG3_A nostavat ZEB2-tasoa. FOXC2:n mRNA-ekspressiota nostavat VSG1_A, VSG1_B, VSG2_A, VSG2_B, sekä VSG3_B.

Yllättävästi jostain syystä ZEB1-geenin mRNA-ekspressiotaso näyttää laskevan VIM-geenin hiljennyksen myötä. EMT-MET on monimutkainen ja vielä monilta osin tutkimaton, joten tarkkaa syytä tähän muutokseen on mahdotonta arvioida vain tämän työn tulosten pohjalta.

Koko tutkimuksen tarkoituksena on tutkia rintasyövän etäpesäkkeiden muodostumiseen vaikuttavia prosesseja ja mahdollisesti löytää kohdegeenejä sen hoitoon. Jatkotutkimuksiin lupaavimmalta näyttää VSG1_A, joka saa aikaan E-kadheriiniin tason nousun ja vimentiniin tason laskun. Lisäksi se laskee E-

kadheriinia repressoivien transkriptiotekijöiden mRNA-tasoja. Ainoastaan FOXC2-geenin mRNA-ekspressiotaso nousee.

VSG1_A:lla näyttäisi siis olevan suurin potentiaali estää metastaasien syntyä rintasyövässä. Jatkotutkimukset kuitenkin vasta kertovat, toimiiko hiljentäminen myös *in vivo* -malleissa. Tämän jälkeen voidaan vasta alkaa pohtimaan mahdollisia terapeuttisia sovelluksia.

LÄHTEET

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2002, Molecular biology of the cell fourth edition, Garland Science, a member of the Taylor & Francis Group: United States of America

Applied Biosystems, viitattu 14.11.2011, saatavilla www-muodossa.com; www.appliedbiosystems.com Applications & Technologies> Real-Time PCR>TaqMan® vs. SYBR® Green Chemistry

Comijn J., Bex G., Vermassen P., Verschuere K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F., 2001, the Two-Handed E Box Binding zinc Finger protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion, Molecular Cell, June, Vol. 7, 1267-1278

Eger A., Mikulits W., 2005, Models of epithelial-mesenchymal transition, Drug Discovery Today: Disease Models Volume 2, Issue 1, Spring, 57-63

Heino J., Vuento M., 2007, Biokemian ja solubiologian perusteet, WSOY Oppimateriaalit Oy, 1. painos

Hung J., Sellappan S., Jiang Q., Zhang Z., Bank A., Quellhorst G., Huang J., Medicus R., 2009, siRNA Delivery Methods into Mammalian Cells, Pathways™, Issue 9, Pages 10-11 saatavilla www-muodossa.com; www.sabiosciences.com/support_literature.php

Ivaska J., 2011, Vimentin: Central hub in EMT induction?, Small GTPases 2:1, 51-53; January/February, Landes Bioscience

Lee S.-K., Kumar P., 2009, Conditional RNAi: Towards a silent gene therapy, Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 61, Issues 7-8, 2 July, 650-664

Mani S. A., Yang J., Brooks M., Schwaninger G., Zhou A., Miura N., Kutok J. L., Hartwell K., Richardson A. L., Weinberg R. A., 2007, Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers, Proceedings of the National Academy of the United States of America, June 12; 104(24): 10069-10074

McInroy L., Määttä A., 2007 Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion, Biochemical and Biophysical Research Communications 360, 109-114

Micalizzi D., Farabaugh S., Ford H., 2010, Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression, Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, June; 15(2): 117-134

Pollari S., Kähkönen S.-M., Edgren H., Wolf M., Kohonen P., Sara H., Guise T, Nees M., Kallioniemi O., 2010, Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer stimulates osteoclastogenesis, Springer Science+Business Media, LLC Published online 30 March

Rintasyöpä, viitattu 20.10.2011, saatavilla www-muodossa.com; www.rintasyopa.fi

Suominen I., Pärssinen R., Haajanen K., Pelkonen J., 2010, Geenitekniikka, Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy

Takeyama Y., Sato M., Horio M., Hase T., Yoshida K., Yokoyama T, Nakashima H., Hashimoto N., Sekido Y., Gazdar A. F., Minna J. D., Kondo M., Hasegawa Y., 2011, Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells, Cancer Letter, October 28; 296(2): 216-224

Thermo Fischer Scientific, Nanodrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's manual

Voulgari A., Pintzas A., 2009, Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796, 75-90