

Jenni Niinimäki ja Sari Seppä

# Eturauhassyöpä ja seriiniproteaasi trypsiini 2

## RNAi-menetelmän optimointi trypsiini 2 -proteaasia koodaavan PRSS2-geenin vaimentamiseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko (AMK)

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

22.01.2015

Tekijä(t) Otsikko	Jenni Niinimäki ja Sari Seppä Eturauhassyöpä ja seriiniproteaasi trypsiini 2 RNAi-menetelmän optimointi trypsiini 2 -proteasia koodaavan PRSS2-geenin vaimentamiseen
Sivumäärä Aika	44 sivua + 5 liitettä 22.1.2015
Tutkinto	Bioanalyttikko
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	FT, vanhempi tutkija Kati Räsänen Lehtori Hannele Pihlaja
<p>Opinnäytetyö tehtiin Hannu Koistisen tutkimusryhmässä, Kliinisen kemian laitoksella, Haartman-instituutissa, jossa työtä ohjasi vanhempana tutkijana ryhmässä toimiva Kati Räsänen.</p> <p>Opinnäytetyössä RNA-interferenssi (RNAi) -menetelmälle pyrittiin löytämään optimaaliset olosuhteet trypsiini 2 -proteasia koodaavan PRSS2-geenialueen ekspression vaimentamiseksi kolmessa eri eturauhassyöpäsolulinjassa. RNAi:n avulla voidaan vaimentaa tietyn geenin ilmeneminen eliön ilmiössä.</p> <p>Eturauhassyöpä, jonka hoidon kehittämiseen opinnäytetyössä keskitytään, on useiden vuosien ajan ollut suomalaisten miesten yleisin syöpäsairaus. Proteaasit, joita työssä tarkastellaan, tuhoavat solujen kalvoja ja aiheuttavat tuhoa ympäröiviin kudoksiin raivaten tilaa lisääntyvälle syöpäsolukolle. Eturauhanen tuottaa useita eri proteaaseja, joilla tiedetään olevan osuutta syövän kehittämisessä ja joiden ilmentyminen vaihtelee eturauhassyövän eri kehitysasteissa. Trypsiineillä on todettu olevan yhteys useisiin eri syöpätyyppeihin, joten niiden tutkiminen on perusteltua myös eturauhassyövän yhteydessä.</p> <p>Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa syöpäsolulinjat PC-3, PC-3M ja ALVA-31 viljeltiin kuusikuoppalevyille, jossa niille suoritettiin siRNA-transfektio kolmella eri PRSS2-geenialueen oligonukleotidisekvenssillä. Transfektion jälkeen soluista eristettiin niiden RNA:t, jotka käännettiin käänteiskopioijaentsyymien avulla komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). cDNA-synteesin jälkeen haluttuja geenituotteita monistettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä (qRT-PCR). qRT-PCR:ssä käytettiin kolmen eri geenialueen (PRSS1, PRSS2, PRSS3) lisäksi GAPDH ja HPRT1 -referenssigeenejä tuloksen normalisointiin.</p> <p>RNAi-menetelmän optimoinnin lisäksi opinnäytetyö sisältää tutkimukseen käytettyjen eturauhassyöpäsolulinjojen karakterisointia, kasvattamalla niitä hiiressä kasvavasta Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarkoomasta uutetulle keinotekoiselle soluväliaineelle, matrigeelille. Syöpäsolulinjojen solujen migraatiota ja invaasiota seurattiin vuorokauden välein.</p>	
Avainsanat	Eturauhassyöpä, proteaasit, PSA, trypsiini, RNA-interferenssi, RNAi, siRNA, transfektio, qRT-PCR, 3D soluviljely, matrigieli

Author(s) Title	Jenni Niinimäki and Sari Seppä The role of serine protease trypsin 2 in prostate cancer Optimization of RNAi-based PRSS2 knockdown
Number of Pages Date	44 pages + 5 appendices 22 January 2015
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Kati Räsänen, Ph.D, Senior Scientist Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>This thesis was carried out for Hannu Koistinen's research group, Department of Clinical Chemistry, Haartman Institute, where the work was directed by senior research scientist Kati Räsänen.</p> <p>The purpose of this thesis was to optimize the conditions of RNA interference (RNAi) method for silencing expression of trypsin-2 protease coding PRSS2 gene sequence in three different prostate cancer cell lines. The overall aim of the RNAi-induced PRSS2 gene silencing was to suppress the migratory phenotype of the prostate cancer cells.</p> <p>Prostate cancer, whereby the development of treatment this thesis was focused on, has for many years been the most common type of cancer among Finnish men. Proteases, which are focused in this work, destroy cell membranes and cause the destruction of the surrounding tissues. The prostate gland produces several different proteases, which are known to play a role in the development of cancer and which expression varies at different developmental stages. Deregulated trypsin expression has been linked to a number of different types of cancer, including prostate cancer.</p> <p>In the experimental part of this study the cancer cell lines PC-3, PC-3M and ALVA-31 were cultured in 6-well plates. Cells were allowed to attach overnight, after which the siRNA transfection was performed using three different PRSS2 oligonucleotide sequences. After transfection, RNA was isolated and then translated by reverse transcriptase (RT) to complementary DNA (cDNA). After the cDNA synthesis, the desired gene products were amplified by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The relative expression of the following genes was analyzed by qRT-PCR: PRSS1, PRSS2 and PRSS3. Housekeeping genes HPRT1 and GAPDH were used to normalize the results.</p> <p>In addition of the optimization of the RNAi-method, this thesis includes morphological characterization of the used prostate cancer cell lines. Cells were cultured in three-dimensional Matrigel, which is extracted from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarcoma grown in mouse. It is artificial but emulates natural extracellular matrix. Cell migration and invasion was monitored daily during the growth in the Matrigel.</p>	
Keywords	Prostate cancer, proteases, PSA, trypsin, RNA-interference, RNAi, siRNA, transfection, qRT-PCR, 3D culture, Matrigel

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Eturauhassyöpä	2
2.1	Syöpäsairauksista yleisesti	3
2.2	Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu ja eturauhassyöpä	4
2.3	Eturauhassyövän proteaasit	5
2.3.1	Prostata spesifinen antigeeni	6
2.3.2	Trypsiinit	7
3	RNA-interferenssi solubiologiassa ja syöpätutkimuksessa	9
3.1	RNA-interferenssi ilmiönä	9
3.2	RNA-interferenssin löytyminen	10
3.3	RNA-interferenssi mekanismin hyödyntäminen syöpätutkimuksessa	11
4	Tutkimuksen lähtökohdat	12
4.1	Työn tarkoitus ja työelämäyhteys	13
4.2	Tutkimusasetelma	14
5	Menetelmäperiaatteet	15
5.1	Soluviljely	15
5.2	siRNA transfektio	15
5.3	RNA:n eristys ja puhdistus	16
5.4	RNA:n puhtauden ja pitoisuuden arviointi	17
5.5	RNA:n kääntäminen komplementaariseksi DNA:ksi	17
5.6	Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR	18
6	Työn toteutus	19
6.1	PRSS2-geenialueen ekspression vaimentaminen RNAi-menetelmällä	21
6.2	3D-kasvatus matrigeelille	25
7	Tulokset	26
7.1	Kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR tuloksen määrittäminen	26
7.2	Tulokset kuvaajien avulla havainnollistettuna	27
7.3	Tulosten ja niiden luotettavuuden arviointi	33
7.4	3D-kasvatuksen tulokset	36

8	Pohdinta	40
	Lähteet	41
	Liitteet	
	Liite 1. Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent -työohje	
	Liite 2. NucleoSpin® RNA isolation Kit -tuotepakkauksen työohje	
	Liite 3. SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit -tuotepakkauksen työohje	
	Liite 4. SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit -tuotepakkauksen työohje	
	Liite 5. siPRSS2-oligonukleotidisekvenssien samankaltaisuushaun tulokset	

## 1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Hannu Koistisen tutkimusryhmässä, Kliinisen kemian laitoksella, Haartman-instituutissa ja se on osa suurempaa tutkimuskokonaisuutta. Tutkimuksessa ryhmän päämääränä on saada tuloksia, joiden pohjalta voitaisiin tulevaisuudessa kehittää uusia lääkeaineita ja hoidollisia menetelmiä eturauhassyövän hoitoon. Opinnäytetyön aiheena toimiva tutkimuksen osa sijoittui suuremman tutkimuksen kontekstissa vaiheeseen, jossa RNA-interferenssi (RNAi) -menetelmälle pyrittiin löytämään optimaaliset olosuhteet trypsiini 2 -proteaasia koodaavan PRSS2-geenialueen ekspression vaimentamiseksi. Valmiin koeasetelman ja lähtökohdan tutkimukselle suunnitteli vanhempana tutkijana Koistisen ryhmässä toimiva Kati Räsänen.

RNA-interferenssi-ilmiö, jota opinnäytetyössä hyödynnetään, on vielä suhteellisen nuori tutkimuslöydös ja nopeasti etenevässä tutkimustyössä se nähdään potentiaalisena menetelmänä tulevaisuuden syöpähoidoissa. Opinnäytetyössä RNAi:n avulla pyrittiin estämään trypsiini 2 -proteaasin syntymistä ja suuremmissa mittakaavassa sitä kautta ehkäisemään syövän kehittymistä ja inhiboimaan syöpäsolujen leviämistä.

Eturauhassyöpä, jonka hoidon kehittämiseen opinnäytetyö kytkeytyy, on jo useiden vuosien ajan ollut suomalaisten miesten yleisin syöpäsairaus ja sitä esiintyy keskimääräisesti yli kymmenen prosenttia enemmän kuin mitään toista syöpätyyppiä. Proteaasit, joita työssä tarkastellaan, tuhoavat solujen kalvoja ja aiheuttavat tuhoa ympäröiviin kudoksiin raivaten tilaa jatkuvasti lisääntyvälle syöpäsolukolle. Eturauhanen tuottaa useita eri proteaaseja, joilla tiedetään olevan osuutta syövän kehittämisessä ja joiden ilmentyminen vaihtelee eturauhassyövän eri kehitysasteissa. Trypsiineillä on todettu olevan yhteys useisiin eri syöpätyyppeihin, joten niiden tutkiminen on varsin perusteltua myös eturauhassyövän yhteydessä. Trypsiini on haiman erittämä ruoansulatusentsyymi ja sen esiastetta trypsinogeeniä esiintyy siemennesteessä sekä miehen lisääntymiselimistön muissa kudoksissa. Lisäksi sitä esiintyy eturauhassyöpäkudoksessa. (Paju – Bjartell – Zhang – Nordling – Borgström ym 2000; Lippolis – Stenman – Bjartell 2013.)

Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa syöpäsolulinjat PC-3, PC-3M ja ALVA-31 viljeltiin kuusikuoppalevyille, jossa niille kiinnittymisen jälkeen suoritettiin siRNA (small interfering RNA) -transfektio kolmella eri PRSS2-geenialueen oligonukleotidisekvenssillä.

Transfektion jälkeen soluista eristettiin niiden RNA:t, jotka käännettiin käänteiskopioija-entsyymien avulla komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). cDNA-synteesin jälkeen haluttuja geenituotteita monistettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä (qRT-PCR) tuloksen saattamiseksi määrälliseen muotoon. qRT-PCR:ssä käytettiin kolmen eri geenialueen (PRSS1, PRSS2, PRSS3) lisäksi GAPDH ja HPRT1 -referenssigeenejä tuloksen normalisointiin. Tulokset taulukoitiin luettavaan muotoon Excel-tilukkolaskentaohjelmalla.

RNAi-menetelmän optimoinnin lisäksi opinnäytetyö sisältää tutkimukseen käytettyjen syöpäsolulinjojen karakterisointia. Opinnäytetyön kokeellinen osuus toteutettiin kolmella eri eturauhassyöpäsolulinjalla, joista tehtiin 3D-soluviljelmät hiiressä kasvavasta Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarkoomasta uutetulle keinotekoiselle mutta luonnollista tyvikalvoa jäljittelevälle soluväliaineelle, matrigeelille. Syöpäsolulinjojen solujen migraatiota ja invaasiota seurattiin ja dokumentoitiin matrigeli-kasvatuksessa vuorokauden välein.

Opinnäytetyön kuvamateriaalin tuottamisesta vastasivat työn tekijät Jenni Niinimäki ja Sari Seppä sekä opinnäytetyötä ohjannut Kati Räsänen. Muuta alkuperää olevien kuvien yhteydessä on käytetty lähdeviitettä.

## **2 Eturauhassyöpä**

Eturauhassyöpä on jo useiden vuosien ajan ollut suomalaisten miesten yleisin syöpäsairaus ja sitä esiintyy keskimääräisesti yli kymmenen prosenttia enemmän kuin mitään toista syöpätyyppiä. Eturauhassyöpä on keuhkosyövän jälkeen miesten toiseksi yleisin kuolemaan johtava syöpä Suomessa; sen osuus oli 13,7 % kaikista miesten syöpäkuolemista vuonna 2012. (Suomen syöpärekisteri 2014; Kujala 2012; 803.)

Eturauhassyöpä on usein liitettävissä ikääntymiseen ja sitä esiintyy enemmän keski-ikäen ylittäneillä kuin nuorilla miehillä. Syövän kehittyminen on usein vuosia kestävä tapahtumasarja, johon tarvitaan useita mutaatioita, mistä johtuen hyvänlaatuisten muutosten kehittyminen varsinaiseksi kliiniseksi taudiksi on monivaiheinen ja aikaa vievä prosessi. Eturauhassyövän tarkkoja aiheuttajia ei täysin tunneta mutta oletetaan, että sen syntyyn vaikuttavat niin etninen tausta kuin geneettisetkin tekijät ja ympäristö. (Tammela – Utriainen – Rosenberg-Ryhänen 2014: 4; Solunetti 2006; Klug – Cummings – Spencer – Palladino 2011: 474.)

## 2.1 Syöpäsairauksista yleisesti

Syöpä on sairaus, jossa normaalin solutuhon ja solunjakautumiseen välillä vallitseva tasapainotila on häiriintynyt. Kliinisesti syöpä voidaan määritellä monimuotoiseksi ryhmäksi sairauksia, jotka käyttäytyvät eri tavoin solutyypistä ja kohde-elimistä riippuen. Syövät nimetään primaarikasvaimen sijainnin ja kasvainkudoksen rakenteen perusteella. (Syöpäjärjestöt 2014.) Eri syöpätyypit vaihtelevat suuresti puhkeamissyiden, kasvun, invasiivisuuden, oireiden, ennusteen ja hoitovasteen puolesta toisistaan. Molekyylitasolla syöpiä kuitenkin yhdistävät tietyt ominaispiirteet, joiden perusteella ne voidaan luokitella samaan tautiperheeseen kuuluviksi. (Klug ym. 2011: 474.)

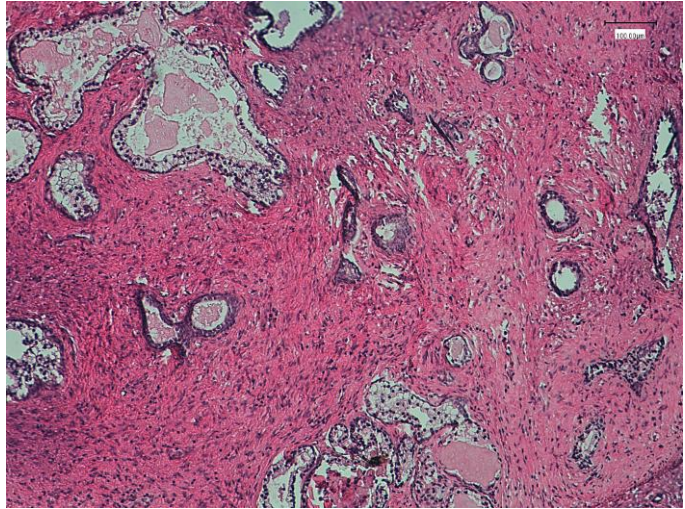
Kaikilla syöpäsoluilla on kaksi perusominaisuutta: kasvunsäätelymekanismien häiriintymisestä johtuva hallitsematon ja nopea jakautuminen, sekä solun normaalisäätelyn pettämisestä aiheutuva syöpäsolujen leviäminen elimistön muihin osiin (etäpesäkkeet I. metastasit). Syöpäsoluissa kasvua säätelevät ja rajoittavat geenit ovat mutatoituneet tai niiden ilmentyminen on muutoin häiriintynyt. Normaaleissa soluissa näitä geenejä ilmentään kontrolloidusti oikeaan aikaan ja oikeassa paikassa. Syöpää aiheuttavat mutaatiot tapahtuvat yleensä kehon somaattisissa soluissa. Normaalin solun muuttumisen syöpäsoluksi voi saada aikaan erilaiset syöpää aiheuttavat tekijät (karsinogeenit). Karsinogeenit voivat olla esimerkiksi virukset tai elinympäristön altisteet. (Syöpäjärjestöt 2014; Klug ym. 2011: 474.)

Syövälle tyypilliset solujen hallitsematon lisääntyminen ja etäpesäkkeet ovat juuri niitä tekijöitä, jotka tekevät siitä vaarallisen sairauden. Solun menettäessä kontrollinsa ja alkaessa jakautumaan hallitsemattomasti, syntyy jatkuvasti kasvava solukasvaima, kasvain. Tällaista kasvainta, joka ei tunkeudu ympäröiviin kudoksiin, kutsutaan hyvänlaatuisiksi (benigni). Sen sijaan kasvainta, joka kasvaa ympäröivien kudosten sisään tuhoten samalla niiden rakennetta tai leviää verenkiertoon synnyttäen sekundaarisia kasvaimia muualle elimistöön, kutsutaan pahanlaatuisiksi (maligni). Pahanlaatuisten kasvainten hoito on hyvin haasteellista ja ne voivat olla sairastuneelle hengenvaarallisia. (Klug ym. 2011: 474–475.)



## 2.2 Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu ja eturauhassyöpä

Aikuisen miehen eturauhanen (prostata) on saksanpähkinän muotoinen ja kokoinen, noin 20 g painava elin, joka sijaitsee lantion suojassa virtsarakon alapuolella virtsaputkea ja rakkon kaulaa ympäröiden. Eturauhanen voidaan jakaa anatomisesti eri alueisiin, joita ovat sentraalinen, transitionaalinen ja perifeerinen vyöhyke. Eturauhanen koostuu pääasiassa sileästä lihaksistosta, sidekudok-



Kuvio 1. Eturauhaskudoksen histologinen näkymä 10x-objektiivilla Leica DMD108 -mikroskooppikameralla kuvattuna.

sesta sekä rauhasrakenteista, joita verhoaa kahden solukerroksen muodostama epiteeli. (Tammela ym. 2014: 5; Kujala 2012: 800.) Normaalista eturauhaskudosta nähtävissä kuviossa 1.

Eturauhasen kasvua ja kehitystä säätelevät kiveksen tuottamat miessukupuoli-hormonit. Valtaosalla miehistä eturauhanen alkaa hitaasti suurentua 40 ikävuoden jälkeen, johtaen eturauhasen hyvänlaatuiseseen liikakasvuun (prostatahyperplasia) (Tammela ym. 2014: 6). Valtaosalla 60-vuotta täyttäneistä on jonkin asteisia hyvänlaatuisesta liikakasvusta johtuvia oireita, mutta eturauhasen koolla ei ole suoraa yhteyttä potilaan oirekuvaan. Yleisin oireiden aiheuttaja on virtsaputken yläosan ahtautuminen. (Kujala 2012: 800.) Eturauhasen hyperplasiaan voi liittyä myös infarkteja, jotka hyvänlaatuisuudestaan huolimatta saattavat aiheuttaa hematuriaa ja PSA:n nousua, kuten pahanlaatuisetkin kasvaimet. Myös eturauhasen tulehdussairaudet ovat hyvin tavallisia. (Kujala 2012: 800–801.)

Eturauhassyöpä ilmenee useimmiten rauhasen uloimmassa (perifeerisessä) vyöhykkeessä. Valtaosa eturauhasen syöivistä on perifeeristen asinusten adenokarsinomia. Transitionaalisesta vyöhykkeestä alkaa noin 15–25 % eturauhassyöpätapauksista. Eturauhassyövät ovat taudinkuvaltaan hyvin heterogeenisiä; joissain tapauksissa tauti voi olla pitkään latentti, kun toisinaan se saattaa edetä hyvinkin nopeasti etäpesäkkeiden syntyyn ja kuolemaan. (Tammela ym. 2014: 6; Kujala 2012: 804.)

Eturauhassyöpä diagnosoidaan koepalojen mikroskooppisella tutkimuksella, minkä lisäksi eturauhanen tunnustellaan palpoimalla ja seerumista määritetään prostataspesifisen antigeenin (PSA:n) pitoisuus (Käypä hoito -suositus 2014). PSA on ollut käytössä eturauhassyövän biomarkkerina 1990-luvulta asti. Merkkiaineen löytäminen on suurentanut huomattavasti eturauhassyövän esiintyvyyttä, koska sen myötä entistä suurempi osa syövästä voidaan todeta jo prekliinisessä vaiheessa kohonneen PSA-arvon perusteella. Ongelma kuitenkin on se, ettei PSA:ta erityy ainoastaan pahanlaatuisesta kudoksesta, vaan niin ikään myös hyvänlaatuiset muutokset kohottavat sen tasoa, jolloin se ei ole täysin spesifinen eturauhassyövän diagnosointiin. (Paju ym. 2000; Lippolis ym. 2013.)

### 2.3 Eturauhassyövän proteaasit

Syöpäsoluilla on erilaisia mekanismeja aiheuttaa palautumattomia vaurioita sairastuneen soluihin ja kudoksiin. Syöpäsoluilla on kyky tunkeutua (invasoida, infiltroida) ympäröiviin kudoksiin, verisuoniin ja imuteihin, mikä aiheuttaa normaalin kudoksen tuhoutumista ja mahdollistaa metastaasien muodostumisen. Lisääntyneen liikkuvuuden lisäksi syöpäsolujen kasvanut proteaasien erityy ja vähentynyt soluadheesio edistävät solujen invaasiota kudoksiin. Kasvainsolukkoon hakeutuvilla, tulehdusreaktioon liittyvillä valkosoluilla sekä niiden erittämällä kasvutekijöillä ja proteaaseilla on myös suuri merkitys syöpäsolujen leviämässä. Syöpäsolujen ympäristöönsä tunkeutumisen havaitseminen on syövän mikroskooppisessa diagnostiikassa hyvin tärkeä, kasvaimen pahanlaatuisuutta indikoiva löydös. (Mason – Joyce 2011; Lyly 2012: 1208.)

Proteaasit, joita tässä työssä tarkastellaan, tuhoavat solujen kalvoja ja aiheuttavat tuhoa ympäröiviin kudoksiin raivaten tilaa jatkuvasti lisääntyvälle syöpäsolukolle. Eturauhanen tuottaa useita eri proteaaseja, joilla tiedetään olevan osuutta syövän kehittämisessä ja joiden ilmentyminen vaihtelee eturauhassyövän eri kehitysasteissa (Borgono – Diamandis 2004; Lawrence – Lai – Clements 2010). Kohonnut protelyyttinen aktiivisuus kasvaimen mikroympäristössä on näin ollen liitettävissä syövän etenemiseen ja syöpäsolujen leviämiseen ympäröiviin kudoksiin (Lopez-Otin – Matrisian 2007). Proteaasit hajottavat soluväliainetta (matriksia) ja sitä kautta edistävät tuumorin kasvua, syöpäsolujen invaasiota ja metastaasien muodostumista (Mason – Joyce 2011).

Proteaasien vaikutus syöpäsolujen kasvuun ja leviämiseen ei ole täysin yksioikoista, vaan ne edistävät solujen migraatiota ja invaasiota keskinäisen verkostoitumisensa ja

vaikutuskaskadien kautta. Toisaalta osalla proteaaseista on myös todettu olevan kasvainten syntyä ja kasvua inhiboivia vaikutuksia. Inhibiittoreina toimivat proteaasit estävät syöpäsolujen invaasiota ohjaamalla niitä luonnolliseen solukuolemaan ja estämällä kasvaimen veri- ja lymfasuonten uudismuodostuksen (angiogeneesin) kehittymistä. (Mason – Joyce 2011; Lopez-Otin – Matrisian 2007.)

Tunnetuin ja tutkituin eturauhasen runsaimmin tuottamista proteaaseista on seriini-proteaasien kalliikreiniini-alaryhmään lukeutuva PSA (prostataspesifinen antigeeni, KLK3), jota tuotetaan prostatan epiteelisoluissa. PSA on yleisimmin eturauhassyövän diagnosoinnissa käytetty biomarkkeri. Toinen tutkimusten myötä esiin noussut eturauhasen tuottama proteaasi on niin ikään kalliikreiniiniperheeseen kuuluva hK2 (KLK2), joka on myös hyvin prostataspesifinen. Huonosti erilaistuneessa syöpäkudoksessa, jossa PSA:n määrä on hyvin vähäinen, hK2-proteaasin määrä nousee. Koska PSA ei kuitenkaan ole täysin spesifinen taudin diagnosoimiseksi, kuten jo aiemmin todettiin, tulisi sen rinnalle löytää uusia merkkiaineita, jotka nykyistä tarkemmin osoittaisivat pahanlaatuiset muutokset muiden muutosten joukosta. Opinnäytetyössä keskeisessä osassa olevilla trypsiineillä on todettu olevan yhteys useisiin eri syöpätyyppeihin, joten niiden tutkiminen on perusteltua myös eturauhassyövän yhteydessä. (Paju ym. 2000; Lippolis ym. 2013; Mattsson 2014: 17)

### 2.3.1 Prostataspesifinen antigeeni

PSA eli prostataspesifinen antigeeni on prostatasolujen tuottama proteiini, jota muiden kudosten solut eivät tuota. PSA:ta on veriplasmassa pieniä määriä. Prostatan koko vaikuttaa plasman PSA-pitoisuuteen (P-PSA). Jos prostata on kookas, myös PSA-pitoisuus on korkeampi. Myös ikä vaikuttaa PSA:n määrään. Iän myötä prostata kasvaa, ja tämä on huomioitu plasman PSA-arvojen viiterajoissa (ks. taulukko 1), jotka lähes kaksinkertaistuvat 56 ikävuoden jälkeen. (Mustajoki – Kaukua 2008.)

Eturauhassolujen lisäksi myös eturauhasen syöpäsolut tuottavat PSA:ta. Näin ollen pitoisuus kohoaa eturauhassyövän yhteydessä. Viitearvojen ylittyminen ei silti läheskään aina kerro syövästä, sillä hyvälaatuinenkin eturauhasen liikakasvu, prostatahyperplasia, saattaa saada pitoisuudet nousemaan selvästi yli viiterajojen. Selvästi korkea PSA-arvo kertoo suuremmasta prostatasyövän mahdollisuudesta, mutta on myös huomioitava,

ettei alhainen PSA-arvo täysin poissulje syövän mahdollisuutta. On olemassa eturauhassyöpäsoluja, jotka eivät tuota normaalista poikkeavia PSA-määriä. (Mustajoki – Kaukua 2008.)

PSA:ta on veressä sekä vapaana että proteiineihin kiinnittyneenä. Monimutkaisemmilla tutkimuksilla on mahdollista mitata näiden suhteellista osuutta (P-PSA-suh). Syöpätapauksissa vapaan PSA:n osuus on tavallista pienempi, eli suhde on keskimäärin 15 %. PSA:n nousun johtuessa muista syistä kuin syövästä, suhde on keskimäärin 22 %. (Mustajoki – Kaukua 2008.)

Taulukko 1. Plasman PSA- ja suhteellisen PSA-pitoisuuden viitearvot. (HUSLAB 2014.)

P-PSA Viitearvot	P-PSA-suht Viitearvot
m alle 56 v    alle 3.3 µg/l	m 40-69 v    yli 15 %
m 56-59 v    alle 3.8 µg/l	m yli 70 v    yli 15 %
m 60-63 v    alle 4.8 µg/l	
m 64-67 v    alle 5.8 µg/l	
m yli 67 v    alle 6.2 µg/l	

### 2.3.2 Trypsiinit

Trypsiini on proteiineja pilkkova haiman entsyymi. Haiman entsyymit erittyvät suoleen inaktiivisissa esimuodoissa. Myös trypsiini on aluksi inaktiivinen, ja tällöin sitä kutsutaan trypsinogeeniksi. Haimanesteen pääasialliset trypsiinin esimuodot ovat trypsinogeeni-1 ja -2. Trypsinogeeni-3 on kolmas haimanesteessä esiintyvä trypsinogeeni ja sitä kutsutaan myös nimellä mesotrypsinogeeni. Sitä esiintyy haimanesteessä pieniä määriä. Ohutsuolen limakalvon enteropeptidaasi aktivoi trypsinogeenin trypsiiniksi, joka puolestaan aktivoi muut haiman proteolyttiset entsyymit. Ruoansulatus, proteiinien pilkkominen ja muiden ruoansulatuskanavan entsyymien aktivointi ovat haiman trypsiinin tärkeimmät tehtävät. (Itkonen 2010: 136–137.)

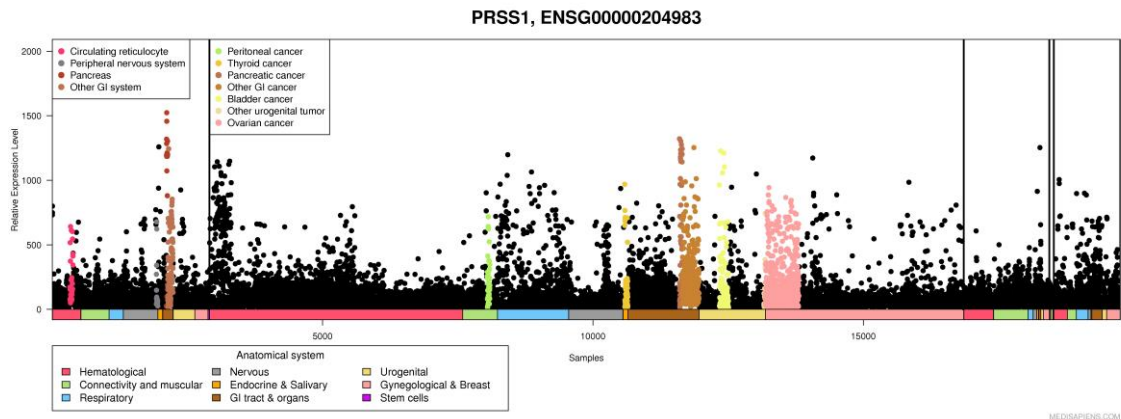
Nykytietämyksen mukaan trypsinogeenien ilmentyminen ei liity ainoastaan haimaan, vaan trypsinogeeniä on havaittavissa useissa kudoksissa, niin normaaleissa kuin pahanlaatuisissakin. Eri kudoksissa ja sairauksissa ilmenevien trypsinogeenien tutkiminen,

puhdistaminen ja karakterisointi ovat edistyneet massaspektrometrian menetelmien kehittymisen myötä. Kemiallisia eroja haiman ja muiden trypsinogeenien välillä on kyetty havaitsemaan ESI-MS (sähkösumutus-ionisaatio – massaspektrometria) -analyysillä. (Itkonen 2010: 136–137.)

Tutkimuksissa on pystytty selvittämään, että esimerkiksi limaa erittävän munasarjasyövän kystanesteessä esiintyy kahta trypsinogeenin isoentsyymiä, ja että näiden entsyymien aminoryhmään päättyvän peptidiketjun N-pään aminohapposekvenssi vastaa haiman trypsinogeeni-1 ja -2 -sekvenssejä mainitussa järjestyksessä (Itkonen 2010: 136). Haiman trypsinogeeni-2:n kanssa sekvenssi on identtinen yhtä emäsparia lukuun ottamatta. Myös molekyylipaino ja immuuniaktiivisuus ovat yhteneväiset. (Nyberg – Ylipalosaari – Sorsa – Salo 2006: 1223.) Isoentsyymeillä on myös eroavaisuuksia, kuten isoelektriset pisteet ja kyseiset isoentsyymit vastaavat eri tavoin proteaasi-inhibiittoreihin. Näin ollen kystanesteestä eristettyjä isoentsyymejä kutsutaan nimellä kasvaimiin liittyvät trypsinogeenit, TAT-1 ja TAT-2 (tumor-associated trypsinogen -1 and -2). (Itkonen 2010: 136.)

Trypsinogeenin ekspressio eturauhassyöpäkudoksessa korreloi käänteisesti sekä syövän erilaistumisasteen että PSA:n ekspression kanssa. (Paju ym. 2000.) TAT-2:n on osoitettu korreloivan syövän pahanlaatuisuuden kanssa ja se on vallitseva isotyyppi maligneissa syövässä. TAT-1:n tason on niin ikään havaittu olevan koholla näissä tapauksissa. TAT-2:n taso korreloi myös syövän metastaasien todennäköisyyden kanssa. On osoitettu, että TAT-1:llä ja TAT-2:lla on useita eri mekanismeja tehostaa syövän aggressiivisuutta. (Nyberg ym. 2006: 1223.)

Ihmisen haiman ja muiden kudosten trypsinogeenien koodaa PRSS-geenit. Trypsiini 1-proteaasia koodaa PRSS-1 ja trypsiini 2-proteaasia koodaa PRSS-2. (Itkonen 2010: 137.) PRSS-1 ja -2 geenisekvenssit ovat 97 %:sti samankaltaiset (UniProt BLAST). Alla olevassa kuvassa (kuvio 2) on esitelty, miten trypsinogeeniä esiintyy ihmisen eri kudoksissa.



Kuvio 2. PRSS1:den suhteellinen mRNA ekspressiotaso eri kudoksissa. PRSS1 on 97 % identtinen PRSS2-alueen kanssa. Kuvan vasemman puoleisessa sarakkeessa on nähtävissä ekspressio normaaleissa kudoksissa. Seuraavassa suuremmassa sarakkeessa voidaan nähdä vastaavat tasot syöpäkudoksissa. Kuvio on löydettyä ISS Online databasesta hakusanalla PRSS1. (ISS Online 2014.)

### 3 RNA-interferenssi solubiologiassa ja syöpätutkimuksessa

RNA-interferenssi (RNAi) on monivaiheinen tapahtuma, johon eri RNA-molekyylit osallistuvat. RNAi on mekanismi, joka hiljentää tietyn geenin ilmenemisen eliön ilmiössä. Ilmiö on täysin luonnollinen, ja esimerkiksi aivotumellisilla se todennäköisesti perustuu eliöiden suojautumiseen ulkopuolisia taudinaiheuttajia, kuten virusinfektioita vastaan. Ilmiö myös suojaa eliön perimää estäen virusten ja muiden liikkuvien, geneettistä ainesta omaavien partikkeleiden lisääntymisen eliön soluissa. RNAi:llä on myös tärkeä merkitys sekä eliöiden oman geeniekspression että niiden kromosomaalisten muutosten säätelyssä. (Agrawal ym. 2003: 657–685.) Nopeasti etenevässä tutkimustyössä pyritään RNA-interferenssiä hyödyntäen kehittämään menetelmiä tulevaisuuden syöpähoitoihin. Viimeaikaiset edistysaskeleet RNAi:tä käyttävissä menetelmissä tarjoavat täysin uudenlaisia mahdollisuuksia myös kliiniseen käytäntöön. Tavoitteena on kehittää RNAi-pohjaisia hoitomuotoja syövän hallintaan. (Wu – Lopez-Berestein – Calin – Sood 2014.)

#### 3.1 RNA-interferenssi ilmiönä

Luonnollisessa ilmiössä sekä miRNA (micro RNA) että siRNA (small interfering RNA) muodostuvat solussa tumien sisällä ja vapautuvat tumahuokosten kautta solulimaan. Solulimassa näihin RNA-molekyyleihin sitoutuu dicer-entsyymi, ribonukleaasi III:n kaltainen

entsyymi, joka pilkkoo nämä RNA:t keskimäärin 20–25 emäsparin pituisiksi osasiksi, varsinaisiksi miRNA:ksi ja siRNA:ksi. (Gu 2007: 34–35.) Dicerin muokkaamat siRNA:t ovat soluissa kaksisäikeisenä RNA:na (double-stranded RNA; dsRNA), mutta miRNA:t esiintyvät yksisäikeisessä muodossa (Saksela 2002: 2194). Solulimassa näihin pieniin RNA-molekyyleihin sitoutuu multiproteiinikompleksi, jossa on mukana useita Argonaute-proteiiniryhmän proteiineja ja lisäksi vielä monia muitakin proteiineja. Nämä kaikki yhdessä muodostavat kompleksin nimeltä RISC (RNA-induced silencing complex) (Pratt – MacRae 2009: 17897). miRNA tai siRNA kiinnittyy kompleksiin, siRNA:n juosteet eroavat toisistaan kompleksissa ja RISC aktivoituu. Tämän jälkeen kompleksi sekä sitoo miRNA:n ja siRNA:n kohde-mRNA:han (messenger RNA) että säätelee emäsparien kohdentamista vastinpareihin. (Gu 2007: 35.)

Aktivoituneen RISC:n sisältämä miRNA tai siRNA siis pariutuu tietyn kohdegeenin mRNA:n kanssa. siRNA:n emäsjärjestys on useimmiten täysin identtinen kohdegeenin mRNA:han verrattuna. Yhdessä kompleksin kanssa siRNA ohjaa kohde mRNA:n katkaisun. miRNA:n emäsjärjestys on vain osittain vastaava kohdegeenin kanssa. Sillä on usein 1–2 kohdegeenin kanssa ei-komplementaarista nukleotidia. Näin kompleksin kanssa kohdegeenin mRNA:han sitoutunut miRNA estää translaation ja molemmissa tapauksissa geenin ilmentyminen estyy. (Saksela 2002: 2192–2194.)

### 3.2 RNA-interferenssin löytyminen

Aivan ensimmäiset havainnot yksittäisen geenin ”sammuttamisesta” tai ”tukahduttamisesta” tulevat siirtogeenisten kasvien puolelta. 1990-luvun alussa tutkijat pyrkivät lisäämään kukkien värikylläisyyttä. Tutkijat kopioivat kasveihin lisää sitä geeniä, joka vastasi tästä ominaisuudesta. Tutkijoiden yllätykseksi osa siirtogeenisistä kukista olikin valkoisia. Tutkittaessa näitä kasveja huomattiin, että kasveissa, joihin oli pyritty lisäämään tätä tiettyä geeniä, kyseistä geeniä löytyikin vähemmän kuin lähtötilanteessa. (Gu 2007: 33)

Varsinaisesta geenin hiljentämisestä voidaan puhua vuodesta 1998 alkaen, sillä silloin nimen RNAi otti käyttöön Andrew Fire. Laakamadoilla (*Caenorhabditis elegans*) oli tehty tieteellistä tutkimusta tutkitun geenin ilmentymisen estämiseksi. Tutkimusta oli tehty ”sense” ja ”antisense” -RNA:lla. Fire ja Craig Mello tekivät yhdessä kokeen sense ja antisense -säikeillä, ja tulos oli kymmenen tai jopa sata kertaa parempi. Fire pystyi osoittamaan, että huomattavasti paremmat koetulokset johtuivat pienestä määrästä dsRNA:ta, jota *C. elegans* -alkioihin ruiskutetut sense- ja antisense-RNA-preparaatit sisälsivät.

Vuonna 2006 Fire ja Mello saivat keksinnöstään Nobelin palkinnon. He olivat kyenneet kehittämään toimivat testimenetelmät ja esittämään kiistattomat todisteet RNAi:n kyvystä vaimentaa kohdegeenin ilmentyminen eliössä mRNA:n välityksellä. (Saksela 2002: 2192; Gu 2007: 33).

Aluksi RNAi:ta ei pidetty kovinkaan lupaavana menetelmänä nisäkässoluihin liittyvissä tutkimuksissa. Tiedossa oli, että esimerkiksi ihmissoluihin viety dsRNA saa aikaan ohjelmoidun solukuoleman tai tilan, jossa interferonivälitteinen reaktio johtaa geeniekspresion yleiseen lamaantumiseen. Mielenkiinto heräsi, kun huomattiin, että dicer-entsyymillä pilkottuja siRNA:n kaltaisia, synteettisesti valmistettuja siRNA-molekyylejä pystyttiin transfektoimaan ihmisen ja hiiren soluihin ilman, että interferonivaste käynnistyi. Vielä kiinnostavammaksi asian teki se, että soluihin siirretyt synteettiset siRNA:t aiheuttivat niille homologisen mRNA:n hajoamisen. (Saksela 2002: 2194.)

Tällä hetkellä RNAi:n kokeellinen hyödyntäminen mullistaa lääketieteellistä tutkimusta ja on avaamassa uusia mahdollisuuksia myös kliiniseen työhön. Erityisesti mielenkiinnon kohteena ovat erilaiset syöpäsairaudet ja eri virusten, kuten HI- ja HBV -virusten, aiheuttamat taudit. Lukuisia tutkimuksia on myös meneillään eri kudosis- ja solutyyppeihin liittyvien geneettisten tautien tiimoilta. Tutkimustyötä tehdään esimerkiksi maksaan ja munuaisiin liittyvien geneettisten tautien parissa sekä hengitystiehyiden ja verisuonten endoteeli- ja epiteelisolujen sekä hematopoieettisten kantasolujen geneettisiin sairauksiin liittyen. Taloudelliset seikat tukevat RNAi-tutkimuksia, sillä sitä pidetään erittäin kustannustehokkaana hoitomuotovaihtoehtona. Tutkimusyhteisöissä uskotaan lujasti RNAi:n mahdollisuuksiin, ja siitä pidetään monoklonaalisten vasta-aineiden varteenotettavana haastajana. (Haussecker 2014: 49.)

### 3.3 RNA-interferenssi mekanismin hyödyntäminen syöpätutkimuksessa

Tutkijat ja klinikot UCLA:sta (University of California, Los Angeles) ja Caltech:sta (California Institute of Technology) ovat pystyneet osoittamaan todisteet RNAi:n toimivuudesta kliinisessä käytössä. Tutkimuksissa suoraan potilaan verenkiertoon ruiskutetut, nanopartikkeleihin sidotut siRNA:t onnistuttiin kuljettamaan kasvainsoluihin ja vaimentamaan haluttu syöpägeeni. Samalla tutkimuksissa havaittiin annosvaste, eli mitä suurempi määrä nanopartikkeleita potilaan verenkiertoon annosteltiin, sen enemmän siRNA:ta oli löydettävissä syöpäsoluista. (Ribas 2010.)



Suomalaiset yliopistotutkijat ovat yhteistyössä kehittämässä uudenlaista RNAi-pohjaista hoitomuotoa ihmisen yleisimpään aivosyöpään, glioblastoomaan. Tutkimustyötä johtaa Turun yliopiston professori, Jukka Westermarck. Helsingin yliopistosta hankkeessa mukana ovat dosentti Pirjo Laakkosen ja Åbo Akademiä dosentti Jessica Rosenholmin tutkimusryhmät. Kyseessä oleva syöpä on erittäin vakava sairaus, ja tällä hetkellä käytävissä olevilla lääkehoidoilla on kaksi suurta ongelmaa: glioblastoomasolut ovat resistenttejä useimmille käytössä oleville syöpälääkkeille ja lääkemolekyylit eivät läpäise aivojen ympärillä olevaa veri-aivoestettä. Tutkimushankkeella on hyvät mahdollisuudet onnistua kehittämään merkittävä läpimurto syöpähoitoin RNAi-pohjaisia menetelmiä hyödyntäen. Westermarckin tutkimusryhmä on kehittänyt uuden, RNAi-ilmioon pohjautuvan menetelmän, joka tuhoaa kaikkein vastustuskykyisimmätkin glioblastoomasolut, ja dosentti Pirjo Laakkosen tutkimusryhmä on keskittynyt lääkkeiden kuljettamiseen veri-aivoesteen läpi erityisillä kuljetuspeptideillä. Dosentti Jessica Rosenholmin tutkimusryhmän erityisalaa ovat lääke- ja RNAi-molekyylien kuljetus elimistössä käyttämällä ryhmän kehittämiä nanopartikkeleita. Tutkijoiden päämääränä on yhdistää keksinnöt lääkkeenomaiseksi tuotteeksi. (Turun yliopisto 2014.)

RNAi:lla pyritään vaikuttamaan suoraan syöpäsoluihin molekyylitasolla. Tähän tavoitteeseen päästään tuntemalla mekanismit, jotka edesauttavat syövän kehittymistä, kasvua ja metastasointia, ja löytämällä ne geenit, jotka ohjaavat näitä mekanismeja. Eri syöpätyyppeihin liittyviä entsyymejä, soluväliaineen osatekijöitä ja solun pinnan reseptoreita ja näitä koodaavia geenejä tunnetaan jo lukuisia ja lisää löydetään jatkuvasti. Pää tavoitteena on saada syöpäsolujen solusykliä ja anti-apoptoosia koodaavat geenit hiljennettyä, jolloin estetään syövän kasvu ja tuhoetaan syöpäsolut ilman, että normaalit solut kärsivät. (Debata – Debata – Panda 2014.)

#### **4 Tutkimuksen lähtökohdat**

Syöpätutkimusta tehdään tänä päivänä paljon, ja kansainvälistä yhteistyötä on runsaasti. Syöpätutkimus on yleensä yhdistelmä perus-, translationaalista- ja kliinistä tutkimusta, joista suurin osa tehdään biokemian, molekyyli- ja syöpäbiologian sekä uusien hoitomenetelmien kehittämisen osa-alueilla. (Biomedicum Helsinki 2014).

Tuoreimpien tutkimusartikkelien perusteella, tämän hetken keskeisimpiin syövän tutkimusalueisiin voidaan lukea kuuluvaksi onkogeenien toiminnan inhibointi, uusien syöpämerkkiaineiden löytäminen, kasvaimen veri- ja lymfasuonten uudismuodostuksen estäminen, syöpäsolun ohjaaminen luonnolliseen solukuolemaan (apoptoosi), solujen (terveiden ja sairaiden) liikkuvuuden tarkastelu sekä etäpesäkkeiden syntyminen, ”syövän kantasolujen” tutkiminen ja solun omien DNA:n korjausmekanismien hyödyntäminen syövän hoidossa. Myös jatkuvasti kehittyvät tutkimusmenetelmät mahdollistavat uusien kohteiden tutkimisen syöpäsairauksien syntymisen ja etenemisen pysäyttämiseksi.

#### 4.1 Työn tarkoitus ja työelämäyhteys

Opinnäytetyö tehtiin Hannu Koistisen tutkimusryhmälle, Kliinisen kemian laitokselle, Haartman-instituuttiin. Opinnäytetyön koeasetelmasta vastasi vanhempana tutkijana Koistisen ryhmässä toimiva Kati Räsänen. Työ sijoittui suuremman tutkimuksen kontekstissa vaiheeseen, jossa RNAi-menetelmälle pyrittiin löytämään optimaaliset olosuhteet trypsiini 2 -proteaasia koodaavan PRSS2-geenialueen ekspression vaimentamiseksi. Työn tavoitteena oli estää trypsiini 2 -proteaasin syntymistä ja, suuremmassa mittakaavassa tarkasteltuna, sitä kautta ehkäistä syövän leviämistä inhiboimalla syöpäsolujen liikkuvuutta. Primaaritavoitteena ja tutkimusryhmän päämääränä on saada tuloksia, joiden pohjalta voidaan tulevaisuudessa kehittää uusia lääkkeitä ja hoidollisia menetelmiä eturauhassyövän hoitamiseen. (Räsänen 2014). Tutkimuskokonaisuudessa voidaan ajatella esitettävän seuraavat kysymykset, joihin tällä opinnäytetyöllä ei suoraan pyritä vastaamaan: Onko menetelmä jalostettavissa hoidolliseen tarkoitukseen, ja kuinka hyvin se hoidollisena menetelmänä estäisi syövän kehittymistä ja syöpäsolujen leviämistä?

Opinnäytetyössä pyrittiin vastaamaan seuraaviin tutkimuskysymyksiin: Saadaanko PRSS2-geenialuetta vaimennettua tutkimukseen valituilla oligonukleotideilla, ja kuinka hyvin trypsiini 2 -proteaasin tuottumista onnistutaan vähentämään tällä menetelmällä? Onko tutkimukselle löydettävissä optimaaliset olosuhteet, ja saadaanko mahdollinen knockdown kohdistettua spesifisesti vain PRSS2-geenialueelle vai tapahtuuko vaimentumista myös muualla?

## 4.2 Tutkimusasetelma

Tutkimus tehtiin kolmella eturauhassyöpösolulinjalla ja useampia solu- ja molekyylibiologisia menetelmiä hyödyntäen. Eri menetelmillä saatujen tulosten toivottiin tukevan toisiaan ja vahvistavan kullakin mittauksella saatujen tulosten luotettavuutta. Opinnäytetyö sisältää myös tutkimukseen valittujen syöpösolulinjojen karakterisointia seuraamalla solujen migraatiota ja invaasiota matrigeeli-kasvatuksessa.

Tutkimuksen keskeisenä menetelmänä käytettiin RNA-interferenssi-ilmiötä. Syöpösolulinjat PC-3, PC-3M ja ALVA-31 viljeltiin kuusikuoppalevyille, jossa niille kasvualustaansa kiinnittymisen jälkeen suoritettiin siRNA-transfektio kolmella eri PRSS2-geenialueen oligonukleotidisekvenssillä. Seitsemänkymmenen kahden tunnin transfektion jälkeen soluista eristettiin niiden RNA:t, jotka käännettiin käänteiskopioijaentsyymien (RT, reverse transcriptase) avulla komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). cDNA-synteesin jälkeen halettuja geenituotteita monistettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR:llä (qRT-PCR) tuloksen saattamiseksi määrälliseen muotoon. qRT-PCR:ssä käytettiin kolmen eri geenialueen (PRSS1, PRSS2, PRSS3) lisäksi GAPDH ja HPRT1 referenssigeenejä tuloksen normalisointiin. Toivottavaa oli, että qRT-PCR-monistuksella saaduissa tuloksissa olisi havaittavissa mRNA:n määrän vähenemistä PRSS2-aluetta kohdentavien alukkeiden näytteissä. Tulokset taulukoitiin luettavaan muotoon Excel-tilukkolaskentaohjelmalla. Tutkimuksen kokeellinen osuus toistettiin kolme kertaa GAPDH-referenssigeenillä, ja RNA-eristyksen jo läpi käyneistä ja pakastetuista näytteistä tehtiin vielä uusi cDNA-transkriptio ja qRT-PCR-monistus eri referenssigeeniä (HPRT1) normalisointiin käyttäen.

Edellä esitettyä määritystä tukemaan tehtiin tutkimusryhmän toimesta transfektion läpikäyneille ja solujen pinnalta ennen RNA-eristystä kerätyille kasvatusmedioille immunofluorimetrinen määrittäminen (IFMA) (Perkin Elmer Wallac™ Victor 2 Model 1420 Multilabel HTS Counter). IFMA:lla mitattiin näytteissä olevan liukoisen TAT-2-proteiinin määrää, jonka niin ikään toivottiin vähentyneen PRSS2 siRNA:n seurauksena. Opinnäytetyössä ei tarkastella immunofluorometriä, tai sillä tehdyistä mittauksista saatuja lukuarvoja sen tarkemmin, vaikka pohdinta osuudessa näitä tuloksia peilataan suuntaa-antavasti qRT-PCR:llä saatuihin tuloksiin.

## 5 Menetelmäperiaatteet

Käytetyt menetelmät olivat siRNA-transfektiota lukuun ottamatta molekyyli-genetiikassa hyvin yleisesti käytössä olevia ja perinteisiä työtapoja. Käytettyjä menetelmiä olivat soluviljely, siRNA-transfektio, RNA-eristys, cDNA-synteesi ja qRT-PCR.

### 5.1 Soluviljely

Soluviljelyssä solut kasvatetaan keinotekoisissa olosuhteissa erillään solujen alkuperäisestä kudoksesta, josta ne on eristetty. Soluille luodaan luonnollisen kaltaiset olosuhteet, joita optimoimalla solut saadaan kasvamaan parhaalla mahdollisella tavalla. Työskenteilyn täytyy olla ehdottoman aseptista ja työtilojen erityispuhtaat, jotta vältytään ulkopuoliselta kontaminaatiolta. Soluja voidaan kasvattaa erilaisissa kasvatusalustoissa, kuten petrialjoilla, viljelypulloissa tai kuoppalevyillä. Solut vaativat kasvaakseen oikeanlaisen elatusaineen, joka voi olla joko suspensio tai kiinteää materiaalia. Elatusaineen tulee olla tarkasti säädelty ravintoaineiden sekä pH-arvon suhteen. Soluja kasvatetaan hiilidioksidilämpökaapissa (5 % CO<sub>2</sub>, +37 C°). (Turpeenoja 2005: 186–187.)

### 5.2 siRNA transfektio

siRNA:t ovat 21–25 nukleotidin pituisia RNA-molekyylejä, jotka säätelevät mRNA:n toimintaa, ja niiden transfektioilla pyritään hiljentämään tietyn geenin ilmeneminen. si-RNA transfektiossa hyödynnetään solujen luonnollista keinoa, endosytoosia, ottaa aktiivisesti materiaalia solun sisään. Tutkimustyössä käytössä olevat transfektio menetelmät voidaan luokitella kahteen pääryhmään: virusmenetelmiin ja kemiallisiin menetelmiin. Virusmenetelmillä saavutetaan hyvä transfektiotaso, mutta virusten haasteellinen, kallis ja aikaa vievä käsittely on vähentänyt niiden käyttöä tutkimusyhteisöissä. Kemiallisissa menetelmissä perustavoite on saada soluun vietävän partikkelin negatiivinen varaus neutraloitua tai muutettua hieman positiiviseksi, sillä solukalvojen varaus on negatiivinen. Näin onnistutaan luomaan mahdollisuudet vieraan partikkelin endosytoosille. (Pietilä 2012: 16–17.)

Kaupallisia transfektio reagensseja on jo useampia, mutta monien niiden ongelmana on sytotoksisuus, eli ne ovat myrkyllisiä useille soluille ja aiheuttavat näin soluvaurioita tai

jopa solukuolemaa. Tällä hetkellä käytetyin transfektiomenetelmä perustuu liposomaaliseen transfektioon, jossa siRNA molekyylit kuljetetaan soluihin liposomien avulla. Menetelmä toimii myös useimmiten niille soluille, jotka ovat liian herkkiä muille vastaaville reagensseille. Liposomit on rasvamaaisista kaksikerroksisista lipidimolekyyleistä muodostuvia partikkeleita, jotka voidaan varata positiivisesti. Positiivisesti varautuneet liposomit sitoutuvat negatiivisesti varautuneisiin siRNA molekyyleihin, ja yhdistelmän varaus säilyy positiivisena. Kompleksi pystyy sitoutumaan negatiivisesti varautuneeseen solukalvoon, ja endosytoosin jälkeen siRNA vapautuu solulimaan. (Pietilä 2012: 17–18.)

Menetelmänä voidaan käyttää joko suoraa transfektiota (forward transfection) tai käänteistä reaktiota (reverse transfection). Suorassa transfektiossa solut ovat viljeltynä kuoppalevyllä ennen transfektioreagenssien lisäämistä ja käänteisessä päinvastoin. Käänteinen transfektio on laajemmin käytetty sen automatisointi mahdollisuuksien vuoksi. (Flexible RNAi Technologies 2010.)

### 5.3 RNA:n eristys ja puhdistus

Molekyylibiologiset tutkimukset edellyttävät nukleiinihappojen (DNA ja RNA) eristämistä ja puhdistamista. Menetelmiä on useita, ja menetelmä määräytyy useimmiten tutkimuksellisista syistä, kuten nukleiinihappojen alkuperästä ja tutkimukseen tarvittavasta nukleiinihappomäärästä. Menetelmät vaativat monta työvaihetta, ja tarjolla on paljon erilaisia kaupallisia reagenssisarjoja ja tuotepakkauksia, jotka sisältävät tarvittavat reagenssit ja välineet työn toteuttamiseen. On myös kehitetty automatisoituja tehomenetelmiä, jotka perustuvat silikalvo- ja magneettipartikkelitekniikoihin. (Suominen – Pärssinen – Haajanen – Pelkonen 2010: 103–108.)

RNA:n puhdistamisen yhteydessä on tärkeää huomioida RNA:n herkkä hajoaminen. Esimerkiksi mRNA:n elinikä elävissä soluissa on vain muutamia minuutteja. Solujen ribonukleaasientsyymit eli RNAasit pilkkovat eristettävää RNA:ta. RNAasien inhiboiminen on välttämätöntä, jotta täysipitkiä ehjiä RNA-molekyylejä saataisiin säilymään. Nykyiset kaupalliset tuotepaketit sisältävät tehokkaita ja turvallisia RNAasi-inhibiittoreita. (Suominen ym. 2010: 108.)

RNA eristys alkaa solujen mekaanisella hajottamisella, ja mukana ovat myös kemialliset ja entsymaattiset tekijät, eli jo solujen hajottamisen yhteydessä nukleiinihappoja pilkkovat nukleaasit inaktivoidaan. Tämän jälkeen poistetaan ylimääräiset proteiinit sekä DNA,

ja jäljelle jää valikoituneesti saostunut RNA. RNA:n puhdistukseen tarjolla olevat manuaaliset kaupalliset menetelmät ovat useimmiten spin-kolonne, vakuumi-imu- ja kuoppalevy menetelmiä. (Suominen ym. 2010: 109–110.)

#### 5.4 RNA:n puhtauden ja pitoisuuden arviointi

RNA:n puhtaus- ja pitoisuusmittausten menetelmänä käytetään yleisimmin spektrofotometriä. Pienoispektrofotometrillä voidaan pienestä näytemäärästä (1–50 µl) yhdellä mittauksella saada arvio näytteen ribonukleiinihapon (RNA:n) puhtaudesta sekä pitoisuudesta. Menetelmä perustuu RNA:n nukleotidien absorptioon aallonpituudella 260 nm. Puhtaan RNA-liuoksen absorptio 1,0 aallonpituudessa 260 nanometriä vastaa RNA-pitoisuutta 40 µg/ml. RNA:n nukleiinihapot absorboivat DNA:ta voimakkaammin aallonpituudella 260 nm, joten niiden absorbanssisuhde on näin ollen DNA:ta korkeampi. Puhtaan RNA:n suhdeluku on noin 2 ( $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=2$ ). Sekundaarisessa puhtausmittauksessa aallonpituuksilla 260/230 tuloksen tulisi olla välillä 1,8-2,2. Proteiinien absorptiomaksimi on noin 280 nm:ssä, joten niiden läsnäolo pienentää absorbanssin suhdelukua. Myös fenolijäämät saattavat laskea lukuarvoja. Näin ollen ohjearvoja alemmat suhdelukuarvot viittaavat yleensä proteiinijäämiin tai muihin kontaminaation lähteisiin. Vapaat nukleotidit ja oligonukleotidiketjut voivat puolestaan nostaa suhdeluvun virheellisen korkeaksi. (Suominen ym. 2010: 110–111).

#### 5.5 RNA:n kääntäminen komplementaariseksi DNA:ksi

Komplementaarinen DNA (cDNA) on mRNA:sta käännetty DNA-kopio, joka edustaa näytteen ekspressoimia geenejä transkription hetkellä. mRNA on käännettävä cDNA:ksi RT (reverse transcriptase) -entsyymien avulla, jotta se on monistettavissa PCR-menetelmällä. Synteesillä tuotettu cDNA on täysin komplementaarinen näytteen mRNA:n nukleotidisekvensseille, ja se ei sisällä lainkaan intronijaksoja. (Klug ym. 2011: 552; Suominen ym. 2010: 151–152)

cDNA transkriptio käynnistyy, kun useilla eukaryoottisoluilla olevaan, pituudeltaan vaihtelevaan, poly-A-jaksoon kiinnittyy käänteiskopioijaentsyymien alukkeena toimivat dNTP-nukleotidit. Ensyymi käyttää mRNA:ta templaattina syntetisoidessaan komplementaarisen DNA-juosteen, muodostaen näin mRNA:sta ja siitä kopioidusta yksijuosteisesta DNA:sta kaksijuosteisen nauhan. Nauhan mRNA pilkotaan RNAasi H -entsyymillä, joka

synnyttää aukkoja RNA-juosteeseen. Jäljellä olevat RNA:n 3'-päät toimivat seuraavien juosteiden alukkeina. DNA-polymeraasientsyymi I poistaa jäljelle jääneet RNA-juosteen osat syntetisoiden samalla ensimmäiselle cDNA-juosteelle uuden vastinparin. Tuloksena saadaan kaksijuosteinen cDNA-nauha. (Klug ym. 2011: 552–553; Suominen ym. 2010: 151–152.)

## 5.6 Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR

Kvantitatiivisella reaaliaikaisella käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktiolla (qRT-PCR) voidaan tehokkaasti tutkia tiettyjen geenien ilmentymistä hyvinkin pienistä mRNA määristä. RT-PCR-reaktioiden mallina toimii RNA, joka on ennen PCR-reaktioita käännettävä cDNA-muotoon. Menetelmä pitää sisällään kaksi vaihetta: käänteistranskription (RT-reaktio) sekä PCR-monistuksen. Työvaiheet voidaan tehdä joko kahdessa erillisessä osassa, kuten tässä opinnäytetyössä, tai ns. yksiputkimenetelmänä yhdessä reaktiossa. (Suominen ym. 2010: 170.)

Kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR (quantitative real-time PCR) kehitettiin 1990-luvun alussa, ja se on menetelmänä perinteistä PCR:ää huomattavasti herkempi ja nopeampi. Siinä tuotteen monistuminen ja määrittäminen tapahtuvat samanaikaisesti, jolloin syntyvän tuotteen määrää voidaan seurata koko ajan reaktion edetessä, reaaliajassa. qRT-PCR -reaktiossa on mukana fluoresoiva väri, jonka lähettämää signaalia mitataan reaktion aikana. Fluoresenssi mitataan jokaisen ekstensiovaiheen jälkeen sykleittäin. Signaalin vahvuus on suoraan verrannollinen kertyvän PCR-tuotteen pitoisuuteen. (Suominen ym. 2010: 166–167; Knuutila 2012: 1188.)

Reaaliaikainen PCR toimii monistusreaktion osalta kuten perinteinenkin PCR. Reaktiossa toistetaan kolmea päävaihetta, jotka yhdessä muodostavat PCR-syklin. Syklin vaiheet ovat denaturointi, alukkeiden kiinnitys (annealing) ja pidennysreaktio. PCR-syklissä kopioinnin kohteena oleva DNA denaturoidaan korkean lämpötilan avulla yksijuosteeseen muotoon (denaturation, 94–98 °C). Syntyneestä säikeestä rajataan monistettava alue sen vastakkaisista päistä tähän tarkoitukseen huolellisesti suunnitelluilla alukkeilla, jotka ovat synteettisesti valmistettuja lyhyitä nukleiinihapposäikeitä (annealing, 45–72 °C). DNA-polymeraasientsyymillä rakennetaan alukkeiden välille uusi juoste dNTP-nukleotideista 5'–3' suuntaan, käyttäen denaturaatiossa syntyneitä yksisäikeistä DNA:ta mallijuosteena (elongation, extension, 72 °C). Yhden syklin replikaation jälkeen DNA:n määrä on kaksinkertaistunut. Jokainen sykli kaksinkertaistaa DNA määrän, jolloin

kopioitavan alueen määrä kasvaa eksponentiaalisesti kierros kierrokselta. Syklejä toistetaan noin 15–40 kertaa. Ohjelman loppuvaiheessa tehdään yleensä loppupidennys, jonka tarkoituksena on saattaa kaikki työn alla olevat monistustuotteet saman mittaisiksi ennen ohjelman päättymistä. (Suominen ym. 2010: 153–157; Klug ym. 2011: 554–557; Knuutila 2012: 1185.)

Lopputuotteen havaitsemiseen qRT-PCR:ssä on käytössä kaksi menetelmää: hydrolysoituvaan DNA-koettiin perustuva TaqMan -menetelmä ja kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvan väriaineen (SYBR Green) käyttäminen. Opinnäytetyössä käytettiin SYBR Green -väriainetta, joten tässä yhteydessä käsitellään ainoastaan sen toimintaperiaate. SYBR Green sitoutuu alukkeiden kiinnittymisvaiheessa kaksijuosteiseen DNA:han. Sitoutuminen saa värin fluoresoimaan voimakkaammin, jolloin värin tuottaman signaalin määrä on suoraan verrannollinen monistustuotteen määrään. Sitoutumattomana väri ei juurikaan fluoresoi. Heikkoutena menetelmässä on, että SYBR Green -väriaine sitoutuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han. Näin ollen huonosti suunnitellut ja toisilleen komplementaariset alukkeet saattavat sitoutua toisiinsa muodostaen ns. primer-dimereita, jolloin SYBR-väri sitoutuu myös niihin väärinä lopputulosta. (Suominen ym. 2010: 167; Klug ym. 2011: 559.)

Kvantitatiiviseen reaaliaikaiseen PCR-reaktioon käytetään usein valmiita tuotepakkauksia, joissa valmiiseen mastermix-liuokseen lisätään ainoastaan monistettavalle alueelle suunnitellut alukkeet (forward ja reverse), steriili vesi ja templaatti (cDNA). Mastermix itsessään pitää sisällään kaikki muut reaktioon tarvittavat komponentit. (Suominen ym. 2010: 170.)

Reaaliaikaisen PCR -monistuksen päätyttyä raakadatalle määritellään tietty kynnystaso (threshold line), jossa monistustuotteen fluoresenssi erottuu taustakohinasta ja eksponentiaalinen kasvuvaihe alkaa.

## **6 Työn toteutus**

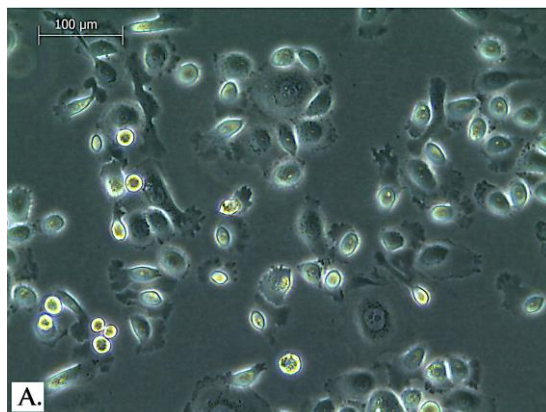
Opinnäytetyön kokeelliset osuudet toteutettiin kolmella valmiiksi eristetyllä eturauhassyöpäsolulinjalla PC-3, PC-3M ja ALVA-31. Solut olivat työn alkaessa jo useampaan kertaan siirrostettuja ja eri linjojen pasaasinumerot vaihtelivat välillä 20–40.



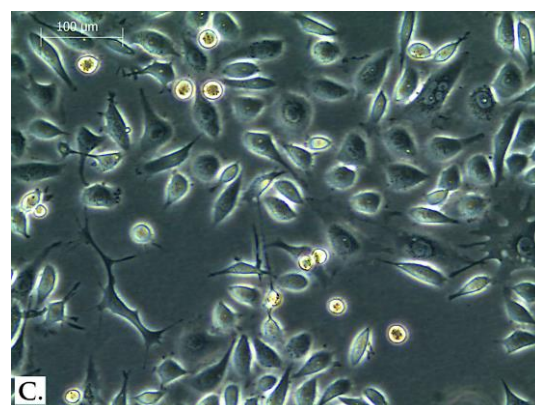
PC-3 (ATCC® CRL-1435™) eturauhassyöpäsolulinja oli hankittu ATCC:ltä (American Type Culture Collection), joka on yksityinen solupankki ja tutkimusorganisaatio. PC-3 solulinja on luokan IV eturauhasadenokarsinooma, joka on peräisin 62-vuotiaan valkoihoisen miehen eturauhasen lähettämästä luumetastaasista. PC-3-linjan solut ovat kooltaan keskisuuria ja muodoltaan monikulmaisia. Ne muodostavat keskenään rypälemäisiä kasvustoja (kts. kuvio 3). Joissakin soluissa voidaan nähdä lipidi-inklusioita. Solujen nukleolit ovat runsaita ja rakeisia. (ATCC 2014.)

PC-3M ja ALVA-31 eturauhassyöpäsolulinjat oli saatu Teknologian tutkimuskeskuksesta (VTT) lahjoituksena. Molemmat linjat on johdettu PC-3 soluista. PC-3M linja on eristetty maksan etäpesäkkeestä, joka muodostui, kun PC-3 soluja injektoidiin hiiren pernaan (Kozlowski – Fidler – Campbell – Xu – Kaighn – Hart 1984). ALVA-31 solulinja on PC-3 soluista eriytnyt kloni (Varella-Garcia, M – Boomer, T – Miller, G.J. 2001). Nämä solulinjat ovat huomattavasti

PC-3-linjan soluja aggressiivisempia sekä kasvultaan että invasiivisuudeltaan. PC-3 ja PC-3M linjojen solut ovat hyvin samankaltaisia. ALVA-31 linjassa on nähtävissä sekä epiteeli- että mesenkymaalisia, bipolaarisia soluja. PC-3M ja ALVA-31 linjojen solumorfologiaa esillä kuvioissa 4 b. (PC-3M) ja 4 c. (ALVA-31). Kuvat on otettu Leica EC3 digital color -mikroskooppikameralla.



Kuvio 3. Eturauhassyöpäsolulinja PC-3:lle tyypillistä solumorfologiaa.



Kuvio 4. Eturauhassyöpäsolulinjoille PC-3M (kuvio b.) ja ALVA-31 (kuvio c.) tyypillistä solumorfologiaa.

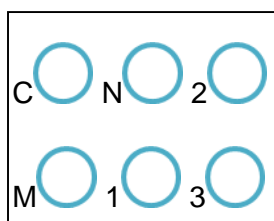
## 6.1 PRSS2-geenialueen ekspression vaimentaminen RNAi-menetelmällä

Edellisessä kappaleessa esitellyt solulinjoja (PC-3, PC-3M ja ALVA-31) kasvatettiin soluviljelypulloissa (+37°C, CO<sub>2</sub> 5 %) noin 72 tuntia ennen seuraavien työvaiheiden aloittamista. Solujen kasvua seurattiin stereomikroskoopilla viljelyn aikana. PC-3 solulinjan kasvatuksessa käytettiin GIBCO® F-12 Nutrient Mix GlutaMAX™ -mediaa (Life Technologies) ja PC-3M ja ALVA-31 -linjoille RPMI 1640 -mediaa (Lonza BioWhittaker™). Kasvatusliuoksiin lisättiin ennen niiden käyttöönottoa 10 % FBS (fetal bovine serum) -liuosta sekä 1 % Penisilliini-Streptomysiiniä (Pen Strep). RPMI 1640 -mediaan lisättiin myös 1 % L-Glutamiinia, mikä F-12 -mediassa oli jo valmiiksi mukana (GlutaMax). Liuoslisäykset perustuvat siihen, että seerumin sisältämät kasvutekijät, kuten mineraalit ja aminohapot, tarjoavat soluille tarvittavat ravinteet edistämällä solujen jakautumista. Pen Strep -liuosta lisättiin estämään bakteerikasvua soluviljelyn aikana. L-glutamiinia solut tarvitsevat proteiinisynteesissä ja sen tehtävä on niin ikään nopeuttaa solujen jakautumista.

Soluviljelylle oli varattu omat puhdistilat, joissa työskentely tapahtui suojavaatteissa. Työskentelytilaa edelsi välitila, jossa pukeutuminen tapahtui ja jossa oli myös varastotilat soluviljelyhuoneessa tarvittaville reagensseille ja välineille. Viljelyhuone oli ilmastoitu ohjeistuksen mukaisesti, ja kaikki työskentely tapahtui laminaarikaapissa kertakäyttöisiä suojakäsineitä käyttäen. Kaappi ja välineet puhdistettiin ennen ja jälkeen viljelyn 70 % etanoliliuoksella.

Noin kolmen vuorokauden kasvatuksen jälkeen, solujen saavutettua eksponentiaalisen kasvun vaiheen, ja jossa ne olivat käyttäneet noin 90 % kasvutilastaan peittäen viljelypullon pohjaa yksikerroksisena solukkona, työtä jatkettiin eteenpäin. Solupullosta pipetoitiin kasvatusmedia pois ja solukko huuhdeltiin 2 ml trypsiiniliuoksella, joka pipetoitiin välittömästi pois. Pulloon lisättiin uudet 2 ml trypsiiniliuosta ja pulloa inkuboitiin lämpökaapissa +37 °C:ssa 2-5 minuuttia, jolloin solut irtosivat pullon pohjalta. Solujen irrottua, pulloon lisättiin 8 ml uutta kasvatusmediaa trypsiinin inaktivoimiseksi. Tämän jälkeen saadusta 10 ml kokonaistilavuudesta pipetoitiin 10 µl suspensiota Bürker-laskentaa varten. Saadusta solumäärästä tehtiin laskutoimitukset, joilla selvitettiin siRNA transfektioon tuleva solumäärä sekä jatkoviljelyä varten uuteen pulloon tuleva suspensiotilavuus ja solumäärä. siRNA transfektiota varten solususpensiota pipetoitiin 6-kuoppalevyille (2x10<sup>5</sup> solua/kuoppa) ja levyä pidettiin vuorokausi lämpökaapissa (+37°C, CO<sub>2</sub> 5 %).

siRNA transfektio tehtiin 6-kuoppalevyllä, Lipofectamine® 2000 Transfection -reagenssilla. Transfektiossa käytetyt oligonukleotidit olivat FlexiTube GeneSolution GS5645 for PRSS2 -tuotepakkauksen oligot si1, si2 ja si6. Käytettyjen siRNA-oligonukleotidien stokkikonsentraatio oli 10µM. Tarvittavat reagenssit (Lipofectamine 2000 ja Opti-MEM -media) sekä oligonukleotidit pipetoitiin aluksi 1,5 ml Eppendorf -putkiin. Pipetointimäärät löytyvät liitteestä 1. Kuopat sekä mikroputket merkittiin seuraavasti:



C = nollakontrolli (vain mediaa)

M = Mock-kontrolli (media + Lipofectamine reagenssi)

N = negatiivinen kontrolli (media + Lipof. + neg.kontrolli)

1 = siRNA1 (media + Lipof. +oligonukleotidi 1)

2 = siRNA2 (media + Lipof. +oligonukleotidi 2)

3 = siRNA6 (media + Lipof. +oligonukleotidi 6)

Mock-kontrollilla testattiin transfektio-reagenssin vaikutuksia soluille. Esimerkiksi reagenssin mahdollinen toksisuus on havaittavissa mock-kontrollin avulla. Negatiivisella kontrollilla ei ole homologiaa minkään tunnetun nisäkkään geenin kanssa, mutta sen partikkelit aktivoivat RISC-kompleksin. Oligonukleotidit si1, si2 ja si6 valittiin niiden spesifisyyden perusteella kohdegeeniin nähden.

Kun media, Lipofectamine ja oligonukleotidit olivat inkuboituneet mikroputkissa vaaditun ajan, 6-kuoppalevytä pipetoitiin vanha kasvatusmedia pois ja se korvattiin uudella medialla (1,5 ml), jonka jälkeen mikroputkisuspensiot (0,5 ml) pipetoitiin tiptoittain kuoppalevyille solukerroksen päälle. Käytettyjen siRNA-oligonukleotidien lopullinen konsentraatio solujen päälle pipetoidussa liuoksessa oli 25nM. Kuoppalevyä inkuboitiin lämpökaapissa (+37°C, CO<sub>2</sub> 5 %) 6 tuntia, jonka jälkeen kuoppalevyllä olleet suspensiot ja mediat pipetoitiin pois, ja ne korvattiin uudella kasvatusmedialla (2 ml/kuoppa). Tämän jälkeen kuoppalevyjen annettiin olla lämpökaapissa (+37°C, CO<sub>2</sub> 5 %) 72 tuntia. Käytetty menetelmä oli suora transfektio.

RNA:n eristys ja puhdistus tehtiin, kun transfektoituneet solut olivat olleet lämpökaapissa kolmen vuorokauden ajan. Eristys tehtiin kaupallisella MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® RNA -tuotepaketilla, paketin ohjeiden mukaisesti (liite 2). Ennen eristämisen aloitusta kuoppalevyiltä pipetoitiin 1 ml/kuoppa kasvatusmediaa Eppendorf-putkiin IFMA-määritystä varten.

RNA eristyksen alussa solut hajotettiin guanidiinitiosyanaatti liuoksessa, johon oli lisätty  $\beta$ -merkaptoetanolia, ja irrotettiin soluraaputtajalla kaapimalla. Liuos saa aikaan solujen hajoamisen ja inaktivoi RNAasit välittömästi. Eristys ja puhdistus tehtiin NucleoSpin® Filter -kolonneilla tuotepakettien ohjeiden mukaisesti, pakkauksen reagensseja käyttäen. Eristyksessä RNA:n sitoutumista suosivaan silikakalvoon tarttuu myös kontaminoivia DNA molekyylejä, jotka huuhdeltiin pois tuotepaketin rDNAasilla, ja puhdas RNA eluoiitiin RNAasi-vapaalla vedellä Eppendorf-putkiin. Lopputilavuus Eppendorf-putkissa oli 40  $\mu$ l/putki. Puhdistuksen jälkeen putkia säilytettiin -80 °C seuraavaan työvaiheeseen asti.

Ennen cDNA-synteesiä eristetyn RNA:n konsentraatio mitattiin NanoDrop ND 1000 -spektrofotometrillä, jossa nukleinihappojen näytetyypiksi valittiin RNA-40. Totaali RNA-konsentraatio ja puhtausaste mitattiin 1  $\mu$ l:sta näytettä. Saaduista lukuarvoista tarkastettiin RNA-pitoisuuden (ng/ $\mu$ l) lisäksi puhtautta indikoivien aallonpituuksien 260/280 ja 260/230 tulokset. Mittauksessa saatujen arvojen perusteella laskettiin cDNA-synteesiin pipetoitavan RNA:n ja RNAasi vapaan veden määrät.

RNA:n syntetisointiin cDNA:ksi käytettiin SensiFAST™ cDNA Synthesis -tuotepakkausta (Bioline). RNA:ta käännettiin 1  $\mu$ g. Työ suoritettiin jäähähteessä pakkauksen työohjeita ja pipetointimääriä noudattaen, kokonaisvolyymilla 20  $\mu$ l. Synteesiin käytettiin MJ Research PTC 200 Thermal Cycler PCR -laitetta, joka ohjelmoitiin niin ikään tuotepakkauksen ohjetta noudattaen. Tuotepakkauksesta löytyvät työohjeet esitettyinä liitteessä 3.

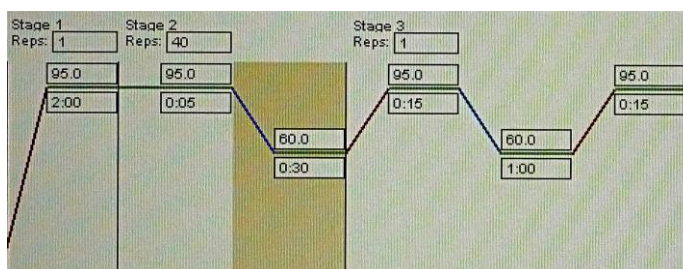
Geenien ekspression määrää, eli RNAi-tekniikalla haettua PRSS2-geenialueen vaimentumista, mitattiin qRT-PCR:llä. qRT-PCR-monistukseen käytettiin SensiFAST SYBR Lo-ROX -tuotepakkausta (Bioline), joka oli yhteensopiva cDNA-synteesiin käytetyn tuotepakkauksen sekä PCR-monistukseen käytetyn ABI 7500 Fast (Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System) -laitteen kanssa. Monistuksessa alukkeina toimineet oligonukleotidisekvenssit olivat spesifiset PRSS1, PRSS2, PRSS3 -geeneille. Tuloksen normalisointiin käytetyt ns. housekeeping-geenit olivat GAPDH ja HPRT1. Alukkeiden sekvenssit nähtävissä taulukossa 2.

Taulukko 2. qRT-PCR:ssä käytettyjen oligonukleotidien sekvenssit (F=forward, R=reverse).

Alukkeen nimi	No. Bases:	Emäsjärjestys 5' – 3'
GAPDH F long	19	GAG TCC ACT GGC GTC TTC A
GAPDH R long	19	GGG GTG CTA AGC AGT TGG T
PRSS1 F	22	CCA CCC CCA ATA CGA CAG GAA G
PRSS1 R	17	GCG CCA GAG CTC GCA GT
PRSS2 F	17	CCA AAT ACA ACA GCC GG
PRSS2 R	20	AGT CGG CAC CAG AAC TCA GA
PRSS3 F	20	ACC CTA AAT ACA ACA GGG AC
PRSS3 R	18	AGC ACC AAA GCT CAG AGT
HPRT1 F	21	CCT GGC GTC GTG ATT AGT GAT
HPRT1 R	22	AGA CGT TCA GTC CTG TCC ATA A

Monistus suoritettiin kokonaistilavuudessa 20 µl. Oligonukleotidisekvenssi-stokeista, joiden lähtöpitoisuus oli 100 µM, laimennettiin alukkeiden käyttöliuokset (pitoisuuksiltaan 1,2 µM). Kokonaisvolyymissä 20 µl alukkeiden pitoisuudet olivat 60 nM per aluke. Pipe-toinnit suoritettiin jäähauteessa pakkauksen työohjeita noudattaen (liite 4). Alukkeet (1 µl reverse / 1 µl forward) pipetoitiin yhteen veden (6 µl) ja valmiin mastermix-liuoksen (10 µl) kanssa. 96-kuoppalevyllä (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL) pipetoidussa kokonaisvolyymissa templaatin (cDNA) määrä oli 2 µl eli 100 ng, ja jokaiselle eri alukeparille valmistettujen mastermix-aluke-vesi -seosten määrä oli 18 µl. Jokaista targetoitavaa aluetta kohden tehtiin myös kontrollikuopat, joihin cDNA:n tilalle pipetoitiin steriili vesi (2 µl). Pipetointien jälkeen reaktiokuopat suljettiin muovilla ja kuoppalevy sentrifugoitiin levysentrifuugilla (900 rpm/1 min.) ennen sen asettamista qRT-PCR -laitteeseen.

ABI 7500 Fast PCR -laitteeseen määritettiin monistusohjelma työohjeita noudattaen (liite 4). Ohjelmoidut ajat ja kierrosmäärät ovat nähtävissä kuviossa 5. Monistustulosten keräys (data collection) tehtiin jokaisen ekstensiovaiheen (60°C / 30s) jälkeen sykleittäin. Ohjelman pää-



Kuvio 5.

Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR-monistuksessa käytetty monistusohjelma.

tyttyä negatiivisten vesikontrollien tulos tarkastettiin ja saaduille kuvaajille määritettiin kynnystaso ja kynnysyksi ennen tulosten analysointia.

## 6.2 3D-kasvatus matrigeelille

Solulinjoista tehtiin 3D-soluviljelmät hiiressä kasvavasta Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) sarkoomasta uutetulle keinotekoiselle, mutta luonnollista tyvikalvoa jäljittelevälle soluväliaineelle, matrigeelille (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix). Matrigeelia valmistetaan kemiallisella uutolla suoraan kasvainmateriaalista, ja se sisältää runsaasti erilaisia tyvikalvon komponentteja. 3D-soluviljelmässä soluja voidaan kasvattaa geelimäisen väliaineen päällä, sisällä tai osittain molemmissa. Geelin funktio on mallintaa kudoksen omaa soluväliainetta. Kolmiulotteinen soluviljelma keinotekoisella väliaineella mahdollistaa solujen erilaistumisen lähtökudoksensa suuntaan sekä kudoksenkaltaisen organisoituneen soluyhteisön synnyn. (Partanen – Klefström 2008; 2444–2447) Matrigeelille viljeltyistä soluista voidaan visuaalisesti havainnoida kasvainsolujen luonnetta, migraatiota ja invasiivisuuden astetta.

Solulinjoja viljeltiin lämpökaapissa (+37°C, CO<sub>2</sub> 5 %) noin 72 tuntia ennen niiden siirrostusta matrigeeli kasvatukseseen. Matrigeeli jähmettyy normaalissa huonelämpötilassa, joten kaikki työskentely suoritettiin jäähauteessa ja työvälineet kylmennettiin ennen niiden käyttöä. Matrigeeli laimennettiin lähtöpitoisuudestaan 9,4 mg/ml pitoisuuteen 5 mg/ml edellä esiteltyihin kasvatusmedioihin. Valmistettua laimennosta pipetoitiin 48-kuoppalevyn kaivoihin 45 µl:aa, minkä jälkeen geeliä inkuboitiin 37 °C:ssa kunnes geeli oli jähmettynyt (noin ½ tuntia).

Inkuboinnin aikana kolmen eri solulinjan solut irrotettiin kasvualustastaan trypsiini-entsyymillä avulla ja niistä tehtiin 10 ml:n solususpensio kasvatusmedioiden kanssa. Eri linjojen suspensioiden solupitoisuudet määritettiin mikroskooppisesti Bürker-laskentakammia käyttäen. Matrigeelille haluttiin siirrostaa 5000 solua per kaivo, joten kammiasennan tuloksien perusteella saatiin jokaisesta linjasta laskettua siirrokseen pipetoitavan solususpension määrä. Lasketut solususpensiomäärät ja 200 µl:aa matrigeeli-laimennosta pipetoitiin 1,5 ml:n Eppendorf-putkiin. Seos sekoitettiin varovasti, minkä jälkeen sitä pipetoitiin inkuboinnin läpikäyneelle 48-kuoppalevylle 140 µl:aa per kaivo (kahteen rinnakkaiseen kaivoon) pohjalle jo jähmettyneen matrigeelin päälle. Suspension annet-

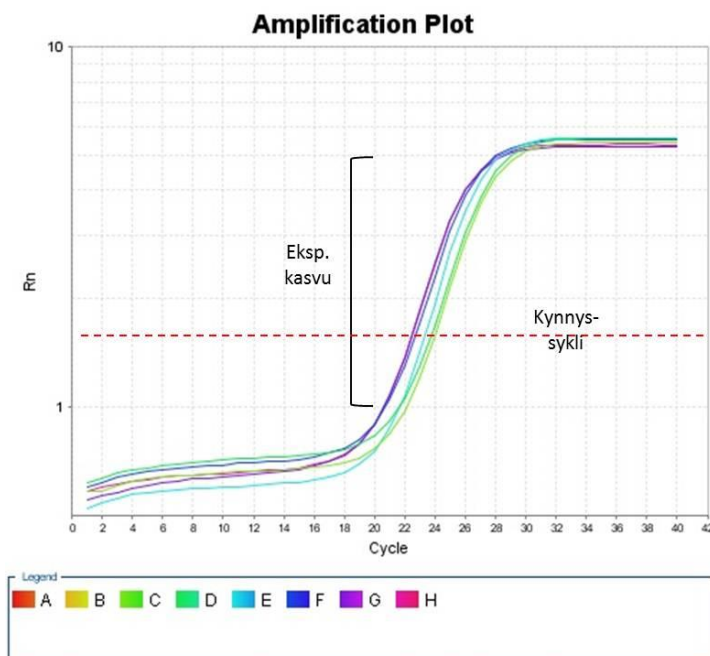
tiin jähmettyä soluviljelyinkubaattorissa, jonka jälkeen matrigelin päälle lisättiin kasvatustediaa 200 µl/kuoppa. Tämän jälkeen solulinjoista otettiin ensimmäiset dokumenttikuvat (d0).

## 7 Tulokset

Kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR-monistumisen onnistumista voidaan seurata näytöltä monistuksen aikana reaaliajassa. Tulosten saattaminen tilastolliseen ja luettavaan formaattiin vaatii kuitenkin tiettyjä toimenpiteitä monistusohjelman päätyttyä.

### 7.1 Kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR tuloksen määrittäminen

Reaaliaikaisen PCR-monistuksen päätyttyä raakadatalle määritellään tietty kynnystaso (threshold line), jossa monistustuotteen fluoresenssi erottuu taustakohinasta ja eksponentiaalinen kasvuvaihe alkaa. Toinen tarkasteltava suure on kynnysyksi (Ct, cycle threshold), joka kertoo kierrosluvun, missä monistustuotteen antaman fluoresenssin intensiteetti on saavuttanut asetetun kynnystason, ja eksponentiaalisen kasvun vaihe alkanut. Ct-arvo on käänteisesti verrannollinen näytteessä olevan kohdenukleinihapon määrään: mitä alhaisempi Ct-arvo, sitä suurempi määrä monistustuotetta näytteessä on. Ct-arvon ollessa pienempi kuin sykli 29, on näytteessä runsaasti targetoitavaa nukleinihappoa. Ct-arvon ollessa sykliä välillä 30–37, näytteessä on kohtalaisesti targetoitavaa nukleinihappoa. Sen sijaan Ct-arvo 38–40 osoittaa näytteessä olevan vain pieniä määriä haluttua monistustuotetta tai että näyte on kontaminoitunut. (Suominen ym. 2010: 167; Knuutila 2012:



Kuvio 6.

Esimerkki qRT-PCR-menetelmän moniskäyrästä. Solulinja PC-3, oligonukleotidisekvenssi HPRT1.



1188.) Kuviossa 6 on nähtävissä esimerkki qRT-PCR-menetelmän monistuskäyrästä. Reaaliaikaisen PCR tuloksen kvantitointi voi olla joko suhteellista tai absoluuttista, joista suhteellinen on yleisemmin käytetty. Menetelmässä kohdegeenin määrää verrataan referenssigeenin määrään. Absoluuttisessa menetelmässä oman tuotteen kopiointisuhdetta verrataan johonkin tunnettuun kohteeseen. (Suominen ym. 2010: 170.) Opinnäytetyössä tuloksen normalisointiin käytettiin kahta tunnettua referenssigeeniä: GAPDH ja HPRT1. Tämän työn yhteydessä esitellään ainoastaan HPRT1-geenisekvenssillä saadut tulokset, koska GAPDH:n toiminta vaihteli suuresti solulinjasta ja targetoitavasta alueesta riippuen. Referenssigeenin avulla oli tarkoitus saada normalisoitua eri solulinjojen ja työvaiheiden aiheuttamat variaatiot tuloksiin.

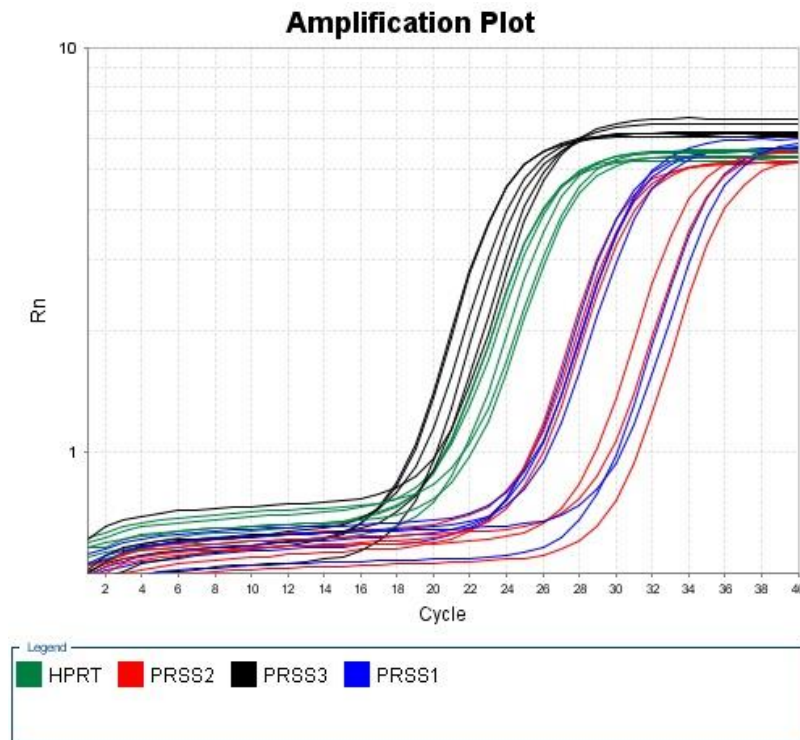
Kvantitatiivisen PCR:n tulosten analysoimiseen Excel-tilukkolaskentaohjelmassa käytettiin suhteellista laskentamenetelmää, jossa referenssigeenin ekspressio suhteutettiin kohdegeenin ekspressioon. Laskutoimitukset suoritettiin Livakin ja Schmittgenin vuonna 2001 kehittämällä  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  -kaavalla. (Livak – Schmittgen 2001: 403.) Kaavan ensimmäinen delta saatiin, kun kohdegeenin Ct vähennettiin referenssigeenin Ct:stä. Seuraava delta voitiin laskea edellisen tuloksen perusteella, kun  $2^{\Delta}$ :sta vähennettiin ensimmäisen deltan lukuarvo. Näiden laskutoimitusten jälkeen joko nollakontrolli tai siN asetettiin lukuarvoon 1 (100 %), johon muita näytteitä suhteutettiin.

## 7.2 Tulokset kuvaajien avulla havainnollistettuna

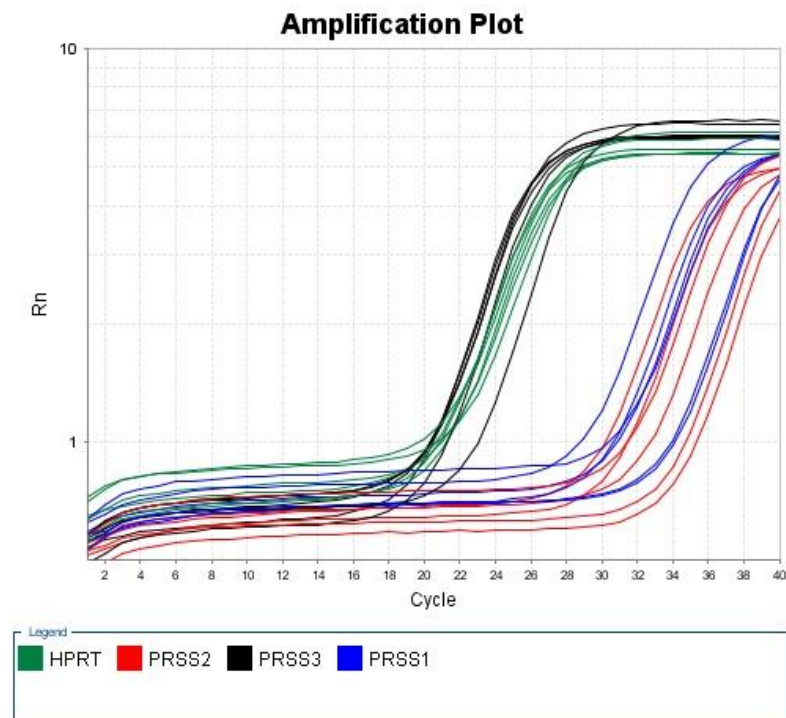
Tulosten perusteella voidaan todeta kaikkien qRT-PCR:ssä käytettyjen alukkeiden toimineen toivotulla tavalla. Amplification Plot -kuvaajista (kuviot 7, 8 ja 9) käy ilmi, että kaikissa solulinjoissa on PRSS3-geeniä PRSS1 ja -2 -geenejä enemmän. Solulinjoista ALVA-31:ssä on nähtävissä kaikkein vähiten PRSS2-geeniä.

Kvantitatiivisessa reaaliaikaisessa PCR:ssä oli selvästi havaittavissa hiljentymistä sekä PRSS1 että PRSS2 -geenialueella, kun taas vastaavasti PRSS3-geenin hiljentymistä ei todettu. qRT-PCR -kuvaaja osoittaa myös sen, ettei PRSS2-siRNA:lla näyttäisi olevan vaikutusta vertailugeenin ilmentymiseen. Alla on esitettynä esimerkkikuvaajat (kuviot 7–9) jokaisesta solulinjasta ja vertailugeeninä näissä kuvissa on HPRT1-geeni. Tehokainta hiljentymistä on PC-3M ja ALVA-31 -soluilla, mutta se on myös selkeästi havaittavissa PC-3-solulinjan soluilla (ks. kuvio 10; PRSS2-kuvaaja).

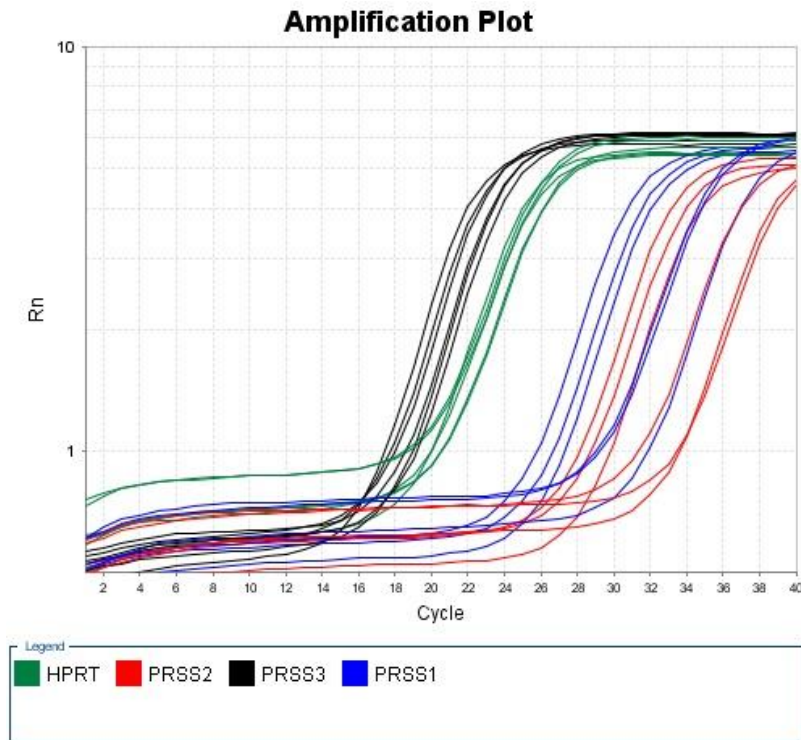




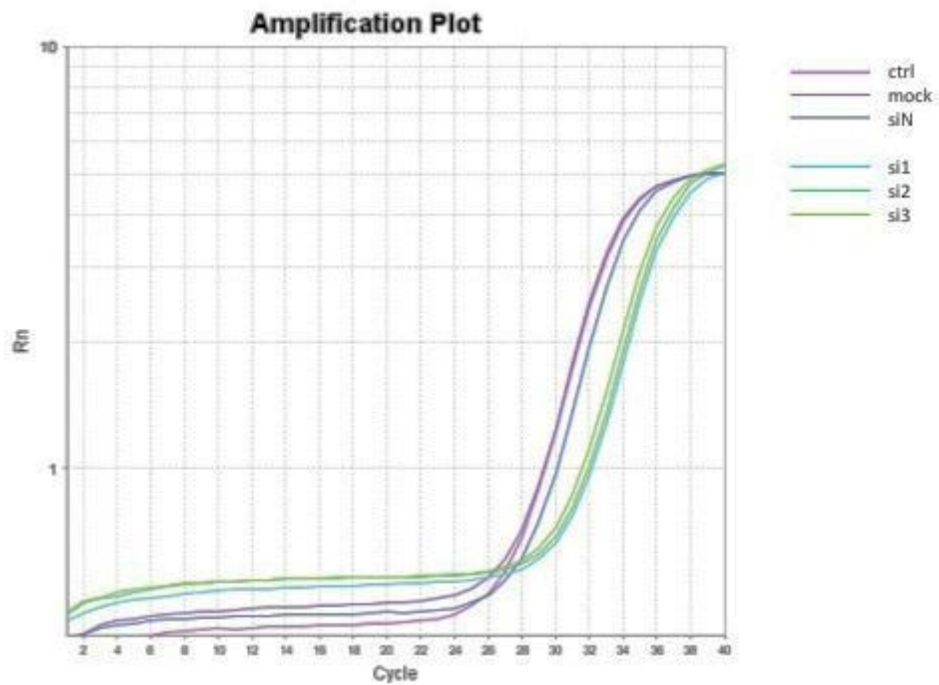
Kuvio 7. qRT-PCR-kuvaaja PC-3-soluista.



Kuvio 8. qRT-PCR-kuvaaja PC-3M-soluista.

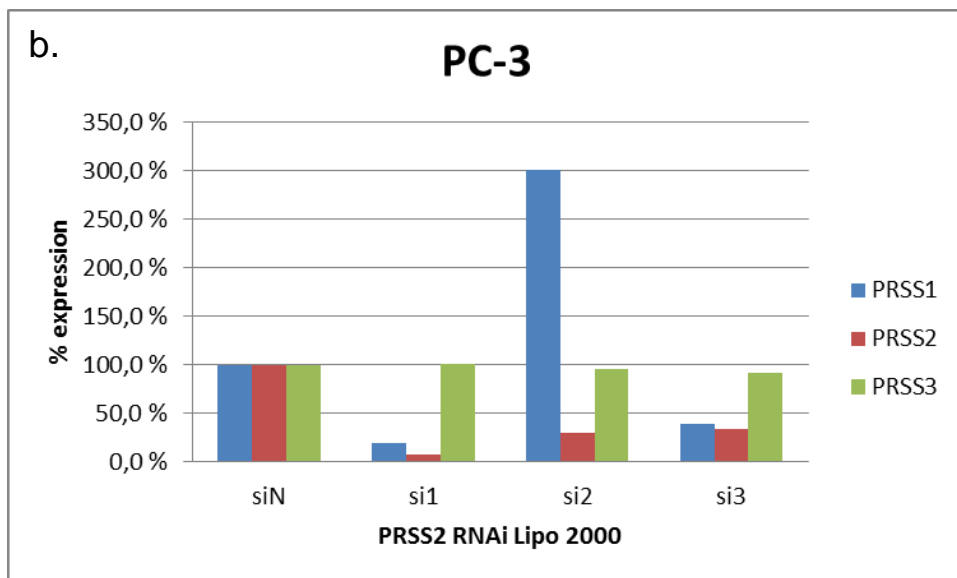
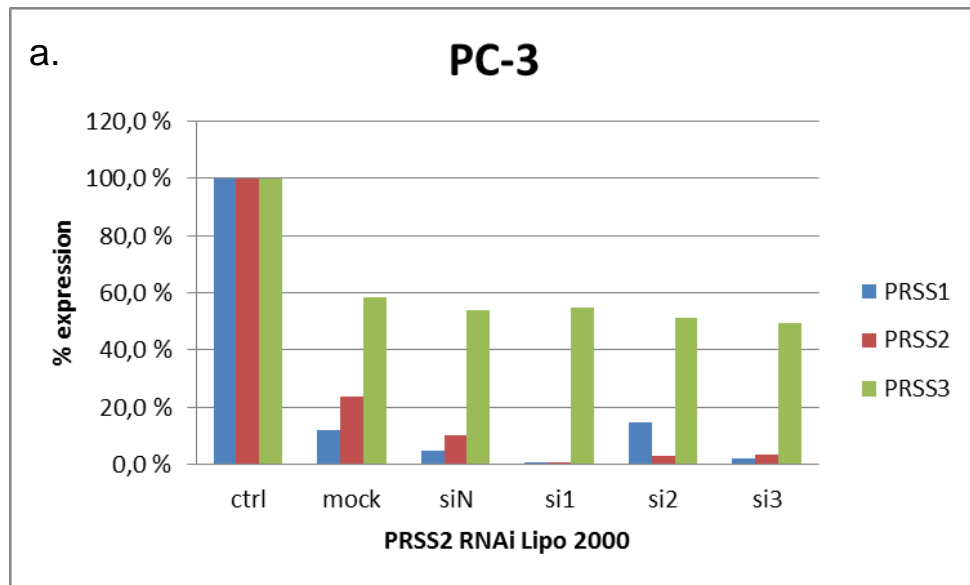


Kuvio 9. qRT-PCR-kuvaaja ALVA-31-soluista.



Kuvio 10. PRSS2-geenialueen monistuskäyrä PC-3-linjan soluista.

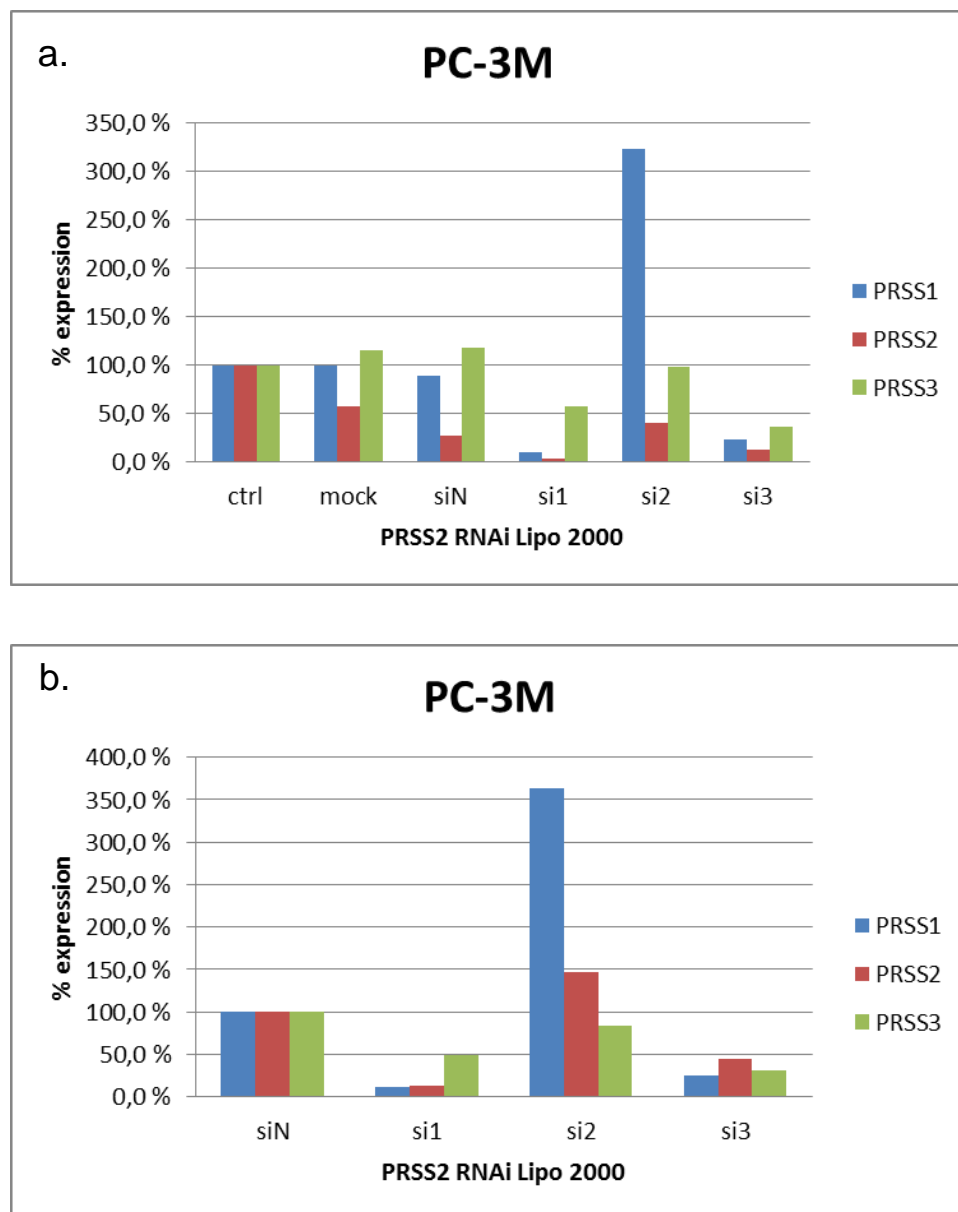
Tulokset laskettiin ja taulukoitiin Excel-taulukkolaskentaohjelmalla pylväsdiagrammeiksi. Ohjelman avulla tuloksia on verrattu valinnaisesti joko nollakontrolliin tai vaihtoehtoisesti ei-targetoivaan negatiiviseen siRNA-kontrolliin. Pylväsdiagrammissa tulokset esitetään suhteellisina prosentteina. Kuvioissa 11–13 on esitelty esimerkkikuvaajat Excel-ohjelmalla tehdyistä diagrammeista.



Kuvio 11. Excel-ohjelmalla lasketut kuvaajat (a. ja b.) PC-3-soluista.

Kuviossa 11 a. PC-3-diagrammissa geenin monistumista on verrattu nollakontrolliin. Geenien hiljentyminen mock-kontrollissa kertoo todennäköisesti transfektioireagenssin toksisesta vaikutuksesta soluihin.

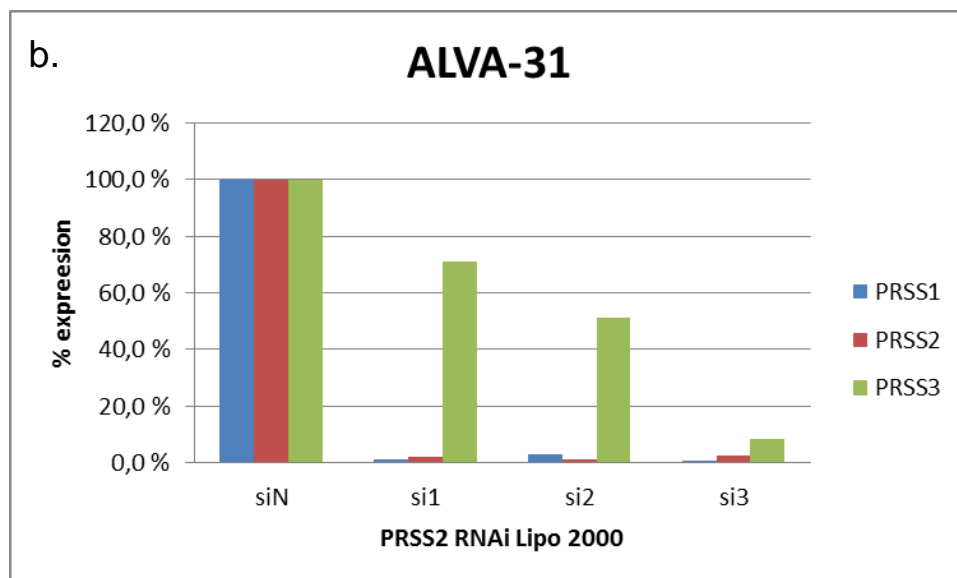
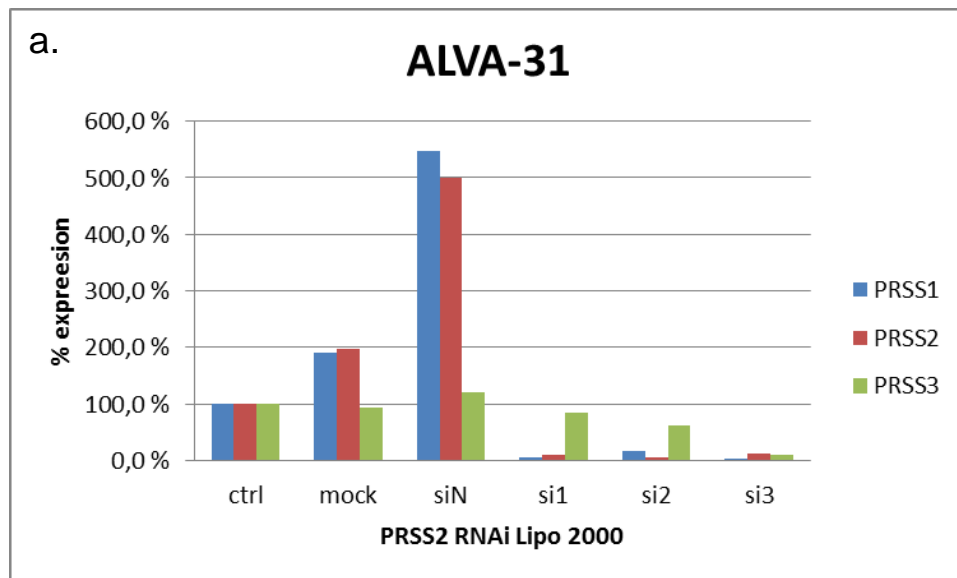
Kuviossa 11 b. PC-3-diagrammissa geenin monistumista on verrattu negatiiviseen siRNA-kontrolliin. PRSS2 si1 ja si3 vaikutti sekä kohdegeenin että PRSS1-geenin ilmentymiseen. Si2-oligo vastaavasti näytti lisäävän PRSS1-geenin ekspressiota, mutta verrattaessa PC-3 a. -diagrammiin relatiivinen määrä on lähellä mock-kontrollin tasoa. PRSS2 siRNA:lla ei ollut vaikutusta PRSS3-geenin ilmentymiseen.



Kuvio 12. Excel-ohjelmalla lasketut kuvaajat (a. ja b.) PC-3M-soluista.

Kuviossa 12 a. PC-3M-diagrammissa geenin monistumista on verrattu nollakontrolliin. PRSS2-geenin hiljentyminen mock-kontrollissa kertoo todennäköisesti transfektio-rea-genssin toksisesta vaikutuksesta soluihin.

Kuviossa 12 b. PC-3M-diagrammissa geenin monistumista on verrattu negatiiviseen siRNA-kontrolliin. PRSS2 si1 ja si3 vaikutti sekä kohdegeenin että PRSS1-geenin ilmen-tymiseen. Näissä soluissa si2-oligo näyttäisi lisäävän PRSS1-geenin ekspressiota, koska piikki näkyy molemmissa diagrammeissa.



Kuvio 13. Excel-ohjelmalla lasketut kuvaajat (a. ja b.) ALVA-31-soluista.

Kuviossa 13 a. ALVA-31-diagrammissa geenin monistumista on verrattu nollakontrolliin. Mock-kontrollin ja negatiivisen kontrollin korkeat piikit ovat todennäköisesti epäpuhtauksista johtuvaa taustaa.

Kuviossa 13 b. ALVA-31-diagrammissa geenin monistumista on verrattu negatiiviseen siRNA-kontrolliin. Geenien hiljentyminen näkyy selvästi kuvaajasta, mutta jostain syystä myös PRSS3-geeni on hiljentynyt si3:n vaikutuksesta.

### 7.3 Tulosten ja niiden luotettavuuden arviointi

Koeolosuhteet pyrittiin vakioimaan alusta loppuun mahdollisimman samankaltaisiksi, jotta toistettavuus koetilanteitten välillä olisi mahdollisimman hyvä. Olosuhteiden vakiointi onnistui siinä määrin, että lopputulokset eri testien välillä ovat keskenään vertailukelpoisia ja olosuhteiden samankaltaisuus poistaa myös olosuhdepoikkeavuudet virhelähteistä. Koska geeniekspression vaimentumista tapahtui PRSS2:n lisäksi myös muilla geenialueilla ja lisäksi osassa testeissä myös kontrolleissa, on otettava huomioon yleisimmät transfektioreaktioihin liittyvät häiriötekijät.

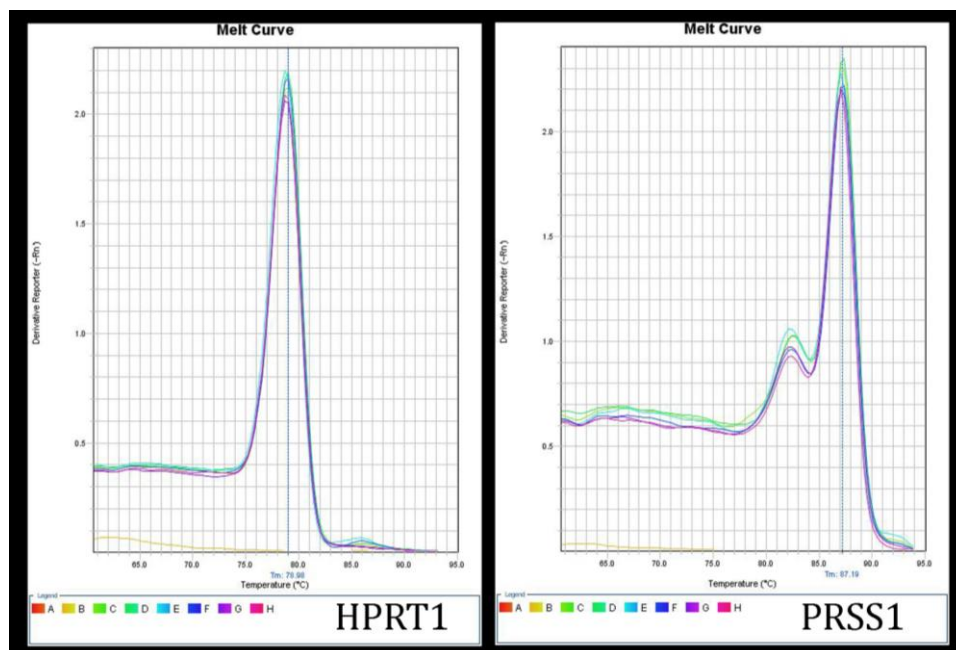
Opinnäytetyössä RNAi-menetelmällä haettu geeniekspression vaimeneminen tulisi olla osoitettavissa vähintään kahdella eri kyseistä geenialuetta targetoivalla oligonukleotidisekvenssillä (oligot 1,2 ja 6 (eli si3)), jotta kokeen tulokset voitaisiin katsoa luotettaviksi. qRT-PCR:llä saadut tulokset kuitenkin osoittivat, että transfektiossa käytetyt oligonukleotidisekvenssit vaimensivat myös PRSS1-geenialuetta, mistä syystä transfektiossa käytetyille oligoille päätettiin tehdä samankaltaisuushaku NCBI:n ylläpitämässä BLAST-tietokannassa. Tietokanta vertaa annettuja sekvenssejä nukleotiditietokantaan, etsien toisiaan vastaavia yhtenäisiä sekvenssialueita rinnastettavista sekvensseistä (highly similar sequences). (Suominen ym. 2010: 224.) Vertailulla haluttiin selvittää, kuinka spesifisiä käytetyt oligot ovat juuri PRSS2:den geenialueelle. Haulla löydetyt tulokset esitettiin liitteessä 5. Tuloksien perusteella voidaan todeta, että oligonukleotidisekvenssi 6:lla (si3) on homologiaa PRSS1 (100 %) ja PRSS3 (85 %) -geenialueille. Tämä selittää mahdollisesti kuviossa 15 nähdyn PRSS3-geenin hiljentymisen PRSS2-siRNA:n johdosta. PRSS1 knockdown si1 -oligonukleotidisekvenssin vaikutuksesta voi olla selitettävissä PRSS1 ja PRSS2 -geenialueiden samankaltaisuudella. Kyseessä voi olla mahdollinen positiivinen palautejärjestelmä (positive feedback loop) geenien säätelyssä (Räsänen 2015).

Yksi yleisimmistä virhelähteistä on siRNA:n liian korkea pitoisuus, jolloin siRNA vaikuttaa myös muiden geenialueiden ekspressioon. Nämä harhaanjohtavat tulokset on vältettävissä matalilla siRNA-pitoisuuksilla. (Flexible RNAi Technologies 2010.) Suoritetuissa testeissä kyseinen siRNA-pitoisuustekijä oli huomioitu (25 nM), ja näin ollen voidaan olettaa, etteivät muilla geenialueilla havaitut reaktiot johtuneet tästä virhemahdollisuudesta. Toinen yleinen häiriötekijä on sytotoksisuus eli soluille myrkylliset osatekijät. Näitä voivat olla esimerkiksi transfektioreagenssi tai jopa siRNA voi itse olla sytotoksinen. Myös monenlaiset stressitekijät, kuten esimerkiksi kuolleet solut, joita viljelystä ei tulisi lainkaan päästä mukaan itse analyyseihin, voivat aiheuttaa vääristymiä tuloksiin. (Flexible RNAi Technologies 2010.) Sytotoksisuus on tekijä, jota ei voida sulkea pois mahdollisista virhelähteistä. Jo se, että käytössä olleessa mock-kontrollissa, jolla esimerkiksi juuri transfektioreagenssin sytotoksisuutta voidaan selvittää, oli joissain kokeissa havaittavissa geeniekspression vaimenemista, kertoo sytotoksisuudesta. Kuolleiden solujen mukaan pääsyä analyyseihin pystyttiin kuitenkin estämään huuhtomalla solukon pinta PBS-lioksella ennen hajotuspuskurin lisäämistä RNA-eristyksen yhteydessä. Onnistuneeseen transfektioon vaaditaan aina elävät, jakautumiskykyiset solut. Koetilanteissa solujen kasvua seurattiin säännöllisesti, ja pääsääntöisesti testeissä käytetyt solukot olivat hyväkuntoisia.

Opinnäytetyö sisälsi useita eri työvaiheita, jotka ovat hyvin herkkiä kontaminaatiolle ja vaativat äärimmäistä huolellisuutta tekijältään. Soluviljelyt tehtiin puhdastiloissa, ja lamiinaarikaappien sekä käytettyjen työvälineiden desinfioinnista huolehdittiin ennen ja jälkeen työn aloittamista. RNA-eristyksen jälkeen näytemateriaalille suoritettiin puhtaus- ja pitoisuusmittaukset, joissa siihen mennessä mahdollisesti aiheutuneet kontaminaatiot olisivat tulleet esiin. Kvantitatiivisen reaaliaikaisen PCR-monistuksen yhteydessä mahdollisia kontaminaatioita selvitettiin vesikontrollien avulla. Myös mahdolliset virheet pipetoinneissa olisivat tulleet näkyviin PCR-ajon yhteydessä.

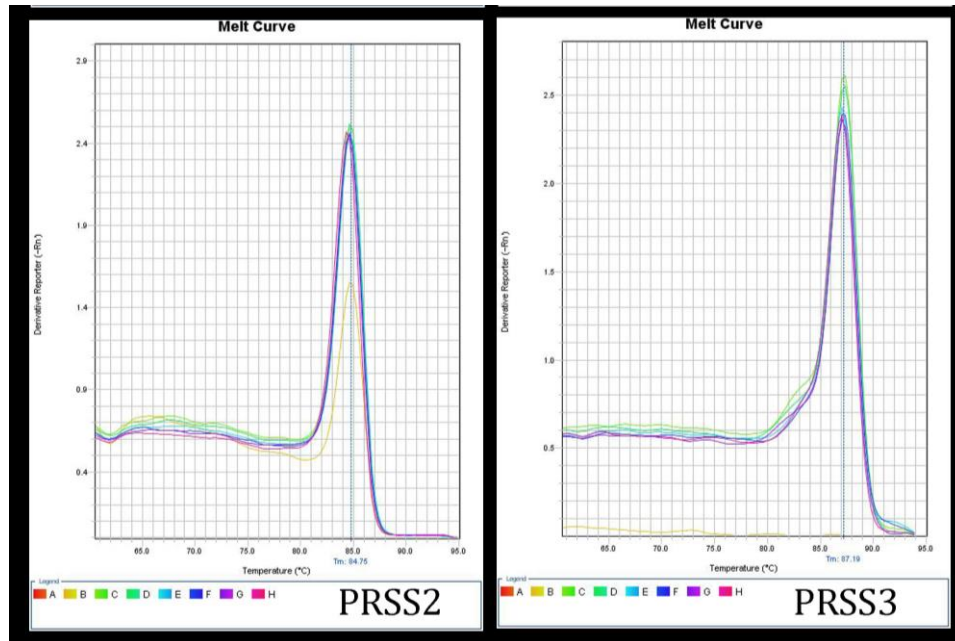
Monistustuotteen detektoinnissa qRT-PCR:llä halutun geenituotteen spesifisyyttä sekä käytössä olleen SYBR Green -väriaineen toimivuutta testattiin monistuksen lopussa sulamiskäyräanalyysin avulla. SYBR Green tarttuu kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:han, joten alukkeiden on oltava erittäin huolellisesti suunniteltuja epäspesifisen sitoutumisen ja primer-dimereiden välttämiseksi. Sulamiskäyräanalyysin (Melting curve / Dissociation curve -analysis) avulla voidaan SYBR Green -menetelmää käytettäessä luokitella PCR-tuotteita ja sitä kautta alukkeiden epäspesifistä sitoutumista. Sulamiskäyrä kuvaa fluoresenssin intensiteetin vähenemistä DNA:n denaturoituessa yksijuosteiseksi. Analyysi

suoritetaan qRT-PCR-ohjelman lopussa normaali syklien päätyttyä (sivun 25 kuviossa 5. nähtävä Stage 3). Sulamiskäyräanalyysissä monistustuotteen lämpötilaa nostetaan 60 °C:sta 95 °C:een. Samanaikaisesti lämpötilan kohoamisen kanssa seurataan fluoresenssia, joka alkaa laskemaan DNA:n denaturoituessa yksijuosteiseksi. Fluoresenssi laskee, koska SYBR Green -väriaine irtoaa yksisäikeisestä DNA:sta eikä sitoutumattomana fluoresoi. Kaikella kaksijuosteisella DNA:lla on sille ominainen sulamislämpötila ( $T_m$ ), jossa DNA:sta noin 50 % on yksijuosteisessa muodossa. Sulamislämpötilaan vaikuttaa DNA-templaatin pituus sekä sekvenssin G-C-emästen pitoisuus. Guaniinin ja sytosiinin väliset kolminkertaiset vetysidokset nostavat sulamislämpötilaan ( $T_m$ ). Käyrä esitetään yleensä lämpötilan funktiona muodossa  $-dF/dT$  (fluoresenssin muutos suhteutettuna lämpötilan muutokseen). (Life Technologies 2012; Suominen ym. 2010: 168–169.) Kuviossa 14 a. ja b. on esitelty ensimmäisen HPRT1-referenssigeeninillä tehdyn qRT-PCR-monistuksen sulamiskäyräanalyysit. PRSS1-geenisekvenssin spesifisen PCR-tuotekäyrän vieressä oleva ”olkapää” indikoi mahdollisia alukedimeerejä eli primer-dimereita.



Kuvio 14 a. qRT-PCR-monistuksen sulamiskäyräanalyysit oligonukleotidisekvensseille HPRT1 ja PRSS1.

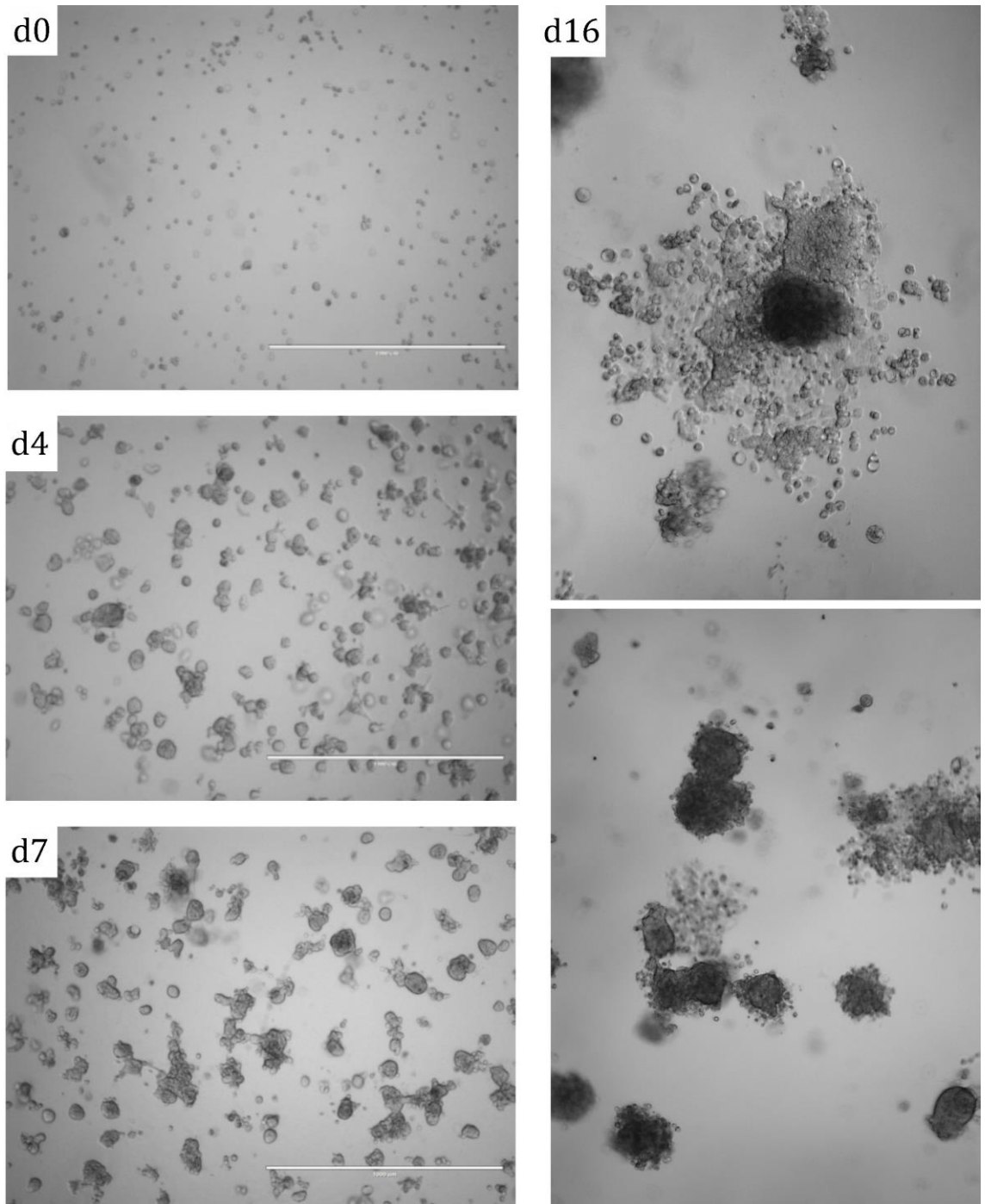




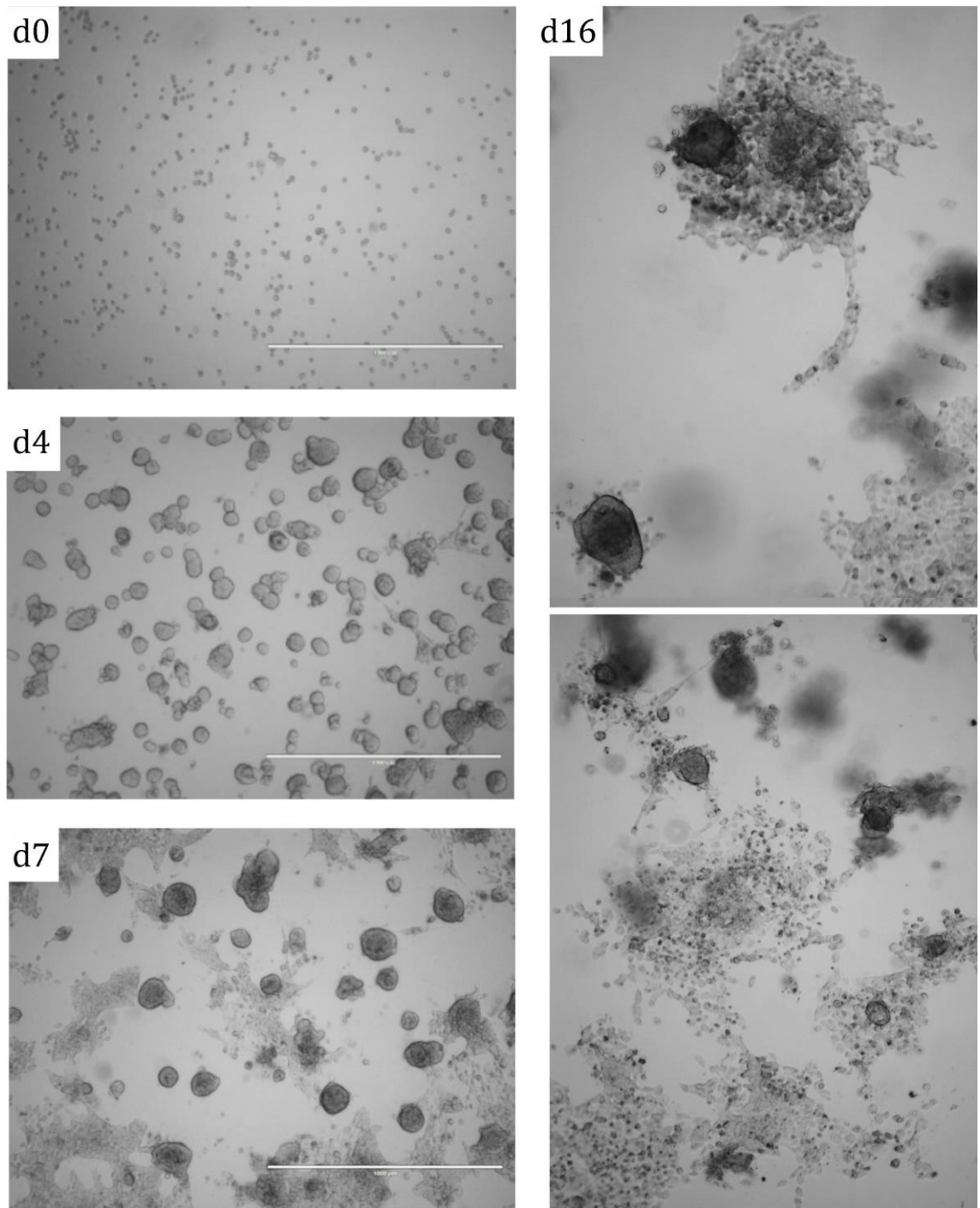
Kuvio 14 b. qRT-PCR-monistuksen sulamiskäyräanalyysit oligonukleotidisekvensseille PRSS2 ja PRSS3.

#### 7.4 3D-kasvatuksen tulokset

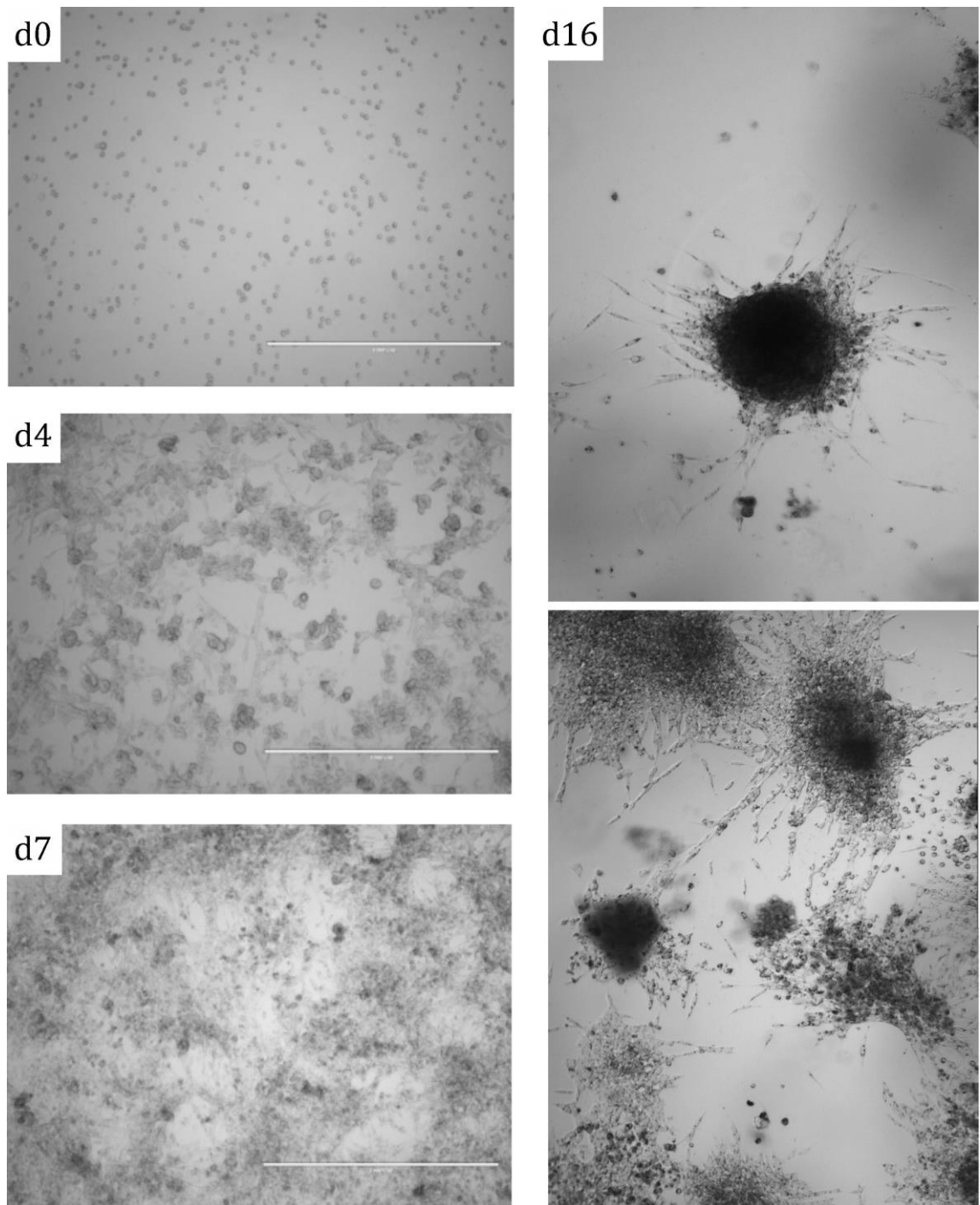
Solulinjojen kasvua matrigeelissä seurattiin ja kuvattiin vuorokauden välein kasvatuksen aloituksesta (d0) aina kuudenteentoista vuorokauteen (d16) saakka, minkä jälkeen viljelmät tuhottiin. Kasvatuksen dokumentointiin käytettiin AMG Evos® -mikroskooppikameraa (4x objektiivi, d16-suurennos kuvankäsittelyohjelmalla). Seuraavien sivujen kuvioihin 15–17 on valittu muutamia kuvia kasvatuksen eri vaiheista, ja niiden on tarkoitus havainnollistaa solulinjojen kasvutapaa, -nopeutta, luonnetta ja invasiivisuutta. Kuvista näkyy, että kaikki kolme solulinjaa muodostavat matrigeelissä spontaaneja solurykelmiä, joissa ne jakautuvat (d4 ja d7). D16-kuvista näkyy, kuinka solut alkavat invasoitumaan matrigeeliin. PC-3-solut invasoivat epiteelisoluille tyypilliseen kollektiiviseen tapaan, kun taas ALVA-31-soluissa on havaittavissa mesenkymaalisten solujen yksittäistä invaasiota. PC-3M-soluissa on nähtävissä kumpaakin invaasio-tapaa.



Kuvio 15. PC-3-eturauhassyöpäsoluminjan kasvua matrigelissä. Kuvat otettu päivinä 0, 4, 7 ja 16.



Kuvio 16. PC-3M-eturauhassyöpäsolulinjan kasvua matrigelissä. Kuvat otettu päivinä 0, 4, 7 ja 16.



Kuvio 17. ALVA-31-eturauhassyöpäsoluminjan kasvua matrigeelissä. Kuvat otettu päivinä 0, 4, 7 ja 16.

## 8 Pohdinta

Työn lopputulosten monimuotoisuus tekee niiden tulkinnasta haasteellista. Osin tulosten perusteella voidaan todeta työn olevan erittäin hyvin onnistunut ja tulosten olevan yksiselitteisiä ja loogisia. Kun tuloksista tehdään kokonaisyhteenveto kuvaajien avulla, ne muuttuvat selvästi epätarkempaan suuntaan. Näin suuressa kokonaisuudessa, jossa liikutaan molekyyllitasolla, on lukematon määrä mahdollisia muuttujia, joten yksittäistä syytä tai tekijää tulosten epätarkkuudelle on mahdoton osoittaa. Jos koetta haluttaisiin vielä jatkaa qRT-PCR-menetelmää käyttäen, tulisi kokeeseen löytää eri geenialuetta targetoivia PRSS2-siRNA-oligoja sekä referenssigeeni, joka toimisi käytettyjä referenssigeenejä paremmin tulosten normalisointiin.

Tutkimusryhmän toimesta tehtiin transfektion jälkeen 6-kuoppalevyiltä kerätyille kasvatusmedioille immunofluorometrinen määrittäminen, jolla mitattiin näytteissä olevan liukoisen trypsiini 2 (TAT2) -proteiinin määrää. Tulokset tukevat qRT-PCR:llä saatuja tuloksia PC-3-solulinjan soluilla, mikä käytännössä tarkoittaa sitä, että liukoisen trypsiini 2 -proteasiinin määrä väheni soluille suoritettuna siRNA-transfektion seurauksena. PC-3M ja ALVA-31 -solulinjoista ei saatu tuloksia, koska niissä kyseisen proteasiinin sekretoituneet määrät jäivät mittausalueen ulkopuolelle.

Jotta kokonaistavoite saavutetaan, eli löydetään mahdollisesti uusi terapiamuoto eturauhassyövän diagnosointiin ja hoitoon, on tutkimustyötä vielä jatkettava. Vaikka opinnäytetyö osoitti, että siRNA-menetelmällä pystytään vaikuttamaan halutun geenin ekspresioon, on vielä paljon tehtävää ennen kuin menetelmä voidaan viedä kokeiltavaksi ihmisiin ja jalostaa kliiniseen käyttöön.

And "So it goes" (Vonnegut 1969 – Slaughterhouse 5)

## Lähteet

Agrawal, Neema – Dasaradhi, P. V. N. – Mohmmed, Asif – Malhotra, Pawan – Bhatnagar, Raj K. – Mukherjee, Sunil K. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309050/>>. Luettu 8.12.2014.

Borgono, C.A. – Diamandis, E.P. 2004. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. Nature Reviews. Cancer 4 (11). 876–890. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516960>>. Luettu 25.9.2014.

Biomedicum Helsinki. Translationaalinen syöpäbiologia. Verkkodokumentti. <[www.biomedicum.fi/](http://www.biomedicum.fi/)>. Luettu 07.10.2014.

Debata, Ashutosh – Debata, Abhitosh – Panda, Darshan 2014. RNAi therapy for the treatment of oral cancer. Academia.edu. Verkkodokumentti. <[http://www.academia.edu/1798048/RNAi\\_therapy\\_in\\_Oral\\_Cancer\\_treatment](http://www.academia.edu/1798048/RNAi_therapy_in_Oral_Cancer_treatment)>. Luettu 20.12.2014

Flexible RNAi Technologies You Can Rely On. 2010. Ohjekirja. My siRNA. Sample & Assay Technologies. QIAGEN®.

Gu, Shuo 2007. RNAi – History, Mechanism and Application. Trends In Bio/ Pharmaceutical Industry 2. 33-38. Verkkodokumentti. <[http://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.tbiweb.org%2Ftbi%2Ffile\\_dir%2FTBI2007%2FTBI2007\\_2\\_33.pdf&ei=WaNVKLaFcj6ygPgrocGgBA&usg=AFQjCNFAOAFwu68fjrIL6ZF5fOYQb1D6UA&bvm=bv.81828268,d.bGQ](http://www.google.fi/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCUQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.tbiweb.org%2Ftbi%2Ffile_dir%2FTBI2007%2FTBI2007_2_33.pdf&ei=WaNVKLaFcj6ygPgrocGgBA&usg=AFQjCNFAOAFwu68fjrIL6ZF5fOYQb1D6UA&bvm=bv.81828268,d.bGQ)>. Luettu 9.12.2014.

Haussecker, Dirk 2014. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. PubMed. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111131>>. Luettu 12.12.2014.

HUSLAB, Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiiri.2014. Tutkimusohjekirja. Haku tutkimusohjekirjasta. Verkkodokumentti. <<http://www.huslab.fi/ohjekirja/index.html>>. Luettu 2.12.2014.

Itkonen, Outi 2010. Human trypsinogens in the pancreas and in cancer. Väitöskirja. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation 70: 136–143. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <[http://scholar.google.fi/scholar\\_url?url=https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/22456/humantry.pdf%3Fsequence%3D1%26origin%3Dpublication\\_detail&hl=fi&sa=X&scisig=AAGBfm1E4eAWxa-HJFHYO8J5RPQkTXFy3w&oi=scholar&ei=LF6NVOjPIOrnygOJ1oC4CQ&ved=0CCEQgAMoADAA](http://scholar.google.fi/scholar_url?url=https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/22456/humantry.pdf%3Fsequence%3D1%26origin%3Dpublication_detail&hl=fi&sa=X&scisig=AAGBfm1E4eAWxa-HJFHYO8J5RPQkTXFy3w&oi=scholar&ei=LF6NVOjPIOrnygOJ1oC4CQ&ved=0CCEQgAMoADAA)>.

IST Online 2014. Verkkodokumentti. <<http://ist.medisapiens.com/>>. Luettu 28.12.2014.

Klug, William S. – Cummings, Michael R. – Spencer, Charlotte A. – Palladino, Michael A. 2011. Concepts of Genetics. 10. uudistettu painos. Mastering Genetics, Pearson eText. Verkkodokumentti. <<http://www.pearsonmylabandmastering.com/northamerica/masteringgenetics/>>. Luettu 06.10.2014.

Knuutila, Sakari 2012. Polymeerasiketjureaktio (PCR). Teoksessa Mäkinen, M. – Carpén, O – Kosma, V-M. – Lehto, V-P. – Paavonen, T. – Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Duodecim, 1185–1188.

Kozlowski, J.M. – Fidler, I.J. – Campbell, D. – Xu, Z.L. – Kaighn, M.E. – Hart, I.R. 1984. Metastatic Behavior of Human Tumor Cell Lines Grown in the Nude Mouse, *Cancer Research* 44. 3522–3529. Verkkodokumentti. <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/44/8/3522.full.pdf>>. Luettu 13.1.2015.

Kujala, Paula 2012. Eturauhanen. Teoksessa Mäkinen, M. – Carpén, O – Kosma, V-M. – Lehto, V-P. – Paavonen, T. – Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Duodecim, 800-803.

Käypä hoito –suositus. Eturauhassyöpä. 2014. Duodecim <<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suositukset/suositus?id=hoi11060>>. Luettu 6.12.2014

Lawrence, M.G. – Lai, J. – Clements, J.A. 2010. Kallikreins on steroids: Structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocrine Reviews* 31 (4). 407–446. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103546>>. Luettu 25.9.2014.

Life Technologies 2012. Real-time PCR handbook. Verkkodokumentti. <<http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>>. Luettu 2.1.2015.

Lippolis, G. – Edsjö, A. – Stenman, U-H. – Bjartell, A. 2013. A high-density tissue microarray from patients with clinically localized prostate cancer reveals ERG and TATI exclusivity in tumor cells. *Prostate Cancer and Prostatic Disease* 16. 145–150. Verkkodokumentti. <<http://www.deepdyve.com/lp/pubmed-central/a-high-density-tissue-microarray-from-patients-with-clinically-Vpl52muX0O/1>>. Luettu 25.9.2014.

Livak, K. J. – Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of the relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25. 402-408. Verkkodokumentti. <[http://dingo.ucsf.edu/twiki/pub/Cores/BioinformaticsCore/QPCR/Livak\\_Schmittgen2001.pdf](http://dingo.ucsf.edu/twiki/pub/Cores/BioinformaticsCore/QPCR/Livak_Schmittgen2001.pdf)>. Luettu 1.1.2015.

Lopez-Otin, C. – Matrisian, L.M. 2007. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nature Reviews. Cancer* 7 (10). 800–808. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17851543>>. Luettu 25.9.2014.

Lyly, Teppo 2012. Sanasto. Teoksessa Mäkinen, M. – Carpén, O – Kosma, V-M. – Lehto, V-P. – Paavonen, T. – Stenbäck, F. (toim.) Patologia. 1. painos. Helsinki: Duodecim, 1208.

Mason, S.D. – Joyce, J.A. 2011. Proteolytic networks in cancer. *Trends in Cell Biology* 21 (4). 228–237. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232958>>. Luettu 25.9.2014.

Mattsson, Johanna 2014. Antiangiogenic and Proteolytic Activities of Prostate-Specific Antigen. Väitöskirja 31/2014. Vantaa: Hansaprint Oy. Luettavissa myös sähköisesti osoitteessa <<https://helda.helsinki.fi/handle/10138/136464>>.

Mustajoki, Pertti – Kaukua, Jarmo 2008. Miesten tutkimuksia P-PSA. Duodecim. Terveyskirjasto. Verkkodokumentti. <[http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=snk03230](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=snk03230)>. Luettu 2.12.2014.

Paju, Annukka – Bjartell, Anders – Zhang, Wan-Ming – Nordling, Stig – Borgström, Anders – Hansson, Jens – Stenman, Ulf-Håkan 2000. Expression and Characterization of Trypsinogen Produced in the Human Male Genital Tract. The American Journal of Pathology 157 (6). 2011–2021. Verkkodokumentti. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1885775/>>. Luettu 25.9.2014.

Partanen, Johanna – Klefström, Juha 2008. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 124(21). 2444-2451. Verkkodokumentti. <[http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/haku;jsessionid=1EF17D40067B9A8C56E55724C346F7CC?p\\_p\\_id=Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet\\_p\\_frompage=uusinumero&Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet\\_viewType=viewArticle&Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet\\_tunnus=duo97615](http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/haku;jsessionid=1EF17D40067B9A8C56E55724C346F7CC?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_lifecycle=0&Article_WAR_DL6_Articleportlet_p_frompage=uusinumero&Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo97615)>. Luettu 29.12.2014.

Pietilä, Elina 2012. Optimization of siRNA transfection for breast and glioma cancer cell cultures. Opinnäytetyö. Turku: Turun ammattikorkeakoulu. Bio- ja Elintarviketekniikka. Biotekniikan koulutusohjelma. Verkkodokumentti. <<http://www.theseus.fi/handle/10024/48795>>. Luettu 30.12.2014

Ribas, Antoni 2010. Study Provides Proof in Humans of RNA Interference Using Targeted Nanoparticles. UCLA Jonsson Comprehensive Cancer Center Research. Verkkodokumentti. <<http://www.cancer.ucla.edu/index.aspx?recordid=334&page=644>>. Luettu 28.12.2014.

Räsänen, Kati 2014. Tutkija. Kliinisen kemian yksikkö. Haartman-instituutti. Helsinki. Suullinen tiedonanto 15.9.2014.

Räsänen, Kati 2014. Tutkija. Kliinisen kemian yksikkö. Haartman-instituutti. Helsinki. Suullinen tiedonanto 13.1.2015.

Saksela, Kalle 2002. RNA-interferenssi virustautien torjuntaan?. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim 21. 2191–2198. Verkkodokumentti. <[http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p\\_p\\_id=Article\\_WAR\\_DL6\\_Articleportlet&viewType=viewArticle&tunnus=duo93237&dlehtihaku\\_view\\_article\\_WAR\\_dlehtihaku\\_p\\_auth=>](http://duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&viewType=viewArticle&tunnus=duo93237&dlehtihaku_view_article_WAR_dlehtihaku_p_auth=>)>. Luettu 8.12.2014.

Solunetti 2006. Verkkodokumentti. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/syopa/>> Luettu 06.10.2014.

Suomen syöpärekisteri, päivitetty 24.04.2014. Verkkodokumentti. <[www.syoparekisteri.fi](http://www.syoparekisteri.fi)>. Luettu 06.10.2014.

Suominen, Ilari - Pärssinen, Raimo - Haajanen, Kari - Pelkonen, Jani 2010. Geenitekniikka. Turun ammattikorkeakoulun oppimateriaaleja 52. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy.

Syöpäjärjestöt 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.cancer.fi/>>. Luettu 06.10.2014.

Tammela, T. – Utriainen, T. – Rosenberg-Ryhänen, L. 2014. Eturauhassyöpöpotilaan opas. Suomen Syöpöpotilaat ry. Uudistettu painos 2014. Redfina. Verkkodokumentti. <<http://syopapotilaat-fi-bin.directo.fi/@Bin/492e94ec61d9d1ed032ef1480de2ad1f/>>



1412577075/application/pdf/27898/SSP\_Eturaussyopa\_2014\_netti.pdf>. Luettu 06.10.2014.

Turpeenoja, Leena 2005. Biokemiaa. Vantaa: Dark Oy.

Turun yliopisto 2014. Miljoonarahoitus aivosyövän uuden hoitostrategian kehittämiseen. Verkkodokumentti. <<http://www.utu.fi/fi/Ajankohtaista/mediatiedotteet/Sivut/miljoonarahoitus-aivosyovan-uuden-hoitostrategian-kehittamiseen.aspx>>. Luettu 28.12.2014.

UniProt BLAST 2014. Verkkodokumentti. <<http://www.uniprot.org/blast/uniprot/B2015011294DQI432UQ>>. Luettu 13.1.2015.

Varella-Garcia, M. – Boomer, T. – Miller, G.J. 2001. Karyotypic Similarity Identified by Multiplex-FISH Relates Four Prostate Adenocarcinoma Cell Lines: PC-3, PPC-1, ALVA-31, and ALVA-41. *Genes, Chromosomes & Cancer* 31(4). 303-315.

Wu, Sherry Y. – Lopez-Berestein, Gabriel – Calin, George A. – Sood, Anil K. 2014. RNAi Therapies: Drugging the Undruggable American Association for the Advancement of Science. Verkkodokumentti. <<http://stm.sciencemag.org/content/6/240/240ps7>>. Luettu 9.12.2014.

## Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent -työohje

Protocol Pub. No. MAN0007824 Rev.1.0

## Lipofectamine® 2000 Reagent

**Package Contents**

Catalog Number	Size
• 11668-030	0.3 mL vial
• 11668-027	0.75 mL vial
• 11668-019	1.5 mL vial
• 11668-500	15 mL vial

**Storage Conditions**

Store at 4°C (do not freeze).

**Required Materials**

- Plasmid DNA (0.5–5 µg/µL stock)
- Opti-MEM® Reduced Serum Medium
- Eppendorf tubes

**Timing**

Preparation: 10 minutes  
Incubation: 5 minutes  
Final Incubation: 1–3 days

**Selection Guide**

[Lipofectamine® Reagents](#)  
Go online to view related products.

**Product Description**

- Lipofectamine® 2000 Reagent is a proprietary formulation for transfecting nucleic acids into a wide range of eukaryotic cells.


**Important Guidelines**

- DNA-Lipofectamine® 2000 complexes must be made in serum-free medium such as Opti-MEM® Reduced Serum Medium and can be added directly to cells in culture medium, in the presence or absence of serum/antibiotic.
- It is not necessary to remove complexes or change/add medium after transfection.
- The amount of Lipofectamine® 2000 Reagent required for successful transfection varies depending on the cell type and passage number. Start any new transfection by testing the recommended four concentrations of Lipofectamine® 2000 Reagent to determine an optimum amount.

**Online Resources**

Visit our [product page](#) for additional information and protocols. For support, visit [www.lifetechnologies.com/support](http://www.lifetechnologies.com/support).

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



**invitrogen**  
by life technologies™

**Protocol Outline**

- Plate cells so they will be 70–90% confluent at the time of transfection.
- Prepare plasmid DNA-lipid complexes.
- Add DNA-lipid complexes to cells.

**Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol**

See page 2 to view a typical DNA transfection procedure.

Component	96-well	24-well	6-well
Final DNA per well	100 ng	500 ng	2500 ng
Final Lipofectamine® 2000 Reagent per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL

**Co-Transfection of Plasmid DNA and siRNA**

Transfect plasmid DNA and siRNA at the same time using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 30 pmol (~0.6 µg) of siRNA per 1 µg of DNA.

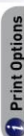
**mRNA Transfection**

mRNA can be transfected in a 24-well plate using Lipofectamine® 2000 Reagent by adding 0.5–1 µg of mRNA per well.

**Photograph of Expected Results**

**Scaling Up or Down Transfections**

**Limited Product Warranty and Disclaimer Details**



*life* technologies™

Lipofectamine® 2000 Reagent Protocol 2013

## Lipofectamine® 2000 DNA Transfection Reagent Protocol





























Transfect cells according to the following chart. Volumes are given on a per-well basis. Each reaction mix is sufficient for triplicate (96-well), duplicate (24-well), and single well (6-well) transfections, and accounts for pipetting variations. Adjust the amounts of components according to your tissue culture format. For additional information on scaling your transfection reaction, see page 1.

	Timeline	Steps	Procedure Details																																
Day 0	1	Seed cells to be 70–90% confluent at transfection	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>96-well</th> <th>24-well</th> <th>6-well</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Adherent cells</td> <td>1–4 × 10<sup>4</sup></td> <td>0.5–2 × 10<sup>5</sup></td> <td>0.25–1 × 10<sup>6</sup></td> </tr> <tr> <td>Opti-MEM® Medium</td> <td>25 µL × 4</td> <td>50 µL × 4</td> <td>150 µL × 4</td> </tr> <tr> <td>Lipofectamine® 2000 Reagent</td> <td>1, 1.5, 2, 2.5 µL</td> <td>2, 3, 4, 5 µL</td> <td>6, 9, 12, 15 µL</td> </tr> <tr> <td>Opti-MEM® Medium</td> <td>125 µL</td> <td>250 µL</td> <td>700 µL</td> </tr> <tr> <td>DNA (0.5–5 µg/µL)</td> <td>2.5 µg</td> <td>5 µg</td> <td>14 µg</td> </tr> <tr> <td>Diluted DNA Total</td> <td>25 µL</td> <td>50 µL</td> <td>150 µL</td> </tr> <tr> <td>Diluted Lipofectamine® 2000 Reagent</td> <td>25 µL</td> <td>50 µL</td> <td>150 µL</td> </tr> </tbody> </table>	Component	96-well	24-well	6-well	Adherent cells	1–4 × 10 <sup>4</sup>	0.5–2 × 10 <sup>5</sup>	0.25–1 × 10 <sup>6</sup>	Opti-MEM® Medium	25 µL × 4	50 µL × 4	150 µL × 4	Lipofectamine® 2000 Reagent	1, 1.5, 2, 2.5 µL	2, 3, 4, 5 µL	6, 9, 12, 15 µL	Opti-MEM® Medium	125 µL	250 µL	700 µL	DNA (0.5–5 µg/µL)	2.5 µg	5 µg	14 µg	Diluted DNA Total	25 µL	50 µL	150 µL	Diluted Lipofectamine® 2000 Reagent	25 µL	50 µL	150 µL
Component	96-well	24-well	6-well																																
Adherent cells	1–4 × 10 <sup>4</sup>	0.5–2 × 10 <sup>5</sup>	0.25–1 × 10 <sup>6</sup>																																
Opti-MEM® Medium	25 µL × 4	50 µL × 4	150 µL × 4																																
Lipofectamine® 2000 Reagent	1, 1.5, 2, 2.5 µL	2, 3, 4, 5 µL	6, 9, 12, 15 µL																																
Opti-MEM® Medium	125 µL	250 µL	700 µL																																
DNA (0.5–5 µg/µL)	2.5 µg	5 µg	14 µg																																
Diluted DNA Total	25 µL	50 µL	150 µL																																
Diluted Lipofectamine® 2000 Reagent	25 µL	50 µL	150 µL																																
Day 1	2	Dilute four amounts of Lipofectamine® Reagent in Opti-MEM® Medium	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>96-well</th> <th>24-well</th> <th>6-well</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DNA-lipid complex per well</td> <td>10 µL</td> <td>50 µL</td> <td>250 µL</td> </tr> <tr> <td>Final DNA used per well</td> <td>100 ng</td> <td>500 ng</td> <td>2500 ng</td> </tr> <tr> <td>Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well</td> <td>0.2–0.5 µL</td> <td>1.0–2.5 µL</td> <td>5.0–12.5 µL</td> </tr> </tbody> </table>	Component	96-well	24-well	6-well	DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL	Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng	Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL																
	Component	96-well		24-well	6-well																														
	DNA-lipid complex per well	10 µL		50 µL	250 µL																														
Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng																																
Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL																																
3	Dilute DNA in Opti-MEM® Medium																																		
4	Add diluted DNA to diluted Lipofectamine® 2000 Reagent (1:1 ratio)																																		
5	Incubate	Incubate for 5 minutes at room temperature.																																	
Day 2–4	6	Add DNA-lipid complex to cells	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Component</th> <th>96-well</th> <th>24-well</th> <th>6-well</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DNA-lipid complex per well</td> <td>10 µL</td> <td>50 µL</td> <td>250 µL</td> </tr> <tr> <td>Final DNA used per well</td> <td>100 ng</td> <td>500 ng</td> <td>2500 ng</td> </tr> <tr> <td>Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well</td> <td>0.2–0.5 µL</td> <td>1.0–2.5 µL</td> <td>5.0–12.5 µL</td> </tr> </tbody> </table>	Component	96-well	24-well	6-well	DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL	Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng	Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL																
	Component	96-well		24-well	6-well																														
DNA-lipid complex per well	10 µL	50 µL	250 µL																																
Final DNA used per well	100 ng	500 ng	2500 ng																																
Final Lipofectamine® 2000 Reagent used per well	0.2–0.5 µL	1.0–2.5 µL	5.0–12.5 µL																																
7	Visualize/analyze transfected cells	Incubate cells for 1–3 days at 37°C. Then analyze transfected cells.																																	

## NucleoSpin® RNA isolation Kit -tuotepakkauksen työhohje

### RNA isolation

#### Protocol-at-a-glance (Rev. 15)

	Mini	Midi
	NucleoSpin® RNA	NucleoSpin® RNA Midi
1 Homogenize sample	 30 mg	 100 mg
2 Lyse cells	 350 µL RA1 3.5 µL β-mercaptoethanol Mix	 1.8 mL RA1 18 µL β-mercaptoethanol Mix
3 Filtrate lysate	  11,000 x g, 1 min	  4,500 x g, 10 min
4 Adjust RNA binding conditions	350 µL 70% ethanol Mix	1.8 mL 70% ethanol Mix
5 Bind RNA	  Load sample 11,000 x g, 30 s	  Load sample 4,500 x g, 3 min
6 Desalt silica membrane	  350 µL MDB 11,000 x g, 1 min	  2.2 mL MDB 4,500 x g, 3 min
7 Digest DNA	 95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min	 250 µL DNase reaction mixture RT, 15 min
8 Wash and dry silica membrane	 1 <sup>st</sup> wash 200 µL RAW2 2 <sup>nd</sup> wash 600 µL RA3 3 <sup>rd</sup> wash 250 µL RA3   1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> 11,000 x g, 30 s  3 <sup>rd</sup> 11,000 x g, 2 min	 1 <sup>st</sup> wash 2.6 mL RAW2 2 <sup>nd</sup> wash 2.6 mL RA3 3 <sup>rd</sup> wash 2.6 mL RA3   1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> 4,500 x g, 3 min  3 <sup>rd</sup> 4,500 x g, 5 min
9 Elute highly pure RNA	  60 µL RNase-free H <sub>2</sub> O 11,000 x g, 1 min	  500 µL RNase-free H <sub>2</sub> O RT, 2 min 4,500 x g, 3 min

## SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit -tuotepakkauksen työhje

### SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit

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



A Meridian Life Science® Company

Store at -20°C

#### Storage and stability:

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

#### Unit definitions:

Reverse Transcriptase: One unit catalyzes the incorporation of 1nmol of dTTP into acid-insoluble material in 10 minutes at 37°C in 50mM Tris-HCl, pH 8.6, 40mM KCl, 1mM MnSO<sub>4</sub>, 1mM DTT, and 0.5mM [3H]TTP, using 200µM oligo(dT)<sub>12-18</sub>-primed poly(A)<sub>n</sub> as template.

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

#### Safety precautions:

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

### Description

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

### Components

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

### SensiFAST cDNA Synthesis Mix Reaction Guidelines

#### Template Quality

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

#### RNA Priming

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

#### Reverse Transcription

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

#### No RT Control

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

### DNase I digestion of total RNA

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

### SensiFAST cDNA Synthesis Kit Protocol

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

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

\* Available separately (see Associated Products)

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

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

## SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit -tuotepakkauksen työhje

### Procedure

**Reaction mix composition:** Prepare a PCR mastermix. The volumes given below are based on a standard 20µl final reaction mix and can be scaled accordingly.

Reagent	Volume	Final concentration
2x SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix	10µl	1x
10µM forward primer	0.8µl	400nM
10µM reverse primer	0.8µl	400nM
Template	up to 8.4µl	
H <sub>2</sub> O	As required	
<b>20µl Final volume</b>		

**Sensitivity testing and C<sub>t</sub> values:** When comparing SensiFAST with a mix from another supplier we strongly recommend amplifying from a 10-fold template dilution series. Loss of detection at low template concentration is the only direct measurement of sensitivity. An early C<sub>t</sub> value is not an indication of good sensitivity, but rather an indication of speed. In some instances increasing final MgCl<sub>2</sub> concentration to 6mM will reduce C<sub>s</sub> for difficult amplicons.

**Suggested real-time PCR conditions:** The following real-time PCR conditions are suitable for the SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit with amplicons of up to 200bp. However, the cycling conditions can be varied to suit different machine-specific protocols. It is not recommended to use annealing temperatures below 60°C or combined annealing/extension times longer than 30 seconds.

SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit is compatible with either 3-step or 2-step cycling:

Cycles	Temp.	Time	Notes
1	*95°C	*2min	Polymerase activation
40	95°C 60-65°C 72°C	5s 10s **5-20s	Denaturation Annealing Extension (acquire at end of step)

\*2min for cDNA, 3min for genomic DNA  
\*\*Not recommended to extend beyond 20 seconds

#### • 2-step cycling

Cycles	Temp.	Time	Notes
1	*95°C	*2min	Polymerase activation
40	95°C 60-65°C	5s **15-30s	Denaturation Annealing/extension (acquire at end of step)

\*2min for cDNA, 3min for genomic DNA  
\*\*Not recommended to anneal/extend beyond 30 seconds

**Optional analysis:** After the reaction has reached completion, refer to the instrument instructions for the option of melt-profile analysis .

### Troubleshooting guide

Problem	Possible Cause	Recommendation
No amplification trace AND No product on agarose gel	Activation time too short	For cDNA templates, make sure SensiFAST SYBR Lo-ROX is activated for 2min at 95°C before cycling. For more complex templates such as genomic DNA, increase activation time up to 3 minutes.
	Error in protocol setup	Verify that correct reagent concentrations, volumes, dilutions and storage conditions have been used
	Suboptimal primer design	Use primer design software or validated assay. Test assay on a control template
	Incorrect concentration of primers	Use primer concentrations between 100nM and 1µM
	Template degraded	Re-isolate your template from the sample material or use freshly prepared template dilution.
	Primers degraded	Use newly synthesized primers
	Template contaminated with PCR inhibitors	Further dilute template before PCR or purify template and resuspend it in PCR-grade water
Template concentration too low	Increase concentration used	
Cycling conditions not optimal	Increase extension/annealing times, increase cycle number	



## siPRSS2-oligonukleotidisekvenssien samankaltaisuushaun tulokset

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession	Column1
Transcripts							
<b>Hs_PRSS2_1</b>							
S100043001							
CACCATGAATCTACTCTGAT							
Select seq ref XM_006725058.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X4, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006725058.1
Select seq ref XM_005276996.2	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X1, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_005276996.2
Select seq ref XM_006716053.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X2, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006716053.1
Select seq ref XM_006716052.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X1, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006716052.1
Select seq ref XM_005276998.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X3, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_005276998.1
Select seq ref NM_002770.2	Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	NM_002770.2
Select seq ref NR_073590.1	Homo sapiens glutaminyl-HRNA synthetase (QARS), transcript variant 3, long non-coding RNA	30.2	30.2	71 %	22	100 %	NR_073590.1
Select seq ref NM_001272073.1	Homo sapiens glutaminyl-HRNA synthetase (QARS), transcript variant 2, mRNA	30.2	30.2	71 %	22	100 %	NM_001272073.1
<b>Hs_PRSS2_2</b>							
S102629522							
CAGCCGGACTCTGGACAATGA							
Select seq ref XM_006725058.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X4, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006725058.1
Select seq ref XM_005276996.2	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X1, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_005276996.2
Select seq ref XM_006716053.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X2, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006716053.1
Select seq ref XM_006716052.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X1, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006716052.1
Select seq ref XM_005276998.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X3, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_005276998.1
Select seq ref NM_002770.2	Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	NM_002770.2
Select seq ref XM_005247121.2	PREDICTED: Homo sapiens collagen, type VI, alpha 6 (COL6A6), transcript variant X1, mRNA	30.2	30.2	71 %	22	100 %	XM_005247121.2
<b>Hs_PRSS2_6</b>							
S103051580							
ATGGCTGTGCCGAGAACA							
Select seq ref XM_006725058.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X4, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006725058.1
Select seq ref XM_005276996.2	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X1, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_005276996.2
Select seq ref XM_006716053.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X2, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006716053.1
Select seq ref XM_006716052.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X1, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_006716052.1
Select seq ref XM_005276998.1	PREDICTED: Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), transcript variant X3, mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	XM_005276998.1
Select seq ref NM_002769.4	<b>Homo sapiens protease, serine, 1 (trypsin 1) (PRSS1), mRNA</b>	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	NM_002769.4
Select seq ref NM_002770.2	Homo sapiens protease, serine, 2 (trypsin 2) (PRSS2), mRNA	42.1	42.1	100 %	0.006	100 %	NM_002770.2
Select seq ref NM_006710228.1	PREDICTED: Homo sapiens putative trypsin-6-like (LOC102725325), mRNA	36.2	36.2	85 %	36	100 %	XM_006710228.1
Select seq ref NR_001296.3	<b>Homo sapiens protease, serine, 3 (pseudogene 2) (PRSS3P2), non-coding RNA</b>	36.2	36.2	85 %	36	100 %	NR_001296.3
Select seq ref XM_006716617.1	PREDICTED: Homo sapiens ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 1 (ST3GAL1), transcript variant X4, mRNA	32.2	32.2	95 %	5 Jul	95 %	XM_006716617.1
Select seq ref XM_005251023.1	PREDICTED: Homo sapiens ST3 beta-galactoside alpha-2, 3-sialyltransferase 1 (ST3GAL1), transcript variant X1, mRNA	32.2	32.2	95 %	5 Jul	95 %	XM_005251023.1