

Tiina Suutari, Milla-Maaria Trivedi ja Sanna-Maria Yrjänheikki

## **VAL201-PEPTIDIN VAIKUTUS RINTASYÖPÄSOLUJEN PROLIFERAATIOON**

## **VAL201-peptidin vaikutus rintasyöpäsolujen proliferaatioon**

Tiina Suutari, Milla-Maaria Trivedi,  
Sanna Yrjänheikki  
Opinnäytetyö  
Syksy 2013  
Bioanalytiikan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

## TIIVISTELMÄ

Oulun seudun ammattikorkeakoulu  
Bioanalytiikan koulutusohjelma

---

Tekijä(t): Suutari, Tiina Annika. Trivedi, Milla-Maaria. Yrjänheikki, Sanna-Maria Hannele  
Opinnäytetyön nimi: Val201-peptidin vaikutus rintasyöpäsolujen proliferaatioon  
Työn ohjaaja(t): Holmström, Anneli. Rasi, Simo. Reponen, Paula.  
Työn valmistuslukukausi ja -vuosi: Syksy 2013 Sivumäärä: 32 + 6 liitesivua

---

Projektimuotoisen opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää Val201-peptidin vaikutusta MCF-7-rintasyöpäsolujen proliferaatioon eli elinkelpoisuuteen. Projektimme tilaajana ja kustantajana toimi ValiRx Plc:n tytäryhtiö ValiRx Finland Oy ja se toteutettiin yhteistyössä Oulun seudun ammattikorkeakoulun kanssa.

Opinnäytetyömme kahtena päätavoitteena oli kasvattaa riittävä määrä MCF-7-soluja ja selvittää Val201-peptidin vaikutusta soluproliferaatioon. Soluja viljeltiin tarvittava määrä, jonka jälkeen peptidin vaikutusta arvioitiin spektrofotometrisellä mittauksella kaupallista WST-1-Cell Proliferation -reagenssia apuna käyttäen. Peptidiä lisättiin syöpäsoluja sisältäville 96-kuoppalevyille viitenä eri pitoisuutena ja vastetta tarkasteltiin. Levyille lisättiin myös estrogeenihormonia vaihtelevina pitoisuuksina, ja käytettyjä altistusajoja muunneltiin. Solujen elinkelpoisuutta tarkkailtiin koko soluviljelyn ajan, ja tästä tehdyn arvion mukaan soluja jaettiin kasvamaan uusiin viljelmiin.

Kontroloimme proliferaatiokokeen tuloksia suorittamalla rinnakkaismittauksia sekä vertaamalla saatuja arvoja nollanäytteisiin. Mitattujen absorbanssiarvojen perusteella arvioimme solujen vastetta peptidille sekä reagenssien ja kontrollien toimivuutta. Käytimme pylväsdiagrammeja sekä rinnakkaisarvojen keskihajontaa tulosten esittämisessä ja tilastoinnissa.

Havaitimme Val201-peptidin vaikuttavan estävästi rintasyöpäsolujen proliferaatioon kokeessa, jossa ulkopuolinen hormoniaaltistus puuttui. Sen sijaan hormonille altistettujen solujen proliferaatioissa estovaikutusta ei ollut havaittavissa. Tulosten perusteella arvioitiin Val201:n käyttömahdollisuuksia potentiaalisena rintasyöpälääkkeenä. Lääkkeen kehittelyyn liittyville jatkotutkimuksille todettiin olevan tarvetta.

**Avainsanat:** Val201-peptidi, MCF-7, apoptoosi, rintasyöpä, soluproliferaatio

## ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences  
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

---

Author(s): Suutari, Tiina Annika. Trivedi, Milla-Maaria. Yrjänheikki, Sanna-Maria Hannele  
Title of thesis: The Effect of Val201-peptide on MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation  
Supervisor(s): Holmström, Anneli. Rasi, Simo. Reponen, Paula.  
Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2013      Number of pages: 32 + 6

---

The final project of our thesis was carried out in order to determine if Val201- peptide has an effect on MCF-7- breast cancer cell viability on a cell culture in vitro. Finding that the peptide has an ability to drive cancer cells into apoptosis, the assigner might be able to develop it into a drug. The publisher and assigner of our project were ValiRx Plc and its subdivision ValiRx Finland Oy and the work was carried out in cooperation with Oulu University of Applied Sciences.

Two main goals of the project were to grow a sufficient number of MCF-7 cells and to find out if Val201- peptide has an effect on cell proliferation. The required amount of cells was cultured after which the peptide was added into the cultures on 96-well plates using five different concentrations. Varying concentrations of hormone were also added on some of the plates and the time of exposure varied as well at each point of measurement. The response of the cells was measured with a spectrophotometer by using a commercial reagent kit WST-1. Cell viability was continuously monitored and new cultures were started throughout the whole cell culture phase of the project.

The project gave promising results with non-hormonal cancer cells showing that Val201 decreased their proliferation. However, the peptide did not seem to have visible effect on the cells with hormone promoting the growth. The results suggest that further research is needed.

**Keywords:** Val201-peptide, MCF-7, apoptosis, breast cancer, cell proliferation

# SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ	
ABSTRACT	
SISÄLLYS	5
1 JOHDANTO	6
2 RINTASYÖPÄ JA MCF-7-SOLUT	8
2.1 Etiologia	8
2.2 Taudinkuva ja oireet	9
2.3 Kasvaimet ja hormonireseptorit	9
2.4 Hoito ja ennaltaehkäisy	10
2.5 MCF-7-Solut	10
3 APOPTOOSI	12
3.1 Solun ulkopuolinen syy	12
3.2 Solun sisäinen syy	13
3.3 Kaspasit	15
3.4 Kaspaseista riippumaton solukuolema	15
4 PROJEKTIOORGANISAATIO JA TAVOITTEET	16
4.1 Projektin tavoitteet	17
5 PROJEKTIN SUORITUS JA KÄYTETYT MENETELMÄT	18
5.1 Solujen kasvatus	18
5.2 Solujen testaaminen	19
5.3 Tulosten kontrollointi ja laadunvarmistus	20
5.4 WST-1-Cell Proliferation -reagenssi ja proliferaatioasteen määrittäminen	20
6 PROLIFERAATION TULOKSET	22
6.1 Koe 1: Val201-peptidin vaikutus soluproliferaatioon estrogeenin läsnäollessa	22
6.2 Koe 2: Val201-peptidin vaikutus soluproliferaatioon ilman hormonivaikutusta	25
6.3 Tulosten arviointi	28
7 POHDINTA	29
LÄHTEET	31
LIITTEET	

# 1 JOHDANTO

Rintasyöpä on yksi yleisimmistä syöpätaudeista: naisilla rintasyövän ilmaantuvuus on ollut nousujohteista 60-luvulta lähtien, mutta miehillä esiintyvyys on pysynyt tasaisena. Rintasyöpäkuolleisuus on kuitenkin pysynyt samana sekä naisilla että miehillä (Tärkeimpiä tilastoja lyhyesti, hakupäivä 22.02.2013). Rintasyövän hoitoon käytettäviä syöpälääkkeitä tutkitaan ja kehitetään jatkuvasti. Lääkkeillä voidaan vaikuttaa syövän etenemiseen eri tavoin: ehkäisemällä uudisverisuonten kasvua, estämällä solun jakautumista, tehostamalla syöpäsolujen apoptoosia tai estämällä solujen leviämistä (Syöpätutkimus ja syöpälääkkeiden kehittäminen, hakupäivä 10.10.2013). Lääkkeen kehittämisprosessi voi olla erittäin hidas ja lääkkeen saaminen markkinoille saattaa kestää jopa viisitoista vuotta. Ennen kliinisiä tutkimuksia lääkeaine käy läpi prekliiniset tutkimukset, joilla pyritään selvittämään aineen vaikutuksia elävään soluksoon esimerkiksi viljelemällä soluja laboratoriossa (Lääketietokeskus, 2005).

ValiRx Plc on kansainvälinen yritys, joka kehittää tuotteita onkologisten sairauksien eli syöpätautien hoitoon ja diagnostiikkaan. Yrityksen päätoimipiste on Lontoossa, Isossa-Britanniassa. ValiRx Plc:n tytäryhtiön ValiRx Finland Oy:n Oulun toimipiste sijaitsee Oulun seudun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveysalan yksikössä ja yritys toimii kiinteässä yhteistyössä bioanalytiikan koulutusohjelman kanssa. Projektimuotoisessa opinnäytetyössämme tutkimme ValiRx Plc:n kehittämän Val201-peptidin vaikutusta rintasyöpäsoluihin. Projektimme on osa laajaa lääkekehitysprojektia ja Pharmatest Services Ltd on tutkinut kyseisen peptidin vaikutusta syöpäsoluihin vuonna 2012. Salassapitosäädösten vuoksi emme kuitenkaan esittele aikaisempia tuloksia tässä raportissa. Työmme tilaajana on ValiRx Finland Oy:n sairaalakemisti Simo Rasi. Raporttoimme saamamme tulokset ValiRx Finland Oy:lle ja Rasi toimittaa ne edelleen ValiRx Plc:lle.

Val201-peptidi on solun jakautumista estävä proteiini, jonka vaikutus perustuu Src-kinaasien eli solun jakautumista ja erilaistumista edistävien entsyymien inhibitioon. Peptidi estää Src-kinaasien kiinnittymistä solunsisäisiin kalvorakenteisiin ja näin ollen rajoittaa sen toimintaa solussa. Tästä johtuen solusykli ei pääse etenemään ja solu ajautuu apoptoosiin eli solukuolemaan.

Opinnäytetyöprojektimme tarkoituksena on testata MCF-7 – tyyppisten, kaupallisesti saatavilla olevien rintasyöpäsolujen vastetta Val201-peptidille sekä kasvattaa kyseisiä soluja myös myöhempää tutkimuskäyttöä varten. Aihe liittyy keskeisesti molekyylibiologiaan, joka on yksi bioanalytiikan koulutusohjelman erikoistumisaloista. Soluviljely ja muu solujen käsittely tapahtuu steriileis-

sä olosuhteissa tarkoitusta varten suunnitellussa soluviljelylaboratoriossa Oulun seudun ammatti-korkeakoulussa.

Aiheen tutkiminen on tarpeellista, sillä Val201-peptidi on uusi, kokeiluvaiheessa oleva lääkeproteiini. Projektissa otamme selvää peptidin mahdollisesta vaikutuksesta altistuskokeella, jonka päätteeksi mittaamme solujen elinkelpoisuutta spektrofotometrisesti. Valittu menetelmä on kustannustehokas sekä yksinkertainen toteuttaa koulumme laitteistoilla. Vertaamme myös solujen apoptoosivastetta Val201:lle tilanteessa, jossa on läsnä ulkoinen syöpäsolujen kasvua edistävä hormonivaikutus.

Opinnäytetyömme aihe on meille sopiva, sillä olemme valinneet erikoistumisalaksemme molekyylibiologian ja geenitekniikan. Aihe on myös haastava, mutta halusimme tarttua siihen sen mielenkiintoisuuden ja ajankohtaisuuden vuoksi. Halusimme myös tehdä konkreettisen, laboratoriotutkimuksena suoritettavan opinnäytetyön. Projektin aikana syvennämme käytännön osaamistamme sekä opimme tarkastelemaan tuloksia kriittisesti arvioiden samalla työmme laatua. Kaikista tutkimustuloksistamme on hyötyä ValiRx Plc:lle Val201:n kehitystyössä.

## 2 RINTASYÖPÄ JA MCF-7-SOLUT

Rintasyöpä on yksi maailmanlaajuisesti yleisimpiä syöpätyyppejä. Siihen sairastuu Suomessa vuosittain noin 19 miestä ja 4147 naista, joista noin 2 (miehistä) ja 893 (naisista) menehtyy siihen. Naisilla rintasyövän ilmaantuvuus on vuosina 1960-2010 noussut jatkuvasti kuolleisuuden samalla kuitenkin pysyessä suhteellisen tasaisena, kun taas miesten kohdalla molemmat lukemat ovat säilyneet samantasoisina. (Suomen Syöpärekisterikeskus, hakupäivä 22.02.2013.)

### 2.1 Etiologia

Kuten kaikissa syövässä, myös rintasyövän tapauksessa sairastumiseen johtavia tekijöitä on useita. Erityisesti hormonaalisten, ympäristöstä riippuvien, yksilöstä riippuvien sekä perinnöllisten syiden katsotaan olevan suuressa roolissa (Joensuu, Roberts, Tenhunen & Teppo 2007, 484-485). Estrogeenien eli naissukupuushormonien määrän on todettu vaikuttavan rintasyövän mahdolliseen kehittymiseen huomattavasti: mitä enemmän estrogeeniä naisen elimistössä hänen elinaikanaan esiintyy, sitä todennäköisemmin hän sairastuu. Tämän katsotaan perustuvan estrogeenien biologiseen taipumukseen edistää solunjakautumista. Solun jakaantuessa tiheästi mahdollisuus DNA:n virheelliseen kopiointiin tai korjaukseen, ja sitä kautta kudoksen kasvun säätelyjärjestelmien pettämiseen, kasvaa (Barbieri & Strauss 2008, 659-660). Rintakudoksen estrogeeni on peräisin munasarjoista, rinnasta itsestään ja rauhasten ulkopuolisesta kudoksesta. Elämänaikainen estrogeenialtistus vaikuttaa suoraan sairastumisriskiin, joten seuraavien hormonaalisten tekijöiden katsotaan mahdollisesti voivan edistävää rintasyövän syntyä: varhainen kuukautisten alkamisikä, korkea ikä ensimmäisen raskauden alkaessa, ehkäisytablettien käyttö, hyperaktiiviset munasarjat, myöhäinen menopaussi sekä postmenopausaaliset hormonihoidot (Barbieri & Strauss 2008, 660-662).

Rintasyövän kehittymistä edesauttaa huomattavasti taudin esiintyminen suvussa. Karkeasti arvioiden jopa 33 %:lla rintasyöpädiagnoosin saaneista naisista on vähintään yksi sairastunut lähisukulainen (Joensuu ym. 2007, 65). Perinnölliseen sairastumisriskiin on liitetty erityisesti tuumorisuppressorigeenit BRCA1 ja BRCA2, jotka toimiessaan viiallisesti edistävät rinta- ja munasarjakudoskasvainten onkogeneesiä eli syövän syntyä. Muita rintasyöpään liitettyjä perinnöllisiä mutaatioita löytyy mm. CHEK2-, MLH1-, MSH2- ja FGFR2- nimisistä geeneistä (Berk, Bretscher, Kaiser, Krieger, Lodish, Matsudaira, Ploegh & Scott 2007, 1115). Vioittua voivat myös sellaiset proteiinit, jotka valvovat solusyklin aikana DNA:n korjausta ja kopiointia aiheuttaen siten mahdolli-



sesti virheitä prosessissa ja hallitsematonta solunjakautumista, esimerkiksi p53 (Barbieri & Strauss 2008, 659).

Vaikka perinnöllinen sairastumisriski olisikin olemassa, katsotaan silti yksilön elämäntavoilla olevan kenties suurin vaikutus syövän mahdolliseen syntyyn. Alkoholin runsas käyttö, tupakointi, ruokavalio ja sitä kautta ylipaino nostavat riskiä merkittävästi. Syöpätekijät voivat olla myös ympäristöperäisiä: esimerkiksi karsinogeeniset aineet, raskasmetallit tai radioaktiiviselle säteilylle altistuminen. Ei pidetä todennäköisenä, että mikään edellä luetelluista riittäisi välttämättä yksinään aiheuttamaan syövän, vaan katsotaan että useamman tekijän yhteisvaikutus suotuisaan aikaan johtaa sairastumiseen. (Abbas, Fausto, Kumar & Mitchell 2007, 743-745.)

## **2.2 Taudinkuva ja oireet**

Rintasyöpä, kuten kaikki muutkin syövän lajit, voi olla erityisesti alussa täysin oireeton. Taudin edetessä ja kasvaimen koon suurentuessa potilas kuitenkin monissa tapauksissa havaitsee sen melko varhaisessa vaiheessa ja myös vuosittain järjestettävät seulonnat edistävät diagnoosin tekoa (Cross & Underwood 2009, 257, 474). Syövän ensimmäinen havaittava oire on usein kova, aristamaton kyhmy jommassa kummassa rinnassa. Aristavuus on myös mahdollista. Muutokset nännin tai nänninpihan morfologiassa, värissä, ihon kunnossa tai niistä erittyvä verinen tai kirkas neste ovat mahdollisen kasvaimen merkkejä – varsinkin nännin vetäytyessä sisäänpäin tulee hoitoon hakeutua välittömästi.

Joissain tapauksissa potilaan ensimmäiset oireet voivat aiheutua rintasyöpäkasvaimen lähettämistä metastaaseista eli etäpesäkkeistä. Tällöin kyhmy voi löytyä kainalosta, ja oireilla voivat metastaaasin sijaintipaikasta riippuen myös hengityselimistö, ruuansulatuselimistö, liikuntaelimet, maksa tai aivometastaasin tapauksessa hermosto. (Joensuu ym. 2007, 485.)

## **2.3 Kasvaimet ja hormonireseptorit**

Rintakudoksen neoplasiat eli uudiskasvulliset muutokset voidaan jakaa hyvänlaatuisiin (esim. fibroadenooma, mastopatia) ja syöpämuutoksiin, joiden päätyypit ovat duktaalinen ja lobulaarinen karsinooma. Lobulaarinen karsinooma saa alkunsa rinnan maitorauhasista ja duktaalinen puolestaan maitotiehyistä. Molemmat syövät voivat esiintyä joko noninvasiivisina (ei metastastoivana: LCIS ja DCIS) tai invasiivisina (metastasointi muihin kudoksiin mahdollista). Harvinaisempia kas-

vaintyyppejä ovat mm. tubulaarinen, medullaarinen, papillaarinen ja musinoosi karsinoma. (Collins, Cotran & Kumar 1999, 1104-117.)

Kliinisissä tutkimuksissa on todettu, että kasvainsolujen pinnan estrogeeni- ja progesteronireseptoreilla on tärkeä rooli syövän kasvun säätelyssä. Reseptorit ylläpitävät ja ruokkivat kasvainkudosta, ja jopa 75 %:ssa kaikista rintasyövistä erityisesti estrogeenireseptorivaste on positiivinen. Hormonihjasteisten karsinoomien ollessa kyseessä potilaan ennuste on hieman parempi kuin ilman reseptoreita toimivan kasvaimen. (Cross & Underwood 2009, 483.)

## **2.4 Hoito ja ennaltaehkäisy**

Ensimmäinen hoitotoimenpide on lähes aina leikkaus. Joissain tapauksissa kasvaimen ollessa suuri ja potilaan niin toivoessa, saatetaan hoito aloittaa myös solunsalpaajilla kasvaimen pienentämiseksi ennen rintaa säästävää kirurgiaa. Seuraavat vaiheet ovat yleensä tapauksesta riippuen sytostaattihoidot ja kasvainalueen säteilytys sekä myöhemmin säännölliset vuosikontrollit. Uusiutuneen tai levinneen syövän hoidossa voidaan käyttää myös hormonaalisia lääkkeitä. (Joensuu ym. 2007, 492-502.)

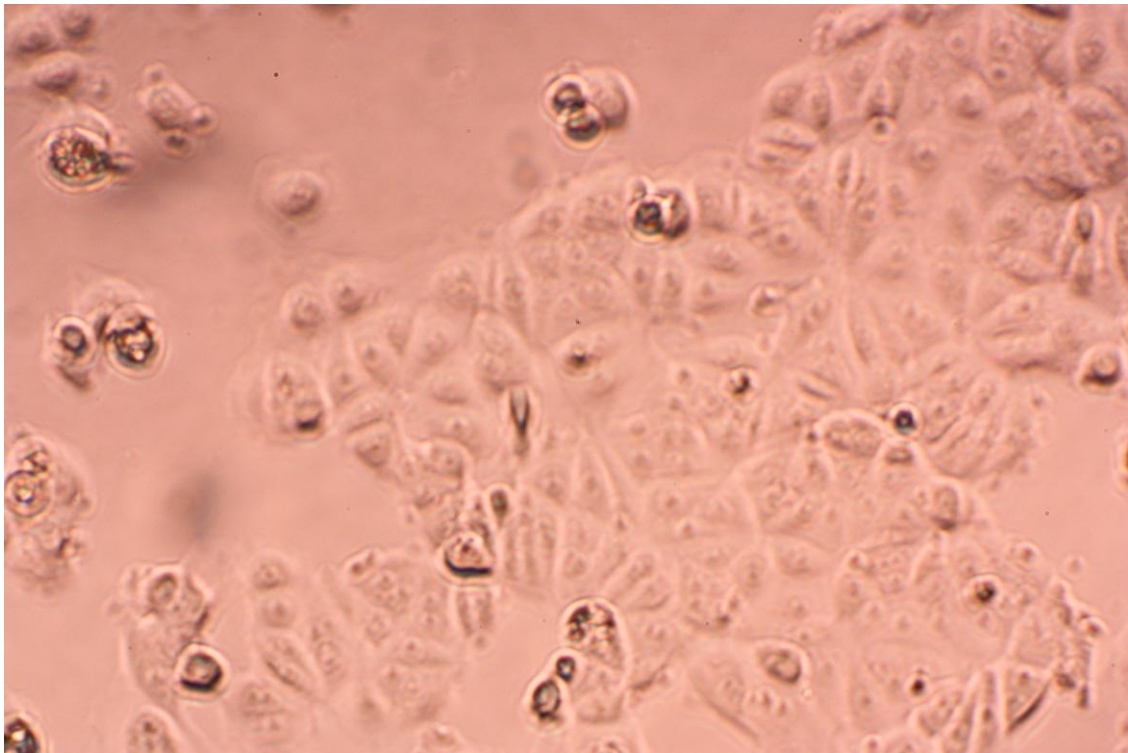
Lähes kaikissa korkean rintasyöpänsidenssin länsimaissa järjestetään seulontoja riskiryhmille. Mammografia-kuvantamisen lisäksi rintoja voidaan kliinisesti tutkia esimerkiksi ultraäänellä tai magneettikuvauksella. Kun neoplasia on todettu, otetaan siitä biopsia, ja patologin lausunnon perusteella tehdään päätös hoidosta (Cross & Underwood 2009, 474).

Rintasyöpää, kuten muitakin syöpiä, voi tehokkaimmin ehkäistä yksilönvalinnoilla. Edes syöpägeenin kantaminen ei altista sairastumiselle yhtä todennäköisesti kuin huonot elämäntavat, ja tästä syystä ennaltaehkäisevinä tekijöinä voidaan pitää liikuntaa, terveellistä dieettiä, varhaista lastensaantia sekä esimerkiksi imetystä (Joensuu ym. 2007, 484-485).

## **2.5 MCF-7-Solut**

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) on syöpä- ja soluviljelytutkimuksissa käytettävä kaupallinen rintasyöpäsolumlinja. Se eristettiin 1970-luvulla kaukasialaistaisen naisen pahanlaatuisesta adenokarsinoomasta.

MCF-7-solujen suosiota selittää se, että ne ovat säilyttäneet tutkimuksellisesti käyttökelpoisimmat ominaisuutensa erittäin hyvin verrattuna moneen muuhun solulinjaan. Solut kykenevät vastaamaan *in vitro*-olosuhteissa erilaisiin ärsykkeisiin samalla tavoin kuin syöpä käyttäytyisi ihmiselämässäkin. Solujen kasvuun voidaan vaikuttaa edistävasti mm. estradiolilla ja sytokeratiinilla, ja toisaalta inhiboivasti antiestrogeneilla sekä TNF-alfa-proteiinilla (Tumor Necrosis Factor Alpha). MCF-7-soluille löytyy siis monia erilaisia käyttökohteita kokeellisilla tieteenaloilla, ja erityisesti biokemian tutkimukset ovat hyötäneet niistä suuresti. Kuva 1.



Kuva 1. MCF-7-rintasyöpäsoluja soluviljelmässä (kuvaaja Simo Rasi).

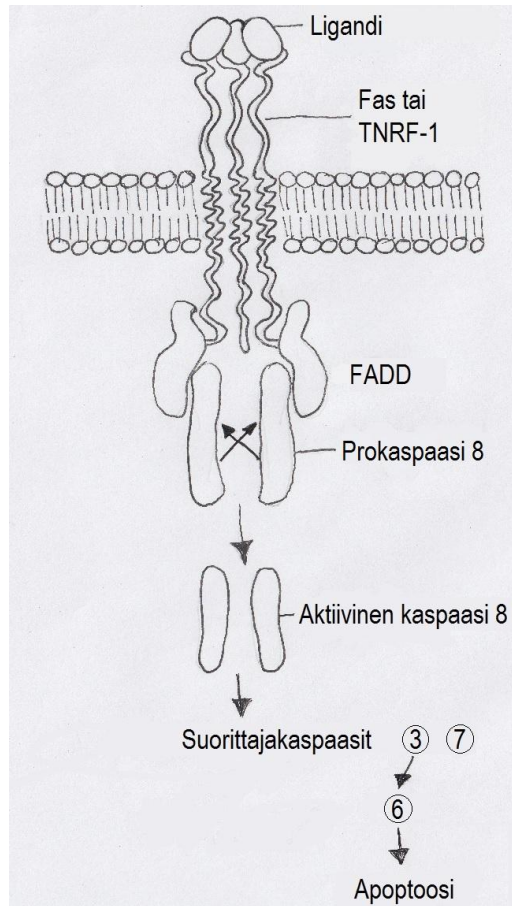
### 3 APOPTOOSI

Solu voi päätyä apoptoosiin kahdella eri tavalla: solu voi käynnistää itse tapahtumaketjun tai saada signaalin ulkopuolelta. Tällöin puhutaan solun sisäisestä ja ulkoisesta signaalista. Sisäinen signaali voi olla lähtöisin esimerkiksi mitokondriosta. Ulkoinen signaali puolestaan tulee soluun sen pinnalla olevien reseptorien kautta ja vasteen aiheuttaa ulkoiseen reseptoriin kiinnittynyt välittäjäaine tai vastinreseptori. Reseptoreita on yhden solun pinnalla vähintään kuusi, ja näistä yleisimmät ovat Fas- ja TNFR-1 reseptorit. Fas-reseptori ottaa vastaan apoptoosin käynnistävän signaalin, jolloin kaspasien ketjureaktio aktivoituu. Esimerkiksi tappaja T-solu (CD8+) käyttää Fas-reseptoria ja aktivoi solun rakenteita hajottavan entsyymireaktion. (Goodman 2008, 291-307.)

Apoptoosiprosessi sisältää kaksi eri vaihetta, latentin vaiheen ja toimeenpanovaiheen. Apoptoosia ei voida enää perua, mikäli se etenee latentin vaiheen loppuun. (Pollard 2008, 833-850.) Apoptoosin edetessä tumen kromatiini kondensoituu ja kasautuu tumakotelon reunoille. Solu alkaa kutistua ja genomisen DNA pilkkoutuu osiksi endonukleasin avulla. Tuma hajoaa, solukalvo poimuttuu ja solu fragmentoituu useiksi apoptoottisiksi kappaleiksi. Naapurisolut ja fagosyytit tyhjentävät syntyneen jätteen kudoksesta ja fagosytoivat apoptoottiset kappaleet nopeasti. (Potten & Wilson 2004, 15-60.)

#### 3.1 Solun ulkopuolinen syy

Solun ulkopuolelta saapuva viesti voi käynnistää apoptoosin nopeasti. Solun kuolemanreseptorien aktivoiminen voi johtua muun muassa tulehdustilasta, jolloin tulehdussolujen vastinreseptorit ja liukoiset välittäjäaineet laukaisevat reaktion. Fas-reseptorin välittämässä reaktiossa apoptoosin aktivoijana toimii esimerkiksi tappajasolun FasL-ligandi. Ligandin kiinnittyminen tuo yhteen kolme solunsisäistä FAS-proteiinia ja vaikuttaa samalla FADD-soviteproteiiniin, jolloin prokaspasi-8 siirtyy solukalvolle. FasL-ligandi, solukalvon reseptori, FADD-soviteproteiini ja prokaspasi-8 muodostavat yhdessä solukuolemaa edistävän signaalikompleksin (DISC = death-inducing signal complex). Tämän jälkeen prokaspasi-8 hajoitetaan kaspasi-8:ksi, joka puolestaan aktivoi suorittajakaspasit-3,-6 ja -7. Kaspasi-3 aktivoi kaspasi-6:n, mikä johtaa solun kuolemaan. (Pollard 2008, 833-850.) Kuvio 1.



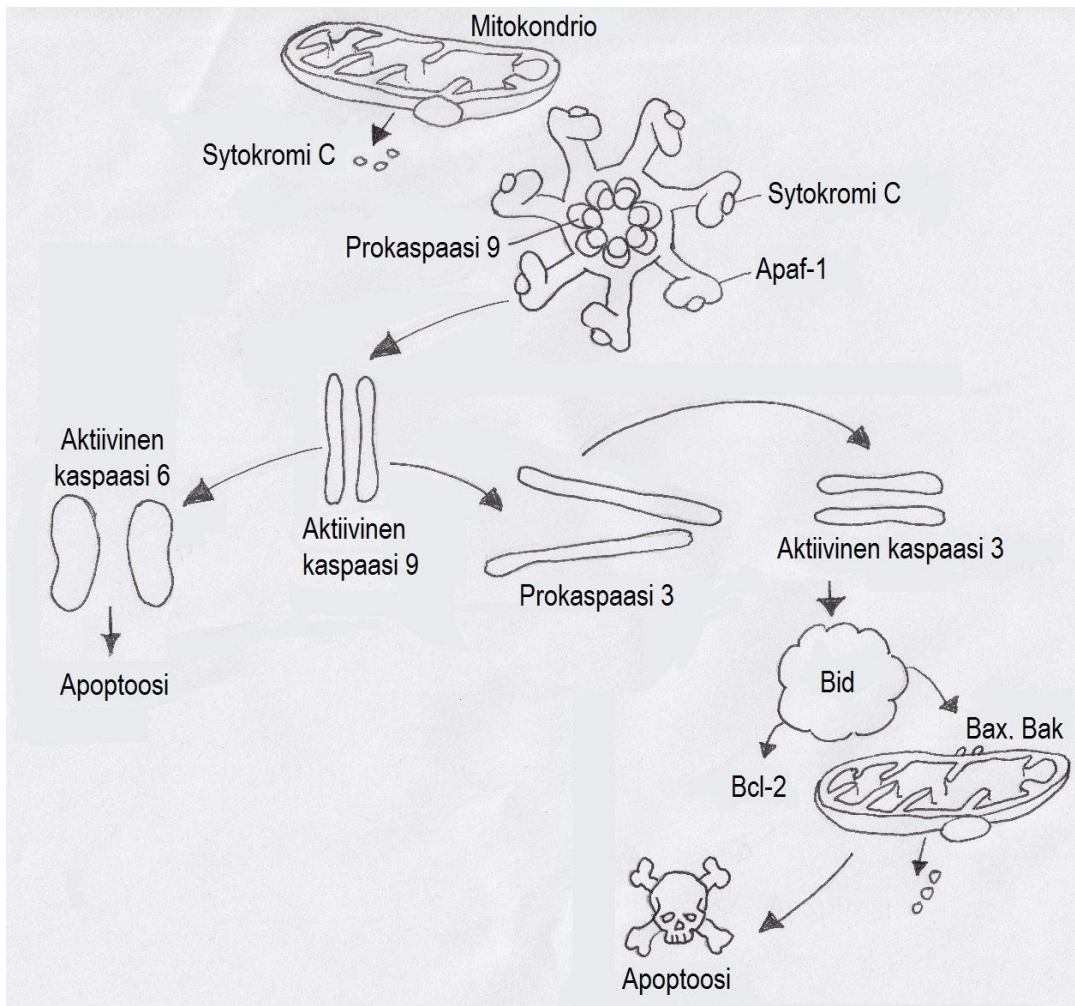
Kuvio 1. Kuva prokaspaasi-8 -välitteisestä solukuolemasta mukaellen Pollard 2008

TNFR-1-reseptorin kautta aktivoituneessa reaktiossa signaalin aiheuttaa liukoinen sytokiini eli liukoinen välittäjäaine. Tämä FasL:n kaltainen aine ei kuitenkaan aina käynnistä apoptoosia (Heino & Vuento 2007, 281-286). Kuvio 1.

### 3.2 Solun sisäinen syy

Mitokondriot voivat käynnistää apoptoosin tunnistamalla solussa vaikuttavia stressitekijöitä, sytoplasman oksidantteja sekä kalsiumin ylimäärää. Mitokondrion ulkokalvon kanavoista (Bax, Bak) vapautuva sytokromi c muodostaa yhdessä Apaf-1 proteiinin kanssa kompleksin, jolloin Apaf-1 muuttaa muotoaan. Prokaspaasi-9 kiinnittyy Apaf-1:n CARD-domeeniin omalla vastaavalla domeenillaan muodostaen näin apoptosomi-kompleksin, josta aktiivinen kaspaasi-9 irtoa. Kaspaasi-9 puolestaan aktivoi kaspaasi-6:n, joka varsinaisesti aikaansaa solukuoleman. Kaspaasi-9 aktivoi myös kaspaasi-3:n, joka pilkkoo edelleen Bid-proteiinin aktivoitujen samalla mitokondrioiden ulkokalvon kanavia (Bax, Bak). Tämä vapauttaa lisää sytokromi c:tä. (Pollard 2008, 833-850.)

Bax , Bak, Bad sekä Bcl-2-proteiinit kuuluvat kaikki samaan proteiiniperheeseen. Näistä Bak, Bax ja Bad edistävät apoptoosia, kun taas Bcl-2-proteiini estää sitä. Mekanismi toimii siten, että Bcl-2 säätelee prokaspasien aktivoitumista – tämä estää edelleen mitokondrion solukanavan aktivoitumisen, jolloin Bax ja Bak eivät aktivoitu. Kaspasireaktion lopputuloksena Bcl-2 hajoaa ja yhä suurempi määrä kaspaseja aktivoituu. Myös Bad-proteiini voi kiinnittyä Bcl-2 proteiiniin ja estää sen toiminnan (Alberts 2010, 609-650). Kuvio 2.



Kuvio 2. Kuva prokaspasi-9 -välitteisestä solukuolemasta mukaellen Pollard 2008

Muita apoptoosia estäviä tekijöitä ovat esimerkiksi Hsp70-proteiinit, joilla on käytössä useita mekanismeja: ne voivat mm. estää kaspasi-9:n aktivoitumista. Apoptoosi voi olla myös hidas, geenien säätelemä prosessi, jonka laukaisee jokin solun sisäinen tapahtuma, kuten vakava DNA-vaurio. Prosessissa on keskeisessä asemassa säätelyproteiini p-53, joka valvoo solusyklin etenemistä ja DNA:n virheetöntä kopiointia. Aktivoituttuaan p-53 siirtyy sytoplasmasta tumaan mikrotubulusten ja dyneiini-moottoriproteiinin avulla. Tumassa p-53:n on mahdollista säädellä apoptoosia useilla eri tavoilla. Solusykli voidaan pysäyttää p21-proteiinin avulla, apoptoosia voidaan

edistää Bax-geenin toiminnalla, tai se voidaan estää kokonaan ribonukleotidireduktaasigeenin aktiiviteetilla. (Pollard 2008, 833-850.)

Apoptoosimekanismista vastaa kolme geeniä: ced-3, ced-4 ja ced-9. Ced-3 tuottaa kaspaseja, ced-4 puolestaan ced-3:n toimintaa aktivoivaa proteiinia. Ced-3 ja -4 vastaavat siis apoptoosin etenemisestä. Ced-9 sen sijaan toimii apoptoosin estäjänä. (Bolsover 2011, 297-314.)

### **3.3 Kaspasit**

Kaspasit ovat solunsisäisiä kysteiiniproteaaseja, jotka ovat vastuussa sadan erilaisen proteiinin hajottamisesta solukuoleman aikana. Kaspasit jaetaan kahteen ryhmään: aloitteentekijäkaspaseihin sekä suorittajakaspaseihin. Aloitteentekijäkaspasit laukaisevat suorittajakaspasien toiminnan, ja suorittajakaspasit hajottavat solun proteiineja. Kaspaseja on tunnistettu tähän mennessä yhteensä 12 kappaletta. (Goodman 2008, 291-307.)

Apoptoosit voidaan jakaa kahteen eri kategoriaan: kaspasi-9-välitteiseen (solun sisäinen signaali) ja kaspasi-8-välitteiseen apoptoosiin (solun ulkoinen signaali). Kaspasi-9 ja kaspasi-8 aktivoivat kumpikin toimiessaan muita kaspaseja. (Bolsover 2011, 297-314.) Aktiivinen suorittajakaspasi muodostuu prokaspasiin kahdesta suuresta ja kahdesta pienestä domeenista pro-osien ensin poistuttua kompleksista. Aktiivinen kaspasi pilkkoo solurakenteet, apoptoosia estävät proteiinit ja Bcl-2-proteiinit, sekä vapauttaa DNA:ta hajottavan nukleaasi Cas:n. (Goodman 2008, 291-307.)

### **3.4 Kaspaseista riippumaton solukuolema**

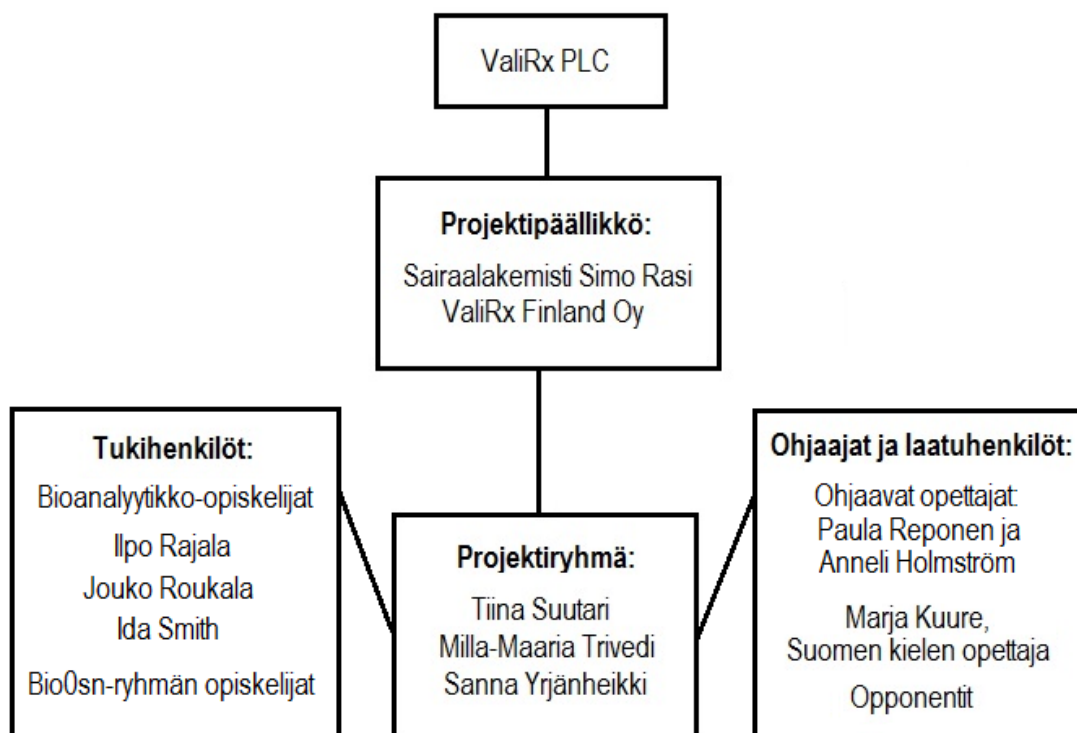
Solukuolema voi tapahtua ohjelmoidusti myös ilman kaspasien vaikutusta. Tätä nimitetään joko apoptoosin kaltaiseksi solukuolemaksi tai kaspaseista riippumattomaksi solukuolemaksi. Tavallisesta apoptoosista se eroaa siten, että solun osat hajotetaan proteasomeissa tai autofagisesti lysosomeissa. Solu voi kuolla tätä reittiä esimerkiksi kasvutekijöiden puutteessa tai jouduttuaan vieraaseen ympäristöön. Solun puutteellinen tai vääränlainen tarttuminen alustaansa voi myös laukaista tapahtumaketjun. (Heino 2007, 281-286.)



## 4 PROJEKTIORGANISAATIO JA TAVOITTEET

Opinnäytetyömme tilaaja on ValiRx Plc:n tytäryhtiö ValiRx Finland Oy, joka toimii yhteistyössä Oulun seudun ammattikorkeakoulun bioanalytiikan koulutusohjelman kanssa. ValiRx Plc on kansainvälinen yritys, joka kehittää tuotteita onkologisten sairauksien eli syöpätautien hoitoon ja diagnostiikkaan. Yrityksen päätoimipiste on Lontoossa, Isossa-Britanniassa.

Projektiorganisaatiolla tarkoitetaan hankkeen toteuttamista varten koottua organisoitua työryhmää (Pelin 2008, 65). Organisaatioomme kuuluvat projektipäällikkö, projektiryhmä, ohjaajat ja laatuhenkilöt sekä tukihenkilöt kuvion 3. mukaisesti. Projektipäällikkönämme on ValiRx Finland Oy:n sairaalakemisti Simo Rasi, joka vastaa projektin pääsuunnittelusta ja käytännön toteutuksen ohjaamisesta. Projektiryhmään kuuluvat opinnäytetyötä suorittavat bioanalyttikko-opiskelijat Tiina Suutari, Milla-Maaria Trivedi ja Sanna Yrjänheikki. Ohjaavina opettajina työssämme toimivat lehtorit Paula Reponen sekä Anneli Holmström (Oulun seudun ammattikorkeakoulu). Raportin kieliasuun antoi ohjeita suomen kielen ja viestinnän opettaja Marja Kuure. Työn laatua arvioivat ja kommentoivat myös opiskelijaopponentit. Tukihenkilöinä projektin aikana toimivat vastaavanlaista opinnäytetyöprojektia suorittavat bioanalyttikko-opiskelijat Ilpo Rajala, Jouko Roukala ja Ida Smith. Taustatukena on myös koko Bio0sn-opiskelijaryhmä.



Kuvio 3. Projektiorganisaatio



## 4.1 Projektin tavoitteet

Projektilla oli kaksi toteutuksellista päätavoitetta. Ensimmäisenä tavoitteena oli kasvattaa riittävä määrä elinkelpoisia MCF-7-rintasyöpäsoluja aloittaen yhdestä ostetusta soluampullista. Soluja tarvittiin runsaasti omia mittauksiimme ja tilaajan suunnittelemaa jatkotutkimuksia varten, joten kasvatusprojekti kesti pitkään. Toisena päätavoitteena oli selvittää vaikuttaako Val201-peptidi kasvatettujen solujen proliferaatioon ja soveltuuko valitsemamme analyysimenetelmä Val201:n vaikutuksen mittaamiseen.

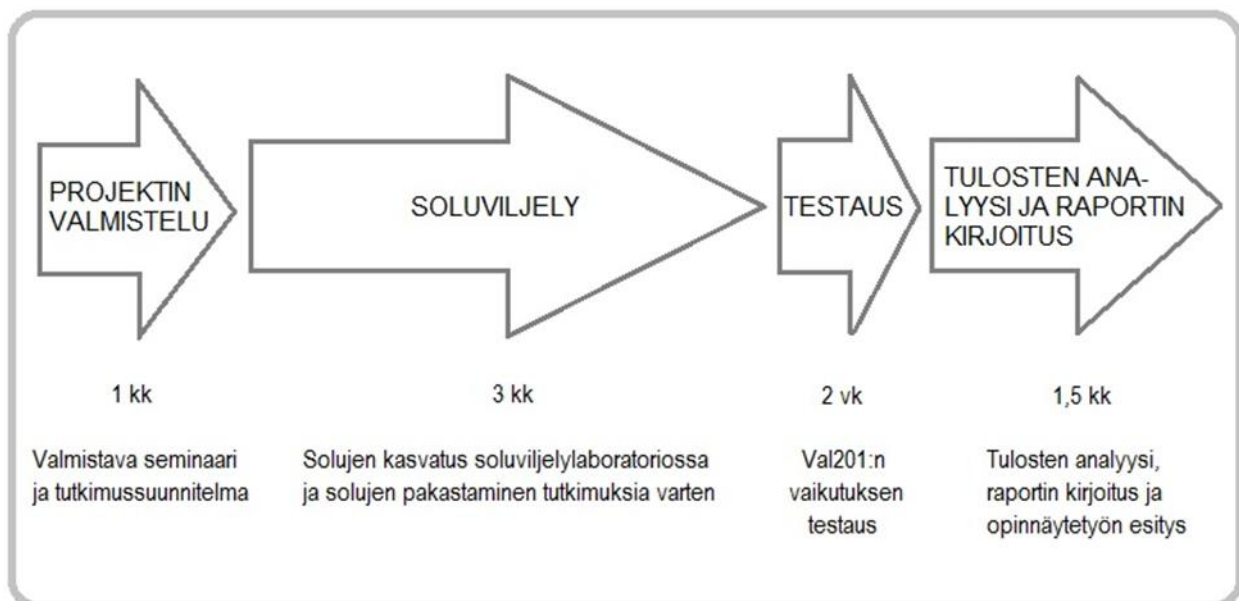
Laadullisena tavoitteena oli luotettavien ja käyttökelpoisten tulosten aikaansaaminen. Projektin tilaajan tulee voida hyödyntää niitä omissa jatkotutkimuksissaan. Pyrimme tähän tarkkuudella ja huolellisilla työskentelytavoilla niin soluviljelyssä, mittauksissa kuin tulosten analysoinnissakin.

Oppimistavoitteenamme oli syventää teoretiamystämme sekä laajentaa ammatillista osaamisemme solujen käsittelyssä ja viljelyssä. Tavoitteenamme oli pyrkiä ensiluokkaiseen laatuun työn jokaisessa vaiheessa erityisesti laboratoriotyöskentelyn osalta. Koko projektin ajan päämääränämme oli toiminnallamme toteuttaa GLP-arvoja (Good Laboratory Practise).

Taloudelliseksi tavoitteeksi asetimme ympäristövaikutusten huomioimisen sekä kestävä kehityksen edistämisen. Ajallisesti tavoitteenamme oli suorittaa projektin laboraatio-osuus kevätlukukauden 2013 loppuun mennessä. Raportin kirjoitustyön ja esittämisen oli määrä toteutua syksyn 2013 aikana.

## 5 PROJEKTIN SUORITUS JA KÄYTETYT MENETELMÄT

Projektin työvaiheet suoritettiin Oulun seudun ammattikorkeakoulun sosiaali- ja terveystieteiden yksikön laboratoriotiloissa vuoden 2013 helmi-toukokuun välisenä aikana. Aloitimme projektin valmistelun projektipäällikkömme Simo Rasin johdolla. Työ suunniteltiin ja toteutuksen aikataulu määritettiin, jonka jälkeen Rasi hankki meille soluviljelyn aloittamiseen tarvittavan MCF-7-ampullin sekä muut työvälineet. Työohjeena käytimme Pauliina Soivuoren opinnäytetyönään kirjoittamaa soluviljelyohjetta (OAMK, 2012). Saimme myös ohjausta solujen käsittelyssä ja viljelyssä käytettävien liuosten valmistamiseen sekä käyttöön. Varsinaisen toteuttamisvaiheen aloitimme soluviljelystä, jota kesti kolme kuukautta. Mittausvaiheeseen aikaa kului kaksi viikkoa, jonka jälkeen analysoimme tulokset ja kirjoitimme raportin. Kokonaisuudessaan projektin suorittamiseen kului noin kuusi kuukautta. Kuvio 4.



Kuvio 4. Projektiaikataulu ja projektitehtävät

### 5.1 Solujen kasvatus

Projektimme ensimmäinen tavoite oli kasvattaa tarvittava määrä MCF-7-soluja. Aloitimme soluviljelyn sulattamalla syväjäädetyt MCF-7-soluampullit ja viljelemällä sen ensimmäiseen kasvatuspulloon. Solut jätettiin kasvamaan hiilidioksidikaappiin (CO<sub>2</sub> 5 %, +37 °C). Kävimme useasti viikossa vaihtamassa solujen kasvatusmediumin sekä seurassimme kasvustojen tiheyttä mikroskoimalla niitä päivittäin. Kasvuston tiheyden mukaan jaoimme soluja aina uusiin kasvatuspulloihin ja pakastimme ylimääräisiä soluja. Pakastusta varten suojasimme solut DMSO:lla (dimetyy-

lisulfoksidi) ja freezing-mediumilla. Tämän jälkeen solut siirrettiin ampulleissa isopropanoliin ja pakastettiin vuorokaudeksi -70 °C:een. Seuraavana päivänä ampullit siirrettiin nestetyypeen (-196 °C) pitkäaikaista säilytystä varten. Päätimme soluviljelyyn, kun saavutimme tarvittavan määrän solumateriaalia sekä omaan käyttöömme että tilaajan jatkotutkimuksia varten.

## 5.2 Solujen testaaminen

Projektimme toisena tavoitteena oli testata Val201-peptidin vaikutusta soluproliferaatioon. Soluviljelyn päättövaiheessa jaoimme osan soluista kasvamaan 96-kuoppalevyille ja altistimme ne testattaville aineille. Näin pääsimme aloittamaan kaksiosaisen koesarjamme.

Ensimmäisessä proliferaatiokokeessa (koe 1) tarkkailtiin Val201:n vaikutusta MCF-7-solujen proliferaatioon estrogeenin läsnäollessa käyttäen kahta eri estrogeenipitoisuutta; 1 nM ja 10 nM. Altistimme solut hormonille, koska estrogeeni edistää MCF-7-solujen kasvua. Tutkimme näin Val201:n kykyä inhiboida solujen kasvua tilanteessa, jossa ulkoinen stimulaatio edistää proliferaatiota. Val201-peptidin vaikutusta testattiin viidellä eri pitoisuudella, jotka olivat valmiissa kasvatusliuoksessa 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM ja 1000 nM (200 µl kasvatusliuovuus). Kaikista pitoisuuksista mitattiin rinnakkaisarvot, ja näytteiden altistusajoja estrogeenille sekä Val201:lle muutettiin. Valmistimme kasvatusliuokset pipetointikaavion mukaisesti:

50µl estrogeeni 100 µl MCF-7 50 µl 0,4 nM Val201	50µl estrogeeni 100 µl MCF-7 50 µl 4 nM Val201	50µl estrogeeni 100 µl MCF-7 50 µl 40 nM Val201	50µl estrogeeni 100 µl MCF-7 50 µl 400 nM Val201	50µl estrogeeni 100 µl MCF-7 50 µl 4000 nM Val201
---	---	--	---	--

*Kuvio 5. Liuosten pipetointilavuudet. 100 µl MCF-7-soluliuosta sisältää 40 000 solua (laskettu Bürker-kammiossa), ja valmiiden kasvatusliuosten estrogeenipitoisuudet ovat 1 nM ja 10 nM.*

Koe 1:ssä analysoitiin soluja kolmelta eri 96-kuoppalevykasvustolta. Ensimmäinen solukasvusto analysoitiin kahden vuorokauden, toinen viiden vuorokauden ja kolmas seitsemän vuorokauden kuluttua estrogeeni- ja Val201-altistuksen aloittamisesta. Proliferaatiokokeessa solunäytteiden absorbanssit mitattiin 0,5 h, 1 h, 2 h ja 4 h WST-1:n (cell-proliferation -reagenssi) lisäämisen jälkeen. Mittaus suoritettiin spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm. Näytteitä inkuboitii ennen mittausta ja mittausten välillä hiilidioksidikaapissa (CO<sub>2</sub> 5 %, +37 °C).

Toisessa koesarjassa (koe 2) kasvatimme soluja ilman estrogeenialtistusta, mutta käytimme Val201:tä samanlaisessa nousevan pitoisuuden sarjassa kuin kokeessa 1. Kaavio 3. Analysoim-

me kahden 96-kuoppalevyn solukot kahden vuorokauden Val201-altistuksen jälkeen. Molemmilta kuoppalevyiltä mitattiin neljät rinnakkaiset tulokset. Absorbanssimittaukset suoritettiin jälleen 0,5 h, 1 h, 2 h ja 4 h WST-1:n lisäämisen jälkeen ja näytteitä inkuboitiin hiilidioksidikaapissa (CO<sub>2</sub> 5 %, +37 °C).

### 5.3 Tulosten kontrollointi ja laadunvarmistus

Soluviljelyn aikana tarkkailimme solujen kasvuolosuhteita mittaamalla päivittäin hiilidioksidikaapin lämpötilan sekä hiilidioksidipitoisuuden. Solujen syväjäädätyksessä käytetyn nestetyypen pinnan korkeutta mittaamalla varmistimme pakastettujen solujen säilymisen. Pinnankorkeus mitattiin keran viikossa ja tarvittaessa nestetyyppiä tilattiin lisää. Säilyvyyden parantamiseksi käytimme myös DMSO-liuosta (dimetyylisulfoksidi), joka suojelee soluja jäätymisen aiheuttamilta vaurioilta. Solujen elinkelpoisuutta testattiin myös sulattamalla ja viljelemällä uudelleen jo jäädetyttyjä soluja.

Kontrolloidaksemme mittausvaiheen tuloksia kasvatimme jokaista Val201-laimennossarjaa kohden kahdet kontrollisolut, joita emme altistaneet Val201:lle. Koe 1:ssä toiset kontrollisolut kasvoivat estrogeenipitoisessa kasvatusmediumissa. Koe 2:ssa käytimme kontrolleina pelkästään DMEM-kasvatusmediumissa kasvaneita MCF-7 soluja. Käyttämämme kontrollit olivat siis:

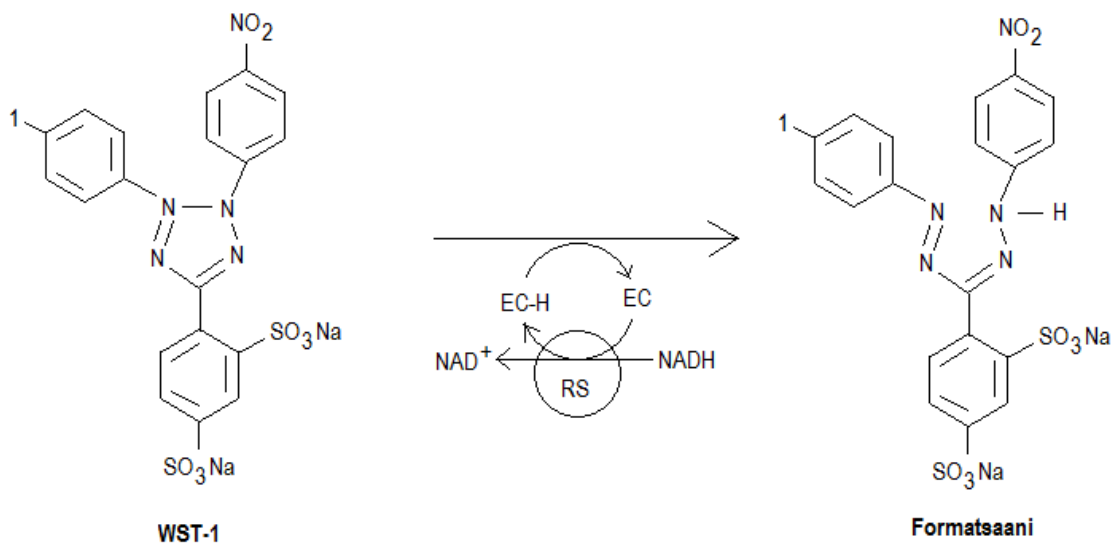
- 1) estrogeenikontrollit; 1 nM estrogeeni ja 10 nM estrogeeni (koe 1)
- 2) DMEM-kontrolli (koe 2)

Kirjasimme työvaiheet päivittäin laboriopäiväkirjaan. Näin kykenimme aina tarvittaessa palaamaan aikaisemmin suoritettuihin toimenpiteisiin ja valvomaan työn laatua. Laboriopäiväkirja luovutettiin työn tilaajalle mahdollisia myöhempiä käyttötarkoituksia varten (esimerkiksi tutkimuksen toistettavuus).

### 5.4 WST-1-Cell Proliferation -reagenssi ja proliferaatioasteen määrittäminen

Kun soluja kasvatetaan viljelmissä, on niiden proliferaation (kasvun etenemisen) ja elinkelpoisuuden määrittäminen usein tärkeä osa tutkimusta. Tarkoitukseen on kehitetty muutamia varsin käytökelppoisia menetelmiä. Näistä päädyimme käyttämään WST-1-Cell Proliferation -reagenssin liuoksessa aikaansaaman värireaktion muutokseen perustuvaa kittiä sen helpon saatavuuden, toutettavuuden sekä matalien kustannusten vuoksi.

WST-1 on vesiliuoksessa hieman punertavan värinen tetratsolium-suola, jota lisätään suoraan kasvatusalustalle solujen proliferaatioasteen määrittämiseksi. Elinkelpoisten, aktiivisten solujen mitokondrioiden dehydrogenaasientsyymit pilkkovat tetratsolium-suoloista formatsaani-nimistä yhdistettä katkaisemalla yhden sen heterosyklisistä hiilirenkaista (katso kuvio 6). Renkaan rakenne siis hajoaa vetyatomien poistuessa siitä. Muodostuva formatsaani on vesiliuoksessa väriltään kirkkaan punaista. Tapahtuva värireaktio korreloi näin ollen suoraan solujen mitokondrioaineenvaihdunnan aktiivisuuteen – mitä voimakkaampi reaktio, sitä enemmän maljalla on eläviä ja hyvinvoivia soluja. Reaktio kyetään jossain määrin havaitsemaan paljaalla silmällä, mutta tarkempaa määrittystä varten tulee tutkittavasta näytteestä mitata sen absorbanssi. Tämä tapahtuu spektrofotometrillä.



Kuvio 6. Formatsaanin muodostuminen WST-1:stä Rochea mukaellen

## 6 PROLIFERAATION TULOKSET

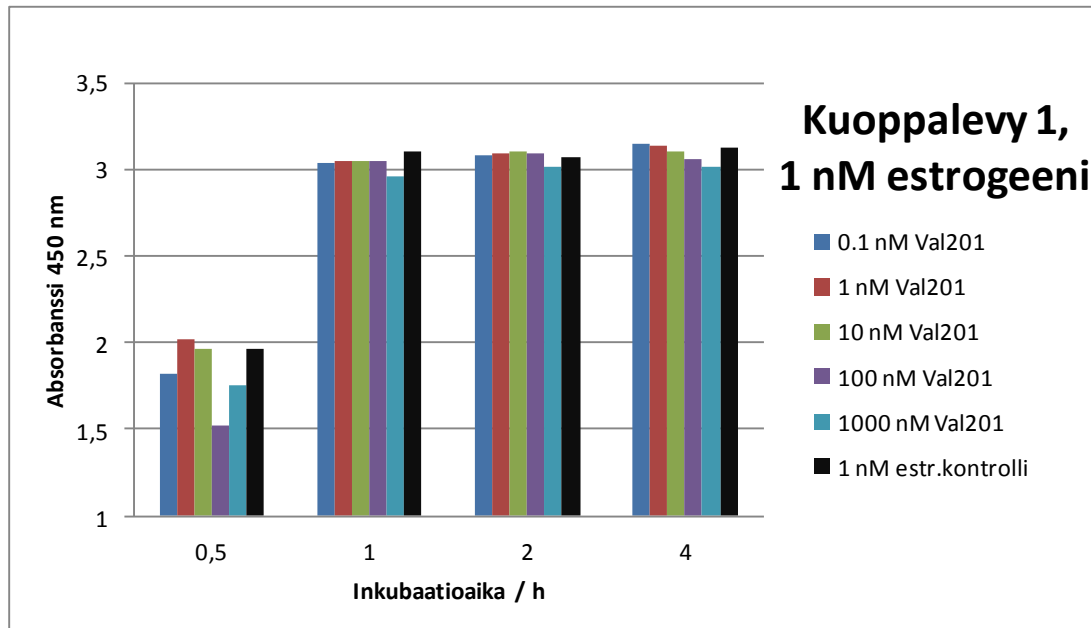
Kaikki proliferaatiokokeessa saadut tulokset ovat taulukoituna liitteessä 1. Ensimmäisessä kokeessamme altistimme soluja Val201:lle tilanteessa, jossa soluihin kohdistui myös hormonivaikutus. Käytimme Val201:ta viitenä eri pitoisuutena ja estrogeenihormonia sekä 1 nM että 10 nM pitoisuutena. Tarkoituksena oli tutkia hormonipitoisuuden mahdollista vaikutusta Val201-peptidin tehoon. Tässä koesarjassa kaikki testatut kuoppalevykasvustot käyttäytyivät samankaltaisesti, ja absorbanssiarvot suurenevät Val201:n läsnäolosta huolimatta jo puolen tunnin inkubaation jälkeen.

Toisessa kokeessa testasimme Val201:n vaikutusta soluproliferaatioon ilman estrogeenin läsnäoloa. Altistimme jälleen solut viidelle eri pitoisuudelle peptidiä. Tulosten vertailussa käytimme kahden tunnin inkubaation jälkeen mitattuja arvoja, sillä niissä näytteiden väliset erot olivat havaittavissa selkeimmin.

### 6.1 Koe 1: Val201-peptidin vaikutus soluproliferaatioon estrogeenin läsnäollessa

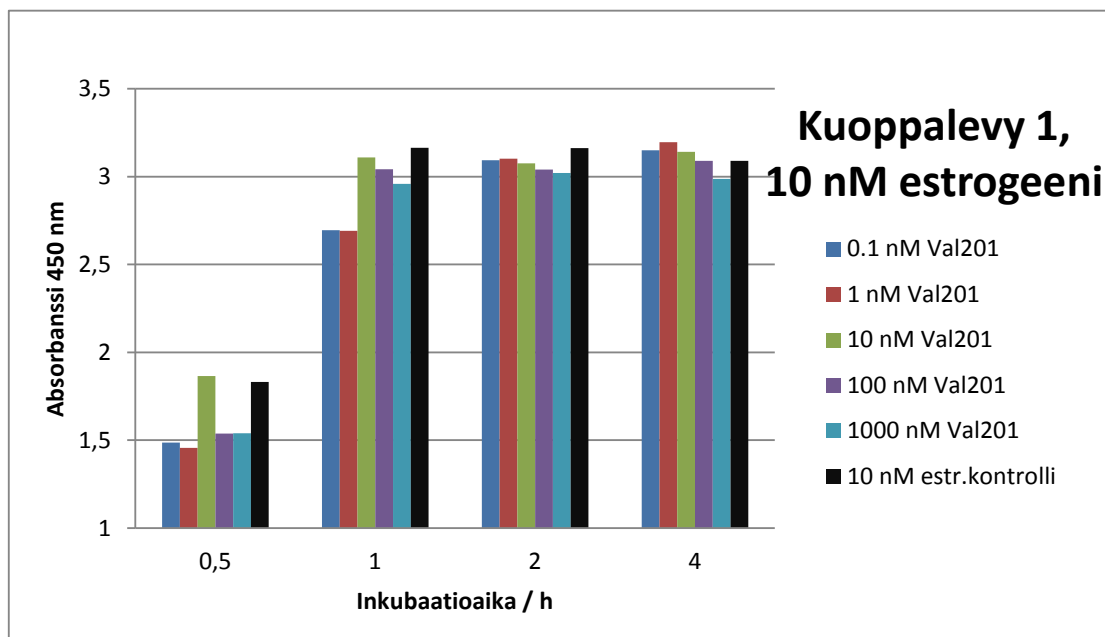
Proliferaatiokokeessa saadut tulokset on esitetty pylväsdiagrammeina. Kuvioiden 7 ja 8 diagrammeissa x-akselilla on kuvattu inkubaatioon käytetty aika: 0,5 h, 1 h, 2 h ja 4 h. Y-akselilla esitetään spektrofotometrillä mitattu absorbanssi. Kuvioiden 9 ja 10 diagrammeissa x-akseli kuvaa vaihtuvia Val201-pitoisuuksia ja y-akseli jälleen absorbanssiarvoja. Kuvioissa 7 ja 9 esiintyvissä koesarjassa oli käytössä 1 nM estrogeenipitoisuus, ja kuvioiden 8 ja 10 kokeessa estrogeenipitoisuus oli 10 nM.

Kuvio 7 kuvaa ensimmäisellä 96-kuoppalevyllä 1 nM estrogeenipitoisuudessa kasvaneiden solujen proliferaatiomuutosta. Tunnin inkubaation jälkeen näytteiden absorbanssiarvot saavuttivat huippunsa. Kontrollin ja näytteiden välisissä absorbanssiarvoissa ei havaittu merkittävää eroa. Kuvio 7.



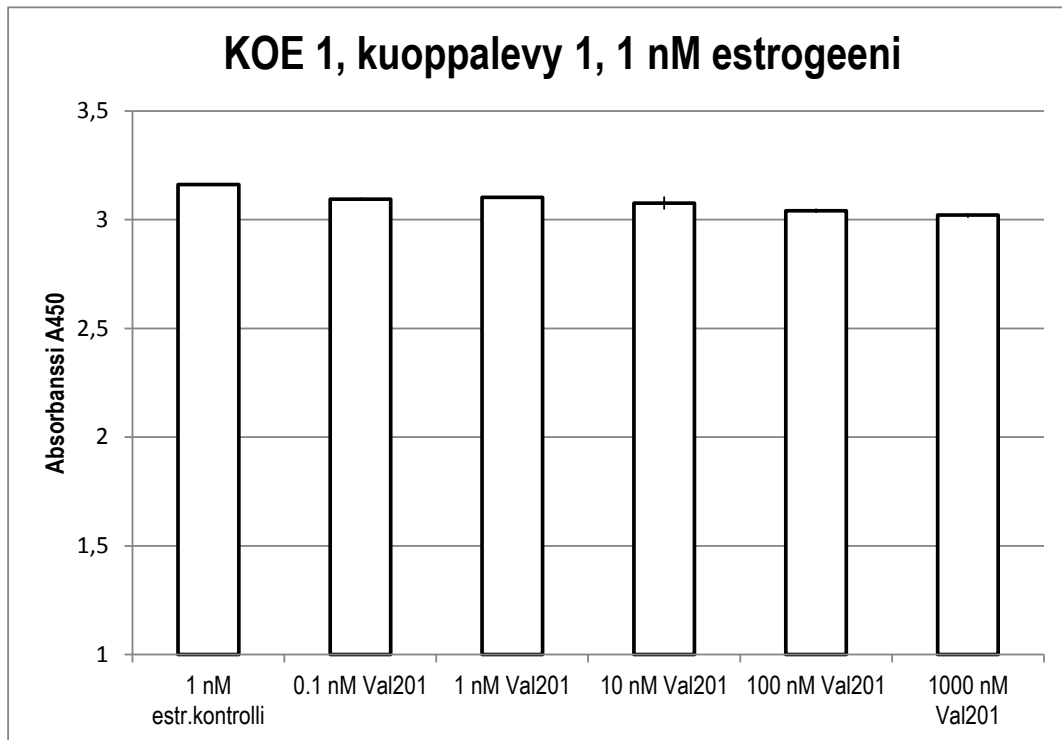
Kuvio 7. Näytteiden absorbanssiarvot 1 nM estrogeenipitoisuudessa.

Kuvio 8 esittää 10 nM estrogeenipitoisuudessa kasvaneiden solujen proliferaatiota. Kontrollinäyte sekä suurimmissa Val201-pitoisuuksissa kasvaneet solut saavuttivat maksimaalisen absorbanssiarvonsa tunnin inkubaation jälkeen. Kahden tunnin inkubaation jälkeen saavutettiin samansuuruisen absorbanssi myös niille näytteille, joiden peptidipitoisuus oli pienempi. Kahden ja neljän tunnin arvojen kohdalla on nähtävissä heikko suuntaus, jossa Val201-pitoisuuden suureneminen pienentää absorbanssia. Kuvio 8.



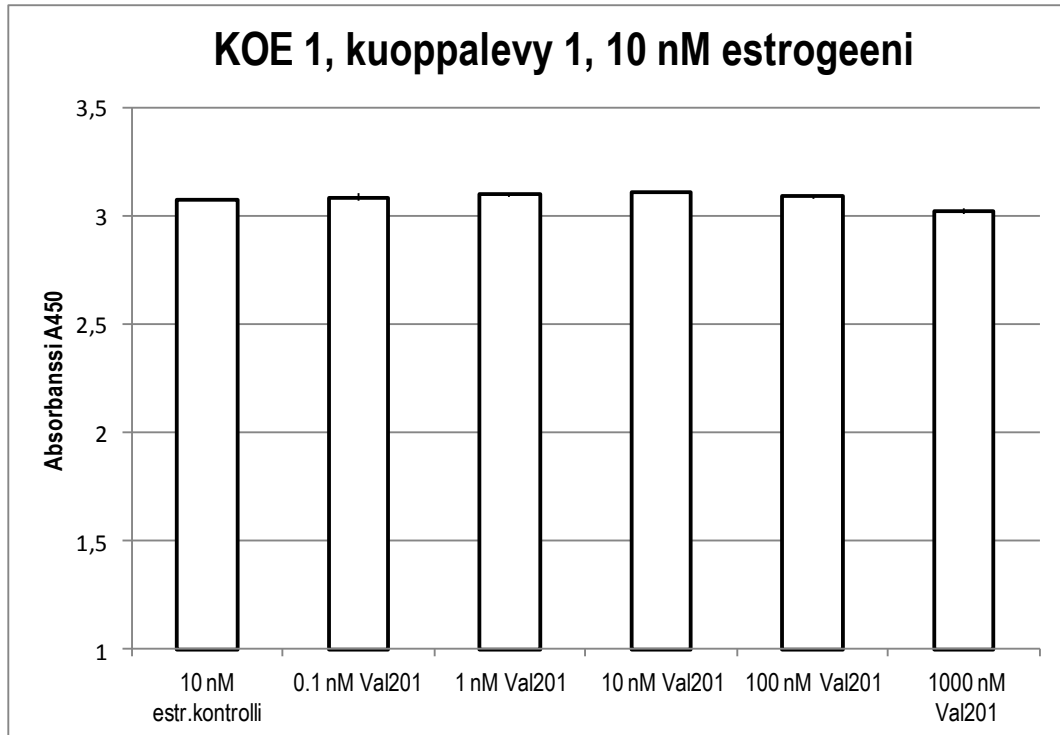
Kuvio 8. Näytteiden absorbanssiarvot 10 nM estrogeenipitoisuudessa.

Kahden tunnin inkubaation jälkeen mitattuja absorbanssiarvoja tarkasteltaessa havaittiin, että Val201-pitoisuuden kasvattaminen ei estrogeenivaikutuksen läsnä ollessa aiheuttanut merkittävää muutosta soluproliferaatiossa. Estrogeenipitoisuuden muutos puolestaan ei näytä vaikuttavan tuloksiin (vertaa kuviot 9 ja 10).



Kuvio 9. Val201-peptidipitoisuuden vaikutus soluproliferaatioon 1 nM estrogeenipitoisuudessa: kuoppalevy 1, 2 h inkubaatio (keskiarvo  $\pm$  SD).



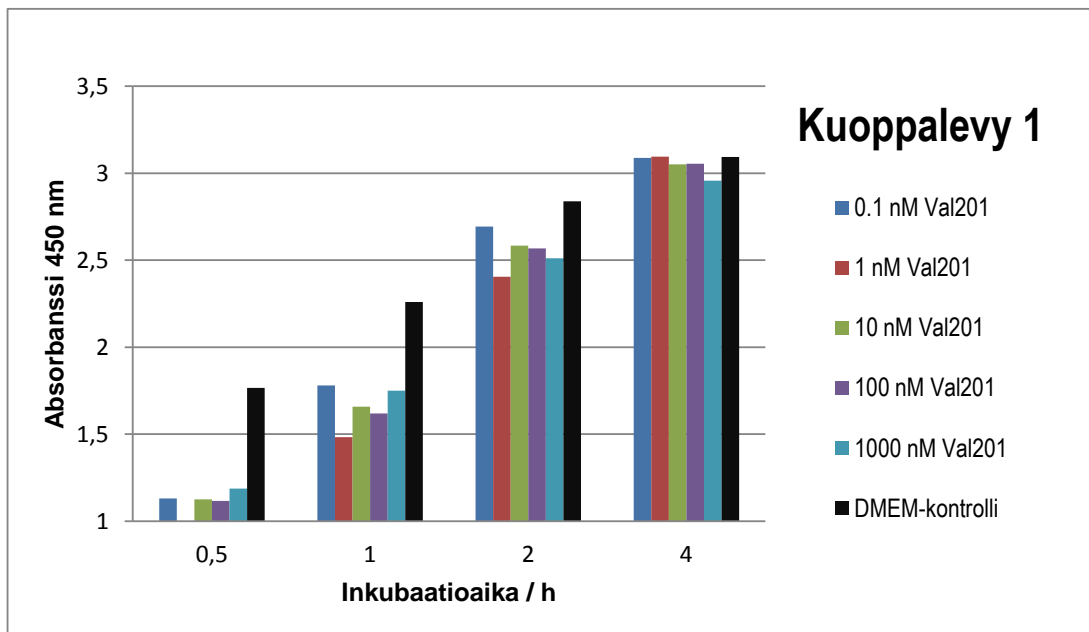


Kuvio 10. Val201-peptidipitoisuuden vaikutus soluproliferaatioon 10 nM estrogeenipitoisuudessa: kuoppalevy 1, 2 h inkubaatio (keskiarvo  $\pm$  SD).

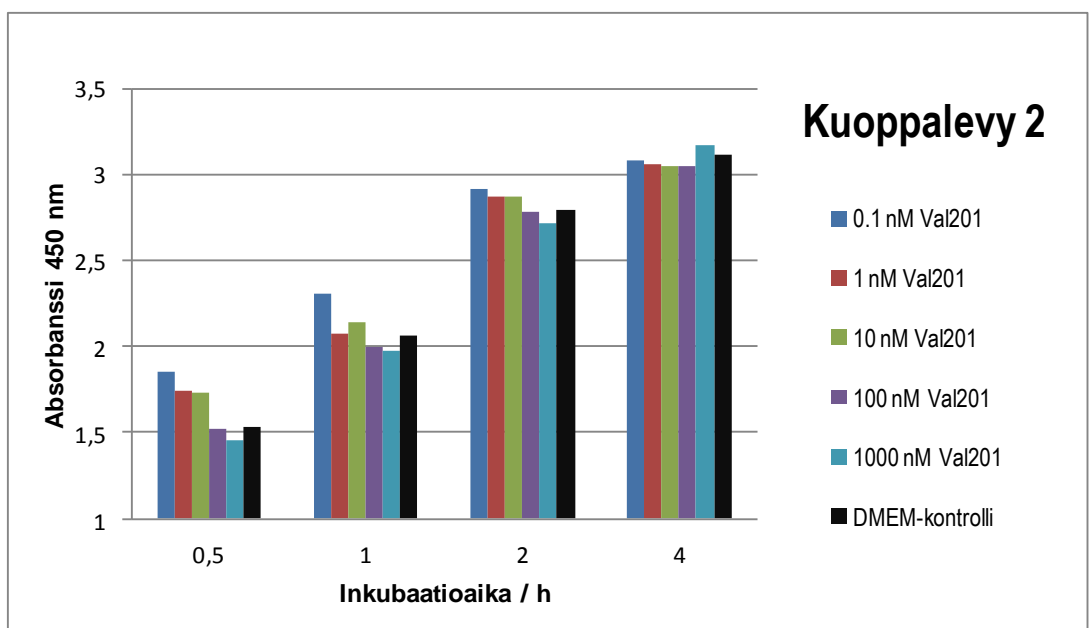
## 6.2 Koe 2: Val201-peptidin vaikutus soluproliferaatioon ilman hormonivaikutusta

Kokeen 2 tulokset esitetään seuraavissa pylväsdiagrammeissa. Kuvioiden 11 ja 12 diagrammeissa x-akselilla kuvataan inkubaatioaikaa: 0,5 h, 1 h, 2 h ja 4 h. Y-akselilla esitetään absorbanssiarvot. Kuvatut tulokset ovat keskenään samalla tavalla suoritetuista kokeista. Kuvioiden 13 ja 14 diagrammeissa x-akselilla kuvataan vaihtuvia Val201-pitoisuuksia ja y-akselilla absorbanssiarvoja, ja diagrammien tulokset ovat niin ikään samanlaisista koesarjoista. Tässä kokeessa estrogeenivahvistusta ei käytetty.

Kuvion 11 diagrammissa (kuoppalevy 1) Val201-peptidille altistettujen solujen absorbanssiarvot suurenevät hitaammin kuin kontrollisolukossa. Val201 siis vaikutti soluihin proliferaatiota heikentävästi kaikilla pitoisuuksilla aina kahden tunnin inkubaatioaikaan saakka. Neljän tunnin kohdalla näytteet kuitenkin saavuttivat samansuuruisen absorbanssin kontrollin kanssa, eikä vaikutusta enää havaittu. Tarkasteltaessa eri peptidipitoisuuksia diagrammista nähdään, että suurempi Val201-pitoisuus pienentää absorbanssia eli heikentää soluproliferaatiota (lukuunottamatta pitoisuutta 1 nM, jolle mitatut absorbanssiarvot olivat heikommat). Peptidipitoisuuden vaikutus näkyy erityisesti kahden tunnin arvoissa. Kuvio 11.



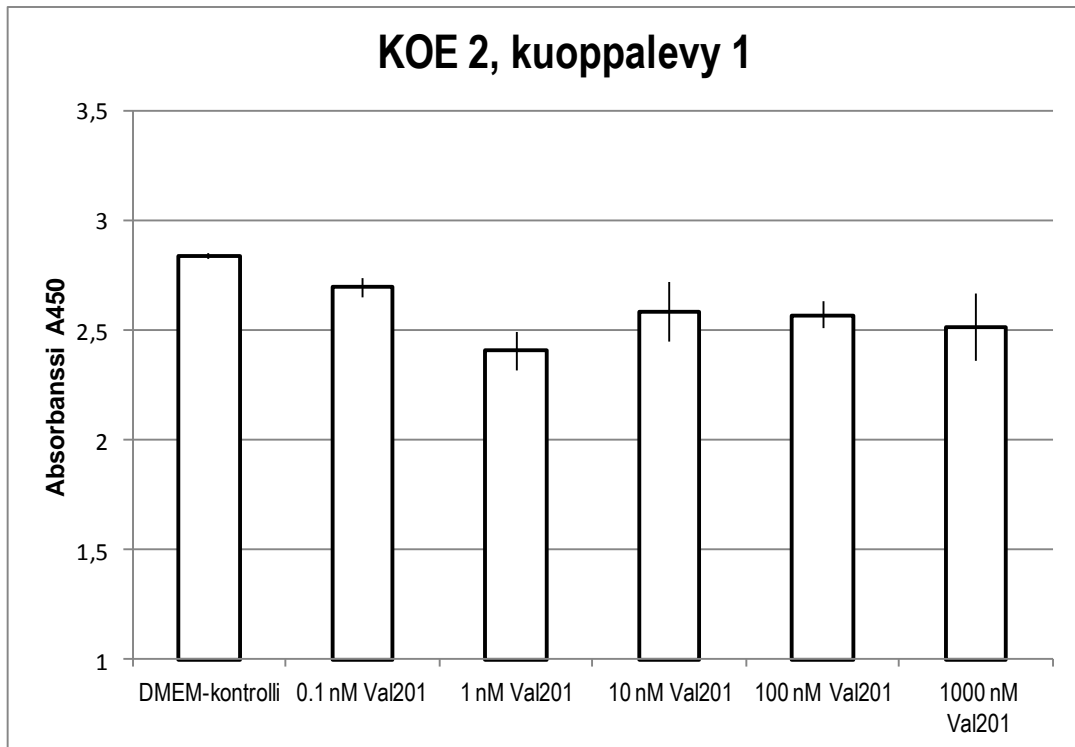
Kuvio 11. Näytteiden absorbanssiarvot kuoppalevyllä 1.



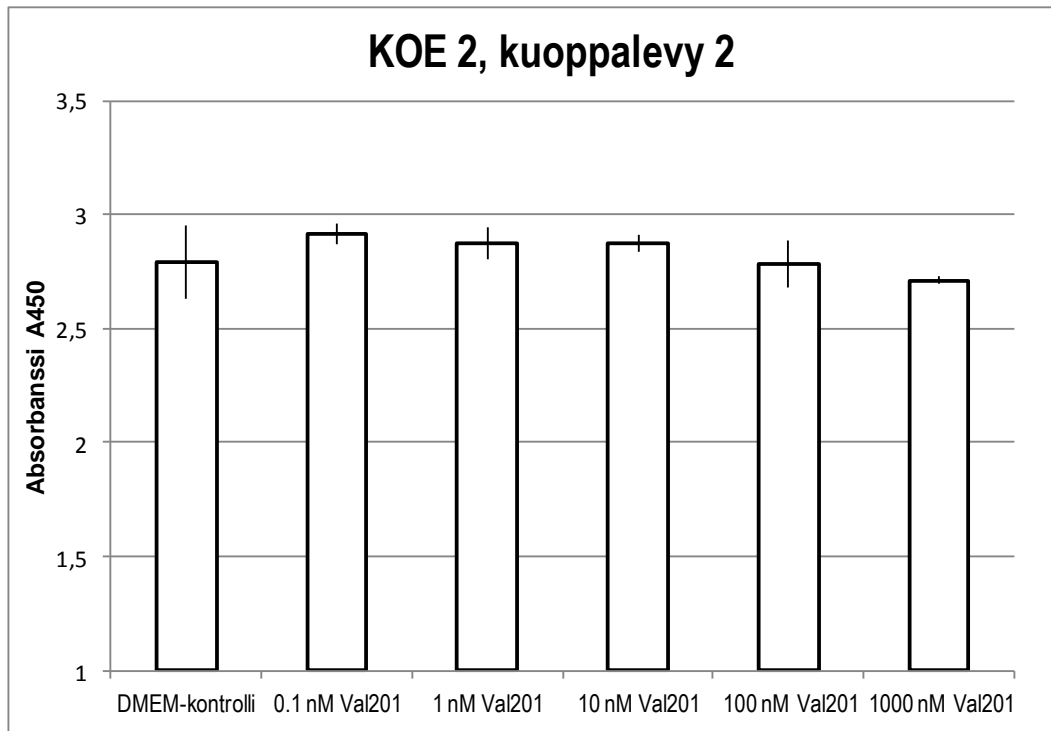
Kuvio 12. Näytteiden absorbanssiarvot kuoppalevyllä 2.

Kuvion 12 diagrammissa (kuoppalevy 2) näytteiden soluproliferaatio on kontrolliin verrattuna suurempi. Tarkasteltaessa eri peptidipitoisuuksia tästäkin diagrammista kuitenkin havaitaan, että suureneva Val201-pitoisuus heikentää soluproliferaatiota tehokkaammin. Kuvio 12.

Peptidipitoisuuden vaikutus absorbanssiin havaitaan selkeämmin kuvioiden 13 ja 14 diagrammeissa, jotka kuvaavat kahden tunnin inkubaation jälkeen mitattuja arvoja. Solujen proliferaation heikkeneminen korreloi suoraan kasvavaan Val201-pitoisuuteen (lukuunottamatta 1 nM pitoisuutta kuoppalevyllä 1, jossa absorbanssi on edelleen pienempi). Kuviot 13 ja 14.



Kuvio 13. Val201-peptidipitoisuuden vaikutus soluproliferaatioon ilman estrogeeniä: kuoppalevy 1, 2 h inkubaatio (keskiarvo ± SD).



Kuvio 14. Val201-peptidipitoisuuden vaikutus soluproliferaatioon ilman estrogeeniä: kuoppalevy 2, 2 h inkubaatio (keskiarvo ± SD).

### 6.3 Tulosten arviointi

Yhteenvedona voidaan todeta, että kokeessa 1 absorbanssiarvot suurensivat jo ensimmäisen inkubaatitunnin aikana maksimiarvoonsa ja pysyivät lähes muuttumattomina kokeen loppuun saakka. Kontrollin ja näytteiden välillä ei havaittu absorbanssieroja. Val201:n vaikutusta ei saatu näkyviin myöskään sen pitoisuutta muuttamalla. Tämän mukaan Val201 ei tässä koetilanteessa vaikuta soluproliferaatioon lainkaan tai sen vaikutus on heikko.

Kokeessa 2 arvot suurensivat huomattavasti hitaammin saavuttaen huippunsa vasta neljän tunnin inkubaation jälkeen. Val201:n vaikutus saatiin näkyviin myös pitoisuuksia muuttamalla: korkeammilla peptidipitoisuuksilla soluproliferaatio pieneni enemmän. Kokeessa 2 peptidin syöpäsolujen elinkelpoisuutta heikentävä vaikutus oli havaittavissa. Saamiemme tulosten perusteella totesimme estrogeenin kumoavan tai estävän Val201:n vaikutuksia solussa.

## 7 POHDINTA

Lääkekehittelyn tarkoituksena on edistää kansanterveyttä ja pidentää ihmisten keskimääräistä eliniänodotetta. Kehitettävänä olevan uuden lääkeaineen testaamisen osalta myös tämä opinnäytetyö tähtää näiden tavoitteiden toteutumiseen. Molekyylibiologia tieteenalana muuttuu jatkuvasti, ja erilaisia käytännön sovelluksia ihmiskunnan hyödyntämiseksi tuotetaan päivittäin.

Opinnäytetyöprojektimme tarjosi meille erinomaisen tilaisuuden olla mukana lääkekehittelyprosessin varhaisessa vaiheessa ja tarkastella sitä bioanalyytikon näkökulmasta. Olemme tyytyväisiä valintaamme toteuttaa opinnäytetyömme projektina, sillä yleiset laboratoriotyöskentelytaitomme kehittyivät työn aikana valtavasti. Projektiluontoisen työn suunnittelu, toteutus sekä tilastointi tulivat tutuiksi ja lisäksi saimme hyvää kokemusta projektiorganisaatiossa toimimisesta. Pääsimme edistämään ammattitaitoamme sekä soluviljelyn, mittausmenetelmän valinnan, tulosten analysoinnin että aseptisten työskentelytapojen osalta. Projektin edetessä kohtasimme myös haasteita: jouduimme muun muassa vaihtamaan alun perin valittua solulinjaa ja mittausmenetelmää.

Teoreettiseen viitekehykseen sekä projektiosuuteen taustakirjallisuutta oli saatavilla hyvin. Erityisesti rintasyöpään ja apoptoosiin liittyvää tietoa kerätessämme käytimme lähinnä luotettavia kansainvälisiä kirjallisteita, sillä englanniksi tietoa oli helpompi löytää ja sitä oli saatavilla kattavammin. Toisaalta näitä aiheita käsittelevän kirjallisuuden suuren määrän vuoksi meidän tarkoituksiimme sopivien lähteiden valinta oli haastavaa. Päädyimme käyttämään valintakriteereinä lähinnä tekstien tuoreutta ja tunnettavuutta. Hyödynsimme myös projektikirjallisuutta. Lisäksi tutustuimme Pharmatest Servicen vuonna 2012 toteuttamaan vastaavanlaiseen tutkimukseen. Käyttämämme tilastotiedot hankimme luotettavista Internet-lähteistä.

Kokonaisuudessaan opinnäytetyöprojektimme oli onnistunut, sillä saavutimme molemmat päätaivoitteemme suunnitellun aikataulun puitteissa. Solujen kasvatusosio sujui hyvin alusta loppuun, ja työskentelytavoille asetetut laadulliset sekä taloudelliset tavoitteet täyttyivät. Kontaminaatioita ei tapahtunut, toimintamme oli huolellista ja saimme työskentelyllämme tuotettua luotettavia tuloksia tilaajan käyttöön. Huomioimme koko prosessin ajan sekä ympäristön, tilaajan että koulun asettamat resurssit.

Solujen elinkelpoisuuden heikentyminen ilman estrogeenivahvistusta toimivissa syöpäsoluissa oli luettavissa mittaustuloksista, mikä edelleen puhuu asettamiemme tutkimustehtävien onnistumi-

sen puolesta. Hormonille altistettujen solujen kohdalla tätä kuitenkaan ei tapahtunut, sillä estrogeeni näyttäisi vaikuttavan kumoavasti tai estävästi Val201:n toimintaan. Tulosten perusteella oletamme, ettei Val201:n teho estrogeeniohjasteisiin rintasyöpiin ole merkittävä. Kuitenkin 25 %:ssa rintasyövistä kasvainsolukolla ei ole estrogeenireseptoreja, ja tällaisissa tapauksissa potilaan ennuste on ollut usein huonompi (Cross & Underwood 2009, 483). Mielestämme olisi kiinnostavaa tutkia Val201:n käyttömahdollisuuksia lisää juuri hormonivaikutuksesta riippumattomien rintasyöpien hoidossa.

Mikäli toistaisimme tutkimuksen, noudattaisimme todennäköisesti samantyyppistä runkoa: suunnittelu, solukasvatus, altistuskoe, mittaus ja tulosten analysointi. Analyysimenetelmäksi valitsimme kuitenkin esimerkiksi virtaussytometrian absorbanssin mittauksen sijaan, sillä proliferaation määrittämiseen saatettaisiin vaihtoehtoista menetelmää käyttämällä saavuttaa suurempi tarkkuus. Tulosten esittämiseen lisäisimme tarkkuutta muodostamalla ennalta laskettujen solumäärien pohjalta MCF-7-standardisuoran. Vertaamalla omia tuloksiamme standardikuvaajaan saisimme tietoa kuolleiden solujen todellisesta lukumäärästä kussakin koetilanteessa.

Jokaiseen tutkimukseen liittyy lisäksi vielä eettisiä näkökohtia, jotka tulee huomioida työskentelyssä. Opinnäytetyössämme ei käsitelty potilasmateriaalia, sillä tutkittavat syöpäsolut tilattiin kaupallisesta soluviljelypankista. Tutkimuslupien hakeminen ei myöskään ollut tarpeellista varsinaisen potilaskohteen puuttumisen vuoksi.

Tutkimuksessamme korostui lähinnä ammattietiikka, sillä standardoidut laboratoriotyöskentelytavat ovat tällaisen työn kohdalla erittäin tärkeitä. Ryhmän työskentely perustui sen jäsenten väliseen luottamukseen ja rehellisyyteen, ja jokainen työvaihe suoritettiin huolellisesti. Projektin soluviljelyvaiheessa tämä oli erityisen tärkeää kontaminaatioiden välttämiseksi. Valvoimme itse jatkuvasti työmme laatua.

Projektin tilaaja tulee hyötymään työstämme, sillä uudentyyppisen lääkeaineen kohdalla kaikki tutkimustieto on arvokasta. Kokonaisuudessaan tutkimusprosessi tulee luonnollisesti kestäämään vielä vuosia, mutta voidaan kuitenkin todeta, että saavuttamamme tulokset ovat peptidin mahdollisen tulevan lääkekäytön kannalta hyödyllisiä. Koemme kasvattaneemme ammattitaitomme uudelle tasolle tämän opinnäyteprojektin aikana, ja siitä tulee olemaan meille tulevaisuudessa konkreettista hyötyä sekä työnhaussa että työelämässä.

## LÄHTEET

Abbas, A., Fausto, N., Kumar, V., Mitchell., R., 2007: ROBBINS Basic Pathology 8<sup>th</sup> edition, Saunders Elsevier

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roperts, K. & Walter P. 2010. Essential cell biology 3rd edition 18 609-650. Garland Science, Taylor & Francis Group.

Barbieri, R., Strauss, J., 2008: Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management 6<sup>th</sup> edition, Saunders Elsevier

Berk, A., Bretscher, A., Kaiser, C., Krieger, M., Lodish, H., Matsudaira, P., Ploegh, H., Scott, M., 2007: Molecular Cell Biology 6<sup>th</sup> edition, W. H. Freeman & Company

Bolsover, S. R., Hyams, J. S., Shephard, E. A. & White, H. A. 2011. Cell biology: a short course third edition 18, 297-314. John Wiley & Sons Inc.

Collins, T., Cotran, R., Kumar, V., 1999: ROBBINS Pathologic Basis of Disease, 6<sup>th</sup> edition, W. B. Saunders Company

Cross, S., Underwood, J., 2009: General and Systematic Pathology, 5<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone Elsevier

Green, D. R. 2011. Means to an end: apoptosis and other cell death mechanisms 11, 163-176. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Golstein, P. & Kroemer G. 2006. Cell Death by necrosis: toward a molecular definition. Trends Biochem Sciences 32, 37-43. Elsevier Ltd.

Goodman, S. R. 2008. Medical Cell Biology third edition. Programmed Cell Death 10, 291-307. Elsevier Inc.

Heino, J. & Vuento M. 2007. Biokemian ja solubiologian perusteet. Ohjelmoitu solun kuolema 13, 281-286. WSOY Oppimateriaalit Oy.

Joensuu, H., Roberts, P., Tenhunen, M., Teppo, L., 2007: Syöpätaudit, 3. painos, Kustannus OY Duodecim

Mukana lääketutkimuksessa -lisämateriaali, Lääketietokeskus, 2005

Pelin, R. 2008. Projektihallinnan käsikirja. 5. uudistettu painos. Jyväskylä: Projektijohtaminen Oy  
Risto Pelin

Pollard, T. D., Earnshaw, W. C. & Lippincott-Schwartz, J. 2008. Cell biology 2nd edition 46, 833-850. Elsevier Inc.

Potten, C. & Wilson J. 2004. Apoptosis: the life and death of cells 2, 15-60. Cambridge University Press.

Syöpätutkimus ja syöpälääkkeiden kehittäminen. Sanofi. hakupäivä 10.10.2013.  
<http://www.sanofi.fi//fi//layout.jsp?scat=43DFE98B-E401-436A-9867-D8FB59331BE7>

Tärkeimpiä tilastotietoja lyhyesti. Suomen Syöpärekisteri, Syöpätautien tilastollinen ja epidemiologinen tutkimuslaitos. Hakupäivä 22.02.2013. <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=180&country=246>



- LIITTEET** (yhteensä 6 sivua)
- LIITE 1 Proliferaatiotulokset kokeesta, jossa solut altistettiin hormonille
- LIITE 2 Proliferaatiotulokset ilman hormoonialtistusta
- LIITE 3 Laimennossarjojen valmistaminen
- LIITE 4 Käytetyt välineet ja materiaalit

## Koe 1, kuoppalevy 1:

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	1,832	2,182	1,4855	1,4565	1,8650	1,5365	1,5395
10 nM estrogeeni	1,969	2,209	1,8170	2,0155	1,9625	1,5185	1,7535

Taulukko 1. Rinnakkaistulosten keskiarvot 0.5 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,165	3,136	2,6950	2,9625	3,1095	3,0425	2,9590
10 nM estrogeeni	3,102	3,103	3,0400	3,0485	3,0440	3,0485	2,9615

Taulukko 2. Rinnakkaistulosten keskiarvot 1 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,162	3,121	3,0935	3,1020	3,0765	3,0405	3,0210
10 nM estrogeeni	3,075	3,129	3,0855	3,0955	3,109	3,0885	3,0190

Taulukko 3. Rinnakkaistulosten keskiarvot 2 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,090	3,097	3,1510	3,1955	3,1410	3,0895	2,9880
10 nM estrogeeni	3,128	3,149	3,1435	3,1330	3,1015	3,0655	3,0160

Taulukko 4. Rinnakkaistulosten keskiarvot 4 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	2,121	1,943	1,5665	1,5175	1,529	1,6410	1,9875
10 nM estrogeeni	2,776	2,318	1,9135	1,7045	1,905	2,0215	2,4025

Taulukko 5. Rinnakkaistulosten keskiarvot 0.5 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	2,777	2,437	1,9040	2,0265	1,9630	2,0465	2,4670
10 nM estrogeeni	3,005	2,965	2,6215	2,6035	3,0165	2,7775	3,0490

Taulukko 6. Rinnakkaistulosten keskiarvot 1 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,159	3,194	3,1155	3,1335	3,088	3,1315	3,0135
10 nM estrogeeni	3,091	3,118	3,1120	3,0705	3,1070	3,1040	2,9880

Taulukko 7. Rinnakkaistulosten keskiarvot 2 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,096	3,114	3,0835	3,1500	3,1235	3,0685	3,0635
10 nM estrogeeni	3,127	3,208	3,1045	3,0450	3,0975	3,1255	2,9785

Taulukko 8. Rinnakkaistulosten keskiarvot 4 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	2,474	1,558	1,3095	1,2305	1,3475	1,4130	1,4805
10 nM estrogeeni	2,459	2,172	2,0025	1,7165	1,9370	1,9610	2,1110

Taulukko 9. Rinnakkaistulosten keskiarvot 0.5 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,043	2,116	1,8050	1,7755	1,8070	2,0295	2,2940
10 nM estrogeeni	3,044	3,044	2,9210	2,7675	2,8915	2,8875	2,9555

Taulukko 10. Rinnakkaistulosten keskiarvot 1 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,202	3,153	2,9435	2,9265	2,8590	3,0485	2,9475
10 nM estrogeeni	3,165	3,139	3,1550	3,1265	3,0970	3,0210	3,0060

Taulukko 11. Rinnakkaistulosten keskiarvot 2 h inkubaation jälkeen

	Estrogeeni-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
1 nM estrogeeni	3,188	3,150	3,1720	3,1320	3,1085	3,1405	3,0150
10 nM estrogeeni	3,080	3,075	3,0930	3,1240	3,1230	3,1060	3,0595

Taulukko 12. Rinnakkaistulosten keskiarvot 4 h inkubaation jälkeen

	DMEM-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
Kuoppalevy 1	1,7655	1,3590	1,1295	1,0003	1,1253	1,1168	1,1865
Kuoppalevy 2	1,5350	1,6085	1,8520	1,7470	1,7275	1,5185	1,4520

Taulukko 13. Neljän rinnakaistuloksen keskiarvot 0.5 h inkubaation jälkeen

	DMEM-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
Kuoppalevy 1	2,2600	1,9840	1,7798	1,4828	1,6580	1,6195	1,7505
Kuoppalevy 2	2,0695	2,1605	2,3023	2,0750	2,1365	1,9960	1,9708

Taulukko 14. Neljän rinnakaistuloksen keskiarvot 1 h inkubaation jälkeen

	DMEM-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
Kuoppalevy 1	2,8395	2,8000	2,6935	2,4048	2,5838	2,5670	2,5103
Kuoppalevy 2	2,7940	2,8940	2,9175	2,8730	2,8720	2,7825	2,7140

Taulukko 15. Neljän rinnakaistuloksen keskiarvot 2 h inkubaation jälkeen

	DMEM-kontrolli	Kontrolli 0.1 % DMSO	0.1 nM Val201	1 nM Val201	10 nM Val201	100 nM Val201	1000 nM Val201
Kuoppalevy 1	3,0940	3,1400	3,0883	3,0948	3,0510	3,0538	2,9578
Kuoppalevy 2	3,1190	3,1245	3,0850	3,0545	3,0505	3,0483	3,1653

Taulukko 16. Neljän rinnakaistuloksen keskiarvot 4 h inkubaation jälkeen

Estrogeenin laimennossarja:

Laimentaminen aloitetaan 2 mM estrogeeni-liuoksesta (5 mg estrogeenia, 9,18 ml EtOH).

→ 10 $\mu$ M	50 $\mu$ l estr + 9950 $\mu$ l DMEM
→ 100 nM	100 $\mu$ l estr/DMEM + 9900 $\mu$ l DMEM
→ 40 nM	4 ml estr/DMEM + 6 ml DMEM
→ 4 nM	1 ml estr/DMEM + 9 ml DMEM

Val201-laimennossarja:

Laimentaminen aloitetaan 1 mM Val201-liuoksesta (1,5 mg Val201, 1,26 ml PBS).

→ 10 $\mu$ M	100 $\mu$ l Val201 + 9900 $\mu$ l DMEM
→ 4000 nM	4 ml Val201/DMEM + 6 ml DMEM
→ 400 nM	1 ml Val201/DMEM + 9 ml DMEM
→ 4 nM	1 ml Val201/DMEM + 9 ml DMEM
→ 0,4 nM	1 ml Val201/DMEM + 9 ml DMEM

- MCF-rintasyöpäsolut
- Soluviljelypulloja, 5 ml ja 20 ml kasvatustilavuus
- Automaattipipetti
- Pipetinkärkiä
- 96-kuoppalevyjä
- 15 ml ja 50 ml falconeita
- 2 ml Kryo-putkia
- Jäteastia käytetyille soluviljelyliuoksille
- DMEM
- Streptomysiini-penisilliini
- Fetal calf seerumi
- Trypsiini-EDTA
- PBS
- Freezing medium
- DMSO
- WST-1 -kitti
- Isopropanoli
- Pakastusastia
- 70 % etanoli
- sentrifuugi
- laminaarivirtauskaappi
- hiilidioksidilämpökaappi
- lämpöhaude
- spektrofotometri
- pakastin -70 °C
- nestetyypisäiliö
- suojakäsineitä