

Sanna Kaustara

MikroRNA:den ilmentyminen rintaepiteelisoluissa epiteeli-mesenkymaali transitiossa ja niiden rooli Axl- reseptorityrosiinikinaasin säätelyssä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

1.5.2014

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Sanna Kaustara MikroRNA:den ilmentyminen rintaepiteelisoluissa epiteeli-mesenkymaali transitiossa ja niiden rooli Axl-reseptorityrosiinikinaasin säätelyssä 49 sivua 1.5.2014
Tutkinto	insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Biolääketiede
Ohjaaja(t)	tohtorikoulutettava, Reetta Virtakoivu professori, Johanna Ivaska FL, lehtori Tiina Soininen
<p>Suomessa toiseksi yleisin kuolinsyy on syöpä. Rintasyöpään sairastuu vuoden aikana tuhansia naisia ja noin joka kahdeksas nainen sairastuu siihen elämänsä aikana. Nykypäivän tehokkaista hoitomuodoista huolimatta kaikkia tapauksia ei saada hoidettua. Etäpesäkkeiden muodostuminen ja aggressiivinen syöpätyyppi heikentävät ennustetta pitkän ajan kuluessa.</p> <p>Reseptorityrosiinikinaasi Axl korreloi huonon selviytymisen kanssa useissa eri syöpätyypeissä. Se on mukana myös epiteeli-mesenkymaali transitiossa (EMT), joka on yksi syövän etäpesäkkeiden muodostumisen mekanismeista. MikroRNA:t ovat pieniä eikoodaavia RNA-pätkiä, jotka hiljentävät proteiinien ekspressiota sitoutumalla lähetti-RNA:han estäen sen translaation ja saaden sen hajoamaan. MiRNA ekspressiot ovat säätelemättömiä syövässä ja niitä kohdentamalla on saatu muutettua syövän fenotyyppiä.</p> <p>Työ tehtiin Turun yliopiston ja VTT:n yhteisessä Johanna Ivaskan johtamassa Soluadheesio ja syöpä -tutkimusryhmässä. Työn tarkoituksena oli tunnistaa transkriptiotekijä Slugin aikaansaamia muutoksia mikroRNA-ekspressioiden tasoissa EMT:n läpikäyneillä Mcf10a rinnan epiteelisoluilla verrattuna normaaleihin Mcf10a soluihin. Lisäksi oltiin kiinnostuneita mikroRNA:den vaikutuksesta EMT:oon liitettyjen proteiinien tasojen muutoksista.</p> <p>MikroRNA-tasojen muutosten perusteella valittiin kuusi mikroRNA:ta (miR-144, -155, -184, -181a, -200c ja -9), joiden vaikutusta soluihin ja EMT:oon tutkittiin havainnoimalla Axl-reseptorin ja muiden EMT:ta edustavien proteiinien muutoksia Western blot-, immunofluoresenssi- ja virtausytometria-analyysillä.</p> <p>Tulosten perusteella voidaan sanoa Slug-proteiinin spesifisesti saavan aikaan mikroRNA-ekspressiotasojen muutoksia. Valittujen mikroRNA:den vaikutukset EMT:oon olivat vähäisiä. Kuudesta mikroRNA:sta yksikään ei aikaansaanut EMT:ta, mutta miR-9 osoitti viitteitä Axl-, E-cadheriini- ja Slug-proteiinitasojen, sekä muiden EMT-proteiinitasojen muutoksista systemaattisesti eri analyysimenetelmillä. Tämän insinöörityön puitteissa tuloksia ei saatu varmistettua useammilla toistoilla, joten tulokset ovat suuntaa antavia.</p>	
Avainsanat	Axl, EMT, mikroRNA, Slug

Author(s) Title Number of Pages Date	Sanna Kaustara MicroRNA expression in breast epithelial cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition and their role in regulation of Axl-receptortyrosinekinase 49 pages 1 May 2014
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio and Food Technology
Specialisation option	Biomedicine
Instructor(s)	Reetta Virtakoivu, PhD student Johanna Ivaska, professor Tiina Soininen, Phil. Lic., lecturer
<p>Cancer is our second common cause of death in Finland. During the year close to 5000 women get cancer and approximately every 8th woman gets cancer during lifetime. Despite the modern treatments and medicine every patient cannot be saved. On the long term cancer metastasis and aggressive phenotype predicts poor survival.</p> <p>Receptortyrosinekinase Axl expression is as strong negative prognostic factor for survival in many types of cancer. It is also related to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which is one of the main mechanisms of metastasis. MicroRNAs are small non-coding RNAs that prevent the translation of proteins by binding to mRNA, leading to inhibition of protein expression and mRNA degradation. MiRNA expressions are deregulated in cancers and it has been showed that cancer phenotype can be modified by targeting miRNA.</p> <p>This thesis was carried out in Johanna Ivaska's group Cell adhesion and cancer in collaboration with University of Turku and VTT. The main goal of the study was to investigate the changes of miRNA expressions in MCF10a breast epithelial cells undergoing Slug induced EMT in comparison to normal MCF10 cells. Furthermore, the effect of miRNAs to EMT related protein levels was under interest.</p> <p>Based on the changes in miRNA expression, six miRNAs (miR-144, -155, -184, -181a, -200c and -9) were chosen to further study. Their impression to cell phenotype, EMT, Axl-receptor and other EMT related proteins were studied by Western blot, immunofluorescence and flowcytometry analyses.</p> <p>The results indicates that Slug induced EMT is able to up- or down regulate specific miRNA levels. The findings indicate that the influence of miRNAs to EMT was minor. Out of six miRNAs not any did induce EMT. Nevertheless, miR-9 did show some evidence of changes on Axl- E-cadherin, Slug and other EMT related protein expressions repeatedly with different analyze methods. The results were not verified by independent repeats in limits of this thesis.</p>	
Keywords	Axl, EMT, microRNA, Slug

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Syöpä	2
3	Rintasyöpä	4
3.1	Luokittelu reseptorien mukaan	5
3.2	Histologinen luokittelu	6
3.3	Etäpesäkkeet ja uusiutuminen	8
3.4	Hoito	8
4	MikroRNA	10
5	Axl-tyrosiinkininaasireseptori	12
6	Epiteeli-mesenkymaali transito	13
6.1	Epiteeli-mesenkymaali transition merkkiaineet	14
6.2	MikroRNA:t ja epiteeli-mesenkymaali transito	16
7	Materiaalit ja menetelmät	18
7.1	Solujen viljely	19
7.2	Western blot -analyysi	21
7.3	MikroRNA PCR -analyysi	22
7.4	MikroRNA -transfektio	23
7.5	MikroRNA -qPCR	24
7.6	Immunofluoresenssivärjäys	24
7.7	Virtausytometrianalyysi, FACS	24
8	Tulokset ja tulosten käsittely	26
8.1	MikroRNA -analyysi	26
8.2	MikroRNA -transfektio	34
8.3	Immunofluoresenssi	39
8.4	Virtausytometria, FACS	41
9	Yhteenveto	44
	Lähteet	45

Lyhenteet

3' UTR	Untranslated region, lähetti-RNA:n alue sen 3' päässä, jota ei transloida, mikroRNA:den yleisin sitoutumiskohta
anti-miRNA	sitoutuu mikroRNA:han estäen sen toiminnan ja hajottaen sen
Axl	reseptorityrosiinikinaasi, RTK
BRCA1	Breast cancer 1 early onset, tuumorisupressorigeeni, liitetty rintasyöpään
EMT	Epithelial-to-mesenchymal-transition, Epiteeli-mesenkymaali transitio
GAPDH	Glyseraldehydi3-fosfaattidehydrogenaasi, entsyymi, joka katalysoi glykolyysiä, käytetään kontrolligeeninä geeniekspressiota tutkittaessa
Gas6	Growth arrest-specific 6, Axl:n ligandi, kasvun pysähtymis spesifinen proteiini 6
GFP	Green fluorescent protein, vihreä fluoresoiva proteiini
milliQ	Millipore Corporationin tavaramerkki ultrapuurtaalle vedelle
miRNA	mikro-RNA, pieni ei-koodaava RNA-molekyyli, osallistuu geenien vaimentamiseen estäen joko translaation tai hajottamalla mRNA:n, solujen itse tuottama
mRNA	messenger-RNA, lähetti-RNA koodaa proteiinisynteesiä
PBS	Phosphate Buffer Saline, fosfaattipuskuri suolaliuoksella
pre-miRNA	esiaste miRNA
RISC	RNA-induced silencing complex, RNA:n aktivoima hiljennys kompleksi

RNAasi	ribonukleaasi, pilkkoo RNA:ta
siRNA	pieni häiritsevä RNA, sitoutuu mRNA:han ja hajoittaa tai estää sen transkription, keinotekoinen, myös virusten tuottama - eng. Small Interfering RNA,
TaqMan®	Reaaliaikaisessa PCR:ssä käytettävä polymeraasi, joka pilkkoo TaqMan® koettimen saaden sen fluoresoimaan
TBST	Tris Buffer Saline + Tween 20, tris puskuri suolaliuoksella, johon on lisätty Tweeniä.

1 Johdanto

Tämä työ suoritettiin Turun yliopiston ja VTT:n yhteisessä Johanna Ivaskan johtamassa Soluadheesio ja syöpä - tutkimusryhmässä Turun Biotekniikan Keskuksessa. Ryhmän tarkoituksena on tutkia, miten syöpäsolut liikkuvat, miten solujen funktionaalisia viestejä välittävät pinnan integriinit ja tyrosiinikinaasireseptorit vaikuttavat syöpäsolujen selviytymiseen, lisääntymiseen tai liikkumiseen ja mitkä ovat mekanismit näiden toimintojen takana.

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpätyyppi. Se on tappava muodostaessaan etäpesäkkeitä ja metastasoidessaan muihin kudoksiin. Rintasyöpätyypit luokitellaan solujen pintareseptorien ja hormoni reseptoristatuksen mukaan ja hoidot valitaan niiden ja muiden luokitusten mukaan potilaalle sopivaksi. Joissakin tapauksissa syöpäsolut tulevat immuuniksi hoidolle ja jatkavat kontrolloimatonta jakautumista ja leviämistä. Axl-tyrosiinikinaasireseptorin on esitetty olevan yksi reitti, jonka kautta solut kiertävät hoidossa estetyin signaalintireitin (Byers ym. 2012).

Axl-reseptorin ekspresion on osoitettu olevan merkki huonosta selviytymisestä keuhkon adenokarsinoomassa, sekä rintasyövässä (Ishikawa ym. 2013; Gjerdrum ym. 2010). Sen on myös osoitettu aiheuttavan epiteelisolujen muuntumista mesenkymaalisiksi rintasyövän kantasoluilla (Asiedu ym. 2013). Vastaavanlaisia tuloksia on saatu myös haiman syövässä ja Axl-reseptoria pidetäänkin uutena terapeuttisena kohteena (Koostra ym. 2009).

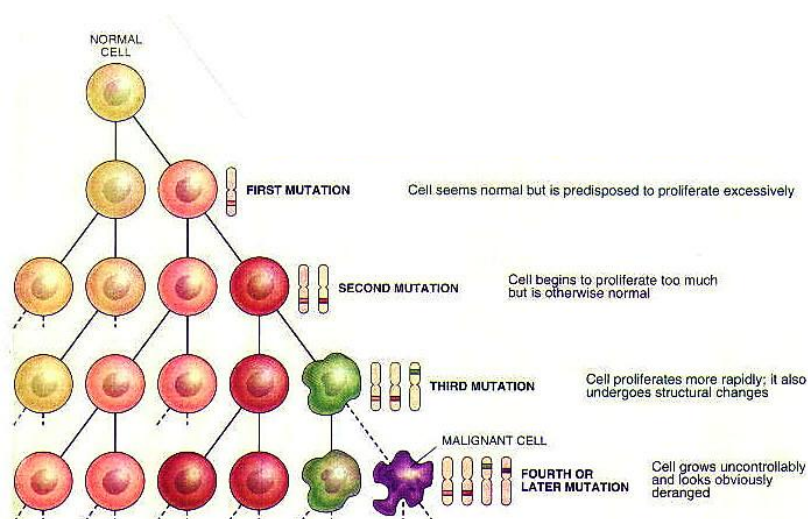
MikroRNA:t ovat pieniä ei koodaavia RNA-pätkiä, joiden tehtävänä on hiljentää lähetti-RNA:ta. Ihmisten miRNA:ta on ruvettu tutkimaan tarkemmin vasta 2000-luvun puolella, mutta niiden on osoitettu olevan mukana useissa soluille kriittisissä tapahtumissa. Ne toimivat usein yhdessä muiden mekanismien kanssa, milloin useampi tekijä vaikuttaa yhdessä samaan kohteeseen tehostaen haluttua vaikutusta.

Joukko Snail-perheen transkriptiotekijöitä säätelee epiteelisolujen transitiota mesenkymaalisiksi. Slug-proteiini on yksi keskeisistä EMT:n tekijöistä. Työn tavoitteena on tunnistaa Slug-proteiinin spesifisesti aikaansaamia muutoksia rinnan epiteelisolujen miRNA-tasoissa ja tunnistaa miRNA:t, joiden tasot muuttuvat. Lisäksi halutaan tietää, miten valitut miRNA:t vaikuttavat soluissa epiteeli-mesenkymaali transitiioon (EMT) liitettyihin tekijöihin, kuten Axl-, Slug- tai E-cadheriini-proteiineihin.

2 Syöpä

Syöpä on Suomessa toiseksi yleisin kuolinsyy sepelvaltimotautien jälkeen (Kuolemansyyt 2012). On arvioitu, että noin kolmasosa suomalaisista sairastuu syöpään elämänsä aikana. Sairastuneiden määrä tulee kasvamaan keski-ikäen noustessa, sillä vanhemmilla ihmisillä on suurempi todennäköisyys sairastua syöpään. Nykyään käytetään myös enemmän prosessoituja elintarvikkeita ja vähemmän luonnonmukaisia tuotteita, kuten marjoja, hedelmiä ja vihanneksia, joiden sisältämien ainesosien on todettu ennaltaehkäisevän syöpää. (Hietanen 2012.) Syövät voidaan karkeasti jaotella sen mukaan, mistä kudoksesta syöpäsolut ovat lähtöisin. Yleisimpiä syöpätyyppejä ovat karsinoomat, jotka ovat lähtöisin epiteelikudoksesta. Mesenkymaalista kudoksesta lähtöisin olevat syövät ovat puolestaan sarkoomia. Lymfoomat ovat peräisin imukudoksesta ja blastoomat ovat embryonaalisia eli alkion lähtöisin olevia syöpiä. Myelooma on selkärangan plasmakomien syöpä ja melanooma ihosyöpä.

Syöpä on seurausta useammista mutaatioista esimerkiksi solun kasvuun tai sen säätelyyn vaikuttavissa geneeissä. Mutaatioiden syntyminen on todennäköisempää paikoissa, joissa solut jakautuvat useammin ja joissa ne altistuvat mekaaniselle rasitukselle, kuten iholla tai limakalvoilla. Kuvassa 1 havainnollistetaan mutaatioiden vaikutusta syövän syntymiseen. Mutaatioita aiheuttavat myös karsinogeenit, eli syöpää aiheuttavat tekijät, kuten tietyt ravintotekijät, muovikemikaalit, virukset, tupakansavu, auringon uv-säteily ja ionisoiva säteily. (Syövän aiheuttajat 2006; Aiheuttajat 2010.)

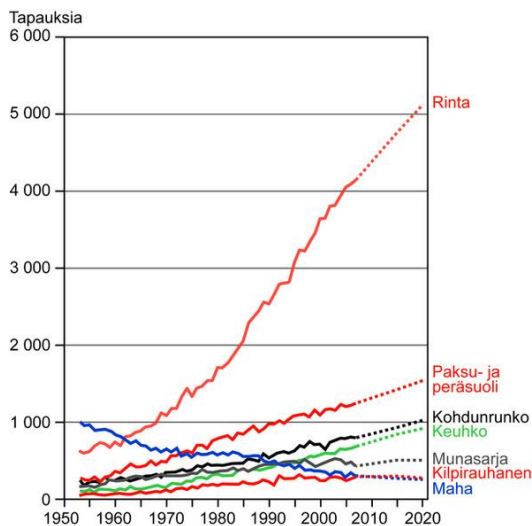


Kuva 1. Mutaatio ja karsinogeneesi (W. Cavenee 1995).

DNA:n vaurioituessa solu pystyy useimmissa tapauksissa joko korjaamaan vaurion tai ajautumaan pakotettuun solukuolemaan, apoptoosiin, jotta vaurio ei periytyisi edelleen uusiin soluihin. Joissakin tapauksissa vaurioituneet solut kuitenkin läpäisevät useat tarkastuspisteet ja jakautuvat edelleen muodostaen solukon, jota kutsutaan syövän esiasteeksi. Vaurioituneiden solujen altistuessa edelleen karsinogeneeneille ja perimässä tapahtuville mutaatioille, menettää solu kykynsä säädellä jakautumistaan, kasvuaan tai vastetta elimistön säätelymekanismeille, kuten apoptoosille. Tällöin kyseessä on karsinogeneesi eli syövän syntyminen. Yksi mutaatio ei siis pysty muuttamaan normaalisti jakautuvaa solua syöpäsoluksi, vaan siihen vaaditaan useampia toisistaan riippumattomia muutoksia solun perimässä. Riski syövän syntymiseen kasvaa iän myötä, sillä mutaatioiden määrä perimässä on suurempi. Perinnölliset tekijät ovat pääsyyinä noin 5 % syöpätapauksissa ja tällöinkin vaikuttavat enemmän herkkyteen karsinogeneeneille kuin suoraan kasvuun, jakautumiseen tai solusykliin vaikuttaviin geeneihin. (Syöpä 2006; Mikä on syöpä 2010.)

3 Rintasyöpä

Suomessa naisten yleisin syöpätyyppi on rintasyöpä. Vuonna 2011 Suomessa todettiin lähes 5000 uutta rintasyöpätapausta ja noin joka kahdeksas nainen sairastuu rintasyöpään elämänsä aikana. Rintasyöpäpotilaiden määrä on kasvanut huomattavasti ja tulee vielä kasvamaan, sillä ihmiset elävät pidempään ja naisten käyttämien hormonivalmisteiden määrä kasvaa. Rintasyöpätapausten raju lisääntyminen voidaan nähdä kuvasta 2 Rintasyöpään sairastumisriskiä lisäävät hormonitasapainon ongelmat, kuten aikaiset kuukautiset tai myöhään alkavat vaihdevuodet. Muita riskitekijöitä on synnytysten vähäisyys, vaihdevuosien jälkeinen ylipaino, pitkään jatkunut vaihdevuosien hormonaalinen hoito, runsas alkoholin käyttö ja pienessä osassa tapauksia periytynyt geenivirhe.



Kuva 2. Uusien tapausten lukumäärät, yleisimpien syöpien mennyt ja ennustettu trendi, naiset (Uusien tapausten lukumäärät, naiset 2009).

Rintasyöpään sairastuneilla on suurin keskimääräinen riski kuolla syöpään yhden vuoden aikana, selviää Suomen Syöpärekisterin yleisemmistä syöpäkuolemansyistä taulukosta 1. Ikävakioitu kuolleisuus 100 000 henkeä kohti tarkoittaa, että kohderyhmän uusien syöpäkuolemien määrä on jaettu kohdeväestön vastaavalla henkilövuosimäärällä ja kerrottu maailman standardiväestöön painotetulla keskiarvolla, jolloin vanhempien ihmisten suurempi kuolleisuus ei vaikuta vertaillessa syövän aiheuttamia kuolemia. (Nordcan 2011; Suomen syöpärekisteri 2013.)

Taulukko 1. Yleisimmät syöpäkuolemansyyt vuonna 2011, naiset. (Suomen Syöpärekisteri, 2013)

Primaaripaikka	Tapausten määrä	Prosentti-jakauma	Kuolleisuus 100.000 kohti ¹
Rinta	841	15.1	13.0
Keuhkot, henkitorvi	672	12.1	9.6
Haima	553	10.0	6.9
Paksusuoli	398	7.2	4.9
Munasarjat	360	6.5	5.5
Maha	214	3.9	2.7
Non-Hodgkin-lymfooma	209	3.8	2.5
Peräsuoli, peräaukko	200	3.6	2.4
Aivot, keskushermosto	196	3.5	3.7
Munuainen	188	3.4	2.2
Kohdunrunko	168	3.0	2.1
Leukemia	155	2.8	2.1
Maksa	140	2.5	1.6
Sappirakko, sappitiet	135	2.4	1.6
Myelooma	133	2.4	1.5
Kokonaissyöpä²	5553	100.0	74.7

¹ Ikävakioitu "maailman standardiväestöön".

² Ihon basaliommat eivät sisälly lukuihin.

3.1 Luokittelu reseptorien mukaan

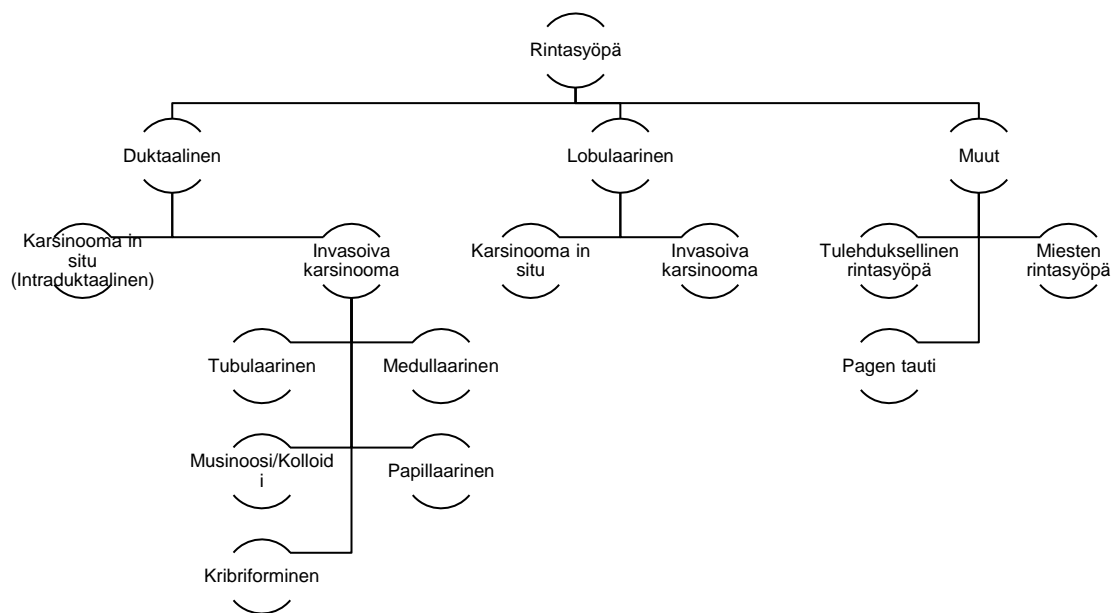
Jotkin syöpäsolut käyttävät hyväkseen elimistön omia hormoneita kasvuunsa. Tällöin solut ilmentävät näitä hormoneja vastaanottavia reseptoreita. Syöpä on reseptorin suhteen joko positiivinen tai negatiivinen. Kolme rintasyövässä kliinisesti merkittävää reseptoria ovat endokriinireseptorit estrogeeni (ER) ja progesteroni (PR), sekä ihmisen epidermaalisen kasvutekijäreseptorin amplifikaatio (HER2). Noin 70 % rintasyöpätapauksista on ER-positiivisia, joista 60 % myös PR-positiivisia ja noin 20 % HER2-amplifioituneita. Loput ovat niin kutsuttuja kolmoisnegatiivisia rintasyöpiä, jotka eivät ilmennä mitään näistä reseptoreista. HER2-positiiviset ja kolmoisnegatiiviset rintasyövät ovat muita muotoja aggressiivisempia. Reseptorien toimintaa voidaan estää vasta-aineiden tai pienemolekyylisten lääkeaineiden avulla.

HER2-reseptorin kanssa samaan reseptoriperheeseen kuuluva epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR) on myös usein amplifikoituna syöpätapauksissa. Syövät

voivat kehittää resistenssin lääkaineille muodostamalla uusia signaalintireittejä toisten reseptoreiden kautta. Hoitona käytetäänkin usein täsmälääkkeitä useammalle eri reseptorille yhtä aikaa mahdollisten resistenssien estämiseksi. (Wax 2012).

3.2 Histologinen luokittelu

Rintasyöpä voidaan jakaa eri histologisiin tyyppeihin kuvan 3 mukaisesti. Sitä on pääosin kahta eri tyyppiä, duktaalista eli tiehytperäistä ja lobulaarista eli rauhasliuskaperäistä. Duktaalinen syöpä syntyy rinnan maitorauhasen rauhasliuoskoja yhdistävien pienten tiehyiden pintasolukossa ja lobulaarinen näissä sidekudoksen ympäröimissä 15–20 rauhasliuoskoissa. (Rintasyöpä 2010; Types of breast cancer 2013).



Kuva 3. Rintasyövän luokittelu eri tyyppeihin

Duktaalista karsinoomaa voi esiintyä erityyppisinä. *Duktaallinen karsinooma in situ*, DCIS on varhainen aste, jossa pahanlaatuiset solut esiintyvät vain tiehyen sisällä. DCIS ei lähetä etäpesäkkeitä ja sillä on hyvä ennuste, vaikkakin riski uusiutumiselle tai eteneminen invasiivaan muotoon on normaalia suurempi. DCIS on yleisin ei-invasiivista rintasyövästä.

Invasiivinen duktaalinen karsinooma (invasive ductal carcinoma), IDC on kaikkein yleisin rintasyövän muoto kattaen noin 80 % tapauksista. Invasiivisuus tarkoittaa, että se on levinnyt maitotiehyistä tyvikalvon läpi ympäröivään rintakudokseen ja pidemmällä aikavälillä imusolmukkeisiin, luuhun tai muihin ympäröiviin elimiin. IDC voidaan jakaa alaluokkiin, joita ovat *tubulaarinen*, *medullaarinen*, *musinööttinen*, *papillaarinen* ja *kribriforminen*. Ne ovat harvemmin esiintyviä muotoja ja invasiivisesta nimestä huolimatta vain medullaarinen muoto voi lähettää etäpesäkkeitä.

Tubulaarinen karsinooma muodostaa pieniä putkimaisia rakenteita, joita kutsutaan tubuluksiksi. Medullaarista karsinoomaa esiintyy yleensä vanhemmilla naisilla, joilla on BRCA1-geenin mutaatio. Musinööttinen karsinooma, toiselta nimeltään kolloidinen karsinooma, erittää limaa solujen ja tuumorin ympärille, ei esiinny yksinään. Papillaariselle karsinoomalle tyypillistä selkeät tuumorin rajat ja sormimaiset muodot. Kribriforminen muoto on rinnan stroomassa ja muodostaa sinne juustomaisen rakenteen, jossa solujen välillä voi olla tyhjiä koloja.

Lobulaarinen karsinooma voidaan jakaa edelleen 2 alatyyppeihin, *lobulaarinen karsinooma in situ* ja *invasiivinen lobulaarinen karsinooma*, joista ensimmäistä ei kategorisoida syöväksi vaan sen riskitekijäksi. Invasiivinen lobulaarinen karsinooma kattaa 10–15 % kaikista rintasyöpätapauksista ja on toiseksi yleisin rintasyöpämuoto. Se on ehtinyt levitä rauhasliuskoista rintakudokseen ja sillä on taipumusta esiintyä molemmissa rinnoissa. Se leviää ajan myötä myös imusolmukkeisiin ja muualle kehoon.

Muita tyyppisiä ovat *inflammatorinen* eli tulehduksellinen rintasyöpä, joka voi olla joko duktaalista tai lobulaarista ja *Pagen tauti*, joka esiintyy usein rintasyövän yhteydessä. Inflammatorisessa rintasyövässä rintarauhaset ovat tulehtuneet. Tämä muoto on aggressiivinen ja leviää nopeasti, mutta harvinainen. Aggressiivisuuden takia sillä on huonompi ennuste kuin muilla tyypeillä. Pagen taudissa nännin ympärille muodostuu ihottumaa, joka usein johtuu syöpäsolujen kerääntymisestä sille alueelle tai tiehyiden lähelle. *Miesten rintasyövät* kattavat noin 1 % kaikista rintasyövästä. Koska rintasyöpää ei yleensä epäillä ensimmäisenä, on syöpä useimmissa tapauksissa ehtinyt levitä muualle elimistöön johtaen miesten huonompaan hoitovasteeseen ja selviytymiseen rintasyövästä. (Rintasyöpä 2013, Types of breast cancer 2013.)

3.3 Etäpesäkkeet ja uusiutuminen

Syövät, jotka muodostavat etäpesäkkeitä, ovat usein aggressiivisempia ja niillä on huonommat pitkän aikavälin ennusteet, kuten taulukossa 2 on esitetty. Jotta etäpesäkkeitä voi muodostua, pitää syöpäsolujen ensin irrottautua primääripaikastaan, päästä tyvikalvoista läpi imu- tai verenkiertoon, selvitä anoiksesta, eli solujen irtautumisesta johtuvasta ohjatusta solukuolemasta, päästä kohdekudokseen sisään tyvikalvon läpi ja kiinnittyä kohteeseen, sekä proliferoida *in situ*. Useimmat rintasyöpäkuolemista johtuvat etäpesäkkeiden muodostumisesta, sillä vaikka primäärikasvain pystyttäisiin poistamaan ja potilas saisi leikkauksen jälkeen sytostaatteja tai kemoterapiaa, on kasvaimesta mahdollisesti lähtenyt verenkiertoon syöpäsoluja, jotka pystyvät myöhemmin muodostamaan etäpesäkkeen toiseen paikkaan.

Taulukko 2. Rintasyövän ja etäpesäkkeiden vaikutus 5-vuotisselviytymiseen. (SEER 2011.)

Stage at Diagnosis	Stage Distribution (%)	5-year Relative Survival (%)
Localized (confined to primary site)	60	98.4
Regional (spread to regional lymphnodes)	33	83.9
Distant (cancer has metastasized)	5	23.8
Unknown (unstaged)	2	50.7

Jos syöpään sairastuu nuorella iällä, on todennäköisempää, että syöpä uusiutuu myöhemmin, sillä mutaatiot pysyvät genomissa ja mahdollistavat myös uusien syöpien syntymisen.

3.4 Hoito

Rintasyöpää hoidetaan sen biologisten luokitteluiden ja levinneisyyden mukaan. Pääasiassa hoitona on leikkaus, sädehoito ja lääkehoitot. Nämä sisältävät eri solunsalpaajat, hormonit ja vasta-aineet. Päätoimisesti hoitona on leikkaus joko osittain tai kokonaan riippuen kasvaimen koosta ja sijoittumisesta. Leikkauksessa poistetaan kasvain, osa tervettä kudosta ja mahdollisesti kainalon imusolmukkeita. Usein hoidoista käytetään erilaisia yhdistelmiä, jossa leikkauksen jälkeen mahdollisesti kehoon jääneet solut pyritään tuhoamaan joko säteilyhoidolla tai solunsalpaajilla. Solunsalpaajat

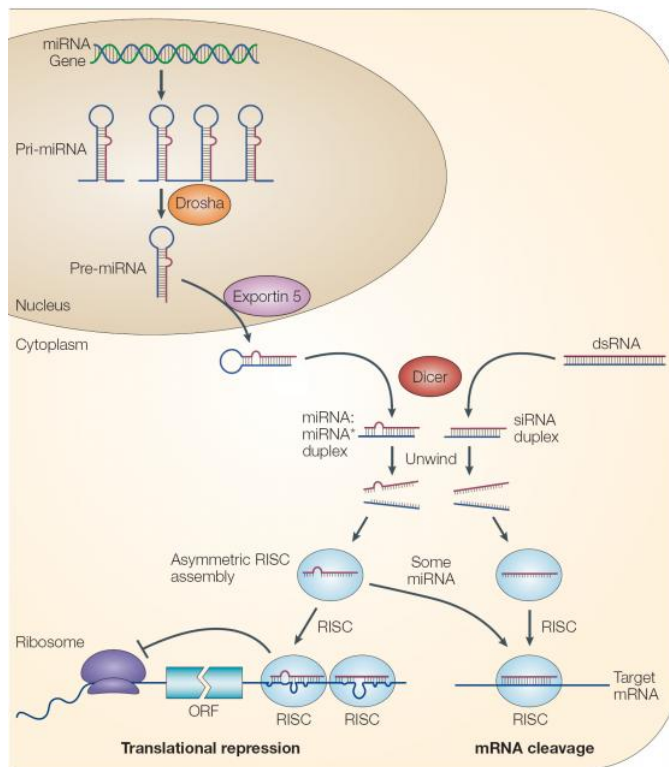
kohdistuvat jakautuviin soluihin estämällä niiden jakautumisen tai tappamalla solut kokonaan. Hoidoissa käytetään solunsalpaajia, jotka kohdistuvat useisiin eri toimintoihin varmistaen mahdollisimman kattavan tehon ja vähäiset haittavaikutukset.

Hoidot ovat usein tehokkaita ja ongelmaksi muodostuvatkin tapaukset, jotka eivät vastaa hoitoon, eli ovat resistenttejä hoidolle . Tästä esimerkkinä on triplanegatiivinen rintasyöpä. Tällöin hoitomuodoiksi jää usein vain leikkaus ja sädehoito. Tarvitaan uusia mahdollisia lääkehoidon kohteita näille tapauksille, jotka eivät vastaa nykyisin hoitomuotoihin, sillä ne ovat usein myös huonoimman ennustuksen saaneet tapaukset. (Rintasyövän hoito 2008).

4 MikroRNA

RNA-interferenssi eli RNA:n häirintä on osa solun puolustusmekanismia. Monet virukset käyttävät infektoimiseen yksi- tai kaksijuosteista RNA:ta, jonka solu kykenee hajottamaan nopeasti käyttäen RNA-interferenssiä. Kun soluissa on kaksijuosteista dsRNA:ta (double stranded), Dicer-kompleksi aktivoituu ja pilkkoo dsRNA:n pieniksi häiritseviksi RNA:ksi, siRNA:ksi. Nämä ds-siRNA:t sitoutuvat Argonautti-proteiiniin, joka irrottaa ja hajoittaa toisen juosteista ja toinen sitoutuu RNA Induced Silencing Complex:n komponentteihin. Kompleksi sitoutuu juosteen avulla edelleen muihin viruksen transfektoimiin RNA-juosteisiin saaden ne hajoamaan välittömästi pariutumisen myötä.

MiRNA:t ovat lyhyitä, noin 18–25 nukleotidin pituisia, ei koodaavia RNA:ita. MiRNA:t käännetään tumassa RNA-polymeraasi II (Pol II) avulla, tuottaen pri-miRNA:ta (koko 1 kb - 3kb, kiloemästä), jonka ribonukleaasi(RNaasi)-Drosha pilkkoo hairpin-muotoiseksi pre-miRNA:iksi (koko 700–1000 nukleotidiä, nt). Se kuljetetaan exportin 5 avulla sytoplasmaan, jossa RNaasi-entsyymi Dicer pilkkoo silmukkarakenteisen pre-miRNA:n pieniksi pätkiksi, mature-miRNA:ksi. Toinen juoste sitoutuu RNA-induced silencing complexiin, RISC:iin ja toinen yleensä hajoaa. MiRNA ohjaa RISC:iä sitoutumaan kohde-mRNA:han. Kuvassa 4 on esitetty miRNAiden muodostuminen. (Garzon 2010). MiRNA:iden sitoutuminen mRNA:han on yleensä osittaista, noin 7–10 nukleotidiä pariutuvat, mikä aikaansaa mRNA:n translaation estymisen ja muuttaa mRNA:n epästabiilimmaksi. MiRNA sitoutuu yleensä mRNA:n 3' UTR päähän. Lopulta mRNA kuljetetaan solun kierrätyskeskuksiin, P-bodeihin, joissa se hajotetaan. Mikäli miRNA sitoutuu mRNA:han täydellisesti, seuraa välitön mRNA:n hajottaminen. Tämä on harvinaisempaa nisäkkäillä, mutta yleisempää kasveilla. (Alberts 2008: 494; Kent & Mendell 2006.)



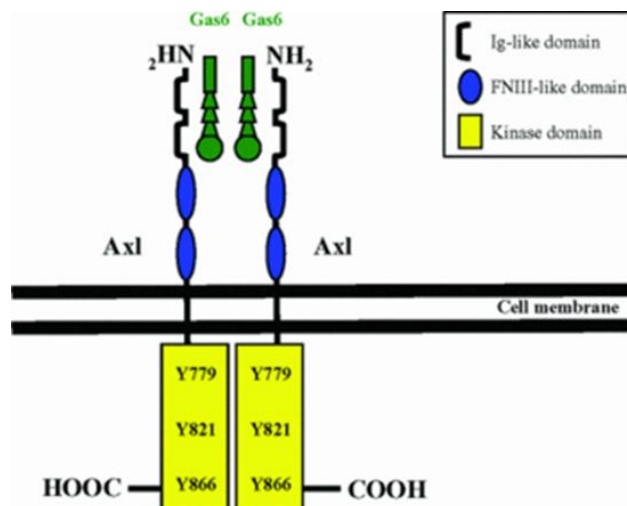
Kuva 4. MikroRNA:n transkriptio ja toimintamekanismi (MicroRNA Deep Sequencing 2013).

MiRNA:t on suhteellisen uusi löytö tieteen mittapuulla - ihmisen miRNAita on ruvettu tutkimaan vasta 2000-luvulla (Aaltonen 2013). Ne vaikuttavat kaikkialla kehossa ja ovat aktiivisesti mukana niin alkionkehityksessä kuin syövän syntymisessä. MiRNA:t sijaitsevat DNA:ssa pääsääntöisesti geenien ei-koodaavilla alueilla. Ne monistuvat samanaikaisesti kuin geeni ja vaikuttavat usein muiden kohteiden lisäksi lähialueella sijaitseviin geeneihin. MiRNA voi sitoutua useampiin eri geeneihin, laskutavasta riippuen 7-200 kohteeseen. Yksi miRNA voi myös sitoutua useampaan eri kohtaan saman geenin sisällä. Useampi eri miRNA voi sitoutua yhteen kohteeseen joko kilpailen sitoutumisesta tai voimistaen toistensa vaikutusta.

Syövässä miRNA:t voivat toimia joko onkogeeneinä tai supressoreina. Ne siis kykenevät hiljentämään geenejä, jotka estävät syövän syntymistä tai ne voivat hiljentää geenejä, jotka aiheuttavat syöpää. Koko genomien kattavat miRNA-tutkimukset ovat osoittaneet, että syövä voidaan jakaa tarkasti niiden miRNA-profiilien perusteella. Tutkimuksissa osoitettiin myös, että miRNA:t ovat syövässä huonosti säädeltyjä verrattuna normaaliin kudokseen ja ovat hyvä kohde lääkekehitykselle, sillä syövän fenotyyppiä on kyetty muuttamaan kohdentamalla miRNA:ita niiden anti-miRNA:illa. (Kent & Mendell 2006; Garzon ym. 2010.)

5 Axl-tyrosiinikinaasireseptori

Axl kuuluu reseptorityrosiinikinaaseihin (RTK), jotka ovat solukalvon toiseksi yleisimpiä reseptoreita. Muita yleisiä reseptorityrosiinikinaaseja ovat epidermaalisen kasvutekijän reseptori ja insuliinireseptori. Tarkemmin Axl-reseptori on osa Tam-perhettä, johon kuuluu sen lisäksi Tyro-3- ja Mer- tyrosiinikinaasireseptorit. (Linger 2008.) Axl-reseptori koostuu ekstrasellulaarisesta osasta, jossa on kaksi immunoglobuliini (Ig) -tyyppistä domeenia, kaksi fibronectiini-3 -tyyppistä domeenia, sekä intrasellulaarinen kinaasidomeeni, jossa on kolme tyrosiinin autofosforylaatiokohtaa (kuvassa 5). Axl-reseptori aktivoituu Gas6:den (Growth arrest-specific 6) sitoutuessa sen Ig-domeeneihin, jolloin niistä muodostuu dimeeri. Tämän johdosta reseptorin intrasellulaarinen osa kykenee fosforyloimaan edelleen sytoplasmassa olevia kinaaseja aktivoiden ne. (Migdall & Graham 2010.)



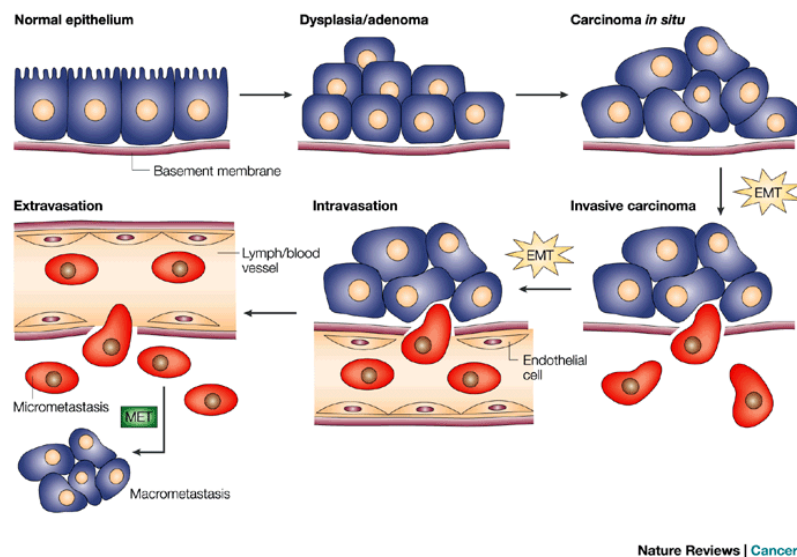
Kuva 5. Tyrosiinikinaasireseptori Axl:n rakenne ja intrasellulaarisen osan autofosforyloitumiskohdat (Korshunov 2012).

Axl-reseptori on yliekspressoituna useissa syöpätyypeissä ja sen on osoitettu olevan merkki huonosta selviytymisestä rintasyövässä. Lisäksi sen ekspression estäminen metastasoivassa rintasyöpäsolulinjassa vähentää solujen invaasiota. Se ei niin ikään ole yhteydessä muihin tunnettuihin selviytymistä huonontaviin tekijöihin, kuten reseptoristatukseen tai levinneisyyteen, vaan sen esiintyminen korreloi huonon selviytymisen kanssa. Axl-reseptorin on myös näytetty indusoivan epiteelimesenkymaali transitiota ja sen merkkiaineita. (Gjerdrum ym. 2010.) Entuudestaan tunnetut miRNA:t miR-199a/b ja miR-34a säätelevät Axl-reseptorin toimintaa hypermetylaation avulla. (Mudduluru ym. 2011.)

6 Epiteeli-mesenkymaali transiitio

Epiteelisolujen muuntuminen mesenkymaaliseksi (EMT) on tärkeä osa alkion kehitystä, kudosten uusiutumista ja haavojen parantumisesta. Se on myös mekanismi, jonka avulla syöpäsolut muodostavat etäpesäkkeitä. On osoitettu, että EMT:n aktivaatio on malignien epiteelisyöpäsolujen syntyminen kriittinen mekanismi. (Kalluri ja Weinberg 2009.)

Jotta karsinoma voi muodostaa etäpesäkkeitä, solujen täytyy ensin omaksua mesenkymaalinen fenotyyppi, järjestäytyä uudelleen ja lähteä liikkeelle elimistöön. Ennen veri- tai imusuoniin pääsemistä muuntuneiden solujen pitää läpäistä tyvikalvo, joka suojaa niitä. Ensin ne vaeltavat suonistoissa ja kiinnittyvät huonosti tunnettujen biologisten signaalien ohjaamana suonien seinämiin. Kohteessa niiden pitää uudelleen hivuttautua kalvon läpi, sekä käydä mesenkymaalisolujen muuntuminen epiteelisoluiksi (MET), jossa solu omaksuu jälleen epiteelisen fenotyypin. Suurin osa soluista kuolee anoikikseen, eli kiinnittymättömyydestä johtuvaan ohjattuun solukuolemaan matkan aikana tai immuunipuolustus eliminoi ne. Kohdekudoksessa syöpäsolut pääsevät jatkamaan proliferointia. Tämä on esitetty kuvassa 6. (Thiery 2002.)



Kuva 6. Epiteeli-mesenkymaali transiitio ja syöpäsolujen leviäminen. (Thiery 2002.)

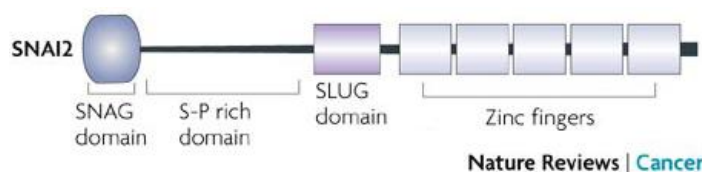
EMT:oon liittyy paljon erilaisia proteiineja, joita ekspressoimalla tai estämällä se voidaan saada aikaan tai palautua mesenkymaali-epiteeli transition, MET:n avulla. Edellä mainittuja proteiineja ovat muun muassa solujen välisiin liitoksiin liittyvät proteiinit, solurankaan ja solun tukiverkoston liittyvät proteiinit, erilaiset

tarttumisreseptorit sekä sen signalointireseptoreihin liittyvät proteiinit. Tämän työn kannalta oleellisia EMT-proteiineja ovat transkriptiotekijä Slug, adherenttien liitosten proteiini E-cadheriini, välimuotoinen filamentti Vimentiini, sekä tyrosiinikinaasireseptori Axl.

6.1 Epiteeli-mesenkymaali transition merkkiaineet

Slug

Snai2, eli Slug-proteiini on transkriptiotekijä. Se sitoutuu DNA:n säätelyjaksoihin sinkkisormien avulla (kuva 7) ja säätelee transkription määrää (SNAI2 2014). Slug-transkriptiotekijä on aktiivisena alkion kehityksessä ja haavojen parantumisen aikana. Mutaatiot tässä geenissä johtavat usein alkion kuolemaan, sillä se on mukana muun muassa hermoston kehityksessä. (Snai2 2013.)



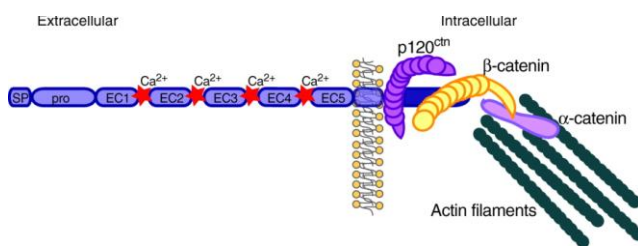
Kuva 7. Slug-proteiinin rakenne. Muokattu alkuperäisestä kuvasta. (Peinado ym. 2007)

Slug-proteiini sitoutuu BRCA2-geenin vaimenninosan E2 -laatikkoon ja hiljentää geenin toiminnan CtBP-1- ja HDAC-1-proteiinien avulla. BRCA2-geeni säätelee solun jakautumista ja solusykliä, sekä korjaa virheitä DNA:ssa, eli se toimii syövän supressorina. Sen ekspressio on voimakas jakautumassa olevissa soluissa, joissa se on mukana tarkistuspisteissä. Mutaatiot tässä geenissä ovat periytyviä ja ne ovat yksi yleisimmistä rintasyöpää aiheuttavista geenimutaatioista.

Slug-proteiini on myös E-cadheriinin repressori, sitoutuen suoraan geenin promoottoriaan. Tätä kautta se estää siis solujen sitoutumista toisiinsa. Lisäksi Slug-proteiinin lisääminen soluihin vaikuttaa niiden jakautumiseen ja kasvun nopeuteen ja sen vieminen epiteelisoluihin saa aikaan niiden muuntumisen mesenkymaaliksi. Tällöin se saa aikaan myös Axl-reseptorin ja Vimentiini-filamenttien ekspressiotason lisääntymisen (Vuoriluoto 2010). Slug-proteiini on yksi keskeisimmistä EMT:ön ja mesenkymaalisten solujen merkkiaineista ZEB- ja Twist-proteiiniperheiden ohella.

E-cadheriini

Solujen välillä on monia erityyppisiä liitoksia, joiden avulla ne kiinnittyvät toisiinsa ja viestivät keskenään. Näissä liitoksissa erilaiset proteiinit, kuten E-cadheriini, liittää solut toisiinsa. E-cadheriini-proteiini muodostuu solun ulkoisesta ja sisäisestä osiosta. Desmosomeissa ja tiiviissä liitoksissa E-cadheriini-proteiini muodostaa itsensä kanssa homodimeerejä ekstrasellulaaristen osien Ca^{2+} -ionien avulla. E-cadheriini-proteiinin intrasellulaariset osat liittävät sen solun tukiverkoston kateniinien avulla desmosomeissa välimuotoisiin filamentteihin ja tiivissä liitoksissa aktiini-filamentteihin. Kuvassa 8 E-cadheriini-proteiini on sitoutunut solun sisäiseen Aktiini-verkoston. (Alberts ym. 2008.)



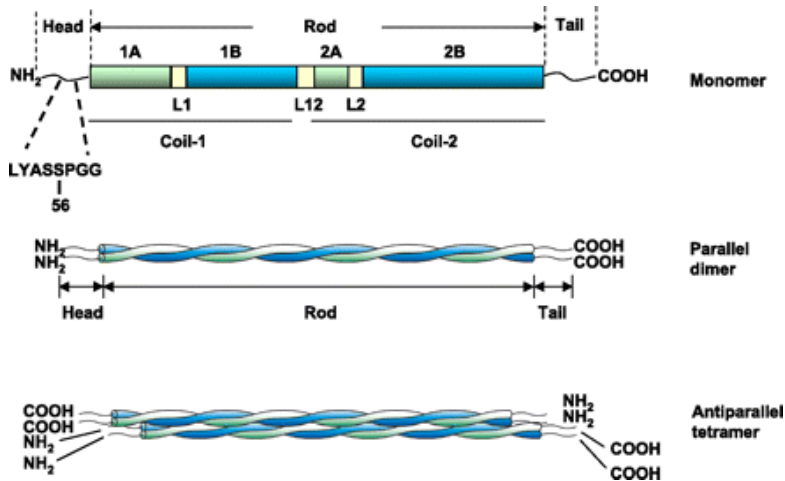
Kuva 8. E-cadheriini-proteiinin rakenne ja sijoittuminen solukalvolle (Wheerlock ym. 2008).

Tiiviiden liitosten avulla solut liittyvät tiukasti toisiinsa ja esimerkiksi liitoksia kiristämällä oikeista kohdista epiteelisoluista voidaan muodostaa epiteeliputkia. Desmosomit antavat soluille niiden mekaanisen kestävyuden siirtämällä niihin kohdistuvat leikkausvoimat välimuotoisiin filamentteihin, joilla on suurempi mekaaninen kestävyys. Suurimmassa osassa epiteelisoluista desmosomit liittyvät keratiineihin, mutta esimerkiksi sydänlihassoluissa ne liittyvät desmiiniin. Mutaatiot E-cadheriini-proteiinia koodavassa geenissä tai sitä säätelevien proteiinien geneissä ovat yleisiä syövissä, jolloin solujen sitoutuminen toisiinsa estyy ja niiden muuttuminen mesenkymaaliseksi ja liikkuviksi mahdollistuu. (Alberts 2008:11; Rivard 2009.)

Vimentiini

Solun tukirangassa on välimuotoisia filamentteja, jotka edesauttavat solun kykyä kestää mekaanista stressiä. Välimuotoisia filamentteja ovat muun muassa keratiinit, neurofilamentit, Nestiini, Desmiini ja Vimentiini (Välimuotoiset filamentit 2006). Vimentiiniä esiintyy normaalisti lähinnä mesenkymaalisisissa soluissa, kuten fibroblasteissa, mutta sitä esiintyy useissa aggressiivisissa syöpätyypeissä.

Vimentiini muodostuu useista toisiinsa kietoituneista Vimentiini-yksiköistä, monomeereista, joiden päissä olevat amino- ja karboksyylihähteet sitoutuvat keskenään muodostaen pitkiä putkimaisia rakenteita. Nämä ketjut kietoutuvat toistensa ympärille muodostaen dimeerejä, tetrameerejä ja edelleen polymeereja (kuvassa 9), joissa useimmat kimput ovat kietoutuneet keskenään.



Kuva 9. Vimentiini-säikeiden muodostuminen ja rakenne (Tang 2008).

Vimentiinillä on soluissa useita erilaisia tehtäviä. Vimentiini säätelee soluissa muun muassa niiden kiinnittymistä ekstrasellulaarisen matriksiin integriini välitteisesti (Ivaska ym. 2007). Sitä tarvitaan EMT:n ja Axl-proteiinin ekspresion käynnistämiseen. Vimentinin hiljentäminen MDA-MB-231-rintasyöpä-soluissa johti niiden liikkuvuuden menettämiseen *in vitro* (Ivaska J. 2011). Se on myös yliekspressoituna kolmoisnegatiivisessa basaalityyppisessä rintasyövässä (Karihtala ym. 2013).

6.2 MikroRNA:t ja epiteeli-mesenkymaali transito

EMT voidaan aikaansaada usealla eri tavalla, kuten ekspressoimalla Snai-, ZEB- tai Twist-perheen transkriptiotekijöitä. Solut menettävät pyöreän muotonsa ja alkavat ekspressoida mesenkymaalisille soluille tunnettuja merkkiaineita. Sama voidaan aikaansaada myös yksittäisillä mikroRNA:illa miR-200-perheestä ja miR205:llä. MiR-200-perheeseen kuuluvat miR-200a, -200b, -200c, -141 ja -429 (Gregory ym. 2008). Niillä on keskeinen asema solujen muuntumisen ja jakautumisen säätelyssä. Erilaisia mikroRNA:ita esiintyy miltei kaikissa solun jakautumisen vaiheissa monikykyisistä kantasoluista erilaistuneihin soluihin. Yksi miRNA voi hiljentää useampaa samantyyppistä proteiinia. Esimerkiksi miR-34a hiljentää Slug-proteiinia, mutta myös

ZEB-proteiinien 3' UTR alueelta löytyy sille sitoutumiskohta. Tämän lisäksi miR-34a hiljentää Axl-reseptoria. Mekanismi toimii molempiin suuntiin; proteiinit, joita miRNA:t hiljentävät, pystyvät hiljentämään kyseisiä miRNA:ita. (Lamouille ym. 2013).

7 Materiaalit ja menetelmät

Tämä insinöörityö alkoi solulinjojen ylläpidolla ja tarvittavien analyysimenetelmien suunnittelulla ja valmistelulla. Soluista kerättiin kerralla sekä proteiinit ja miRNA, jotta voitiin varmistaa miRNA-analyysiin käytettävien solujen ekspresion olevan molemmilla kerroilla samanlainen. Aluksi tehtiin miRNA-analyysi kaksista eri kerralla valmistetuista virustransfektoiduista soluista ja niiden tulosten sekä kirjallisuuskatsauksen perusteella valittiin ja tilattiin miRNA:t jatkotutkimuksia varten. Valitut miRNA:t transfektoitiin soluihin ja transfektiot varmistettiin qPCR:n avulla. MiRNA –analyysin tulosten toistuminen toisella solulinjalla varmistettiin QPCR:n avulla. Sen perusteella tehtiin uudet transfektiot pidemmällä vaikutusajoilla eri soluihin, joista valmistettiin edelleen näytteet immunofluorensenssiä ja virtausytometriaa varten. Taulukossa 3 on esitetty työssä käytetyt vasta-aineet.

Taulukko 3. Työssä käytetyt vasta-aineet ja laimennokset

Vasta-aine	Tunniste	Laji	Valmistaja	Sovellus	Laimennos
Axl	AF154	vuohi	R&D Systems	WB	1:1000
Axl	H-124	kani	Santa-Cruz	WB, IF	1:1000, 1:50
Axl	Z49M	hiiri	Santa-Cruz	FACS	1:400
E-cadheriini	24E10	kani	Cell Signaling	FACS	1:100
E-cadheriini	#4065	kani	Cell Signaling	WB, IF	1:1000, 1:500
N-cadheriini	61090	hiiri	BD Transduction Laboratories	WB, IF	1:1000, 1:50
Vimentini	V9	hiiri	Santa-Cruz	WB, IF	1:1000, 1:100
Slug	#9585S	kani	Cell Signaling	WB	1:1000
α-tubuliini	12G10	hiiri	Hybridoma Bank	WB (latauskontrolli)	1:1000
β-aktiini	ab8226	hiiri	abcam	WB (latauskontrolli)	1:1000
hiiri 488				FACS	1:400
hiiri 680				WB	1:5000
hiiri 570				IF	1:400
kani 488				IF, FACS	1:400, 1:400
kani 800				WB	1:5000
vuohi 800				WB	1:5000

7.1 Solujen viljely

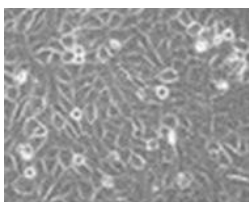
Työssä käytettiin taulukossa 4 listattuja solulinjoja, jotka edustivat kahta erilaista fenotyyppiä ja ekspressoivat eri EMT:n merkkiaineita. Viitatta solulinjoihin myöhemmin käytetään taulukon mukaisia lyhenteitä niiden nimeämiseen lukuunottamatta kuvatekstejä ja otsikoita. 10a- ja GFP-solut toimivat kontrolleina, joihin Slug- ja 231-soluja verrattiin.

Taulukko 4. Työssä käytetyt solulinjat

Solulinja	Käytettävä lyhenne	Fenotyyppi	Axl	E-cadheriini	Slug	Vimentini
Mcf10a	10a	epiteliaalinen		x		
Mcf10a GFP	GFP	epiteliaalinen		x		
Mcf10a GFP Slug	Slug	mesenkymaalinen	x		x	x
MDA-MB-231	231	mesenkymaalinen	x		x	x

Mcf10a

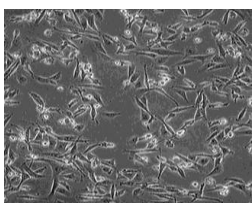
10a on rintaepiteelisolulinja, joka muistuttaa normaaleja rinnan epiteelisoluja. Solut eivät pysty jakautumaan loputtomasti, kuten syöpäsolut, ne kestävät noin 30 jakokertaa. Solut eivät ekspressoi Axl reseptoria, Vimentini- tai Slug-proteiineja, joiden sijasta niiden merkkiaineena toimii solujen välisiä liitoksia muodostava E-cadheriini-proteiini. 10a-solut ovat adherenteja soluja, eli ne kiinnittyvät kasvualustaansa ja muodostavat kasvaessaan sidoksia toisiinsa. Tavallisessa soluviljelmässä solut kasvavat vain yhdessä kerroksessa. Kuvassa 10 on konfluentteja 10a-epiteelisoluja.



Kuva 10. Kuvassa on konfluentteja Mcf10a-soluja, jotka edustavat epitelialista fenotyyppiä (Botlagunta ym. 2010).

Mcf10a GFP ja GFP Slug wt

Työhön käytetyt 10a-solut oli virustransfektoitu GFP ja GFP Slug-proteiineilla. GFP-solut muistuttivat fenotyypiltään normaaleja 10a-soluja (kuva 10), kun taas Slug-solut olivat omaksuneet mesenkymaalisolujen fenotyypin (kuva 11) ja ekspressoivat useita mesenkymaalisten solujen merkkiaineita. Transfektio ei ollut kovin stabiili, sillä onkogeenin vieminen normaalin kaltaiseen soluun johtaa puolustusmekanismien aktivoitumiseen ja vektorin poistamiseen solusta. Solut palautuivat epiteelisolujen tyyppisiksi vähitellen, eritoten jakamisen tai sulatuksen jälkeen.



Kuva 11. Rinnan adenokarsinooma MDA-MB-231 soluja, jotka edustavat mesenkymaalista fenotyyppiä (Botlagunta ym. 2010).

Kaikkia näitä soluja ylläpidettiin 10a-solujen kasvatusliuoksessa (taulukko 5). Ne jaettiin noin kolmen päivän välein 1:5 tai 1:6, kunnes ne olivat noin 90 % konfluenssissa. 10a-solut olivat herkkiä liialliselle jakamiselle ja liian tiheässä kasvamiselle, joten ne tuli jakaa tasaisin väliajoin. Kasvatusmedium imettiin pois ja solut pestiin nopeasti noin 5 ml:lla PBS-liuoksella. Solut irrotettiin lisäämällä niiden päälle 1 ml punaista 10x trypsiini-liuosta ja annettiin sen vaikuttaa 10 minuuttia +37 °C:ssa. Solujen irtoaminen tarkistettiin mikroskoopilla. Solut sentrifugoitiin 1:1 kasvatusliuoksen kanssa ja solut suspensoitiin 1 ml kasvatusliuosta, josta ne jaettiin valitussa suhteessa kasvatusmaljalle 10 ml kasvatusliuokseen.

Taulukko 5. Työssä käytetyt kasvatusliuokset.

Mcf10a kasvatusliuos		MDA-MB-231 kasvatusliuos	
reagenssi	pitoisuus	reagenssi	pitoisuus
kantaliuos		DMEM	
DMEM/F12	1:1	FBS	10 %
Hevososen seerumi	5 %	L-glutamiini	1 %
L-glutamiini	1 % DMEM, tai 0,5 % DMEM/F12 pitoisuudesta	Non-essential-amino acids	1 %
valmis liuos = kantaliuos + lisäkomponentit			
Insuliini	10 µg/ml		
Epidermaalinen kasvutekijä	20 ng/ml		
Cholera Toxiini	100 ng/ml		
Hydrocortisoni	0,5 µg/ml		

MDA-MB-231

Rinnan adenokarsinoma 231-solut edustavat metastasoivaa ja proliferoivaa rintasyöpätyyppiä ja niitä verrattiin 10a-solulinjaan. 231-solut edustavat mesenkymaalista fenotyyppiä ja ekspressoivat Axl-reseptoria, Vimentiini- ja Slug-proteiineja. Soluja kasvatettiin taulukon 5 mukaisessa kasvatusliuoksessa. Solut jaettiin 3–4 päivän välein 1:10–1:20 riippuen niiden konfluenssista ja seuraavasta käyttökerrasta. Koska 231-solut olivat syöpäsoluja, ne eivät kärsineet jakovälien epätasaisuudesta tai liian harvaan jakamisesta. Solujen kasvatusmedium imettiin pois, solut pestiin nopeasti PBS:llä ja irrotettiin yksinkertaiseksi laimennetulla trypsiinillä +37 °C:ssa 2-3 minuutin ajan. Solut sentrifugoitiin 1:1 kasvatusliuoksen kanssa ja solut suspensoitiin 1 ml kasvatusliuosta, josta ne jaettiin valitussa suhteessa kasvatusmaljalle 10 ml kasvatusliuokseen.

7.2 Western blot -analyysi

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi, SDS-PAGE, (engl. *sodiumdodecylsulfatepolyacrylamidegelelectrophoresis*) erottelee proteiinit niiden koon perusteella sähkökentässä akryyliamidigeelille. Solut kerättiin maljoilta näytepuskuriin, jonka detergentit hajottavat solukalvon ja -elimet. Työssä on käytetty kahta eri

näytepuskuria riippuen siitä, mitattiinko niiden suhteelliset proteiinimäärät. Detergentteinä toimivat SDS ja merkaptoetanol, jonka lisäksi puskurit sisälsivät suoloja. Proteiineja mitattaessa näytepuskuri ei sisältänyt väriainetta. Näytteet sonikoitiin ultraäänellä pitämällä sonikaattorin pilliä näyteputkessa 10–15 sekunnin ajan. Ennen jokaista ajoa näytteitä keitettiin noin kymmenen minuuttia proteiinien denaturoitumiseksi. Kokostandardi ja näytteet pipetoitiin tutkittavien proteiinien koon mukaan valitun BioRadin polyakryyligeelin kaivoihin. Geelin annettiin ajautua 120 V jännitteessä kunnes näytteet olivat ajautuneet geelin alareunaan, yleensä noin 2 tuntia.

Proteiinit siirrettiin geeliltä BioRadin nitroselluloosamembraanille 25 V jännitteessä BioRadin Transblot Turbo-laitella. Membraani blokattiin PBS-liuoksella 1:2 laimennetulla Odyssey Blocking Bufferilla noin tunnin ajan RT:ssä. Sen jälkeen membraania inkubointiin primäärivasta-aineliuoksessa yön yli +4 °C:ssa. Membraani pestiin kolme kertaa viiden minuutin ajan TBST-liuoksella. Pesun jälkeen membraania inkubointiin sekundäärivasta-aineessa valolta suojattuna tunnin ajan RT:ssä. Tämän jälkeen membraanit pestiin jälleen kolme kertaa viisi minuuttia TBST-liuoksessa, liuos vaihdettiin jokaisella kerralla. Membraani kuvattiin Odyssey -laitteella, jonka laser virittää sekundääri vasta-aineiden leimat ja havaitsee niistä lähtevän valon.

7.3 MikroRNA PCR -analyysi

Soluista eristettiin totaali-RNA Qiagenin miRNAeasy-kitin ohjeiden mukaisesti. Kaikki vapaavalintaiset työvaiheet suoritettiin ja lopuksi näytteet eluointiin lopputilavuuteen 30 µl. Näytteistä mitattiin konsentraatiot ja puhtaudet NanoDropilla.

Työssä käytettiin miRNAiden analysointiin Qiagenin MiScript miRNA PCR Arrayta. Analyysissa 96-kuoppalevyn jokaisen kaivon pohjaan on sidottu tietylle miRNAlle spesifisiä koettimia, joihin näytteessä oleva miRNA sitoutuu ja monistuu. 96 kuopasta 12 sisältää kontrollikoettimia, joten itse testissä on mukana yhteensä 84 eri miRNA:ta. Reaktioissa on mukana kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvaa SYBR Green -fluoresoivaa väriä. Fluoresenssin määrää mittaamalla tulokseksi saadaan sen suhteellinen arvo suhteessa syklien lukumäärään. Mitä aikaisemmin fluoresenssin määrä nousee, sitä enemmän näytteessä on miRNA:ta. Tuloksien analysoinnissa näytettä verrataan kontrolliin, jolloin tulokseksi saadaan miRNA tason lisääntyminen tai vähentyminen suhteessa kontrolliin. Testiin valittiin syöväälle spesifisiä miRNA:ita sisältävä kuoppalevy. Näytteinä toimivat GFP- ja Slug-solujen RNA. Kummallekin

näytteelle oli oma 96-kuoppalevynsä. Paketin reagenssit on mitoitettu niin, että niiden pitäisi riittää yhteensä neljän 96-kuoppalevyn reaktioihin. Työ toistettiin kerran itsenäisesti, eri transfektioerän GFP- ja Slug-soluilla. Nämä lajiteltiin ennen analyysia virtaussytometrillä, jotta vektorin poistaneet solut eivät edustaisi suurempaa osaa Slug-solupopulaatiota.

RNA käännettiin ensin DNA:ksi käänteiskopioija-entsyymillä, jotta sitä voitaisiin monistaa qPCR-analyysilla. RT-reaktiot suoritettiin miScript RT II -kitillä, PCR-analyysin ohjeiden mukaisesti. Reaktioissa käytettiin 250 ng RNA:ta näytettä kohti. RT-reaktioiden jälkeen näytteet laimennettiin ja reaktiot valmistettiin PCR-analyysin ohjeiden mukaisesti. Ohjeissa noudatettiin kohtia, jotka oli tarkoitettu Pathway-Focused miRNA PCR Array 96-kuoppalevylle. Levyt suljettiin teipein ja nesteet sentrifugoitiin pohjaan. Näytteet ajettiin taulukon 7 mukaisesti.

Taulukko 6. miRNA qPCR ohjelma

Vaihe	Aika	Lämpötila (°C)
Alkudenaturaatio	15 min	95
3-vaiheinen sykli:		
Denaturaatio	15 s	94
Sitoutuminen	30s	55
Pidennys	30s	70
Syklien määrä	40	

7.4 MikroRNA -transfektio

Soluihin vietiin TaqMan pre-miRNA tai anti-miRNA käänteisellä transfektioilla sen mukaan oliko kyseisen miRNA:n taso ylhäällä vai alhaalla kontrolliin nähden. Transfektio varmistettiin qPCR:illa, kyseiselle miRNAlle spesifisesti suunniteltujen alukkeiden avulla. Transfektio tehtiin 12-kuoppalevyillä. Transfektioseoksen volyyymi oli puolet kasvatuskaivon normaalista kasvatusliuosmäärästä. Kutakin miRNA:ta tuli 20 nM, Qiagenin Hiperfect -reagenssia kaksinkertainen määrä miRNA:n volyyymia kohden ja loput volyymistä täytettiin Invitrogenin Optimem-liuoksella. Solut irrotettiin ja jaettiin kuten aiemmin, mutta suspensoitiin transfektioseokseen ja siirrettiin maljalle. Soluja hoidettiin Optimem, HiperFect ja miRNA -seoksella yön yli, jonka jälkeen lisättiin tuoretta kasvatusmediumia 1:1 suhteessa transfektiovolyyymiin. MiRNA:iden annettiin ensimmäisellä kerralla vaikuttaa 3 vuorokautta ja toisella kerralla 5 vuorokautta.

7.5 MikroRNA -qPCR

Analyysiin käytetty RNA eristettiin kuten aiemmin. RT-reaktiot suoritettiin Qiagenin kitin ohjeiden mukaan. Reaktioissa käytettiin 10 ng:aa RNA:ta. RNA:t laimennettiin 1:10 veteen, sillä määriä ei muuten olisi pystytty pipetoimaan. Reaktiot tehtiin suoraan PCR-putkiin. MiRNA PCR suoritettiin myös kuten valmistajan ohjeessa. Näytteet pipetoitiin 96-kuoppalevylle ja jokaisesta näytteestä tehtiin 4 rinnakkaista kaivoa. Tulokset analysoitiin qPCR -laitteen valmistajan omalla ohjelmalla.

7.6 Immunofluoresenssivärjäys

MiRNA -transfektoituja soluja kasvatettiin noin 80 % konfluenssiin 24-kuoppalevyn pohjalla olevien lasilevyjen päällä. Värjäyksessä käytetty blokkauслиuos sisälsi 30 % hevosen seerumia PBS-liuoksessa. Kasvatusliuos imettiin pois ja solut pestiin nopeasti noin 500 µl:lla PBS-liuosta. Solujen kasvu pysäytettiin fiksaamalla solut kiinni alustaan 4 %:sella paraformaldehydillä, jota tuli 200 µl kaivoa kohti. Soluseinät tehtiin läpäiseviksi permeabilisaatiossa Triton-X:n avulla. Kuoppiin annosteltiin 250 µl pitoisuudeltaan 0,1 % Triton-X-blokkauслиuosta ja annettiin sen vaikuttaa 15 minuuttia, jonka jälkeen näytteet blokattiin blokkauслиuoksessa 30 minuttia. Näytteitä inkuboitiin primäärivasta-aineen kanssa 1 tunti lasilevy solupuoli alaspäin käännettynä, jonka jälkeen ne pestiin kolme kertaa PBS-liuoksella solupuoli ylöspäin. Pesujen jälkeen näytteitä inkuboitiin sekundäärivasta-aineiden kanssa 1 tunti valolta suojattuna, solupuoli alaspäin. Lopuksi näytteet pestiin vielä kaksi kertaa PBS-liuoksella ja kerran vedellä solupuoli ylöspäin. Kaikki vaiheet tehtiin RT:ssä. Kuvaamista varten lasilevyt kiinnitetään objektilaseille Mowiolilla ja pidettiin +37°C:ssa noin 1 tunti.

7.7 Virtausytometrianalyysi, FACS

Virtausytometriassa solut virtaavat yksisolususpensiona lasereiden ohi, jotka skannaavat soluja suora- ja sivuttaissironnan mukaan. Tämän avulla niitä voidaan lajitella muodon ja koon mukaan. Lisäksi niihin voidaan lisätä fluoresoivia vasta-aineita kuten immunofluoresenssivärjäyksessä. Tulokseksi saadaan fluoresenssin suhteellinen määrä solua kohti.

Solut irrotettiin maljalta Thermo Fisherin HiQase-reagenssilla, jonka annettiin vaikuttaa noin 10 minuuttia +37°C:ssa. Normaali trypsinointi hajottaisi solujen väliset E-cadheriini-sidokset, mikä estäisi E-cadheriini-proteiinin havainnoimisen FACS:llä. Solut sentrifugoitiin 1:1 Tyrodes-puskurin kanssa ja suspensoitiin 1 ml:aan Tyrodes-puskuria ja säilöttiin + 4°C:seen. Näytteiden käsittelyä varten solut sentrifugoitiin uudelleen ja solut suspensoitiin 180 µl Tyrodes-puskuria. Solut jaettiin neljään putkeen, joista jokaiseen tuli 50 µl solu-Tyrodes-seosta. Solut ja 50 µl primääri vasta-ainetta sekoitettiin keskenään ja inkuboitin 1 tunti sekoituksessa. Solut sentrifugoitiin ja liuos poistettiin. Näytteet pestiin kerran Tyrodes-puskurilla ja suspensoitiin 50 µl Tyrodes-puskuria. Solut yhdistettiin 50 µl sekundääri vasta-aineiden kanssa ja inkuboitin 1 tunti valolta suojattuna. Ne pestiin Tyrodes-puskurilla kaksi kertaa ja suspensoitiin 150 µl Tyrodes-liuokseen ja jätettiin +4 °C:seen ennen näytteiden ajamista. Muut vaiheet tehtiin RT:ssä.

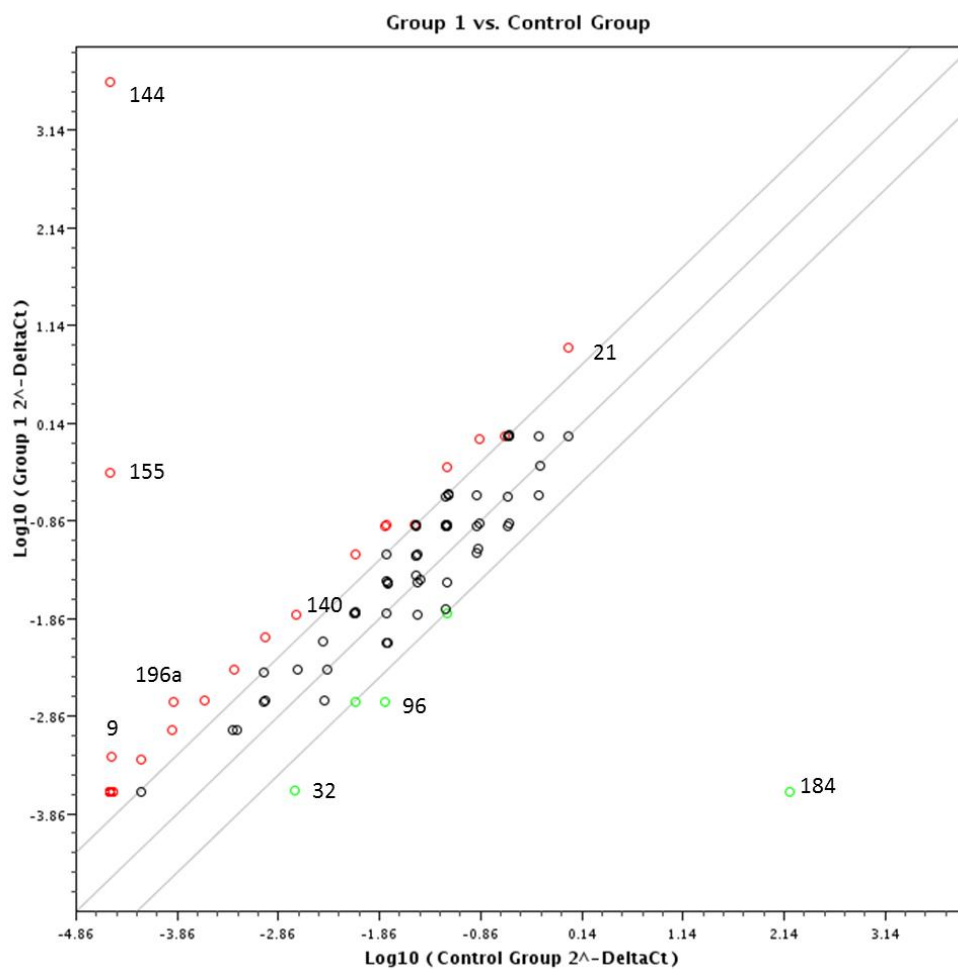
8 Tulokset ja tulosten käsittely

8.1 MikroRNA -analyysi

Solut olivat näytteiden keräyshetkellä noin 80 % konfluenssissa. Slug-soluissa oli arvioilta noin 5 % epiteliaalisiksi muuntuneita soluja. NanoDrop –mittauksen perustella RNA-näytteet olivat puhtaita ja konsentraatiot hyviä. (Tuloksia ei esitetä.)

MiRNA-analyysin tulokset syötettiin valmistajan omaan analysointiohjelmaan (MiScript miRNA PCR Array Data Analysis 2000– 2012). Kuvassa 12 esitetään miRNA-analyysin tulokset. Numerot pallojen vieressä viittaavat miRNA:n nimeen. Punaiset pallot ovat kontrolliin nähden yliekspressoituja miRNA:ita ja vihreät aliekspressoituja. Mustat pallot esittävät miRNA:ita, jotka eivät eronneet kontrollin ja verrokin kesken. Testissä oli yhteensä 84 eri miRNA:ita. Group 1 esittää Slug-soluja ja Control Group GFP-soluja.

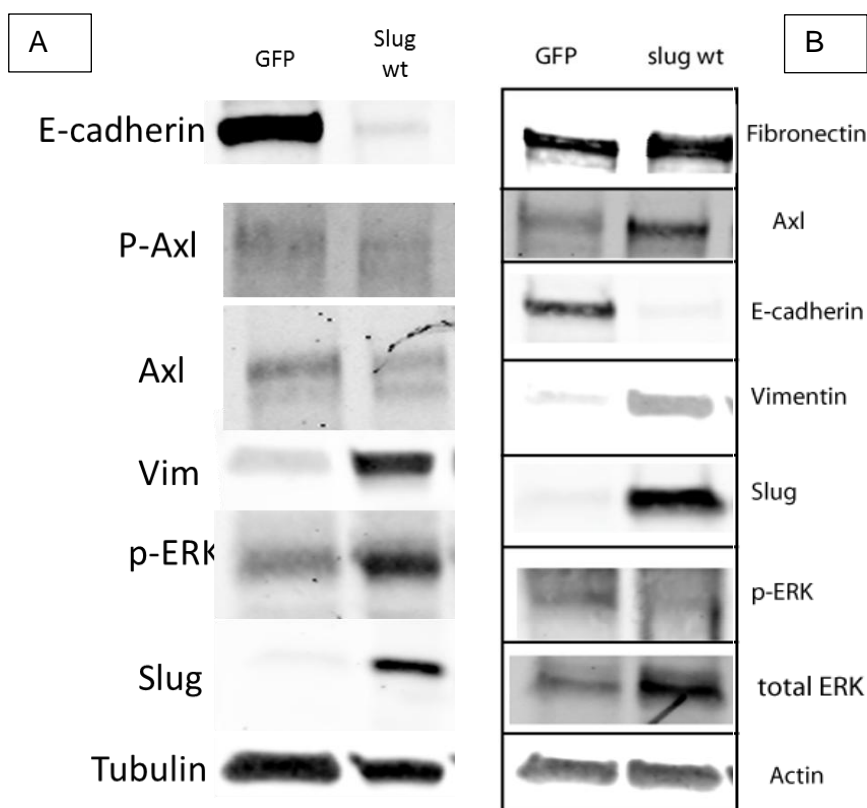
SYBR Green -väri sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han ja voi mahdollisesti aiheuttaa väärää signaalia sitoutuessaan muuhun kuin mitattavaan tuotteeseen. Tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi kaikissa miRNA-analyyseista tehtiin myös sulamislämpötila-analyysi. Niiden perusteella voidaan sanoa signaalin tulevan tuotteista, eikä reaktioissa ole esiintynyt alukkeiden keskenäistä sitoutumista. (Tuloksia ei esitetä.)



Kuva 12. MikroRNA -analyysi GFP- (Control Group) ja Slug- (Group1) soluilla. Kuvan akselit edustavat suhteellisesta arvosta otettua kymmenkantaista logaritmia. Vasemmalla puolella mustien viivojen yläpuolella olevat punaiset pallot edustavat Slug-soluissa yliekspressoituja mikroRNA:ita ja vihreät aliekspressoituja. Mustat pallot kuvaavat mikroRNA:ita, joiden tasoilla ei ollut eroja GFP- ja Slug-näytteiden välillä.

Tulosten analysointiohjelma jakoi ne neljään eri luokkaan (OKAY, A, B ja C) niiden luotettavuuden mukaan. OKAY-ryhmään kuuluneet arvot voitiin hyväksyä sellaisenaan. Ryhmän A tuloksien toisessa näytteessä on ollut suhteellisen matala kynnyssyklarivo, mikä aiheuttaa näytteiden välillä odotetusti eron, vaikka taso olisi matala toisessakin. Käytännössä toisessa näytteessä miRNA:ta on ollut hyvin vähän, mutta toisessa keskimääräisesti tai paljon muihin miRNA -tasoihin verrattuna. Nämä miRNA:t ovat kuitenkin tulosten kannalta kiinnostavia, joten niitä ei rajata ulos. Näin tehdään myös ryhmän B miRNA:ille, jossa molempien näytteiden miRNA-tasot olivat olleet suhteellisen matalia. Käytännössä molemmissa näytteissä on ollut miRNA:ta vähän, mutta niiden välinen ero on silti todellinen. Erot matalilla tasoilla voivat kuitenkin näkyä soluissakin, mikäli miRNA:lla on tärkeä rooli säätelyssä. C-ryhmän tulokset taas jätettiin ulos tarkastelusta, sillä näissä kynnyssyklarivo on molemmissa näytteissä ollut

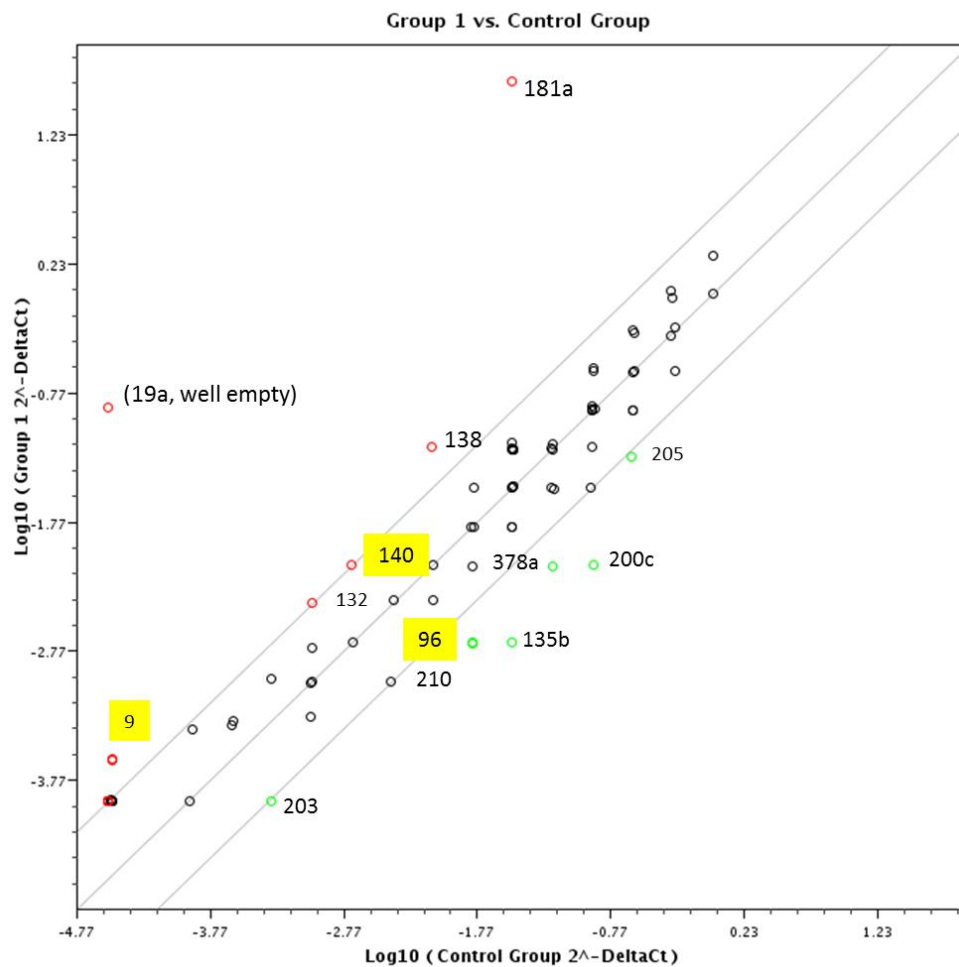
RNA-näytteiden kanssa samaan aikaan soluista kerättiin proteiininäytteet WB-analyysia varten. Näiden tuloksia verrattiin samoista soluista kerättyihin, valmistamisen ja lajittelun jälkeen otettuihin näytteisiin, jotta pystyttiin arvioimaan kuinka paljon solujun muuttuminen takaisin vaikuttaa niiden ekspressioihin. Kuvassa 14 A-kohdassa on solut, joista analyysi on tehty ja B-kohdassa solut lajittelun jälkeen. Silmämääräisesti vertaamalla voidaan todeta A-kohdan Slug-solujen ekspressoivan vähän E-cadheriini-proteiinia, mutta kuitenkin edelleen myös Slug-proteiinia. Axl-reseptoria näyttäisi olevan enemmän GFP-soluissa, mutta todennäköisesti vasta-aine ei ole toiminut, sillä lajittelun jälkeen Axl-reseptorin taso noudattaa Vimentini- ja Slug-proteiinien tasoa (kuva 14 kohta B).



Kuva 14. WB –analyysin tulokset, GFP- ja Slug-solut A. Näytteet kerätty rinnakkaisista soluista miRNA -analyysin RNA:n kanssa. Latauskontrollina toimii Tubuliini-proteiini. GFP-solujen lataus oli silmämääräisesti arvioituna noin 30 % suurempi kuin Slug-solujen. B. Samat solut kuin A-kohdassa, mutta näytteet kerätty solujen valmistuksen yhteydessä lajittelun jälkeen. Latauskontrolli Actin-proteiini on silmämääräisesti arvioituna tasainen. Sekä A- että B-kohdissa työn kannalta oleelliset proteiinit E-cadheriini, Axl, Vimentini, Slug ja latauskontrollit. Vim ja vimentini tarkoittavat samaa proteiinia.

MiRNA-analyysin tulosten perusteella Slug-proteiini lisäisi ainakin mikroRNA:t miR-144, -155, -196a, -140, -21 ja -9 ekspressioita. Sen mukaan Slug-proteiini inhiboisi mikroRNA:iden miR-32, -96 ja -184 ekspressiota. Analyysi toistetaan eri aikaan

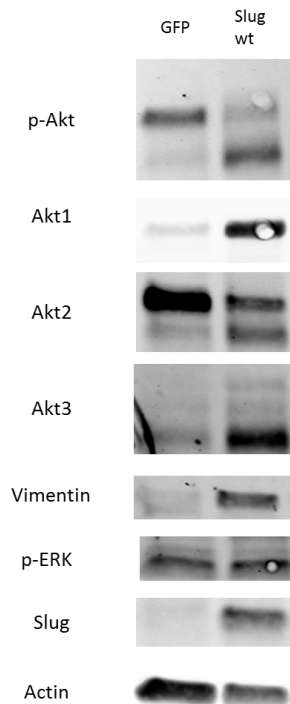
kasvatetuilla GFP- ja Slug-soluilla, jotka on lajiteltu noin viikkoa ennen analyysia muuntuneiden solujen poistamiseksi. Kuvassa 15 tulokset esitetty kuten aikaisemmin. Keltaisella pohjalla korostettuna ovat samoja osumia kuin aiemmalla kerralla.



Kuva 15. Toistettu mikroRNA -analyysi lajitelluille GFP- (Control Group) ja Slug- (Group1) soluille. Kuvan akselit edustavat suhteellisesta arvosta otettua kymmenkantaista logaritmia. Vasemmalla puolella mustien viivojen yläpuolella olevat punaiset pallot edustavat Slug-soluissa yliekspressoituja mikroRNA:ita ja vihreät aliekspressoituja. Mustat pallot kuvaavat mikroRNA:ita, joiden tasoilla ei ollut eroja GFP- ja Slug-näytteiden välillä. Keltaisella korostettuna molemmissa analyyseissä esiintyneet miRNA:t

Tulokset käsiteltiin kuten edellä ja ne on esitetty kuvassa 16.

muuttuneita soluja ennen näytteiden keräämistä. Tämä näkyy kuvassa 17 Slug-proteiinin hieman heikompana ekspressiona.



Kuva 17. Toistettu mikroRNA-analyysi lajitelluilla GFP- ja Slug-soluilla. Latauskontrollina Aktiini-proteiini.

Toistetussa miRNA-analyysissä ekspressiotasot ovat nouseet miRNA:illa miR-181a, -138, -132 ja -9. Reaktioseosta valmistuessa yksi reagensseistä loppui kesken, joten kaksi kaivoa jouduttiin jättämään tyhjäksi Slug-kuoppalevyllä. Tyhjäksi jäi yksi rinnakkainen kontrollikaivo ja miR-19a kaivo. Toistetussa analyysissä laskeneet ekspressiotasot olivat miRNA:illa miR-203, -210, -96, -135b, -378a, -200c ja -205. Kuvan 17 mukaan normaalit (GFP) solut ekspressoivat Akt2-isomuotoa enemmän kuin Slug-solut, mutta vähemmän Akt3- ja p-Akt-isomuotoja. Akt-kinaasin eri isomuodot toimivat erilaisissa rooleissa syövässä ja EMT:ssä.

MiRNA-analyysien tulosten ja tehdyn kirjallisuuskatsauksen (taulukko 7), sekä miRNA:iden ennustettujen kohteiden perusteella valittiin jatkotutkimuksiin miRNA:t 144, 155, 181a, 184, 200c ja 9. Näille tilattiin pre- ja anti-miRNA:t transfektiota ja alukkeet qPCR varten. Pre-miRNA:t mukailevat soluissa esiintyviä miRNA:ta hiljentäen mRNA:ta ja anti-miRNA:t estävät soluissa toimivien miRNA:iden toiminnan sitoutuen niihin. MiRNA:t valittiin Life Technologies yrityksen mir-Vana-tuoteperheestä, RT-

analyysia varten tilattiin Applied Biosystems'in TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit ja TaqMan MicroRNA Assays.

Taulukko 7. MikroRNA -kirjallisuuskatsaus

MikroRNA	Tehtävä	Lähde
miR-144	Estää PTEN ekspressiota pAKT, cyclin D1 tasojen nostamiseksi ja laskee E-cadheriinin ekspressiota nenäontelon syövässä.	Zhang ym. 2013
miR-155	MiRNA:n yliekspressio estää CDLK 1 ekspressiota munasarjan syöpäsoluissa	Qin ym. 2013
	Mutantti p53 lisää invaasioita rintasyöpäsoluissa miR-155 yliekspression avulla	Neilsen ym. 2013
	Diagnostista arvoa syövän havaitsemisessa	He ym. 2013; Tang ym. 2013
	Edistää verisuonten muodostumista	Kong ym. 2014
miR-184	Neuroblastoomassa miRNA:n tason nousu inhiboi tuumorin kasvua	Tivnan ym. 2010
	Ei artikkeleita rintasyöpään liittyen	
miR-181a	TGF-beeta säätelee miR-181a ekspressiota rintasyövän metastaasien muodostumiseksi	Taylor ym. 2013
miR-9	Ekspressio lisää imusolmuke metastaaseja rintasyövässä	Wang ym. 2013
	Inhiboi E-cadheriinia maksan syövässä ja lisää solujen liikkuvuutta	Tan ym. 2010

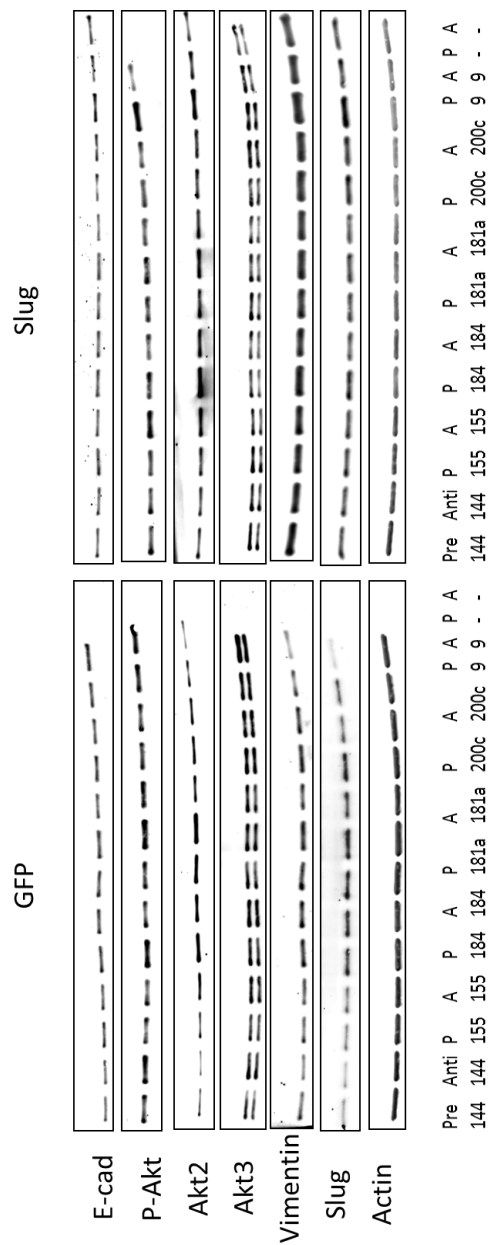
MiRNA-analyysien tulokset ovat kyseenalaistettavia, sillä solut ajautuivat nopeasti MET:tiin, mesenkymaali-epiteeli transitoon. Slug-proteiini on mukana vaikuttamassa solujen proliferaatioon, joten GFP- ja Slug-solut kasvoivat eri tahtiin ja niiden palautuminen pakastuksesta tai jakamisesta voi vaikuttaa keräämishetkellä ekspressoitaviin miRNA-tasoihin. Toisaalta molemmissa testeissä samoilla paikoilla (kuvat 12 ja 15) toistuneet miRNA:t miR-9, -140 ja -96 viittaavat siihen, että olosuhteiden erilaisuudesta huolimatta niiden tasot ovat muuttuneet samalla tavalla. Kannattavaa olisikin ollut testata molemmissa testeissä samalla tasolla toistuneita miRNA:ita

QPCR-analyysi on herkkä pienille muutoksille mitattavassa reaktiossa. Tästä syystä tehdään yksi reaktioseos, josta se jaetaan kuoppalevyn kaivoihin. Tähän voi kuitenkin vaikuttaa pipetoinnin toistettavuus, pipettien kalibrointi ja käyttäjän taidot. Reaktioseoksen loppuminen kesken vaikutti seokseen tulleiden komponenttien suhteeseen ja sitä kautta mahdollisesti myös testin tuloksiin. Lisäksi kuoppalevyillä oli

vain yksi kaivo miRNA:ta kohden. Luotettava qPCR-tulos vaatii vähintään 3 rinnakkaista kaivoa näytettä kohden. Analyysistä tehdyt kaksi itsenäistä toistoa on hyvä, sillä analyysien tulokset tulisi aina varmistaa useammin kuin kerran, jotta voidaan varmistua tulosten johtuvan tutkittavasta kohteesta muiden tekijöiden sijaan.

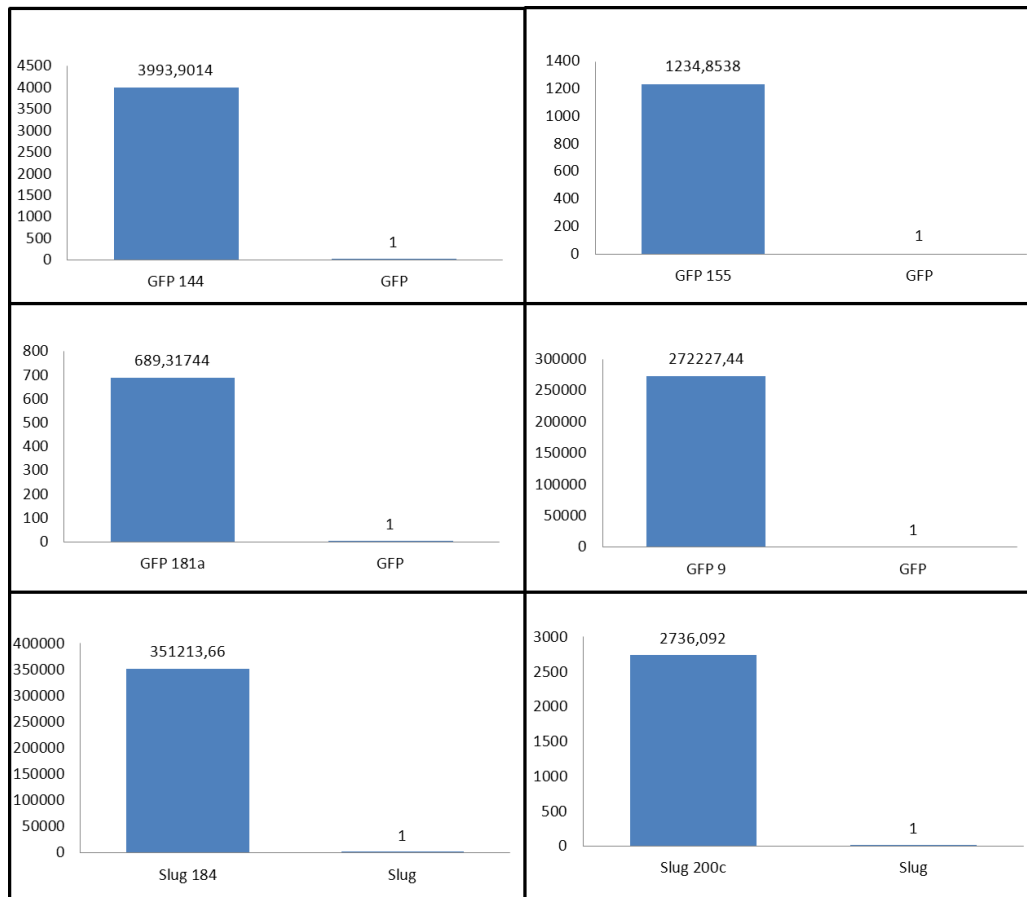
8.2 MikroRNA -transfektio

Transfektio tehtiin aluksi GFP- ja Slug-soluihin, kumpaankin solulinjaan transfektoitiin sekä pre- että anti-miRNA:t. Transfektiooliuksen annettiin vaikuttaa 3 päivää. WB-analyysin tulokset on esitetty kuvassa 18. Kuvan alapuolella miRNA:iden järjestys. GFP- ja Slug-testiivoja ei voida verrata keskenään kuvan erilaisen valotuksen vuoksi, vaan transfektoidun miRNA:n tasoa verrataan pre- tai anti-kontrolliin transfektoidun miRNA:n mukaisesti.



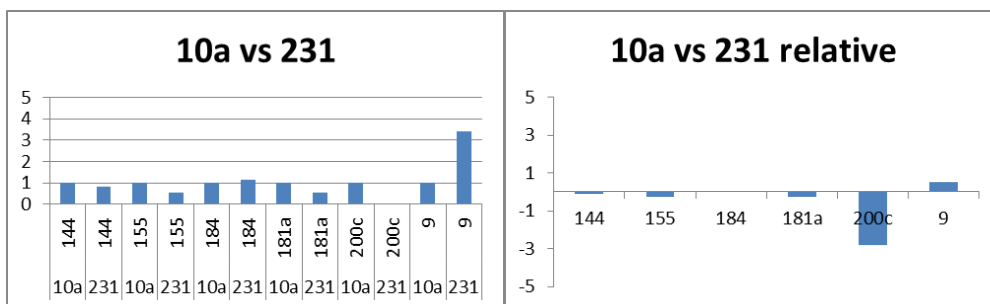
Kuva 18. WB-analyysin tulokset mikroRNA-trasfektioista kaikilla miRNA:illa GFP- ja Slug-soluissa. Aktiini-proteiini toimii latauskontrollina. Anti-kontrolli miRNA-kaivo on jäänyt tyhjäksi, eikä kohdassa näy proteiineja.

Transfektion toimivuuden varmistamiseksi transfektoiduista soluista kerättiin RNA ja näytteistä tehtiin qPCR-analyysi, jonka tulokset on esitetty kuvassa 19. Kuvassa y-akselilla on miRNA:n suhteellinen ekspressiotaso. Vasen pylväs kuvaa transfektoidun solun miRNA-tasoa ja oikea pylväs kontrollin miRNA-tasoa. Anti-miRNA-tasoa ei voida varmistaa tällä menetelmällä, koska RT-reaktioiden alukkeet ovat miRNA-spesifisiä.



Kuva 19. MikroRNA -transfektion varmistaminen GFP- ja Slug-soluista. Y-akseli kuvaa miRNA:n suhteellista ekspressiota. Tulokset on normalisoitu kontrolliin. Transfektioista vain pre-miRNA:lla tehdyt voitiin varmistaa, sillä miRNA RT PCR-analyysissä käytettävät alukkeet ovat spesifiset vain pre-miRNA:lle. Lisäksi tarkistettiin vain ne miRNA -transfektiot, joiden miRNA:n ekspressio oli päinvastainen solulinjan omaan ekspression nähden.

GFP- ja Slug-solujen muuttumisen takia transfektioita toistettiin 10a- ja 231-soluilla. 10a- ja GFP-solut ovat miltei samoja (GFP-soluissa erona vain tyhjä vektori) ja Slug- ja 231-solut ekspressoivat samoja proteiineja, joten ne voisivat siltä osalta soveltua transfektioon. Solujen soveltuvuutta miRNA -transfektioon testattiin qPCR-analyysillä, jonka tulokset on esitetty kuvassa 20.

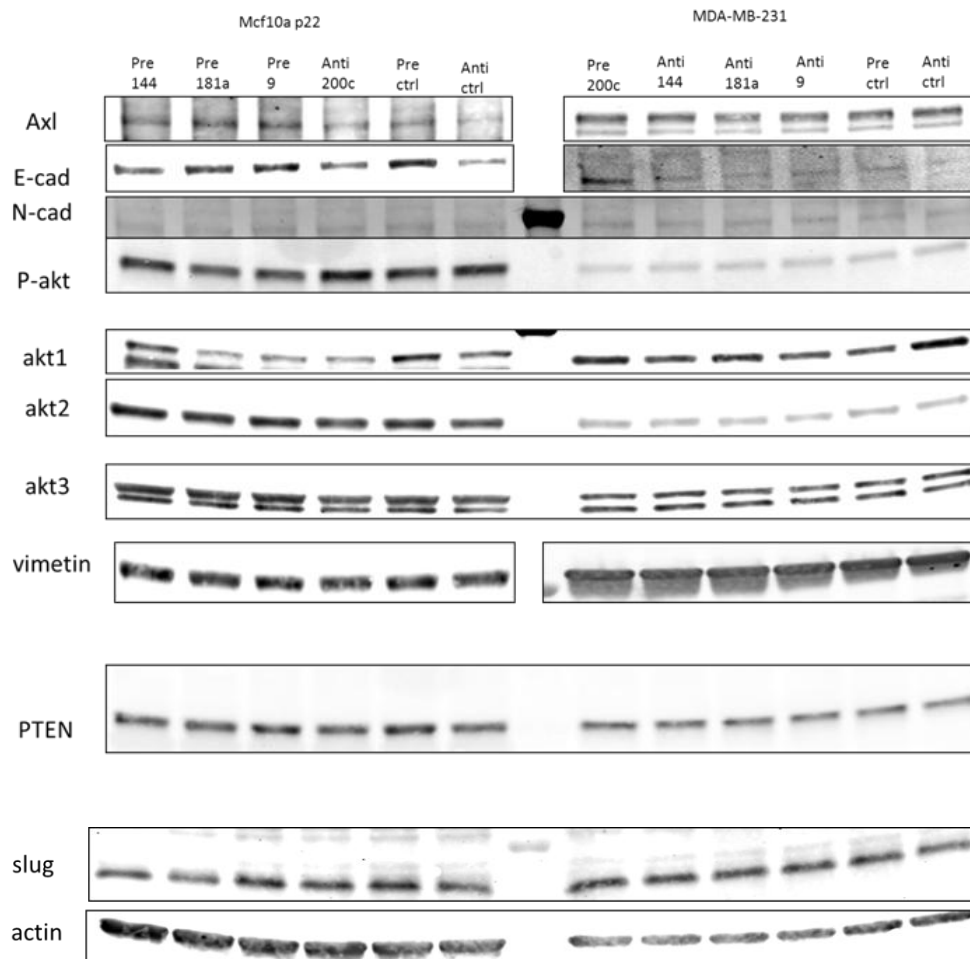


Kuva 20. 10a- ja 231-solujen soveltuvuus miRNA -transfektioon. Y-akseli on miRNA:n suhteellinen ekspressio.

Tässä vaiheessa jätettiin pois miR-155, josta löytyi jo paljon tietoa rintasyöpään liittyen ja miR-184, jonka ei noudattanut analyysin tuloksia. Vaikka mikroRNA:t miR-144 ja -181a eivät noudattaneet analyysien tuloksia, ne haluttiin muista syistä jättää tutkittavaksi.

10a- ja 231-soluihin transfektoitiin vain se miRNA, jonka ekspressio olisi päinvastainen solun ekspressiotasoihin nähden. Transfektiooliuksen annettiin vaikuttaa 3 päivää, jonka jälkeen tehtiin uusi, 2 päivää kestänyt transfektio. Solut olivat muuttaneet hieman muotoaan, mutta kontrollitransfektoidut solut olivat vastaavassa kunnossa kuin miRNA-transfektoidut. Kuvassa 21 on esitetty toisen transfektion WB-analyysin tulokset.

10a- ja 231-solujen käyttäminen transfektiossa oli sopiva vaihtoehto GFP- ja Slug-solujen sijaan, sillä 231-solut eivät menetä ekspressiotaan jakamisen seurauksena. Näitä olisi voinut käyttää myös koko työn tekemiseen, sillä 231-solut ekspressoivat Axl-Slug-, ja Vimentiini-proteiineja stabiilisti ja ne ovat 10a-solujen tavoin rinnan epiteeliperäisiä, vaikkakin karsinomasoluja.



Kuva 21. WB-analyysi mikroRNA -transfektioista 10a- ja 231-soluihin pidemmällä vaikutusajalla. Latauskontrollina Aktiini-proteiini.

Solujen transfektoiminen miRNA:illa ei muuttanut solujen fenotyyppiä tai saanut aikaan merkittäviä tai johdonmukaisia muutoksia proteiinitasoissa kummassakaan transfektiossa. Muutokset kuvissa näkyvissä tasoissa voivat siis johtua solujen kärsimisestä transfektioissa tai muista tuntemattomista tekijöistä. EMT-tekijöihin vaikuttaa lisäksi useita eri faktoreita, jolloin muut pitäisi sulkea pois halutessa tutkia tietyn tekijän aiheuttamaa muutosta. Yksittäiset miRNA:t eivät välttämättä saa aikaan haluttua muutosta soluissa, vaan ne toimivat mahdollisesti muun mekanismin tukena, jolloin monta asiaa kohdistuvat samaan aikaan proteiinin hiljentämiseen. Solujen mekanismi on myös hidas, käytetty transfektioaika riittää kyllä miRNA:n tason huimaan nostamiseen (kuva 19), mutta proteiinitasolla vastaavanlaisia muutoksia ei näy. Jos kohteena oleva proteiini on luonteeltaan stabiili, sen mRNA-tasojen hiljentäminen ei ehkä riitä koko ekspression muuttamiseen. Lyhyen ja pitkän transfektion välillä ei ollut muuta selvää eroa kuin solujen kärsiminen pidemmässä transfektiossa.

WB-tulosten perusteella anti-mir-9 näyttäisi hieman lisäävän E-cadheriini-, p-Akt-, Akt2-Vimentini- ja Slug-proteiinien ekspressioita Slug-soluissa verrattuna anti-miR-kontrolliin (kuva 18). Vastaavaa eroa ei näy GFP-soluissa, mutta toisen transfektion 10a-soluissa on samantyyppinen muutos (kuva 21). Näillä näkyy myös pieni ero Axl-tasoissa. Muilla miRNA:illa ei ole johdonmukaisia muutoksia. WB-tuloksista huomioitavaa on proteiinien tasaisesta latauksesta kertova latauskontrolli; aktiini tai tubuliini. Näiden testiivivojen pitäisi olla keskenään samankokoiset ja intensiteetiltään tasaiset, jotta muita proteiinitasoa voitaisiin verrata suoraan keskenään. Latauksen tasaisuuteen vaikuttaa sekä näytepuskurin volyyymi, johon solut lyysataan kasvatusmaljalta että WB-näytekaivoihin pipetoitu näytteen määrä. Nämä arvioidaan solujen konfluenssin ja koon mukaan – epiteelisolut kasvavat tiheämmin ja konfluenssia voi olla vaikea verrata mesenkymaalisiin. Kaivoihin pipetoitavat määrät voi myös tasata mittamalla näytteiden suhteellisen proteiinipitoisuuden ja vakioimalla sen näytteiden kesken. MiRNA-transfektioista ajatut näytteet valmistettiin tällä tavalla mahdollisimman pienen muutosten havainnoimiseksi.

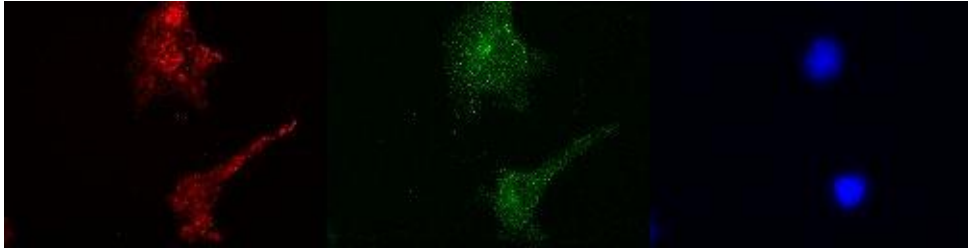
8.3 Immunofluoresenssi

Immunofluoresenssissä käytettiin samoja miRNA-transfektioituja soluja kuin WB-analyysiin. Soluista kuvattiin kaksi eri proteiinia näytettä kohden, E-cadheriini ja N-cadheriini yhdessä ja Vimentini ja Axl yhdessä. Solut olivat noin 90 % konfluentteja näytteiden valmistushetkellä. Näytteitä kuvatessa luotiin ensin yleiskuva kuvattavien kohteiden näkyvyydestä näytteessä. MiRNA:illa transfektioitujen solujen ja kontrollivektorilla transfektioitujen solujen välillä ei ollut huomattavaa eroa. Tämän jälkeen tutkittiin tarkemmin löytykö solun koon, muodon, konfluenssin, kuvattavan proteiinin muodolla tai ilmentymisellä yhteyttä toistensa kanssa.

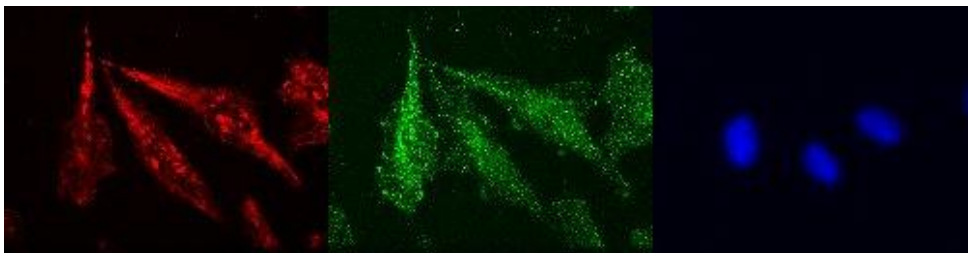
10a-solut ekspressoivat E-cadheriini-proteiinia solujen ympärillä toisin kuin 231-solut. Niissä puolestaan oli vimentiniä, jota ei Mcf10a soluissa ollut. N-cadheriinia ei näkynyt kummassakaan. Axl-reseptoria esiintyi enemmän 231-soluissa.

Huomioitavaa 231-soluissa oli Vimentini-verkoston erilaisuus riippuen solun muodosta. Pyöreämissä ja moniulottuvaisemmissa soluissa verkosto oli rihmastomainen (kuva 22) ja pitkissä tikkumaisissa soluissa verkosto oli yksinkertaisempi (kuva 23). Joissakin soluissa verkostossa oli selkeitä kertymiä, jotka näkyvät pisteinä verkossa. E-cadheriini- tai N-cadheriini-proteiineja ei soluissa näkynyt. N-cadheriini-proteiinin vasta-

aine ei todennäköisemmin toiminut, sillä solujen olisi pitänyt ekspressoida sitä. Axl-reseptoria esiintyi soluissa satunnaisen tasaisesti.

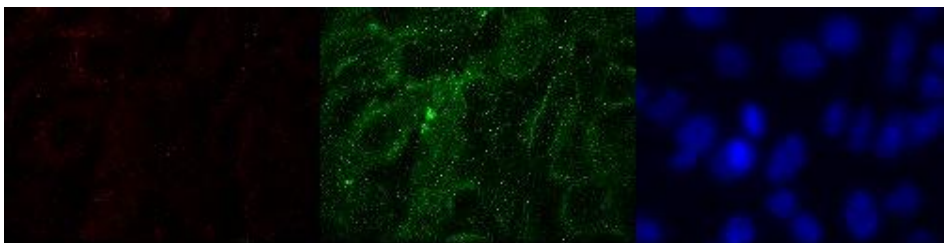


Kuva 22. 231-solujen anti-ctrl transfektio, rihmastomainen verkosto. Punaisella värjättyä Vimentiini, vihreällä Axl ja sininen on DAPI, joka värjää tumat.



Kuva 23. 231-solujen miR-9 transfektio, pitkänomaiset säikeet. Punaisella värjättyä Vimentiini, vihreällä Axl ja sininen on DAPI, joka värjää tumat.

Huomioitavaa 10a-soluista oli Vimentiini-filamenttien esiintyminen liikkuvien solujen liikkumissuuntaa kohti (kuva 25). Sama ilmiö on nähty myös konfluenssiin solumattoon tehdyn ”haavan” reunalla. (Vuoriluoto 2010.) E-cadheriini-proteiinin ekspressio ympäröi tumaa ja solureunoja. Sitä ei kuitenkaan ollut kaikkialla, vaikka solut olisivat olleet tiiviisti. Todennäköisesti ne ovat muodostaneet toisen tyyppisiä sidoksia keskenään. Ekspressio ei ollut yhtä voimakas kuin WB:ssä nähtävä ero solulinjojen välillä.



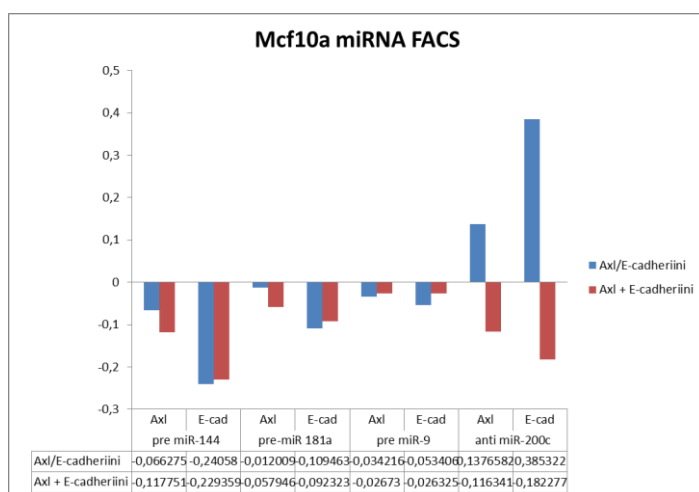
Kuva 24. 10a-solujen miR-9 transfektio. E-cadheriinia on solujen reunoilla. Punaisella kuvassa N-cadheriin, vihreällä E-cadheriini ja sinisellä DAPI, joka värjää tumat.



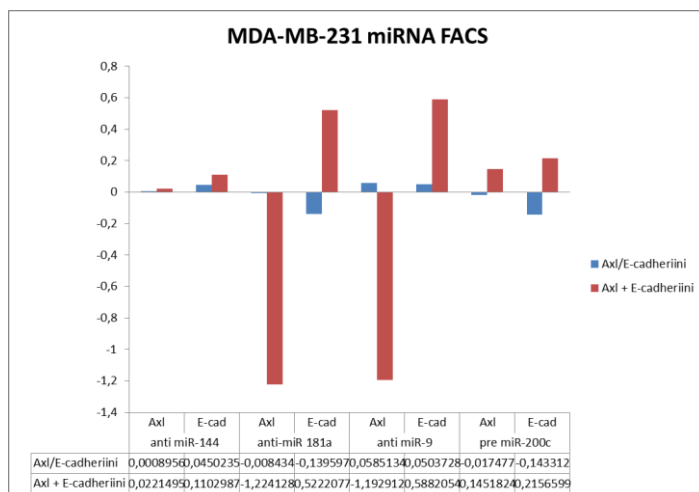
Kuva 25. 10a-solujen miR-9 transfektio. Vimentiiniä pieninä sykerömäisinä verkoistoina soluissa, jotka liikkumassa vapaata tilaa kohti. Punaisella kuvassa Vimentiini, vihreällä Axl ja sinisellä DAPI, joka värjää tumat.

8.4 Virtaussytometria, FACS

FACS -analyysiin käytettiin samoja miRNA-transfektoituja soluja kuin immunofluorenssiin ja WB -analyysiin. Näytteistä mitattiin erikseen Axl- ja E-cadheriini-proteiinit sekä yhdessä että erikseen. Kuvassa 22 on esitetty 10a-solujen ekspressiotasojen tulokset. Näytteet on normalisoitu kontrollitransfektion suhteen niin, että kontrollin arvo on yksi. Saaduista luvuista otettiin kymmenkantainen logaritmi, jolloin saatiin proteiinin suhteellinen ekspressio näytteessä kontrolliin nähden.



Kuva 26. Mcf10a miRNA -transfektoidut solut. FACS-analyysi miRNA:den vaikutuksesta Axl- ja E-cadheriini-proteiinien tasoihin. Tulokset on normalisoitu kontrolli-miRNA:ta vastaan. Siniset pylväät kuvaavat sitä kun soluista värjättiin vain toista proteiinia ja punaiset pylväät kun molemmat proteiinit mitattiin samasta näytteestä.



Kuva 27. MDA-MB-231 miRNA- transfektoidut solut. FACS-analyysi miRNA:den vaikutuksesta Axl- ja E-cadheriini-proteiinien tasoihin. Tulokset on normalisoitu kontrolli-miRNA:ta vastaan. Siniset pylväät kuvaavat sitä kun soluista värjättiin vain toista proteiinia ja punaiset pylväät kun molemmat proteiinit mitattiin samasta näytteestä.

FACS:n tuloksista voidaan nähdä, että ainakin miR-9 johdonmukaisesti inhiboi E-cadheriini-proteiinin ekspressiota Mcf10a pre-miR-9-transfektiossa ja lisää sitä MDA-MB-231 anti-miR-9- transfektiossa. Tulokset on esitetty suhteellisena ekspressiona kontrolli- transfektioituja soluja vastaan. Kuvissa 26 ja 28 on esitetty sinisin pylväin näytteistä yksittäin värjätty Axl- ja E-cadheriini-proteiinit ja punaisin pylväin ne tasot, kun samasta näytteestä on värjätty molemmat proteiinit. Näiden pitäisi siis olla sama asia mitattuna kahteen kertaan, mutta tasot vaihtelevat ja toisissa menevät jopa päinvastaisiin suuntiin. Analyysissa värjättiin vain solun pinnan proteiineja, sillä soluja ei hajoteta vaan signaali mitataan niiden pinnalta.

Kaikenkaikkiaan tulosten perusteella voidaan sanoa, että tiettyjä Slug-proteiinin vaikutuksesta ekspressiotasoltaan muuttuneita miRNA:ita löydettiin, mutta tarkemmin tutkittavista vain miR-9 näytti vähäisiä merkkejä mahdollisesta vaikutuksesta ekspressiotasoihin. Yhdelläkään valituista MiRNA:ista ei ollut vaikutusta solujen fenotyyppiin ja vaikutuksesta EMT:n merkkiaineisiin oli vain vähäisiä merkkejä.

Stabiilimpien solujen käyttäminen miRNA -analyysihin ja transfektioihin olisi voinut vaikuttaa tuloksiin. MiRNA -tasojen havainnointiin käytetty menetelmä on herkkä vaihteluille, erilaisten menetelmien arviointi ja vertailu ennen käytettävän analyysimenetelmän valintaa olisi ollut kannattavaa. Analyysien useampi toistaminen ja rinnakkaisten näytteiden tekeminen olisi lisännyt tulosten luotettavuutta. Menetelmien hyvä tuntemus ja osaaminen olisivat lisänneet luottamusta tulosten oikeellisuuteen.

Voidaan kuitenkin todeta miR-9 eri analyyseissä toistuvien samankaltaisten tulosten perusteella, että tuloksiin voidaan pääsääntöisesti luottaa huolimatta esiintyneistä epävarmuuksista.

9 Yhteenveto

Työssä tutkittiin Slug-proteiinin spesifisesti aikaansaamia muutoksia rinnan epiteelisolujen miRNA:iden ilmentymisessä ja niiden vaikutuksia epiteeli-mesenkymaali transitoon, solujen fenotyyppiin sekä niiden ekspressoimiin EMT:n merkkiaineisiin ja Axl-tyrosiinikinaasireseptoriin.

Työssä vertailtiin Mcf10a rinnan epiteelisoluja ja Slug-proteiinin aikaansaaman EMT:n läpikäyneitä Mcf10a-soluja. Muutoksia tutkittiin PCR- pohjaisella miRNA- analyysilla. Tulosten perusteella valittiin kuusi miRNA:ta (miR-144, -155, -184, -181a, -200c ja -9) transfektoitavaksi soluihin ja niiden aikaansaamia muutoksia havainnoitiin vertaamalla solujen proteiinitasoja WB -analyysillä, immunofluoresenssillä ja virtausytometrialla.

Tulosten perusteella voidaan sanoa, ettei mikään kuudesta miRNA:sta pystynyt muuttamaan solujen fenotyyppiä. Tämän lisäksi valituista miRNA:ista vain yksi (miR-9) antoi viitteitä vaikutuksesta EMT:oon. Se sai odotusten mukaisesti soluissa aikaan vähäistä epiteelisolujen merkkiaineiden (E-cadheriini) vähentymistä ja mesenkymaalisten (Slug ja Vimentiini) lisääntymistä sekä WB- että FACS- menetelmillä. Työhön käytettävän ajan rajallisuuden takia analyysijä ei ehditty toistaa tulosten varmistamiseksi. Tulosten vaihtelevuudesta huolimatta voidaan menetelmien suorituksen ja luotettavuuden arvioinnin perusteella tuloksiin pääsääntöisesti luottaa.

Esitettyihin tavoitteisiin kyettiin löytämään vastaukset, vaikka tulokset eivät vastanneetkaan odotuksia yhden miRNA:n selkeä toimimisesta osana Slug-proteiinin aikaansamaa EMT:ta. Voidaan kuitenkin olla tyytyväisiä siihen, että yksi miRNA sai aikaan pieniä muutoksia, sillä harvoin vaikutukset ovat täysin selkeitä.

Lähteet

Aaltonen Hannu 2012. Mikro-RNA:n perustutkimuksesta vuosikymmenessä uudeksi lääkkeeksi hepatiittiin. Verkkójulkaisu.

<<http://www.utu.fi/fi/Ajankohtaista/Uutiset/Sivut/mikro-rnan-perustutkimuksesta-vuosikymmenessa-uudeksi-laakkeeksi-hepatiittiin.aspx>> Viitattu 24.4.2014

Aiheuttajat 2010. Verkkodokumentti. Syöpäjärjestöt. Tietoa Syövästä.

<<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopa/aiheuttajat/>>. Viitattu 24.6.13

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2008, The Molecular Biology of The Cell, Fifth Edition, Reference Edition, USA, Garland Science, ISBN 978-0-8153-4111-6

Asiedu, Beauchamp-Perez, Ingle, Behrens, Radisky and Knutson. 2013. Axl induces epithelial-to-mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene*(2013) 1-9

Botlagunta M., Winnard P., and Ram V. Neoplastic transformation of breast epithelial cells by genotoxic stress. Springer Link Verkkodokumentti.

<http://link.springer.com/article/10.1186%2F1471-2407-10-343/fulltext.html#Fig1_2142> Viitattu 29.4.2014

Cavenee, W. K., White, R. L. 1995. Kuva. *Scientific American* ,1995, March, pp. 72-79

Garzon R, Marcucci G and Croce CM. 2010. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews* 9: 775-789

Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T et al. 2010. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:1124-1129

He J, Zhang F, Wu Y, Zhang W, Zhu X, Zhao Y, Zhang W and Zhao Y. 2013. Prognostic role of microRNA-155 in various carcinomas: results from a meta-analysis. *Dis Markers* 2013;34(6):379-86.

Hietanen Päivi. 2012. Väestö vanhenee ja liho – syöpä yleistyy kaikkialla.

Verkkodokumentti. < <http://www.potilaanlaakarilehti.fi/laakarin-aani/vaesto-vanhenee-ja-lihoo-ndash-syopa-yleistyy-kaikkialla/>> Viitattu 24.4.2014

Ivaska Johanna, Hanna-Mari Pallari, Jonna Nevo ja John E. Eriksson. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration and signaling. *Experimental cell research* 313 (2007) 2050-2062.

Ivaska Johanna. 2011. Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small GTPases* Jan 2(1):51-53

Jan-Bart M. Kostra, Collins A Karikari, Georg Feldmann, Savita Bisht, Pamela Leal Rojas, G. Johan A. Offerhaus, Hector Alvarez and Anirban Maitra. 2009. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biology and Therapy* Volume 8 Issue 7

Kalluri Raghu and Weimberg Robert. 2009. The basics of the epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* 119:1420-1428 (2009)

Karihtala Peeter, Auvinen Päivi, Kauppila Saila, Haapasaari Kirsi-Maria, Jukkola-Vuorinen Arja ja Soini Ylermi. 2013. Vimentin, Zeb1, and Sip1 are up-regulated in triple-negative and basal-like breast cancers: association with an aggressive tumour phenotype. *Breast cancer Res Treat* (2013) 138:81-90

Kent OA and Mendell JT. 2006. A Small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 25: 6188-6196

Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu CX, Permeth-Wey J, Lancaster JM, Coppola D, Sellers TA, Djeu JY and Cheng JQ. 2014 Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2014 Feb 6;33(6):679-89.

Korshunov Vyacheslav A. 2012. Axl-dependent signaling: a clinical update. *Clinical Science* 122: 361-368

Kuolemansyyt. 2012. Suomen virallinen tilasto (SVT): Kuolemansyyt. Verkkojulkaisu. Kuolemansyyt vuonna 2012
<http://www.stat.fi/til/ksyyt/2012/ksyyt_2012_2013-12-30_kat_001_fi.html>
ISSN=1799-5051. 2012, 1. Helsinki: Tilastokeskus Viitattu: 24.4.2014

Lamouille Samy, Subramanyam Deepa, Belloch Robert and Derynck Rik. 2013. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*(2013) 25:1-8.

Lauren Averett Byers, Lixia Diao, Jing Wang, Pierre Saintigny, Luc Girard, Michael Peyton, Li Shen, Youhong Dan ym. 2012. An Epithelial–Mesenchymal Transition Gene Signature Predicts Resistance to EGFR and PI3K Inhibitors and Identifies Axl as a Therapeutic Target for Overcoming EGFR Inhibitor Resistance. *Clin Cancer Res* January 1, 2013 19; 279.

Linger Rachel, Keating Amy, Graham Douglas. 2008. TAM Receptor Tyrosine Kinases: Biologic Functions, Signaling, and Potential Therapeutic Targeting in Human Cancer. *Adv. Cancer Res.* 100: 35-83

Masashi Ishikawa, MD, Makoto Sonobe, MD, PhD, Ei Nakayama, MD, Masashi Kobayashi, MD, Ryutaro Kikuchi, MD, Jiro Kitamura, MD, Naoto Imamura, MD and Hiroshi Date, MD, PhD. 2013. Higher expression of receptor tyrosine kinase Axl, and differential expression of its ligand Gas6, predict poor survival in lung cancer adenocarcinoma patients. *Annals of Surgical Oncology* December 2013, Volume 20, Issue 3 supplement, pp 467-476.

- MicroRNA Deep Sequencing. 2013. <<http://pgfe.umassmed.edu/ou/archives/2888>> Viitattu 2.7.13
- Migdall Justine and Graham Douglas K. 2010. AXL (AXL receptor tyrosine kinase). Atlas of Genet Cytogenetn Oncol Haematol. February 2010. Verkkodokumentti. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_AXL.html> Viitattu 24.4.2014.
- Mikä on syöpä. 2010. Verkkodokumentti. Syöpäjärjestöt. Tietoa syövästä. <<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopa/>>. Viitattu 27.3.13
- miScript miRNA PCR Array Data Analysis, Copyright © 2000-2012 SABiosciences, a QIAGEN company. All rights reserved. Verko-ohjelma. <<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>> Viitattu 29.4.2014
- Mudduluru G, Ceppi P, Kumarswamy R, Scagliotti GV, Papotti M and Allgayer H. 2011. Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene* (2011) 30, 2888-2899.
- Neilsen PM, Noll JE, Mattiske S, Bracken CP, Gregory PA, , Schulz RB, Lim SP, Kumar R, Suetani RJ, Goodall GJ, Callen DF. 2013. Mutant p53 drives invasion in breast tumors through up-regulation of miR-155. *Oncogene* 2013 Jun 13;32(24):2992-3000
- Nordcan, 2011, Tilastollisten termien selityksiä, Association of the Nordic Cancer Registries. Verkkodokumentti. <<http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/glossary.htm>> Viitattu 3.7.2013
- Peinado Héctor, Olmeda David, Cano Amparo. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature reviews Cancer* 7, 415-428
- Philip A Gregory, Cameron P. Bracken, AndrewG. Bert and Gregory J. Goodall. 2008. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* (2008) Vol 7 Issue 20, 3112-3118.
- Pukkala E, Patama T. 2010. Syövän ajallinen ja alueellinen vaihtelu kartta-animaatioina Suomessa 1953-2008. Suomen Syöpärekisteri. Verkkodokumentti. <<http://astra.cancer.fi/cancermaps/suomi5308/fi/>>. Viitattu 28.3.13
- Rintasyöpä 2013. Verkkodokumentti. Syöpäjärjestöt. Tietoa Syövästä. <<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/rintasyopa/>>. Viitattu 3.7.2013
- Rintasyövän hoito. 2008. Verkkodokumentti. <<http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/rintasyopa/rintasyovan-hoito/>> Viitattu 22.4.2014
- Rivard, Nathalie. 2009. Phosphatidylinositol 3-kinase: a key regulator in adherens junction formation and function. Verkkodokumentti. <<http://www.frontbiosci.org/2009/v14/af/3259/figures.htm>>. Viitattu 17.4.13

SEER Stat Fact Sheets: Breast Cancer. 2011. Verkkodokumentti.
<<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>> Viitattu 3.7.2013

Snai2. 2013 Genetics Home Reference. Verkkodokumentti.
<<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SNAI2>>. Viitattu 25.4.2014

SNAI2. 2014. snail family zinc finger 2 [Homo sapiens (human)]. NCBI.
Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6591>> Viitattu 13.4.2014.

Suomen Syöpärekisteri, 2013, Verkkodokumentti Yleisimmät syöpäkuolemansyyt vuonna 2011 naiset, <<http://stats.cancerregistry.fi/stats/fin/vfin0021m0.html>>, 18.3.2013. Viitattu 16.4.2013

Syöpä. 2006. Verkkodokumentti Solunetti.
<<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/syopa/>>. Viitattu 21.2.13

Syövän aiheuttajat. Verkkodokumentti. 2006. Solunetti,
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/syovan_aiheuttajat/2/>. Viitattu 27.3.13

Tan HX, Wang Q, Chen Lz, Huang XH, Chen JS, Fu XH, Cao LQ, Chen XL, Li W and Zhang LJ. 2010. Med Oncol. 2010 Sep;27(3):654-60

Tang Dale D. 2008. Intermediate filaments in smooth muscle. Am J Physiol Cell Physiol. Apr 2008; 294(4): C869–C878

Tang D, Shen Y, Wang M, Yang R, Wang Z, Sui A, Jiao W, Wang Y. 2013. Identification of plasma microRNAs as novel noninvasive biomarkers for early detection of lung cancer. Eur J. Cancer Prev. 2013 Nov;22(6):540-8

Taylor MA, Sossey-Alaoui K, Thompson CL, Danielpour D and Schiemann WP. 2013. TGF-beeta upregulates miR-181a expression to promote breast cancer metastasis. J Clin Invest 2013 Jan 2;123(1):150-63

Thiery Jean Paul. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature Reviews Cancer 2. 442-454.

Tivnan A, Foley NH, Tracey L, Davidoff AM and Stallings RL. 2010 MicroRNA-184-mediated inhibition of tumour growth in an orthotopic murine model neuroblastoma. Anticancer 2010 Nov;30(11):4391-5.

Types of breast cancer. 2013. Verkkodokumentti.
<<http://www.breastcancer.org/symptoms/types>> Viitattu 4.7.2013

Uusien tapausten lukumäärät, naiset. Finnish Cancer Registry - Institute for Statistical and Epidemiological Cancer Research: Cancer Incidence in Finland 2006 and 2007. Cancer Statistics of the National Institute for Health and Welfare (THL). Cancer Society of Finland Publication No. 76. Helsinki 2009. Verkkodoku-

mentti.<<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/grafiikkaa-syovanyleisyystesta/tapausmaarat-naiset/>>. Viitattu 24.6.13

Wang J, Zhao H, Tang D, Wu J, Yao G and Zhang Q. 2013. Overexpressions of MicroRNA-9 and MicroRNA-200c in Human Breast Cancers Are Associated with Lymph Node Metastasis. *Cancer Biother Radiopharm* 2013 Apr 25.

Wax Arnold. 2012. Types of Breast Cancer: ER Positive, HER2 Positive, and Triple Negative. Verkkodokumentti. < <http://www.webmd.com/breast-cancer/breast-cancer-types-er-positive-her2-positive>> WebMD, LLC. June 26 2012.

What is cancer. 2013. Verkkodokumentti National Cancer Institute, <<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>. Viitattu 27.3.13

Wheelock, Margaret J., Shintani, Yasushi, Maeda, Masato, Fukumoto, Yuri and Johnson, Keith R. 2008. Cadherin switching. *J Cell Sci* 121: 727-735

Vuoriluoto K., 2010, Anchor or accelerate – a study on cancer cell adhesion and motility. Väitöskirja. ISSN 0355-9483

Välimuotoiset filamentit. 2006. Solunetti. Verkkodokumentti. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/valikokoiset_filamentit/2/> Viitattu 25.4.2014

Qin W, Ren Q, Liu T, Huang Y, Wang J. 2013. MicroRNA-155 is a novel suppressor of ovarian cancer-initiating cells that targets CLDN1. *FEBS* 2013 May 2;587(9):1434-9

Zhang Ly, Ho-Fun Lee V, Wong AM, Kwong DL, Zhu YH, Dong SS, Kong KL, Chen J, Tsao SW, Guan XY, and Fu L. 2013. MicroRNA-144 promotes cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through repression of PTEN. *Carcinogenesis* 2013 February 34(2): 454-63