

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

2017

Mira Hannolin

**TSOLEDRONAATIN IN VIVO -
VAIKUTUKSET RINTASYÖVÄN
LÄHETTI-RNA:N
ILMENTYMISEEN**

Mira Hannolin

TSOLEDRONAATIN IN VIVO-VAIKUTUKSET RINTASYÖVÄN LÄHETTI-RNA:N ILMENTYMISEEN

Rintasyöpä on yleisin naisilla esiintyvä syöpä Suomessa. Tällä hetkellä muualle elimistöön etäpesäkkeitä lähettänyttä rintasyöpää ei pystytä parantamaan, vaan hoidossa keskitytään potilaan elinajan pidentämiseen ja oireiden hoitamiseen. Tsoledronaattia käytetään osteoporoosin ja luumetastaaseista johtuvien oireiden etenemisen hidastamiseen tai estämiseen, sillä on aiemmin havaittu olevan mahdollisesti myös joitakin suoraan syövän vastaisia vaikutuksia.

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli osana muuta tutkimusta selvittää, onko tsoledronaatin antamisesta apua rintasyöpäpotilaalle jo varhaisessa taudin toteamisen vaiheessa. Työssä mitattiin Balb/c nude -hiirten ihonalaiskudokseen istutetun kolmoisnegatiivisen rintasyöpäkasvaimen mRNA:n ilmentymistä tsoledronaattia saaneissa ja kontrolliryhmissä.

Kasvainnäytteistä eristettiin RNA, josta käänteistranskription avulla valmistettiin mRNA:lle komplementaarinen cDNA. cDNA:sta tutkittiin kiinnostuksen kohteiksi valittujen Rock1- ja E2F3 -geenien mRNA-aktiivisuutta reaaliaikaisen polymeerasiketjureaktion avulla. Valitut geenit liittyvät solun migraatioon ja solusyklin säätelyyn.

Tsoledronaattilla ei näyttäisi olevan merkittävää vaikutusta Rock1:n ilmentymiseen. E2F3:n ekspressio oli merkittävästi suurempi TLR9-knockout -kontrolliryhmässä kuin normaalissa kontrolliryhmässä, mikä viittaisi siihen, että TLR9:ää ekspressoimattomat kasvainsolut jakautuisivat voimakkaammin. E2F3:n ekspressio aleni tsoledronaattia saaneessa TLR9-knockout -ryhmässä, mikä viittaisi siihen, että tsoledronaatti vähentäisi kasvainsolujen jakautumista TLR9:ää ekspressoimattomassa kasvaimessa.

ASIASANAT:

Lähettilä-RNA, rintasyöpä, reaaliaikainen polymeerasiketjureaktio, tsoledronaatti

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biomedical science

2017 | 26+2

Mira Hannolin

THE IN VIVO EFFECTS OF ZOLEDRONATE ON MESSENGER RNA EXPRESSION IN BREAST CANCER

Breast cancer is the most common cancer appearing in women in Finland. A metastatic breast cancer is considered incurable for now, so the treatment is focused on relieving the symptoms and lengthening the lifespan of the patient. Zoledronate has been noted to possibly have some direct anticancer effects.

The aim of this thesis was as a part of other study to see if patients with an early state breast cancer profit of zoledronate treatment. The mRNA expression of a triple negative breast cancer xenografted in balb/c nude mice subcutaneous tissue was studied in this experiment. There were control groups and zoledronate treated groups.

RNA was extracted from the tumor samples and then a complementary cDNA was made from the mRNA using reverse transcription. The mRNA activity of Rock1 and E2F3 was measured using Real Time polymerase transcription. The genes of interest are associated with cell migration and regulation of cell cycle.

Zoledronate doesn't seem to have a statistically significant effect on Rock1 expression. E2F3 expression was significantly higher in no treatment TLR9 knockout-group compared to the normal control group, which suggests that the cell division is less frequent in a tumor that expresses TLR9. E2F3 expression decreased in zoledronate treated TLR9 knockout groups. This suggests that zoledronate decreases cell division in a tumor that doesn't express TLR9.

KEYWORDS:

Messenger RNA, breast cancer, Real Time polymerase chain reaction, zoledronate

SISÄLTÖ

| | |
|--|-----------|
| KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO | 6 |
| 1 JOHDANTO | 7 |
| 2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA | 8 |
| 2.1 Tsoledronaatti | 8 |
| 2.2 Rintasyöpä | 8 |
| 2.3 Lähetti-RNA ja RNA-interferenssi | 11 |
| 2.4 In vivo-tutkimus | 11 |
| 2.4.1 Hiiri- ja solulinjat | 12 |
| 2.4.2 TLR9-knockout | 12 |
| 3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET | 13 |
| 4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS | 14 |
| 4.1 Tutkimuksen suoritus | 14 |
| 4.2 Metodologiset lähtökohdat | 20 |
| 4.3 Eettinen tarkastelu | 21 |
| 5 TUTKIMUSTULOKSET JA POHDINTA | 22 |
| LÄHTEET | 25 |

LIITTEET

Liite 1. Direct-zol RNA MiniPrep, Zymo Research

Liite 2. SensiFAST cDNA Synthesis Kit, Bioline

KUVAT

| | |
|--|----|
| Kuva 1. Metastaasien synty (Isola 2013) | 10 |
| Kuva 2. hiiriryhmät ja niiden saamat käsittelyt | 14 |
| Kuva 3. PCR:n periaate. | 16 |
| Kuva 4. Esimerkki pipetointikartasta. Näytenumerot ja vihreällä pohjalla Rock1, keltaisella E2F3 ja punaisella β -aktiini. | 17 |

| | |
|---|----|
| Kuva 5. Ensimmäisen analysoidun levyn sulamiskäyrät | 20 |
|---|----|

KUVIOT

| | |
|---------------------------------------|----|
| Kuvio 1. Rock1-aktiivisuus ryhmittäin | 23 |
| Kuvio 2. E2F3-aktiivisuus ryhmittäin | 23 |

TAULUKOT

| | |
|--|----|
| Taulukko 1. RNA-pitoisuudet kunkin ryhmän numeroiduissa näytteissä ng/ μ l | 15 |
| Taulukko 2. Reaktioseoksen komponentit kuoppaa kohden | 18 |
| Taulukko 3. qPCR protokolla. vaiheet 2-4 toistettiin 40 kertaa. Vaiheet 5-7 ovat sulamiskäyrää varten. | 19 |
| Taulukko 4. Fold change -arvojen keskiarvot ryhmittäin ja niiden keskihajonnat | 22 |
| Taulukko 5. muiden ryhmien väliset p-arvot | 22 |

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

| | |
|-----------------|--|
| Balb/c nude | Immuunipuutteinen hiirilinja, jolta puuttuu kateenkorva ja näin myös T-solut |
| Duktaalinen | Tiehyestä lähtöisin oleva |
| E2F3 | solusyklin säätelyyn liittyvä geeni |
| HER2 | Epidermaalisen kasvutekijän reseptori 2 |
| <i>In situ</i> | ympäristöön leviämätön |
| <i>In vitro</i> | Elimistön ulkopuolella, koeputkessa tapahtuva |
| <i>In vivo</i> | Elimistössä, elävän organismin sisällä |
| Lobulaarinen | Maitorauhasliuskasta lähtöisin oleva |
| MDA-MB-231 | Kolmoisnegatiivinen ihmisperäinen rintasyöpäsolulinja |
| mRNA | Lähetti-RNA |
| qPCR | kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio, reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio |
| Rock1 | Solujen migraatioon liittyvä geeni |
| RT-PCR | käänteistranskriptio |
| shRNA | short hairpin RNA |
| siRNA | small interfering RNA |
| TLR9 | Tollin kaltainen reseptori 9 |

1 JOHDANTO

Rintasyöpä on naisten yleisimmin esiintyvä syöpä Suomessa, vuosittain siihen sairastuu yli 5000 naista (Suomen Syöpärekisteri2017). Rintasyövän tyyppi vaikuttaa sen aggressiivisuuteen ja leviämiseen ja sen myötä ennusteeseen. Yksi aggressiivisiin tyyppisiin kuuluvista rintasyövistä on kolmoisnegatiivinen rintasyöpä, eli kasvaimesta puuttuvat estrogeeni- ja progesteronireseptorit sekä HER2-geenin monistuma. Tällä hetkellä levinnyttä rintasyöpää ei pystytä parantamaan. (Mattson & Huovinen 2015.)

Tsoledronaatti on tyyppiä sisältäviin bisfosfonaatteihin kuuluva lääkeaine, jota käytetään tällä hetkellä osteoporoosin sekä luumetastaasien hoidossa. Se on erittäin luuhakuinen ja estää osteoklastien toimintaa ja sitä kautta edistää luuntiheyden parantumista. Tsoledronaatin on huomattu myös vaikuttavan suoraan syöpäkasvaimeen. Sen vaikutusmekanismeja kasvaimeen ei kuitenkaan tunneta hyvin. (Clézardin et al. 2011)

Tässä opinnäytetyössä on tutkittu tsoledronaatin vaikutusta rintasyöpäkasvaimen mRNA-ekspressioon. Kiinnostuksen kohteiksi on valittu Rock1-geeni, joka liittyy solun migraatioon (Weizmann Institute of Science 2017a) ja E2F3-geeni, joka liittyy keskeisesti solusyklin säätelyyn (Weizmann Institute of Science 2017b). Aineistona on käytetty hiirten subkutaaniin istutettuja MDA-MB-231-rintasyöpäkasvaimia. Hiiret olivat jaettu kahteen kontrolli- ja koeryhmään, joista toiset olivat TLR9 knockout -ryhmiä. Samalla haluttiin tutkia, miten TLR9:n ekspressio vaikuttaa tsoledronaatin vaikutukseen näiden mRNA:iden ekspressioon. Kasvainten RNA on eristetty ja siitä on käänteistranskription avulla valmistettu cDNA. cDNA:sta mRNA-ekspressiota on tutkittu reaaliaikaisen PCR:n avulla.

2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Tsoledronaatti

Tsoledronaatti on tyyppiä sisältäviin bisfosfonaatteihin kuuluva lääkeaine, jota käytetään mm. osteoporoosin tai syöpähoitojen aiheuttaman luukadon ja luumetastaasien hoidossa. Bisfosfonaatit voidaan jakaa tyyppiä sisältäviin ja tyyppiä sisältämättömiin bisfosfonaatteihin. Bisfosfonaatit sitoutuvat luun mineraaleihin ja estävät osteoklastivälitteistä luun hajottamista. Tyyppiä sisältävät bisfosfonaatit ovat tyyppiä sisältämättömiä kykenevämpiä hillitsemään osteoklastien aktiivisuutta. Tsoledronaatin on osoitettu vähentävän luukatoa sekä parantavan elossaolo-osuutta rintasyövän lääkehoitona. Sillä näyttäisi olevan luustovaikutusten lisäksi myös suoria syövänvastaisia vaikutuksia etenkin yhdessä kemoterapian kanssa. (Clézardin ym. 2011.) Tyyppiä sisältävien bisfosfonaattien syövänvastaisia ominaisuuksia on tutkittu useissa luumetastaaseja tutkivissa eläinmalleissa, tsoledronaatti on näissä eniten tutkittu tyyppiä sisältävä bisfosfonaatti. (Clézardin 2011.)

Luuytimessä olevat etäpesäkesolut erittävät tekijöitä, jotka lisäävät osteoklastien, luukudoksen hajottamiseen erilaistuneiden solujen, aktiivisuutta. Luukudoksen hajotessa vapautuu kasvutekijöitä, jotka stimuloivat metastaasin kasvua. Tämä on niin sanottu vicious cycle. (Käkönen, Mundy 2003) On olemassa laajaa prekliinistä näyttöä siitä, että bisfosfonaatit hillitsevät luumetastaasien muodostusta eläinmalleissa katkaisemalla tämän kehän. (Clézardin ym. 2011.) Tsoledronaatti vähentää myös kasvaimesta irronneiden, leviämään lähtevien syöpäsolujen määrää (Aft ym. 2010).

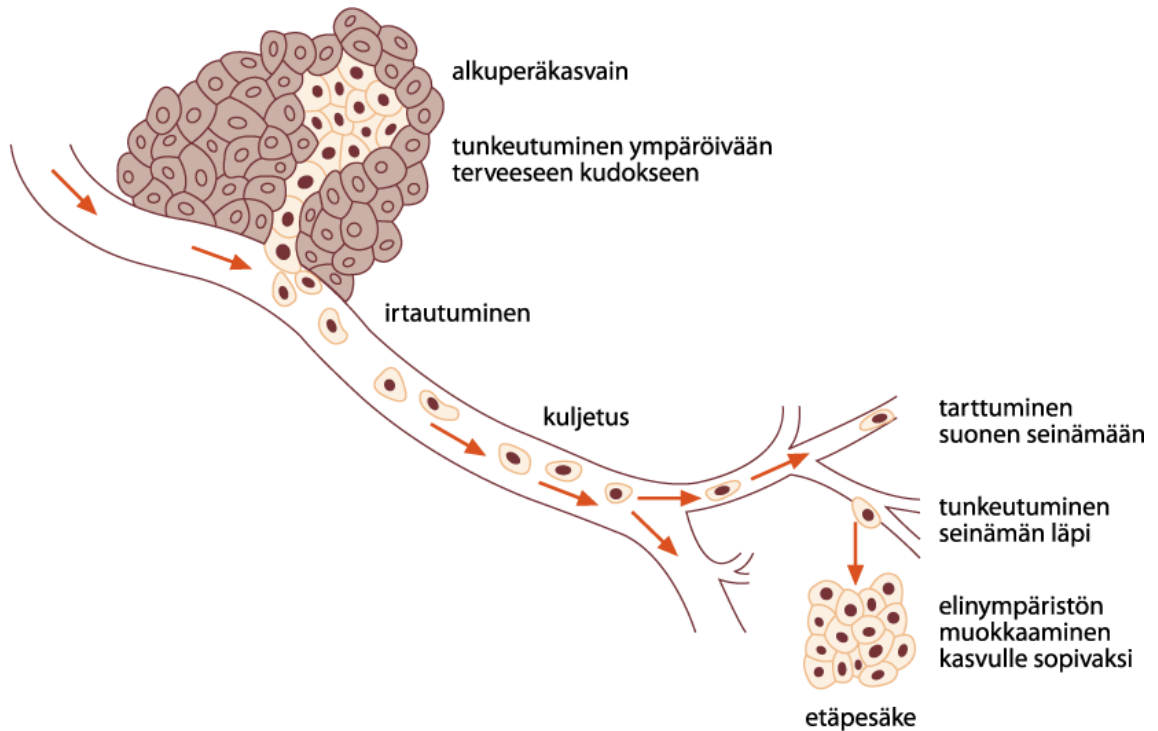
2.2 Rintasyöpä

Naisten tavallisin syöpä on rintasyöpä, johon sairastui 5161 naista Suomessa vuonna 2015. Uusia rintasyöpätapauksia todetaan vuosittain entistä suurempia määriä. (Suomen Syöpärekisteri 2017.) Rintasyöpään sairastumisen syytä on mahdotonta arvioida yksittäisen potilaan kohdalla, sillä rintasyöpä on monitekijäinen sairaus. Sen riskiä lisääviä tekijöitä tunnetaan useita, kuten korkea ikä, monet hormonitasapainoon liittyvät seikat, runsas alkoholinkäyttö sekä periytyvä alttius. (Vehmanen 2017b.)

Rintasyövän oire on tavallisimmin kivuton kyhmy rinnassa, mutta kyhmy voi aiheuttaa myös kipua, pistelyä, nännieritettä tai ihomuutoksia. Syöpä löydetään usein itse tunnuksella tai mammografialla, rintojen röntgenkuvauksella. Lääkäri tunnustelee löydetyn kyhmyä ja mammografian lisäksi tehdään ultraäänikuvaus sekä otetaan aina paksuneläyte patologin arvioitavaksi. Jotkin rinnasta löytyneet kyhmyt ovat hyvänlaatuisia, kuten kystia eli nesterakkuloita tai fibroadenoomia eli sidekudoskasvaimia, eivätkä siis ole syöpää. (Vehmanen 2017b.) Tutkimuksissa epäselväksi jääneet muutokset poistetaan leikkauksella, samoin kuin jos mikään tutkimuksessa viittaa muutoksen pahanlaatuisuuteen. (Huovinen 2017.)

Rintasyövän histologisia päätyyppejä ovat duktaalinen eli tiehytkarsinooma ja lobulaarinen, joista kummastakin on olemassa myös *in situ* -muoto. Ennen leikkausta voidaan antaa neoadjuvanttihoitoa, eli lääkehoitoa, jolla pyritään pienentämään kasvaimen kokoa, jotta suurikin kasvain voitaisiin leikata. Mahdollisuuksien mukaan pyritään aina leikkaamaan rintaa säästävällä kuitenkin riittävällä tervekkudosmarginaalilla. Kainalon imusolmukkeet tarkistetaan metastaasien varalta. (Huovinen 2017.) Tärkeimpiä biologisia tekijöitä hoidon suunnittelun kannalta ovat estrogeeni- ja progesteronireseptoripitoisuus ja HER2-geenin ilmentyminen. Aggressiivisin rintasyöpätyyppi on kolmoisnegatiivinen rintasyöpä, mikä tarkoittaa sekä hormonireseptorien että HER2-geenimonistuman puuttumista. (Mattson & Huovinen 2015.)

Rintasyövän metastaaseja löytyy tavallisimmin luustosta, maksasta, imusolmukkeista ja keuhkoista. Levinnyttä rintasyöpää ei tällä hetkellä pystytä parantamaan. (Mattson & Huovinen 2015.) Metastaaseja muodostuessa primaarikasvaimesta hilseilee syöpäsoluja, ne tunkeutuvat veri- tai imusuonistoon ja kulkeutuvat uuteen paikkaan, kuten kuvassa 1 on esitetty. Uudessa paikassa solut siirtyvät hiussuonista kudokseen. Niiden kehittymiselle solusta kasvaimeksi on tärkeää, että paikka on otollinen syöpäsolujen kiinnittymiselle ja kasvulle. (Isola 2013.)



Kuva 1. Metastaasien synty (Isola 2013)

Leikkauksen jälkeisiä hoitoja ovat esimerkiksi sädehoito ja liitännäislääkehoidot, kuten solunsalpaajahoito, vasta-ainehoito ja hormonihoito. Sädehoito pienentää riskiä syövän paikallisen uusiutumisen riskiä ja parantaa ennustetta. Sädehoidon kesto on yksilöllinen ja annossuunnittelun ja sädehoitotekniikan avulla vähennetään riskielinten, kuten sydämen ja keuhkojen sädeannosta. Liitännäislääkehoidolla tarkoitetaan syövän uusiutumista estävää lääkehoitoa ja sen aloittamiseen vaikuttaa korkeampi uusiutumisriski, johon vaikuttaa esimerkiksi levinneisyys. Liitännäislääkehoidon valinta perustuu muun muassa kasvaimen biologiseen alaryhmään: kasvaimesta tutkitaan esimerkiksi estrogeenireseptorien (ER), progesteronireseptorien (PR) tai HER2-geenin monistuman esiintyminen. ER ja PR -positiivisten kasvainten hoitoon kuuluu aina hormonihoito, jolla pyritään estämään joko hormonituotantoa tai hormonien toimiminen kasvua edistävasti salpaamalla reseptorien toimintaa. HER2-positiivisen kasvaimen hoidossa käytetään vasta-aine trastutsumabia yhdessä solunsalpaajahoidon kanssa. (Rintasyöpäryhmä 2015.) Solunsalpaajahoito on usein suonensisäisesti annettava syöpälääke. Se annetaan polikliinisesti ja siihen kuluu aikaa muutama tunti kerrallaan. Sen suurin haittavaikutus on alentunut vastustuskyky sen aiheuttaman leukosytopenian takia. (Vehmanen 2017a.)

2.3 Lähetti-RNA ja RNA-interferenssi

Lähetti-RNA-molekyylit eli mRNA syntyvät solun tumassa. RNA-polymeraasi muodostaa yhdelle DNA-juosteelle komplementaarisen RNA-molekyylin, tätä kutsutaan transkriptioksi. DNA:sta valmistetaan erilaisia RNA-molekyylejä, pääasiassa lähetti-RNA:ta, siirtäjä-RNA:ta ja ribosomaalista RNA:ta. Näistä mRNA toimii proteiinisynteesin templaattina translaatiossa. Transkriptoitua RNA-molekyylä muokataan vielä solussa valmistettaessa mRNA:ta muun muassa poistamalla proteiinia koodaamattomia intronialueita, liittämällä RNA:n 5'-päähän 7-metyyliguanosiini-trifosfaatti sekä liittämällä sen 3'-päähän poly-A-häntä, jossa on noin kaksisataa adenosiniemästä. Transkriptiota säätelevät monet transkriptiotekijät, joten solu pystyy tuottamaan tarvittavia RNA-molekyylejä juuri silloin kun niitä tarvitaan. (Solunetti.)

Nisäkässoluissa esiintyy myös ei-koodaavia RNA-lajeja, jotka vaikuttavat solun geeniekspressioon monella tasolla. Näistä esimerkki on miRNA. miRNA-molekyylit ovat kaksijuosteinen, lyhyt RNA-molekyylit. Sen aktiivinen juoste sitoutuu kohde-mRNA:n komplementaariseen sekvenssiin ja aiheuttaa mRNA:n hajotuksen solussa. Tätä ilmiötä kutsutaan RNA-interferenssiksi, eli RNA-häirinnäksi ja sitä voidaan käyttää tutkimuksessa hyödyksi. Sen avulla voidaan hiljentää spesifisesti halutun geenin toiminta ja nähdään geenituotteen puuttumisen vaikutukset solun toimintaan. (Bartel 2004.)

Tässä opinnäytetyössä kiinnostuksen kohteina ovat Rock1 ja E2F3 -geenit ja niiden mRNA:n ilmentyminen solussa. Rock1 koodaa entsyymiä, joka liittyy muun muassa solujen migraatioon (Weizmann Institute of Science 2017a) ja E2F3 liittyy solusyklin säätelyyn (Weizmann Institute of Science 2017b).

2.4 In vivo-tutkimus

In vivo -tutkimus viittaa kokonaisessa elävässä organismissa tehtävään kokeeseen tai tutkimukseen. *In vivo* -tutkimuksen muotoja ovat esimerkiksi eläinkokeet sekä kliiniset tutkimukset. *In vivo* -menetelmän etu *in vitro* -menetelmään (ns. koeputkessa tehtävä koe, esimerkiksi soluviljelyä käyttäen) on se, että sillä nähdään paremmin tutkittavan asian kokonaisvaikutus elävään kohteeseen. (Autoimmunity Research Foundation 2015.)

2.4.1 Hiiri- ja solulinjat

Tämän opinnäytetyön aineistona käytetyt kasvaimet oli istutettu Balb/c nude-hiirten rintakudokseen. Tämän linjan hiiret on jalostettu niin, että niiltä puuttuu synnynnäisesti kaateenkorva, jolloin niille ei kehity lainkaan T-lymfosyyttejä. Tämä aiheuttaa heikon immuunipuolustuksen, mikä helpottaa esimerkiksi kasvainsolujen istuttamista hiiriin. (Charles River Laboratories 2017, Animalab 2017.)

Hiiriin oli istutettu MDA-MB-231-rintasyöpäsoluja, joista osaan oli transfektoitu TLR9 shRNA -plasmideja (Sandholm ym. 2016). MDA-MB-231 on ihmisperäinen, erittäin aggressiivinen, invasiivinen ja huonosti erilaistunut kolmoisnegatiivinen rintasyöpäsolulinja. Koska kolmoisnegatiivinen rintasyöpä on aggressiivinen ja sen hoitovaihtoehdot ovat rajalliset, sen hoitoon on tärkeää kehittää uusia lääkkeitä. Sen takia tämä solulinja on yksi yleisimmin käytetyistä solulinjoista lääketieteellisissä tutkimuslaboratorioissa. (Public Health England 2017.)

2.4.2 TLR9-knockout

TLR9 on solunsisäinen DNA-reseptori, joka tunnistaa sekä mikrobi- että isäntäsoluperäistä DNA:ta. TLR9:n aktivaatio käynnistää nopean immuunipuolustusreaktion, josta erittyy inflammatorisia väittäjäaineita ja sen ekspressiolla on vaikutusta kolmoisnegatiivisen rintasyövän ennusteeseen. On tutkittu, että kasvaimen alhainen TLR9 ekspression madaltuminen altistaa solut bisfosfonaattien kasvua hidastaville vaikutuksille. (Sandholm ym. 2016.)

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS JA TAVOITTEET

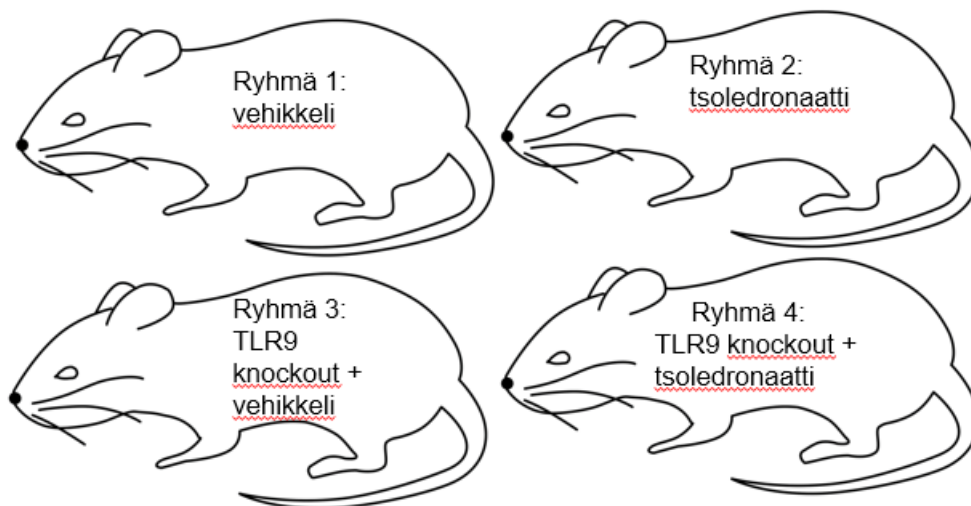
Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli selvittää, vaikuttaako tsoledronaatti rintasyövän mRNA-ekspressioon. Tutkimuksessa tutkittiin tsoledronaatin vaikutusta suoraan primaarikasvaimeen ja selvittää, voidaanko *in vitro* havaitut mRNA-ekspressioiden madaltumiset havaita myös *in vivo* -mallissa hiiren subkutaanissa rintasyöpäkasvaimessa. Lisäksi tutkittiin, miten TLR9:n ekspressio vaikuttaa tsoledronaatin vaikutukseen näiden mRNA:iden ekspressioon.

Tavoitteena oli osana muuta tutkimusta selvittää, onko tsoledronaatin antamisesta rintasyöpäpotilaalle apua jo primaarikasvaimen hoidossa. Tsoledronaatilla pyrittiin estämään syöpäkasvaimen leviämistä metastaaseina muualle elimistöön ja hillitsemään primaarikasvaimen kasvua.

4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Tutkimuksen suoritus

Tämän opinnäytetyön kokeellinen osuus toteutettiin keväällä 2017 syventävän harjoittelujakson aikana Turun Yliopiston Biolääketieteen laitoksella. Aineistona käytetyt kasvainnäytteet saatiin käyttöön Turun Yliopistolta. Näytteinä oli Balb/c nude hiirten subkutaaniin istutettuja MDA-MB-231 -rintasyöpäkasvaimia, jotka oli kerätty jo aikaisemmin ja pakastettu -80°C pakkaseen RNAlater -nimiseen liuokseen, joka säilyttää RNA:ta myöhempää tutkimusta varten. Näytteet oli jaettu neljään ryhmään hiirten käsittelytavan mukaan ja jokaisesta ryhmästä tähän opinnäytetyöhön otettiin kahdeksan näytettä. (Kuva 2) Näytteistä osa valikoitui pois huonon beeta-aktiinin amplifikoitumisen vuoksi. Tästä voitiin päätellä, ettei eristetty RNA ollut riittävän edustavaa. Reagenssit ja työssä tarvittavat välineet saatiin käyttöön Turun Yliopistolta. RNA:n eristyksen lisäksi käytettyjä menetelmiä olivat RT-PCR eli käänteistranskriptio ja qPCR, kvantitatiivinen tai reaaliaikainen PCR.



Kuva 2. hiiriryhmät ja niiden saamat käsittelyt

Kasvainnäytteet käsiteltiin muutaman kappaleen erissä, jotta yksittäinen näyte saataisiin mahdollisimman nopeasti käsiteltyä ja eristetty herkästi hajoava RNA siirrettyä -80°C

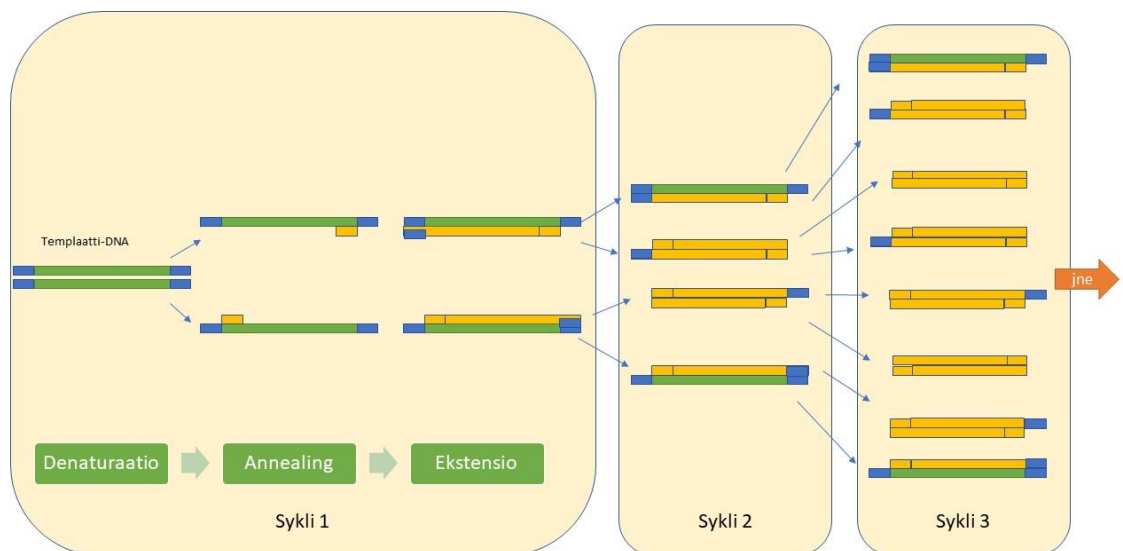
pakkaseen odottamaan seuraavaa vaihetta. Käsiteltävien näytteiden määrä kerralla vaihteli kahdesta kahdeksaan, määrä pyrittiin pitämään parillisena sentrifugoinnin helpottamiseksi. Jokaisesta näytteestä dissekoitiin silmämääräisesti noin 15mg:n kokoinen edustava pala 600 µl:aan Zymo Researchin valmistamaa TRI Reagentia 15ml:n Falconiin ja seos homogenoitiin Ultra Turrax -homogenoijalla. Jäljelle jäänyt kasvainnäyte laitettiin heti dissekoinnin jälkeen takaisin RNA later -liuokseen ja jäädytettiin alkoholihauteessa, johon oli lisätty kuivajäätä. Homogenoija huuhdeltiin näytteiden välillä vedellä, 100% etanolilla ja vielä vedellä. Seoksen RNA eristettiin Zymo Researchin Direct-zol RNA MiniPrep -kitillä sen ohjeen mukaan. (Liite 1) Näytteet pidettiin jäällä työskentelyn ajan. Ryhmän 2 näytteiden 3-8 kohdalla näytteet joutuivat seisomaan jäällä 30min homogenoinnin ja alkoholin lisäämisen jälkeen, sillä jäädytettävä sentrifugi oli varattu.

Eristetyn RNA:n pitoisuus mitattiin eristyksen jälkeen NanoDrop spektrofotometrillä. Pitoisuudet näkyvät taulukossa 1. Ennen mittauksen aloittamista näytealusta puhdistettiin pipetoimalla näytealustalle 2µl RNAasivapaata vettä. Laitteen näytevarsi laskettiin alas ja nostettiin ylös ja molemmat osat kuivattiin puhtaalla, nukkaamattomalla lapulla. Tämä toistettiin kolme kertaa. Tietokoneelta valittiin nucleic acid -applikaatio ja tehtiin blankkimittaus 2µl RNAasivapaalla vedellä. Näytealusta ja varsi kuivattiin, alustalle pipetoitiin 2µl näytettä ja valittiin näytetyypiksi RNA-40, jolloin ohjelma laskee RNA:n pitoisuuden näytteessä spesifisen absorbanssin perusteella. Näytealusta ja varsi kuivattiin puhtaalla, nukkaamattomalla lapulla näytteiden välissä. Näyteastiat pidettiin mittauksen ajan jäällä, jotta RNA ei hajoaisi. Näytteet siirrettiin -80°C pakkaseen odottamaan seuraavaa vaihetta.

Taulukko 1. RNA-pitoisuudet kunkin ryhmän numeroiduissa näytteissä ng/µl

| | Ryhmä 1 | Ryhmä 2 | Ryhmä 3 | Ryhmä 4 |
|---|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 138,70 | 92,46 | 69,49 | 313,20 |
| 2 | 311,82 | 45,02 | 41,94 | 65,88 |
| 3 | 74,66 | 28,11 | 29,54 | 132,28 |
| 4 | 168,68 | 19,82 | 345,39 | 33,82 |
| 5 | 139,49 | 38,61 | 235,74 | 72,12 |
| 6 | 163,46 | 28,16 | 310,75 | 130,30 |
| 7 | 267,87 | 39,02 | 334,41 | 157,32 |
| 8 | 423,39 | 116,39 | 162,39 | 137,87 |

Seuraavassa vaiheessa RNA:sta valmistettiin komplementaarinen DNA eli cDNA RT-PCR-menetelmällä. PCR- eli polymeerasiketjureaktiomenetelmät koostuvat denaturaatio-, annealing- ja ekstensiovaiheista. Reaktion ensimmäisessä vaiheessa DNA denaturoidaan, eli sen juosteet erotetaan toisistaan lämmittämällä. Denaturaatiolämpötila riippuu kopioitavan juosteen rakenteesta: juosteet, joilla on suurempi guaniini- ja sytosiinipitoisuus vaativat korkeamman lämpötilan irrotakseen toisistaan. Toisessa vaiheessa, annealing-vaiheessa pienet synteettiset DNA-juosteet, alukkeet, kiinnittyvät kopioitavan alueen eli templaatin 5'-päähän ja ekstensiovaiheessa DNA-polymeraasi kopioi templaatin alukkeen 3'-päähän. Uusi lämpösykli alkaa ja syntyneet juosteet irtautuvat toisistaan, näin pystytään valmistamaan eksponentiaalinen määrä kopioita alkuperäisestä DNA-juosteesta. (Thermo Fischer Scientific 2017) (Kuva 3)



Kuva 3. PCR:n periaate.

RT-PCR -menetelmässä alkuperäisenä templaattina toimii RNA-molekyyli. Reaktiossa käytetään käänteistranskriptaasientsyymiä (RT-entsyymi), joka valmistaa RNA:sta PCR-periaatteella sille komplementaarisen cDNA-juosteen, joka on stabiilimpi kuin RNA. (Thermo Fischer Scientific 2017)

cDNA-synteesissä käytettiin Biolinen SensiFAST cDNA Synthesis Kittä sen ohjeen mukaan. (Liite 2) Reaktioon oli tarkoitus käyttää 600ng RNA:ta, mutta joidenkin näytteiden

kohdalla eristetyn RNA:n saanti oli niin pieni, että näiden kohdalla käytettiin 400ng tai 200ng, jotta reaktiivilavuus pysyisi samana. Huonompaan saantiin saattoi vaikuttaa kasvaimesta dissekoidun palan edustavuus.

Näytteet otettiin jälle kun pipetoitavat määrät oli laskettu ja PCR-putket pidettiin jäällä pipetoinnin ajan, jotta näytteiden RNA säilyisi mahdollisimman hyvin. Kaikki työssä käytettävät putket ja pipetinkärjet olivat RNA-työskentelyyn tarkoitettuja, eli ne oli käsitelty välinehuollossa RNAasivapaiksi. Lämpösykkit ajettiin Eppendorfin Mastercycler Gradientilla kitin ohjeen protokollan mukaan. Kittiohjeesta poikettiin ryhmän 4 näytteiden 8 ja 9 kohdalla: RT-entsyymi loppui kesken ja muuten valmiiksi pipetoitu reaktioseos siirrettiin -20°C pakkaseen odottamaan. Uusi RT-entsyymi saatiin seuraavana päivänä ja pipetoitiin sulaneeseen reaktioseokseen ja cDNA-synteesi suoritettiin loppuun.

Näytteiden mRNA-ekspressiota selvitettiin qPCR:n avulla. qPCR:ää kutsutaan myös kvantitatiiviseksi tai reaaliaikaiseksi PCR:ksi. Sen avulla voidaan havaita PCR-tuotteet niiden kertyessä fluoresoivan väriaineen avulla (Raymaekers et al. 2009). Tässä työssä käytettiin Bio-Radin SYBR® Green Master Mixiä. Se sisältää DNA-kaksoisjuosteeseen sitoutuvaa fluoresoivaa väriainetta. Jokaisella amplifikaatiokierroksella SYBR® Green sitoutuu DNA-kaksoisjuosteeseen sen rakentuessa ja näin fluoresenssi voimistuu DNA-kopioiden määrän kasvaessa. (Bio-Radin www-sivut)

RNA:n tai DNA:n määrittäminen qPCR:llä voi tapahtua standardisuoran ja komparatiivisen metodin avulla. Määrittäminen voi olla joko absoluuttista tai suhteellista. Suhteellisessa määrittämisessä standardisuoran käyttöä voi välttää käyttämällä vertailevaa $\Delta\Delta C_T$ -menetelmää. Näytteen biologisen materiaalin määrän erojen tasaamiseksi tarvitaan normalisointia. Suosituin tapa on sisäisen referenssigeenin käyttö. (Raymaekers et al. 2009.)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| B | | 4 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 7 | 7 | 7 | 8 |
| C | | 8 | 8 | | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 |
| D | | 3 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 7 |
| E | | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| F | | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 6 |
| G | | 6 | 6 | 7 | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Kuva 4. Esimerkki pipetointikartasta. Näyttenumerot ja vihreällä pohjalla Rock1, keltaisella E2F3 ja punaisella β -aktiini.

Näytteistä valittiin ensin jokaisen ryhmän kaksi ensimmäistä näytettä, joilla tehtiin ensimmäinen ajo kaikilla kohdegeeneillä, jotta nähtäisiin, onko cDNA-synteesi toiminut. (Kuva 4) Sisäisenä referensigeeninä, eli housekeeping geeninä käytettiin beeta-aktiinia, joka on yleisesti käytetty ja suositeltu housekeeping geeni rintasyöpää tutkittaessa (Liu et al 2015). Beeta-aktiini on proteiinia koodaava geeni, joka liittyy solun ulkoiseen tukirankaan ja sitä löytyy kaikista kudoksista. (Weizmann Institute of Science 2017c)

Jokaista kohdegeeniä varten tehtiin oma master mix, johon tuli geenikohtaiset alukkeet. Rock1:n alukkeiden sekvenssit olivat: CGGAAGTGAATTCGGATTGT, sulamislämpötila 59,9°C ja CCTTCCTGGTGGATTTATGC, sulamislämpötila 59,4°C. E2F3:n alukkeiden sekvenssit olivat: GGCTGGAGCTAGGAGAAAGC, sulamislämpötila 60,18°C, ja AGACGTATCATACCGCGTTTTT, sulamislämpötila 58,49°C. Beeta-aktiinin alukkeiden sekvenssit: CGCCGCCAGCTCACCA ja CCCACGATGGAGGGGAAGAC.

Master mixeihin laskettiin tulevan jokaista kuoppaa kohden RNAasivapaata vettä 1,2µl, forward ja reverse primeria 0,4µl kumpaakin sekä SYBR® Greeniä 10µl ja vielä kymmenen prosentin hukka. (Taulukko 2) Näytteet analysoitiin 96-kuoppaisella valkoisella PCR-levyllä. Master mixit, laimennokset ja analyysilevyille pipetointi tehtiin laminaarikaapissa kontaminaatioiden välttämiseksi. Näytteet ja reagenssit pidettiin jäällä työskentelyn ajan, jotta polymeerasientsyymi toimisi toivotulla tavalla. Kuoppalevy laitettiin jäälle pipetoinnin jälkeen kuljetuksen ajaksi.

Taulukko 2. Reaktioseoksen komponentit kuoppaa kohden

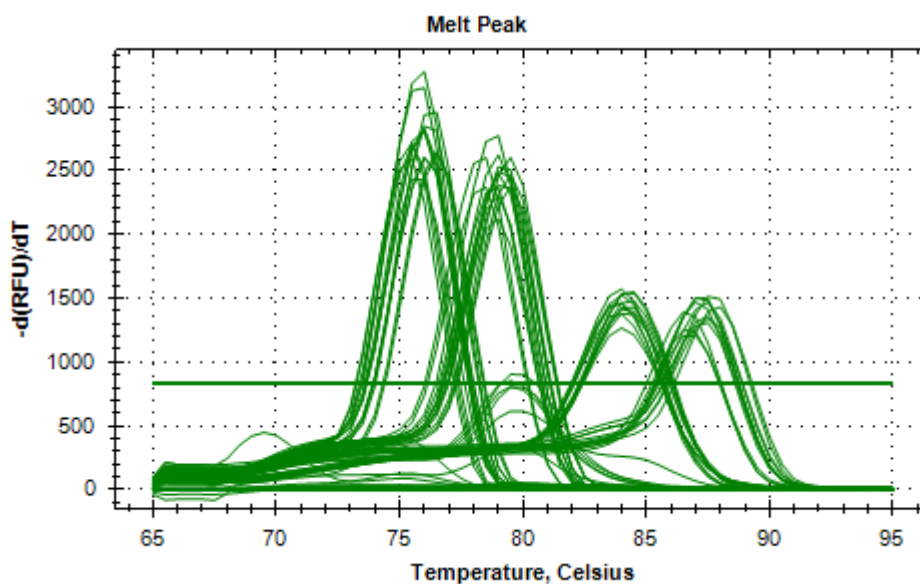
| | |
|------------------|-------|
| SYBR Green | 10µl |
| Forward primer | 0,4µl |
| Reverse primer | 0,4µl |
| RNAasivapaa vesi | 1,2µl |
| Yhteensä | 12µl |

Ennen analysointia levy sentrifugoitiin lyhyesti, jotta kaikki reagenssit ja näytteet varmasti olisivat kuopan pohjalla ja reaktio voisi onnistua. Yhteen reaktiokuoppaan pipetointiin pipetointikartan mukaan 12µl master mixiä sekä 8µl cDNA:ta laimennettuna 1:5. Reaktiotalavuudeksi tuli siis 20 µl. Levy sinetöitiin läpinäkyvällä muovisinettiä haihtumisen ja kontaminaatioiden estämiseksi. Ajot tehtiin Bio-Rad CFX96 -analysointilaitteella valmiilla protokollalla (Taulukko 3). Levyt valmistettiin yksi kerrallaan niin, että valmiiksi pipetoitu levy saataisiin analysoitua mahdollisimman nopeasti pipetoinnin jälkeen, jotta tulokset olisivat luotettavia.

Taulukko 3. qPCR protokolla. vaiheet 2-4 toistettiin 40 kertaa. Vaiheet 5-7 ovat sulamiskäyrää varten.

| Step | Temp | Time (min) |
|------|------|------------|
| 1. | 95°C | 1:00 |
| 2. | 95°C | 0:10 |
| 3. | 60°C | 0:30 |
| 4. | 72°C | 0:20 |
| 5. | 95°C | 0:10 |
| 6. | 65°C | 0:05 |
| 7. | 95°C | |

Kaikista ensimmäisen levyn näytteistä saatiin signaali ja alukkeiden toimivuus tarkistettiin käyttäen DNA:n kaksoisjuosteen purkautumisasteen määrittämistä eri lämpötiloissa, (Kuva 5) joten loputkin näytteet analysoitiin. Kuvassa näkyy ylimääräinen huippu noin 84°C:n kohdalla. Näissä näytteissä on monistunut jotain muuta kuin kohdegeeniä ja näytteet hylättiin myöhemmin sen perusteella tämän opinnäytetyön aineistosta. Loput ajot tehtiin kohdegeeni kerrallaan kaksi levyä samana päivänä. cDNA-laimennokset tehtiin kahdessa erässä: Rock1-määrittämiselle oma laimennos ja E2F3:lle ja beeta-aktiinille kerralla yhteinen laimennos, jotta cDNA:ta ei tarvitsisi sulattaa ja pakastaa useita kertoja. Kaikista näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista määrittämistä ja näiden kuoppien antamista C_T -arvoista laskettiin keskiarvo. Poikkeuksena beeta-aktiinimäärittämisessä ryhmän 3 näytteet 4 ja 5, joista näyte 4 pipetoitiin vahingossa neljään kuoppaan ja näyte 5 vain kahteen kuoppaan. Pipetointivirhe merkittiin pipetointikarttaan ja otettiin huomioon tuloksia laskettaessa.



Kuva 5. Ensimmäisen analysoidun levyn sulamiskäyrät

Jokaisessa analysoitavassa levyssä tarvitaan aina negatiivinen kontrolli ilman templaattia, mutta tekijän kokemattomuudesta johtuen se jäi alkuperäisiltä levyiltä pois. Negatiivisella kontrollilla halutaan varmistaa, etteivät reagenssit ole kontaminoituneet, ja että monistunut reaktiotuote on varmasti peräisin näytteestä. Tulokset varmistettiin myöhemmin uusimmalla analyysillä negatiivisen kontrollin kanssa.

qPCR-ajojen tulokset järjesteltiin taulukoiksi kohdegeenin ja näytenuumeron mukaan ryhmittäin Exceliin. Jokaisen näytteen C_T -arvoista laskettiin keskiarvot ja ryhmäkohtainen keskiarvo jokaisen geenin C_T -arvon osalta. Jokaisen näytteen keskihajonta ja ryhmän keskimääräinen keskihajonta laskettiin. Rock1- ja E2F3-aktiivisuutta verrattiin kunkin näytteen omaan beeta-aktiiniaktiivisuuteen, mistä saatiin ΔC_T -arvo. Kunkin näytteen ΔC_T -arvoa verrattiin vielä ryhmän keskimääräiseen ΔC_T -arvoon, mistä saatiin $\Delta\Delta C_T$ -arvo. Jokaisesta ryhmästä laskettiin vielä keskimääräinen $\Delta\Delta C_T$ -arvo sekä Rock1:n että E2F3:n kohdalla. $\Delta\Delta C_T$ -arvosta laskettiin vielä fold change, jonka avulla tulokset saatiin vertailtavaan muotoon.

4.2 Metodologiset lähtökohdat

Tämä opinnäytetyö on tutkimusotteeltaan kvantitatiivinen: kvantitatiivinen tutkimus keskittyy mittaamaan muuttujia ja tarkastelemaan niiden välisiä yhteyksiä. Kvantitatiiviselle

tutkimukselle on ominaista muun muassa strukturoitu tutkimusasetelma, numeerinen mittaaminen ja tilastollisen merkitsevyyden arviointi, eli p-arvo. Opinnäytetyön tutkimusasetelma on kokeellinen, siinä tutkittava joukko on jaettu kontrolli- ja koeryhmiin. (Kankunen & Vehviläinen-Julkunen 2009.) Kontrolliryhmälle on toteutettu mittaus ja koeryhmässä on toteutettu interventio, eli tässä tapauksessa annettu tsoledronaattia ennen mitausta.

Teoreettisena taustamateriaalina on käytetty saman aihepiirin tieteellisiä julkaisuja ja artikkeleita ja alan kirjallisuutta ja internet-julkaisuja. Otokoko oli 32 kasvainnäytettä, jotka oli jaettu neljään ryhmään, joista kaksi oli kontrolliryhmiä ja kaksi koeryhmiä.

4.3 Eettinen tarkastelu

Tieteellistä tutkimusta ohjaavat hyvät tieteelliset käytännöt, jotka toimivat myös pohjana tutkimusryhmien laatujärjestelmälle. Hyvään tieteelliseen käytäntöön kuuluvat rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus kaikissa työvaiheissa, niin tutkimustyössä kuin tulosten tallentamisessa ja niiden arvioinnissa. Muiden työ ja julkaisut on merkittävä asianmukaisella tavalla. (Tutkimuseettinen Neuvottelukunta 2017.)

Tätä opinnäytetyötä tehtäessä on pyritty noudattamaan hyviä tieteellisiä käytäntöjä. Tutkimustyössä, tulosten tallentamisessa ja esittämisessä sekä tulosten arvioinnissa on noudatettu rehellisyyttä, yleistä huolellisuutta ja tarkkuutta. Lähteinä on käytetty mahdollisimman tuoreita julkaisuja ja lähteet on merkitty asianmukaisella tavalla. Työtä varten on tehty toimeksiantosopimus Turun Yliopiston kanssa.

Hiirikokeet oli tehty eläinkoelautakunnan luvalla ESAVI/2165/04.10.07/2015. Hiiriä oli hoidettu Turun Yliopiston koe-eläinkeskuksessa ja hiirien hyvinvoinnista huolehdittu päivittäin. Opinnäytetyöntekijä ei käsitellyt hiiriä missään vaiheessa, vaan pelkästään valmiiksi kerättyjä kasvainnäytteitä.

5 TUTKIMUSTULOKSET JA POHDINTA

Rock1:n fold change -arvot laskivat koeryhmissä verrattuna kontrolliryhmiin. TLR9 knockout -ryhmien tulokset olivat hieman korkeammat kuin sitä ekspressoivilla. Rock1:n ekspressio syöpäsoluissa oli siis pienempää koeryhmissä 2 ja 4 kuin kontrolliryhmissä 1 ja 3. Keskihajontaa ryhmien sisällä kuitenkin oli suhteellisen paljon eivätkä erot T-testin mukaan ole tilastollisesti merkittäviä minkään ryhmien välillä. (Taulukot 4 ja 5) TLR9:n ekspressiolla ei myöskään ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta Rock1:n ekspressioon koe- tai kontrolliryhmissä.

Taulukko 4. Fold change -arvojen keskiarvot ryhmittäin ja niiden keskihajonnat

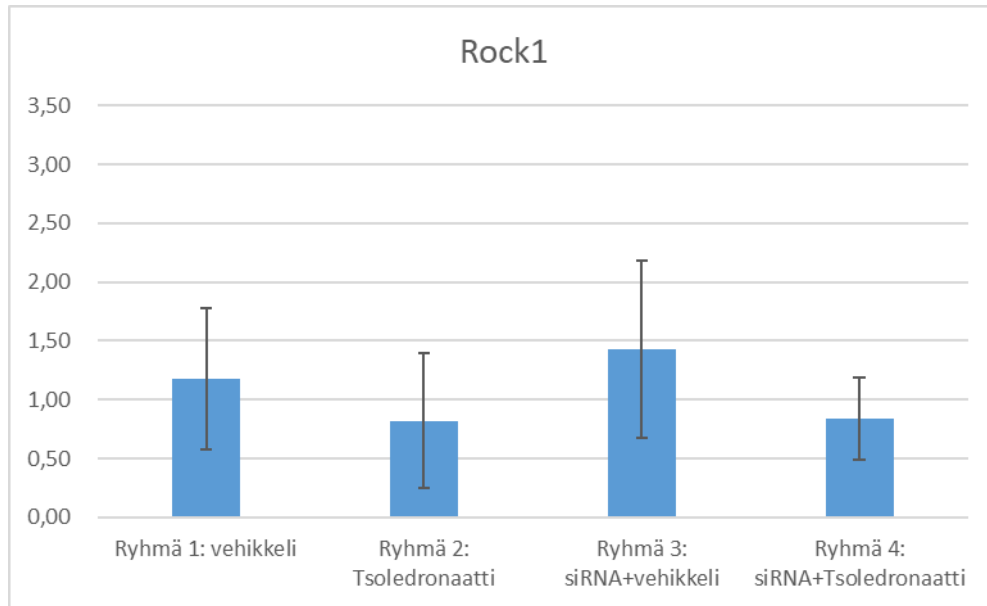
| | Rock1 | Rock1 keskihajonta | p-arvo vs. ryhmä1 | E2F3 | E2F3 keskihajonta | p-arvo vs. ryhmä 1 |
|----------------|-------|--------------------|-------------------|------|-------------------|--------------------|
| Ryhmä 1 | 1,18 | 0,599 | | 1,07 | 0,424 | |
| Ryhmä 2 | 0,82 | 0,574 | 0,267 | 1,38 | 0,848 | 0,407 |
| Ryhmä 3 | 1,43 | 0,753 | 0,510 | 2,25 | 0,735 | 0,004 |
| Ryhmä 4 | 0,84 | 0,347 | 0,219 | 1,44 | 0,280 | 0,079 |

Taulukko 5. muiden ryhmien väliset p-arvot

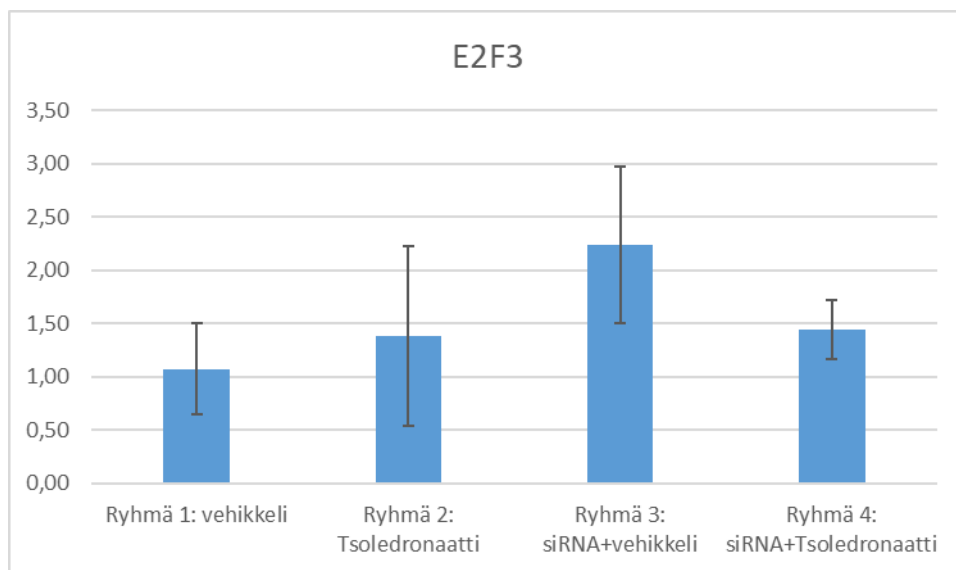
| | Rock1 | E2F3 |
|---------------|-------|-------|
| 2 vs 3 | 0,113 | 0,062 |
| 3 vs 4 | 0,935 | 0,024 |
| 2 vs 4 | 0,935 | 0,866 |

E2F3:n aktiivisuus oli matalampi TLR9:ää ekspressoivissa kasvaimissa kuin knockout-ryhmässä. Tämä viittaisi siihen, että kasvaimessa, joka ei ekspressoisi TLR9:ää, solujen jakautuminen olisi voimakkaampaa. TLR9:ää ekspressoivissa soluissa tsoledronaatti näyttäisi nostavan E2F3:n ekspressiota, kun taas knockout -ryhmässä ekspressio näyttäisi laskevan tsoledronaatin vaikutuksesta. Ero E2F3:n ekspressiossa kontrolliryhmien välillä on tilastollisesti merkittävä, $p=0,004$.

Tuloksen mukaan tsoledronaatti ei siis vähennä Rock1:n ekspressiota tilastollisesti merkittävästi, eikä tätä kautta vähentäisi solujen migraatiota. Kasvaimissa, jotka eivät ekspressoisi TLR9:ää, tsoledronaatti näyttäisi vähentävän E2F3:n ekspressiota, eli se voisi hillitä solujen jakautumista. TLR9:ää ekspressoivissa kasvaimissa E2F3:n ekspression nousu tsoledronaatin myötä antaisi viitteitä siitä, että tsoledronaatti saattaisi kiihdyttää solujen jakautumista.



Kuvio 1. Rock1-aktiivisuus ryhmittäin



Kuvio 2. E2F3-aktiivisuus ryhmittäin

Tulosten luotettavuutta vähentää opinnäytetyön otannan pienuus. Vertailemalla kaikkia hiiriryhmistä kerättyjä näytteitä saataisiin parempi kuva vaikutuksista. Koska tulosten hajonta on aika suurta ja otoskoko on vain kahdeksan näytettä kustakin ryhmästä, erojen löytäminen ryhmien väliltä on vaikeaa. Osa koko aineiston näytteistä jouduttiin hylkäämään huonon housekeeping-monistuman takia, eikä niitä otettu tähän opinnäytetyöhön mukaan. Niissä eristetty RNA ei välttämättä ollut edustavaa, sillä housekeeping-geeninä käytettyä beeta-aktiinia pitäisi olla kaikissa soluissa.

Suurin osa menetelmistä olivat tekohetkellä opinnäytetyön tekijälle uusia. Opinnäytetyön tekijän kokemattomuus ja puutteelliset tiedot menetelmistä tekohetkellä ovat mahdollisia virhelähteitä. Laboratoriotöissä oli monta toisiinsa liittyvää vaihetta, minkä takia mahdolliset virheet aikaisemmissa vaiheissa ovat kertautuneet seuraaviin vaiheisiin.

Jatkotutkimuksena voisi eristää RNA:n uudelleen niiden näytteiden osalta, joiden houle-keeping-monistuma oli huono. Uudelleen eristetyllä RNA:lla voisi sitten toistaa saman tutkimuksen. Käsittelemällä koko aineiston $\Delta\Delta C_T$ -menetelmällä saataisiin kattavampi kuva tsoledronaatin vaikutuksesta tutkittuihin mRNA-molekyyleihin. Opinnäytetyöstä jätettiin myös osittain ajan puutteen takia pois kolmas tutkittava geeni, OGN, jonka määrittämisen voisi tehdä samalla.

Bioanalyttikon työn kannalta opinnäytetyöprosessi oli hyvin antoisa. Osaamiseni laajeni tutustuessani RNA-työskentelyyn ja uusiin PCR-menetelmiin. Monivaiheinen työ oli yhtenäinen kokonaisuus, mikä auttoi ymmärtämään eri vaiheiden merkitystä. Kontrollien tärkeys tuli erityisesti esille niiden puuttuessa, eikä virhe luultavasti toistu tämän jälkeen kovin helposti, sillä työ oli käytännössä tehtävä uudelleen, jotta tuloksia voitiin pitää luotettavina. PCR-menetelmien ymmärtäminen kasvoi paljon tätä työtä tehtäessä. Tieteellisessä tutkimuksessa osallisena oleminen oli hyödyllistä ammatillista kasvua ajatellen. Mielestäni se antaa uuden näkökulman myös sairaalalaboratoriossa työskentelyyn.

LÄHTEET

Aft, R.; Naughton, M.; Trinkhaus, K.; Watson, M.; Ylagan, L.; Chavez-Mac-Gregor, M.; Zhai, J.; Kuo, S.; Shannon, W.; Diemer, K.; Hermann, V.; Dietz, J.; Ali, A.; Ellis, M.; Weiss, P.; Eberlein, T.; Ma, C.; Fracasso, P.M.; Zoberi, I.; Taulor, M.; Gillanders, W.; Pluard, T.; Mortimer, J. & Weilbaecher, K. 2010. Effect of zoledronic acid on disseminated tumour cells in women with locally advanced breast cancer: an open label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 11. 5. 421-428

Animalab. 2017 Viitattu 28.11.2017 <http://animalab.eu/products/balbc-nude-mouse>

Autoimmunity Research Foundation. 2015. Differences between in vitro, in vivo, and in silico studies. Viitattu 27.10.2017 https://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies

Bartel, P. 2004. MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 116. 2. 281-297.

Charles River Laboratories International. 2017. Viitattu 28.11.2017. <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/balb-c-nude-mouse?loc=FI>

Clézardin, P. 2011. Bisphosphonates' antitumor activity: An unravelled side of a multifaceted drug class. *Bone*. 48. 1. 71-79.

Clézardin, P.; Benzaïd, I. & Croucher, P.I. 2011. Bisphosphonates in preclinical bone oncology. *Bone*. 49. 1. 66-70.

Huovinen, R. 2017. Rintasyöpä. Lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim*, vol.133. nro.7. s.689-72

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 19.10.2017. <http://www.oppiportti.fi>

Janssens, N.; Janicot, M.; Perera, T. & Bakker, A. 2004. Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Molecular Diagnosis: a journal devoted to understanding human disease through the clinical application of molecular biology*. 8. 2. 107-13

Käkönen, S. & Mundy, G.R. 2003. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer*. 97. S3. 834-839.

Liu, L.-L.; Zhao, H.; Ma, T.-F.; Ge, F.; Chen, C.-S. & Zhang, Y.-P. Identification of Valid Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Expression Studies in Human Breast Cancer Cell Lines Treated with and without Transient Transfection. *PLoS ONE* 10. 1. e0117058

Public Health England. 2017. ECACC General cell collection: MDA-MB-231. Viitattu 11.12.2017 <https://www.phe-culturecollections.org.uk> Home>Products>Cell Lines and Hybridomas>General Cell Collection>General Cell Collection Detail>Cell line profile MDA-MB-231

Raymaekers, M.; Smets, R.; Maes, B. & Cartuyvels, R. 2009. Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 23. 145-151

Sandholm, J.; Lehtimäki, J.; Ishizu, T.; Velu, S. E.; Clark, J.; Härkönen, P.; Jukkola-Vuorinen, A.; Schrey, A.; Harris, K. W.; Tuomela, J. M. & Selander, K. S. 2016. Toll-like receptor 9 expression is associated with breast cancer sensitivity to the growth inhibitory effects of bisphosphonates *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*. 7. 52. 87373-87389

Solunetti www.solunetti.fi Viitattu 23.10.2017

Suomen Rintasyöpäryhmä ry. 2015. Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus. Viitattu 7.12.2017. <https://rintasyoparyhma.yhdistysavain.fi/hoitosuositus/>

Suomen Syöpärekisteri 2017. Tautitilastot. <https://syoparekisteri.fi/tilastot/tautitilastot/> Viitattu 6.10.2017

Tutkimuseettisen neuvottelukunnan www-sivut. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 31.10.2017 http://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf

Vehmanen, L. 2017a. Paikallisen rintasyövän hoito. Duodecim. www.terveyskirjasto.fi Viitattu 23.10.2017

Vehmanen, L. 2017b. Terveyskirjasto: Rintasyöpä: toteaminen ja ennuste. Duodecim. www.terveyskirjasto.fi Viitattu 23.10.2017

Weizmann Institute of Science. 2017a. Gene cards. Viitattu 3.11.2017 <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ROCK1>

Weizmann Institute of Science. 2017b. Gene cards. Viitattu 3.11.2017 <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=E2F3>

Weizmann Institute of Science. 2017c. Gene cards. Viitattu 28.11.2017 <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACTB>

Direct-zol RNA MiniPrep -kittiohje (Zymo Research)

4

Biological Liquids

Add 3 volumes TRI Reagent[®] to each liquid sample, (3:1; see table below) and mix thoroughly for 5 minutes. To remove particulate debris, centrifuge and transfer the supernatant into an RNase-free tube. Proceed to RNA Purification (below).

| Blood, Plasma, Serum, Semen, CSF, Buffy coat, Body fluids, etc. | Add TRI Reagent [®] |
|---|------------------------------|
| 100 µl | 300 µl |

Reaction Clean-Up

For clean-up of enzymatic reactions, add 3 volumes TRI Reagent[®] to each liquid sample, (3:1; see table below) and mix thoroughly. Proceed to RNA Purification (below).

| <i>In vitro</i> transcription, DNase I digestion, Labeling reaction, etc. | Add TRI Reagent [®] |
|---|------------------------------|
| 100 µl | 300 µl |

(II) RNA Purification

All centrifugation steps should be performed at 10,000-16,000 x g for 30 seconds.

1. Add an equal volume ethanol (95-100%) to a sample lysed in TRI Reagent[®] or similar¹ and mix thoroughly.
2. Transfer the mixture into a Zymo-Spin[™] IC Column² in a Collection Tube and centrifuge. Transfer the column into a new collection tube and discard the flow-through.

Recommended: DNase I treatment (in-column)³

- (D1) Add 400 µl RNA Wash Buffer to the column and centrifuge.
 (D2) In an RNase-free tube, add 5 µl DNase I (6 U/µl)⁴, 35 µl DNA Digestion Buffer and mix⁴. Add the mix directly to the column matrix.
 (D3) Incubate at room temperature (20-30°C) for 15 minutes. Proceed to step 3.

3. Add 400 µl Direct-zol[™] RNA PreWash⁵ to the column and centrifuge. Discard the flow-through and repeat this step.
4. Add 700 µl RNA Wash Buffer⁵ to the column and centrifuge for 2 minutes to ensure complete removal of the wash buffer. Transfer the column carefully into an RNase-free tube.
5. To elute RNA, add 15 µl of DNase/RNase-Free Water directly to the column matrix and centrifuge.

Alternatively, for highly concentrated RNA use ≥6 µl elution.

RNA⁶ can be used immediately or stored frozen at ≤-70°C.

Up to 100 µl of biological liquid per prep can be processed without having to reload the spin column.

Notes:

¹ TRIzol[®], RNAzol[®], QIAzol[®], TriPure[™], TriSure[™] and all other acid-guanidinium-phenol reagents.

² To process samples >700 µl, reload the column and repeat Step 2 (or use a vacuum manifold, centrifuge the column and proceed with the protocol).

³ Prior to use, reconstitute the lyophilized DNase I as indicated on the vial. Store frozen aliquots.

⁴ Mix by gentle inversion.

* Unit definition – one unit increases the absorbance of a high molecular weight DNA solution at a rate of 0.001 A₂₆₀ units/ml of reaction mixture at 25°C.

⁵ Before use, add ethanol to the buffer concentrate (Buffer Preparation, page 3).

⁶ For complete removal of PCR (RT) inhibitors from plant, soil and fecal samples, use the OneStep[™] PCR Inhibitor Removal Kit, D6030.

ZYMO RESEARCH CORP.

Phone: (949) 679-1190 • Toll Free: (888) 882-9682 • Fax: (949) 266-9452 • info@zymoresearch.com • www.zymoresearch.com

SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline)

SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit

Shipping: On dry/blue ice Catalog numbers
 BIO-65053: 50 reactions
 Batch No.: See vial BIO-65054: 250 reactions



A Meridian Life Science® Company

Store at -20°C

Storage and stability:

SensiFAST cDNA Synthesis Kit is shipped on dry/blue ice and should be stored at -20 °C upon receipt. When stored under optimum conditions, the reagents are stable for a minimum of one year from date of purchase.

Unit definitions:

Reverse Transcriptase: One unit catalyzes the incorporation of 1 nmol of dTTP into acid-insoluble material in 10 minutes at 37 °C in 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, 40 mM KCl, 1 mM MnSO₄, 1 mM DTT, and 0.5 mM [3H]TTP, using 200 µM oligo(dT)₁₂₋₁₈-primed poly(A)_n as template.

RNase Inhibitor: One unit inhibits 5 ng of RNase A by 50%.

Safety precautions:

Harmful if swallowed. Irritating to eyes, respiratory system and skin. Please refer to the material safety data sheet for information regarding hazards and safe handling practice.



Signal word: WARNING

Description

SensiFAST cDNA Synthesis Kit provides a rapid and very sensitive method for first strand cDNA synthesis for use in real-time PCR studies. The 5x TransAmp™ Buffer provides highly optimized components for efficient reverse transcription, and includes a unique blend of anchored oligo dT and random hexamer primers to ensure unbiased 3' and 5' coverage for enhanced data accuracy. An extremely efficient reverse transcriptase delivers highly robust first strand synthesis and higher cDNA yields from a wide range of input RNA concentrations. SensiFAST cDNA Synthesis Kit offers enhanced sensitivity, efficiency and reproducibility for exceptional performance in subsequent real-time PCR experiments.

Components

| Product Name | 50 reactions | 250 reactions |
|-----------------------|--------------|---------------|
| 5x TransAmp Buffer | 200 µl | 1 ml |
| Reverse Transcriptase | 50 µl | 250 µl |

SensiFAST cDNA Synthesis Mix Reaction Guidelines

Template Quality

- Intact, high-quality RNA is essential for the reverse transcription reaction
- All reagents for use with RNA must be prepared using nuclease-free, molecular biology grade water
- RiboSafe RNase Inhibitor is included in the SensiFAST cDNA Synthesis Kit to help reduce template degradation and increase yield of RT-qPCR product
- Low-copy-number genes may require an increase in starting material
- Use a suitable RNA extraction reagent e.g. TRIsure™ or ISOLATE™ II RNA Mini Kit

RNA Priming

A unique blend of random hexamer and anchored oligo dT primers in the SensiFAST cDNA Synthesis Mix provides optimal sensitivity and accuracy of first-strand cDNA synthesis. Anchored oligo dT primers anneal precisely to the junction of the poly-A tail (found on the 3' end of most eukaryotic mRNAs) and the gene of interest. This ensures that the coding 3' end of mRNAs are always represented. The reverse transcriptase can also prime from the random hexamers, to give broad coverage of all the regions of the RNA and thus a cDNA pool representative of the transcriptome. The combined benefits of both priming strategies offers enhanced data quality.

Reverse Transcription

Efficient reverse transcription can normally be achieved at 42 °C for 15 minutes, as the TransAmp Buffer contains reverse transcriptase enhancers that reduce complex RNA secondary structure. For templates that have a high degree of structure, such as viral RNA and some plant RNA, we suggest using an additional 15 minute 48 °C incubation step.

No RT Control

It is important to always include the appropriate 'no RT' or 'minus RT' control reactions in your experimental design. As the reverse transcriptase is a separate component of the SensiFAST cDNA Synthesis Kit, it is possible to include a formal cDNA synthesis control that includes all components except the reverse transcriptase.

DNase I digestion of total RNA

To eliminate any residual contaminating genomic DNA that can affect highly sensitive real-time PCR applications (e.g. probe-based quantification of a low abundant target), we recommend using a high quality RNase-free DNase I during or after RNA extraction protocols. DNase I removal by ethanol precipitation, or with a RNA clean-up kit e.g. ISOLATE II RNA Micro Clean-Up Kit is required before proceeding with first-strand cDNA synthesis.

SensiFAST cDNA Synthesis Kit Protocol

- Prepare the mastermix on ice.
- Vortex solutions and centrifuge briefly before use.

| Total RNA or mRNA (up to 1 µg) | n µl |
|--------------------------------|-------------|
| 5x TransAmp Buffer | 4 µl |
| Reverse Transcriptase | 1 µl |
| DNase/RNase free-water* | Up to 20 µl |

* Available separately (see Associated Products)

- Mix gently by pipetting.
- Set up the following program in a thermal cycler:
 - 25 °C for 10 min (primer annealing)
 - 42 °C for 15 min (reverse transcription)
 - Optional Step: 48 °C for 15 min (for highly-structured RNA)
 - 85 °C for 5 min (inactivation)
 - 4 °C hold (or chill on ice)
- Use up to 4 µl (1/5th volume) of cDNA synthesis reaction product in a 20 µl volume real-time PCR. If desired, reaction product can be diluted in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA prior to use.
- Alternatively, store reaction product or diluted cDNA at 4 °C for 1 week or -20 °C for long term storage.

This protocol is intended for use as a guide only; conditions will vary from reaction to reaction and may need optimization.