

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

Solu- ja molekyylibiologia

2016

Minna Lagström

PIM-INHIBITION VAIKUTUKSET ETURAUHAS- JA RINTASYÖPÄSOLUISSA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytiikka | Solu- ja molekyylibiologia

2016 | 44 + 8

Sanna Virtanen ja Päivi Koskinen

Minna Lagström

PIM-INHIBITION VAIKUTUKSET ETURAUHAS- JA RINTASYÖPÄSOLUISSA

Eturauhassyöpä on Suomessa miesten yleisin syöpätyyppi. Tauti voi alkuvaiheessa olla melko oireeton, joten kolmannes eturauhassyövistä on diagnoosihetkellä ehtinyt jo lähettää etäpesäkkeitä muualle elimistöön. Syövän ennuste muuttuu huonoksi silloin, kun syöpä on ehtinyt levitä elimistössä ja muodostanut etäpesäkkeitä.

Naisten yleisin syöpätyyppi Suomessa on rintasyöpä. Se on yleistynyt viime vuosikymmenien aikana ja sen on ennustettu yleistyvän edelleen. Rintasyövän seulontamenetelmänä käytetään mammografiaa, jonka avulla voidaan todeta epänormaalit muutokset rinnassa. Mammografialla saadaan suurin osa rintasyövistä diagnosoida oireettomassa vaiheessa.

Syöpien hoitoon pyritään jatkuvasti löytämään uusia tehokkaampia hoitomuotoja, joiden avulla voitaisiin vähentää syöpäsolujen leviämistä ja etäpesäkkeiden muodostumista. Yhtenä kiinnostavana lääkekohteena ovat olleet proteiinikinaasit, jotka vaikuttavat solujen moniin elintärkeisiin toimintoihin. Pim-ryhmän-kinaasien on todettu edistävän muun muassa eturauhassyöpäsolujen kasvua ja leviämistä, minkä vuoksi on ollut tarpeen tutkia Pim-kinaasien toimintaa estävien kemiallisten aineiden eli inhibiittorien sekä inaktivoivien mutaatioiden vaikutusta syöpäsoluihin.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia uuden Pim-kinaasien toimintaa estävän inhibiittorin, RAG:in, vaikutusta PC-3-eturauhassyöpäsoluihin. Vertailukontrollina toimi DHPCC-9-inhibiittori, jolla on aikaisemmissa tutkimuksissa saatu hyviä tuloksia. Pim-kinaasien ominaisuuksia tutkittiin myös Pim-kinaasin inaktivoivalla mutaatiolla MCF-7-rintasyöpäsoluissa. Vertailukontrollina oli normaalisti toimiva Pim-villityyppi. Opinnäytetyössä tutkittiin Pim-inhibition vaikutuksia solujen aktiivisuuteen, aineenvaihduntaan sekä elinkykyyn. Tuloksista kävi ilmi että uusi Pim-selektiivinen inhibiittori, RAG, ei vaikuttanut PC-3-syöpäsoluihin yhtä hyvin kuin vertailuna ollut DHPCC-9 inhibiittori. Tuloksista ilmeni myös, että Pim-1-kinaasin mutaatio vähensi solujen aktiivisuutta Pim-1-villityyppiin verrattuna.

ASIASANAT:

Pim-kinaasi, Inhibiittori, mutaatio, PC-3, MCF-7, DHPCC-9, RAG

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme of Biomedical Laboratory Science | Cell and Molecular Biology

2016 | 44 + 8

Sanna Virtanen and Päivi Koskinen

Minna Lagström

THE EFFECTS OF PIM-INHIBITON IN PROSTATE AND BREAST CANCER CELLS

Prostate cancer is one of the most common cancer types for men in Finland. In its early phase the cancer can be symptomless. When diagnosed, one third of the cases have already metastasized. Prostate cancer prognosis turns bad, when the cancer has spread in the body and formed metastasis.

For women breast cancer is the most common type of cancer in Finland. It has become more common in the last decades, and it is predicted to become even more common in the future. Mammography is used as a screening method for breast cancer. It allows detection of abnormal changes in breast tissue. Thanks to mammography, most of breast cancers are diagnosed at symptomless stage.

Researchers continuously attempts to find new, more efficient forms of treatment, which can reduce the spread of cancer cells and metastasis. One interesting target for drug discovery, are protein kinases, which affect in essential cell functions. Pim -kinase family has shown to promote growth and metastases of for example prostate cancer cells. Therefore it has been found useful to investigate effects of inhibitors of Pim -kinases but also the effects of inactivating mutations on cancer cells.

The purpose of this thesis was to study the effects of a new Pim -kinase inhibitor named RAG on PC-3-prostate cancer cells. As a comparison, DHPCC-9-inhibitor, which has shown promising results in previous studies, was used as a control. The features of Pim -kinases were also studied with an inactivating Pim -mutation in MCF-7-breast cancer cells. As a comparison a normally functioning Pim -wild -type was used as a control. In the thesis the effects of Pim -inhibition on cell activity, metabolism and viability were studied. The results showed that the new Pim-selective inhibitor RAG was not as effective in PC-3 cancer cells as the DHPCC-9 inhibitor. The results also showed that the mutation in Pim-1 kinase decreased cell activity in comparison to Pim-1 -wild -type.

KEYWORDS:

Pim -kinase, Inhibitor, mutation, PC-3, MCF-7, DHPCC-9, RAG

SISÄLTÖ

LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	9
2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA	11
2.1 Tutkimuksen keskeiset käsitteet	11
2.1.1 Eturauhassyöpä	11
2.1.2 Rintasyöpä	11
2.1.3 Kinaasi	12
2.1.4 Pim-ryhmän kinaasit	13
2.1.5 Inhibiittori	13
2.2 Menetelmäteoria	14
2.2.1 Soluviljely	14
2.2.2 Transfektio lipofektion ja elektroporaation avulla	15
2.2.3 Lusiferaasikoe	16
2.2.4 β -galaktosidaasikoe	17
2.2.5 MTT-koe	18
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	19
4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	20
4.1 Toteutussuunnitelma	20
4.2 Metodologiset ratkaisut	20
4.3 Eettisten näkökohtien tarkastelu	20
4.4 Tutkimuksen kokeellinen suoritus	21
4.4.1 Solujen käsittely	21
4.4.2 Lusiferaasikoe	23
4.4.3 β -galaktosidaasikoe	24
4.4.4 MTT-koe	24
5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	25
5.1 MTT-koe	25
5.2 Lusiferaasi ja β -galaktosidaasikokeet	29
5.2.1 PC-3-eturauhassyöpäsolut	29
5.2.2 MCF-7-rintasyöpäsolut	33

6 POHDINTA	37
6.1 Yleinen pohdinta	37
6.2 Tutkimustulosten pohdinta	37
6.3 Jatkotutkimusaiheet	39

LÄHTEET	40
----------------	-----------

LIITTEET

Liite 1 Toimeksiantosopimus

Liite 2 Solulaskut

Liite 3 Solujen jakaminen

Liite 4 Työohje FuGENE

Liite 5 Työohje elektroporaatio

Liite 6 Solujen lyysaus

Liite 7 Lusiferaasikokeen liuokset

Liite 8 β -galaktosidaasikokeen reaktioseos

KUVAT

Kuva 1. DHPCC-9 inhibiittori (Santio ym. 2010)	14
Kuva 2. RAG inhibiittori (Moreau ym. 2014)	14
Kuva 3. Solun transfektio	17

KUVIOT

Kuvio 1. DHPCC-9-inhibiittorin vaikutus PC-3-solujen elinkykyyn	25
Kuvio 2. RAG inhibiittorin vaikutus PC-3-solujen elinkykyyn	26
Kuvio 3. Elinkykytesti laimennossarjalla PC-3 solususpensiota	26
Kuvio 4. Laimennossarjan standardisuora	27
Kuvio 5. Laimennossarjan solumäärät, jotka oli laskettu standardisuoraa käyttäen	28

Kuvio 6. Inhibiittoreita sisältävien solujen määrät, jotka oli laskettu standardisuoraa käyttäen	28
Kuvio 7. Lusiferaasiaktiivisuus 5 μ M- ja 10 μ M-pitoisuuksilla	29
Kuvio 8. β -galaktosidaasiaktiivisuus 5 μ M- ja 10 μ M-pitoisuuksilla	30
Kuvio 9. Lusiferaasiaktiivisuuden tulokset, jotka oli normalisoitu β -galaktosidaasilla	30
Kuvio 10. Lusiferaasiaktiivisuus inhibiittorien laimennossarjalla	31
Kuvio 11. β -galaktosidaasiaktiivisuus inhibiittorien laimennossarjalla	32
Kuvio 12. Inhibiittorien laimennossarjan tulokset, jotka normalisoitiin β -galaktosidaasilla	32
Kuvio 13. DHPCC-9- ja RAG-inhibiittorien vaikutus PC-3-syöpäsoluihin 5 μ M- ja 10 μ M-pitoisuuksilla	33
Kuvio 14. Pim-WT:n sekä Pim-KD:n vaikutus MCF-7-solujen lusiferaasiaktiivisuuteen	34
Kuvio 15. MCF-7-solujen β -galaktosidaasiaktiivisuus	34
Kuvio 16. Lusiferaasikoe, jonka tuloksia on normalisoitu β -galaktosidaasikokeen tuloksilla	35
Kuvio 17. Pim-1-villityypin sekä mutantin tulosten yhteenveto	36

LYHENTEET

ATP	Adenosiinitrifosfaatti
β -gal	β -galaktosidaasi
CSL-LUC	CSL-transkriptiotekijän säätelmänä lusiferaasi-entsyymiä tuottava reportterigeeni
DHPCC-9	1,10-dihydropyrrolo [2,3-a] karbatsoli-3-karbaldehydi, Pim-spesifinen inhibiittori
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium -ravintoneste
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
EGTA	Etyleeniglykolitetraetikkahappo
FCS	Vasikan seerumi (engl. fetal calf serum)
HCl	Suolahappo
KPO ₄	Kaliumfosfaatti
L-glut	L-glutamiini
LSB	Laemmlin näytepuskuri (engl. Laemmler Sample Buffer)
MCF-7	Ihmisen rintasyöpäsolulinja
Mg ²⁺	Magnesium-ioni
MgSO ₄	Magnesiumsulfaatti
NaPO ₄	Natriumfosfaatti
Notch	Transmembraaniproteiini, Pim-kinaasin substraatti

ONPG	Orto-nitrofenoligalaktopyranosiidi
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PC-3	Ihmisen eturauhassyöpäsolulinja
pCDNA3	CMV-promoottorin säätelemä nisäkässolun ilmentävä vektori
pCS2	CMV-promoottorin säätelemä nisäkässolun ilmentävä vektori
Pim	Kinaasientsyymi (lyhennys engl. Pro-viral integration site for moloney murine leukemia virus)
Pim-1 KD	Pim-1 mutantti, jonka kinaasiaktiivisuus estetty piste-mutaatiolla
Pim-1 WT	Pim-1 villityyppinen entsyymi
RAG	Compound 1 eli RAG-II-163 Pim-spesifinen inhibiittori
RLU	Suhteellinen valon määrä (engl. relative light unit)
RPM1-1640	ravintoneste
TE-puskuri	10 mM Tris/1 mM EDTA -puskuri
UV	Ultravioletti

1 JOHDANTO

Eturauhassyöpä on Suomessa miesten yleisin syöpätyyppi. Syövän ennuste muuttuu huonoksi yleensä silloin kun syöpäsolut leviävät elimistöön ja muodostavat etäpesäkkeitä elintärkeisiin kudoksiin. Tämän vuoksi on tärkeää tutkia lääkainekohteita ja löytää syövän leviämistä estäviä uusia lääkkeitä. (Santio ym. 2015.)

Monien solujen tuottamien proteiinien aktiivisuutta voidaan muuttaa fosforyloimalla, jolloin molekyyliin liitetään ylimääräinen fosfaattiryhmä. Kinaasit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat soluissa fosforylaatio-reaktioita. Proteiineja fosforyloivat proteiinikinaasit jaetaan kohteidensa mukaisesti ryhmiin. (Heino & Vuento 2004.) Proteiiniseriini/treoniinikinaasit fosforyloivat seriini- ja/tai treoniiniproteiineja, ja proteiinityrosiinikinaasit taas tyrosiiniproteiineja (Gerard 2015). Pim-ryhmän kinaasit ovat pienikokoisia suhteellisen aktiivisia kinaaseja, jotka kuuluvat proteiiniseriini/treoniinikinaasien ryhmään (Santio ym. 2010). Proteiinikinaasit toimivat osana solujen säätelyjärjestelmää ja vaikuttavat solujen aineenvaihduntaan, jakautumiseen sekä muihin toimintoihin (Heino & Vuento 2004).

Turun yliopiston biologian laitoksen genetiikan ja fysiologian osastolla on tutkittu Pim-kinaasien merkitystä eturauhassyöpäsolujen leviämiseen. Ihmisen eturauhassyövän hiirimallilla todennettiin, että Pim-kinaasit lisäävät syöpäsolujen kykyä muodostaa etäpesäkkeitä sekä eturauhasta ympäröiviin imusolmukkeisiin että keuhkoihin. Tutkimuksessa saatiin selville, että DHPCC-9 -niminen inhibiittori, joka estää Pim-kinaasien toimintaa soluissa, heikentää myös hiirissä

eturauhaseen istutettujen syöpäsolujen kasvua ja etäpesäkkeiden muodostumista (Santio ym. 2010).

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää uuden Pim-selektiivisen inhibiittorin sekä inaktiivisen mutaation vaikutuksia eturauhas- ja rintasyöpäsolujen kasvuun sekä elinkykyyn. Tavoitteena tässä opinnäytetyössä oli kartoittaa ja löytää uusi toimiva inhibiittori, joka vaikuttaisi Pim-kinaasien toimintaan.

2 TUTKIMUKSEN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Tutkimuksen keskeiset käsitteet

2.1.1 Eturauhassyöpä

Eturauhassyöpä on Suomessa miesten yleisin syöpä (Käypä hoito 2014). Vuosien 2009–2013 aikana Suomessa todettiin vuosittain liki 5000 uutta eturauhassyöpätapausta (Nordcan 2015). Sairastuneiden keski-ikä diagnoosihetkellä on 71 vuotta (Saarelma, 2015). Kasvaimen syntyyn vaikuttavia tekijöitä on onnistuttu selvittämään vain osittain, mutta taudin kehittymisen kannalta hormonaalisilla tekijöillä ja ravintotekijöillä uskotaan olevan merkitystä. (Pfizer 2014.) Kun eturauhassyöpä todetaan, 23-prosentilla tapauksissa tauti on ehtinyt lähettää etäpesäkkeitä. Eturauhassyöpä on yleensä taudin alkuvaiheessa melko oireeton. Oireet voivat olla virtsaamisoireita, jotka ovat tyypillisiä myös hyvänlaatuisille eturauhas- ja virtsarakkosairauksille.

Pienen uusiutumiskisrin potilailla eturauhassyövän hoitona käytetään aktiiviseurantaa, ulkoista tai lyhytetäisyysistä sädehoitoa tai radikaalileikkausta. Pienen riskin potilailla paranemisennuste on yleensä erinomainen. (Käypä hoito 2014.) Pidemmälle levinneessä eturauhassyövässä oireina saattaa esiintyä muun muassa luustokipua. (Tammela ym. 2014.) Eturauhassyövän ennuste on huonompi silloin, kun syöpä on levinnyt elimistössä, ja etäpesäkkeitä on ehtinyt muodostua (Käypä hoito 2014).

2.1.2 Rintasyöpä

Naisten yleisin syöpätyyppi Suomessa on rintasyöpä. Tauti yleistyy 45 ikävuoden jälkeen. Keski-ikä rintasyövän toteamishetkellä on noin 60 vuotta. Rintasyöpä on selkeästi yleistynyt Suomessa 1970-luvulta lähtien. On ennustettu, että se edelleen lisääntyy. Vuonna 2011 todettiin 4865 uutta rintasyöpätapausta. Kuten eturauhassyövässä rintasyövässäkin hormonaalisilla tekijöillä on mer-

kittävä osuus. Esimerkiksi synnyttämättömillä naisilla riski sairastua rintasyöpään on suurempi kuin synnyttäneillä naisilla. (Joensuu ym. 2007.)

Rintasyövän toteamisessa, arvioinnissa sekä seurannassa yksi tärkeimmistä menetelmistä on mammografia. Siinä rinnoista otetaan röntgenkuvat, joiden avulla voidaan todeta rinnan epänormaalit muutokset. Tavallisin oire on kivuton kyhmy, joka ei arista. Muita oireita ovat esimerkiksi kipu tai pistely rinnassa, rinnan punoitus sekä ihottuma. Suurin osa rintasyöivistä diagnosoidaan oireettomina mammografian avulla. Osa todetuista syöivistä on kuitenkin ehtinyt toteamishetkellä muodostaa etäpesäkkeitä. (Roche 2016.) Uusien kehittyneiden hoitomenetelmien ja varhaisen toteamisen vuoksi taudin ennuste on jatkuvasti parantunut (Duodecim Terveyskirjasto 2012).

2.1.3 Kinaasi

Kinaasit ovat entsyymejä, jotka lisäävät molekyyliin fosfaattiryhmän (Cooper 2015). Monien solujen entsyymien aktiivisuus muuttuu, jos joitakin niiden sivuketjuista muunnellaan fosforyloimalla (Heino & Vuento 2014). Fosforylaatio vaikuttaa solujen proteiinien aktiivisuuteen ja niiden toiminnan säätelyyn (Thermo Fisher scientific 2015). Proteiinien fosforylaatiota katalysoivat proteiinikinaasit. Näissä reaktioissa fosfaattiryhmän luovuttajana toimii ATP (adenosiinitrifosfaatti). Proteiinikinaasit vaikuttavat muun muassa solujen jakautumiseen, aineenvaihduntaan ja muihin toimintoihin. Proteiinikinaasit tunnistavat tarkasti ne proteiinit, joita niiden kuuluu fosforyloida. (Heino & Vuento 2014.) Proteiinikinaasit ovat tarpeen mukaan aktiivisessa tai inaktiivisessa muodossa. Proteiinikinaasi voi aktiivisessa muodossa sitoutua toiseen proteiinikinaasiin, jolloin ne voivat aktivoida toisiaan. (Syöpätieto 2015.) Kohteensa mukaisesti proteiinikinaasit jaetaan proteiiniseriini/treoniinikinaaseihin ja proteiinityrosiinikinaaseihin sen mukaisesti mihin aminohappoihin ne fosfaattiryhmiä liittävät (Heino & Vuento 2004).

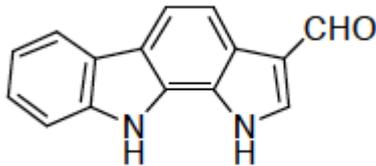
2.1.4 Pim-ryhmän kinaasit

Pim-ryhmän kinaasit kuuluvat proteiiniseriini/treoniinikinaasien ryhmään ja koostuvat kolmesta hyvinkin samankaltaisesta proteiinista: Pim-1, Pim-2 ja Pim-3 (Santio ym. 2010). Pim-kinaasien on todettu vaikuttavan positiivisesti solun selviytymiskykyyn, sillä ne estävät apoptoosia eli solun ohjelmoitua kuolemaa (Fox ym. 2003). Pim-kinaasit ovat liikaa ilmentyessään yksi syöpää aiheuttavista tekijöistä (Santio ym. 2010). *In vivo* hiirikokeilla on osoitettu, että Pim-kinaasit, joiden ilmentyminen syövässä lisääntyy, vaikuttavat yhdessä muiden syöpägeenien kanssa syövän syntyyn (Aho 2005). Pim-ryhmän kinaasien yli-ilmentymistä onkin löydetty niin verta muodostavista eli hematopoieettisista pahalaatuisista syövästä kuin kiinteistä kasvaimista (Santio ym. 2010).

2.1.5 Inhibiittori

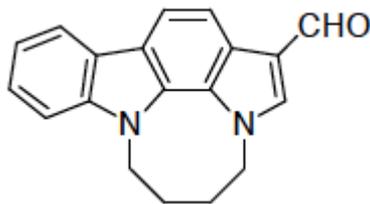
Inhibiittorit ovat aineita, jotka estävät entsyymien toiminnan sitoutumalla niihin. Jotkut elimistön entsyymeistä voivat itsekin olla inhibiittoreita, jolloin ne estävät toisten entsyymien toimintaa. (Heiskanen & Mankinen 2004.) Inhibiittorin vaikutus voi olla reversiibeliä eli palautuvaa tai irreversiibeliä eli palautumatonta (Heino & Vuento 2014). Palautuva esto voi olla luonteeltaan myös kilpailevaa, jolloin inhibiittorit kilpailevat sitoutumisesta entsyymiin aktiiviseen kohtaan yhdessä substraatin kanssa (Heino & Vuento 2004). Substraatti on se kohdemolekyylä, johon entsyymiin toiminta kohdistuu. Entsyymi voi vaikuttaa substraatin kiinnittymiseen muihin aineisiin tai sen pilkkoutumiseen. Jokaisella entsyymillä on tietynmuotoinen rakenne, joten kuhunkin entsyymiin voi sitoutua vain tietynmuotoinen substraattimolekyylä, eli entsyymit ovat spesifisiä substraattia kohtaan. (Ulmanen ym. 2007.) Inhibiittorin kiinnittyessä entsyymiin ne muodostavat entsyymi-inhibiittorikompleksin (Okamoto ym. 2003). Kompleksin muodostuttua inhibiittori voi estää entsyymiin toimintaa myös irreversiibelisti eli palautumattomasti, jolloin inhibiittori muuntaa entsyymiin pysyvästi ei toimivaan muotoon (Heino & Vuento 2014). Pim-kinaasien toiminnan estämiseen on kehitetty monia

inhibiittoreita ja niillä on todettu olevan vaikutusta syöpäsolujen liikkumiseen ja toimintaan aikaisemmissa tutkimuksissa (Santio ym. 2010, Moreaus ym. 2014).



Kuva 1. DHPCC-9 inhibiittori (Santio ym. 2010)

Kuvassa 1 on esitetty Pim-selektiivisen DHPCC-9-inhibiittorin rakennekaava.



Kuva 2. RAG inhibiittori (Moreau ym. 2014)

Kuvassa 2 on RAG inhibiittori, joka on DHPCC-9-inhibiittorin johdannainen. RAG:ssa on yksi ylimääräinen butyyliketju lisää.

2.2 Menetelmäteoria

2.2.1 Soluviljely

Eläin- tai kasvisolut voidaan eristää kudoksesta. Ne voivat jatkaa kasvuaan sopivalla alustalla sekä suotuisassa ympäristössä. Kasvaakseen solut tarvitsevat tarkasti säädellyn ympäristön. Solut vaativat oikeanlaiset olosuhteet lämpötilan, kaasujen, pH:n ja ravintoaineiden kannalta. (ThermoFisher 2015.) Oikeat soluviljelyolosuhteet saattavat hieman vaihdella eri solulinjojen välillä. Suspensiossa pystytään viljelemään suurempia solumääriä. Monet eläinsolulinjat kuitenkin vaativat kiinnittymisalustan, jolloin soluja viljellään kasvatusliuoksessa pulloissa tai maljoilla. (ATCC® 2014.)

Solujen kanssa työskenneltäessä aseptisuus on tärkeää. Soluja käsitellään aina laminaarikaapissa. Käytetyt välineet, pullot ja pinnat pyyhitään 70-prosenttisella etanolilla ennen työskentelyn aloittamista. Solut kasvavat maljalla ravintonesteessä, jonka täytyy sisältää soluille välttämättömiä yhdisteitä kuten glukoosia, aminohappoja, antibioottia ja seerumia. Vasikan seerumi (FCS, Fetal Calf Serum) sisältää soluille tärkeitä kasvutekijöitä. Antibiootit puolestaan estävät bakteerien kasvun solumaljoilla. Solut kiinnittyvät maljan pohjaan ja ne saadaan irrotettua maljasta trypsiini/EDTA-liuoksen avulla. Solut jaetaan uusille maljoille, kun niiden solutiheys kasvaa liian suureksi. Näin saadaan ylläpidettyä solujen kasvulle otollisia olosuhteita. (Invitrogen/Gibco 2014.)

2.2.2 Transfektio lipofektion ja elektroporaation avulla

Transfektioilla tarkoitetaan DNA:n viemistä kohdesoluun. Transfektion avulla saadaan solu ilmentämään tutkittavaa geeniä. Kohdegeeni transfektoidaan riittävään määrään soluja, jolloin sen geenituotetta voidaan havainnoida ja tutkia sen vaikutuksia soluun. (Suominen ym. 2010.) Tehokkaan transfektion saavuttamiseksi solujen tulee olla elinvoimaisia, joten solujen ravintoneste vaihdetaan uuteen ennen transfektiota. Soluja kasvatetaan +37C-asteisessä soluviljelykaapissa 24–72 tuntia transfektion jälkeen. (Promega 2016.) Transfektioon on käytössä useita eri menetelmiä.

Lipofektio kuuluu biokemiallisiin menetelmiin. Siinä positiivisesti varautuneet lipidit muodostavat rakenteen negatiivisesti varautuneen DNA:n ympärille. Nämä liposomikompleksit läpäisevät solukalvon endosytoosin avulla muodostaen endosomeja, joista DNA voi vapautua ja kulkeutua tumaan. (Felgner ym. 1987.)

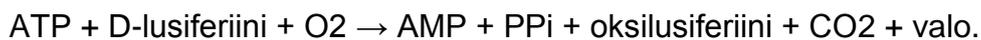
Elektroporaatiossa kohdesoluihin viedään DNA:ta sähköpulssein avulla. Elektroporaatio perustuu voimakkaaseen, mutta lyhytaikaiseen sähköimpulssiin, joka synnyttää solukalvoon reikiä. DNA:n on mahdollista siirtyä suoraan solujen sisään näiden reikien kautta. (Suominen ym. 2010.) Kyseistä tekniikkaa käytettäessä tarvitaan yleensä enemmän soluja, sillä osa soluista kuolee sähköim-

pulssin seurauksena. Sähköimpulssin voimakkuus ja pulssin pituus täytyy aina optimoida käytössä olevalle solutyypille sopivaksi. (Promega 2016.)

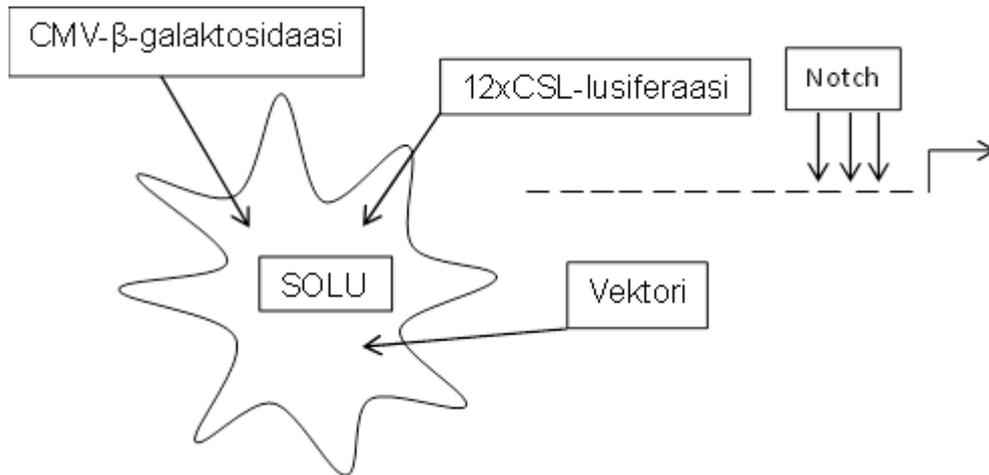
2.2.3 Lusiferaasikoe

Geenien ilmentymistä tutkittaessa voidaan käyttää soluun siirrettävää reportterigeeniä, jonka tuotantoa tutkittava geeni suoraan tai epäsuorasti säätelee (Simon & Kevin 2008). Reportterigeenin tuotetta, esimerkiksi entsyymiä ja sen määrää, voidaan helposti mitata transfektion jälkeen. Tällä tavoin voidaan tutkia geenien ilmentymisen säätelyä sekä transfektion tehokkuutta. (ThermoFisher Scientific 2015.) Yleensä reportterigeeni kloonataan tutkittavan DNA:n kanssa vektoriin eli geenin kuljettajaan, joka siirretään transfektiolla soluun. Transfektion jälkeen reportterigeenin proteiini- tai entsyymiaktiivisuus mitataan. Hyvä reportterigeeni, kuten lusiferaasi, on helposti tunnistettavissa ja mitattavissa määrällisesti, kun se on ilmennetty. (Simon & Kevin 2008.) Lusiferaasientsyymin aktiivisuuden mittaaminen perustuu bioluminesenssireaktioon. Lusiferaasientsyymi katalysoi ATP:tä. Reaktion seurauksena syntyy valoa, joka mitataan luminesenssin havaitsevalla laitteella. Valon voimakkuus on suoraan verrannollinen lusiferaasientsyymin aktiivisuuteen. (NanoLight Technology 2011.)

Kaava 1. Lusiferaasimittauksen reaktiokaava (NanoLight Technology 2011.)



Lusiferaasikoetta varten näytteeseen transfektoidaan kuvan 3 mukaisesti β -gal ja 12xCSL-LUC reportterigeenejä sekä tutkittavaa DNA:ta ekspressiovektorissa, tässä tapauksessa Notchia. Notch on reseptoriproteiini, joka pystyy läpäisemään solukalvon. Reseptoriproteiini koostuu solun ulkoisesta, transmembraanisesta ja solunsisäisestä osasta. Solun ulkoinen osa vastaanottaa viereisistä soluista tulevia viestimolekyylejä. Notchin sisäinen osa irtoaa, kun viestimolekylyli on sitoutunut proteiiniin. Sisäisen osan irrottua, se siirtyy tumaan aktivoimaan kohdegeeninsä transkriptiota.



Kuva 3. Solun transfektio

Lusiferaasikoetta varten käytetään 12xCSL-LUC:ia. Kyseinen reportterigeeni sisältää 12 kohtaa, joihin Notch voi sitoutua. Notchin sitouduttua se alkaa ilmentää lusiferaasientsyymiä. Kyseisen entsyymin aktiivisuutta mitataan kaavan 1 esittämässä reaktiossa spektrofotometrisesti. Lusiferaasikokeessa luminesenssia syntyy sitä enemmän, mitä useampaan kohtaan Notch sitoutuu.

Reportterigeeni ilmentää lusiferaasia. Näytteeseen lisätty Pim-kinaasi fosforyloi Notchia, jolloin se sitoutuu useampaan kohtaan. Näin ollen lusiferaasiaktiivisuuden määrä näytteessä nousee. Estettäessä Pim-kinaasin aktiivisuus joko inhibiittorilla tai Pim-KD mutaatiolla, ei fosforylaatiota pääse tapahtumaan, jolloin lusiferaasientsyymien aktiivisuus ei nouse.

2.2.4 β-galaktosidaasikoe

β-galaktosidaasia käytetään usein tasoittamaan lusiferaasikokeen tuloksia, sillä kyseinen entsyymi ilmentyy soluissa saman verran, jos DNA:ta on näytteessä sama määrä. CMV-β-gal entsyymiä transfektoidaan solun sisään ja sen määrä voidaan mitata käyttämällä ainetta, joka sitoutuessaan entsyymiin aiheuttaa värireaktion. Näin ollen saadaan transfektiotehokkuus normalisoitua. (Smale 2010.)

2.2.5 MTT-koe

Solujen metabolista aktiivisuutta voidaan mitata MTT-kokeen avulla, joka mittaa mitokondriaalisen sukkiinaattidehydrogenaasientsyymin aktiivisuutta. Solut, joissa on metabolista aktiivisuutta, ottavat sisäänsä keltaista tetratsoliumbromidia eli MTT:tä (engl. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*). MTT pelkistyy veteen liukenemattomiksi, tummansinisiksi formatsaanikiteiksi. Nämä kiteet voidaan liuottaa esimerkiksi isopropanolilla, minkä jälkeen näytteessä olevan värin voimakkuus voidaan mitata spektrofotometrisesti. Pelkistyneen värin pitoisuus korreloi metabolisesti aktiivisten solujen määrää. MTT-kokeella voidaan helposti tutkia erilaisten aineiden tai kasvuolosuhteiden vaikutuksia solujen hengissä säilymiseen ja lisääntymiseen. (Koskinen 2009.)

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla aiemmin tutkitun DHPCC-9 inhibiittorin sekä sen johdannaisen RAG:in vaikutuksia Pim-kinaaseihin. Inhibiittorien vaikutuksia testattiin PC-3-eturauhassyöpäsoluilla. Lisäksi tutkittiin Pim-kinaasin mutaation vaikutusta MCF-7-rintasyöpäsoluihin. Erityisesti tarkasteltiin sitä, miten Pim-inhibiittorit tai Pim-kinaasin mutaatio vaikuttavat syöpäsolujen aktiivisuuteen, aineenvaihduntaan ja elinkykyyn.

Tavoitteena oli löytää mahdollisesti aiempaa tehokkaampi Pim-selektiivinen inhibiittori. Pim-kinaasin mutaatiota tutkimalla pyrittiin saamaan lisätietoa muista mahdollisista menetelmistä, joilla syöpäsolujen kykyyn tehdä etäpesäkkeitä voitaisiin vaikuttaa.

Tutkimusongelmat:

1. Onko RAG-inhibiittori tehokkaampi PC-3-eturauhassyöpäsoluille kuin DHPCC-9?
2. Heikentääkö Pim-kinaasin mutaatio MCF-7-rintasyöpäsolujen aktiivisuutta?

4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Toteutussuunnitelma

Opinnäytetyön toteutus tapahtui Turun yliopiston biologian laitoksen genetiikan ja fysiologian osastolla dosentti Päivi Koskisen tutkimusryhmässä. Käytännön osuus suoritettiin suurimmaksi osaksi marras-joulukuussa 2015, jolloin inhibiittorien vaikutusta testattiin PC-3-solulinjalla. Kevään 2016 aikana tehtiin lisäkokeita. Tutkimuksessa käytettiin sekä PC-3-eturauhassyöpäsoluja että MCF-7-rintasyöpäsoluja. Opinnäytetyö valmistui keväällä 2016. Opinnäytetyön lähtökohtina toimivat Päivi Koskisen tutkimusryhmän aiemmat tutkimustulokset ja niistä julkaistut artikkelit.

4.2 Metodologiset ratkaisut

Kvantitatiivisessa eli määrällisessä tutkimuksessa tavoitteena on kuvata ilmiötä numeerisesti. Aineisto analysoidaan tilastollisia analyysimenetelmiä käyttäen. (Vilkkä 2007.) Peruslähtökohtana näin ollen on, että mittauksista saadaan tulokselle numeerinen sisältö. Numeroarvojen antaminen kohteille ei kuitenkaan yksinään tee tutkimuksesta kvantitatiivista. (Erätuuli ym. 1994.)

Tämä opinnäytetyö oli luonteeltaan kvantitatiivinen, sillä aineistoa voidaan mitata numeerisesti ja tulosten tarkastelemiseen käytetään tilastollisia analyysimenetelmiä. Suurin osa testeistä oli toistettu aikaisemmin, joten tutkimusaineiston valinta perustuu edellisiin tutkimuksiin.

4.3 Eettisten näkökohtien tarkastelu

Opinnäytetyössä noudatettiin hyvää tieteellistä käytäntöä. Tutkimuksen kaikissa vaiheissa painottui rehellisyys, huolellisuus ja tarkkuus. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2014.) Näin varmistettiin tutkimuksen mahdollisimman hyvä luotettavuus ja tulosten uskottavuus (Helsingin yliopisto 2015). Muiden tutkijoiden

töitä kunnioitettiin ja lähdeviitteet merkittiin asianmukaisesti eikä muiden julkaisuja plagioitu. Tutkimusryhmällä oli tarvittavat tutkimusluvut kunnossa. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2014.) Opinnäytetyöstä tehtiin asianmukainen tutkimussuunnitelma, joka noudatti Turun AMK:n kirjallisen työn ohjeita. Laboratoriotyöskentelystä pidettiin laboratoriopäiväkirjaa.

4.4 Tutkimuksen kokeellinen suoritus

4.4.1 Solujen käsittely

Työn käytännön toteuttaminen aloitettiin syksyllä 2015 solu- ja molekyylibiologian syventävän harjoittelun aikana. Testejä jatkettiin keväällä 2016. Tutkimus alkoi kasvattamalla PC-3-eturauhassyöpäsoluja, joita tutkimusryhmällä oli käytettävissään. Solujen kunto tarkastettiin mikroskoopilla, jolloin kävi ilmi solujen terveys ja jakamistarve sekä ravintonesteen vaihtotarve. Solujen jakaminen tapahtui sen perusteella, kuinka paljon soluja oli maljalla ja kuinka paljon soluja tarvittiin tutkimuksiin. Haluttu solutiheys testistä riippuen oli 175 000 – 300 000 solua/ml. Solutiheys laskettiin Bürkerin kammion avulla (liite 2). Solut jaettiin työohjeen (liite 3) mukaisesti maanantaisin ja torstaisin. Solut viljeltiin RPM1-1640-ravintonesteessä eli mediumissa, johon lisättiin 10-prosenttia FCS-seerumia, antibiootiksi penisilliini/streptomysiiniliuosta ja tuoretta 1 mM L-glutamiinia, sillä tämä aminohappo hajoaa ravintonesteessä noin 10 päivässä. Soluja kasvatettiin +37C-asteisessa inkubaatiokaapissa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5-prosenttia. Soluja jaettaessa tai kerätessä käytettiin itse tehtyä 10 mM trypsiini/1 mM EDTA-liuosta, joka oli valmistettu PBS-puskuriin (fosfaattipuskuroitu liuos). Tutkimuksia varten solut jaettiin kuoppalevyille. Myöhemmin käytettävät solut jaettiin uusille maljoille. Keväällä 2016 kasvatettiin MCF-7-rintasyöpäsoluja, joiden viljelyssä käytettiin DMEM-ravintonestettä. Mediumiin lisättiin L-glutamiinia, 10-prosenttia FCS-seerumia, penisilliini/streptomysiiniä sekä 1/100 Na-pyruvaattia ja 1/100 ei-välttämättömiä aminohappoja.

PC-3-solut transfektoitiin lipofektiolla käyttäen FuGENE transfection reagent – kittiä (liite 4). Transfektio-päivän aamulla solujen ravintoneste vaihdettiin uuteen, jotta solut olivat mahdollisimman elinvoimaisia transfektiota varten ja ottivat entistä paremmin DNA:ta sisäänsä. Käytetyt DNA:t olivat tutkimusryhmällä valmiina. Tutkimuksessa käytetyt DNA:t olivat pCS2-Notch ja tyhjä kontrollivektori, lisäksi kaikkiin näytteisiin pipetoitiin CSL-LUC ja β -gal-reportterigeenejä. Soluihin transfektoitiin yhteensä 2 μ g DNA:ta, joka liuotettiin seerumittomaan ravintonesteeseen. FuGENE-reagenssia pipetoitiin suhteessa DNA:han 3:1 (3 osaa FuGENE:a ja 1 osa DNA:ta). Liuos valmistettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin, jossa sen annettiin inkuboitua 15 minuuttia. Inkubaation jälkeen liuosta pipetoitiin 100 μ l jokaiseen kuoppalevyn kuoppaan. Transfektion jälkeen solut saivat olla 24 tuntia + 37C-asteisessa inkubaatiokaapissa.

MCF-7-solut transfektoitiin käyttäen elektroporaatiota (liite 5). Käytettyjä DNA:aita olivat pCDNA3, Pim-1 WT ja Pim-1 KD sekä jokaiseen näytteeseen CSL-LUC:ia ja β -gal:ia. Kontrollina toimiva pCDNA3 laimennettiin käyttäen TE-puskuria (10 mM Tris/1 mM EDTA-puskuri), jotta tilavuus saatiin samaksi Pim-1 WT:n ja Pim-1 KD:n kanssa. Soluihin transfektoitiin 10 μ g DNA:ta. Jokaista näytettä kohden käytettiin omaa kyvetiä, joiden läpimitta oli 4 mm. Ennen transfektiota, kyvetit steriloiitiin UV-valon alla 15 minuuttia. Solut kerättiin viljelymaljalta 10 mM trypsiini/1 mM EDTA-liuoksella falcon-putkeen. Putkea sentrifugoitiin 3 minuuttia, jonka jälkeen supernatantti imettiin steriilillä lasipipetillä pois. Jäljelle jäänyt solupelletti liuotettiin 1200 μ l DMEM:iin. Soluja lisättiin 400 μ l jokaiseen DNA:ta sisältävään eppendorf-putkeen ja sekoitettiin hellävaraisesti edestakaisin pipetoimalla. Putkista näytteet pipetoitiin elektroporaatiokyvetteihin. Elektroporaatio suoritettiin käyttäen laitetta Bio Radin Gene Pulser Xcell-laitetta, ja elektroporaation asetuksina käytettiin 230V ja 975 μ F. Transfektion jälkeen solut siirrettiin lasipipettiä käyttäen takaisin maljoille tai kuoppalevyille. Soluille lisättiin ravintonestettä, ja maljat siirrettiin +37C-asteiseen inkubaatiokaappiin 48 tunniksi.

PC-3 syöpäsoluille lisättiin inhibiittori 24 tunnin kuluttua transfektiosta. Inhibiittoreina oli DHPCC-9 sekä uusi RAG-yhdiste. Kontrollina toimi näyte, jossa

DMSO:ta oli lisätty soluihin. DMSO:ta käytettiin kontrollina, koska inhibiittorit oli liuotettu siihen. Inhibiittoreita pipetoitiin kuoppalevyn kuoppiin kahta tai viittä eri määrää, jolloin pystyttiin tutkimaan pitoisuuksien muutosten vaikutusta soluihin. Inhibiittorin lisäyksen jälkeen kuoppalevyt laitettiin takaisin +37C-asteiseen inkubaatiokaappiin 24 tunnin ajaksi.

Tutkimuksia varten solut irrotettiin kuoppalevyiltä imemällä ravintoneste pois ja huuhtelemalla yksinkertaisella PBS:llä kahteen kertaan. Huuhtelun jälkeen solut raaputettiin kuoppalevyjen pohjasta lastalla ja pipetoitiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin. Kerätyt solut lyysattiin eli hajotettiin sulatus-jäädytys-menetelmällä lusiferaasi- ja β -galaktosidaasikokeita varten. Solususpensiota sisältävät eppendorf-putket sentrifugoitiin + 4C-asteessa, 1300 rpm ja 3 minuuttia. Sentrifugoinnin seurauksena muodostunut supernatantti pipetoitiin pois. Solupelletin määrä arvioitiin silmämääräisesti, ja lyysipuskuria lisättiin 5-kertainen määrä pelletin kokoon nähden. Solupelletti resuspentoitiin puskuriliuokseen, jonka jälkeen solut lyysattiin liitteen 6 ohjeen mukaisesti. Lopuksi putket sentrifugoitiin lyhyesti + 4C-asteessa 13 200 rpm. Uudesta putkesta pipetoitiin supernatantti eli liuos, joka sisälsi halutut proteiinit. Näytteitä pidettiin jäähauteella aina kun mahdollista. Näytteet oli mahdollista pakastaa heti raaputtamisen jälkeen tai silloin, kun supernatantti oli kerätty uuteen putkeen.

4.4.2 Lusiferaasikoe

Näytteet otettiin lusiferaasikoetta varten jäähauteelle sulamaan noin tuntia ennen, jos ne olivat olleet pakastettuna. Myös lusiferiinistokki otettiin jäähauteelle sulamaan. Putki suojattiin valolta folion kanssa. Näytemäärään nähden tehtiin sopiva määrä lusiferaasiseosta (liite 7, työohje 1) sekä lusiferaasi näytepuskuria (lusiferase assay buffer) (liite 7, työohje 2). Lusiferaasiseosta tehtiin 4 kertaa blankki (jotka toimivat tyhjinä näytteinä) + n (näytemäärä + rinnakkaiset) + 10. Blankit ja näytteet pipetoitiin valkoiselle 96-kuoppalevyille 20 μ l/kuoppa. Lusiferiinistokki (lusiferiinikantaliuos) lisättiin lusiferaasiseokseen juuri ennen mittaus- ta, sillä reaktio alkoi heti sen pipetoimisen jälkeen. Lusiferaasiseosta, joka sisäl-

si lusiferiinin, pipetoitiin monikanavapipetillä 110 µl/kuoppa ja tulos mitattiin välittömästi, käyttäen Envision-laitteen Lusiferase-assay protokollaa.

4.4.3 β-galaktosidaasikoe

β-galaktosidaasimittausta varten otettiin noin tuntia ennen ONPG (orto-nitrofenoligalaktopyranosiidi), Mg²⁺ (magnesium-ioni) ja näytteet jäähauteelle sulamaan. Mikäli näytteet oli kerätty juuri ennen mittausta, pidettiin ne jäähauteella. Mittausta varten tehtiin reaktioseos (liite 8) näytemäärään riittäväksi. Reaktioseosta valmistettiin 4 kertaa blankki + n (näytemäärä + rinnakkaiset) + 1. Blankit ja näytteet pipetoitiin kirkkaalle 96-kuoppalevylle, 20 µl/kaivo. Jokaiseen kaivoon lisättiin 280 µl reaktioseosta, jonka jälkeen kuoppalevy peitettiin parafilmillä ja laitettiin +37C-asteiseen lämpökaappiin inkuboitumaan. Liuos muuttui keltaiseksi, jolloin näytteet mitattiin Envisionin β-galactosidase assay-protokollalla.

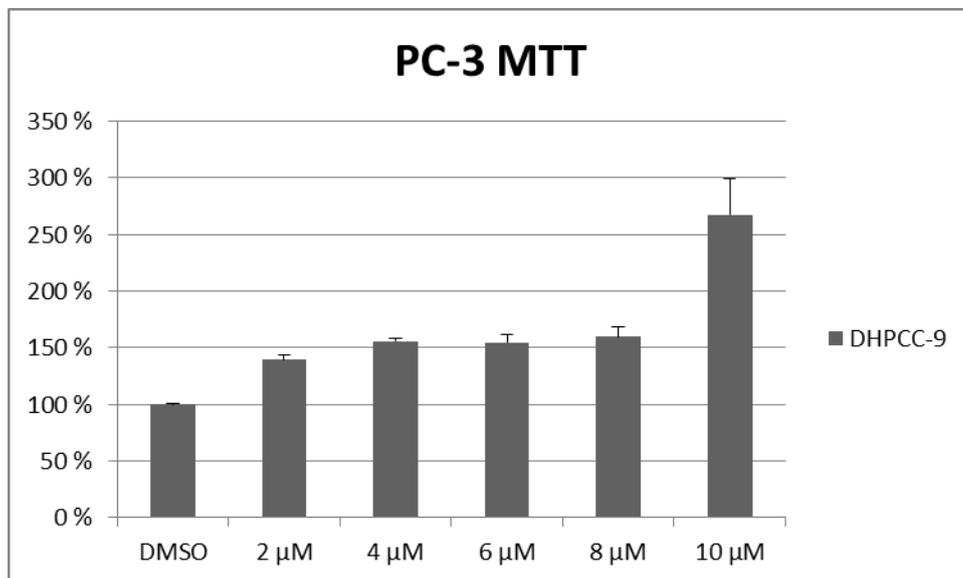
4.4.4 MTT-koe

Solut irrotettiin maljalta liitteen 3 ohjeen mukaisesti. Kerättyjen solujen määrä laskettiin Bürkerin kammiota käyttäen (liite 2) Haluttu solumäärä oli 175 000 solua/ml, jolloin yhdelle 96-kuoppalevyn kuopalle tuli noin 35 000 solua. Ensimmäiselle riville pipetoitiin solususpensiota, joka sisälsi DHPCC-9 inhibiittoria. Toiselle riville pipetoitiin RAG:ia sisältävät solut ja kolmannelle riville pipetoitiin soluista laimennossarja. Kaikista näytteistä pipetoitiin myös rinnakkaiset näytteet. 96-kuoppalevyn kuoppiin lisättiin laminaarikaapissa MTT-kantaliuosta 20µl/kuoppa. Kantaliuos säilytettiin pimeässä -20C-asteessa. Soluja inkuboitiin tämän jälkeen + 37C-asteisessa viljelykaapissa 3 tuntia. Inkuboinnin jälkeen nesteet imettiin kuopista pois ja jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 200 µl isopropanolia, jossa oli 0,04M HCl:ää eli suolaliuosta. Näytteitä pipetoitiin edestakaisin formatsaanikiteiden liuottamiseksi. Lopuksi näytteiden absorbanssit mitattiin 595 nm:ssä.

5 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

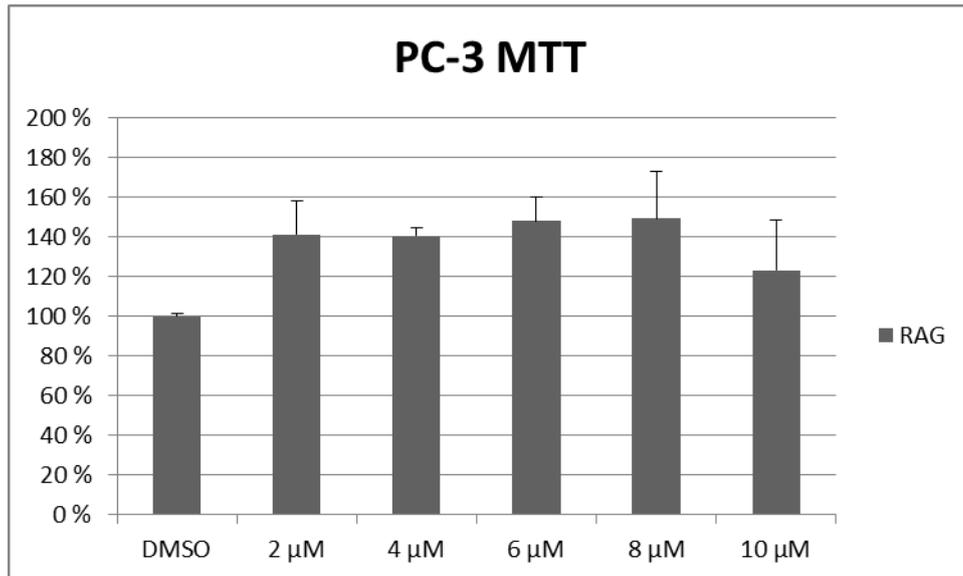
5.1 MTT-koe

Opinnäytetyöprosessin aikana elinkykytesti tehtiin PC-3-soluille kerran. Molemmissa inhibiittoria sisältävissä mittauksissa vertailuna, eli kontrollina, toimivat DMSO:lla käsitellyt solut. Kontrollia pienemmät absorbanssiarvot tarkoittavat solujen vähentyneitä jakautumiskykyä.



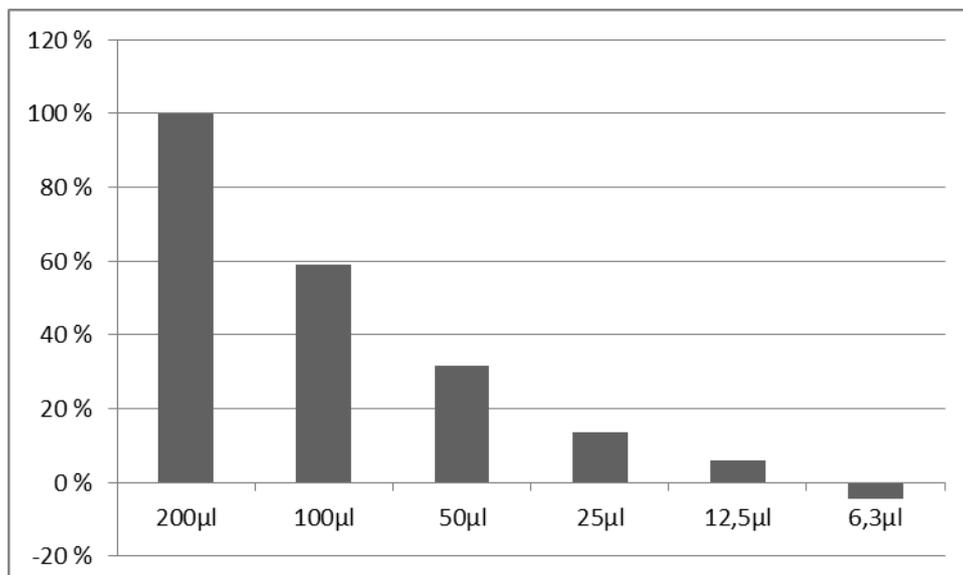
Kuvio 1. DHPCC-9-inhibiittorin vaikutus PC-3-solujen elinkykyyn

Kuviossa 1. näkyy kaavio solujen elinkykymittauksesta DHPCC-9-inhibiittorin kanssa. Inhibiittorin negatiivisena kontrollina toimi DMSO-käsittely. DHPCC-9:ää oli soluihin pipetoitu viittä eri pitoisuutta: 2 μM, 4 μM, 6 μM, 8 μM ja 10 μM. Tuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta, ettei DHPCC-9 inhibiittori millään pitoisuuksilla vaikuttanut PC-3-eturauhassyöpäsolujen elinkykyyn. DHPCC-9-inhibiittorin kanssa saadut tulokset ovat verrattavissa aikaisempiin tutkimustuloksiin solujen elinkyvystä, joka tukee tutkimustulosten oikeellisuutta.



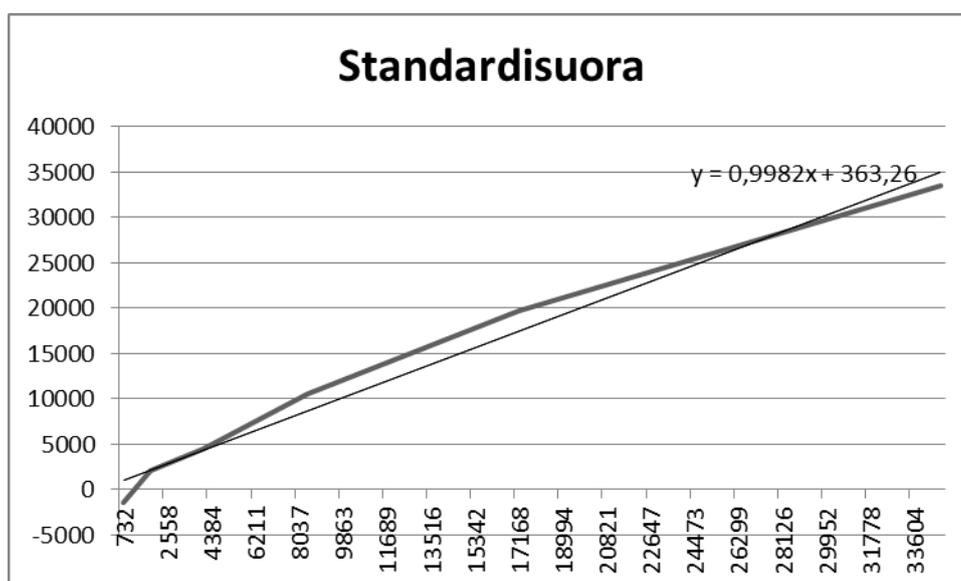
Kuvio 2. RAG inhibiittorin vaikutus PC-3-solujen elinkykyyn

Kuvion 2 tulokset ovat solujen elinkykytestistä RAG inhibiittorin kanssa. Tässä kokeessa RAG:ia oli samat pitoisuudet kuin DHPCC-9-testissä, ja kontrollina toimi myös DMSO-käsittely. Tuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta, ettei RAG inhibiittori vaikuttanut PC-3-eturauhassyöpäsolujen elinkelpoisuuteen. Solujen elinkyky pysyi samanlaisena jopa silloin, kun inhibiittoripitoisuus oli 10 μM.



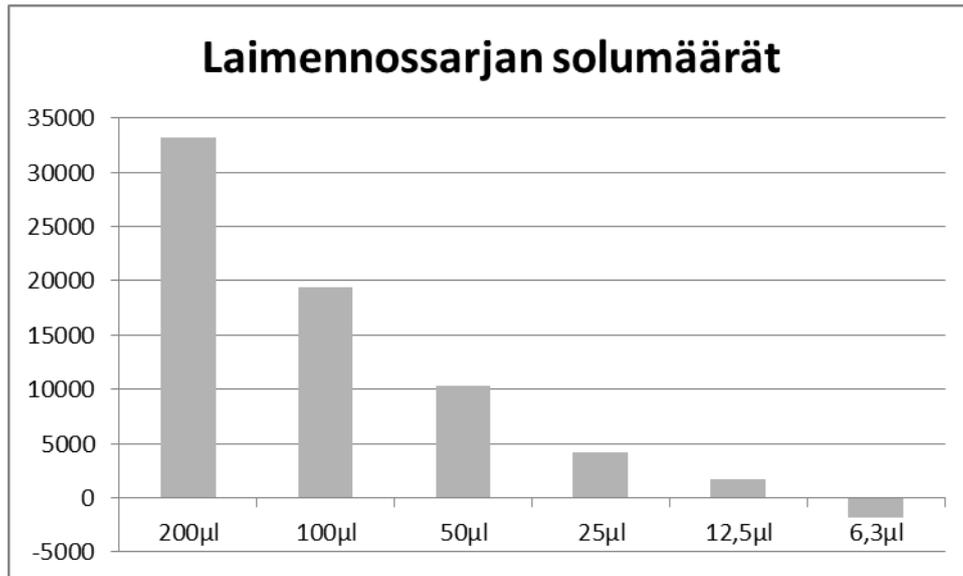
Kuvio 3. Elinkykytesti laimennossarjalla PC-3 solususpensiota

Elinkykyttesti tehtiin lisäksi soluille, joita ei käsitelty inhibiittoreilla. Tämä toimi kontrollina DHPPC-9- ja RAG-testeille. Soluista tehtiin laimennossarja, joissa näytteiden kokonaistilavuus oli aina 200µl. Solususpension määrä puolitettiin aina edellisestä, ja jäljellä olevaan tilavuuteen pipetoitiin pelkkää ravintonestettä. Kuviota 3 tarkasteltaessa voidaan todeta, että laimennossarja toimi kontrollina odotetusti. Elinkykyisten solujen määrän vähentyessä näytteissä pieneni myös metabolinen aktiivisuus. Tulosten luotettavuuden vuoksi koe olisi kannattanut toistaa useampaan kertaan ja verrata saatuja tuloksia keskenään.



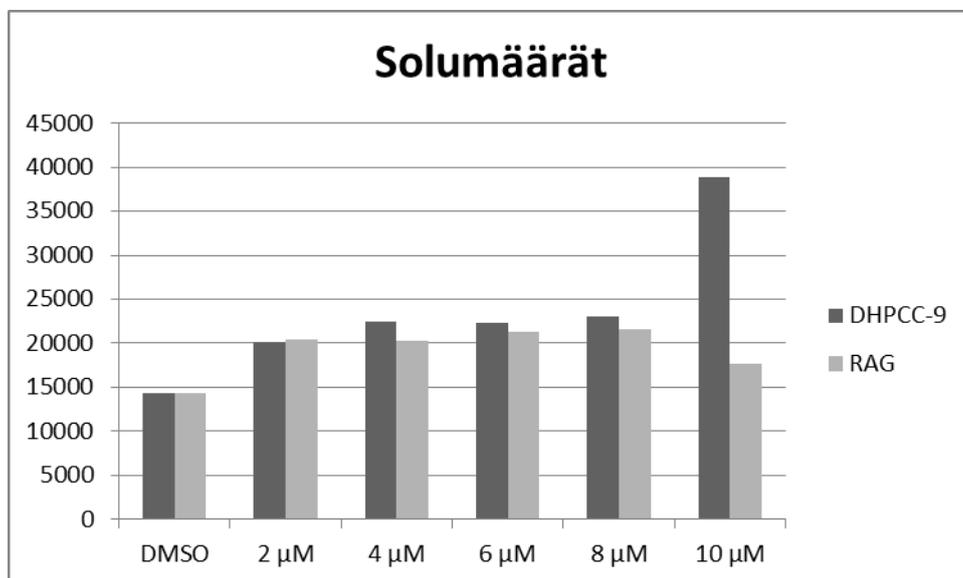
Kuvio 4. Laimennossarjan standardisuora

Laimennossarjan tuloksista tehtiin standardisuora (kuvio 4). Siinä näytteiden absorbanssit ovat y-akselilla ja näytteissä olevat arvioidut solumäärät ovat x-akselilla. Tuloksista tehdyn standardisuoran yhtälön avulla voitiin näytteiden solumäärät laskea tarkemmin.



Kuvio 5. Laimennossarjan solumäärät, jotka oli laskettu standardisuoraa käyttäen

Kuvion 5 tuloksissa laimennossarjan tarkat solumäärät laskettiin standardisuoran avulla. Solujen määrä väheni säännöllisesti, kun solususpension määrä oli näytteissä pienentynyt aina puolella.



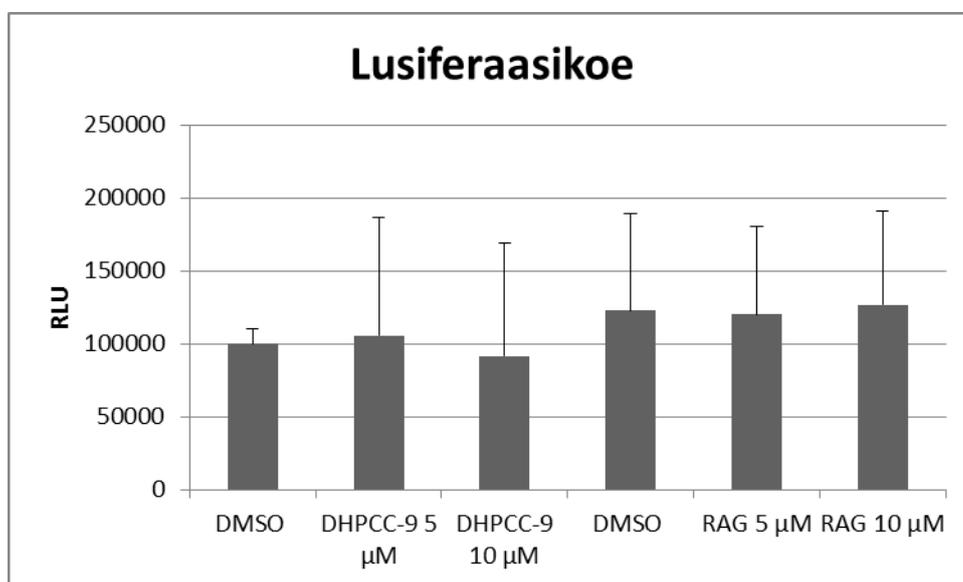
Kuvio 6. Inhibiittoreita sisältävien solujen määrät, jotka oli laskettu standardisuoraa käyttäen

Inhibiittoria sisältävien näytteiden metabolisesti aktiivisten solujen määrät laskettiin standardisuoran avulla kuviossa 6. Molemmilla inhibiittoreilla käsitellyt näytteet sisälsivät lähes saman verran soluja, mutta 10 μM DHPCC-9 näyte poikkesi jostain syystä muista.

5.2 Lusiferaasi ja β -galaktosidaasikokeet

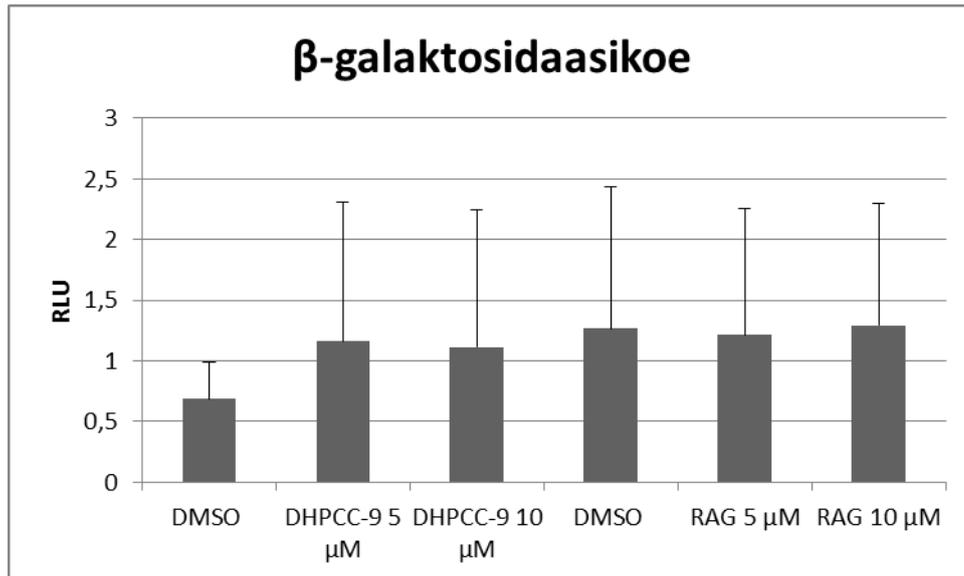
5.2.1 PC-3-eturauhassyöpäsolut

PC-3-eturauhassyöpäsoluilla toistettiin lusiferaasi- ja β -galaktosidaasikokeita useaan kertaan. Mittauksia tehtiin kahdella erilaisella sarjalla inhibiittoreita. Yhdessä sarjassa negatiivisen kontrollin eli DMSO-käsittelyn lisäksi molempia inhibiittoreita käytettiin 5 μM - sekä 10 μM -pitoisuuksilla. Toisessa testissä käytettiin DMSO-käsittelyä negatiivisena kontrollina, jonka lisäksi molempia inhibiittoreita pipetoitiin sarjana 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM ja 10 μM .



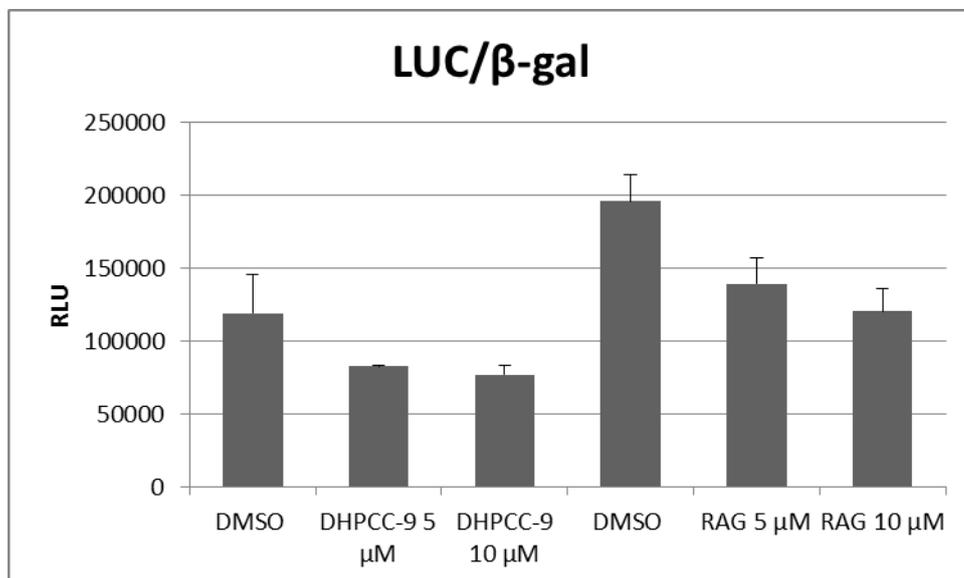
Kuvio 7. Lusiferaasiaktiivisuus 5 μM - ja 10 μM -pitoisuuksilla

Kuvion 7 tuloksia tarkasteltaessa huomataan, ettei näytteiden välillä ole ollut suuria eroja. Tuloksissa keskihajonta oli kohtalaisen suuri, joka saattaa vaikuttaa tuloksiin.



Kuvio 8. β-galaktosidaasiaktiivisuus 5 μM- ja 10 μM-pitoisuuksilla

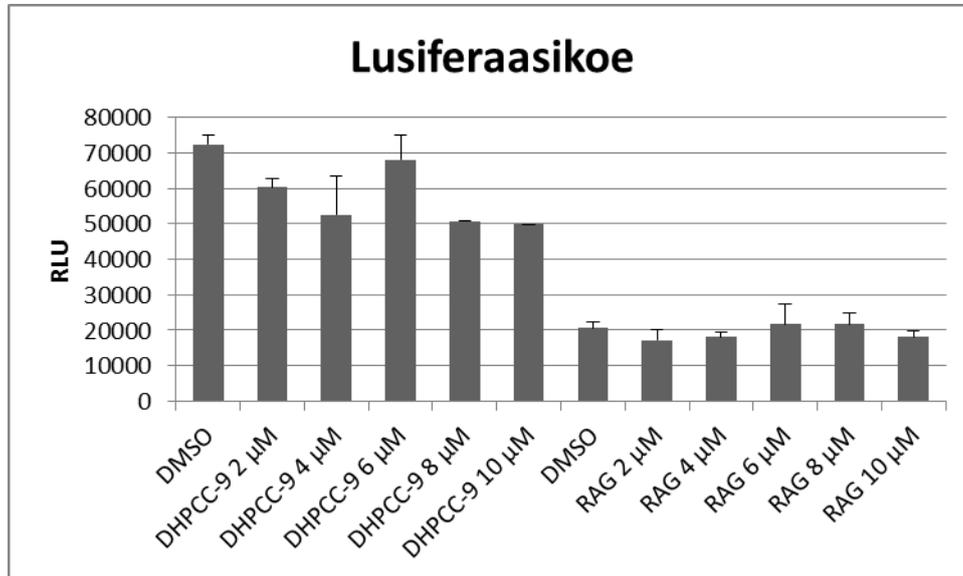
Kuvion 8 β-galaktosidaasikokeen tuloksissa arvot olivat yhteneväisiä kuvion 7 lusiferaasikokeen kanssa. Keskihajonta oli kohtalaisen suuri, mutta tulokset olivat keskenään samansuuntaisia.



Kuvio 9. Lusiferaasiaktiivisuuden tulokset, jotka oli normalisoitu β-galaktosidaasilla

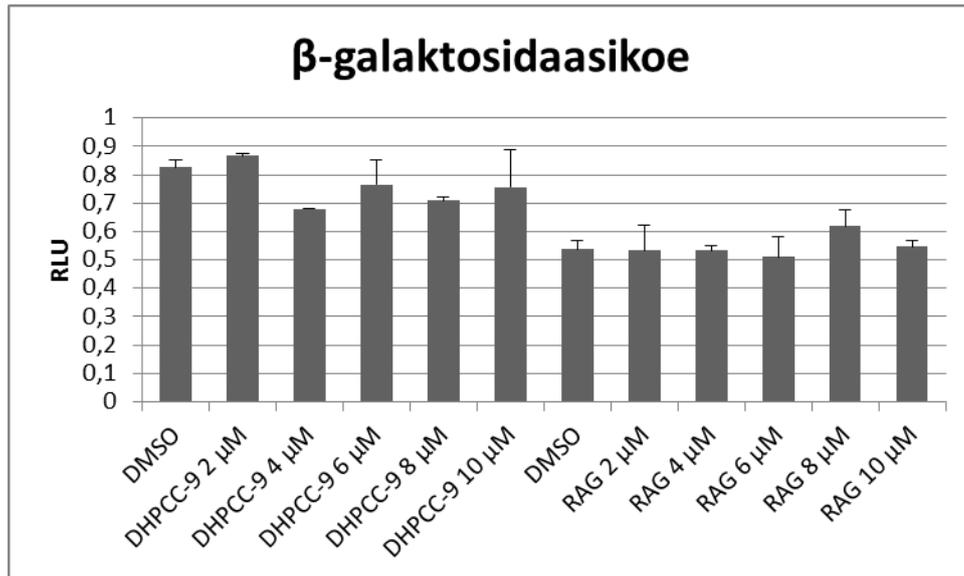
Lusiferaasikokeen tulokset normalisoitiin β-galaktosidaasikokeen tuloksilla kuviossa 9. Molempien inhibiittorien kanssa solujen aktiivisuus heikkeni verrattuna

kontrolliin. Vaikka näytteiden välillä oli paljon variaatiota sekä lusiferaasi- että β -galaktosidaasikokeissa, tämä variaatio pieneni merkittävästi, kun kunkin näytteen LUC-arvo normalisoitiin sitä vastaavalla β -gal-arvolla.



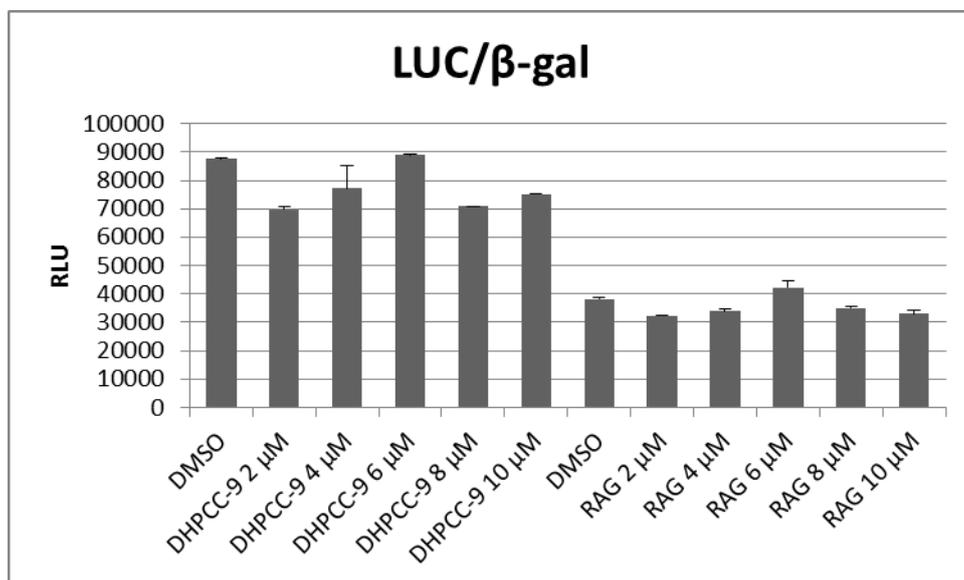
Kuvio 10. Lusiferaasiaktiivisuus inhibiittorien laimennossarjalla

Soluille pipetoitiin viisi eri pitoisuutta molempia inhibiittoreita. Kuviossa 10 on molempien inhibiittorisarjojen lusiferaasikokeen tulokset. DHPCC-9-inhibiittorin kanssa lusiferaasiaktiivisuus väheni verrattuna DMSO-kontrolliin. 6 μ M-pitoisuudessa aktiivisuus poikkeuksellisesti kasvoi. RAG-inhibiittorilla ei ollut yhtä suurta vaikutusta solujen lusiferaasiaktiivisuuden kanssa. RAG-inhibiittoria sisältävien solujen tulokset olivat matalampia kuin DHPCC-9:n tulokset. Syitä voi olla useita. RAG saattoi olla epävakaampi soluissa tai sen rasvaliukoisuus ja kyky päästä solukalvon läpi voi olla huonompi kuin DHPCC-9-inhibiittorilla.



Kuvio 11. β-galaktosidaasiaktiivisuus inhibiittorien laimennossarjalla

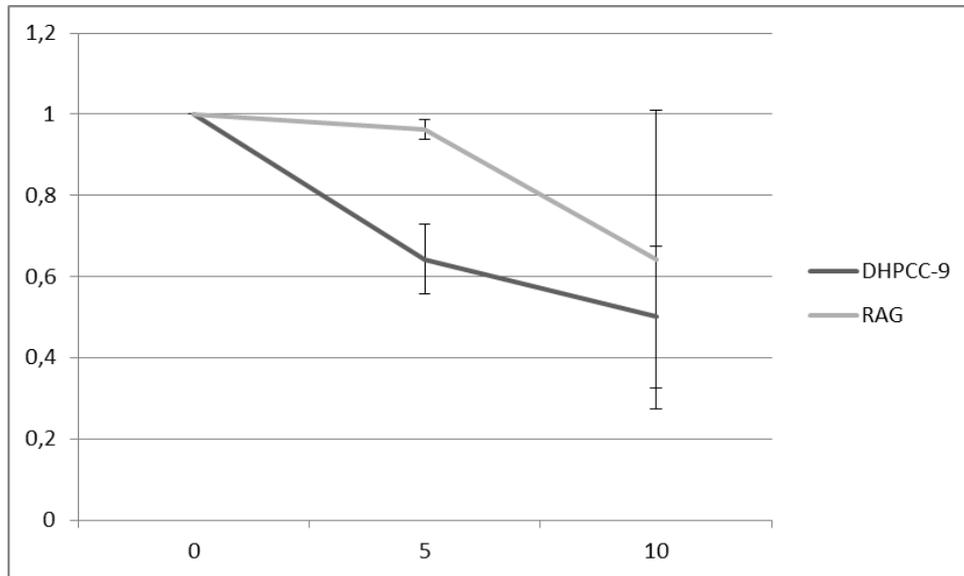
Näytteiden β-galaktosidaasikokeen tulokset olivat kuvion 11 mukaan samantyylliset näytteiden lusiferaasikokeen kanssa.



Kuvio 12. Inhibiittorien laimennossarjan tulokset, jotka normalisoitiin β-galaktosidaasilla

Kuvion 12 tuloksista näkyy, että solujen aktiivisuus heikkeni hieman DHPCC-9-inhibiittorin kanssa, lukuun ottamatta 6 μM pitoisuuden poikkeusta. RAG inhibiit-

tori ei vaikuttanut yhtä selkeästi soluihin kuin DHPCC-9. Keskihajonta oli vähäistä näissä tuloksissa, mikä parantaa tulosten luotettavuutta.

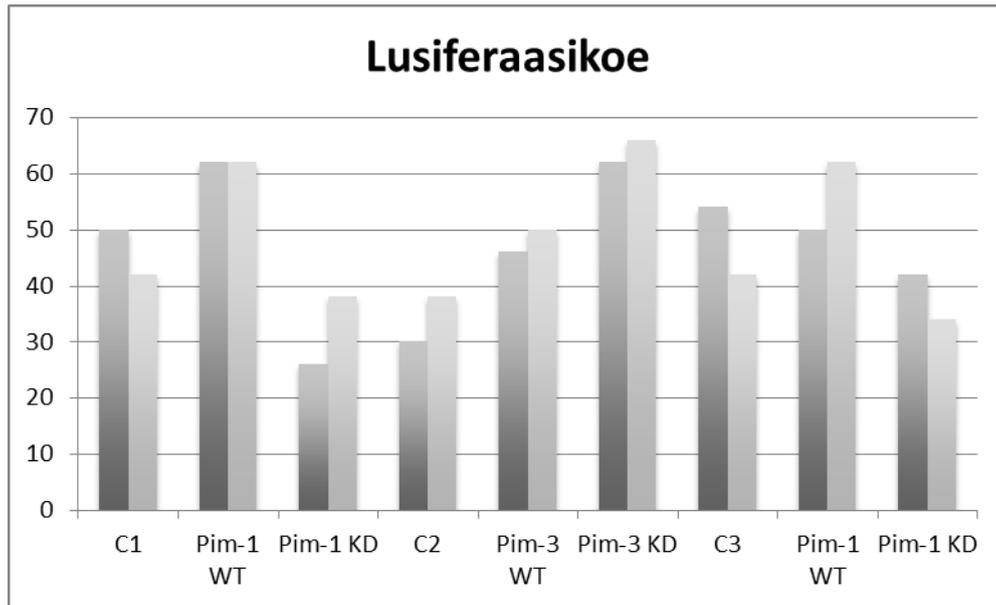


Kuvio 13. DHPCC-9- ja RAG-inhibiittorien vaikutus PC-3-syöpäsoluihin 5 µM- ja 10 µM-pitoisuuksilla

Kuviossa 13 esitetään yhteenveto usean testin tulosten keskiarvoista. Keskihajonta oli kohtalaisen suuri 10 µM-pitoisuuden tuloksissa. Tuloksista huomataan, että tutkittava inhibiittori RAG ei vaikuttanut soluihin yhtä hyvin, kuin DHPCC-9 inhibiittori. DHPCC-9 vaikutti soluihin jo selkeästi pienemmillä pitoisuuksilla.

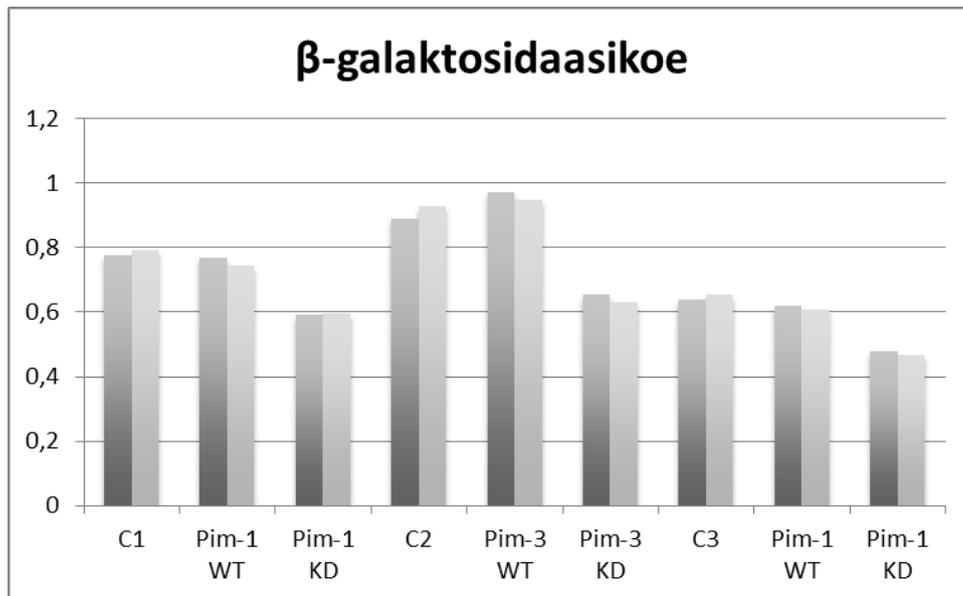
5.2.2 MCF-7-rintasyöpäsolut

MCF-7 rintasyöpäsoluille tehtiin β-galaktosidaasi- ja lusiferaasikokeet, joilla mitattiin Pim-1- ja Pim-3-kinaasin mutaatioiden vaikutuksia solujen aktiivisuuteen.



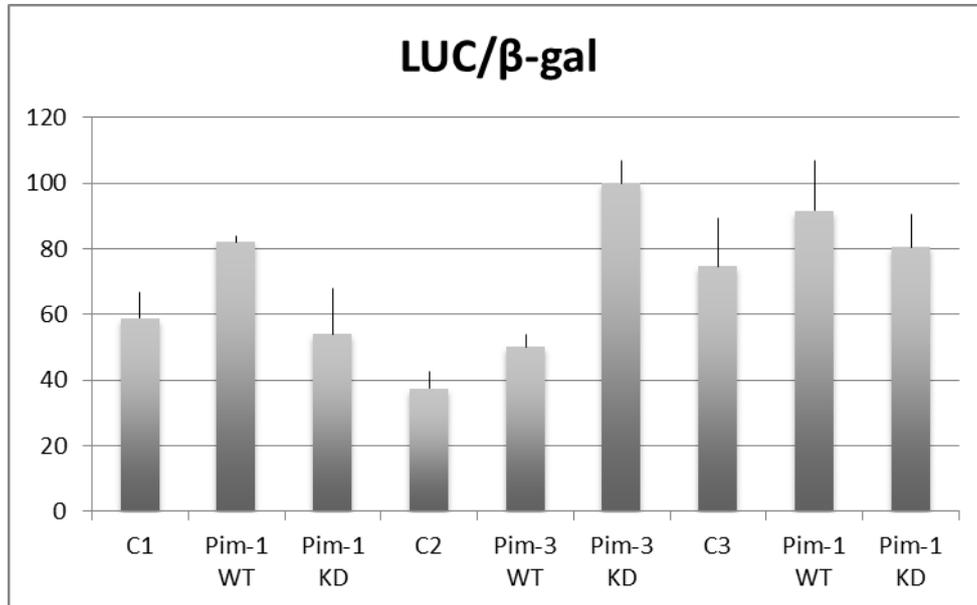
Kuvio 14. Pim-WT:n sekä Pim-KD:n vaikutus MCF-7-solujen lusiferaasiaktiivisuuteen

Kuviossa 14 on erikseen näkyvissä rinnakkaiset näytteet. Lusiferaasikokeen arvot olivat erittäin matalia, sillä Notchin aktiivisuus MCF-7-soluissa ilman stimulaatiota oli alhainen. Kuvioista näkee, että Pim-mutaatiota sisältävien solujen lusiferaasiaktiivisuus oli pienempi kuin Pim-villityypin, joka toimi kontrollina.



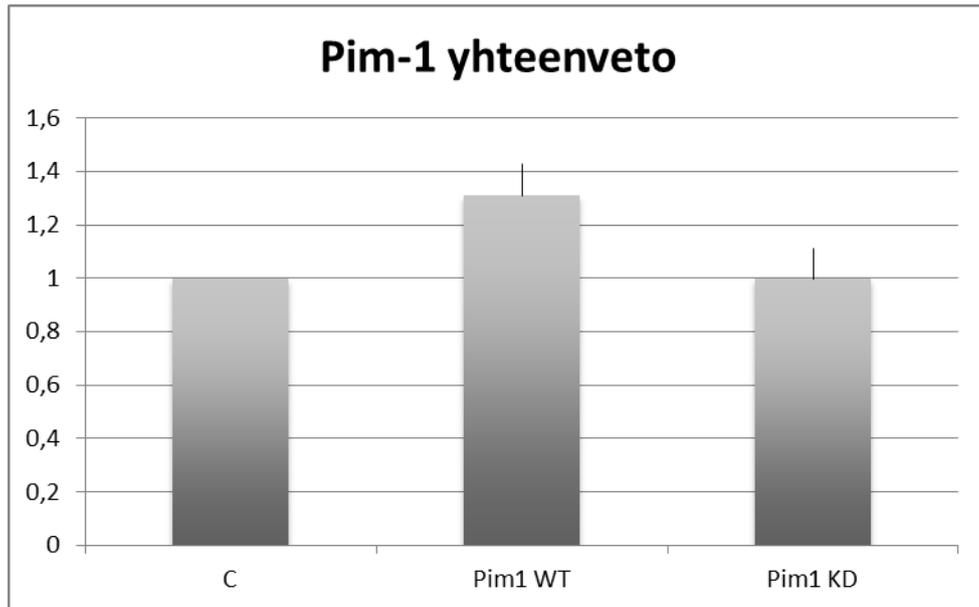
Kuvio 15. MCF-7-solujen β -galaktosidaasiaktiivisuus

Lusiferaasimittauksen normalisointiin tarkoitetun β -galaktosidaasikokeen tulokset näkyvät kuviossa 15. Rinnakkaiset tulokset olivat hyvin vertailukelpoisia keskenään, ja tulokset olivat suhteellisen tasaiset.



Kuvio 16. Lusiferaasikoe, jonka tuloksia on normalisoitu β -galaktosidaasikokeen tuloksilla

Kuvion 16 tuloksia tarkasteltaessa näkee, että Pim-1-villityypin arvot olivat suurempia kuin Pim-1-mutanttien ja että kahden eri koesarjan tulokset olivat vertailukelpoiset. Pim-3-WT nosti lusiferaasiaktiivisuutta, mutta Pim-3-mutaation tulokset eivät olleet oletuksen mukaiset, sillä se nosti aktiivisuutta kaikkein eniten.



Kuvio 17. Pim-1-villityypin sekä mutantin tulosten yhteenveto

Kuvio 17 havainnollistaa Pim-1:n villityypin ja mutaation vaikutuksia solujen lusiferaasiaktiivisuuteen. Pim-1-WT nosti aktiivisuutta, kun taas Pim-1-KD soluissa lusiferaasiaktiivisuus pysyi samalla tasolla kontrollisolujen kanssa.

6 POHDINTA

6.1 Yleinen pohdinta

Opinnäytetyön aihe oli ajankohtainen. Pim-inhibiittorien vaikutuksia syöpäsolujen toimintaan on tutkittu, minkä seurauksena on pyritty löytämään uusia, mahdollisesti tehokkaampia, Pim-selektiivisiä inhibiittoreita. Aiheen teoreettiseen viitekehykseen perehtymisessä hyvää harjoitusta toi suurimmaksi osaksi englanninkielinen aineisto. Ryhmän vetäjä neuvoi tarpeen vaatiessa aiheista suomeksi, ja täydensi teoreettista tietämystä. Tutkimuksessa käytetyt menetelmät opinnäytetyön tekijä opetteli soluviljelystä lähtien, sillä mitkään menetelmät eivät olleet ennestään tuttuja. Tämä saattoi vaikuttaa joidenkin tulosten luotettavuuteen. Kokemattomuuden huomasi esimerkiksi projektin toteutuksen alkupuolella reaktioseosten laskujen virheellisyytenä tai kuoppalevyjen pipetointivirheinä. Monien uusien menetelmien opettelu toi kuitenkin arvokasta kokemusta erilaisista molekyylibiologisista tutkimuksista ja niiden periaatteista. Tutkimuksen aikana kaikki työvaiheet kirjattiin tarkasti laboratoriopäiväkirjaan. Päiväkirjan perusteella pystyttiin tarkastelemaan aiemmin tehtyjä töitä ja tarvittaessa toistamaan kokeet samalla tavalla. Tutkimuksissa pyrittiin aina luomaan mahdollisimman samanlaiset olosuhteet ja tekemään rinnakkaiset näytteet. Nämä seikat parantavat tutkimustulosten luotettavuutta. Joitakin työvaiheita muutettiin tutkimusten edetessä, mikä vaikuttaa tulosten verrattavuuteen. Esimerkiksi solujen määrää ja inhibiittorien pitoisuuksia vaihdeltiin, jotta löydettiin parhaiten toimivat kokonaisuudet. Tutkimuksista saadut tulokset käytiin aina läpi yhdessä tutkimusryhmän vetäjän Päivi Koskisen kanssa.

6.2 Tutkimustulosten pohdinta

PC-3-solujen elinkykyä ja aineenvaihduntaa tutkittiin MTT-kokeilla. Testin tulokset tukivat jo aiemmin saatuja tutkimustuloksia siitä, ettei Pim-kinaasien estäminen inhibiittorin avulla vaikuta solujen elinkelpoisuuteen. Uusi RAG inhibiittori

toimi samantyyliisesti DHPCC-9-inhibiittorin kanssa. Solut pysyivät inhibiittoria sisältävissä näytteissä elinkykyisinä ja olivat metabolisesti jopa hieman aktiivisempia kuin kontrollina toimineet DMSO:lla käsitellyt solut. Tutkimus tehtiin vain kerran, mutta tulokset olivat verrattavissa aikaisempien tutkimusten tuloksiin (Santio ym. 2010). Toisena kontrollina toiminut solujen laimennossarja tuki myös tutkimustulosten oikeellisuutta.

Eturauhassyöpäsoluille tehtiin lisäksi lusiferaasi- ja β -galaktosidaasi-mittauksia, joilla pyrittiin selvittämään inhibiittorien vaikutuksia solujen aktiivisuuteen. Inhibiittoreista testattiin RAG ja DHPCC-9. Inhibiittorien määriä näytteissä vaihdeltiin. Inhibiittorien lisäämisen soluille oletettiin vähentävän solujen ilmentämän lusiferaasientsyymin määrää, sillä ne estävät Pim-kinaasia fosforyloimasta Notchia, ja myös Notchin toiminta muuttuu. Tutkimustuloksia tarkasteltaessa voidaan todeta, että DHPCC-9 selkeästi vähensi PC-3-eturauhassyöpäsolujen aktiivisuutta. Uusi tutkittava inhibiittori, RAG, ei toiminut yhtä hyvin kuin oli odotettu. RAG vähensi PC-3-solujen aktiivisuutta, mutta ei yhtä tehokkaasti kuin vertailuna toiminut inhibiittori. Tulosten luotettavuutta parantaa se, että useasta kokeesta saatiin vertailukelpoisia tuloksia. Kokeissa saattaa ilmaantua yksittäisiä poikkeuksia.

MCF-7-rintasyöpäsoluja tutkittiin, jotta saataisiin kattavampaa tietoa Pim-inhibition vaikutuksista inhibiittorien lisäksi. Kontrollinäytteinä oli DMSO:lla käsitellyt solut. Kontrollin lisäksi oli näytteitä, joihin oli transfektoitu Pim-villityyppiä tai Pim-kinaasi-inaktiivista mutanttia. Rintasyöpäsoluilla Pim-3-KD ei vaikuttanut oletuksen mukaisesti. Pim-3 mutaatio nosti lusiferaasiaktiivisuutta, joka saattaa johtua DNA-preparaatin laimeasta pitoisuudesta. Pim-1-mutaatiosta saatiin kuitenkin hyviä tuloksia, jotka vastasivat hypoteesia Pim-kinaasin vaikutuksesta solujen aktiivisuuteen. Pim-1- ja Pim-3-villityypit nostivat selkeästi solujen lusiferaasiaktiivisuutta kontrolliin verrattuna, sillä näissä soluissa Pim-kinaasit pääsivät fosforyloimaan Notch-reseptoriproteiinia, joka vaikuttaa solujen lusiferaasientsyymin tuotantoon. Pim-1-mutaatiossa kinaasin toiminta on estetty, jolloin fosforylaatiota ei pitäisi pystyä tapahtumaan eikä solujen aktiivisuuden pitäisi lisääntyä. Tuloksista näkyy, että näin kävi. Pim-1-KD-näytteiden lusife-

raasiaktiivisuus oli samalla tasolla kontrollinäytteiden kanssa. Tutkimusryhmän muut jäsenet toistivat vielä myöhemmin näitä kokeita ja varmistivat siten saamiensa tulosten luotettavuuden. Tuloksia esittelevä kuva myös julkaistiin osana Pim-kinaasien ja Notch1-proteiinin vuorovaikutuksia käsittelevää tieteellistä artikkelia (Santio ym. 2016).

6.3 Jatkotutkimusaiheet

Jatkotutkimusaiheena voisi tutkia tarkemmin Pim-kinaasiryhmän mutaatioiden vaikutuksia solujen aktiivisuuteen. Nyt saatiin hyviä tuloksia Pim-1-mutaatiosta MCF-7-soluilla. Tarkempia tutkimuksia voisi tehdä ainakin Pim-3-mutaatiolla ja selvittää reagoiko se samalla tavalla kuin Pim-1-mutaatio. Lisäksi mutaation vaikutusta voitaisiin tutkia myös muilla solulinjoilla, kuten PC-3-eturauhassyöpäsoluilla. Inhibiittorien vaikutuksia voisi myös tutkia muilla solulinjoilla, esimerkiksi PC-3-solujen lisäksi juuri MCF-7-rintasyöpäsoluilla. Pim-kinaasien ja niiden inhibition vaikutuksesta on jo saatu lupaavia tuloksia. Uusien inhibiittorien ja niiden vaikutusmekanismien tutkiminen saattaa osoittautua erittäin hyödylliseksi uusien syöpälääkkeiden kehittämisessä.

LÄHTEET

Aho, T. 2005. Pim-kinaasit verisolujen kasvun säätelyssä. Viitattu 17.10.2015.

http://www.terveyskirjasto.fi/terveysportti/uutissorvi_uusi.lue_abstrakti2?iid=7723&iprint=3&p_hakusana=.

ATCC®. 2014. Animal cell culture guide, tips and techniques for continuous cell lines. Viitattu 27.4.2016.

https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx.

Cooper, J. 2015. Encyclopædia Britannica. Kinase. Viitattu 17.10.2015.

<http://global.britannica.com/science/kinase>.

Duodecim Terveyskirjasto. 2012. Rintasyöpä: toteaminen ja ennuste. Viitattu 8.4.2016.

http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00618.

Erätuuli, M.; Leino, J. & Yli-Luoma, P. 1994. Kvantitatiiviset analyysimenetelmät ihmistieteissä. Helsinki: Kirjayhtymä Oy.

Felgner, P.; Gadek, T.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.; Wenz, M.; Northrop, J.; Ringold, G. & Danielsen, M. 1987. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA. Nov; 84 (21): 7413–7417. Viitattu 23.3.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC299306/>.

Fox, C.; Hammerman, P.; Cinalli, R.; Master, S.; Chodosh, L. & Thompson, G. 2003. The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. Genes & Development 17:1841–1854.

Gerard, M. 2015. Cell Signaling Technology. Protein kinases: Introduction. Viitattu 14.10.2015.

<http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=kinases>.

Heino, J. & Vuento, M. 2004. Solubiologia. 2., uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

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

Heiskanen, P. & Mankinen, S-T. 2004. Entsyymit – solutason työntekijät. 5/2004. Viitattu 17.10.2015.

http://www.helsinki.fi/kemia/opettaja/aineistot/entsyymit/rakenne_2.html.

Helsingin yliopisto. 2015. Tutkimusetiikka. Viitattu 16.10.2015.

<https://www.helsinki.fi/fi/tutkimus/tutkimusetiikka>.

Invitrogen/Gibco. 2014. Cell culture basics. Viitattu 24.3.2016.

<http://www.vanderbilt.edu/viibre/CellCultureBasicsEU.pdf>.

Joensuu, H.; Roberts, P.; Lyly, T. & Tenhunen, M. 2007. Duodecim Syöpätaudit. 3., uudistettu painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Koskinen, P. 2009. Soluviljelykurssi. Turku: Biologian laitos, fysiologian ja geenetiikan osasto.

Käypä hoito. 2014. Eturauhassyöpä. Viitattu 17.10.2015.

<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=hoi11060>.

Moreau, P.; Dezhenkova, L.; Anizon, F.; Nauton, L.; Théry, V.; Liang, S.;

Kaluzhny, D. & Shtil, A. 2014. New potent and selective inhibitor of Pim-1/3 protein kinases sensitizes human colon carcinoma cells to doxorubicin. *Anticancer Agents Med Chem.* 14:1228–1236, 2014.

NanoLight Technology. 2011. One step luciferase assay kits for detection of firefly luciferase. Viitattu 23.03.2016.

<http://nanolight.com/Uploads/file/NanoFuels/318%20one%20step%20luciferase%20assay%20kit.pdf>.

Nordcan, Association of the Nordic Cancer Registries. 2015. Tärkeimpiä tilastoja lyhyesti, Suomi - eturauhanen. Viitattu 17.10.2015. <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=261&country=246>.

Okamoto, K.; Eger, B.; Nishino, T.; Kondo, S.; Pai, E. & Nishino, T. 2003. An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase, crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. The journal of biological chemistry. Vol. 278, No. 3, Issue of January 17, pp. 1848–1855. Viitattu 27.4.2016. http://www2.dq.fct.unl.pt/cadeiras/METREG/Seminarios_files/XXXROS-XO-JBC-2003.pdf.

Pfizer. 2014. Eturauhassyöpä. Viitattu 8.4.2016. <http://www.syopainfo.fi/eri-syopamuodot/eturauhassyopa.html>.

Promega. 2016. Transfection. Viitattu 24.3.2016. <https://fi.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/transfection/>.

Saarelma, O. 2015. Eturauhassyöpä. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 17.10.2015. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00210.

Santio, N.; Eerola, S.; Paatero, I.; Yli-Kauhaluoma, J.; Anizon, F.; Moreau, P.; Tuomela, J.; Härkönen, P. & Koskinen, P. 2015. Pim kinases promote migration and metastatic growth of prostate cancer xenografts. Plos one. 10(6)e0130340, 2015.

Santio, N.; Landor, S.; Vahtera, L.; Paloniemi, E.; Imanishi, S.; Corthals, G.; Varjosalo, M.; Manoharan, G.; Uri, A.; Lendahl, U.; Sahlgren, C. & Koskinen, P. 2016. Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells. Oncotarget, painossa 2016.

Santio, N.; Vahakoski, R.; Rainio, E.; Sandholm, J.; Virtanen, S.; Prudhomme, M.; Anizon, F.; Moreau, P. & Koskinen, P. 2010. Pim-selective inhibitor DHPCC-

9 reveals Pim kinases as potent stimulators of cancer cell migration and invasion: Molecular Cancer 9:279.

Simon, A. & Kevin, K. 2008. Luciferase reporter assays: Powerful, adaptable tools for cell biology research. Cell Notes, issue 21. Viitattu 30.3.2016. https://www.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/publications/promega-luciferase-reporter-assays-publication.pdf.

Smale, S. 2010. Beta-galactosidase assay. Cold Spring Harb Protoc. May; 2010(5). Viitattu 23.3.2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439410>.

Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. Geenitekniikka. Turku: Turun ammattikorkeakoulu.

Syöpätieto. 2015. Viitattu 17.10.2015. <http://www.syopatieto.fi/util/syopasanakirja.shtml>.

Tammela, T.; Utriainen, T. & Rosenberg-Ryhänen, L. 2014. Suomen syöpäpotilaat Ry. Eturauhassyöpöpotilaan opas. Helsinki: Painotalo Redfina Oy.

Thermo Fisher Scientific. 2015. Phosphorylation. Viitattu 17.10.2015. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/phosphorylation.html>.

ThermoFisher scientific. 2015. Introduction to cell culture. Viitattu 22.3.2016. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html#>.

ThermoFisher Scientific. 2015. Reporter gene assays. Viitattu 8.4.2016. <https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/reporter-gene-assays.html>.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2014. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen (Power Point). Viitattu 16.10.2015.

<http://www.tenk.fi/> > Ohjeet ja julkaisut > Opetusmateriaali > Hyvä tieteellinen käytäntö (HTK) ja sen loukkausepäilyjen Käsitteleminen Suomessa.

Ulmanen, I.; Tenhunen, J. & Yläne, J. 2007. Geeni ja biotekniikka. Helsinki: WSOY.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa, määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki: Tammi

Liite 1 Toimeksiantosopimus



OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

1

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Minna Kristina Lagström
 Osoite Linnunpäänte 6 C 33, 20810 Turku
 Puhelin koti 040-5514874 Puhelin työ -11-
 Sähköposti minna.lagstrom@edu.turkuamk.fi
 Koulutusohjelma Bioanalyttikon ko.

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/työnimi Pim-inhibition vaikutus syöpäsoluissa.

Aikataulu Syysy 2015 - Kevät 2016

TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio Turun yliopisto / Eläinfysiologia
 Työn ohjaaja / yhteyshenkilö Koskinen Päivi
 Osoite Luonnontieteiden talo, Vesilinnante 5
 Puhelin 02-3335936 Sähköposti paivi.koskinen@utu.fi

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Sanna Virtanen
 Puhelin 044-9674576 Sähköposti sanna.virtanen@turkuamk.fi

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT***OHJAUS JA VASTUUT**

Vastuu opinnäytetyön tekemisestä ja tuloksista on opiskelijalla. Turun ammattikorkeakoulu vastaa opinnäytetyön ohjauksesta. Toimeksiantaja sitoutuu antamaan opiskelijan käyttöön kaikki opinnäytetyön tekemisessä tarvittavat tiedot ja aineistot sekä ohjaamaan opinnäytetyötä toimeksiantajaorganisaation näkökulmasta.

OIKEUDET

Opinnäytetyön tekijänoikeus kuuluu tekijälle eli opiskelijalle. Tekijänoikeuden lisäksi myös muiden immateriaalioikeuksien osalta noudatetaan kulloinkin voimassa olevaa kyseessä olevaa oikeutta koskevaa lainsäädäntöä.

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

Mahdollisesta työsuhteesta, työstä maksettavasta palkki-osta ja työstä mahdollisesti aiheutuvien kustannusten korvaamisesta toimeksiantaja ja opinnäytetyön tekijä sopivat erikseen.

TULOSTEN JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Mitä liike- tai ammattisalaisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Kirjallinen raportti luovutetaan toimeksiantajalle ja asetetaan kirjaston kokoelmiin tai julkaistaan elektronisessa muodossa verkkokirjastossa.

Julkaistava opinnäytetyöraportti on laadittava niin, ettei se sisällä liike- tai ammattisalaisuuksia tai muita julkisuuslaissa (laki viranomaisten toiminnan julkisuudesta) salassa pidettäväksi määrättyjä tietoja, vaan ne jätetään työn tausta-aineistoon. Opinnäytetyön arvioinnissa otetaan huomioon sekä julkaistava että salassa pidettävä osa.

Opinnäytetyön toimeksiantaja ja opiskelija sitoutuvat pitämään salassa kaikki opinnäytetyön tekemisessä ja sitä edeltävissä tai sen jälkeisissä neuvotteluissa esiin tulevat luottamukselliset tiedot ja asiakirjat.

Toimeksiantajan edustajalle varataan mahdollisuus tutustua opinnäytetyöraporttiin viimeistään neljätoista (14) päivää ennen aiottua julkaisemista. Toimeksiantaja antaa työstä ennen edellä mainittua julkaisemisajankohtaa lausunnon, jossa voidaan määritellä opinnäytetyöraporttiin mahdollisesti sisältyvät liike- tai ammattisalaisuudet, joita ei julkaista.

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETYLLE TAVALLA

11/3 20 16

11/3 20 16

Minna Lahti Minna Lahti

Opiskelija

Toimeksiantaja

Päivi Koskinen

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA

* Turun ammattikorkeakoulun toiminnan yhtiöittämistä vuoden 2014 alusta valmistellaan. Osakeyhtiön toiminnan aluetta tämä sopimus siirtyy Turun AMK:n toiminnan vastaanottavalle yhtiölle.

Liite 2 Solulaskut

Solujen laskeminen Bürkerin kammiolla

1. Solususpensiota pipetoidaan noin 10 μ l laskukammiota peittävän peitinlasin alle.
2. Solutiheyden määrittämistä varten lasketaan 3 A-ruutua.
3. Lasketaan tulosten keskiarvo.
4. Näytteen solutiheys

$\text{solua/ml} = \text{laskettujen solujen määrä} / \text{laskettujen kenttien määrä} \times \text{muuntokerroin} \times \text{laimennuskerroin}$

$\text{muuntokerroin} = 10^4 \text{ solua/ml}$, $\text{laimennuskerroin} = \text{laskettu solumäärä} \times 10^4 / \text{haluttu solumäärä} / \text{ml}$.

Esimerkki: Jos solujen laskettu keskiarvo on 125. $125 \times 10^4 = 1\,250\,000$ solua/ml. Haluttu solumäärä on 300 000 solua/ml. Laimennuskerroin saadaan jakamalla solumäärä halutulla solumäärällä eli $1\,250\,000 / 300\,000 = 4,2$.

Solususpensiota on falcon-putkessa 8ml, joka kerrotaan laimennuskertoimella. $8\text{ml} \times 4,2 = 33,6 \text{ ml}$, joka on solususpension kokonaistilavuus, jolloin soluja on haluttu määrä. Kokonaistilavuudesta miinustetaan jo olemassa olevan solususpension määrä, jolloin saadaan selville, kuinka paljon ravintonestettä täytyy pipetoida lisää. $33,6 \text{ ml} - 8\text{ml} = 25,6\text{ml}$ täytyy pipetoida ravintonestettä falcon-putkeen, jolloin liuoksen solutiheys on 300 000 solua/ml.

Liite 3 Solujen jakaminen

1. Siirrä solut laminaarikaappiin.
2. Ime ravintoneste pois lasipipetillä.
3. Pipetoi 2 ml trypsiini/EDTA liuosta maljalle.
4. Ime trypsiini/EDTA pois.
5. Pipetoi uudestaan 2 ml trypsiini/EDTA:ta. Anna vaikuttaa hetki.
6. Ime melkein kaikki pois.
7. Kopauta maljaa voimakkaasti ja tarkista solujen irtoaminen mikroskooppista.
8. Pipetoi maljalle ravintonestettä ja huuhtelumenetelmällä pipetoi aina 1 ml solususpensiota uusille maljoille, joissa on 9 ml tuoretta ravintonestettä (soluja kasvatetaan ja varastoidaan myöhempää käyttöä varten) tai kerää kaikki solususpensio falcon-putkeen solujen tiheyden määrittämistä varten (solut otetaan tutkimuksia varten käyttöön). Solutiheyden määrittämisen jälkeen pipetoi haluttu määrä soluja kuoppalevyille.
9. Laita maljat ja/tai kuoppalevyt +37C-asteiseen viljelykaappiin kasvaamaan.

Liite 4 Työohje FuGENE

1. Laske kuinka paljon DNA:ta täytyy pipetoida.
2. Siirrä solut, tarvittavat DNA:t ja reagenssit laminaarikaappiin. Anna reagenssin lämmetä +15- +25C-asteiseksi.
3. Pipetoi eppendorf-putkiin tarvittavat määrät DNA:ta.
4. Lisää putkeen ravintonestettä. Yhteen näytteeseen tulee 100µl ravintonestettä sis. 0,02 µg/µl plasmidia.
5. Lisää liuokseen FuGENE suoraan liuokseen suhteessa 3:1 DNA:han.
6. Vorteksoi putkia lyhyesti 1-2 sekuntia.
7. Inkuboi huoneenlämmössä 15 minuuttia.
8. Lisää liuos kuoppalevyihin ja pyörittele levyjä, jotta liuos sekoittuu tasaisesti.
9. Sekoita levyjä 30 sekuntia esimerkiksi tasoravistelijalla.
10. Laita levyt +37C-asteiseen inkubaatiokaappiin.

Liite 5 Työohje elektroporaatio

1. Lämmitä DMEM ravintonestepullo vesihauteella ja siirrä se laminaarikaapissa.
2. Pipetoi laminaarikaapissa eppendorf-putkiin transfektoitava plasmidi-DNA yht. 10 µg (β-gal 1,5 µg, CSL-LUC 6 µg, Pim/pCDNA3 3 µg). Pipetoi pCDNA3 putkeen TE-puskuria, jotta näytetilavuus on yhtä paljon kuin Pim näytteissä. Tämä toimii elektroporaatiokontrollina.
3. Siirrä solut laminaarikaappiin, kerää solut kolmesta maljasta falcon-putkeen ja määritä solutiheys.
4. Sentrifugoi falcon-putki 3 min, 1250 rpm, jolloin solupelletti painuu putken pohjalle.
5. Pipetoi sillä aikaa kolmeen 5ml:n maljaan lämmintä ravintonestettä ja nimeä viljelymaljat.
6. Ime falcon-putkesta ravintonestettä pois ja pipetoi tilalle 1200µl +37C-asteista DMEM:iä. Suspensoi solut. Pipetoi jokaiseen eppendorf-putkeen 400µl solususpensiota.
7. Sekoita pipetoimalla varovasti edestakaisin ja siirrä DNA-solususpensio elektroporaatiokyvetteihin.
8. Aseta elektroporaatiolaitteeseen asetuksiksi 230 V ja 975 µF. Naputtele vielä kyvettä, jos solut ovat laskeutuneet pohjaan ja aseta kyvetti elektroporaatiokammioon.
9. Anna soluille sähköimpulssi ja kirjaa ylös laitteen antama millisekuntiarvo.
10. Vie kyvetit takaisin laminaarikaappiin ja siirrä solut lasipasteurpipeteillä kyvetistä pieniin viljelymaljoihin.
11. Kasvata soluja +37C-asteisessa viljelykaapissa kaksi vuorokautta

Liite 6 Solujen lyysaus

Solut on irrotettu kuoppalevyiltä PBS:llä ja pipetoitu eppendorf-putkiin.

1. Sentrifugoi putket +4C-asteessa, 13 200 rpm, 10 sekuntia
2. Pipetoi muodostunut supernatantti pois.
3. Arvioi solupelletin määrä. Pipetoi lyysispuskuria 5-kertaa solupelletin tilavuus. Resuspendoi solut lyysispuskuriin.
4. Jäädytä solut nestetyypessä noin 1 minuutti.
5. Laita solut sulamaan +37C-asteiseen vesihauteeseen (max 5 minuuttia!) ja vorteksoi lyhyesti.
6. Toista kahdesti ja vorteksoi hyvin (vähintään 10 sekuntia).
7. Sentrifugoi +4C-asteessa, 13 200 rpm, 5 minuuttia.
8. Pipetoi supernatantti uusiin eppendorf-putkiin.

Pidä näytteitä jäähauteella!

Liite 7 Lusiferaasikokeen liuokset

Työohje 1. Lusiferaasiseos

1 x näytteelle

72 µl	Lusiferase assay buffer (sis. DTT)
8 µl	Lusiferiinistokkia
3,2 µl	0,25 M glysyyliglysiiniä
28,8	H ₂ O
Yht. 112 µl	

Valmista liuosta n + 10, pidä jäällä. Muista rinnakkaiset näytteet (2) ja blankit (4).

Työohje 2. Lusiferase assay buffer

200ml:aa varten

20 ml	0,25 M glysyylislysiini
3 ml	1 M KPO ₄ pH 7,8
3 ml	MgSO ₄
1,6 ml	0,5 M EGTA pH 7,8
220 mg	ATP
172,4 ml	H ₂ O

200 ml:n ohjeesta tehtiin yleensä 2-3 ml, jakamalla ohjeiden määrät.

Liite 8 β -galaktosidaasikokeen reaktioseos

Valmista seosta n + 1. Muista rinnakkaiset näytteet (2) ja blankit (4).

1 x näytteelle

50 μ l	ONPG
3 μ l	100xMg ²⁺ -puskuri
227 μ l	0,1 M NaPO ₄ – puskuri
Yht. 280 μ l	

Pidä näytteet jäähautella!