

Jenna Mämmi & Kirsi Timonen

**VAL201-PEPTIDIN VAIKUTUS SIGNAALINSIIRTOON HORMONIRIIPPUVAIS-  
SA RINTASYÖPÄSOLUISSA**

**VAL201-PEPTIDIN VAIKUTUS SIGNAALINSIIRTOON HORMONIRIIPPUVAIS-  
SA RINTASYÖPÄSOLUISSA**

Jenna Mämmi & Kirsi Timonen  
Opinnäytetyö  
Kevät 2014  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

---

Tekijä(t): Mämmi, Jenna. Timonen, Kirsi  
Opinnäytetyön nimi: Val201-peptidin vaikutus signaalinsiirtoon hormoniriippuvaisissa rintasyöpäsoluissa  
Työn ohjaaja(t): Mäkitalo, Outi. Rasi, Simo. Reponen, Paula  
Työn valmistumislukukausi ja -vuosi: Kevät 2014 Sivumäärä: 26 + 8 liitesivua

---

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää Val201-peptidin vaikutuksia hormoniriippuvaisten rintasyöpäsolujen signaalinsiirtoon. Työn tilaajana oli ValiRx Plc:n tytäryhtiö ValiFinn Oy, joka toimii Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa. Työ toteutettiin projektina.

Työlle asetettiin kolme päätavoitetta, jotka olivat selvittää, vaikuttaako Val201-peptidi estävästi hormoniriippuvaisten rintasyöpäsolujen signaalin siirtymiseen estrogeenin sitoutuessa reseptoriinsa, pystyykö Val201-peptidi estämään signaalinsiirtäjäkinaasin (Src) kiinnittymistä reseptorin solukalvon sisäpuoliseen osaan sekä pystyykö Val201-peptidi estämään estrogeenivälitteisen ERK2-stimulaation ja siten solusyklin etenemisen S-vaiheeseen. Kokeita varten viljeltiin MCF-7-rintasyöpäsoluja, joita altistettiin eri pitoisuuksille estrogeeni- ja Val201-liuoksia. Saadut näytteet analysoitiin määrittäen niistä kokonaisproteiinipitoisuudet, fosforyloituneiden Src:n ja ERK:n sekä kokonais-ERK:n pitoisuusmuutokset.

Kinaasimääritykset tehtiin semikvantitatiivisesti ja tuloksista muodostettiin pylväsdiagrammit pitoisuuserojen havainnollistamiseksi. Reagenssien määrä oli rajallinen, joten rinnakkaismäärityksiin ei ollut mahdollisuutta. Kokeistamme saatujen tulosten perusteella Val201-peptidi on potentiaallinen lääke rintasyövän hoitoon, joskin lisätutkimuksia tarvitaan. Tulostemme mukaan Val201-peptidillä vaikuttaisi olevan suotuisissa olosuhteissa estävä vaikutus estrogeenivälitteiseen signaalinsiirtoon.

---

Asiasanat:

*Val201-peptidi, MCF-7, Src-kinaasi, ERK, signaalinsiirto, rintasyöpä, soluviljely*

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Science  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

---

Author(s): Mämmi, Jenna. Timonen, Kirsi

Title of thesis: The Effect of Val201 peptide on Signal Transduction on Hormone Dependent Breast Cancer Cells

Supervisor(s): Mäkitalo, Outi. Rasi, Simo. Reponen, Paula

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2014

Number of pages: 26, 8 appendices

---

This thesis is a part of ValiRx Plc's anti-cancer drug development project. The study was assigned to us by ValiFinn Oy, a subdivision of ValiRx Plc and the project was carried out in Oulu University of Applied Sciences and the Department of Physiology of Oulu University.

The aims of the project were to study if Val201-peptide had an inhibiting effect on signal transduction on hormone dependent breast cancer cells and if it was capable of preventing the Src from binding to its intracellular membrane receptor. The third aim was to discover if Val201-peptide was able to inhibit the estrogen-related ERK2 stimulation.

The project started with culturing breast cancer cells using the MCF-7 cell line. After obtaining an adequate quantity of cells they were laid to 24-well plates for the experiment. The cells were pre-disposed to different concentrations of Val201-peptide and estrogen. The exposure time was varied as well. The samples were then analyzed determining their total protein level and changes in total ERK and phosphorylated Src and ERK levels.

The results suggested that Val201-peptide is a potential anti-cancer drug for breast cancer. It was found that the Val201-peptide might be able to prevent the Src from binding to its intracellular receptor and therefore the ERK2 stimulation can be inhibited. It seems that Val201-peptide has an inhibiting effect on signal transduction but further research is required.

---

Key words:

*Val201-peptide, MCF-7, Src-kinase, ERK, signal transduction, breast cancer, cell culture*

# SISÄLLYS

JOHDANTO .....	6
1 RINTASYÖPÄ.....	7
1.1 MCF-7 .....	8
2 SIGNAALINSIIRTÄJÄKINAASIT.....	9
2.1 Src-kinaasi.....	9
2.2 ERK .....	10
2.3 Val201-peptidi.....	11
3 PROJEKTIOORGANISAATIO JA TAVOITTEET.....	12
3.1 Projektioorganisaatio .....	12
3.2 Projektin tavoitteet .....	13
4 PROJEKTIN SUORITUS JA KÄYTETYT MENETELMÄT .....	14
4.1 Soluviljely.....	14
4.2 Kokeiden suoritus .....	15
4.3 Menetelmäperiaatteet ja analysointi .....	16
4.3.1 Kokonaisproteiinimääritys.....	16
4.3.2 Kinaasimääritykset.....	16
5 TULOKSET.....	18
6 POHDINTA.....	21
LÄHTEET.....	23
LIITTEET .....	26

## JOHDANTO

Rintasyöpä on länsimaisten naisten yleisin syöpä ja sen esiintyvyys on kasvanut viime vuosien aikana (Puustola 2011, hakupäivä 6.2.2014). Rintasyövälle altistavia tekijöitä on useita, mutta muiden syöpien tavoin rintasyöpä aiheutuu viime kädessä DNA-mutaatioista. Hoitomuotoina käytetään säde- ja leikkaushoitoa sekä liitännäishoitona esimerkiksi sytostaatteja (Syöpäjärjestöt 2008, hakupäivä 6.2.2014).

Uudenlaisia syöpälääkkeitä kehitetään jatkuvasti. Tulevaisuuden syöpälääkkeillä pyritään vaikuttamaan spesifisesti solun rakenteen ja toiminnan poikkeavuuksiin. Näin tavoitellaan hyvää tehoa ilman vaikeita haittavaikutuksia (Syöpäjärjestöt 2014, hakupäivä 17.3.2014). Lääkekehitys on pitkä ja monivaiheinen prosessi, joka voi viedä kymmeniä vuosia. Tämä opinnäytetyö on projekti ja se on osa ValiRx Plc:n syöpälääkekehitystä, jossa tutkimme Val201-peptidin vaikutusta signaalinsiirtoon hormoniriippuvaisissa rintasyöpäsoluissa. Työ on jatkoa syksyllä 2013 valmistuneelle *Val201-peptidin vaikutus rintasyöpäsolujen proliferaatioon* –opinnäytetyölle, jossa tutkittiin, miten peptidi vaikuttaa solujen elinkelpoisuuteen.

Val201-peptidin vaikutus perustuu signaalinsiirron estämiseen. Signaalinsiirtäjäkinaasit siirtävät fosfaattiryhmiä luovuttajamolekyyleilta kohdemolekyyleille. Niiden pääsääntöinen tarkoitus on siten aktivoida kohdemolekyylejä, jolloin ne voivat vaikuttaa esimerkiksi solun kasvuun (Cell Signaling Technology 2014, hakupäivä 13.2.2014). Val201 on rakenteeltaan Src-kinaasin kaltainen, joka on yksi signaalinsiirtäjäkinaaseista (Auricchio & Migliaccio 2012, 34–35). Src-kinaasin poikkeuksellinen aktivaatio on liitetty useisiin syöpiin, minkä takia sen toimintaa on alettu tutkia tarkemmin.

Tässä opinnäytetyössä käytetään kaupallista MCF-7-rintasyöpäsolulinjaa. Syöpäsoluja viljellään Val201-peptidin testausta varten ja saaduista näytteistä analysoidaan niistä kokonaisproteiinipitoisuudet, fosforyloituneiden Src:n ja ERK:n sekä kokonais-ERK:n pitoisuusmuutokset. Lopuksi kinaasien pitoisuusmuutoksia verrataan kokonaisproteiinipitoisuuksiin. Proteiinimittaus suoritetaan biuret-menetelmällä ja kinaasimääritykset immunokemiallisesti.

# 1 RINTASYÖPÄ

Syöpä on DNA-mutaatioiden aiheuttama geneettinen häiriö. Mutaatiot voivat syntyä joko spontaanisti tai ympäristötekijöiden vaikutuksesta. Kaikki mutaatiot eivät automaattisesti johda syövän syntymiseen, sillä soluilla on mekanismeja, joiden tehtävä on korjata syntyneitä mutaatioita. Syöpäkasvain eli maligni neoplasia syntyy, kun solut alkavat jakautua, eikä elimistö pysty korjausmekanismeillaan enää vaikuttamaan niihin. (Kumar, Abbas & Aster 2013, 161–163.)

Rintasyöpä on länsimaissa naisten yleisin syöpä. Viime vuosien aikana sen esiintyvyys on kasvanut merkittävästi. Kasvanut eliniän odote ei yksistään selitä rintasyövän esiintymisen kasvua, vaan riskitekijöiksi epäillään esimerkiksi synnyttämättömyyttä, ensisynnytystä myöhäisellä iällä ja lihavuutta. Tästä huolimatta kuolleisuus rintasyöpään on laskenut muun muassa seulontojen ansiosta. (Puistola 2011, hakupäivä 6.2.2014.)

Kuten muitakin syöpiä, myös rintasyöpä voidaan luokitella sen tyypistä riippuen. Yleisimmät rintasyöpätyypit ovat duktaalinen (tiehytperäinen) tai lobulaarinen (rauhasperäinen) *in situ*-karsinooma sekä duktaalinen tai lobulaarinen invasiivinen karsinooma. Näiden lisäksi on olemassa myös muita, harvinaisempia rintasyövän kudostyyppiejä. (Syöpäjärjestöt 2013, hakupäivä 24.2.2014.)

Rintasyövän syyt ovat yhä osittain epäselviä. Tutkijat ovat kuitenkin havainneet kolme tärkeää rintasyövän syntyyn vaikuttavaa tekijää: geneettiset muutokset, hormonaaliset vaikutukset sekä ympäristötekijät. Kuten kaikissa syövissä, proto-onkogeeneihin ja tuumorisupressorigeeneihin vaikuttavat mutaatiot edesauttavat syövän syntyä. Estrogeeni puolestaan stimuloi kasvutekijöiden tuottoa, joka edistää kasvainten syntymistä. Ympäristötekijöillä tarkoitetaan kehon ulkopuolelta tulevia karsinogeenejä, kuten ionisoiva säteily. (Sattar 2013, 707–714.)

Proto-onkogeeneit ja tuumorisupressorigeeneit ovat geenejä joita on normaalisti toimivissa soluissa. Proto-onkogeeniin vaikuttava mutaatio saa aikaan geenin aktivoitumisen ja aiheuttaa solun kontrolloimattoman jakautumisen (Isola & Kallioniemi 2013, 19). Tuumorisupressori- eli kasvurajoitteenit korjaavat normaalisti jo tapahtuneita mutaatioita. Mikäli tuumorisupressorigeeni mutatoituu, sen toiminta lakkaa eikä se siten pysty enää toimimaan syöpää estävällä tavalla. (Isola 2013, 19–20.)

Rintasyövän ensisijaiset hoitomuodot ovat säde- ja leikkaushoito. Näiden lisäksi jatkohoitomuotoina käytetään erilaisia liitännäishoitoja, kuten hormonihoidon ja solunsalpaajia. Leikkaushoidon tarkoituksena on poistaa syöpäkudos elimistöstä. Sen rinnalla voidaan käyttää sädehoitoa, joka tuhoaa jakautumisvaiheessa olevia soluja. Koska kaikkia syöpäsoluja ei välttämättä saada leikkauksen avulla poistettua, tarvitaan avuksi usein lääkehoitoa. Lääkehoitona käytetään sytostaatteja sekä hormoni- ja vasta-ainehoitoja. Hoitomuodon valinta riippuu syöpätyypistä. (Syöpäjärjestöt 2008, hakupäivä 6.2.2014.)

## 1.1 MCF-7

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) on rintasyöpäsolulinja, joka eristettiin 69-vuotiaalta kaukasialaiselta naiselta vuonna 1970. Rintasyöpä oli levinnyt, joten syöpäsoluja ei eristetty suoraan rintakudoksesta vaan pleuraeffuusiosta eli pleuranestepurkaumasta. Poistettu kudos osoittautui pahanlaatuisiksi adenokarsinomeiksi, josta kerättiin soluja MCF-7-solulinjaa varten. (MCF-7 2014, hakupäivä 16.1.2014.)

MCF-7 on yksi tutkituimmista rintasyöpäsolulinjoista. Se on säilyttänyt erinäisiä rintarauhasen epiteelisolujen ominaisuuksia, kuten morfologisia ominaispiirteitä sekä estrogeeni- ja progesteronireseptoreja. Tämän ansiosta solut käyttäytyvät *in vitro* -olosuhteissa hyvin samankaltaisesti kuin ihmisen elimistössä. (Sutherland, Watts, Lee & Musgrove 1999, 85.)



## 2 SIGNAALINSIIRTÄJÄKINAASIT

Kinaasit ovat entsyymejä, joiden tehtävä on siirtää fosfaattiryhmiä luovuttajamolekyyleiltä (esimerkiksi ATP) kohdemolekyyleille eli substraateille. Tätä fosfaattiryhmien siirtoa kutsutaan fosforylaatioksi. Sen pääsääntöinen tarkoitus on aktivoida kohdemolekyylejä, kuten esimerkiksi proteiinikinaasit aktivoivat omia kohdeproteiinejaan signaalinvälityksen kautta. Tätä tapahtumaa kutsutaan signaalinsiirtoketjuksi. (Cell Signaling Technology 2014, hakupäivä 13.2.2014.)

### 2.1 Src-kinaasi

Src-kinaasi on yksi solun proto-onkogeneista, jonka funktiona solussa on signaalin välitys (Isola & Kallioniemi 2013, 19). Src on osa Src-kinaasiperhettä (SFK), johon kuuluu myös muita ei-reseptorisia tyrosiinikinaaseja, kuten Yes ja Fyn. Näitä tyrosiinikinaaseja on useimmissa ihmiskehon kudoksissa, esimerkiksi virtsarakossa, rintakudoksessa ja aivoissa. (Sen & Johnson 2011, 1.)

Ihmisen elimistössä esiintyvä Src-kinaasi on proteiini, joka koostuu 536 aminohaposta. Src-molekyylin N-terminaalipäähän on liittynään myristiinihapporyhmä. Sitä seuraa SH4-alue ja kyseiselle kinaasille ominainen sekvenssi (X). Näitä seuraavat osat ovat SH3 ja SH2 sekä niitä SH1:een yhdistävä linkkeri (L). Proteiinin 419. aminohappo on tyrosiini, joka sijaitsee SH1-alueella. Proteiinin viimeisenä osana on C-terminaalinen säätelyosa, jossa sijaitsee tyrosiini paikalla 530 (R). Näiden tyrosiinien fosforylaatio johtaa Src-kinaasin aktivoitumiseen. Src-kinaasin rakennetta on havainnollistettu kuviossa 1. (Sen & Johnson 2011, 2.)

Myr	SH4	X	SH3	SH2	L	Tyr kinaasi (SH1)	R
-----	-----	---	-----	-----	---	-------------------	---

KUVIO 1. Src-kinaasin rakenne. (Sen & Johnson 2011, 2.)

Src-kinaasi kiinnittyy estrogeenireseptorin solukalvon sisäpuoliseen osaan. Jotta kinaasi voi kiinnittyä siihen, tulee reseptorin solukalvon ulkopuoliseen osaan olla ensin kiinnittynään estrogeenimolekyyli. Src-kinaasin signaalinsiirtovaikutus alkaa vasta, kun sen aktiivinen muoto on kiinnittynyt estrogeenireseptoriin. (Mann, Cortez & Vadlamudi 2011, 1693.)

Src:n vaikutukset nisäkässoluihin ovat pleiotrooppisia eli yksi geeni vaikuttaa moneen ominaisuuteen. Vaikutuksen kohteita ovat muun muassa solun morfologia, ympäristöön kiinnittyvyys, liikkuvuus, invaasiokyky, proliferaatio ja erilaistuminen. (Sen & Johnson 2011, 2; Zhang, Wang, Gerald, Hudis, Norton, Smid, Foekens & Massagué 2009, 68.) Src-kinaasin toiminta riippuu sen sijainnista ja se voi välittää reseptoreilta tulevia signaaleja eteenpäin solun sisällä. Kinaasi muokkaa solukalvolta tulevia signaaleja solun sisäiseen signaalointiin sopiviksi, jotta ne ymmärretään esimerkiksi tumakalvolla. Muun muassa kasvutekijäreseptoreilta tulevat signaalit aiheuttavat kinaasin välityksellä solun kasvua ja proliferaatioita. Tumassa Src:n uskotaan säätelevän solusykliä vuorovaikutuksessa muiden proteiinien kanssa. (McDowall 2014a, hakupäivä 4.3.2014.)

Normaalisti Src esiintyy soluissa inaktiivisessa muodossa ja se aktivoituu vain tarvittaessa. Jos fosforylaatitasapaino häiriintyy, muutokset voivat aiheuttaa Src-kinaasin toiminnassa rajuja seurauksia. (McDowall 2014b, hakupäivä 4.3.2014.) Src-kinaasin aktivoituminen tapahtuu yleisimmin syövän yhteydessä. Useissa tutkimuksissa on havaittu Src-aktiivisuuden nousua muun muassa rint- ja paksusuolensyövässä. Myös syövän pahanlaatuisuuden ja aktiivisen Src:n tason nousun on havaittu olevan yhteydessä toisiinsa. Tyrosiinikinaasiperheen aktiivisuutta säädelään usealla eri tavalla. Src:n aktivaatio saavutetaan yleensä rakenteellisilla muutoksilla, joita aiheuttavat toiset kinaasit ja fosfataasit. Src-kinaasin aktiivisuutta voidaan säädellä monilla tavoilla ja mikä tahansa näistä voi edistää sen aktivoitumista syöpäsoluissa. (Sen & Johnson 2011, 2–3, 6.)

Src:n poikkeuksellisella aktivoitumisella vaikuttaa olevan merkittävä yhteys syövän etenemiseen. Tämän lisäksi Src saattaa vaikuttaa syövän metastasointikykyyn eli kykyyn lähettää etäpesäkkeitä. (Irby & Yeatman 2000, 5636.) Ilmeisesti Src:n vaikutuksesta metastasoitumista voi tapahtua vuosia alkuperäisen kasvaimen poiston jälkeen. Näin tapahtuu erityisesti syövässä, jotka ovat estrogeenireseptoriposiitivisia. (Zhang ym. 2009, 68–69.) Src-kinaasiperhe onkin noussut tärkeäksi kohteeksi syöpälääkekehityksessä (Auricchio & Migliaccio 2012, 33).

## 2.2 ERK

ERK (extracellular signal regulated kinase) on proteiini ja osa solun sisäistä signaalinsiirtoketjua. ERK aktivoituu osana Src:n estrogeenivälitteisesti käynnistämää signaalinsiirtoketjua, jossa Src aktivoi fosforyloimalla substraattinsa, joka puolestaan jatkaa seuraavan substraatin aktivoimista. Näin signaali siirtyy ketjumaisesti eteenpäin ja viesti kulkeutuu kohteeseensa. Fosforyloituneella

eli aktivoituneella ERK:lla on solulimassa useita substraatteja. Erilaistuneissa soluissa sillä on tärkeitä tehtäviä, kuten solun jakautumisen käynnistäminen ja säätely. (Hofmann 2009, 5-7.)

ERK:t kuuluvat MAP-kinaaseihin (mitogen activated protein kinase) ja niitä on useita eri muotoja, kuten ERK1 (MAPK3) ja ERK2 (MAPK1). (Migliaccio, Di Domenico, Castoria, De Falco, Bontempo, Nola & Auricchio 1996, 1292.) Tutkimusten mukaan selektiivisellä inhibiittorilla voidaan estää estrogeenin stimuloimaa ERK2:n aktivoitumista. Sillä voidaan estää siten solusyklin eteneminen G<sub>1</sub>-vaiheesta S-vaiheeseen, jossa DNA replikoituu. (Castoria, Barone, Di Domenico, Bilancio, Ametrano, Migliaccio & Auricchio 1999, 2500.)

### 2.3 Val201-peptidi

Val201 on ensimmäinen syöpälääke, jonka toiminta perustuu spesifisesti steroidireseptoriin riippuvan signaalinsiirron estämiseen, kun taas muut samankaltaiset lääkkeet voivat kiinnittyä useisiin erilaisiin reseptoreihin. Val201-peptidin rakenne jäljittelee läheisesti Src-kinaasin rakennetta ja prekliinisissä tutkimuksissa onkin osoitettu, että Val201 ehkäisee estrogeenivälitteistä estrogeenireseptorin ja Src:n välistä vuorovaikutusta häiritsemättä reseptorin normaalia transkriptiionaalista toimintaa. (Auricchio & Migliaccio 2012, 33–35.) Peptidi estää solusyklin siirtymistä G<sub>1</sub>-vaiheesta S-vaiheeseen eli DNA:n replikoitumiseen estrogeenivälitteisissä rintasyöpäsoluissa *in vitro* (Migliaccio, Varricchio, De Falco, Castoria, Arra, Yamaguchi, Ciociola, Lombardi, Di Stasio, Barbieri, Baldi, Barone, Appella & Auricchio 2007, 6620).

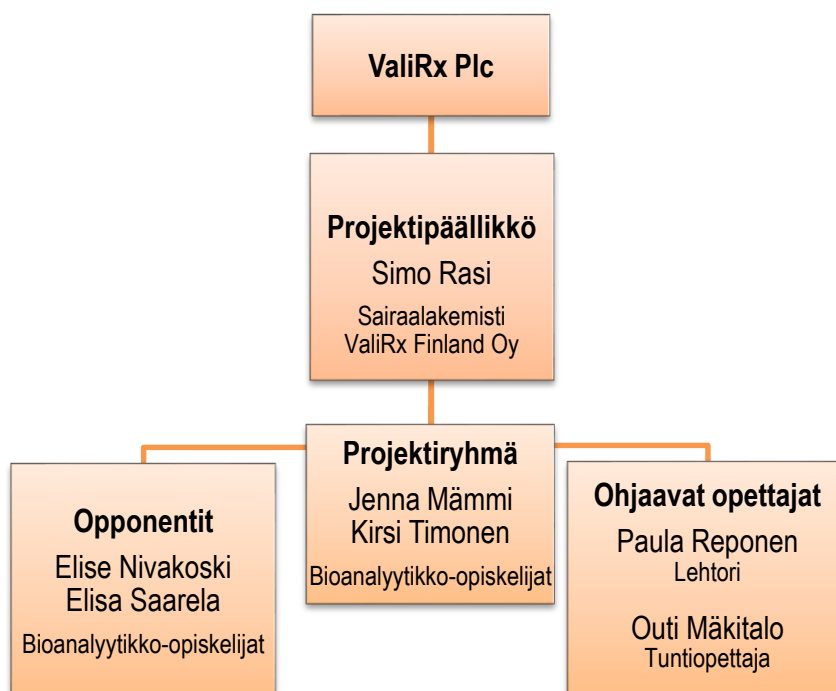
Opinnäytetyömme on jatkoa syksyllä 2013 valmistuneelle *Val201-peptidin vaikutus rintasyöpäsolujen proliferaatioon* –opinnäytetyölle, jossa tutkittiin, miten peptidi vaikuttaa solujen elinkelpoisuuteen. Työssä testattiin peptidin vaikutusta soluihin sekä estrogeenin kanssa että ilman. Lopputuloksena oli, että estrogeenin läsnä ollessa lääkkeen vaikutus ei merkittävästi vaikuttanut solujen elinkelpoisuuteen, toisin kuin ilman estrogeenia. Tästä työn tekijät päättelivät, että Val201-peptidi on sopivampi ei-hormoniriippuvaisiin rintasyöpäkasvaimiin.

### 3 PROJEKTIORGANISAATIO JA TAVOITTEET

Opinnäytetyömme on osa ValiRx Plc:n lääkekehitystyötä, mutta varsinaisena työn tilaajana toimii tytäryhtiö ValiRx Finland Oy eli ValiFinn. ValiRx Plc on kansainvälinen biotieteiden alan tutkimusyritys ja sen pääkonttori sijaitsee Lontoossa. Yrityksen keskeinen tutkimuskohde on onkologisten sairauksien hoitomuotojen kehittäminen (ValiRx 2014a, hakupäivä 7.2.2014). ValiFinn perustettiin Oulussa vuonna 2008 ja se toimii Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa yhteistyössä bioanalytiikan koulutusohjelman kanssa (ValiRx 2014b, hakupäivä 7.2.2014).

#### 3.1 Projektioorganisaatio

Projektioorganisaatiomme koostui projektipäälliköstä, projektiryhmästä, ohjaajista ja vertaisarvioijista. Projektipäällikkönä ja pääasiallisena sisällönhoajaana toimi ValiRx Finland Oy:n sairaalakemisti Simo Rasi. Projektiryhmän muodostivat opinnäytetyön tekijät Jenna Mämmi ja Kirsi Timonen. Lehtori Paula Reponen ja tuntiopettaja Outi Mäkitalo toimivat ohjaavina opettajina. Työn vertaisarvioijat olivat kanssaopiskelijat Elise Nivakoski ja Elisa Saarela.



KUVIO 2. Projektioorganisaatiokaavio.

### 3.2 Projektin tavoitteet

Opinnäytetyömme on osa ValiRx Plc:n lääkekehitysprosessia. He ovat kehittäneet uuden syöpälääkkeen Val201-peptidin, ja työssämme testataan kyseistä lääkettä. Tavoitteiksi työn tilaaja antoi selvittää:

1. Vaikuttaako Val201-peptidi estävästi hormoniriippuvaisten rintasyöpäsolujen signaalin siirtymiseen estrogeenin sitoutuessa reseptoriinsa.
2. Pystyykö Val201-peptidi estämään signaalinsiirtäjäkinaasin (Src) kiinnittymistä reseptorin solukalvon sisäpuoliseen osaan.
3. Pystyykö Val201-peptidi estämään estrogeenivälitteisen ERK2-stimulaation ja siten solusyklin etenemisen S-vaiheeseen.

Asetimme projektille työn tilaajan tavoitteiden lisäksi laadullisen tavoitteen ja laadun takaamiseksi noudatimme GLP-käytänteitä (Good Laboratory Practise). Tavoitteenamme on tuottaa validia tutkimustietoa, josta on konkreettista hyötyä työn tilaajalle. Mahdollisuuksien puitteissa otimme huomioon myös kestäväen kehityksen, mutta soluviljelytyöskentelyn luonteen ja aseptiikan vuoksi jätettä syntyy kertakäyttövälineiden vuoksi väistämättä.

Oppimistavoitteenamme halusimme muun muassa hyödyntää molekyylibiologian ja geeniteknikan kurssilla opetettuja metodeja käytännössä. Tavoitteenamme oli oppia lisää soluviljelystä ja sen tuomista mahdollisuuksista. Halusimme olla osana tärkeää tutkimusta ja tutustua tutkimusprosessiin. Samalla saimme mahdollisuuden tutustua lääkekehitysprosessiin.

## 4 PROJEKTIN SUORITUS JA KÄYTETYT MENETELMÄT

Työn käytännön osuudet suoritettiin Oulun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveystieteiden yksikön soluviljelylaboratoriossa sekä Oulun yliopiston fysiologian laitoksella. Työskentelyssä noudatettiin GLP-käytänteitä (Good Laboratory Practise). Koska soluviljely kuului oleellisena osana työhön, hyvä aseptiikka oli erityisen tärkeässä asemassa. Kokeiden suorituksen jälkeen näytteistä määritettiin kokonaisproteiinipitoisuudet. Solun sisäistä signaalinsiirtoa mitattiin analysoimalla fosforyloituneiden Src:n ja ERK:n sekä kokonais-ERK:n pitoisuusmuutokset. Pidimme työstä laboratorionäytteenkirjaa, joka jäi työn tilaajalle mahdollista myöhempää käyttöä varten.

### 4.1 Soluviljely

Soluviljelyllä tarkoitetaan eukaryoottisolujen kasvattamista laboratorio-olosuhteissa. Olosuhteet pyritään järjestämään siten, että ne vastaavat mahdollisimman hyvin solujen luonnollisia kasvuoloja. Tämän takia kaikki käytetyt liuokset tulee lämmittää +37-asteiseksi ja soluja kasvatetaan hiilidioksidilämpökaapissa. Soluviljelmät ovat herkkiä epäpuhtauksille, joten kontaminoitumisen välttämiseksi on tärkeää noudattaa aseptisia työtapoja. Niihin kuuluvat laminaarikaapissa työskentely, kertakäyttökäsineiden ja steriilien välineiden käyttö sekä tarvittaessa välineiden käsitteleminen 70 % etanolilla.

Työn käytännön osuus aloitettiin soluviljelyllä tammikuussa 2014. Koska opinnäytetyömme on jatkoa jo aiemmin aloitetulle Val201-peptidin testaukselle, käytimme työssä edellisen ryhmän pakastamia MCF-7-soluja. Soluviljelyä varten valmistimme steriilin kasvatusliuoksen (mediumin) kaupallisesta DMEM-kasvatusliuoksesta, streptomysiini-penisilliinantibiootista sekä lämpöhauteessa inaktivoitua ja suodatetusta FBS:stä (Fetal Bovine Serum) (liite1). MCF-7-soluja varten mediumin tulee olla 10 % FBS:n suhteen sekä sisältää L-glutamiinia (Cell Lines Service 2014, hakupäivä 23.1.2014).

Aloitimme soluviljelyn viljelemällä yhden ampullin nestetyypessä olleita soluja kahteen pieneen soluviljelypulloon. Soluja kasvatettiin hiilidioksidilämpökaapissa (5 % CO<sub>2</sub>, +37 °C). Solujen kasvua seurattiin ja kasvustoa harvennettiin tarpeen mukaan jakamalla soluja uusiin pulloihin niiden elin-tilan lisäämiseksi. Tällä tavoin solujen kasvuvauhti ja -tapa tulee tutuksi, mikä puolestaan helpottaa esimerkiksi morfologiassa mahdollisesti tapahtuvien muutosten huomaamista. Morfologian

muutokset voivat olla merkki muun muassa vääränlaisista kasvuoloista. Myös mahdolliset kontaminaatiot voidaan havaita mikroskoopin avulla. (Davis 2011, 110–111.) Kun olimme saaneet tarpeellisen määrän soluja kokeitamme varten, pakastimme solut odottamaan kokeiden suoritusajankohtaa. Pakastuksessa käytetään freezing mediumia, jonka sisältämä dimetyylisulfoksidi suojelee soluja pakastuksen aikana (Freshney 2005, 322). Solut pakastettiin pienissä cryo-putkissa ja laitettiin isopropanolihauteeseen (-70 °C), josta ne siirrettiin vuorokauden kuluttua nestetyyppeen. Soluviljelyyn kului aikaa muutama viikko.

## 4.2 Kokeiden suoritus

Kokeet suoritettiin altistamalla soluja eri vahvuisille estrogeeni- ja Val201-peptidiliuksille. Estrogeeninä käytettiin estradiolia (E<sub>2</sub>) ja nollanäytteenä pelkkää kasvatusliuosta. Soluviljelypulloissa kasvatetuista soluista valmistettiin solususpensiot, joiden solumäärät laskettiin kammiolaskennan avulla. Näin suspensiot voitiin laimentaa siten, että niistä saatiin pipetoitua sama määrä soluja jokaista kaivoa kohden (30 000 solua/100 µl/kaivo). Kasvatettuja soluja jaettiin neljälle 24-kuoppalevyille (levyt 1-4) kasvamaan kokeiden suoritusta varten. Kuhunkin kaivoon lisättiin 100 µl solususpensiota ja 400 µl kasvatusliuosta. Solut laitettiin kuoppalevyillä hiilidioksidilämpökaappiin kasvamaan muutamaksi päiväksi, jonka jälkeen solujen päällä ollut kasvatusliuos vaihdettiin DMEM-kasvatusliuokseksi, joka ei sisällä fenolipunaa. Fenolipunaa sisältävällä kasvatusliuoksella on todettu olevan lievästi estrogeeniä muistuttavia vaikutuksia, joten sillä saattaisi olla vaikutusta tuloksiin (Migliaccio ym. 1996, 1292). Fenolipunaton kasvatusliuos aiheuttaa soluille lievän ravinnonpuutteen, minkä ansiosta solut ovat herkempiä testauksessa käytettäville testiliuksille. Fenolipunattoman kasvatusliuoksen tulee antaa vaikuttaa soluihin vähintään 24 tunnin ajan.

Testiliuksissa käytettiin normaalia kasvatusliuosta, 10 nM estrogeeniä sekä 4 nM, 40 nM, 400 nM ja 4000 nM Val201-peptidiä (liite 2). Kuoppalevyillä 1 ja 2 kokeessa käytettiin seuraavia altistusajoja: 10 sekuntia, 1, 5, 10, 30 ja 60 minuuttia. Kuoppalevyillä 3 ja 4 käytettiin altistusajoja 10 sekuntia, 2 minuuttia, 20 minuuttia ja 60 minuuttia. Kokeet suoritettiin seuraavasti: kuoppalevyn kaivoista pipetoitiin kasvatusliuos pois, jonka jälkeen solujen päälle lisättiin kuhunkin kaivoon 200 µl testiliuosta. Testiliuoksen annettiin vaikuttaa määrätyn ajan, jonka jälkeen se pipetoitiin pois ja solut pestiin jääkylmällä 1 X PBS:llä 200 µl/kaivo. Heti pesun jälkeen solujen päälle lisättiin soluja hajottavaa puskuria 200 µl/kaivo, joka sisälsi proteaasiestäjää. Hajottavan puskurin annettiin vaikuttaa +4 °C tasosekoittajassa 20–30 minuuttia, jonka jälkeen kuoppalevyt pakastettiin -70 °C. Kuoppalevyjen pipetointikaaviot on havainnollistettu liitteessä 4.

### 4.3 Menetelmäperiaatteet ja analysointi

Kitin sisältämät reagenssit riittivät yhteensä 96 näytteelle. Neljällä kuoppalevyllä oli yhteensä 80 näytettä, joten karsimme näytemäärämme puoleen, koska samalla kitillä tehtiin myös toisen ryhmän näytteet. Kuoppalevyt 1 ja 2 olivat keskenään rinnakkaiset, joten levy 1 jätettiin kokonaan pois. Lisäksi levyiltä 2 jätettiin pois viiden ja 30 minuutin altistusaikojen näytteet. Levyiltä 3 ja 4 jätettiin analysoimatta 20 minuutin altistusajan näytteet (liite 4). Kokonaisproteiinimääritys suoritettiin kvantitatiivisesti ja mittauksulokset ovat liitteessä 4. Emme olleet kiinnostuneita tarkoista kinaasipitoisuuksista, vaan lähinnä niiden pitoisuusmuutoksista, joten tarkoitustamme varten semikvantitatiivinen mittausmenetelmä oli riittävä.

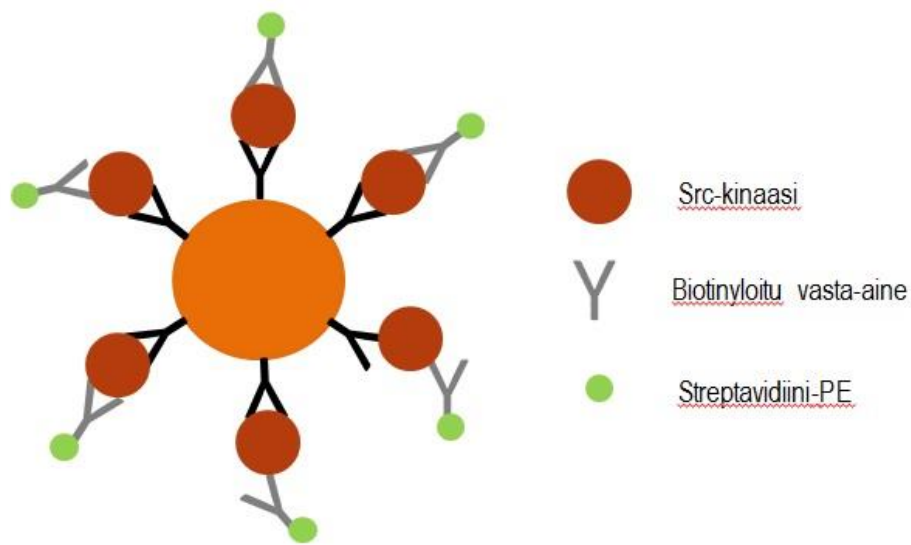
#### 4.3.1 Kokonaisproteiinimääritys

Näytteiden kokonaisproteiinin määritys tehtiin käyttämällä Novagen® BCA Protein Assay -kittiä. Menetelmä perustuu biuret-reaktioon, jonka aiheuttamaa värin muutoksen voimakkuutta mitataan fotometrisesti yleensä aallonpituudella 540 nm. Teknisistä syistä päädyimme kuitenkin käyttämään aallonpituutta 595 nm, jonka projektipäällikkömme Simo Rasi katsoi soveltuvaksi. Biuret-reaktiossa reagenssin  $\text{Cu}^{2+}$  -ionit pelkistyvät näytteen sisältämien proteiinien vaikutuksesta  $\text{Cu}^{+}$  -ioneiksi ja tämä on havaittavissa värin muutoksena. Tapahtuakseen reaktio tarvitsee alkaliset olosuhteet. Kitin proteiinimääritys on luotettava välillä 20–2000  $\mu\text{l/ml}$ . (Novagen 2011, 2)

#### 4.3.2 Kinaasimääritykset

Näytteistä analysoitiin kahta erilaista signaaliinsiirtäjäkinaasia, ERK:ta ja fosforyloitunutta Src:tä. ERK:sta analysoitiin sen kokonaismäärä sekä fosforyloituneen ERK:n osuus. Käytetty menetelmäperiaate oli immunokemiallinen. Näytteitä inkuboitiin kuoppalevyllä fluoresoivasti värjättyjen helmien kanssa, jotka oli päällystetty kullekin kinaasille spesifisillä vasta-aineilla. Jotta reaktiosta saatiin poistettua vasta-aineisiin sitoutumaton kinaasi, näytekaivot pestiin. Muodostuneita helminäyte-komplekseja inkuboitiin biotinyloitujen, kinaaseille spesifisten vasta-aineiden kanssa yön yli. Reaktion loppuun saattamiseksi suoritettiin vielä yksi inkubaatio, jossa kompleksiin sitoutui Streptavidini-PE-konjugaatti. Myös PE on fluoresoiva väri. Src-reaktiossa syntyvää näytekompleskia on havainnollistettu kuviossa 3. (Millipore 2012.)





*KUVIO 3. Src-määrityksen reaktiossa syntyvä näytekompleksi. Oranssi pallo kuvaa fluoresoivasti värjättyä helmeä, joka on päällystetty Src:lle spesifisillä vasta-aineilla.*

Näytteet analysoitiin Luminex® 200™ -analysaattorilla. Analysaattorissa näytteet viritetään, jonka seurauksena fluoresoivat helmet ja PE voidaan havaita ja mitata. Näiden suhteiden perusteella analysaattori laskee näytteiden kinaasipitoisuudet. (Millipore 2012.) Käytimme näytteiden kaupallisia MILLIPLEX® MAP -kittejä, Cell Signaling Buffer and Detection Kit, Phospho Src (Tyr419) Magnetic Bead MAPmate™ Src:lle ja ERK:lle 2-Plex Total/Phospho ERK Magnetic Bead Kit.

## 5 TULOKSET

Työn tavoitteiksi asetettiin selvittää, vaikuttaako Val201-peptidi estävästi hormoniriippuvaisten rintasyöpäsolujen signaalin siirtymiseen estrogeenin sitoutuessa reseptoriinsa, pystyykö Val201-peptidi estämään signaalinsiirtäjäkinaasin (Src) kiinnittymistä reseptorin solukalvon sisäpuoliseen osaan sekä pystyykö Val201-peptidi estämään estrogeenivälitteisen ERK2-stimulaation ja siten solusyklin etenemisen S-vaiheeseen. Tuloksia tulkittiin pylväsdiagrammien avulla, jotka muodostettiin Val201-peptidin pitoisuuksien mukaan.

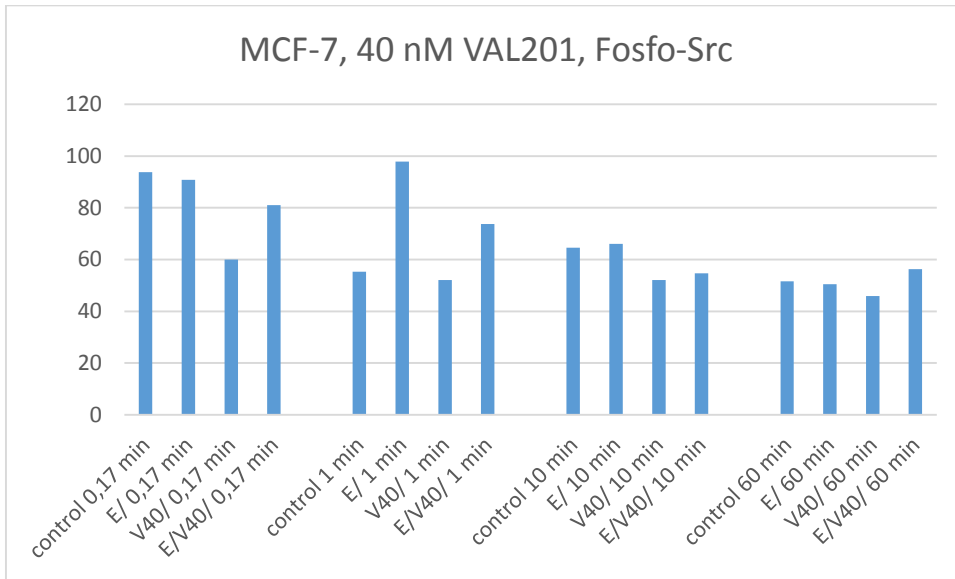
Saavuttaaksemme toivotut tulokset, eli Val201-peptidin estävät vaikutukset signaalinsiirtoon tuloksista tulisi käydä ilmi, että fosforyloituneen Src:n (jatkossa pelkkä Src) osuus pienenee estrogeenin ja Val201-peptidin yhteisvaikutuksesta. Vaikutuksia verrataan DMEM-kontrolliin, jossa soluja ei ole stimuloitu estrogeenilla tai testattavalla lääkkeellä. Pelkällä estrogeenilla stimuloituissa näytteissä tulisi olla havaittavissa Src-tason nousua. Ilman estrogeenia pelkän Val201-peptidin vaikutukset ovat oletettavasti vähäiset kontrolliin verrattuna.

Kuvioissa 4, 5 ja 6 on havainnollistettu mittaustuloksia 40 nM Val201-peptidin osalta. Muut Val201-peptidin eri pitoisuuksien perusteella piirretyt kuvaajat ovat liitteessä 5. Koska meillä ei ollut mahdollisuutta tehdä rinnakkaisnäytteitä, tuloksissa ei ole huomioitu keskiahajontaa tai virhemarginaaleja. Kinaasimääritys oli semikvantitatiivinen, joten tulokset ovat pitoisuuksien suhteen suuntaa antavia.

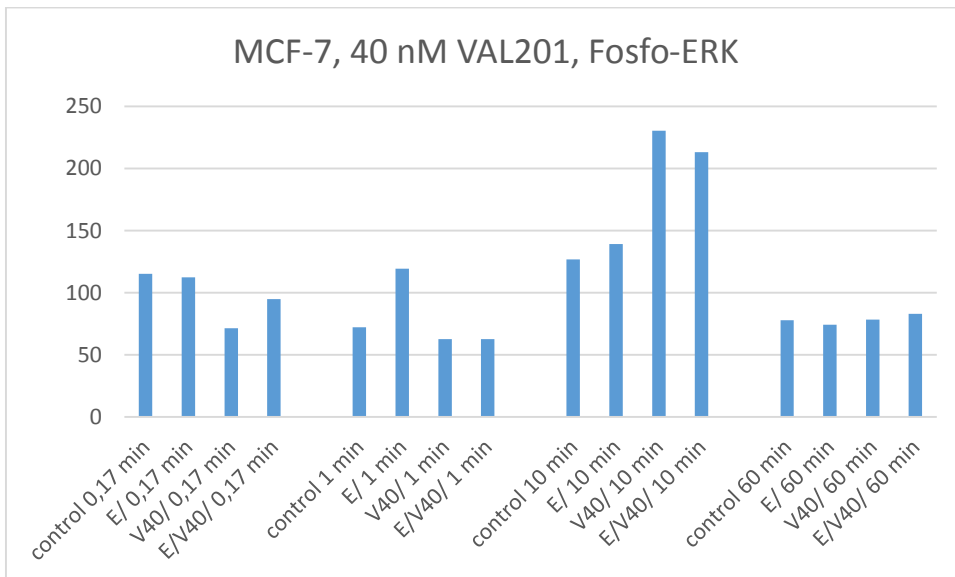
Src-tasossa on havaittavissa oletettu nousu estrogeenin vaikutuksesta erityisesti ensimmäisen minuutin kohdalla. Val201-peptidin vaikutuksesta Src:n aktiivisuus laskee estrogeenin läsnä ollessa, kun taas pelkän Val201-peptidin vaikutus on vähäinen. Tutkimusten mukaan spesifisen inhibiittorin, tässä tapauksessa Val201-peptidin, vaikutuksen on todettu olevan huipussaan ensimmäisten minuuttien kuluttua altistuksesta, jonka jälkeen sen vaikutus hiipuu (Migliaccio ym. 1996, 1292-1293). Tämän takia keskityimme tulosten tulkitsemisessa näytteisiin ensimmäisen kymmenen minuutin ajalta. Kymmenen sekunnin (0,17 min) altistusajan näytteissä ei ole havaittavissa selviä eroja, joten päättelimme altistusajan olleen liian lyhyt.

Kuviosta 6 voidaan tarkastella kokonais-ERK:n vaihteluja, jotka tukevat Src-tason vaihteluja. Kuviossa 5 on kuitenkin nähtävillä 10 minuutin kohdalla selittämätön fosfo-ERK-tason nousu, jolle

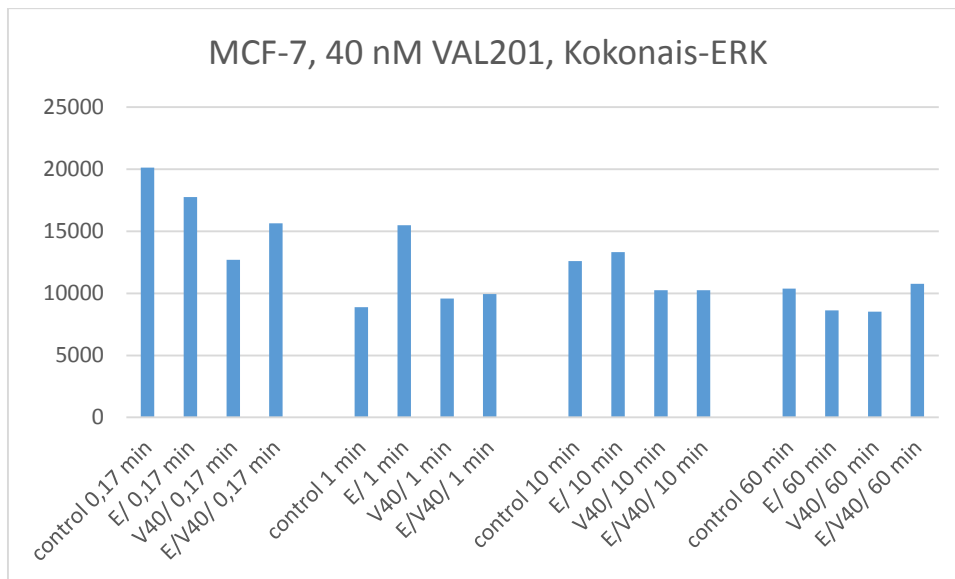
voi olla lukuisia syitä. ERK sijaitsee signaalinsiirtoketjussa paljon Src:tä myöhemmin ja siihen voi vaikuttaa moni muukin tekijä Src:n aktivoitumisen ja Val201-peptidin lisäksi.



KUVIO 4. Val201-peptidin (40 nM) vaikutus signaalinsiirtoon (Src). X-akselille on merkitty altistusliuos ja käytetty altistusaika. Y-akseli kuvaa fluoresenssin keskimääräistä intensiteettiä (MFI). Kontrollina käytettiin ei-stimuloituja soluja (pelkkä DMEM), E=estrogeneeni ja V=Val201 ja sen käytetty pitoisuus.



KUVIO 5. Val201-peptidin (40 nM) vaikutus signaalinsiirtoon (fosfo-ERK).



KUVIO 6. Val201-peptidin (40 nM) vaikutus kokonais-ERK-pitoisuuteen.

Keskityimme diagrammien tarkastelussa 40 nM pitoisuudella suoritetuista kokeista saatuihin tuloksiin, koska niissä muutokset olivat selkeämmin havaittavissa muihin kuvaajiin verrattuna. Kuoppalevyjen 3 ja 4 soluja kasvatettiin vuorokauden pidempään, jolloin solumäärä oli oletettavasti suurempi kuoppalevyyn 2 verrattuna. Tämän vuoksi solut ovat saattaneet altistua suhteessa pienemmälle estrogeenimäärälle, jolloin sen vaikutus on ollut vähäisempi. Tätä teoriaa tukevat myös näiden kuoppalevyjen näytteiden perusteella muodostetut kuvaajat (liite 5).

Oikean pitoisuuden löytyessä Val201-peptidillä vaikuttaa olevan estävä vaikutus hormoniriippuvaisissa rintasyöpäsoluissa signaalin siirtymiseen estrogeenin sitoutuessa reseptoriinsa. Täten voidaan olettaa, että Val201-peptidi estää Src:n kiinnittymistä reseptorin solukalvon sisäpuoliseen osaan. Val201-peptidin estettyä Src:n aktivoitumisen estyy signaalinkulku myös ERK:lle, joten ainakin Src-välitteinen ERK:n aktivointi estyy. Työmme on ensimmäisiä tutkimuksia Val201-peptidin vaikutuksista signaalinsiirtoon, joten lisäkokeita tarvitaan väistämättä. Kokeiden avulla tulisi selvittää ainakin oikeat estrogeeni- ja lääkepitoisuudet sekä inkubaatioajat lääkkeen optimaalisen toiminnan varmistamiseksi. Signaalinsiirto on monimutkainen kompleksi, johon Val201-peptidillä saattaa olla myös ennalta-arvaamattomia vaikutuksia. Lääketutkimus vaatii siten vielä paljon tutkimusta.

## 6 POHDINTA

Opinnäytetyön tekeminen oli opettavainen ja ammatillisesti erittäin mielenkiintoinen projekti. Pääsimme osaksi konkreettista lääkekehitystyötä, jossa saimme hyödyntää bioanalyytikon ammatillista osaamista. Projekti sujui kokonaisuudessaan hyvin, vaikka haasteilta ei välttyttykään. Suurimmat haasteet johtuivat projektin loppupuolella reagenssien toimitusvaikeuksista aiheutuneista aikatauluongelmista.

Aiempi tietämyksemme muun muassa soluviljelystä perustui molekyylibiologian kurssilla käsiteltyihin perusteisiin. Lääkekehityksestä ja siihen liittyvistä prosesseista meillä ei ollut lainkaan aiempaa tietämystä. Koska opinnäytetyön aiheemme oli meille entuudestaan täysin vieras, aloitimme aiheeseen perehtymisen täysin alusta. Aihe tarjosi siten kaivattua haastetta, vaikka se aluksi tuntui jopa liian haasteelliselta. Erityisesti luotettavien, relevanttien ja ennen kaikkea ymmärrettävien lähteiden löytäminen vaikutti aluksi lähes mahdottomalta. Saimme kuitenkin tukea ja neuvoja hyviin lähteisiin ohjaajiltamme, eikä työ kokonaisuudessaan ollut liian haastava.

Tutkimuksemme oli ensimmäisiä koskien Val201-peptidin vaikutuksia signaalinsiirtoon. Koska koejärjestelyjen optimaalisuudesta Val201-peptidin toiminnalle ja siten signaalinsiirron estämiselle ei ollut varmuutta, krittejä tilattiin kustannussyistä vain yksi kutakin. Yhden kitin reagenssit riittivät 96 näytteelle, eikä rinnakkaisnäytteille ollut tilaa, vaikka niin olisimme saaneet enemmän dataa ja siten luotettavampia tuloksia. Toistettavuuden takaamiseksi koejärjestelyt olisi hyvä tehdä useamman kerran, jolloin tulosten tilastointi olisi luotettavaa ja niille voitaisiin laskea keskihajonnat ja virhemarginaalit.

Val201-peptidin toimivuutta tullaan tutkimaan jatkossa lisää. Suorittamiemme tutkimusten perusteella lisätutkimusta kaipaavat erityisesti lääkkeen optimaalisen pitoisuuden ja altistusajojen selvittäminen. Käyttämistämme altistusajoista tunnin altistus oli tulosten perusteella liian pitkä. Signaalinsiirto tapahtuu nopeasti jo ensimmäisten minuuttien kuluttua altistuksesta, joten tunnissa tilanne on ehtinyt jo normalisoitua. Jatkotutkimuksia ajatellen mittauspisteitä kannattanee sijoittaa enemmän altistuksen ensimmäisiin minuutteihin. Kymmenen sekunnin altistusaika vaikuttaa puolestaan liian lyhyeltä, koska missään kuvaajassa ei ole havaittavissa selviä muutoksia tässä ajassa. Altistuskokeita suoritettaessa pipetoimme näytteet käsin ja laskimme altistusajat sekuntikellon

avulla. Jos altistusajat valitaan lyhyillä aikavälillä, tulee pipetointiin kiinnittää tarkkuutta. Parhaiten tämä saavutetaan automatisoimalla pipetointia.

Luultavasti myös estrogeenipitoisuus vaikuttaa lääkkeen toimivuuteen, joten myös sen optimaalinen pitoisuus tarvitsee lisäselvityksiä. Käyttämämme estrogeenipitoisuus olisi voinut olla suurempi kuin 10 nM, jolloin olisimme saattaneet saada selvempiä kinaasipitoisuseroja. Toisaalta kuoppalevyn 2 näytteistä saatiin oikeansuuntaisia tuloksia, joten liian pieni estrogeenipitoisuus ei selitä alhaisia kinaasiaktivaatioita toisilla kuoppalevyillä. Syy saattaa olla myös siinä, että estrogeenia oli liian vähän suhteessa solumäärään, sillä kuoppalevyjen 3 ja 4 soluja kasvatettiin vuorokauden pidempään ja niissä oli siten enemmän soluja.

Vaikka tutkimustuloksemme ovat suuntaa antavia, niistä on havaittavissa selkeitä viitteitä siitä, että Val201-peptidi toimii kuten sen kuuluukin. Vaikka näytteistä ei tehty rinnakkaismäärittäyksiä eikä kokeita toistettu, pidämme saamiamme tuloksia luotettavina. Teimme työvaiheet tarkasti ja ohjeita noudattaen. Pyrimme tiedostamaan erilaiset riskitekijät, kuten soluviljelyn kontaminaatiomahdollisuuden, jotta osaisimme välttyä virheiltiltä ja toimia tilanteen vaatimalla tavalla.

Toimimme opinnäytetyöprojektissa ammattietikamme mukaan. Luotimme toisen tekemiseen ja siihen, että työt tehdään huolella ja ohjeistetusti. Projektin myötä opimme luottamaan omiin taitoihimme niin käytännön työskentelyssä kuin uusien asioiden sisäistämisessä itseopiskelun kautta. Halusimme, että opinnäytetyöprosessi sisältää käytännön laboratoriotyöskentelyä, joten tämä aihe tuntui meille luonnolliselta. Koemme, että työmme on arvokasta ja siitä saadaan konkreettista hyötyä Val201-peptidin jatkotutkimuksia varten. Meistä on hienoa, että saimme olla osana tärkeää tutkimusprosessia ja koemme oppineemme projektista paljon. Mielestämme opinnäytetyöprojekti tuki ammatillista kasvuamme bioanalytikoina ja antoi valmiuksia tutkimustyön tekemiseen tulevaisuudessa.

## LÄHTEET

ATCC. 2014. ATCC Cell Culture Guide. Hakupäivä 6.2.2014

[https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture\\_Guide.pdf](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.pdf).

Auricchio, F. & Migliaccio, A. 2012. VAL201 - An inhibitor of Androgen Receptor-associated Src and Potential Treatment of Castration-resistant Prostate cancer. *European Oncology & Hematology* 8 (1), 32-35.

Castoria, G., Barone, M. V., Di Domenico, M., Bilancio, A., Ametrano, D., Migliaccio, A., Auricchio, F. 1999. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *The EMBO Journal* 18 (9), 2500-2510.

Cell Lines Service. 2014. MCF-7. Hakupäivä 23.1.2014 [http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4254/e4271/index\\_ges.html](http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4254/e4271/index_ges.html).

Cell Signaling Technology. 2014. Protein Kinases Introduction. Hakupäivä 13.2.2014 <http://www.cellsignal.com/reference/kinase/>.

Davis, J. 2011. Basic Techniques and Media, the Maintenance of Cell Lines, and Safety. Teoksessa J. Davis (toim.) *Animal Cell Culture : Essential Methods*. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 110–111.

Freshney, R. I. 2005. *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N.J: Wiley-Liss.

Hofmann, T. 2009. Resorcylic Lactone L-783277 as a New Lead Structure for Kinase Inhibition – Total Synthesis and SAR Studies. Swiss Federal Institute of Technology Zurich.

Irby, R. B. & Yeatman, T. J. 2000. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19 (49), 5636–5642.

Isola, J., & Kallioniemi, A. 2013. Onkogeenit syövän synnyssä. Teoksessa H. Joensuu , Peter J. Roberts , Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen , Sirkku Jyrkkiö , Mauri Kouri & Lyly Teppo (toim.) Syöpätaudit. Helsinki: Duodecim.

Isola, J. 2013. Kasvunrajoitegeenit syövän kehittämisessä. Teoksessa H. Joensuu , Peter J. Roberts , Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen , Sirkku Jyrkkiö , Mauri Kouri & Lyly Teppo (toim.) Syöpätaudit. Helsinki: Duodecim.

Kumar, V., Abbas, A. K. & Aster, J. C. 2013. Neoplasia. Teoksessa V. Kumar, Abul K. Abbas & Jon C. Aster (toim.) Robbins basic pathology. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 161–163.

Mann, M., Cortez, V. & Vadlamudi, R. K. 2011. Epigenetics of Estrogen Receptor Signaling: Role in Hormonal Cancer Progression and Therapy. *Cancers* 3 (2), 1691–1707.

McDowall, J. 2014a. Src, Proto-oncogene Tyrosine-protein Kinase. Hakupäivä 4.3.2014 [http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003\\_2/Page\\_1.htm](http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_2/Page_1.htm).

McDowall, J. 2014b. How Src Works. Hakupäivä 4.3.2014 [http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003\\_2/Page\\_2.htm](http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_2/Page_2.htm).

MCF-7 Cells. 2014. Hakupäivä 16.1.2014 <http://www.mcf7.com/>.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., De Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., Auricchio, F. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO Journal* 15 (6), 1292-1300

Migliaccio, A., Varricchio, L., De Falco, A., Castoria, G., Arra, C., Yamaguchi, H., Ciociola, A., Lombardi, M., Di Stasio, R., Barbieri, A., Baldi, A., Barone, M., Appella, E. & Auricchio, F. 2007. Inhibition of the SH3 domain-mediated binding of Src to the androgen receptor and its effect on tumor growth. *Oncogene* 26, 6619–6629.

Millipore. 2012. Cell Signaling Buffer and Detection Kit.

Novagen. 2011. BCA Protein Assay Kit.



Sattar, H. A. 2013. Female Genital System and Breast. Teoksessa V. Kumar, Abul K. Abbas & Jon C. Aster (toim.) Robbins basic pathology. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 707–714.

Sen, B. & Johnson, F. M. 2011. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. Journal of Signal Transduction 2011, 1–14.

Sutherland, R. L., Watts, C. K. W., Lee, C. S. L. & Musgrove, E. A. 1999. Breast cancer. Teoksessa J. R. W. Masters & Bernhard Palsson (toim.) Human Cell Culture: Cancer Cell Lines, Part 2. Hingham, MA, USA: Kluwer Academic Publishers.

Syöpäjärjestöt. 2013. Rintasyöpä. Hakupäivä 24.2.2014  
<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/rintasyopa/>.

Syöpäjärjestöt. 2008. Rintasyövän hoito. Hakupäivä 6.2.2014  
<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/rintasyopa/rintasyovan-hoito/>.

Syöpäjärjestöt. 2014. Uudet hoitomuodot. Hakupäivä 17.3.2014  
[http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/hoidot/uudet\\_hoitomuodot/](http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/hoidot/uudet_hoitomuodot/).

ValiRx. 2014a. ValiRx. Hakupäivä 7.2.2014 <http://www.valirx.com/>.

ValiRx. 2014b. ValiFinn. Hakupäivä 7.2.2014 <http://www.valirx.com/valifinn/who-we-are>.

Zhang, X. H. F., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C. A., Norton, L., Smid, M., Foekens, J. A. & Mas-sagué, J. 2009. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent Survival Sig-nals. Cancer Cell 16 (1), 67–78.

## LIITTEET

- LIITE 1 Kasvatusliuosten valmistaminen
- LIITE 2 Estrogeeni- ja Val201-liuosten valmistaminen
- LIITE 3 Soluviljelyn työohjeet
- LIITE 4 Kuoppalevyjen pipetointikaaviot ja näytteiden proteiinipitoisuudet
- LIITE 5 Tulosdiagrammit

**DMEM-kasvatusliuos**

500 ml	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (with L-glutamine and 4 500 mg glucose/l)
50 ml	Fetal Bovine Serum
5 ml	Streptomysiini-penisilliini

- Inaktivoi FBS +56 °C 30 min
- Suodata FBS filtlerin läpi steriiliin pulloon
- Lisää DMEM-pulloon FBS ja streptomysiini-penisilliini
- Jaa valmis kasvatusliuos 50 ml falcon-putkiin
- Säilytys jääkaapissa

**Fenolipunaton DMEM-kasvatusliuos**

500 ml	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (with 4 500 mg glucose/l, without L-glutamine and phenol red)
5 ml	Streptomysiini-penisilliini

- Lisää antibiootti DMEM-liuokseen
- Jaa 100 ml steriileihin pulloihin
- Säilytys jääkaapissa

**Estrogeeniliuos**

272,38 mg estrogeenia/1 l etanolia = 1 mM estrogeeniliuos

Täten 5 mg estrogeenia/9,18 ml etanolia = 2 mM estrogeeniliuos

Laimenna 2 mM estrogeeniliuosta valmiilla kasvatusliuoksella. Jatka laimentamista käyttämällä edellisessä vaiheessa laimentamaasi liuosta.

1:200	50 $\mu$ l E <sub>2</sub> + 9 950 $\mu$ l DMEM = 10 $\mu$ M	= 10 000 nM
1:100	100 $\mu$ l E <sub>2</sub> /DMEM + 9 900 $\mu$ l DMEM	= 100 nM
1:10	1 000 $\mu$ l E <sub>2</sub> /DMEM + 9 000 $\mu$ l DMEM	= 10 nM
1:10	1 000 $\mu$ l E <sub>2</sub> /DMEM + 9 000 $\mu$ l DMEM	= 1 nM
1:10	1 000 $\mu$ l E <sub>2</sub> /DMEM + 9 000 $\mu$ l DMEM	= 0,1 nM

**Val201-liuos**

Punnitse 1 mg Val201-peptidiä ja liuota se 840  $\mu$ l 1 X PBS:ään = 1 mM Val201

Laimenna 1 mM Val201-liuosta valmiilla kasvatusliuoksella. Jatka laimentamista käyttämällä edellisessä vaiheessa laimentamaasi liuosta.

1:100	100 $\mu$ l Val201 + 9 900 $\mu$ l DMEM = 10 $\mu$ M	= 10 000 nM
1:2,5	4 000 $\mu$ l Val201/DMEM + 6 000 $\mu$ l DMEM	= 4 000 nM
1:10	1 000 $\mu$ l Val201/DMEM + 9 000 $\mu$ l DMEM	= 400 nM
1:10	1 000 $\mu$ l Val201/DMEM + 9 000 $\mu$ l DMEM	= 40 nM
1:10	1 000 $\mu$ l Val201/DMEM + 9 000 $\mu$ l DMEM	= 4 nM
1:10	1 000 $\mu$ l Val201/DMEM + 9 000 $\mu$ l DMEM	= 0,4 nM

Soluviljely aloitetaan sulattamalla solut nestetyypestä.

- Sulata solut +37 °C vesihauteessa
- Siirrä solususpensio cryoputkesta 15 ml falcon-putkeen
- Lisää 2 ml valmista kasvatusliuosta
- Sentrifugoi 4 min 1 000 rpm
- Pipetoi supernatantti pois ja lisää tilalle 2 ml kasvatusliuosta
- Vortexoi ja lisää kasvatusliuosta vielä 6 ml
- Jaa soluliuos kahteen pieneen soluviljelypulloon ja laita hiilidioksidilämpökaappiin (CO<sub>2</sub>, +37 °C)

Solujen jakaminen tai pakastaminen

- Pipetoi kasvatusliuos pois solujen päältä
- Pese solut kahdesti 1 X PBS:llä, 7ml/pesu
- Lisää 3 ml trypsiini-EDTA:ta ja anna vaikuttaa hiilidioksidilämpökaapissa 5-10 minuuttia. Tarkkaile solujen irtoamista mikroskoopilla.
- Pysäytä trypsiini-EDTA:n vaikutus lisäämällä soljen päälle 10 ml kasvatusliuosta
- Pipetoi soluliuos 15 ml falcon-putkeen
- Sentrifugoi 4 min 1 000 rpm

Jatkoviljely

- Pipetoi supernatantti pois
- Lisää solunapin päälle 4 ml kasvatusliuosta
- Jaa soluliuos kahteen isoon soluviljelypulloon
- Lisää molempiin pulloihin 18 ml kasvatusliuosta
- Laita solut kasvamaan hiilidioksidilämpökaappiin

Solujen pakastaminen

- Pipetoi supernatantti pois
- Lisää solunapin päälle 2 ml freezing mediumia
- Sekoita hyvin ja jaa kahteen cryoputkeen, 1 ml/putki
- Laita putket isopropanolihauteessa -70 °C
- Siirrä putket vuorokauden kuluttua nestetyypeen

Käytetyt yhdistelmäliuokset tehtiin 1:1. Jokaiseen kaivoon pipetoitiin 200 µl testiliuosta. Nollanäytteenä käytettiin pelkkää kasvatusliuosta. Kuoppalevyt 1 ja 2 olivat rinnakkaisia, joten levy 1 jätettiin pois rajallisen näytemäärän vuoksi.

2.	1 10 s	2 1 min	3 5 min	4 10 min	5 30 min	6 1 h
<b>A</b> DMEM	102,3 µg/ml	213,5 µg/ml		182,9 µg/ml		267,6 µg/ml
<b>B</b> E2/ DMEM	130,0 µg/ml	135,9 µg/ml		196,8 µg/ml		320,6 µg/ml
<b>C</b> E2/ Val201	145,5 µg/ml	252,1 µg/ml		285,1 µg/ml		262,7 µg/ml
<b>D</b> Val201/ DMEM	213,3 µg/ml	288,1 µg/ml		280,3 µg/ml		314,0 µg/ml

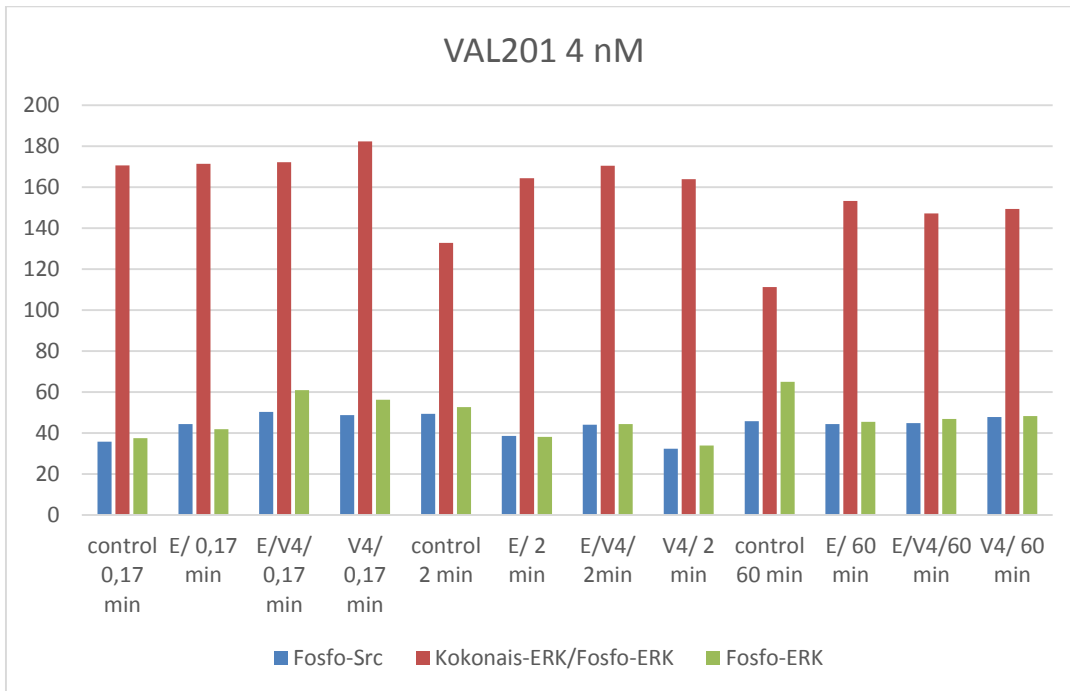
E2: 10 nM/ Val201: 40 nM

3.	1 DMEM	2 E2/ DMEM	3 E2/ Val 4 nM	4 DMEM/ Val 4 nM	5	6
<b>A</b> 10 s	485,7 µg/ml	443,9 µg/ml	282,0 µg/ml	295,0 µg/ml		
<b>B</b> 2 min	436,6 µg/ml	467,5 µg/ml	396,4 µg/ml	401,1 µg/ml		
<b>C</b> 20 min						
<b>D</b> 1 h	436,9 µg/ml	434,5 µg/ml	445,5 µg/ml	421,6 µg/ml		

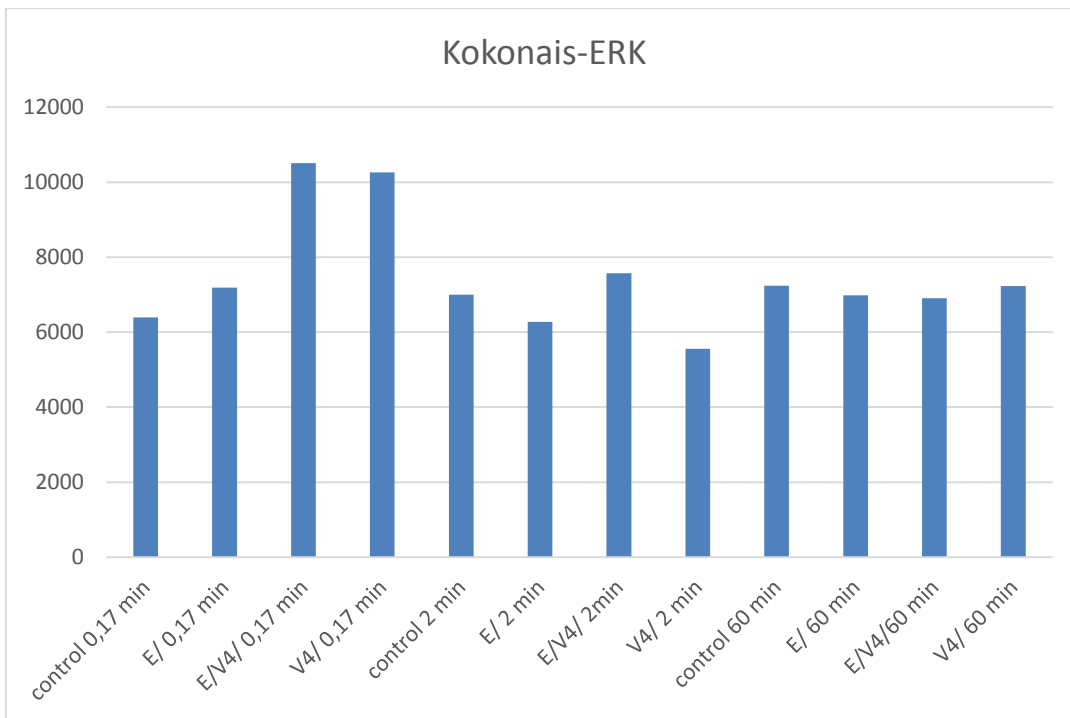
E2: 10 nM

<b>4.</b>	<b>1 E2/ Val 400 nM</b>	<b>2 DMEM/ Val 400 nM</b>	<b>3 E2/ Val 4000 nM</b>	<b>4 DMEM/ Val 400 nM</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b> 10 s	274,1 µg/ml	275,0 µg/ml	279,7 µg/ml	266,7 µg/ml		
<b>B</b> 2 min	232,1 µg/ml	253,3 µg/ml	222,4 µg/ml	297,5 µg/ml		
<b>C</b> 20 min						
<b>D</b> 1 h	173,1 µg/ml	175,5 µg/ml	193,7 µg/ml	216,0 µg/ml		

E2: 10 nM

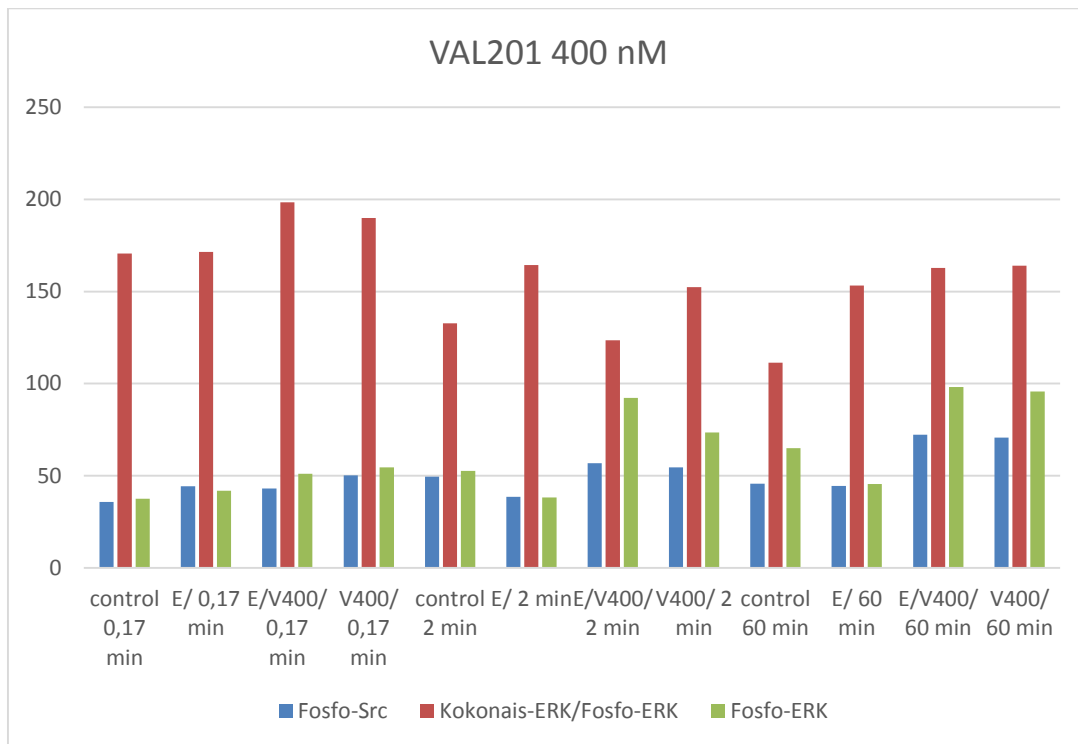


KUVIO 1. Val201-peptidin (4 nM) vaikutus signaalinsiirtoon.

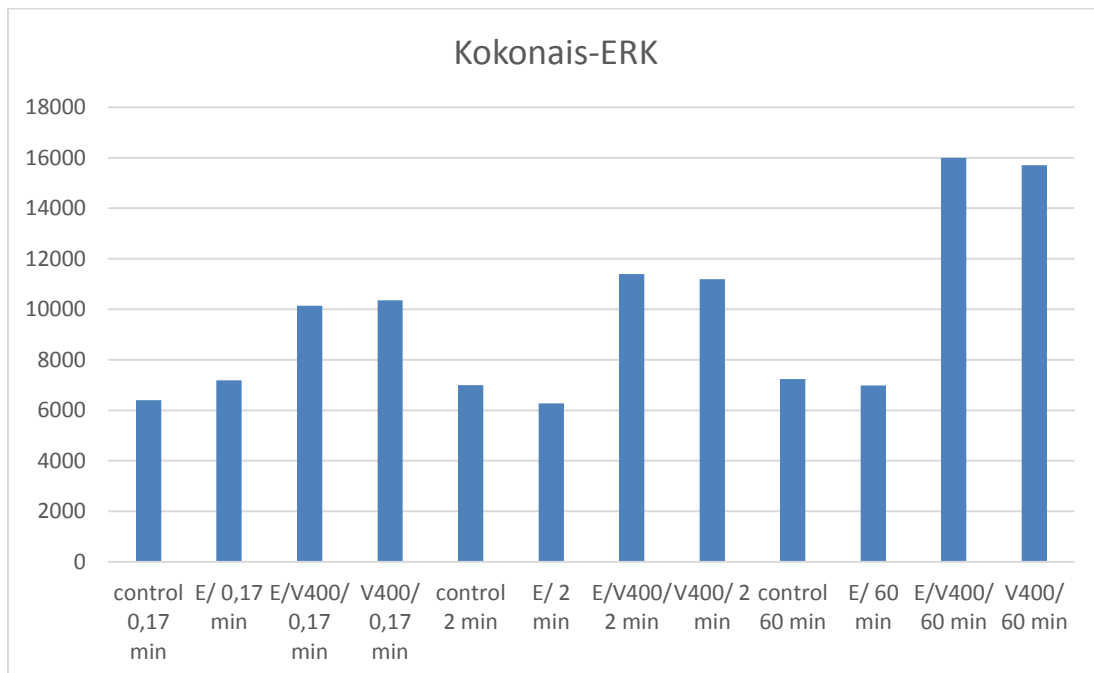


KUVIO 2. Val201-peptidin (4 nM) vaikutus kokonais- ERK-pitoisuuteen.

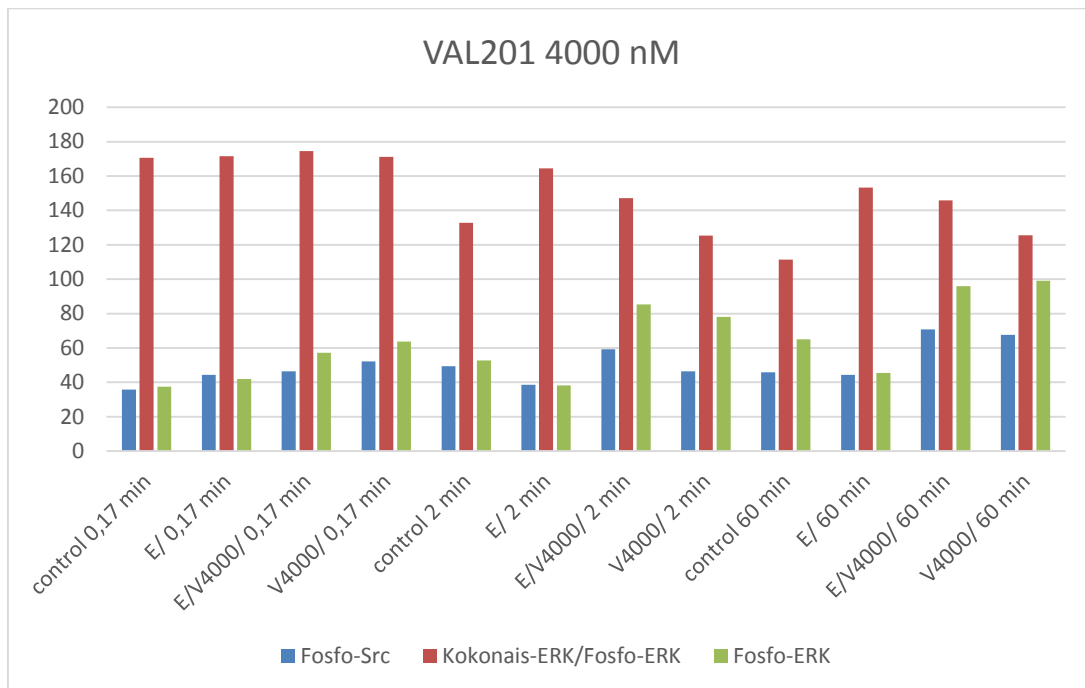




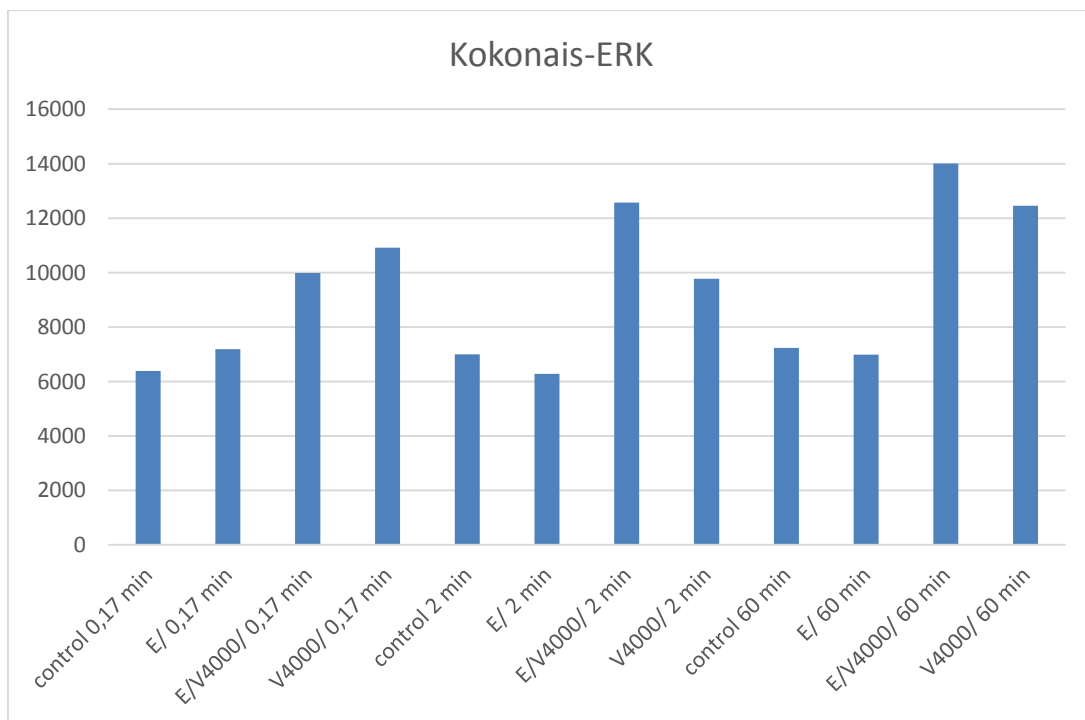
KUVIO 3. Val201-peptidin (400 nM) vaikutus signaalinsiirtoon.



KUVIO 4. Val201-peptidin (400 nM) vaikutus kokonais-ERK-pitoisuuteen.



KUVIO 5. Val201-peptidin (4000 nM) vaikutus signaalinsiirtoon.



KUVIO 6. Val201-peptidin (4000 nM) vaikutus kokonais- ERK-pitoisuuteen.