

Opinnäytetyö (AMK)
Bioanalytikkokoulutus
NBIOAK14
2017

Anna-Kaisa Andersson

MIKRO-RNA -MOLEKYYLIEN
KOHDELÄHETTI-RNA -
VAIKUTUSTEN
TODENTAMINEN
FLUORESENSSI-
REPORTTERILLA

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytikkokoulutus

2017 | 28 sivua

Anna-Kaisa Andersson

MIKRO-RNA-MOLEKYYLIEN KOHDELÄHETTI-RNA-VAIKUTUSTEN TODENTAMINEN FLUORESENSSIREPORTTERILLA

Tsoledronaatti on hyvin siedetty osteoporoosilääke, jolla hoidetaan myös rintasyövän luustoetäpesäkkeitä. Lääkkeelle tutkitaan uutta käyttötarkoitusta rintasyövän primäärikasvainten hoitoon. Tutkimuksissa on todettu, että tsoledronaatti muuttaa tiettyjen mikro-RNA-molekyylien määriä rintasyöpäsoluissa. Mikro-RNA:t ovat RNA:ta joka ei koodaa proteiineja, vaan säätelee geenien toimintaa estämällä lähetti-RNA:n translaation ja sitä kautta vaimentavat säätelemänsä geenin toiminnan.

Turun Yliopistolla käynnissä olevien tutkimusten mukaan, tiettyjen tsoledronaatin vaikutuksesta määrältään lisääntyneiden mikro-RNA:iden kohteena ovat rintasyöpäsolujen luuhakuisuuteen, jakaantumiseen ja migraatioon liittyvät geenit, joiden toiminnan kyseiset mikro-RNA:t estävät.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli varmistaa mikro-RNA:iden kohteena olevat lähetti-RNA:t yhdistelmä-DNA-tekniikan, soluviljelmien ja mikro-RNA:ta jäljittelevien valmisteiden avulla. Tavoitteena oli selvittää tsoledronaatin käyttökelpoisuutta rintasyövän hoidossa, ja edistää rintasyövän lääkehoidon kehitystä. Tarkoituksena oli todentaa mikro-RNA:n vaikutukset kohdelähetti-RNA:han fluoresenssirepotterilla transfektoiduilla soluviljelmissä, joihin lisätään tutkittavia mikro-RNA:ita jäljitteleviä valmisteita. Fluoresenssin sammuminen soluissa osoittaisi mikro-RNA:iden vaikutuksen.

Opinnäytetyöhön liittyviä laboratoriotöitä tehtiin neljän viikon ajan alkuvuodesta 2017. Aikaisemmassa syventävässä erikoisalan osaamisen harjoittelussa tehdyissä, opinnäytetyöhön valmistelemissa laboratoriotöissä oli osoitettu jo yhden geenin kohdalla mikro-RNA:n vaikutukset kohdelähetti-RNA:han, joten opinnäytetyön käytännön toteutuksessa keskityttiin kahteen muuhun geeniin. Opinnäytetyön käytännön laboratoriotöihin varattu aika loppui kesken, ennen kuin vaikutukset kahden muun geenin kohdalla pystyttiin todentamaan. Opinnäytetyön lopussa esitetään jatkotutkimusmahdollisuuksia.

ASIASANAT:

Mikro-RNA:t, lähetti-RNA:t, rintasyöpä, yhdistelmä-DNA, geneettiset vektorit, fluoresenssi.

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical Laboratory Science

2017 | 28 pages

Anna-Kaisa Andersson

VERIFICATION OF MICRO-RNA MOLECULE EFFECTS ON TARGET MESSENGER RNA BY FLUORESCENCE REPORTER

Zoledronate is a well tolerated osteoporosis drug, which is also used for treating breast cancer bone metastases. The drug is researched for a new purpose of use in treating breast cancer primary tumors. Studies have found that zoledronate changes quantities of certain micro-RNA molecules in breast cancer cells. Micro-RNAs are RNA that does not encode proteins but regulates the activity of genes by blocking messenger RNA translation and thus suppress the function of the gene they are regulating.

According to ongoing studies in the University of Turku, the targets of certain micro-RNA's amplified by zoledronic acid are genes related to high bone affinity, proliferation and migration of breast cancer cells, whose expression the micro-RNA's inhibit.

The purpose of this study was to ensure the target messenger RNAs of the micro-RNA's by recombinant DNA technology, cell cultures and micro-RNA mimicking preparations. The aim was to determine the usefulness of zoledronate in treating breast cancer, and promote the development of breast cancer treatment. The purpose was to verify the micro-RNA's effects on the target messenger RNA by fluorescence reporter transfected cell cultures, to which micro-RNA mimicking preparations are added to. Exhaustion of the fluorescence of the cells demonstrates a micro-RNAs effect.

Laboratory work on the thesis was four weeks in early 2017. Earlier, in the pre-thesis laboratory work for the advanced studies internship, the micro-RNA's effects on target messenger RNA was established regarding one of the three genes studied, so practical thesis implementation focused on the two other genes. Time reserved for the practical laboratory work for the thesis ran out, before the effects on the other two messenger RNA's could be verified. At the end of the thesis there are presented further research opportunities.

KEYWORDS:

MicroRNAs, RNA; messenger, breast cancer, DNA; recombinant, genetic vectors, fluorescence.

SISÄLTÖ

SANASTO	6
1 JOHDANTO	8
2 TEOREETTINEN TAUSTA	9
2.1 Rintasyöpä	9
2.2 Mikro-RNA:t vilkkaan tutkimustyön kohteena	10
2.3 Tsoledronaatin mahdollisuudet rintasyövän hoidossa	11
2.4 Opinnäytetyössä käytetyt vektorit	12
3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	15
4 KÄYTÖNNÖN OSUUS	16
4.1 Opinnäytetyön toteutus	16
4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat	19
4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat	20
5 TULOKSET JA POHDINTAA	21
5.1 Laboratoriotöiden tulokset	21
5.2 Luotettavuuden tarkastelu	23
5.3 Jatkotutkimusaiheet	23
5.4 Ammatillinen kasvu	24
LÄHTEET	26

KUVAT

Kuva 1. Etäpesäkkeiden synty (Oppiportti 2017).	10
Kuva 2. GFP-vektorin toimintaperiaate (Cell Biolabs 2016).	13
Kuva 3. Opinnäytetyössä käytetyt vektorit (Cell Biolabs 2016).	14
Kuva 4. Agarosigeeli jossa digestoimatonta ja digestoitua DNA:ta. Vasemmalta oikealle: NEB 1k bp ladder, GFP-vektori, E2F3, OGN, OGN, Thermo Fisher 100 bp Gene Ruler (digestoidut DNA:t jaettuna kahteen kaivoon).	17
Kuva 5. Fenoli-kloroformiuutto (Suominen & Ollikka 2004).	18
Kuva 6. Etanolisaostus (Zumbo 2012a).	19
Kuva 7. Tutkittavia soluja kirkaskenttämikroskoopissa kuvattuna.	21

- Kuva 8. Rock1-geeniä ekspressoivat, negatiivisella kontrolli-miRNA:lla transfektoidut solut fluoresenssimikroskoopissa. 22
- Kuva 9. Rock1-geeniä ekspressoivat, tutkittavalla miRNA:lla käsitellyt solut fluoresenssimikroskoopissa. 22

SANASTO

Digestio	DNA:n katkaiseminen entsyymillä
Eksoni	Proteiinia koodittava DNA-jakso
Ekspressio	Geenin ilmentyminen eli sen koodaaman proteiinin tuottaminen
Insertti	Vektoriin liitettävä vieras DNA
Introni	Eksonien välissä oleva DNA-jakso
Plasmidi	Rengasmainen DNA, joka monistuu solussa itsenäisesti
Transfektio	DNA:n siirtäminen eukaryootti- eli eläinsoluun
Transformaatio	DNA:n siirtäminen bakteerisoluun
Ligaatio	DNA-jaksojen liittäminen yhteen
Restriktioentsyymi	Entsyymi, joka katkaisee DNA-nauhan tarkasti määrätystä kohdasta
Vektori	Plasmidi tai virus, jota käytetään DNA:n kuljettajana geeniteknikassa

1 JOHDANTO

Tsoledronaatti on käytössä oleva, hyvin siedetty osteoporoosilääke, jota käytetään myös rintasyövän luumetastaasien hoidossa, mutta lääkkeelle tutkitaan uutta käyttötarkoitusta rintasyövän primäärikasvainten hoidossa (Morgan & Lipton 2010; Insalaco ym. 2012).

Mikro-RNA:t eli miRNA:t ovat RNA:ta joka ei koodaa proteiineja, vaan jotka säätelevät lähetti-RNA:ta useimmiten estämällä sen toiminnan (Guled & Knuutila 2013). Tiedetään, että tsoledronaatin vaikutuksesta tiettyjen mikro-RNA:iden tuotto muuttuu (Fanale ym. 2016). Jorma Määtän tutkimusryhmän Turun Yliopistolla käynnissä olevien tutkimusten mukaan, eräiden tsoledronaatin vaikutuksesta määrältään lisääntyneiden mikro-RNA:iden kohteena ovat syöpäsolujen migraatioon, luuhakuisuuteen ja jakaantumiseen liittyvien tiettyjen geenien lähetti-RNA:t, joiden translaation kyseiset mikro-RNA:t estävät. Tutkimuksen kohteena ovat geenit Rock1 (migraatio), OGN (osteoglysiini, luuhakuisuuteen liittyvä) ja E2F3 (jakaantuminen).

Geenejä, jotka virheellisesti toimiessaan voivat aiheuttaa syöpää tai lisätä sen pahanlaatuisia ominaisuuksia, kutsutaan syöpä-eli onkogeneiksi (Isola & Kallioniemi 2013). Mikro-RNA:t ohjaavat geenien toimintaa, ja tsoledronaatin vaikutukset rintasyöpäsoluihin perustuvat suurilta osin miRNA-molekyyleihin, ja niiden vaikutuksiin tiettyihin onkogeneihin. Tsoledronaatin on todettu vaikuttavan rintasyöpäsoluissa miRNA:iden määriin, osaan lisäävästi ja osaan vähentävästi. (Fanale ym. 2016.)

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on selvittää tsoledronaatin soveltuvuutta rintasyövän primäärikasvainten hoitoon. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on varmistaa tiettyjen mikro-RNA –molekyyliden kohteena olevat lähetti-RNA:t. Kohdelähetti-RNA:t on tarkoitus varmistaa soluviljelmillä, joihin on transfektoitu tutkittavia geenejä ilmaisevia plasmideja, ja jonka jälkeen soluihin lisätään tutkittavia miRNA-molekyylejä jäljitteleviä kaupallisia valmisteita. Tulokset olisivat luettavissa plasmidien fluoresoivien ominaisuuksien ansiosta fluoresenssimikroskoopilla.

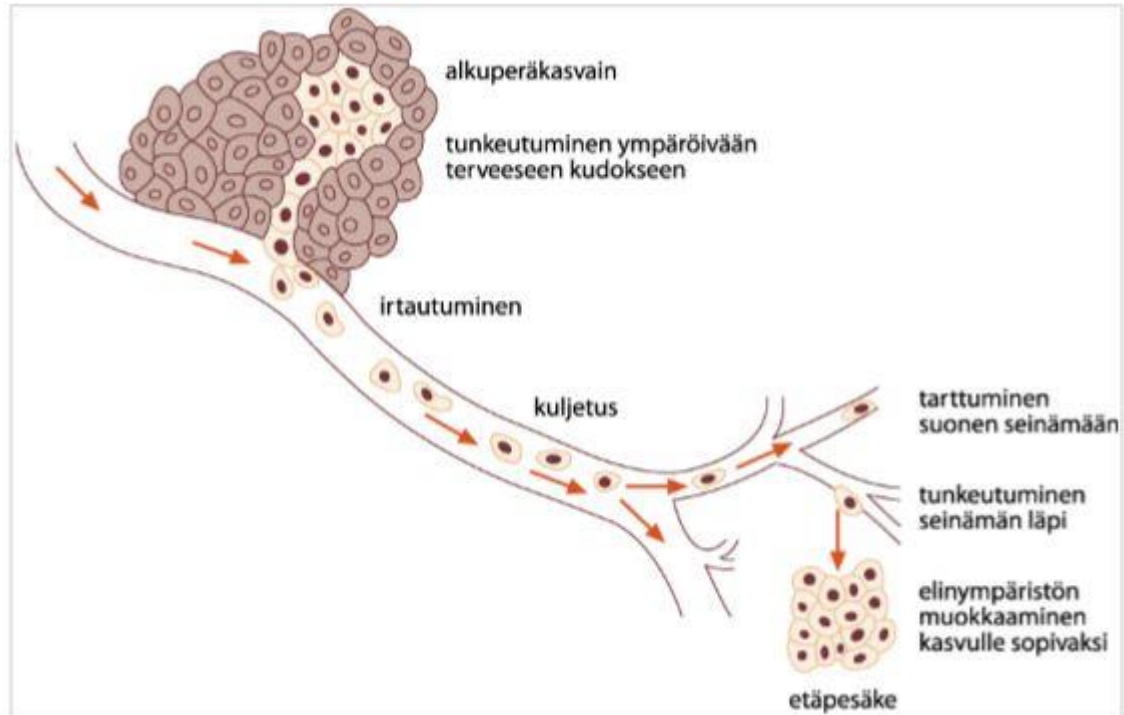
2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Rintasyöpä

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä, ja uusia tapauksia todetaan vuosittain n. 5000. Rintasyöpää esiintyy yleensä yli 45-vuotiailla, alle 30-vuotiailla tauti on harvinainen. Rintasyövän syitä ei täysin tunneta, mutta altistavia tekijöitä on useita, joista kaikkiin ei pystytä vaikuttamaan. Altistavia tekijöitä on mm. myöhään alkavat vaihdevuodet, aikaisin alkaneet kuukautiset, lapsettomuus, ylipaino ja pitkäaikainen hormonikorvaushoito. Perinnöllinen rintasyöpäalittius geenimutaation takia on taustalla n. 5-10% rintasyöpätapauksista. Rintasyöpä diagnosoidaan palpoimalla eli tunnustelemalla, kuvantamismenetelmillä (mammografia yleisin) ja histologisella paksuneulanäytteellä. (Huovinen 2017.)

Rintasyöpä voidaan jakaa histologisesti eli kudospillisesti kahteen päätyyppiin; duktaaliseen eli rintatiehyestä lähtöisin olevaan ja lobulaariseen eli rintarauhaslohkosta lähtöisin olevaan. Rintasyöpä voidaan jakaa biologisten ominaisuuksien perusteella estrogeeni- tai progesteronireseptorinegatiivisiin ja -positiivisiin, HER2-onkogeeni-positiivisiin ja -negatiivisiin, ja nopeasti tai hitaasti jakautuvaan. Syöpäsolujen reseptorinegatiivisuudet ja HER2-positiivisuus lisäävät rintasyövän aggressiivisuutta. Kolmoisnegatiivisen rintasyövän, missä ei ole estrogeeni- tai progesteronireseptoreita eikä HER2-onkogeeniä, ennuste on huonompi kuin muiden. Nykytietämyksen mukaan etäpesäkkeitä lähettänyt rintasyöpä on parantumaton sairaus, mutta erilaisilla hoidoilla taudin etenemistä pystytään hidastamaan. (Vehmanen 2017.)

Rintasyöpä tekee etäpesäkkeitä eli metastaaseja useimmiten luustoon, keuhkoihin, maksaan ja imusolmukkeisiin. (Mattson & Huovinen 2015.) Ensimmäinen vaihe etäpesäkkeiden synnyssä on syöpäsolujen hilseily alkuperäisestä kasvaimesta, jonka jälkeen ne liikkuvat imuneste- tai verenkierron mukana muualle elimistöön, läpäisevät hiusverisuonen seinämän ja jakaantuvat uudessa ympäristössään. Ns. vartijaimusolmukkeen tutkimuksessa rintasyövän yhteydessä paikallistetaan lähin imusolmuke ja tutkitaan, onko syöpä levinnyt imusolmukkeeseen ja sen perusteella voidaan päätellä, onko laajempi kainalon imusolmukkeiden poisto tarpeen. Valtimoverenkierron mukana liikkuvat rintasyöpäsolut metastasoivat tyypillisesti luustoon. Syöpäsolulle suotuisat olosuhteet ovat myös ilmeisesti merkittävä tekijä etäpesäkkeen synnylle. (Isola 2013.)



Kuva 1. Etäpesäkkeiden synty (Oppiportti 2017).

2.2 Mikro-RNA:t vilkkaan tutkimustyön kohteena

Mikro-RNA:t eli miRNA:t ovat lyhyitä RNA-jaksoja, jotka eivät koodaa proteiineja, vaan joiden tärkein tehtävä on säädellä geenien toimintaa estämällä lähetti-RNA:n translaatiota, ja ne ovat mukana lähes kaikissa fysiologisissa tapahtumissa. Mikro-RNA:ita koodaavat jaksot sijaitsevat sekä intronien että eksonien alueilla DNA:ssa, ja niissä on vastaavat promoottori- eli säätelyalueet kuin proteiineja tuottavissakin geeneissä. MiRNA:iden synteesi tapahtuu monivaiheisesti jopa yli tuhat emästä sisältävistä primäärijuosteista. Primääri-miRNA:sta muodostuu tumassa silmukoitumalla sytoplasmaan siirrettävä kaksijuosteinen ”hiuspinni”-rakenteinen välivaihe, josta muodostuu sytoplasmassa yleensä 22 emäsparin pituisia, yksisäikeisiä kypsiä miRNA-jaksoja, jotka ovat yhdistyneenä RISC (RNA-induced silencing complex) -proteiinimolekyyleihin. Häiriöt miRNA-molekyylien toiminnassa liittyvät useiden sairauksien ja varsinkin syövän kehittymiseen. Mikro-RNA:iden tutkimus tuo uusia mahdollisuuksia mm. syövän hoitoon ja diagnosointiin. (Guled & Knuutila 2013; Ohtsuka ym. 2015.)

Mikro-RNA:t eli miRNA:t ovat olleet viimeisen vuosikymmenen ajan hyvin vilkkaan biolääketieteellisen tutkimuksen kohteena. Kun löydettiin yhteys poikkeavasti toimivien

miRNA:iden ja monien sairauksien välillä, on ryhdytty tutkimaan uusia miRNA:ihin perustuvia hoitomuotoja erityisesti syöpätauteihin. MiRNA:t joko estävät mRNA:n translaation tai hidastavat sitä, ja siten estävät geenien toimintaa. MiRNA:n ja mRNA:n emäsjärjestysten vastaavuuteen perustuvien tietokonemallinnusten perusteella voidaan löytää ja ennustaa miRNA:iden kohdegeenejä ja selvittää tautimekanismeja. MiRNA:n sitoutuminen mRNA:han perustuu emästen vastaavuuteen miRNA:n sitoutumiskohdassa, ja vaaditaan ainakin viiden emäksen vastaavuus, että sitoutuminen voi tapahtua. Eri miRNA:ita tunnetaan ihmisellä yli kaksi tuhatta. (Guled & Knuutila 2013.)

Tsoledronaattiin liittyen Fanale ym. (2016) selvittivät tutkimuksessaan, voisiko mikroRNA:n ekspressioprofiili auttaa löytämään uusia tsoledronaatin vaikutuskohteita rintasyövässä. Vaikutuksia tutkittiin rintasyöpäsolumiljelmillä, jotka oli käsitelty tsoledronaattilla, verrattuna soluihin joita ei oltu käsitelty. Tuloksena oli, että löydettiin 54 eri miRNA:ta, joiden määrä oli tsoledronaatin vaikutuksesta muuttunut, ja jotka saattavat säädellä geenejä jotka liittyvät syöpään. Tutkijat päättelivät, että nykyiset tutkimukset osoittavat, että poikkeamat tiettyjen miRNA:iden määrissä tsoledronaatin annostelun jälkeen saavat aikaan tsoledronaatin tuumorivastaiset vaikutukset rintasyöpäsoluissa.

2.3 Tsoledronaatin mahdollisuudet rintasyövän hoidossa

Tsoledronaatti eli tsoledronihappo on bifosfonaattien ryhmään luettava lääkeaine, jota käytetään erityisesti naisten osteoporoosin hoidossa ja pahanlaatuisten luustometastaausten hoidossa, sekä pitkäkestoisen kortisonihoidon aiheuttaman luukadon sekä luuston Pagetin taudin hoidossa. Tsoledronaatti hakeutuu luukudokseen ja sen vaikutukset perustuvat suurelta luukudosta hajottavien osteoklastien toiminnan estämiseen. (Huupponen 2014.)

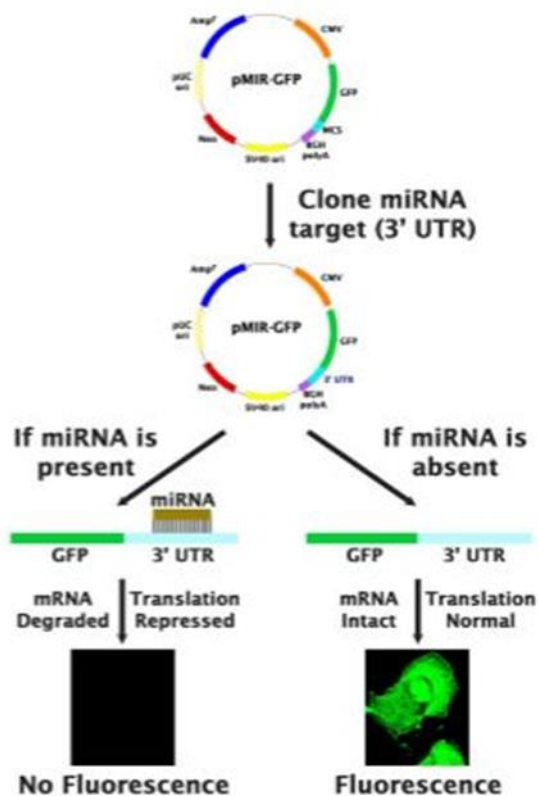
Coleman ym. (2013) tutkivat kattavassa ZO-FAST -tutkimuksessa (n= 1065) viiden vuoden ajan tsoledronaatin vaikutuksia hormonaalista lääkehoitoa rintasyöpään saavilla, vaihdevuosi-ikä ylittäneillä naisilla. Tutkimuksessa verrattiin potilaita, jotka saivat tsoledronaattia vain luunmurtumien tai madaltuneen luuntiheyden hoitoon, satunnaisesti valittuihin potilaisiin, jotka saivat tsoledronaattia aina puolen vuoden välein. Tuloksena oli, että tsoledronaattia puolen vuoden välein saaneilla potilailla oli 34% pienempi taudin uusiutumisen todennäköisyys ja parempi luuntiheys.

Insalaco ym. (2012) ovat analysoineet tsoledronaatin molekyyllitason mekanismeja ja kasvainvastaisia vaikutuksia rintasyöpäsolviljelmillä, jotka oli käsitelty pienillä annoksilla tsoledronaattia. Tuloksista ilmeni, että tsoledronaatti esti syöpäsolujen lisäkasvua, ja aiheutti muutoksia 126 eri geenin ilmentymisessä ja sitä kautta mm. vähensi syöpäsolujen leviämispotentiaalia sekä lisäsi verisuonten kehittymistä vastustavien tekijöiden ilmenemistä soluissa.

2.4 Opinnäytetyössä käytetyt vektorit

Vektorit ovat geenitekniikassa käytettyjä DNA-molekyyliä, jotka monistuvat itsenäisesti solussa sen muusta DNA:sta riippumatta. Vektoreihin eli plasmideihin saadaan liitettyä haluttu DNA-jakso, joka voidaan siirtää vektorin mukana isäntäsoluun. (Pärssinen ym. 2012.)

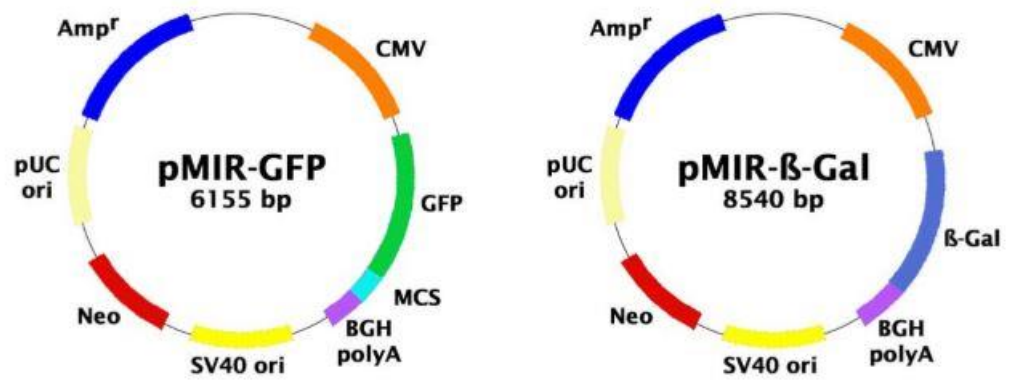
Tähän opinnäytetyöhön liittyvissä laboratoriotöissä käytettiin Cell Biolabs-valmistajan miRNASelect™ pMIR-GFP Reporter System:iä, joka sisältää GFP-vektorin, johon tutkittavia geenejä yhdistetään, ja β -Gal kontrolliplasmidin. GFP-vektori sisältää vihreää fluoresenssiä tuottavan geenin, jota voidaan havainnoida fluoresenssimikroskoopilla. Yhdistämällä eli kloonamalla oletettu miRNA:n kohdegeeni GFP-vektoriin, yhdistelmä-plasmiin kohdistuu vastaava säätely kuin miRNA:n kohdegeeniin, kun soluihin transfektoidaan tutkittavia miRNA-molekyyliä jäljitteleviä RNA-molekyyliä. B-Gal -kontrolliplasmidilla voidaan tarkastella transfektion onnistumista β -galaktosidaasiin perustuvan sinivärijäyksen avulla. (Cell Biolabs 2016.)



Kuva 2. GFP-vektorin toimintaperiaate (Cell Biolabs 2016).

GFP eli Green Fluorescent Protein on alun perin meduusasta eristetty geeni, joka tuottaa fluoresoivaa proteiinia, jota käytetään paljon geenitekniikassa. Kun fluoresoivaa ainetta valaistaan tietynvärisellä valolla, se hohtaa eli emittoi valoa joka on aallonpituudeltaan alukepäistä valoa suurempi, eli eri värinen. Tätä ilmiötä hyväksikäyttäen fluoresenssia pystytään tarkastelemaan fluoresenssimikroskoopilla. (Heino & Vuento 2014.)

B-Gal -kontrolliplasmidi sisältää LacZ-geenin, joka tuottaa β -galaktodaasientsyymiä. β -galaktodaasi hajottaa X-gal nimistä yhdistettä, joka on synteettinen laktoosia muistuttava yhdiste, jonka hajoamistuotteena syntyy sinistä väriainetta (Suominen ym. 2010, 80). β -Gal -plasmidin sisään ottaneet soluviljelmän solut ovat nähtävissä sinisenä valomikroskoopissa X-gal -käsittelyn jälkeen, ja osoittavat solujen transfektion onnistumisen, ja etteivät käytetyt miRNA-valmisteet ole sytotoksisia eli soluille haitallisia (Cell Biolabs 2016).



Kuva 3. Opinnäytetyössä käytetyt vektorit (Cell Biolabs 2016).

3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli varmistaa niiden mikro-RNA:iden, joiden tuottoa tsoledronaatti voimistaa, vaikutukset tiettyjen rintasyöpäsolujen geenien lähetti-RNA:han. Turun Yliopistolla käynnissä olevien tutkimusten ja tehdyn tietokone-ennusteen mukaan lääkkeen vaikutuksesta muodostuvat miRNA:t vaimentavat rintasyöpäsolujen migraatioon, luuhakuisuuteen ja jakautumiseen liittyvien geenien Rock1:n, ONG:n ja E2F3:n lähetti-RNA:n toimintaa, eli estävät niiden ilmentymistä. Tämän opinnäytetyön tutkimuskysymyksenä onkin, tunnistavatko tietyt mikro-RNA:t edellä mainittujen geenien lähetti-RNA:n ja siten estävät niiden toiminnan.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää tsoledronaatin käyttökelpoisuutta rintasyövän primäärikasvainten hoidossa, ja laajemmin edistää rintasyövän lääkehoidon kehitystä.

4 KÄYTÖNNÖN OSUUS

4.1 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön suunnitelma hyväksyttiin ja toimeksiantosopimus tehtiin tammikuussa 2017. Opinnäytetyöhön liittyvät laboratoriotyöt toteutettiin neljän viikon aikana tammi-kuussa ja helmikuun alussa. Laboratoriotyöt toteutettiin Turun Yliopiston biolääketieteen laitoksella solubiologian ja anatomian oppiaineen tiloissa. Opinnäytetyön varsinainen kirjoitusprosessi tapahtui kevään 2017 aikana.

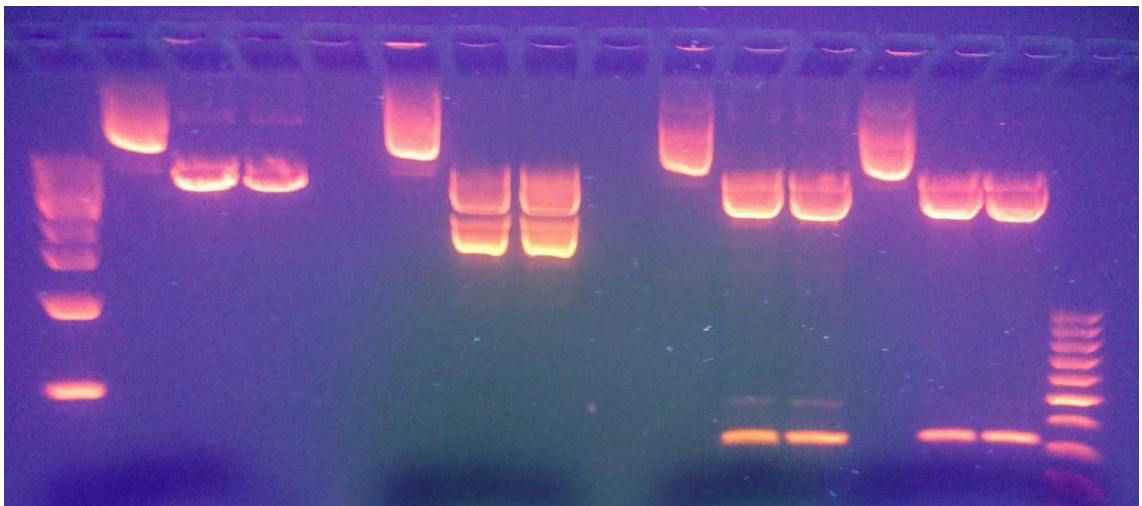
Opinnäytetyössä tarvittavat DNA-näytteet, plasmidit, soluviljelmät, synteettiset RNA-valmisteet ja tarvittavat välineet ja reagenssit saatiin käyttöön Turun Yliopistolta. Suunnitelman mukaan tutkimusaineistona olivat reportteri- ja kontrolliplasmideilla transfektoidut Cos-7 -soluviljelmät, joihin lisätään tutkittavia miRNA-molekyylejä jäljitteleviä kaupallisia valmisteita, joihin sisältyy myös negatiiviset kontrollit.

Alkuperäisen suunnitelman mukaan tutkimuksen kohteena olevat geenit yhdistetään reportterivektoreihin eli plasmideihin, jonka jälkeen yhdistelmä-DNA siirretään eli transformoidaan *E. coli* -isäntäsoluihin, joissa saadaan antibioottiselektion avulla monistettua yhdistelmä-DNA:ta. Plasmidi-DNA:t eristetään *E. coli* -soluista, minkä jälkeen niitä siirretään Cos-7 -soluviljelmiin kontrolliplasmidin kanssa. Tutkijan päättämässä aikapisteessä Cos-7-soluviljelmiin lisätään lisäksi mikro-RNA:ta, ja seuraavassa aikapisteessä soluja tarkastellaan fluoresenssimikroskoopissa. Toivottavana tuloksena mikro-RNA- valmisteilla käsitellyissä soluissa ei näy fluoresenssiä, kun taas kontrolliviljelmissä näkyy (käsitelty muuten samoin, mutta lisätty mikro-RNA ei vastaa troledronaatin tuottamaa mikro-RNA:ta). Soluille tehdään lisäksi sinivärjäys, jossa varmistetaan kontrolliplasmidin avulla, että tutkittaviin soluihin on onnistuttu siirtämään plasmidi-DNA:ta. Soluviljelmistä otetaan kuvat fluoresenssimikroskoopissa.

Syventävässä erikoisalan harjoittelussa tehdyissä, opinnäytetyötä valmistelemissa laboratoriotöissä Rock1-geenin kohdalla pystyttiin jo osoittamaan miRNA:n vaikutukset geenin mRNA:han, tosin mukana ei ollut β -gal -kontrolliplasmidia, joten työt oli tarkoitus vielä toistaa kontrolliplasmidin kanssa. Opinnäytetyön käytännön osuudessa päätettiin ensimmäiseksi keskittyä kahteen muuhun geeniin; E2F3 ja OGN.

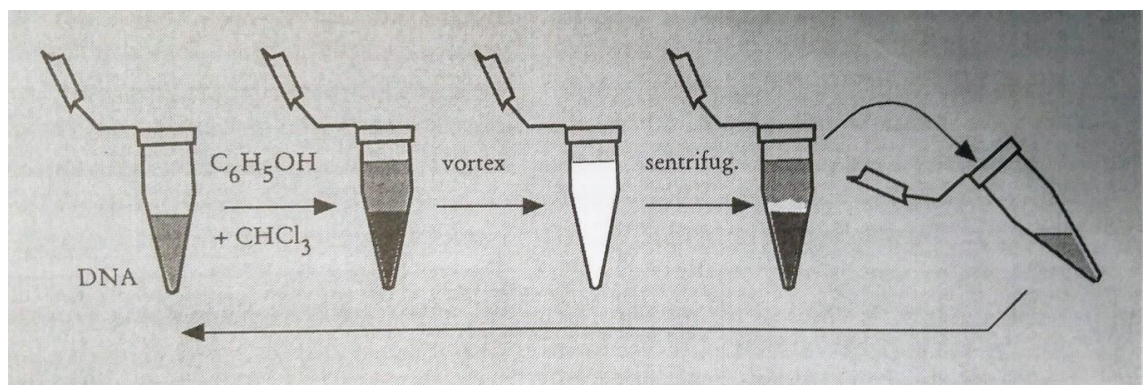
Käytännössä opinnäytetyö ei edennyt alkuperäisen suunnitelman mukaan, ja käytännön toteutukseen varattu aika loppui kesken ennen kuin päästiin etenemään varsinaisiin soluviljelmillä tehtäviin tutkimuksiin. Tutkittavat geenit olivat TOPO-kloonausvektoreissa, ja opinnäytetyössä käytettyjen kloonien emäsjärjestys oli varmistettu sekvensoimalla, jolla varmistettiin että opinnäytetyössä käytetyt geenit olivat oikeita, eivätkä esim. sisällä mutaatioita.

Kloonausvektoreista geenit katkaistiin irti eli digestoitiiin restriktioentsyymien avulla siirrettäväksi varsinaiseen fluoresenssivektoriin. DNA:lle tehtiin kaksoisdigestio käyttämällä *Xba*I ja *Kpn*I -ensyymeitä. Restriktioentsyymien lämpöinaktivoinnin jälkeen digestoiduista inserteistä ja vektorista ajettiin agarosigeelielektroforeesi (AGE). Geeli kuvattiin UV-valossa, minkä jälkeen oikean kokoiset DNA-bandit leikattiin talteen geeliltä ja puhdistettiin Qiagen-valmistajan Gel Extration Kitillä valmistajan ohjeiden mukaan. Digestoidut geenit ja samoilla restriktioentsyymeillä avattu GFP-vektori yhdistettiin liigaasiensyymien avulla, jotta saataisiin yhdistelmä-plasmidiDNA siirrettäväksi *E. coli*-soluihin. Kohdesoluina olivat kompetenteiksi käsitellyt *E. coli* -solut, joihin ligaatioseosta transformoitiin valmistajan (New England Biolabs) ohjeiden mukaan. Yhdistelmäplasmidin siirtäminen eli transformoiminen *E. coli*-soluihin osoittautui kuitenkin haastavaksi, ja vaihetta jouduttiin toistamaan useita kertoja tuloksetta. Restriktioentsyymeinä käytettiin myöhemmillä kerroilla *Bam*HI ja *Not*I -ensyymeitä.



Kuva 4. Agarosigeeli jossa digestioimatonta ja digestoitua DNA:ta. Vasemmalta oikealle: NEB 1k bp ladder, GFP-vektori, E2F3, OGN, OGN, Thermo Fisher 100 bp Gene Ruler (digestoidut DNA:t jaettuna kahteen kaivoon).

Ongelmiin lähdettiin etsimään ratkaisua tekemällä DNA:lle fenoliuutto, jolla puhdistetaan DNA:ta proteiiniepäpuhtauksista, kuten mahdollisista entsyymijäämistä, jotka voisivat häiritä seuraavassa vaiheessa tehtäviä ligaasireaktioita. Fenoliuutto perustuu molekyylien erilaisiin liukoisuuksiin kahteen toisiinsa sekoittumattomaan nesteeseen polaarisuutensa mukaan. DNA hakeutuu negatiivisesta varauksestaan johtuvan polaarisuutensa ansiosta vesipitoiseen nestefaasiin, kun taas proteiinit saostuvat fenolin vaikutuksesta vähemmän polaariseen fenoli-kloroformifaasiin. Sentrifugoinnin avulla faasit saadaan erottumaan painonsa mukaan ja DNA saadaan talteen vesifaasin mukana. (Zumbo 2012b.)



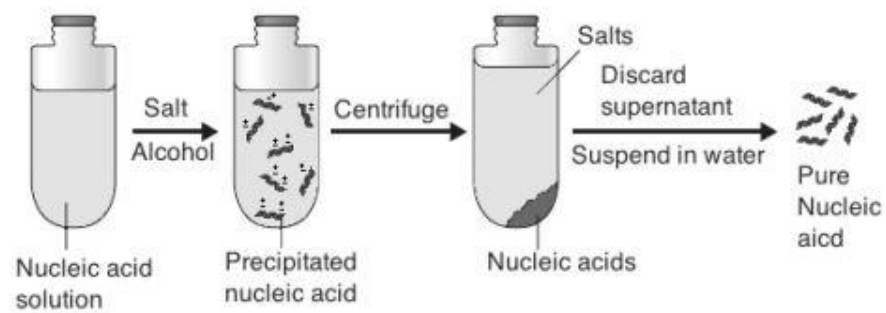
Kuva 5. Fenoli-kloroformiuutto (Suominen & Ollikka 2004).

Vektori- ja insertti-DNA:n yhteen liittämistä ligaasientsyymin avulla toistettiin erilaisilla inkubaatioajoilla ja lämpötiloilla, jotta olisi löydetty optimaaliset olosuhteet. Erilaisina vaihtoehtoina kokeiltiin mm. inkubaatiota yön yli $+4$ asteessa ja vaihtoehtoisesti $+16$ asteessa, lisäksi kahden tunnin inkubaatiota huoneenlämmössä. Näillä muutoksilla ei kuitenkaan saatu toivottua tulosta.

Inkuboituneesta ligaatioseoksesta ajettiin agarosegeelielektroforeesi, jotta nähtäisiin onko ligaatio onnistunut. Geelillä oli nähtävissä pelkästään ns. smearia, eli haaleana UV-valossa erottuvaa DNA:ta ilman selkeitä bandeja koko matkalla näytekaivon kohdalla, joka osoitti että ligaatioreaktiossa oli muodostunut eripituisia lineaarisia DNA-jaksoja ympärämäisen plasmidi-DNA:n sijaan. Lineaarisen DNA:n muodostumisen estämiseksi päätettiin inserteille tehdä 5'-päiden fosfaattiryhmien poisto alkalisella fosfataasilla. Käsitteily päätettiin tehdä inserteille, koska aikaisemmissa kokeissa vektoritausta ei ollut ongelma. Vektoritaustalla tarkoitetaan ilman inserttiä itsensä kanssa ligoituneen vektorin ilmenemistä transformoiduissa soluissa, eli kloonit ovat ottaneet sisäänsä pelkän vektorin (Suominen 2010). Ensimmäisellä kerralla käytettiin New England Biolabsin (NEB)

Antarctic Phosphatase ja toisella yrityksellä NEB:in Shrimp Alkaline Phosphatasea, mutta majoilla ei kasvanut pesäkkeitä.

Transformaation tehostamiseksi ligoatiosoksen DNA tiivistettiin etanolisaostuksella, jotta kompetentteihin *E. coli*-soluihin saataisiin lisättyä mahdollisimman paljon plasmidi-DNA:ta. Lisäämällä DNA:ta sisältävään vesiliuokseen etanolia ja suoloja DNA saostuu ja voidaan uudelleen liuottaa pienempään tilavuuteen vettä, jolloin saadaan konsentroitua DNA:ta. (Zumbo 2012a.) Tähän opinnäytetyöhön liittyvät etanolisaostukset tehtiin jäällä -70°C asteessa säilytetyllä absoluuttisella etanolilla. Näin saatua tiivistettyä DNA:ta transformoitiin *E. coli*-soluihin valmistajan protokollaa noudattaen (New England Biolabs 2017), mutta maljoille ei muodostunut pesäkkeitä.



Kuva 6. Etanolisaostus (Zumbo 2012a).

4.2 Opinnäytetyön metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisen eli eksperimentaalisen tutkimuksen keskeisiä piirteitä ovat mm. aikaisempaan teoriaan tai tutkimuksiin perustuvat olettamattomat eli hypoteesit, syyn ja seurauksen lakien korostaminen, sekä kerättävän aineiston saattaminen numeeriseen muotoon. (Hirsjärvi ym. 2009.)

Kvantitatiivinen tutkimus pyrkii löytämään syy-seuraussuhteita, selittämään, ennustamaan, kartoittamaan tai vertailemaan ilmiöitä. Tutkimustehtävä on usein asetettu hypoteesin muotoon, eli sisältää teorian perustuvan väittämän tai ennakoivan selityksen tutkittavasta ilmiöstä. Teoreettiset käsitteet ovat kvantitatiivisen tutkimuksen lähtökohta. (Vilka 2007.)

Tämän opinnäytetyön metodologinen lähtökohta on kvantitatiivinen, koska opinnäytetyössä on tarkoitus havainnoida solujen fluoresenssia ja fluoresenssin sammumista osoituksena mikro-RNA:iden vaikutuksista, ja mahdolliset tulokset ovat joko positiivinen tai negatiivinen, jolle voidaan antaa numeerinen arvo. Opinnäytetyön tavoite ja tarkoitus pohjautuvat teoretietoon ja sisältävät hypoteesin, mikä on tyypillistä kvantitatiiviselle tutkimukselle (Vilkkä 2007).

4.3 Opinnäytetyön eettiset lähtökohdat

Tutkimusetiikalla eli hyvällä tieteellisellä käytännöllä tarkoitetaan yleisiä pelisääntöjä tutkimuksen tekemisessä. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu tiedeyhteisön hyväksymien tutkimus- ja tiedonhankintamenetelmien käyttö, uuden tiedon tuottaminen tai vanhan tiedon uuden käyttötavan esille tuominen, sekä vilpittömyys ja rehellisyys toisia tutkijoita kohtaan. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluu myös teoreettisen toistettavuuden periaate, millä tarkoitetaan, että tutkimus on kirjoitettu niin täsmällisesti, tarkasti ja rehellisesti, että sen sisältö on lukijalle ymmärrettävissä. (Vilkkä 2005.)

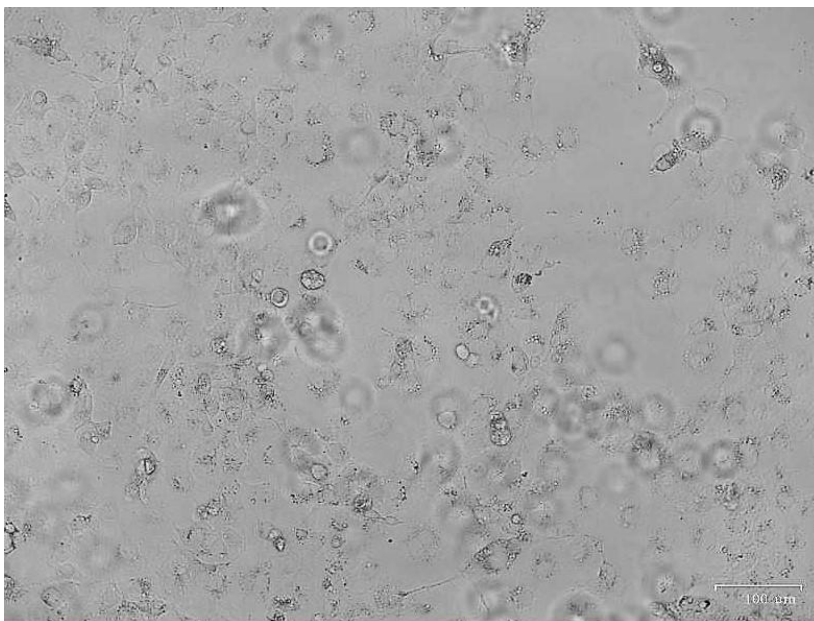
Tämä opinnäytetyö on osa syöpälääketutkimusta, jonka tavoitteena on voida hoitaa rintasyöpäpotilaita entistä paremmin. Potilasnäytteitä ei käsitelty opinnäytetyöhön liittyen. Tämä opinnäytetyö toteutettiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä noudattaen, joihin kuuluu mm. rehellisyys, tarkkuus ja huolellisuus kaikissa vaiheissa sekä asianmukainen viittaaminen muiden tutkijoiden tekemään työhön (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012). Tätä opinnäytetyötä varten tehtäviin laboratoriotöihin ei tarvittu erityistä projektikohtaista lupaa. Työtilat ja niiden toimintaperiaatteet olivat lääninhallituksen puolesta hyväksytyt kyseessä olevien laboratoriotöiden tekemiseen.

5 TULOKSET JA POHDINTAA

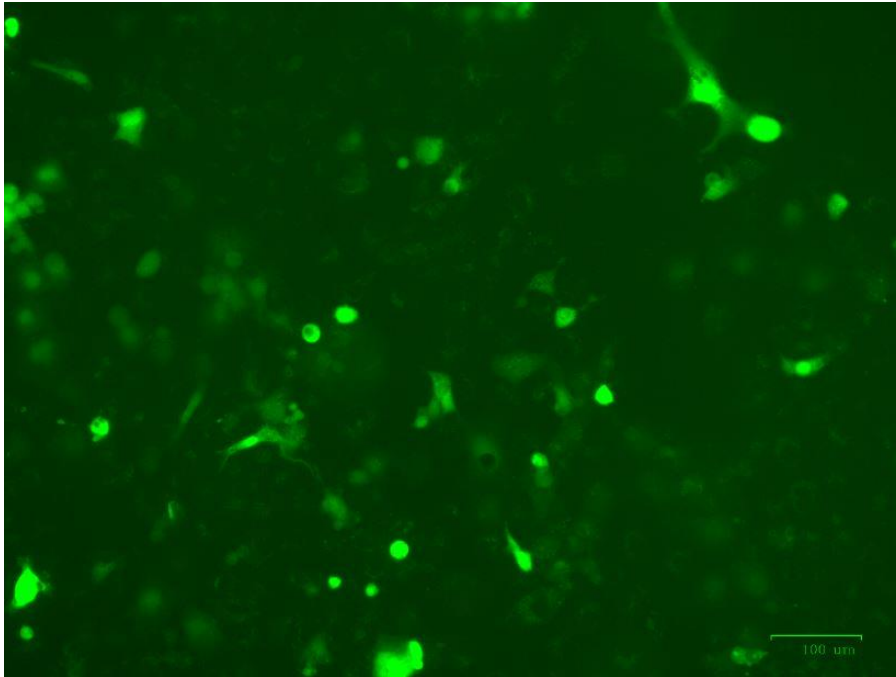
5.1 Laboratoriotöiden tulokset

Opinnäytetyön tekemiseen varattu aika loppui kesken ennen kuin päästiin varsinaiseen tuloksien kannalta kriittiseen vaiheeseen. Suunnitellut laboratoriotyöt eivät sinänsä olisi olleet lainkaan mahdottomia toteuttaa aikataulun ja opinnäytetyön opintopistemäärän puitteissa, mutta alkuvaiheissa kohdatut haasteet veivät suhteettoman paljon aikaa. Alkuvaiheen laboratoriotyöt, kuten transformoitujen *E. coli* -solujen kasvatus maljoilla, olivat paljon aikaa vieviä työvaiheita, joten aikatauluun oli mahdoton kiriä muiden opintojen kärsimättä tai valmistumisen viivästyttä.

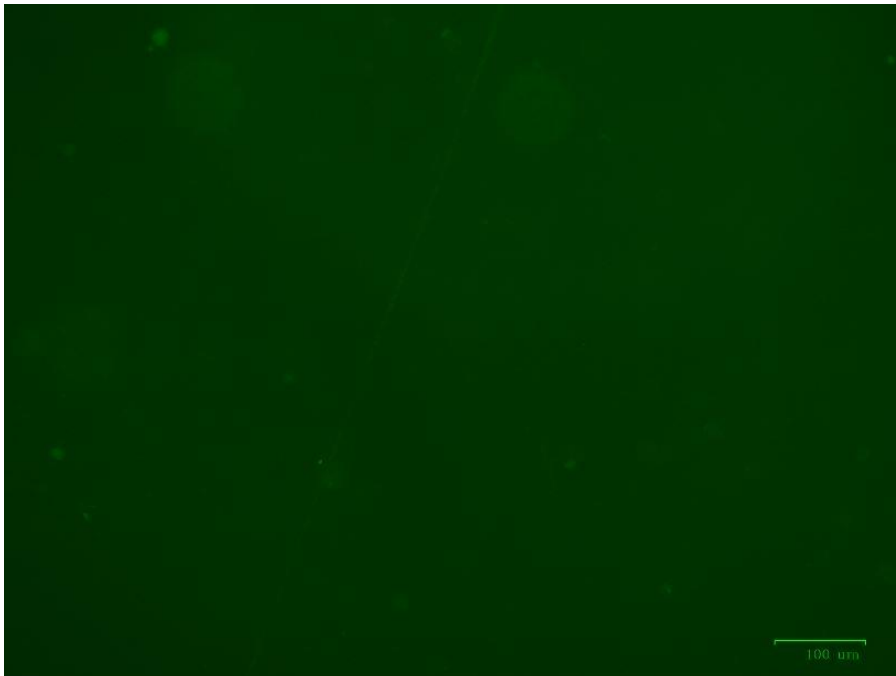
Aikaisemmin samassa paikassa toteutetussa, syventävien opintojen harjoittelussa tehdyssä opinnäytetyötä valmistelemissä laboratoriotöissä, Rock1-geenin kohdalla oltiin jo päästy miRNA-vaiheeseen asti, ja fluoresenssimikroskoopissa oli nähtävissä toivotut tulokset; kontrollisoluissa näkyi fluoresenssia, kun taas tutkittavaa mikro-RNA:ta vastavalla Mimic miRNA:lla käsitellyissä soluissa fluoresenssi oli sammunut. Tässä harjoitustyössä ei kuitenkaan ollut mukana β -Gal -kontrolliplasmidia, joten transfektion onnistumista ei pystytty sen avulla varmentamaan.



Kuva 7. Tutkittavia soluja kirkaskenttämikroskoopissa kuvattuna.



Kuva 8. Rock1-geeniä ekspressoivat, negatiivisella kontrolli-miRNA:lla transfektoidut solut fluoresenssimikroskoopissa.



Kuva 9. Rock1-geeniä ekspressoivat, tutkittavalla miRNA:lla käsitellyt solut fluoresenssimikroskoopissa.

5.2 Luotettavuuden tarkastelu

Opinnäytetyössä käytetyt DNA:t oli sekvensoitu, eli niiden oikeellisuus oli vahvistettu. Menetelmän toimivuus oli osittain pystytty testaamaan aiemmissa harjoittelun aikana tehdyissä laboratoriotöissä. Opinnäytetyöhön liittyvissä laboratoriotöissä ohjeita pyrittiin seuraamaan täsmällisesti ja noudattamaan tarkkuutta töiden kaikissa vaiheissa. Opinnäytetyön teoreettinen viitekehys perustui mahdollisimman tuoreisiin ja luotettaviin lähteisiin.

Opinnäytetyön tekijän kokemattomuus ja rajalliset tiedot joistakin menetelmistä ovat mahdollisia virhelähteitä. Laboratoriotyöt sisälsivät monia peräkkäisiä, toisiinsa liittyviä työvaiheita, minkä takia mahdolliset virheet kertautuvat seuraaviin vaiheisiin.

5.3 Jatkotutkimusaiheet

Vaikkakin jo syventävien opintojen harjoittelussa pystyttiin todentamaan Rock1-geenin kohdalla menetelmän toimivuus ja odotetut tulokset, osoittautui kahden toisen geenin, E2F3:n ja OGN:n, kohdalla suunniteltujen laboratoriotöiden toteuttaminen haastavaksi. Tässä osiossa esitetään mahdollisia ratkaisuja laboratoriotöiden toteutukseen menestyksekkäästi myös E2F3:n ja OGN:n osalta.

Jatkotutkimusaiheena voisi olla hyödyllistä tehdä etanolisaostus huoneenlämpöisellä etanolilla, sillä Zumbon (2012a) mukaan alle 0°C etanoli heikentää tulosta, koska erittäin kylmissä lämpötiloissa vesi-alkoholiliuoksen eristevakio kasvaa jolloin saostusteho vähenee, lisäksi liuoksen viskositeetin lisääntyessä DNA:n saostuminen vaikeutuu ja suo- lojen kertyminen DNA-kasaumiin lisääntyy. Vaikka DNA:n konsentroiminen etanolisaostuksella ei ole välttämätöntä Qiaex II Gel Extraction -kittiä käytettäessä, sillä Qiaex II- kitin valmistajan sivujen mukaan DNA-jaksojen eristämiseen agarosigeeliltä ei tarvita lisäksi etanolisaostusta eikä fenoli-kloroformiuuttoa (Qiagen 2017), molempia perinteisiä menetelmiä voi olla hyödyllistä käyttää apuna uusien menetelmien rinnalla.

TAE (Tris-Asetaatti-EDTA) -geelipuskuria AGE:ssa voisi olla suositeltavaa käyttää TBE(Tris-boraatti-EDTA) -puskurin sijasta. QIAEX II Gel Extraction Kit on silikamene- telmä, jossa DNA sitoutuu silikapartikkeleihin kaotrooppisten suo- lojen läsnä ollessa, ja

valmistajan (Qiagen 2017) nettisivujen mukaan menetelmä toimii TBE- ja TAE-puskuriliuoksissa. Kuitenkin joidenkin lähteiden mukaan TBE-puskuri heikentää DNA:n sitoutumista silikapartikkeleihin tai estää menetelmän toiminnan kokonaan ja sen sisältämä boaraatti on entsyymi-inhibiittori jonka jäämät voivat haitata ligaatioita (Suominen & Ollikka 2004; Oswald 2009).

Fosfataasikäsittelyä vektorille inserttien sijaan suositellaan kirjallisuudessa (Suominen ym. 2010; Pärssinen ym. 2012) ja vaikka opinnäytetyössä päädyttiin tekemään käsittely inserteille koska vektoritausta ei ollut ongelma, voisi perinteistä menettelyä kokeilla.

Myös erilaista puhdistusmenetelmää DNA:lle geeliajon jälkeen olisi voinut kokeilla, esim. eri valmistajan kittiä jossa olisi käytetty silika-pylväsmentelmää, koska silloin pipetointivirheillä olisi vähemmän merkitystä, DNA voitaisiin saada talteen tehokkaammin ja puhtaampana. Vaikka mentelmänä pylväsmentelmä on hieman kalliimpi, voisi se olla varmakäyttöisempi ja nopeampi, sillä tällä menetelmällä DNA-preparaatti voidaan sekä puhdistaa että väkevöidä samanaikaisesti (Suominen & Ollikka 2004).

Opinnäytetyöhön liittyvien laboratoriotöiden jakson lopuksi kloonattiin ja puhdistettiin uutta plasmidi-DNA:ta E2F3- ja OGN-glyserolistokeista, joissa tutkittavia geenejä oli TOPO-vektoreissa *E. coli*-soluihin transformoituina. Toistuvat jäädytykset ja sulatukset voivat olla haitallisia DNA:lle jääkiteiden muodostumisen takia (Lister 2016), joten tuoreilla puhdistetuilla plasmidi-DNA näytteillä voidaan päästä parempiin tuloksiin. Voisi myös olla järkevää jakaa plasmidi-DNA pienempiin eriin joiden määrä on arvioitu käyttötarpeen mukaan, jolloin toistuvulta pakastamiselta ja sulattamiselta vältyttäisiin.

Rock1-geenin kohdalla koe-asetelma pitäisi vielä toistaa niin, että β -gal -plasmidi on mukana, jotta niissä soluissa, joissa fluoresenssi on sammunut, voidaan osoittaa transfektion onnistuminen kontrolliplasmidin avulla.

5.4 Ammatillinen kasvu

Bioanalyytikon ammatin kannalta opinnäytetyö oli antoisa kokemus, koska käytännön osuudessa kertautuivat monet yhdistelmä-DNA-tekniikan perusmenetelmät. Opinnäytetyön yhteydessä tutuksi tulivat kaikki neljä tärkeintä yhdistelmä-DNA-tekniikan perusmenetelmää; restriktioentsyymien, ligaasien ja vektoreiden käyttö ja solujen transformaatio. Koska laboratoriotyöt olivat kiinteästi yhteydessä toisiinsa ja muodostivat yhtenäisen ko-

konaisuuden, auttoivat ne ymmärtämään syvällisemmin solu- ja molekyylibiologiaa/ geenitekniikkaa. Ammatillista kasvua edisti myös tieteellisessä tutkimuksessa osallisena oleminen ja yliopistoyhteisöön tutustuminen.

LÄHTEET

Cell Biolabsin www-sivut. Product Data Sheet miRNASelect™ pMIR-GFP Reporter System. Viitattu 21.11.2016.

Coleman, R. de Boer, H. Eidtmann, A. Lombart, N. Davidson, P. Neven, G. von Minckwitz, H. P. Sleeboom, J. Forbes, C. Barrios, A. Frassoldati, I. Campbell, O. Paija, N. Martin, A. Modi, & N. Bundred. 2013. Zoledronic acid (zoledronate) for postmenopausal women with early breast cancer receiving adjuvant letrozole (ZO-FAST study): final 60-month results. *Annals of Oncology* 2, 398-405.

Fanale D, Amodeo V, Bazan V, Insalaco L, Incorvaia L, Barraco N, Castiglia M, Rizzo S, Santini D, Giordano A, Castorina S, Russo A. 2016. Can the microRNA expression profile help to identify novel targets for zoledronic acid in breast cancer? *Oncotarget*. 7, 29321-32.

Guled M. & Knuutila, S. 2013. Mikro-RNA:t ja syöpä. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. 129, 1661-9.

Heino J. & Vuento M. 2014. Biokemian ja solubiologian perusteet. 3. uud. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2009. Tutki ja kirjoita. 15. – 17. uudistettu painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.

Huovinen, R. 2017. Rintasyöpä. Teoksessa *Lääkärin käsikirja*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 16.5.2017. www.oppiportti.fi

Huupponen R. 2014. Bifosfonaatit. Teoksessa Pelkonen, O. & Ruskoaho H (toim.) *Lääketieteellinen farmakologia ja toksikologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 20.11.2016. www.oppiportti.fi

Insalaco, L., Gaudio, F. D., Terrasi, M., Amodeo, V., Caruso, S., Corsini, L. R., Fanale, D., Margarese, N., Santini, D., Bazan, V. and Russo, A. 2012. Analysis of molecular mechanisms and anti-tumoural effects of zoledronic acid in breast cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 16, 2186–2195.

Isola, J. 2013. Etäpesäkkeiden synty. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. J., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkiö, S., Kouri, M. & Teppo, L. (toim.) *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 21.5.2017. www.oppiportti.fi.

Isola J. & Kallioniemi A. 2013. Onkogeeneit syövän synnyssä. Teoksessa Joensuu, H., Roberts, P. J., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkiö, S., Kouri, M. & Teppo, L. (toim.) *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. Viitattu 23.11.2016. www.oppiportti.fi.

Lister, I. 'Hot, Frozen, Sublimed and Blown: Biological Sample Storage Methods Summarized – Part One'. *BitesizeBio*. 9.7.2016. Viitattu 8.4.2017. <http://bitesizebio.com/25729/hot-frozen-sublimed-and-blown-biological-sample-storage-methods-summarized-part-one/>

Mattson, J. & Huovinen, R. 2015. Levinneen rintasyövän hoito. *Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim*. 11, 1033-40.

Morgan, G. & Lipton, A. 2010. Antitumor Effects and Anticancer Applications of Bisphosphonates. *Seminars in Oncology*, Volume 37, 30 - 40.

New England Biolabsin www-sivut. Viitattu 7.4.2017.

- Oswald, N. ' Which is Best: TAE, TBE or Something Else?'. BitesizeBio. 19.11.2009. Viitattu 8.4.2017. <http://bitesizebio.com/2737/tae-or-tbe-electrophoresis/>
- Ohtsuka, M., Ling, H., Doki, Y., Mori, M., & Calin, G. A. 2015. MicroRNA Processing and Human Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 8, 1651–1667.
- Pärssinen, R., Suominen, I. & Haajanen, K. 2012. Biogeeni – Ammatillista biokemiaa ja geeniteknikkaa. Helsinki: Opetushallitus.
- Qiagenin www-sivut. Viitattu 7.4.2017.
- Suominen, I. & Ollikka, P. 2004. Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. 3-2. painos. Helsinki: Opetushallitus.
- Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.
- Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa (HTK-ohje 2012). Tutkimuseettisen neuvottelukunnan www-sivut. Viitattu 2.12.2016.
- Vehmanen, L. 2017. Tietoa potilaalle: Rintasyöpä: toteaminen ja ennuste. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 21.5.2017. www.terveysportti.fi
- Vilka, H. 2005. Tutki ja kehitä. 1. – 2. painos. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi.
- Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa: määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Kustannusosakeyhtiö Tammi. Viitattu 25.4.2017. <http://hanna.vilka.fi/wp-content/uploads/2014/02/Tutki-ja-mittaa.pdf>
- Zumbo, P. 2012a. Ethanol Precipitation. Weill Cornell Medical Collegen www-sivut. Viitattu 8.3.2017.
- Zumbo, P. 2012b. Phenol-chloroform Extraction. Weill Cornell Medical Collegen www-sivut. Viitattu 8.3.2017.