



Υ-SEKRETAASIN INHIBIITTORIEN VAIKUTUS RINTASYÖPÄSOLUJEN PROLIFERAATIOON JA VIABILITEETTIIN

Opinnäytetyö

Koulutusala Sosiaali-, terveys- ja liikunta-ala	
Koulutusohjelma Bioanalytiikan koulutusohjelma	
Työn tekijä(t) Kastinen Miia, Lemettinen Marjo	
Työn nimi γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutus rintasyöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin	
Päiväys	15.4.2014
Sivumäärä/Liitteet	57/5
Ohjaaja(t) Jaana Hoffren, TtM, bioanalytiikan va. lehtori ja Hanna Peltonen, FT, tutkija	
Toimeksiantaja/Yhteistyökumppani(t) Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta, Lääketieteen laitos, Kliinisen lääketieteen yksikkö, Kliinisen patologian ja oikeuslääketieteen oppiaine.	
Tiivistelmä	
<p>γ-sekretaasi on soluissa esiintyvä proteiineja solukalvolla pilkkova entsyymi. Monilla γ-sekretaasin substraateilla on yhteys muun muassa syövän syntyyn ja kehittymiseen vaikuttaviin mekanismeihin. Yksi γ-sekretaasin kohdeproteiineista on Notch. Notch-signaali on yksi solujen viestinvälitysreiteistä, mikä vaikuttaa normaalisti terveissä soluissa muun muassa solujen kehitykseen ja erilaistumiseen. Onkogeneeninä toimiessaan Notch-signaali aiheuttaa esimerkiksi rintasyöpää. γ-sekretaasin toimintaa voidaan estää erilaisten kemiallisten yhdisteiden, inhibiittorien avulla. Kun γ-sekretaasin toiminta estetään, estyy myös Notch-signaalin se vaihe, minkä kautta Notch-proteiini pystyy aktivoitumaan ja toimimaan onkogeneeninä. Kirjallisuudessa on esitetty, että γ-sekretaasin inhibiittoreita voitaisiin käyttää lääkkeenä syövän hoitoon.</p> <p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kokeellisesti todeta, vaikuttaako γ-sekretaasin toiminnan inhiboiminen käytössämme olevilla inhibiittoreilla (DAPT, L-685,458 ja Compound E) rintasyöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin. Työ toteutettiin soluviljelmällä kolmea eri solulinjaa, joista yksi toimi kontrollisolulinjana ja kaksi olivat rintasyöpäsolulinjoja. Solulinjoihin lisättiin inhibiittorit, joista käytettiin eri konsentraatioita. Inhibiittorien vaikutukset mitattiin 24, 48 ja 72 tunnin jälkeen inhibiittorien lisäämisestä. Vaikutusten mittaamiseen käytettiin kahta eri menetelmää, joista toinen perustui solujen laskemiseen Scepter™-solulaskijalla ja toinen menetelmä kolorimetrisen määrittämiseen WST-1-reagenssilla. Kokeellisen osuuden laboratoriotutkimusprosessi, menetelmien ongelmat ja tulokset raportoitiin tähän opinnäytetyöhön.</p> <p>Tämä opinnäytetyö oli pieni kokeellinen osa yliopiston laajaa rintasyöpätutkimusta. Tämän työn tavoitteena oli olla aiheen tarjonneelle yksikölle hyödyksi ja tarjota jatkotutkimusmahdollisuuksia tämän työn tuloksista. Tavoitteena oli myös lisätä tietoa γ-sekretaasin inhibiittorien vaikutuksista rintasyöpäsoluihin.</p> <p>γ-sekretaasin inhibiittorien vaikutuksista käytettyihin solulinjoihin muodostettiin pylväsdiagrammit vertaamalla inhibiittorien vaikutusta inhibiittorikäsitellyissä- ja kontrollisoluuissa. Scepter™-kokeen tuloksissa oli paljon hajontaa. Tämän kokeen perusteella ei voi tehdä selviä johtopäätöksiä tuloksista, koska Scepter™-menetelmän työläydestä johtuen, mittauksia ei tehty tieteellisen tutkimuksen kriteereiden vaatimaa kolmea rinnakkaista mittausta. Lupaavin rintasyöpäsolujen proliferaatiota ja viabiliteettiä hillitsevä vaikutus näytti olevan DAPT-inhibiittorin 20 μM konsentraatiolla MCF-7-solulinjalla. WST-1-kokeen tulosten analysointiin käytettiin IBM® SPSS® Statistics -ohjelmaa. WST-1-kokeessa Compound E-inhibiittorilla oli merkitsevä vaikutus MCF-12F-solujen proliferaatioon ja viabiliteettiin 48 tunnin vaikutusajalla. DAPT-inhibiittorilla oli merkitsevä vaikutus MDA-MB-453-soluihin 72 tunnin vaikutusajalla.</p>	
Avainsanat γ -sekretaasi, γ -sekretaasin inhibiittorit, rintasyöpä, soluviljely, signaalintireitit	

Field of Study Social Services, Health and Sports			
Degree Programme Degree Programme of Biomedical Laboratory Science			
Author(s) Kastinen Miia and Lemettinen Marjo			
Title of Thesis The effects of gamma-secretase inhibitors on proliferation and viability of breast cancer cells			
Date	15.4.2014	Pages/Appendices	57/5
Supervisor(s) Jaana Hoffren, MHS, lecturer of biomedical laboratory science and Hanna Peltonen, PhD, scientist			
Client Organisation /Partners University of Eastern Finland, Faculty of Health Sciences, School of Medicine, Institute of Clinical Medicine, Pathology and Forensic Medicine			
<p>Abstract</p> <p>γ-Secretase is an enzyme expressed in the cells. It cleaves proteins on the cell membrane. Many of the γ-secretase substrates are involved, among other things, in mechanisms affecting on the development and progression of cancer. One of the γ-secretase substrate proteins is Notch. The Notch signaling is one of the signal transduction pathways of the cells. Normally in healthy cells, it affects, among other things, on the development and differentiation of the cells. When acting as an oncogene, Notch signaling causes e.g. breast cancer. The activity of γ-secretase can be prevented by means of various types of chemical compounds, so called inhibitors. When γ-secretase is blocked, also the specific phase of the Notch signaling through which the Notch protein can be activated and is able to act as an oncogene is inhibited. It has been presented in the literature that γ-secretase inhibitors could be used as drugs for cancer.</p> <p>The purpose of this thesis was to experimentally test the effects of the γ-secretase inhibitors (DAPT, L-685,458 and Compound E) on the proliferation and viability of the breast cancer cells. The work was done by culturing three different cell lines, of which one was the control cell line and the other two were breast cancer cell lines. Inhibitors at different concentrations were added to the cell lines. The effects of the inhibitors were measured at 24 hours, 48 hours, 72 hours after the addition of the inhibitors. Two different methods were used to measure the effects. One of the methods was based on calculating the cells with Scepter™ cell counter and the other one was a colorimetric assay based on WST-1 reagent. The laboratory research process, the methods, the problems, and the results of the experimental part were reported in this thesis.</p> <p>This study was a small experimental part of a wide breast cancer research of the University. The objective of this work was to benefit the client organization and to provide further study opportunities utilizing the results of this work as a starting point. The aim was also to increase knowledge of the effects of γ-secretase inhibitors on breast cancer cells.</p> <p>The effects of γ-secretase inhibitors on the cell lines were presented as bar graphs, in which the cells treated with the inhibitors were compared with the control cells. There was a lot of dispersion in the Scepter™ test results. The measurements were not made according to the scientific research criteria requiring three parallel measurements because the Scepter™ method was complicated and time-consuming. Therefore, no firm conclusions can be drawn from the results of this test. The most promising inhibitory effect on breast cancer cell proliferation and viability seemed to be with DAPT inhibitor at 20 μM concentration in MCF-7 cell line. IBM® SPSS® Statistics program was used for the analysis of WST-1 test results. In the WST-1 test, Compound E inhibitor had a significant effect on the proliferation and viability of MCF-12F cells at the treatment time of 48 hours. DAPT inhibitor had a significant effect on MDA-MB-453 cells at the treatment time of 72 hours.</p>			
<p>Keywords γ-secretase, γ-secretase inhibitors, cell culturing, breast cancer, signaling pathways</p>			

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	8
2	RINTASYÖPÄ.....	10
3	SYÖVÄN SYNTY.....	11
4	SOLUJEN VÄLINEN VIESTINTÄ	12
4.1	γ-sekretaasi.....	12
4.2	Notch-signaaliointi	13
4.3	Notch-signaaliointi ja rintasyöpä.....	14
4.4	γ-sekretaasin inhibiittorit.....	16
5	SOLUVILJELY	19
5.1	Solulinjojen ylläpito	20
5.2	Kontaminaatiot soluviljelylaboratoriossa	21
6	SOLUJEN PROLIFERAATIOTA JA VIABILITEETTIÄ TUTKIVAT MENETELMÄT	22
6.1	Scepter™-solulaskija.....	22
6.2	WST-1-reagenssi.....	24
7	OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT.....	25
8	KOKEELLINEN OSUUS.....	26
8.1	Scepter™-koe	26
8.1.1	Scepter™-kokeen suoritus.....	26
8.1.2	Scepter™-kokeen tulokset.....	30
8.2	WST-1-koe	33
8.2.1	WST-1-kokeen suoritus.....	33
8.2.2	WST-1-kokeen tulokset.....	37
9	POHDINTA.....	40
9.1	Scepter™ tulosten pohdinta.....	40
9.2	WST-1 tulosten pohdinta.....	41
9.3	Ammatillinen kasvu	41
9.4	Opinnäytetyön tutkimustehtävien, tarkoitusten ja tavoitteiden arviointi.....	43
9.5	Tulosten luotettavuus	44
9.6	Eettisyys	46
	LÄHTEET	47
	LIITE 1: SOLUJEN JAKAMINEN (MENETELMÄOHJE).....	52

LIITE 2: MCF-12F KASVATUSMEDIUMIN VALMISTUS (MENETELMÄOHJE)	54
LIITE 3: MDA-MB-453 KASVATUSMEDIUMIN VALMISTUS (MENETELMÄOHJE)	55
LIITE 4: MCF-7 KASVATUSMEDIUMIN VALMISTUS (MENETELMÄOHJE).....	56
LIITE 5: KUVALUETTELO.....	57

Sanasto

Apoptoosi	Ohjelmoitu solukuolema
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
Fibroblastikasvutekijä	Ryhmä peptidikasvutekijöitä, jotka muun muassa edistävät solujen jakaantumista, lisäävät verisuonten uudismuodostumista ja suojelevat hermosoluja (lyh.FGF)
Infiltroida	Tunkeutua läpi, kasvaa ympäristöön, aiheuttaa infiltraatio
Inhibiittori	Estäjä/tekijä joka estää tai hidastaa esimerkiksi entsyymattista reaktiota tai fysiologista toimintaa
Initiaatio	Alkuun saattaminen, alkaminen. Aineen (initiaattorin) vaikutus soluun, jonka DNA:ssa täten tapahtuvat ensimmäiset syövän syntyyn johtavat muutokset
In vitro	Pullossa, koeputkessa, elimistön ulkopuolella
In vivo	Elämässä, elävässä elimistössä
Kasvutekijä	Kudoksissa syntyviä, solujen kasvua ja erilaistumista lisääviä tai estäviä hormonin kaltaisia peptidejä
Kolorimetria	Värin mittaus, erityisellä laitteella (kolorimetrilla) tehty ainemäärän kvantitatiivinen mittaus, joka perustuu valon tietyn aallonpituuden absorptioon tutkittavassa liuoksessa verrattuna standardiliuoksen vastaavaan arvoon
Ligandi	Orgaaninen molekyyli, joka sitoutuu toiseen (yleensä suurempaan) molekyyliin, esimerkiksi hormoni, joka sitoutuu reseptoriin
Onkogeeni	Geeni, jonka virheellinen toiminta johtaa solun malignistumisprosessiin eli solun muuttumiseen syöpäsoluksi
Progressio	Syövän kehitysvaihe pahanlaatuisemmaksi
Proliferaatio	Lisääntyminen, lukumäärän kasvu, lisäkasvu, uudiskasvu
Proteaasi	Proteiineja hajottavien entsyymien yleisnimi

Reseptori	Vastaanotin; Hormonireseptori, lääkeainereseptori, kasvutekijäreseptori. Solun pinnassa tai solun sisällä oleva makromolekyyli, joka sitoo liigandin (esimerkiksi hormoni- tai lääkeainemolekyylin)
RNA	Ribonukleiinihappo
Rna-polymeraasi	Kopioi DNA-molekyylin emäsjärjestyksen mukaan vastaavan komplementaarisen RNA-molekyylin.
Transkriptio	Kopiointi, kopioituminen, kopio, geneettinen transkriptio/DNA-ketjun mallin mukaan tapahtuva RNA-molekyylin rakentuminen
Tranlokaatio	Siirtymä/ kromosomin osan siirtyminen toiseen kromosomiin
Transmembraaniproteiini	Solukalvoon kuuluva valkuaisainemolekyyli, joka läpäisee koko solukalvon.
Tyvikalvo	Kalvo, joka erottaa epiteelin sidekudoksesta sekä ympäröi lihas- ja rasvasoluja ja Schwannin soluja
Viabiliteetti	Elinkykyisyys

1 JOHDANTO

Uusia rintasyöpätapauksia diagnosoitiin vuonna 2012 maailmanlaajuisesti 1 676 332 tapausta. Kaikista sinä vuonna diagnosoiduista syöpätapauksista rintasyövän osuus oli yli 25 prosenttia. Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä. Suomessa diagnosoitiin vuonna 2012 rintasyöpä 4 477 naisella. (IARC 2014.) Viisi vuotta taudin diagnosoinnista Suomessa rintasyöpäpotilaista on elossa 89 %. Tauti diagnosoidaan nykyisin entistä varhaisemmassa vaiheessa muun muassa kattavien rintasyöpäseulontojen ansiosta. Syövän hoidon lääketieteellinen kehitys etenee nopeasti. Viime vuosina on kehitetty muun muassa uusia lääkkeitä syöpäsairauksiin. Kaikkia rintasyöpiä ei kuitenkaan voida parantaa. Taudin hoitoennustetta huonontavat syövän leviäminen eli metastasointi, syövän uusiutuminen sekä syövän kehittyminen vastustuskykyiseksi käytettyä hoitomuotoa vastaan. (Roche 2013.) Opinnäytetyömme aiheena oli kokeellisesti tutkia γ -sekretaasin (gamma-sekretaasi) inhibiittorien vaikutuksia rintasyöpäsolujen proliferaatioon (lisääntyminen) ja viabiliteettiin (elinkyky). γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksia syöpäsoluihin tutkitaan, koska niistä toivotaan löydettävän uusi syövän lääkehoitomuoto.

γ -sekretaasi on soluissa toimiva proteaasi, minkä tehtävä on spesifisesti pilkkoa proteiineja solukalvulta (De Strooper 2003). Tutkimuksissa on havaittu γ -sekretaasin yhteys moniin syövän syntyyn vaikuttavien proteiinien viestinvälitysreitteihin (signalointiin). Solujen välisen viestinnän tarkoituksena on kuljettaa viestimolekyylin sisältämä viesti solukalvon reseptorin kautta kohteeseensa. Yksi γ -sekretaasin kohdeproteiineista (substraatti) on Notch. (Haapasalo ja Kovacs 2011.) Tutkimuksissa on todettu, että γ -sekretaasin inhiboiminen (toiminnan estäminen) vaikuttaa muun muassa Notch-signalointiin. Notch-signalointi eli tietynlainen proteiinien viestinvälitysreitti on yksi osa solujen välistä viestintää. Notch-signaloinnin tarkoituksena on kuljettaa viestimolekyylin sisältämä viesti soluun sisään ja monien välivaiheiden kautta muuttaa geeniekspressiota (geenien ilmentyminen). (Al-Hussaini, Subramanyam, Reedijk ja Sridhar 2011.) Notch-signaloinnin aktivoituminen soluissa on yhteydessä rintasyövän kehittymiseen (Wolfe 2009). Notch-signaloinnin inhiboimista erilaisilla γ -sekretaasin inhibiittoreilla on tutkittu laajasti ja tutkimustulokset eri syöpäsolulinjoilla ovat olleet lupaavia. Vaikka Notch-signalointia on tutkittu vuodesta 1913, ei γ -sekretaasin inhibiittoreita kuitenkaan käytetä vielä rutiinilääkkeinä syövän hoidossa. (Groth ja Fortini 2012.) γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutusten selvittäminen vaatii vielä lisää tutkimuksia.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kokeellisesti todeta, vaikuttaako γ -sekretaasin toiminnan inhiboiminen käytössämme olevilla inhibiittoreilla (DAPT, L-685,458 ja Compound E) rintasyöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli kokeilla kahta eri menetelmää γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutusten selvittämiseksi ja raportoida laboratoriotutkimusprosessin työosuus eli kertoa menetelmistä työn toteutuksessa sekä esittää tulokset pylväsdiagrammeina.

Opinnäytetyömme tavoitteena oli saamiemme tulosten avulla lisätä tietoa γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksista syöpäsoluihin. Aiemman kirjallisuuden perusteella hypoteesi on, että inhibio heikentää syöpäsolujen kasvua. Tavoitteena oli lisätä omaa ammatillista kasvuamme ja oppimistamme tässä työssä käsitellyistä aiheista sekä tarjota tietoa muille asiasta kiinnostuneille opiskelijoille. Opinnäytetyömme toimeksiantaja oli Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta, Lääketieteen laitos, Klii-

nisen lääketieteen yksikkö, Kliinisen patologian ja oikeuslääketieteen oppiaine. Opinnäytetyömme oli pieni kokeellinen osa laajaa rintasyöpätutkimusta. Opinnäytetyömme tavoitteena oli olla tälle tutkimukselle hyödyksi ja tarjota jatkotutkimusmahdollisuuksia työmme tuloksista. Yliopiston tutkimusryhmällä on Tutkimuseettisen toimikunnan myöntämä lupa rintasyöpätutkimukseen. Toimimme tämän luvan alaisuudessa opinnäytetyötä tehdessämme.

Opinnäytetyössämme tutkimme γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksia soluihin soluviljelyn avulla. Soluviljelytekniikat ovat laajasti käytettyjä erilaisissa rintasyöpätutkimuksissa. Soluviljelytekniikoita käytetään, koska niiden avulla saadaan tuotettua suhteellisen homogeeninen solupopulaatio, joka jakautuu itsenäisesti. (Holliday ja Speirs 2011.) Opinnäytetyössämme teimme soluviljelyä käyttäen kolmea eri solulinjaa, joista yksi solulinja toimi kontrollina ja kaksi solulinjaa olivat rintasyöpäsolulinjoja. Soluviljelyihin lisäsimme tässä opinnäytetyössä käyttämiämme γ -sekretaasin inhibiittoreita ja tutkimme inhibiittorien vaikutusta solujen proliferaatioon ja viabiliteettiin. Solujen proliferaation ja viabiliteetin mittaamiseen käytimme kahta eri menetelmää. Menetelmistä toisessa solujen laskemiseen käytettiin Scepter™ -solulaskijaa ja toinen perustui kolorimetriseen määrittelyyn proliferaatioreagenssilla (WST-1).

Opinnäytetyön kokeellisesta osuudesta saimme tulokset siitä, miten käyttämämme inhibiittorit vaikuttavat tutkimuskohteena olevien solujen proliferaatioon ja viabiliteettiin. Saamamme tulokset olivat alustavia, koska luotettavien tulosten saaminen vaatisi lisämittauksia ja kokeiden toistoa. Tulokset antoivat opinnäytetyömme toimeksiantajalle tietoa menetelmien toimivuudesta tässä kokeessa. Tulosten perusteella opinnäytetyön aiheen tarjonnut yksikkö voi myös suunnitella jatkotutkimuksiaan aiheesta.

2 RINTASYÖPÄ

Naisten rintasyöpä on Suomessa jatkuvasti yleistynyt syöpämuoto, ollen tällä hetkellä yleisin naisten syöpäsairaus Suomessa. Rintasyöpään sairastuu Suomessa noin joka kahdeksas nainen potilaiden keski-ikä ollessa noin 60 vuotta taudin toteamishetkellä. (Joensuu ja Huovinen 2013, 595.) Vuonna 2012 Suomessa diagnosoitiin 4 477 uutta rintasyöpää (IARC 2014). Suomessa potilaista on elossa viiden vuoden kuluttua sairauden diagnosoinnista 89 % (Syöpäjärjestöt 2013). Rintasyöpää on kahta eri päätyyppiä; duktaalinen ja lobulaarinen karsinooma. Lisäksi on olemassa muita rintasyövän erikoistyyppiä. Duktaalinen karsinooma on yleisin rintasyöpätyyppi. Karsinoomasolut voivat kasvaa rinnan rauhastiehyiden sisäpuolella, jolloin käytetään nimitystä carcinoma ductale in situ (DCIS) tai karsinooma voi olla invasiivinen, kasvaa tyvikalvon läpi ja metastasoida eli lähettää etäpesäkkeitä. Lobulaarinen karsinooma kasvaa infiltroiden solujonoina eli tunkeutumalla ympäröivään kudokseen. Lobulaarinen neoplasia in situ (LIN) on solumuutos, joka ennustaa suurentunutta riskiä sairastua infiltroivaan karsinoomaan. Rintasyövän erikoistyyppiä ovat papillaarinen karsinooma, medullaarinen karsinooma, musinoinen karsinooma sekä tubulaarinen karsinooma. (Leidenius ja Joensuu 2013, 601–602.)

Hormonaaliset tekijät liittyvät riskiin sairastua rintasyöpään (Joensuu ja Huovinen 2013, 595). Estrogeenireseptorin (ER) ja progesteronireseptorin (PgR) sekä solukalvolla olevan reseptorityrosiini-kinaasin (HER-2) ilmentymisen perusteella rintasyöpä voidaan luokitella eri alatyyppeihin, joiden hoitomuodot poikkeavat toisistaan. Kolmoisnegatiivinen rintasyövän alatyypin ei ilmennä ER:a, PgR:a tai HER-2:a, joten tämän alatyypin rintatuumorit ovat usein aggressiivisia ja niillä on huonoin hoitotulokset. Vaikka rintasyövän hoidossa on kehitytty jatkuvasti ja rintasyövän etiologiaan liittyvät prosessit muun muassa solujen selviytyminen, metabolismi, proliferaatio, erilaistuminen ja angiogeneesi tunnetaan melko hyvin, rintasyövän progressiota ja lääkeaineresistenssiä edistävät mekanismit ovat yhä huonosti ymmärrettyjä. Siksi muun muassa lääkeaineresistenssiä aiheuttavien mekanismien selvityksellä toivotaan löytyvän ratkaisu rintasyövän etenemisen ja uusiutumisen estämiseen. Viime vuosina on yritetty selvittää solujen signalointireittejä ja signalointireittien yhteyksiä toisiinsa sekä näiden viestinvälitysreittien yhteyttä syövän syntyyn, kasvuun ja metastaasiin. (Olsauskas-Kuprys, Zlobin ja Osipo 2013.)

3 SYÖVÄN SYNTY

Syöpä syntyy eli karsinogeneesi alkaa deoksiribonukleinihapossa (DNA) tapahtuvasta mutaatiosta, jota kutsutaan initiaatioksi. Mutaatio voi olla pistemutaatio eli yhden emäsparin muutos, kromosomaalinen translokaatio (kromosomin osan siirtymä), geenien monistuminen tai kromosomiston monistuminen. DNA:n mutaatio voi johtaa solussa virheellisen proteiinin syntymiseen, toimimattomaan proteiiniin, proteiinituotteen määrän lisääntymiseen, proteiinin muuttumiseen onkogeeniksi eli syöpägeeniksi ja kromosomien moninkertaistumiseen. Syöpä saa alkunsa lähes aina yhdestä solusta, joka hallitsemattomasti jakautuessaan tuottaa tytärsoluja. Syntyneiden tytärsolujen DNA-vaurioiden määrä lisääntyy jakautumisten myötä, koska syöpäsolukon DNA-vaurioiden korjaamiskyky on heikentynyt. Kasvainsolukko on yleensä heterogeenistä mutaatioiden ja solujen ilmiäsuun suhteen. (Isola 2013, 13, 15–19.)

Yleensä syövän syntyyn vaaditaan useita mutaatioita, joiden kertymiseen voi kulua vuosia (Solunetti 2006a; Solunetti 2006b). Vain harva DNA-mutaatio johtaa syövän syntyyn, koska elimistöllä on kyky korjata DNA-mutaatioita. DNA-vaurioiden korjaamiskyvyn pettäminen on yksi keskeinen tapahtuma syövän synnyssä. Initiaatiota seuraava vaihe on promootio eli kohdesolukon kiihtynyt solunjakautuminen. Kolmas syövän kehitysvaihe on progressio, jolloin pahanlaatuisessa solukossa tapahtuu lisämuutoksia, kuten solukon muuttuminen ulkoisista säätelytekijöistä riippumattomaksi ja etäpesäkkeiden lähettämiskyvyn kehittyminen. (Isola 2013, 13, 16–17.)

Solun malignistumisprosessiin johtavat DNA-vauriot tapahtuvat syöpägeneeissä, joita ovat onkogeneetit ja kasvurajoitegeenit. Lähes kaikki syöpägeenit vaikuttavat solun kasvun säätelyyn. Onkogeneetit ovat geenit, joiden aktivoituminen edesauttaa syöpäsolujen viabiliteettiä. Onkogeneetin DNA-vaurio aiheuttaa geenin toimimisen virheellisesti tai liian aktiivisesti. Onkogeneetit voivat koodata proteiinkasvutekijöitä tai solukalvon reseptoreita ja vaikuttaa näin kasvusignaalin välittymiseen tumaan stimuloiden kasvua. Onkoproteiinit voivat myös sitoutua suoraan DNA:han vaikuttaen muun muassa transkriptioon eli DNA:n emäsjärjestyksen kopioitumiseen RNA:ksi (ribonukleinihappo). Normaalisti toimiessaan kasvurajoitegeenit estävät niiden proteiinien toimintaa, jotka kiihdyttävät solun jakautumista. Kasvurajoitegeenien toiminnan häviäminen antaa syöväälle mahdollisuuden kasvaa ja levitä. (Isola ja Kallioniemi 2013, 15, 18–19.)

Normaalisti aikuisilla solujen jakautumisaktiivisuus on vilkasta vain kudoksissa, joissa jatkuvasta uusiutumisesta on hyötyä, kuten ihon ja limakalvon epiteelisoluissa. Syöpäsolujen jakaantuminen on yleensä poikkeuksellisen aktiivista. Kasvunopeuteen vaikuttaa solujen jakautumisnopeus, jakautumissyklissä olevien solujen määrä ja solujen apoptoosi eli ohjelmoitu solukuolema. (Isola 2013, 22–23.) Vaurioituneet solut jatkavat kasvuaan muodostaen kasvaimia eli tuumoreita, jos geneettisten tekijöiden säätelämä normaalin kasvun järjestelmä pettää. Kasvaimista osa on benignejä eli hyvänlaatuisia, jotka ovat rajautuneina ympäristöönsä eivätkä lähetä etäpesäkkeitä. Hyvänlaatuisten kasvainten solut ovat myös pitkälti erilaistuneita lähtösolukon mukaan. Pahanlaatuisten eli malignien syöpäkasvaimien solut menevät ympäröivään kudokseen ja lähettävät usein etäpesäkkeitä eli metastasoivat. (Niemi, Virtanen ja Vuorio 1994, 307–308.)

4 SOLUJEN VÄLINEN VIESTINTÄ

Solujen välisen viestinnän tarkoituksena on elimistön toiminnan säätely. Solujen kemiallinen viestintä on monivaiheinen tapahtuma, minkä päävaiheet ovat solun ulkopuolelta tulevan viestin vastaanotto, viestin kuljetus sytosoliin eli solun perusaineeseen tai tumaan ja viestin aiheuttamat vaikutukset solussa. (Tapana 2010, 242–244.) Viestintä tapahtuu endokriinisesti, parakriinisesti tai autokriinisesti. Endokriininen säätely perustuu rauhassolujen tuottamien hormonien kulkeutumiseen kohdesolukoon verenkierron välityksellä. Parakriiniseksi säätelyksi kutsutaan sitä, että solu säätelee hormonien kaltaisten viestimolekyylien avulla välittömässä läheisyydessä olevia muita soluja. Kun solu säätelee itseään tuottamalla välittäjäaineita, kutsutaan säätelyä autokriiniseksi. Solubiologiassa paikallisesti vaikuttavia välittäjäaineita kutsutaan kasvutekijöiksi. (Heino ja Vuento 2010, 247–248.) Terveessä kudoksessa kasvutekijöiden tehtävänä on huolehtia solujen normaalista kasvusta ja kehitymisestä. Syöpäsolut viestivät autokriinisesti lähettämällä kasvutekijöitä mahdollistaen hallitsemattoman jakaantumisen. (Tapana 2010, 246–247.)

Solujen välinen viestintä alkaa kasvutekijäproteiinien kiinnittymisellä tunnistemolekyyliin eli reseptoriin. Kun kasvutekijä ligandina sitoutuu reseptoriinsa, reseptori aktivoituu ja aloittaa solunsisäisen tiedonsiirtoprosessin eli viestinvälitysreitit (engl. signaling pathway). Tiedonsiirtoprosessi on monivaiheinen tapahtuma, missä proteiinit säätelevät seuraavien proteiinien aktiivisuutta. Lopulta säädelään transkriptiotekijöitä viestin siirtyessä tumaan ja proteiinin kiinnittyessä geenin säätelyalueelle. (Heino ja Vuento 2010, 247–250.) Transkriptiotekijät säätelevät transkriptiota eli RNA:n valmistamista DNA:n emäsjärjestyksen mukaisesti (Solunetti 2006b). Koska osa viestimolekyyleistä vaikuttaa tumassa transkriptiota säätelevien geenien aktiivisuuteen, solujen välisen viestinnän kautta uudelleen säädelään geenien ilmentymistä. Solujen viestinvälitysreitit ovat usein kytköksissä toisiin viestinvälitysreitteihin. (Heino ja Vuento 2010, 247–250.)

4.1 γ -sekretaasi

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kokeellisesti todeta, vaikuttaako γ -sekretaasin toiminnan inhiboiminen käytössämme olevilla inhibiittoreilla (DAPT, L-685,458 ja Compound E) syöpäsolujen proliferatioon ja viabiliteettiin. γ -sekretaasi on kaikissa soluissa esiintyvä suuri proteaasi eli proteiineja pilkkova entsyymi. Se koostuu neljästä alayksiköstä: preseniliini, Aph1a, PEN-2 ja nikastrini. Kaikki neljä proteiinialayksikköä ovat tarpeellisia kompleksin aktiivisuudelle. γ -sekretaasi entsyymien tehtävänä on pilkkoa spesifisesti proteiineja solukalvolla vaikuttaen näin solujen väliseen viestintään. (De Strooper 2003).

Ensimmäiset tutkimukset γ -sekretaasin vaikutuksista soluissa on tehty tutkittaessa Alzheimerin taudin syntymekanismia. γ -sekretaasin on todettu tuottavan Alzheimerin taudissa amyloidi- β -peptidiä. (De Strooper 2003.) Myöhemmin on havaittu γ -sekretaasin yhteys myös moniin syövän syntyyn vaikuttavien proteiinien viestinvälitysreitteihin. Proteiineja, joihin γ -sekretaasi vaikuttaa, tunnistetaan

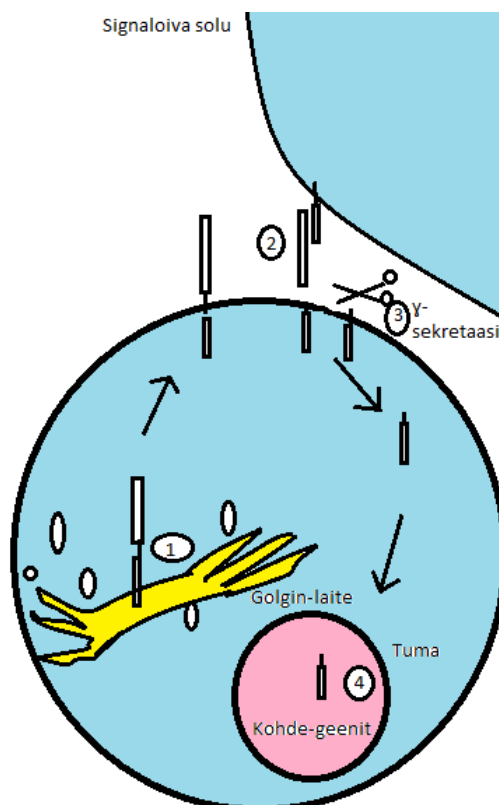
jatkuvasti lisää. Tällä hetkellä γ -sekretaasilla on todettu olevan noin 90 erilaista substraattia. Vaikka näillä γ -sekretaasin substraateilla on eroja rakenteessa, sijainnissa ja fysiologisissa ominaisuuksissa, on näillä γ -sekretaasin substraateilla myös yhteisiä piirteitä. Suurin osa näistä proteiineista on tyyppin I transmembraanisia proteiineja, jotka toimivat signaloivina proteiineina ja joilla on merkityksellisiä tehtäviä solun elintoiminnoissa. (Haapasalo ja Kovacs 2011.)

γ -sekretaasi vaikuttaa substraatteihinsa pilkkomalla niitä solukalvolla eli membraanilla ja vapauttamalla proteiinin solunsisäisen osan solulimaan. Useat substraatit siirtyvät tumaan ja säätelevät transkriptiota. Toimivan γ -sekretaasin puute estää substraattien solunsisäisen osan irtoamisen. Useilla γ -sekretaasin substraateista on yhteyksiä syöpään (Haapasalo ja Kovacs 2011.) Yksi rintasyövän kannalta merkityksellisimmistä γ -sekretaasin substraattiproteiineista on Notch, transmembraaninen heterodimeeri, jonka signaalintireitin on todettu olevan yhteydessä rintasyöpään. (Wolfe 2009.) γ -sekretaasin toimintaa pystytään estämään erilaisten inhibiittorien avulla. Koska γ -sekretaasin vaikutuksesta Notch-proteiini pystyy aktivoitumaan ja toimimaan onkogeeninä on kirjallisuudessa esitetty, että γ -sekretaasin inhibiittoreita voitaisiin käyttää lääkkeenä syövän hoitoon. (Yin, Velazquez ja Liu 2010.)

4.2 Notch-signaali

Solujen viestinvälitysreitin eli signaloinnin tarkoituksena on kuljettaa viestimolekyylin sisältämä viesti solukalvon reseptorin kautta solun sisään kohteeseensa. Notch-signaloinnin tarkoituksena on monien välivaiheiden kautta muuttaa geeniekspressiota. Notch-viestinvälitysreitin vaikutukset ovat laajat. (Al-Hussaini ym. 2011.) Terveissä soluissa Notch-signaali vaikuttaa solujen kohtaloon, kantasolujen ylläpitoon, solujen kehityksen ja erilaistumisen sääntötyöhön (Yin ym. 2010). Notch säätelee myös monien elinten kehittymistä ja erilaistumista, kuten verisuonten muodostusta ja hematopoiesia (verisolujen muodostumista) (Al-Hussaini ym. 2011).

Transmembraarisia Notch-reseptoreita on neljä: Notch 1, -2, -3 ja -4. Reseptorit toimivat solukalvolla läpäisten kalvon lipidikaksoiskerroksen. Reseptorit koostuvat kolmesta osasta: solun ulkoisesta, transmembraanisesta sekä solunsisäisestä osasta. Solun ulkoinen osa pystyy sitomaan viereisistä soluista tulevia viestimolekyylejä eli ligandeja. (Al-Hussaini ym. 2011.) Ligandeilla tarkoitetaan biokemiassa reseptoriinsa sitoutuvaa solunulkoista molekyyliä (Kivelä ym. 2007, 396). Notch-ligandit ovat proteiineja ja niitä on viisi: Delta-like 1, 3, 4 ja Jagged 1 ja 2. Kaikkien Notch-reseptorien viestinvälitysreitti toimii samalla mekanismilla (Kuva 1). Notch-signaali aktivoituu viereisen solun Notch-ligandin liittymisellä Notch-reseptoriin. γ -sekretaasi vaikuttaa Notch-signaaliin aktivoitumisreitin varhaisessa vaiheessa. γ -sekretaasin vaikutuksesta Notch-reseptorin solunsisäinen osa irtoaa ja syntyy solunsisäistä Notch:ia (ICN). Tämä ICN siirtyy tumaan, jossa se muuntaa geeniekspressiota vaikuttamalla transkriptiotekijöihin. (Al-Hussaini ym. 2011). Notch:n kohdegeenejä ovat muun muassa c-Myc, p21 ja Cyclin D1, joiden tehtävänä on säädellä solusykliä, Bcl-2, joka estää apoptoosia, ja HES/HEY-perheen geenit, jotka määrittelevät solun kohtaloa. (Olsauskas-Kuprys ym. 2013.)



Kuva 1. Notch-signalointi. Notch-signaloinnin neljä päätapahtumaa ovat 1) Golgin laitteessa kypsyminen: Notch-reseptoriin muodostuu solunulkoisen ja solunsisäisen osan, joiden välille syntyy eikovalenttinen sidos ja koko kompleksin siirtyä solukalvolle. 2) Notch-reseptori aktivoituu, kun sille spesifinen ligandi liittyy siihen. 3) γ -sekretaasi vapauttaa solukalvoon ankkuroituneen Notch-reseptorin solunsisäisen osan. 4) Solunsisäinen osa siirtyä tumaan säätämään kohdegeeniensä ilmentymistä. (mukaillen Fortini 2002.)

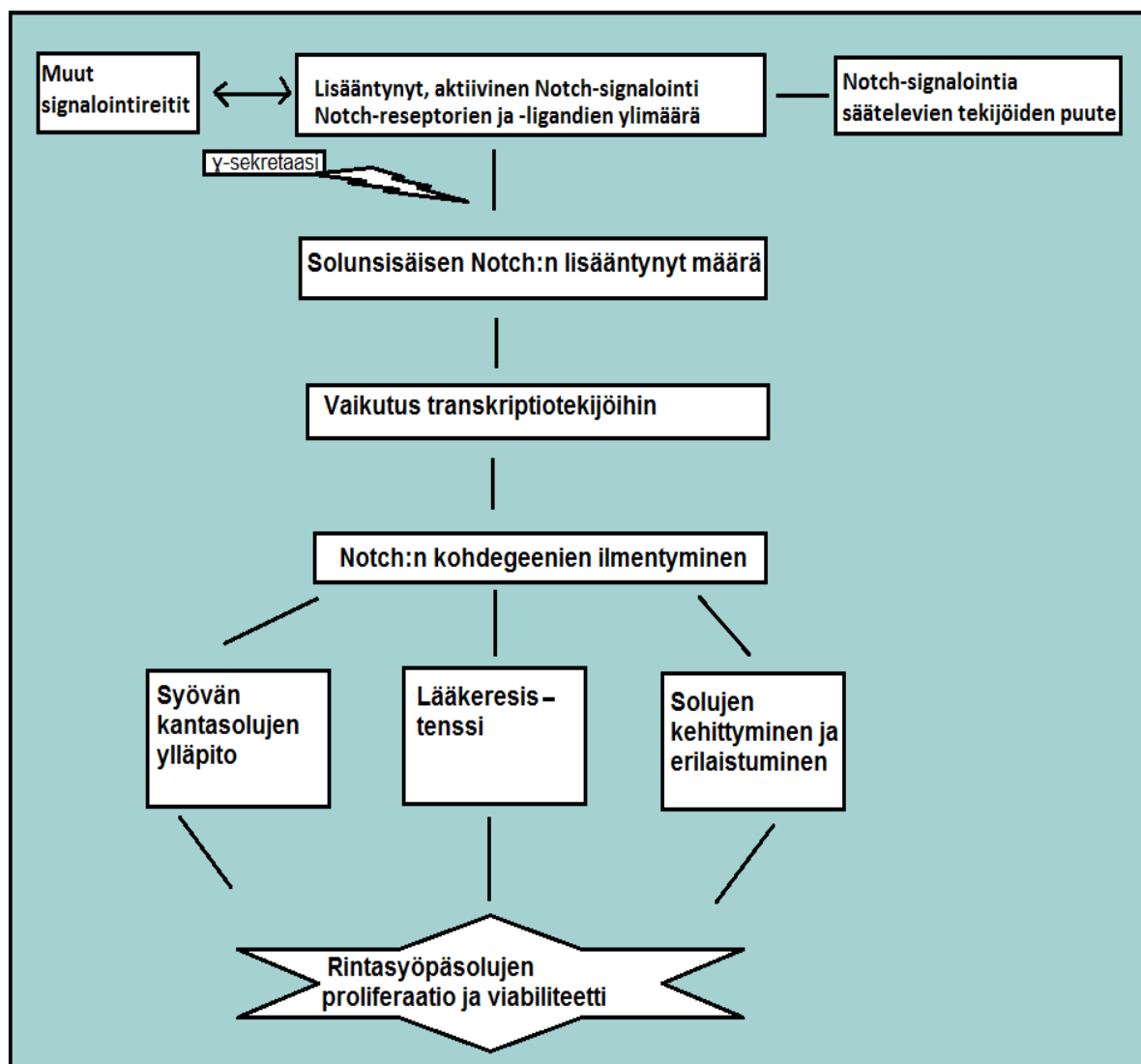
4.3 Notch-signalointi ja rintasyöpä

Ensimmäinen Notch-geenimutaatio löydettiin banaanikärpäselästä (*Drosophila*) vuonna 1913 ja Notch-signalointia on tutkittu siitä lähtien (Groth ja Fortini 2012.) Notch-signaloinnin yhteys syövän syntyyn huomattiin ensimmäisen kerran T-solujen akuutin lymfaattisen leukemian (T-ALL) kromosomien translokaationa. Havaittiin, että translokaation vaikutuksesta Notch-1-reseptorit olivat kokoajan aktiivisia. Notch-1-reseptorin mutaatioita on myöhemmin löydetty yli 50 prosentissa ihmisen T-ALL-tapauksista. (Al-Hussaini ym. 2011.) Onkogeeninä eli syöpägeeninä toimiessaan Notch aiheuttaa myös esimerkiksi rintasyöpää. Notch-reseptorissa tapahtuvat mutaatiot, kuten kromosomaalinen translokaatio, pistemutaatiot ja kromosomaalinen amplifikaatio (monistuminen), ovat tunnettuja mekanismeja Notch-signaloinnin aktivoitumiseen syövässä. Kaikki nämä mekanismit lisäävät solunsisäisen Notch:n määrää. (Shih ja Wang 2007.)

Monet tutkimukset ovat osoittaneet, että Notch-signaloinnilla on onkogeeninen rooli rintasyövässä myös muiden signalointireittien kautta. Tällaisia signalointireittejä ovat muun muassa Ras-, Erb2-,

TGF- β - ja Wnt-signalointireitit, jotka myös vaikuttavat rinnan kasvaimen syntyyn. (Yin ym. 2010.) Koska Notch-signaloinnilla on tärkeä rooli syövän synnyssä ja etenemisessä, sen vaiheisiin vaikuttamisella saattaa olla syövän syntyä ja etenemistä estävä vaikutus. Notch-signaloinnin estämisessä tärkeintä on rajoittaa sitä proteolyttistä vaihetta, jossa ICN syntyy (Shih ja Wang 2007.) Tällä tavoin vaikuttavia γ -sekretaasin inhibiittoreita ei kuitenkaan vielä käytetä rutiinilääkkeenä syövän hoitoon (Groth ja Fortini 2012.). Notch-proteiinin rakenteen ja signalointiketjun tapahtumien ymmärtäminen on tärkeää tutkittaessa uusia lääkkeitä, kuten γ -sekretaasin inhibiittoreita, syövän hoitomuodoksi. (Shih ja Wang 2007.)

Rintasyövässä Notch vaikuttaa rintasyöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin (Kuva 2). Notch vaikuttaa myös normaalien rinnan kantasolujen kohtaloon ja normaaliin rinnan kehitykseen. (Al-Hussaini ym. 2011.) Notch-reseptorien ja -ligandien määrää on mitattu eri rintasyöpätyypeistä immunohistokemiallisesti ja rintasyövässä on havaittu ylimäärin Notch-reseptoreja ja -ligandeja. Riippuen rintasyövän alatyypistä muun muassa Notch-1-, Notch-4- ja Notch-3-reseptorien sekä näiden solunsisäisten reseptoriosien yli-ilmentymää on löydetty tutkittaessa rintasyöpänäytteitä. Ihmisen rintasyöpään liittyvissä tutkimuksissa on havaittu, että Notch-1-reseptorin ja sen ligandin Jagged-1:n yli-ilmentyminen ennustaa huonointa hoitoennustetta. Notch-1 ja Notch-4 on kategorisoitu rinnan onkogeneiksi. Tutkimuksissa on myös havaittu Notch:n ja Notch-ligandien lähetti-RNA:n tasoissa epäsäänneltyä ilmentymistä. Rintasyövän kantasoluilla tehdyssä tutkimuksessa on havaittu Notch-4-reseptorien olevan kahdeksan kertaa aktiivisempia kuin erilaistuneissa soluissa. Notch-4:n inhibointi rajoitti tuumorien kasvua. Rintasyövän kantasoluilla oli myös lisääntynyttä Notch-signalointia. On myös havaittu, että Notch-signalointia sääteleviä tekijöitä puuttuu rintatuumoreissa. (Olsauskas-Kuprys ym. 2013.)



Kuva 2. Notch-signaalin vaikutukset rintasyöpäsoluihin. Onkogeeninä toimiessaan lisääntynyt, aktiivinen Notch-signaali johtaa Notch:n solunsisäisen osan ylimäärään solulimassa silloin kun γ -sekretaasin toimintaa ei ole estetty inhibiittoreilla. Solunsisäisen Notch:n ylimäärä vaikuttaa transkriptiotekijöihin sekä Notch:n kohdegeeneihin. Notch:n kohdegeenien ilmentyminen estää solujen erilaistumista. Lisääntyneen aktiivisen Notch-signaalin vaikutuksesta rintasyöpäsolujen proliferaatio ja viabiliteetti ovat hyvät. (Al-Hussaini ym. 2011; Olsauskas-Kuprys ym. 2013; Shih ja Wang 2007.)

4.4 γ -sekretaasin inhibiittorit

Inhibiittorit estävät soluissa entsyymien kuten γ -sekretaasin toimintaa, millä on vaikutusta solujen signaalintireitteihin. Entsyymit ovat pääosin proteiineja, jotka katalysoivat soluissa monenlaisia biokemiallisia reaktioita. Näitä reaktioita ovat muun muassa hajoamisreaktiot, synteesireaktiot ja hapetus- pelkistysreaktiot. Molekyyliä, johon entsyymin toiminta kohdistuu, kutsutaan substraatiksi. Entsyymi ja substraatti muodostavat entsyymi-substraattiyhdistymän esimerkiksi heikkojen vety- tai ionisidosten avulla, jolloin substraatti muuntuu reaktiotuotteeksi ylimääräisen energian avulla. Entsyymien toiminta soluissa riippuu entsyymien lukumäärästä ja aktiivisuudesta. Näitä sääteleviä teki-

jöitä ovat muun muassa geenit, substraatit, hormonaaliset tekijät, kovalenttinen muuntelu sekä aktivaattorien ja inhibiittorien läsnäolo. (Heino ja Vuento 2010, 66–67, 70–72.)

Inhibiittorit estävät entsyymien toimintaa joko palautuvasti (reversiibeliesto) tai pysyvästi (irreversiibeliesto). Reversiibeliestossa entsyymien toiminta palautuu, kun inhibiittori poistuu entsyymistä. Inhibiittori voi muistuttaa substraattia ja sitoutua entsyymien aktiiviseen kohtaan, jolloin reaktiotuotetta ei synny. Tätä palautuvaa estoa kutsutaan kilpailevaksi estoksi. Toinen palautuvan eston muoto on ei-kilpaileva esto, jolloin inhibiittori ei sitoudu entsyymien aktiiviseen kohtaan, vaan muualle molekyyllisessä vaikuttaen näin entsyymien aktiivisuuteen kiihdyttämällä, hidastamalla tai estämällä entsyymireaktiota. (Heino ja Vuento 2010, 70–72.)

γ -sekretaasin inhibiittorit estävät γ -sekretaasin toimintaa, jolloin muun muassa ICN ei pääse siirtymään tumaan säätelemään kohdegeeniensä ilmentymistä. γ -sekretaasin inhibiittoreista on saatu hyviä tuloksia eri syöpäsolujen kasvun rajoittamisessa tämä tarkoittaa, että γ -sekretaasin inhibiittoreissa on potentiaalia syövän hoitomuodoksi. Suurimpia haasteita on selvittää inhibiittorien sivuvaikutuksia. Koska Notch-signaalointia tapahtuu myös normaalissa kudoksessa ja se vaikuttaa muun muassa hematopoieesiin, saattaa γ -sekretaasin inhibiittoreiden käyttö aiheuttaa toimintahäiriöitä elintärkeissä elimissä. Käytettäessä γ -sekretaasin inhibiittoreita lääkkeinä syövän hoidossa, lääkeannostus vaikuttavasta annoksesta myrkylliseen vaatii vielä lisätutkimuksia. γ -sekretaasi ei vaikuta ainoastaan Notch-signaalointiin, vaan γ -sekretaasilla on myös monia muita kohdeproteiineja, sen vuoksi γ -sekretaasin toiminnan rajoittamisella saattaa olla ennustamattomia vaikutuksia elimistössä (in vivo). Lisäksi γ -sekretaasin inhibiittorit voivat vaikuttaa myös muihin proteaaseihin kuin γ -sekretaasiin, joten inhibiittorien vaikutukset in vivo voivat olla laajat. (Shih ja Wang 2007.) Haittavaikutusten minimoimiseksi on ehdotettu esimerkiksi Notch-reseptorien esihoitoa reseptorien vasta-aineella yhdistettynä γ -sekretaasin inhibiittorien käyttöön. Lisäksi olisi tärkeää arvioida Notch:n aktivaation ja mutaatioiden määrä kussakin syövässä, koska γ -sekretaasin inhibiittoreilla on parempi vaikutus tuumorissa, joissa on epäsäänneltyä Notch-signaalointia. γ -sekretaasin inhibiittoreita voidaan käyttää yhdistettynä toiseen hoitomuotoon, kuten anti-hormonaalisiin lääkkeisiin paremman hoitotuloksen saamiseksi. (Olsauskas-Kuprys ym. 2013; Al-Hussaini ym. 2010.)

γ -sekretaasin inhibiittoreita on tällä hetkellä yli 100, joista kehitetään suun kautta otettavia syöpälääkkeitä. Kliinisissä kokeissa rintasyövän hoitamiseksi γ -sekretaasin inhibiittoreita on tutkittu faasin I–II kokeilla eli inhibiittoreita on jo testattu sekä terveillä, että sairailta ihmisillä eripituisten tutkimusjaksojen ajan. DAPT on eniten käytetty inhibiittori laboratorioskokeissa. DAPT:n vaikutukset eri solulinjoihin ovat olleet muun muassa solujen apoptoosin lisääntyminen ja proliferaation estyminen. In vitro ja in vivo -tutkimuksissa L-685,458 inhibiittorin on havaittu estävän metastasointia rintasyövässä, jotka ovat yli-ilmentäneet Notch-3:a. (Olsauskas-Kuprys ym. 2013.)

Opinnäytetyössämme käytimme kolmea eri γ -sekretaasin inhibiittoria: DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, Cas nro: 208255-80-5), L-685,458 ((5S)-(t-Butoxycarbonylamino)-6-phenyl-(4R)hydroxy-(2R)benzylhexanoyl)-L-leu-L-phe-amide, Cas nro: 292632-98-5) ja Compound E ((2S)-2-[[[3,5-Difluorophenyl]acetyl]amino]-N-[(3S)-1-methyl-2-oxo-

5-phenyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-3-yl]propanamide, Cas nro: 209986-17-4) (Enzo Life Sciences 2014; Sigma-aldrich 2014c; Sigma-aldrich 2014d.)

5 SOLUVILJELY

Rintasyöpätutkimuksia tehdään muun muassa käyttämällä erilaisia soluviljelytekniikoita. Soluviljelyn avulla saadaan tuotettua suhteellisen homogeeninen solupopulaatio, joka jakautuu itsenäisesti. (Holiday ja Speirs 2011.) Soluviljelmissä pyritään luomaan kasvatettaville soluille mahdollisimman luonnollinen (in vivo) elinympäristö. Elatusaineen koostumus on soluille hyvin tärkeä ja sen tuleekin muistuttaa mahdollisimman paljon elävää solunulkoista nestettä. Solukko täyttää hyvissä oloissa nopeasti käytettävissä olevan kasvutilan, jos soluille on tarjolla elatusnesteessä kaikki välttämättömät epäorgaaniset ja orgaaniset aineet. Puskurien avulla säädetään elatusnesteeseen pH vastaamaan fysiologista pH:ta. Kuvassa 3 on tyypillinen elatusainetta eli mediumia sisältävä soluviljelypullo. Soluviljelmät kasvatetaan inkubaattoreissa eli soluviljelykaapeissa, koska lämpötilan, kosteuden ja hiilidioksidin tulee pysyä vakiona kasvatuksen aikana. (Niemi ym. 1994, 41–43.)



Kuva 3. Mediumia sisältävä soluviljelypullo

Soluviljely tehdään omassa puhdistilassa, jonne kuljetaan erillisen välihuoneen kautta. Välihuoneessa työntekijä vaihtaa suojavaatetuksen, johon kuuluvat esimerkiksi laboratoriotakki ja suojakäsineet sekä mahdolliset muut suojaruusteet. Solulinjojen kontaminaatiot ehkäistään noudattamalla aseptisiä työskentelymenetelmiä. Kaikki tasot, pinnat, suojakäsineet ja välineet desinfioidaan ja jokaisessa työskentelyvaiheessa otetaan huomioon aseptiikka ja soluviljelylaboratorion siisteys. Soluviljelmien käsittely tehdään laminaari-ilmavirtauskaapissa, joka suojaa soluviljelmiä ja työntekijää. Erilaisia kontaminaatioita ovat mykoplasma-, hiiva-, bakteeri- ja sienikontaminaatiot sekä solulinjojen väliset ristikontaminaatiot. Yhden solulinjan käsittely kerrallaan estää soluja ristikontaminaatioilta. (Solunetti 2006a.)

Solujen tehtävä on kasvaa ja erilaistua niin elimistössä kuin soluviljelmissäkin. Kasvu perustuu yksittäisten solujen suurenemiseen (hypertrofiaan) tai solujen lukumäärän lisääntymiseen (proliferaatioon). Solun kasvu ja jakautuminen riippuu solun omasta geneettisestä ohjauksesta ja ympäristötekijöistä ollen tarkoin säädeltyä. Elimistössä solut jakautuvat siinä tahdissa kuin niitä tarvitaan. Soluilla on esimerkiksi kyky aistia ympäristöönsä soluhukasta. Soluviljelmässä normaalien solujen kasvua rajoittaa kontakti- eli tiheysinhibitio, joka estää soluja kasvamasta toistensa päälle. Kun solut ovat jakau-

tuneet ja levittäytyneet yhden solukerroksen paksuisena koko viljelyalustan pohjaan, niiden jakautuminen, DNA-synteesi ja liike loppuvat. Täyttyneeseen maljaan voidaan tehdä tilaa harventamalla soluja, jolloin ne alkavat taas jakautua ja liikkua. Malignien solujen kontakti-inhibitio ei toimi ja syöpäsolut saattavat kasvaa jatkuvina, kuolemattomina solulinjoina muodostaen erittäin tiheän ja monikerroksisen solukon. (Niemi ym. 1994, 242–243, 307–308.) Kuolleet solut voidaan yleensä havaita mediumissa yksittäisinä kelluvina soluina (Ryan 2012, 2).

Solulinjat, joita opinnäytetyössämme käytimme, olivat MCF-12F, MCF-7 ja MDA-MB-453.

MCF-12F-solulinja (ATCC® CRL-10783™) toimii opinnäytetyössämme kontrollilinjana. MCF-12F-solut ovat 60-vuotiaan kaukaasialaisen naisen rinnan epiteelisolukkoa. Linjan solut eivät ole syöpäsoluja. MCF-7 (ATCC® HTB-22™) on 69-vuotiaan kaukaasialaisen naisen rintarauhasen epiteelin adenokarsinoomasoluja. Solulinja ilmentää ER:a ja solut ilmentävät WNT7B syöpägeeniä. MDA-MB-453-syöpäsolut ovat peräisin 48-vuotiaan kaukaasialaisen naisen pleuraeffuusiosta (nesteen kertyminen keuhkoihin), jonne ne ovat rinnasta levinneet. MDA-MB-453-solulinja (ATCC® HTB-131™) on metastasoivan rintarauhasen epiteelin karsinoomasoluja, jotka ilmentävät fibroblastikasvutekijöitä (FGF). (ATCC 2012a; ATCC 2012b; ATCC 2012c.) MDA-MB-453-solulinja on kolmoisnegatiivinen eli sen ER ja Pgr sekä Her-2-proteiinin ilmentyminen ovat negatiivisia. Solulinja on androgeenireseptori (AR)-positiivinen. Androgeenit lisäävät solujen proliferaatiota, joten proliferaatiota voidaan rajoittaa käyttämällä anti-androgeenejä, kuten flutamidia. MB-MDA-453-solulinjassa on monia rakenteellisia poikkeavuuksia, kuten geneettiset muutokset ja muutokset tiettyjen proteiinien ilmentymisessä sekä muutokset solujen signaalintireiteissä. MDA-MB-453-soluilla on hyvä proliferaatioaste eli solut lisääntyvät ja kasvavat hyvin. (Vranic, Gatalica ja Wang 2011.)

5.1 Solulinjojen ylläpito

Solulinjojen ylläpidolla tarkoitetaan toimenpiteitä, joilla mahdollistetaan solujen jatkuva lisääntyminen. Soluviljelmissä solut lisääntyvät alun hitaan kasvun vaiheen jälkeen eksperimentaalisesti, kunnes ne ovat käyttäneet lähes kaiken tilan soluviljelijepullossa tai kunnes mediumin ravinteet alkavat loppua. Optimaalisen tiheyden ylläpitämiseksi soluja pitää jakaa ennen kuin ne saavuttavat kasvukonfluentin (vaiheen, jolloin kontakti-inhibitio alkaa rajoittaa kasvua). Medium tulee vaihtaa uuteen viimeistään silloin, kun mediumin pH tippuu yli 0,1–0,2 pH yksikköä ja solukonsentraatio laskee. pH laskee solujen metabolian kautta syntyvän maitohappopitoisuuden lisääntymisen takia, mikä voi olla soluille toksista. Solut pestään fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (PBS, phosphate buffered saline), mediumin vaihdon yhteydessä, jotta kaikki seerumi, kalsium ja magnesium saadaan poistettua häiritsemästä reagenssien toimintaa. (Life technologies™, 26–31.)

Uuden mediumin vaihtoväli ja solujen jakamisväli riippuvat solutyypistä, esimerkiksi sen kasvunopeudesta, koosta ja ympäristövaatimuksista. Solulinjojen ylläpitoimenpiteet kannattaa suorittaa säännöllisesti. Näin solujen terveydessä tapahtuvat muutokset kuten muutokset kasvutiheydessä huomataan. Solujen ylläpitoimet kannattaa myös aina kirjata ylös. (Life technologies™, 26–31.)

5.2 Kontaminaatiot soluviljelylaboratoriossa

Kontaminaatiolla soluviljelylaboratoriossa voi olla vakavat seuraukset. Kontaminaatioita voivat aiheuttaa kemialliset kontaminaatiot kuten mediumin tai reagenssien epäpuhtaudet ja biologiset kontaminaatiot kuten bakteerit, home, hiiva, virukset, mykoplasma ja ristikontaminaatiot eri solulinjojen välillä. Kontaminaatioita vähennetään oikeilla, aseptisilla työtapoilla. Bakteerit ovat kaikkein yleisimpiä soluviljelylaboratorion kontaminaatioista. Bakteerit voidaan huomata soluviljelmää visuaalisesti tarkastelemalla parin päivän päästä infektiosta. Soluviljelämä voi muuttua bakteerikasvuston seurauksena sameaksi ja sen pinnalle voi muodostua ohut kalvo. Bakteerit näkyvät mikroskooppisesti. Bakteerien koko ja muoto riippuu bakteerin lajista. (Life technologies™, 14.)

Mykoplasma kuuluu bakteerien sukuun. Siltä puuttuu soluseinä ja se on pienin, yleensä alle 1 µm kokoinen, itsenäisesti lisääntyvä organismi. Mykoplasma on erittäin vaikea havaita soluviljelmistä, ellei kontaminaatio ole jo niin vaikea, että solut alkavat kuolla. Hitaasti kasvavat mykoplasmalajit eivät välttämättä aiheuta solukuolemia, mutta voivat muuten vaikuttaa solujen metaboliaan ja käyttäytymiseen sekä alentaa solujen proliferaatiota. Mykoplasmakontaminaation tunnistamiseen käytetään yleensä fluoresenssivärjäystä. (Life technologies™, 16.)

Hiiva ja home kuuluvat sieniin ja ovat eukaryoottisia (aitotumallisia) mikro-organismeja. Hiivan koko vaihtelee yleisestä muutamasta mikrometristä jopa 40 µm:iin. Hiiva- ja homekontaminaatio voivat muuttaa soluviljelmän sameaksi samoin kuin bakteeri-infektiokin. Mikroskooppisesti tarkasteltuna hiiva näkyy yksittäisinä ovaaleina tai pallonmuotoisina kappaleina, mistä voi lähteä pienempiä partikkeleita hiivan jakautuessa. Home kasvaa monisoluisena rihmastona. Mikroskoopissa home näkyy yleensä ohuina rihmoina, myös tiheämpiä kokkareita tai itiöitä voi olla havaittavissa. (Life technologies™, 15.)

Virukset ovat erittäin pieniä mikrobeja, jotka tarvitsevat isäntäsolun lisääntyäkseen. Pienen kokonsa takia viruksia on erittäin vaikea havaita ja poistaa soluviljelmistä tai reagensseista. Viruskontaminaatiot aiheuttavat terveysriskin soluviljelylaboratoriossa työskenteleville. Viruskontaminaatio voidaan havaita elektronimikroskoopin, immunologisten värjäysten, ELISA-tekniikoiden tai PCR:n (polymeerasiketjureaktio) avulla. (Life technologies™, 16.)

Eri solulinjojen kontaminoituminen keskenään on vakava ongelma, joka voidaan välttää hankkimalla soluja vain hyvämaineisista solupankeista, tarkastelemalla solujen piirteitä ja ulkonäköä mikroskooppisesti sekä noudattamalla hyviä aseptisia työtapoja. Ristikontaminaatiot voidaan tunnistaa muun muassa DNA-sormenjälkianalyysin ja karyotyypinanalyysin (analyysi kromosomien lukumäärästä ja rakenteesta) avulla. (Life technologies™, 17.)

6 SOLUJEN PROLIFERAATIOTA JA VIABILITEETTIÄ TUTKIVAT MENETELMÄT

Terveiden solujen lukumäärää mittaamalla saadaan tietoa solujen viabiliteetistä tai proliferaatiosta. Proliferaation mittarina voidaan käyttää jakautuvien solujen lukumäärää soluviljelyssä. (Roche Diagnostics 2008, 110.) Solujen proliferaatiota tutkivia tekniikoita ovat myös menetelmät, jotka mittaavat DNA-synteesin määrää solupopulaatiossa, DNA-synteesin määrää yksittäisessä solussa ja solusykliin liittyviä antigeenejä yksittäisessä solussa. (Roche Diagnostics 1996–2013a.)

Solujen viabiliteettiä voidaan määrittää soluviljelmän terveiden solujen määrällä. Yksinkertaisin tapa määrittää elinkelpoisten solujen määrää on laskea ne laskukammiossa (Roche Diagnostics 2008, 113). Solujen viabiliteettiä tutkivia tekniikoita ovat myös menetelmät, jotka mittaavat solukalvon vauriota/vuotoa ja aineenvaihdunnallista aktiiviteettiä solupopulaatiossa. Elinkykyiset solut ovat aineenvaihdunnallisesti aktiivisia. Tätä aktiivisuutta voidaan mitata käyttämällä tetrazolium-suolaa (esimerkiksi WST-1), jonka metabolisesti aktiiviset solut pystyvät muuttamaan värilliseen liukoiseen muotoon. (Roche Diagnostics 1996–2013a.)

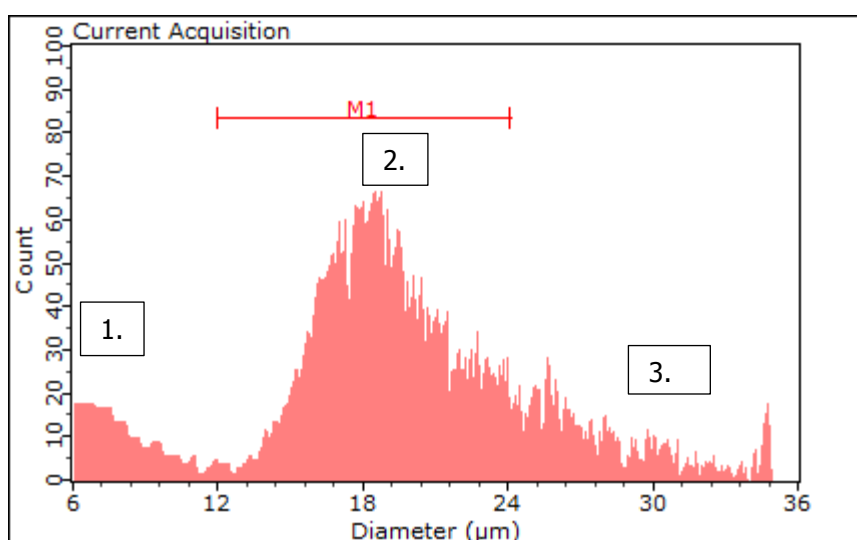
6.1 Scepter™-solulaskija

Scepter™-solulaskijan avulla voidaan mitata solujen proliferaatiota ja viabiliteettiä. Scepter™-solulaskijalla pystytään laskemaan soluviljelmän elinkykyisten solujen lukumäärä. Solujen lasku on tärkeää seurattaessa solujen kasvua, jakautumista ja elinkykyä. Scepter™-solulaskija (Kuva 4) on käsitönteinen, nopea ja tarkka menetelmä solulaskennassa. Scepter™:n periaate perustuu impedanssi-pohjaiseen partikkelien havaitsemiseen. Kun solut virtaavat sensorin (Kuva 5) aukon läpi, vastus kasvaa ja Ohmin lakiin perustuen vastuksen kasvaessa myös jännite kasvaa. Scepter™ mittaa jokaisen solun aiheuttamaa jännitteen muutosta ja muodostaa samankokoisista jännitepiikeistä histogrammin. Histogrammi antaa kvantitatiivista tietoa solun morfologiasta, minkä perusteella voidaan arvioida viljeltyjen solujen terveyttä ja laatua. (EMD Millipore Corporation 2013.)



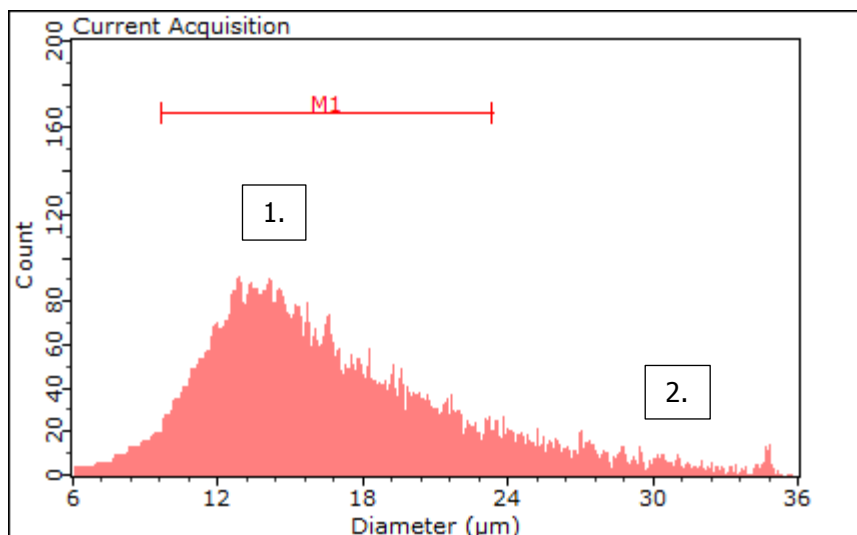
Kuva 4. Scepter™-solulaskija Kuva 5. Scepter™-sensorit

Opinnäytetyössämme käytettyjen solulinjojen terveiden solujen lukumäärä mitattiin γ -sekretaasin inhibiittoreilla käsittelyn jälkeen Scepter™-solulaskijalla. Terveitä soluja laskemalla saatiin tässä työssä tietoa rintasyöpäsolujen ja käytetyn kontrollisolulinjan proliferaatiosta ja viabilititeetistä. Laskettaessa soluja Scepter™-solulaskijalla solulaskijan päähän laitetaan sensori. Näyte kulkee sensorin kammion läpi. 50 μ l näytemäärästä sensori aistii solujen koon ja määrän. Scepter™-solulaskija muodostaa laskemistaan soluista histogrammin solujen koon eli läpimitan sekä solujen lukumäärän perusteella. Histogrammi muodostuu eri solupopulaatioista. Hajonneet, oletettavasti kuolleet solut ja reagenssin aiheuttama tausta muodostavat oman populaationsa. Suuret solut ja yhteenliittyneet solut muodostavat histogrammin ”hännän”. Nämä rajataan pois varsinaisesta elinkykyisten solujen populaatiosta ja niiden lukumäärä lasketaan. (Ongena, Das, Smith, Gil ja Johnston 2010.)



Kuva 6. Esimerkkikuva MCF-7-solujen Scepter™-histogrammista

Tästä histogrammikuvasta (Kuva 6) nähdään kolme MCF-7-solulinjan solupopulaatiota. Ensimmäisessä populaatiossa näkyvät hajonneet ja kuolleet solut, jotka rajattiin pois halutusta populaatiosta (1.). Kolmannen populaation muodostavat suuret ja yhteenliittyneet solut (3.), jotka myös rajattiin pois halutusta populaatiosta. Elinukyiset lasketut solut näkyvät populaatiossa kaksi (2.). Tässä esimerkkitapauksessa elinkykyisten solujen halkaisija on 12 μ m – 24,075 μ m. Mitatun näytteen konsentraatioksi Scepter™ laski 111 000 solua/ml ja solujen halkaisijoiden keskiarvoksi 19,11 μ m.



Kuva 7. Esimerkkikuva MCF-12F-solujen Scepter™-histogrammista

Kuvan 7 histogrammi esittää MCF-12F-solinjan kahta eri solupopulaatiota. Ensimmäinen solupopulaatio edustaa elinkykyisten solujen populaatiota (1.). Hajonneita ja kuolleita soluja edustavaa erillistä populaatiota ei ole näkyvässä. Toinen populaatio on rajattu pois elinkykyisten solujen populaatiosta (2.). Tässä populaatiossa ovat suuret ja yhteenliittyneet solut. Esimerkitapauksessa elinkykyisten solujen halkaisija on 9,675 µm – 23,325 µm. Mitatun näytteen konsentraatioksi Scepter™ laski 207 000 solua/ml ja solujen halkaisijoiden keskiarvoksi 16,31 µm.

6.2 WST-1-reagenssi

Opinnäytetyömme toinen mittausmenetelmä, kolorimetrinen WST-1 ((5-(2,4- disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium inner salt)) -reagenssiin perustuva menetelmä mittaa aineenvaihdunnallisesti aktiivisten, elinkelpoisten solujen määrää. Näytemuotona voidaan käyttää 96-kuoppalevyn pohjaan tarttuneita soluja tai solususpensiota. WST-1-reaktio mitataan fotometrisesti ELISA- (enzyme-linked immunosorbent assay) lukijaa apuna käyttäen. Tämä tutkimus ei edellytä pesuja tai solujen harventamista mikroviljelyssä ja se on hyvä menetelmä analysoitaessa tietoa ELISA-lukijalla. Menetelmän avulla voidaan analysoida kerralla suuri määrä näytteitä ja havaita herkästi alhaiset solumäärät. (Roche Diagnostics 1996–2013b.)

WST-1-reagenssi lisätään mikroviljelmiin. Aktiiviset elävät solut muuttavat WST-1-reagenssin värilliseen liukoiseen muotoon. WST-1-reagenssin inkubaatioajat riippuvat muun muassa solutyypistä ja solukonsentraatiosta. Tämän takia WST-1-reagenssin vaikutukset pitäisi mitata useassa eri aikapisteessä: esimerkiksi puolen tunnin, tunnin, kahden tunnin ja neljän tunnin inkubaation jälkeen optimaalisen mittaustuloksen saamiseksi. (Roche Applied Science 2005.) Värireaktio mitataan ELISA-lukijalla sopivilla filtereillä. ELISA-lukija mittaa aallonpituutta, jota väri absorboi. Absorbanssi mitataan ELISA-lukijalla aallonpituuksilla 420–480 nm. Vertailu aallonpituuden on oltava suurempi kuin 600 nm. Etuina käytettäessä WST-1-tekniikkaa ovat valmiit reagenssit, herkkyys alhaisissakin solumäärissä ja toistettavuus. (Roche Diagnostics 1996–2013b.)

7 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Opinnäytetyössämme tutkimme γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksia rintasyöpäsoluihin soluviljelyn avulla. Tämä koe oli osa tutkimusryhmän laajaa rintasyöpäprojektia. Itä-Suomen yliopiston Terveystieteiden tiedekunnan Lääketieteen laitoksen Kliinisen lääketieteen yksikön Kliinisen patologian ja oikeuslääketieteen oppiaineen tutkimusryhmä tutkii malignien sairauksien etiologiaa ja patogeneesia. Päättutkimuskohteita ovat histopatologia, molekulaarinen patologia, genetiikka/ genomiikka, epigeneetiikka ja syöpäsolujen ja niitä ympäröivän kudoksen välinen vuorovaikutus. Tutkimusryhmän tarkoituksena on muun muassa löytää tavallisimpia geneettisiä variantteja, jotka altistavat rintasyöpäriskille sekä ymmärtää niiden vaikutuksia yksilön kannalta. Tutkimusryhmä selvittää esimerkiksi geneettisten tekijöiden, elinympäristön ja elintapojen riskitekijöiden sekä syöpäriskien vaikutuksia kliinisen hoidon tulokseen. (Itä-Suomen yliopisto.)

γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksia tutkitaan, koska niistä toivotaan löydettävän tehokas ja turvallinen rintasyövän hoitomuoto. On tärkeää ymmärtää miten inhibiittorit vaikuttavat soluissa, jotta mahdollisesti kehiteltävien syöpälääkkeiden kaikki vaikutukset, myös haittavaikutukset saadaan selville. Tutkimustyö vie aikaa, koska γ -sekretaasin inhibiittoreita on useita, syöpäsolulinjoja on monia ja inhibiittorien vaikutukset soluihin ovat laajoja.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kokeellisesti todeta, vaikuttaako γ -sekretaasin toiminnan inhiboiminen käytössämme olevilla inhibiittoreilla (DAPT, L-685,458 ja Compound E) rintasyöpäsolujen proliferaation ja viabiliteettiin. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli kokeilla kahta eri menetelmää γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutusten selvittämiseksi ja raportoida laboratoriotutkimusprosessin työosuus eli kertoa menetelmistä työn toteutuksessa sekä esittää tulokset pylväsdiagrammeina.

Opinnäytetyömme tavoitteena oli saamiemme tulosten avulla lisätä tietoa γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksista syöpäsoluihin. Tavoitteena oli lisätä omaa ammatillista kasvuamme ja oppimistamme tässä työssä käsitellyistä aiheista sekä tarjota tietoa muille asiasta kiinnostuneille opiskelijoille. Opinnäytetyömme oli pieni kokeellinen osa yliopiston laajaa rintasyöpätutkimusta. Opinnäytetyömme tavoitteena oli olla tälle tutkimukselle hyödyksi ja tarjota jatkotutkimusmahdollisuuksia työmme tuloksista.

Tämän opinnäytetyön tutkimustehtävinä oli:

- ylläpitää MCF-7, MCF-12F ja MDA-MB-453-solulinjoja
- lisätä solulinjoihin γ -sekretaasin inhibiittoreita
- käyttää WST-1-reagenssia ja ELISA-lukijaa solujen elinkyvyn ja kasvun tarkasteluun ja laskea eläviä soluja ScepterTM-solulaskijalla.
- analysoida inhibiittoreiden vaikutusta syöpäsolujen proliferaation ja viabiliteettiin eli solujen kasvuun ja elinkykyyn.
- kuvata keskeiset laboratoriomenetelmät, joiden avulla solulinjoja kasvatetaan ja inhibiittoreiden vaikutuksia tarkastellaan.

8 KOKEELLINEN OSUUS

Tämä opinnäytetyö oli kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Kokeellinen osuus tehtiin käyttämällä kahta eri menetelmää, Scepter™-solulaskijaa ja WST-1-reagenssia γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutusten mittaamiseksi. Työn kokeellinen osuus koostui näiden kokeiden suorittamisesta ja työssä käytettävien solulinjojen jakamisesta sekä ylläpidosta. Lisäksi kokeiden aikana tehtiin myös kontaminaatiokontrollit.

Kokeellisen osuuden aikana kaikista solulinjoista pidettiin varalta ainakin yhtä ylläpitopulloa, jotta soluja oli aina saatavilla jatkokäyttöä varten. Opinnäytetyömme kokeellisen osuuden aikana solulinjojen ylläpitopullojen mediumia vaihdettiin noin kolmen päivän välein ja soluja jaettiin alle 90 % kasvukonfluenssissa (ekspotentiaalisessa kasvuvaiheessa) noin kerran viikossa työohjeen mukaan (LIITE 1). Työssä käytettyjen solulinjojen mediumit valmistettiin työohjeiden mukaan (LIITE 2–4). Solujen jakosuhteet olivat 1:6–1:12 solukonsetraatiosta riippuen (1 osa solususpensiota, 5–11 osaa mediumia).

Koska mediumin on mahdollista kontaminoitua käsittelyssä, teimme kokeiden aikana kontaminaatiokontrollimaljat. Kontaminaatiokontrollit tehtiin pipetoimalla kunkin solulinjan mediumia kaksi millillä yhdelle maljalle ja maljat siirrettiin inkubaattoriin. Maljoja seurattiin mikroskopoimalla niitä säännöllisesti viikon ajan ja etsimällä bakteereja, hiivoja, homeita, soluja sekä muita epäpuhtauksia. Maljoilta ei löytynyt kontaminaatioita.

8.1 Scepter™-koe

8.1.1 Scepter™-kokeen suoritus

Scepter™-koe koostui solujen jakamisesta 6-kuoppalevyille, inhibiittorien lisäämisestä ja solujen laskemisesta. Scepter™-solulaskentaa varten koe aloitettiin jakamalla soluviljelypulloissa kasvatetut rintasyöpösolulinjat MCF-7 ja MDA-MB-453 sekä kontrollisolulinja MCF-12F 6-kuoppalevyille (Kuva 8). Soluviljelypulloissa kasvaneet solut irrotettiin trypsiinin ja inkuboinnin avulla ja irroitettut solut laskettiin Scepter™-solulaskijalla. Trypsiini on entsyymi, mitä käytetään solujen irrotukseen viljelyalustan pohjalta. Solujen irrotukseen viljelyalustan pohjasta vaadittava aika riippuu muun muassa solutyypistä, populaation tiheydestä ja mediumin sisältämän seerumin konsentraatiosta. Liian vahva trypsiinikonsentraatio tai liian pitkä inkubaatioaika trypsiinissä vahingoittaa tai tappaa soluja. Seerumia tai seerumia sisältävää mediumia tulee lisätä solususpensioon niin nopeasti kuin mahdollista inkubaatioajan jälkeen trypsiinin vaikutuksen lopettamiseksi. (Sigma-Aldrich, 2014a.)

6-kuoppalevyille pipetoitiin jokaiselle kuopalle mediumia ja solususpensiota Scepter™-solulaskijan antaman solukonsentraation mukaan. Kuoppien lopullinen tilavuus oli 2 ml. MCF-7-soluja pipetoitiin 50 000 solua/kuoppa, MCF-12F 100 000 solua/kuoppa ja MDA-MB-453 250 000 solua/kuoppa. Käy-

tetyt solumäärät perustuivat solujen kokoon ja todettuun kasvunopeuteen. Solumäärät valittiin niin, että solut ennättäisivät peittää noin 70–80 % kuoppalevyjen pohjista neljän vuorokauden kasvatuksen jälkeen, mutta eivät ennättäisi kasvukonfluenttiin, jolloin kosketusinhibitio alkaisi rajoittaa kasvua.



Kuva 8. 6-kuoppalevy. Työssä käytetyt solut jaettiin Scepter™-koetta varten 6-kuoppalevyille.

Solujen annettiin kiinnittyä kuoppalevyjen kuoppien pohjiin yksi vuorokausi soluviljelyinkubaattoris- sa. Vuorokauden inkuboinnin jälkeen 6-kuoppalevyille vaihdettiin mediumit imemällä vanha medium pois ja lisäämällä 1 ml uutta mediumia, mihin oli lisätty inhibiittoria. γ -sekretaasin inhibiittorit oli laimennettu dimetyylisulfoksidilla (DMSO, dimethyl sulfoxide Cas nro:67–68–5), jota käytetään kaupallisten inhibiittorien liuottamiseen, jotta ne pystyvät vaikuttamaan soluihin. (Sigma-Aldrich 2014, b.) Tässä osassa kokeellista työtä käytetyt inhibiittorit olivat DAPT ja Compound E (CE). Molemmista inhibiittoreista käytettiin kuutta eri konsentraatiota soluviljelmissä. DAPT-inhibiittorista käytettiin lopullisia konsentraatioita 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M ja 20 μ M ja CE-inhibiittorista 10 nM, 20 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM ja 500 nM.

DAPT- ja CE-kuoppalevyille tehtiin kontrollilevyt pipetoimalla vastaavat tilavuudet mediumia ja DMSO:a 6-kuoppalevyille. Kontrollin tulee vastata mahdollisimman hyvin käsiteltyä näytettä niin, että ainoana erona on vaikuttava aine eli inhibiittori. Kun kontrolliin lisätään sama määrä liuotinta kuin käsitellyssä näytteessä, liuottimen mahdollinen oma vaikutus ei pääse vääristämään tuloksia. Jokaiselle työssä käytetylle solulinjalle tehtiin DAPT-, CE- ja DMSO-kontrollilevyt (taulukko 1, 2, 3 ja 4).

Taulukko 1. Pipetointikartta DAPT-kuoppalevyille

2 μ l (250 μ M DAPT)/ 1 ml medium Konsentraatio 0,5 μ M	4 μ l (250 μ M DAPT)/ 1 ml medium Konsentraatio 1 μ M	8 μ l (250 μ M DAPT)/ 1 ml medium Konsentraatio 2 μ M
2 μ l (2,5 mM DAPT)/ 1 ml medium Konsentraatio 5 μ M	4 μ l (2,5 mM DAPT)/ 1 ml medium Konsentraatio 10 μ M	8 μ l (2,5 mM DAPT)/ 1 ml medium Konsentraatio 20 μ M

Taulukko 2. DMSO-kontrolli kuoppalevy DAPT-inhibiittorille

2 µl DMSO	4 µl DMSO	8 µl DMSO
2 µl DMSO	4 µl DMSO	8 µl DMSO

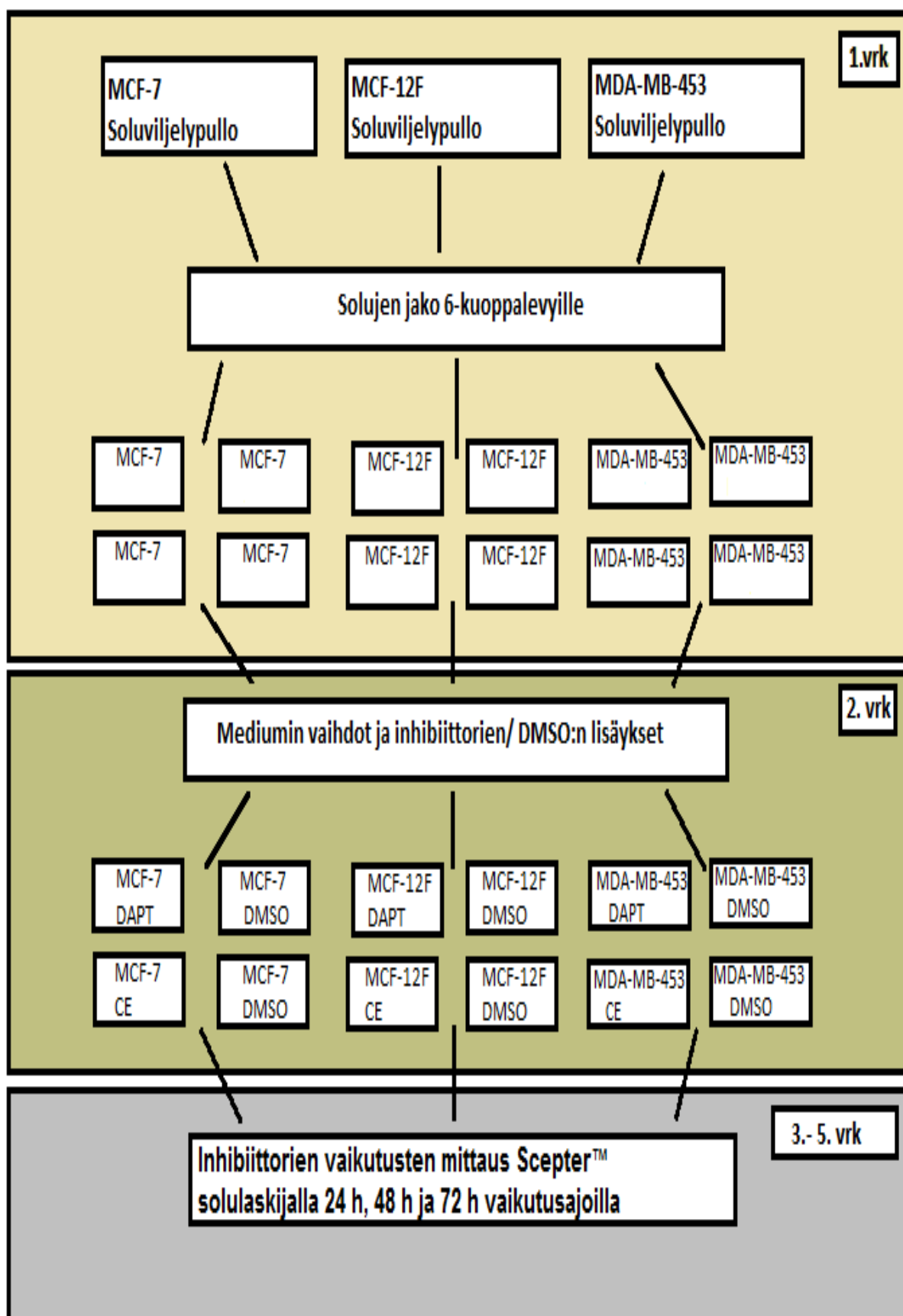
Taulukko 3. Pipetointikartta CE-kuoppalevyille

1 µl (10 µM CE)/ 1 ml medium Konsentraatio 10 nM	2 µl (10 µM CE)/ 1 ml medium Konsentraatio 20 nM	5 µl (10 µM CE)/ 1 ml medium Konsentraatio 50 nM
10 µl (10 µM CE)/ 1ml medium Konsentraatio 100 nM	20 µl (10 µM CE)/ 1 ml medium Konsentraatio 200 nM	2 µl (250 µM CE)/ 1 ml medium Konsentraatio 500 nM

Taulukko 4. DMSO-kontrolli kuoppalevy CE-inhibiittorille

1 µl DMSO	2 µl DMSO	5 µl DMSO
10 µl DMSO	20 µl DMSO	2 µl DMSO

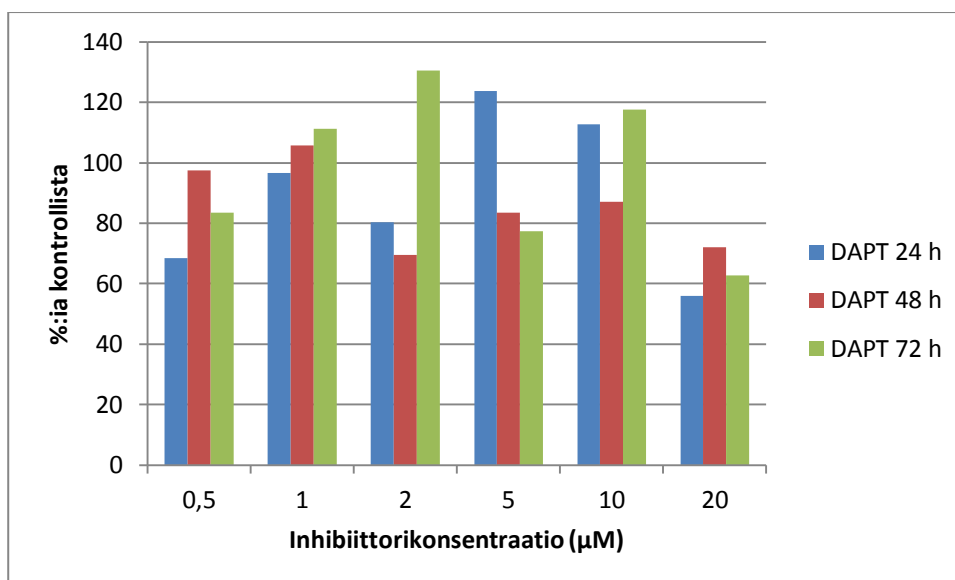
Scepter™-kokeessa inhibiittorien annettiin vaikuttaa 24, 48 ja 72 tuntia, minkä jälkeen solujen määrät laskettiin Scepter™-solulaskijalla. Laskemista varten jokainen kuoppa pestiin ensin kahdesti PBS:lla. Kuopille lisättiin trypsiiniä ja kuoppalevyjä inkuboitiin noin 5–15 minuuttia inkubaattorissa, minkä jälkeen irronnutta solususpensiota pipetoitiin edestakaisin kuopan pohjaa pitkin. Kuopille lisättiin mediumia ja suspensio siirrettiin eppendorfputkeen. Kuopat pestiin vielä mediumilla ja liuos lisättiin samaan eppendorfputkeen ja sekoitettiin solususpensio hyvin. Eppendorfputkessa olevasta suspensiosta otettiin näyte Scepter™:lla laskemista varten. Kuvassa 9 kuvataan Scepter-kokeen koko suoritus.



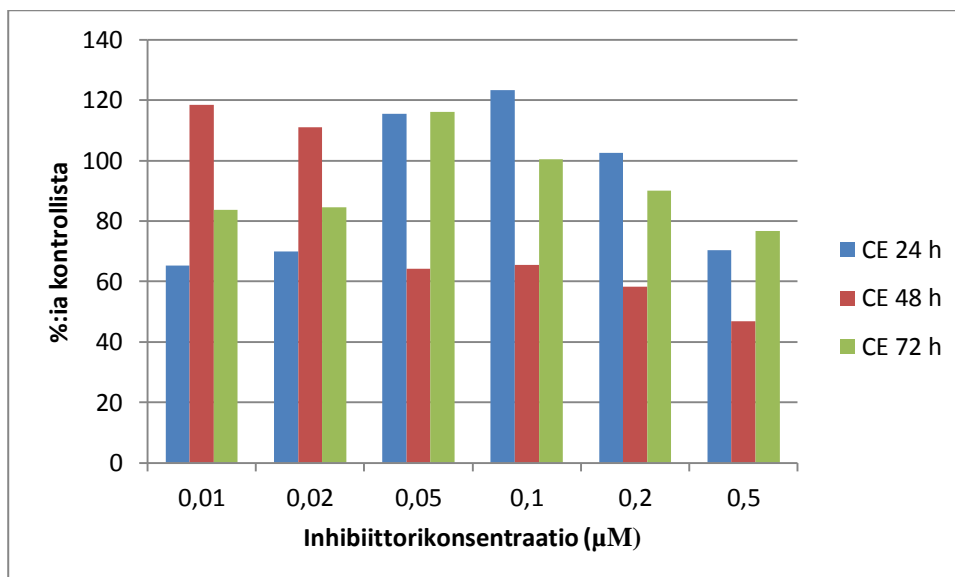
Kuva 9. Scepter™-kokeen suoritus

8.1.2 Scepter™-kokeen tulokset

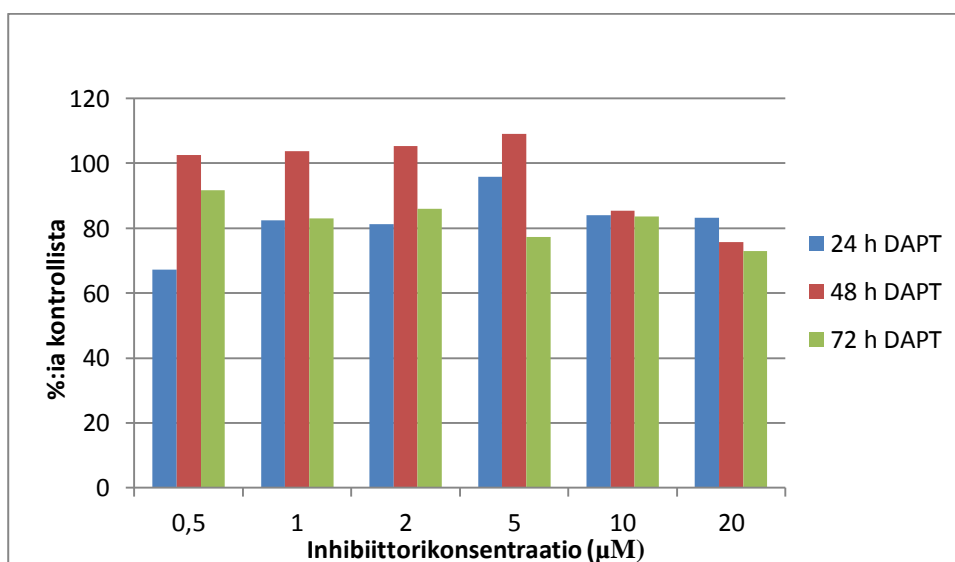
Inhibiittorien vaikutukset mitattiin 24, 48 ja 72 tunnin vaikutusaikojen jälkeen. Scepter™-kokeen tuloksista muodostettiin pylväsdiagrammit. Pylväsdiagrammit (kuviot 1–6) muodostettiin tuloksista, jotka saatiin laskemalla inhibiittorikäsiteltyjen kuoppien solumäärät ja DMSO-käsiteltyjen kuoppien solumäärät. Koska DMSO:n vaikutukset soluihin haluttiin poistaa tuloksista ja tarkastella vain inhibiittorien vaikutuksia, on tuloksista muodostettu prosenttiluku jakamalla inhibiittorikuoppien solumäärä DMSO-kuoppien solumäärällä ja kertomalla 100 %:lla. Tuloksissa 100 % tarkoittaa sitä, että solumäärä on samanlainen kuin kontrollinäytteessä inhibiittorikäsitelystä huolimatta. Yli 100 % tarkoittaa sitä, että soluja on enemmän kuin kontrollinäytteessä, eli inhibiittori ei ole rajoittanut kasvua. Alle 100 % tarkoittaa sitä, että solujen lukumäärä on pienempi kuin kontrollinäytteessä.



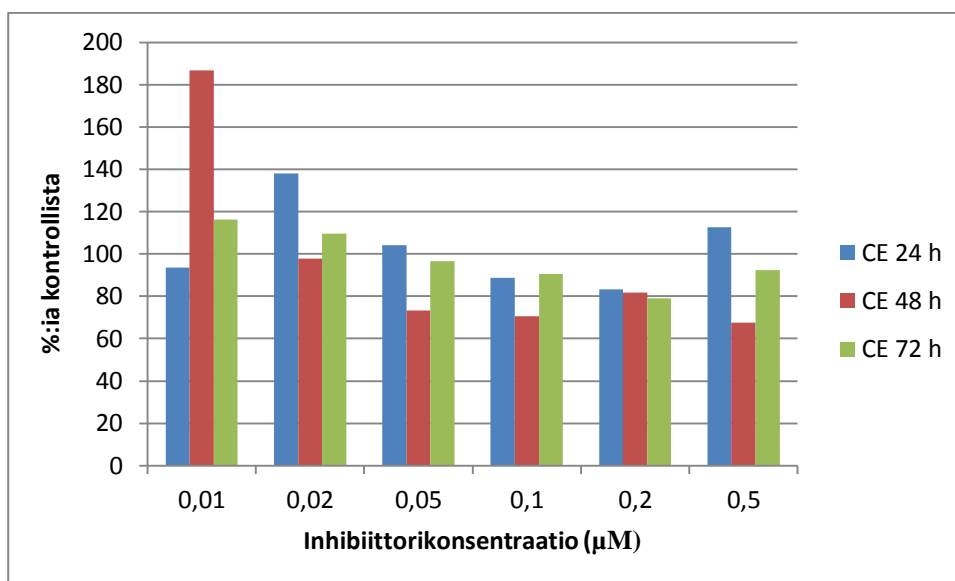
Kuvio 1. DAPT:n vaikutus MCF-7-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h inhibiittorin vaikutusajoilla Scepter™-solulaskijalla mitattuna



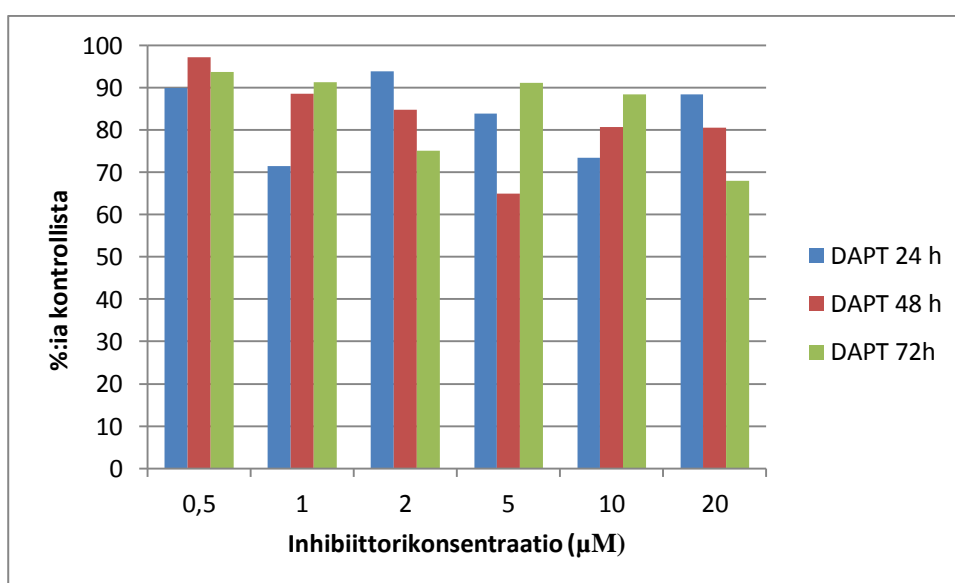
Kuvio 2. CE:n vaikutus MCF-7-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h inhibiittorin vaikutusajoilla Scepter™-solulaskijalla mitattuna



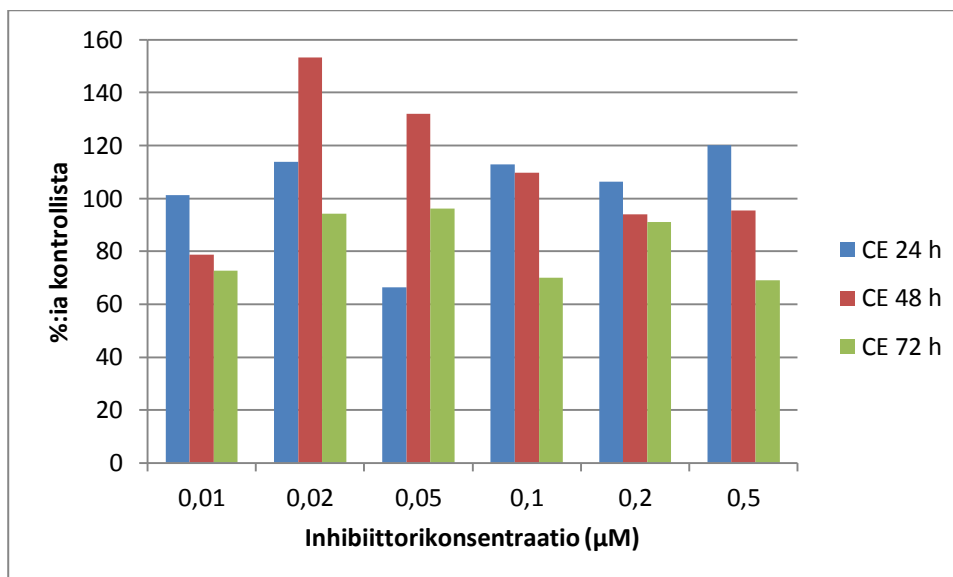
Kuvio 3. DAPT:n vaikutus MCF-12F-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h inhibiittorin vaikutusajoilla Scepter™-solulaskijalla mitattuna



Kuvio 4. CE:n vaikutus MCF-12F-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h inhibiittorin vaikutusajoilla Scepter™-solulaskijalla mitattuna



Kuvio 5. DAPT:n vaikutus MDA-MB-453-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h inhibiittorin vaikutusajoilla Scepter™-solulaskijalla mitattuna



Kuvio 6. CE:n vaikutus MDA-MB-453-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h inhibiittorin vaikutusajoilla Scepter™-solulaskijalla mitattuna

DAPT-inhibiittori hillitsi MCF-7-solujen kasvua kaikilla vaikutusajoilla konsentraatiolla 20 µM (solumäärä oli 56–72 prosenttia pienempi kuin kontrollissa) (Kuvio 1). CE:n vaikutuksissa MCF-7-solujen kasvuun oli hyvin paljon hajontaa. Lupaavin CE-inhibiittorin vaikutusaika näyttäisi olevan 48 tuntia: konsentraatioilla 0,05 µM, 0,1 µM, 0,2 µM ja 0,5 µM näyttäisi olevan solujen kasvua hillitsevää vaikutusta (Kuvio 2). DAPT:n vaikutukset MCF-12F-solujen kasvuun olivat 10–20 µM konsentraatioilla 24, 48 ja 72 tunnin vaikutusajoilla lähes samoja: solujen kasvu väheni 73–84 prosenttiin verrattuna kontrolliin (Kuvio 3). CE vaikutti MCF-12F-solujen kasvuun niin, että CE-konsentraatioilla 0,1 µM, 0,2 µM ja 0,5 µM solumäärä oli 68–92 % kontrollista eri vaikutusajoilla lukuunottamatta 24 tunnin vaikutusaikaa konsentraatiolla 0,5 µM, jolloin solut olivat lisääntyneet inhibiittorista huolimatta (Kuvio 4). DAPT-konsentraatiolla 20 µM 72 tunnin vaikutusajalla MDA-MB-453-solujen määrä oli 68 prosenttia kontrollista (Kuvio 5). CE:n vaikutukset MDA-MB-453-soluihin olivat hyvin vaihtelevia inhibiittorin konsentraatiosta ja vaikutusajasta riippuen (Kuvio 6).

8.2 WST-1-koe

8.2.1 WST-1-kokeen suoritus

WST-1-koe aloitettiin rintasyöpäsolulinjojen MCF-7 ja MDA-MB-453 sekä kontrollisolulinjan MCF-12F kasvatuksella soluviljelypulloissa. Solut irroitettiin soluviljelypulloista kuten Scepter™-kokeessa ja siirrettiin 96-kuoppalevyille (Kuva 10). WST-1-reagenssin valmistajan ja aikaisempien ohjeiden mukaan 96-kuoppalevyille laitettiin MCF-7-soluja 2000 kpl/kuoppa, MCF-12F-soluja 4000 solua/kuoppa ja MDA-MB-453-soluja 10 000 kpl/kuoppa. Haluttu määrä soluja saatiin laskemalla soluviljelypulloista irroitettujen solujen määrä Scepter™-solulaskijalla ja tuloksen mukaan pipetoitiin sopiva tilavuus solususpensiota sekä medium kuopille. Solut oli vaikea saada levittäytymään tasaisesti kuopille, joten teimme ensin solususpension erilliseen koeputkeen, josta pipetoimme jokaiseen kuoppaan 100 µl so-

lensuspensiota. Solususpensio pipetoitiin kuopille B1-G3 ja kuoppalevyn A1-A3 kuopille pipetoitiin mediumia ilman soluja (Taulukko 5). Mediumiin lisätty WST-1-reagenssi aiheuttaa omaa tausta-absorbanssia (0,1–0,2 absorbanssi yksikköä), joten soluttomien mediumkuoppien avulla pystyttiin vähentämään tausta-absorbanssi (blank) pois tuloksista. (Roche Applied Science 2005). Otimme mukaan myös kuopat (B1-B3), joihin laitoimme pelkästään solususpensiota ja WST-1-reagenssia, mutta emme inhibiittoria tai DMSO:a (WO-kuopat). Tällä halusimme testata DMSO:n vaikutuksen (Taulukko 5).

Jokaiselle solulinjalle tehtiin kolme rinnakkaista 96-kuoppalevyä 24, 48, ja 72 tunnin inhibiittorien vaikutusajoille. Jokaiselle inhibiittorille ja kontrollille tehtiin kolme rinnakkaista kuoppaa. WST-1-kokeessa soluja kasvatettiin 96-kuoppalevyillä ensin vuorokausi, minkä aikana solut tarttuivat kuoppien pohjaan. Kuoppalevyinä käytettiin pintakäsiteltyjä kuoppalevyjä (Corning® CellBIND® 96 Well Clear Bottom Polystyrene Microplate). Kuoppalevyn pinta on käsitelty niin, että se edistää solujen kiinnittymistä pohjaan ja luo soluille hyvät kasvuolosuhteet. (Corning 1994–2013.)

96-kuoppalevyjä käytettäessä päätimme tehdä kaikille solulinjoille ja koepäiville omat 96-kuoppalevyt kontaminaatioiden ehkäisemiseksi. Näin yhdelle levyille tuli yksi solulinja yhdelle koepäivälle. Eri päivien (24 h, 48 h, 72 h) saman linjan soluja emme laittaneet samalle 96-kuoppalevyille, koska levyjä kuljetettiin päivän aikana monta kertaa eri tiloihin ELISA-lukijalle. Kuoppalevyjen kuljettaminen eri tiloissa olisi voinut aiheuttaa soluviljelytilojen kontaminaation. Ristikontaminaatiot ehkäistiin laittamalla eri solulinjat eri 96-kuoppalevyille.

Vuorokauden jälkeen kuoppalevyille lisättiin inhibiittoria sisältävää mediumia 100 mikrolitraa. Käytetyt γ -sekretaasin inhibiittorit olivat DAPT, L-685,458 (L-6), CE, joiden annettiin vaikuttaa 24, 48 ja 72 tuntia. Kontrollina vastaavina pitoisuuksina inhibiittorien kanssa käytettiin DMSO:a. (Roche Applied Science 2005.) Inhibiittoripitoisuudet määräytyivät Scepter™-kokeen perusteella ja kontrollikuopat tehtiin pipetoimalla vastaavat tilavuudet DMSO:a. Kuopilla olevat pitoisuudet olivat DMSO 0,2 % ja 0,4 %, DAPT 20 μ M, L-6 20 μ M ja CE 500 nM.

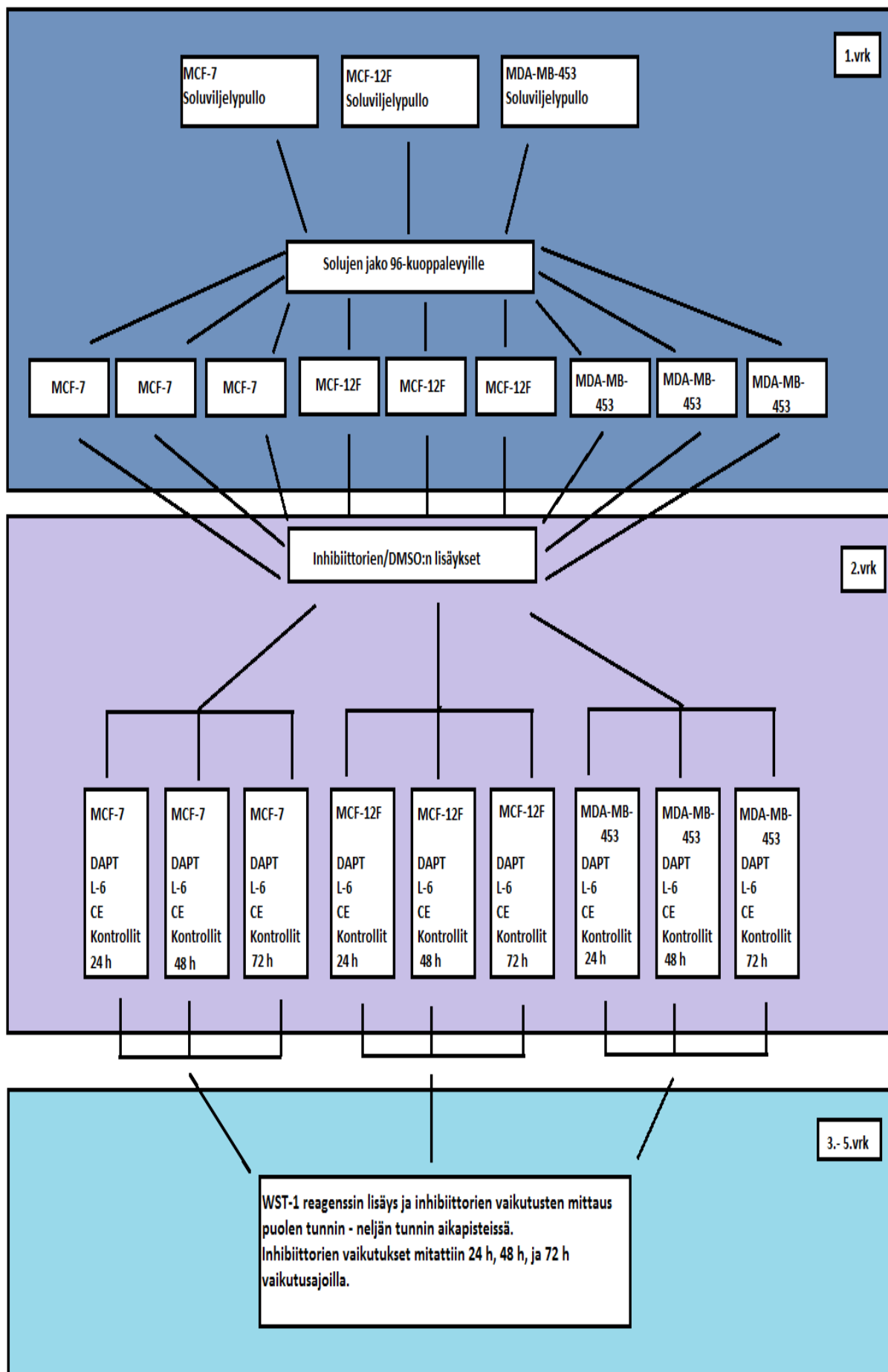


Kuva 10. 96-kuoppalevyt

Taulukko 5. WST-1-kokeen kontrollit ja inhibiittorit 96-kuoppalevyllä

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank									
B	WO	WO	WO									
C	DMSO 0,4 %	DMSO 0,4 %	DMSO 0,4 %									
D	DAPT	DAPT	DAPT									
E	L-6	L-6	L-6									
F	DMSO 0,2 %	DMSO 0,2 %	DMSO 0,2 %									
G	CE	CE	CE									
H												

Kun inhibiittorit olivat vaikuttaneet vuorokauden, mitattiin 24 tunnin aikana saadut vaikutukset. Ennen mittausta jokaisen solulinjan 96-kuoppalevyyn pipetoitiin 20 µl WST-1-reagenssia/ kuoppa, minkä annettiin vaikuttaa tunnista neljään tuntiin. Tämän jälkeen kuoppalevyjä ravisteltiin yhden minuutin ajan. Tulokset luettiin ELISA-lukijalla (Labsystems Multiskan® PLUS, type 314) tunnin, kahden tunnin ja neljän tunnin aikapisteissä aallonpituudella 450 nm, jota käytettiin WST-1-reagenssin absorbanssin mittaamiseen. Vertailuaallonpituutena mittauksissa käytettiin 630 nm. (Roche Applied Science 2005.) Tulokset laskettiin käyttämällä kaavaa (450 nm – 630 nm) - blank. Kuoppalevyjä pidettiin väliajat inkubaattorissa. Tämä toistettiin vielä 48 ja 72 tunnin jälkeen inhibiittorien lisäämistä jäljelle jääneillä 96-kuoppalevyillä. Kuvassa 11 kuvataan koko WST-1-kokeen suoritus.

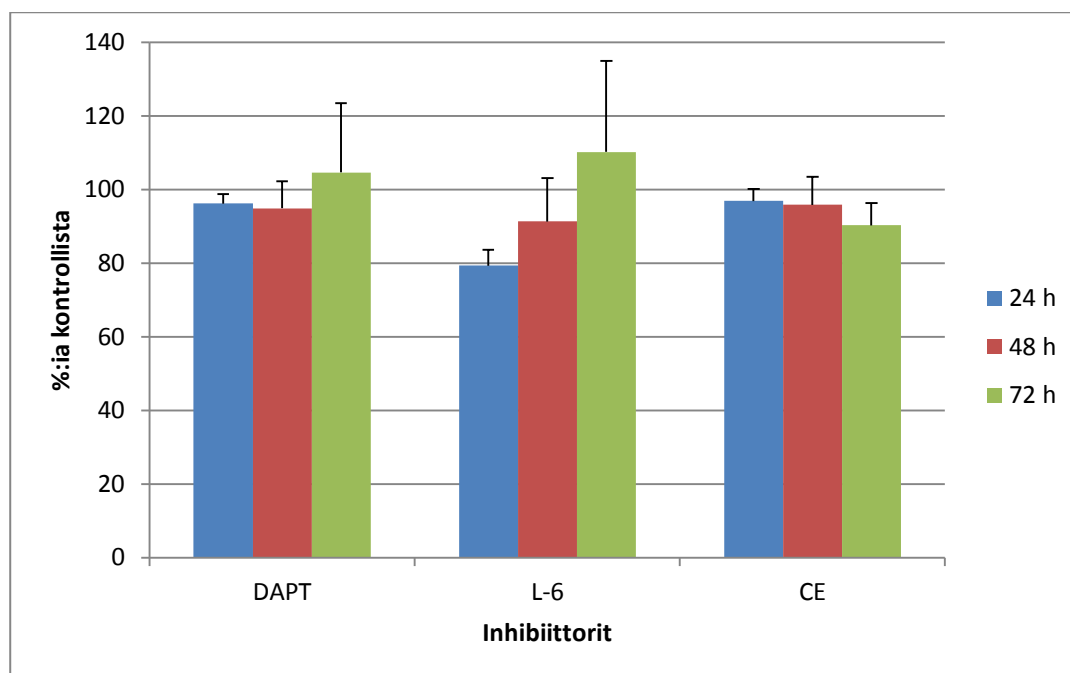


Kuva 11. WST-1 kokeen suoritus

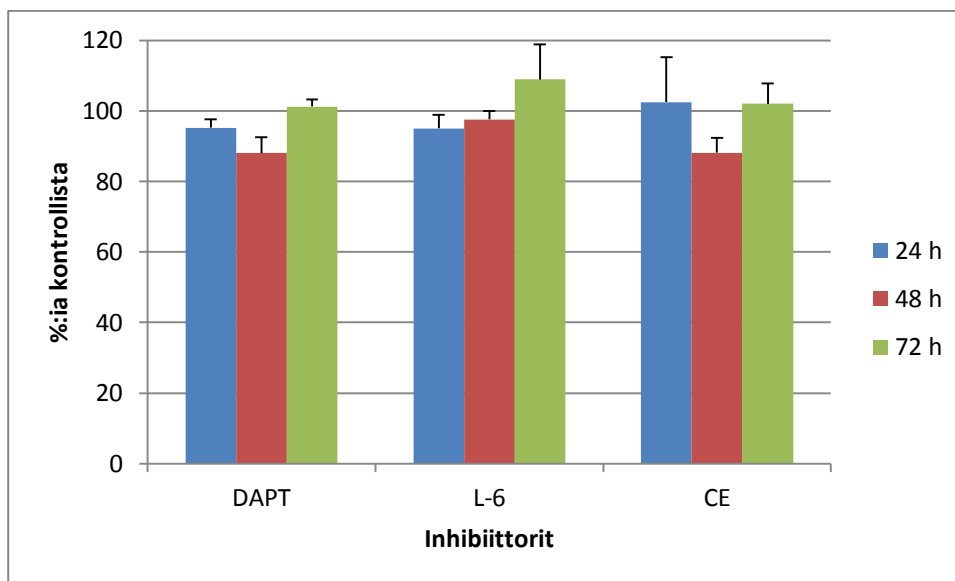
8.2.2 WST-1-kokeen tulokset

WST-1-kokeen tulokset saatiin mittaamalla inhibiittorien vaikutukset 24, 48 ja 72 tunnin inhibiittorien vaikutusaikojen jälkeen. WST-1-reagenssin lisäämisen jälkeen inhibiittorikäsiteltyjen ja DMSO:lla käsiteltyjen kuoppien absorbanssit mitattiin ELISA-lukijalla tunnin, kahden tunnin ja neljän tunnin aikapisteissä. Absorbanssit olivat korkeimmillaan neljän tunnin WST-1-käsittelyn jälkeen joten neljän tunnin aikapisteissä mitatuista absorbansseista muodostettiin pylväsdiagrammit. Kustakin solulinjasta ja inhibiittorista sekä inhibiittorin vaikutusajasta teimme kolme rinnakkaista mittausta. Näistä tuloksista laskimme keskiarvon. Koska DMSO:n vaikutukset solujen lisääntymiseen haluttiin poistaa tuloksista ja tarkastella vain inhibiittorien vaikutuksia on tuloksista muodostettu prosenttiluku jakamalla inhibiittorikuoppien absorbanssien keskiarvo DMSO-kuoppien absorbanssien keskiarvolla ja kertomalla 100 %:lla (merkitty %:ia kontrollista kuvioihin 7–9). Tuloksissa 100 % tarkoittaa sitä, että solumäärä on sama kuin kontrollinäytteessä inhibiittorikäsitteystä huolimatta. Yli 100 % tarkoittaa sitä, että soluja on enemmän kuin kontrollinäytteessä, eli inhibiittori ei ole rajoittanut kasvua. Alle 100 % tarkoittaa sitä, että solujen lukumäärä on vähentynyt verrattuna kontrolliin inhibiittorin vaikutuksesta.

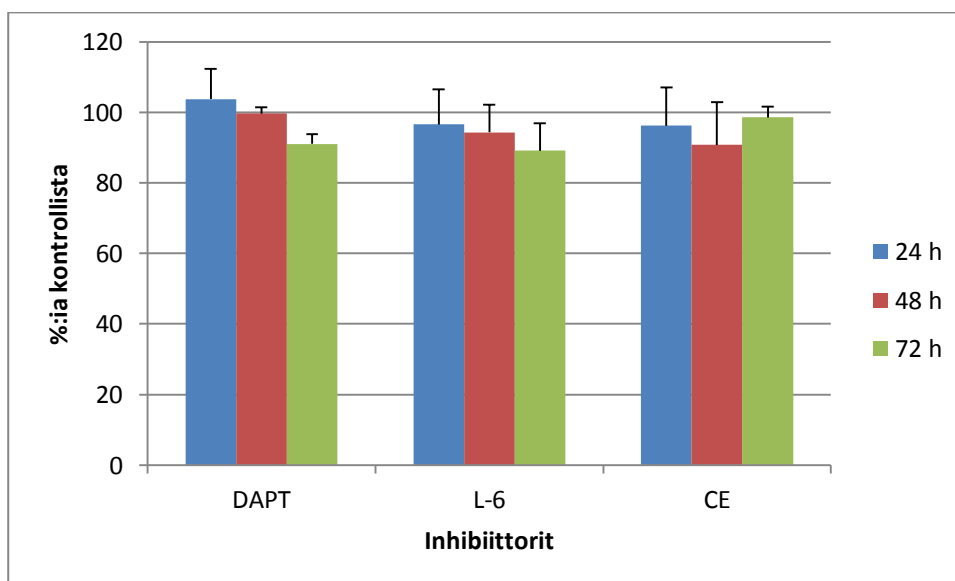
Koska tuloksissa on aina hajontaa, laskimme myös virherajat (virhepalkit), mitkä edustavat hajonnan jakaumaa. Virherajat antavat tietoa siitä, kuinka tarkka mittaus on ja mikä on tuloksen todellinen vaihteluväli. (NC State University 2004.)



Kuvio 7. Inhibiittorien vaikutukset MCF-7-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h vaikutusajoilla WST-1-reagenssilla mitattuna



Kuvio 8. Inhibiittorien vaikutukset MCF-12F-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h vaikutusajoilla WST-1-reagenssilla mitattuna



Kuvio 9. Inhibiittorien vaikutukset MDA-MB-453-solujen kasvuun 24 h, 48 h ja 72 h vaikutusajoilla WST-1-reagenssilla mitattuna

Analysoimme WST-1 tulokset käyttämällä IBM® SPSS® Statistics -ohjelmaa. Eri tavoin käsitellyistä kuopista saatuja absorbanssiarvoja verrattiin keskenään (two-tailed Student's t-test for independent samples). Tilastollisesti merkitseväenä pidettiin p-arvoja alle 0,05. Pelkkä DMSO-käsittely ei näyttänyt vaikuttavan solujen kasvuun, koska verrattaessa WO- ja DMSO-kuoppia ei saatu tilastollisesti merkitseviä eroja. Vertasimme näitä kuoppia, koska halusimme tietää vaikuttaako DMSO yksin solujen kasvua hidastavasti. MCF-7-solujen 24 tunnin L-6-inhibiittorin vaikutusajan mittaustulos oli lähellä merkitsevää, mutta häviää pidempiaikaisissa käsittelyissä. MCF-12F-solujen kasvuun 48 tunnin vaikutusajalla CE-inhibiittorilla oli merkitsevä vaikutus ($p < 0,01$). Myös DAPT:n vaikutus oli lähellä mer-

kitsevää. Pidemmällä käsittelyllä vaikutukset jälleen katosivat. MDA-MB-453-solujen kasvuun 72 tunnin vaikutusajalla DAPT-inhibiittorilla oli merkitsevä vaikutus ($p < 0,05$).

9 POHDINTA

9.1 Scepter™ tulosten pohdinta

Hypoteesina oli, että inhibiittorit vähentävät rintasyöpäsolujen proliferaatiota ja viabiliteettiä. Scepter™-kokeessa käytettiin kuutta eri inhibiittorien konsentraatiota ja kolmea eri vaikutusaikaa, jotta löydettäisiin rintasyöpäsolujen kasvuun parhaiten vaikuttava konsentraatio ja vaikutusaika. Tämän kokeen perusteella ei voi kuitenkaan tehdä selviä johtopäätöksiä tuloksista, koska Scepter™-menetelmän työläydestä johtuen, mittauksia ei tehty tieteellisen tutkimuksen kriteereiden vaatimaa kolmea rinnakkaista mittausta. Mittaukset tehtiin yhdesti käyttäen kolmea eri inhibiittorin vaikutusaikaa kullakin solulinjalla. Scepter™-kokeen suorittamiseen kului kolme viikkoa. Menetelmä oli työläs, koska yhden viikon työajan puitteissa pipetoiitiin 12 kappaletta 6-kuoppalevyjä (kolmelle solulinjalle kullekin neljä 6-kuoppalevyä DAPT ja kontrolli sekä CE ja kontrolli) ja laskettiin eri solulinjojen solut joko 24, 48 tai 72 tunnin inhibiittorin vaikutusajan jälkeen. Koska eri vaikutusaikoja oli kolme, täytyi viikon kestävä koe suorittaa kolme kertaa, jotta saatiin tulokset kaikille solulinjoille kaikilla inhibiittorin vaikutusajoilla. Koska kolmea rinnakkaista mittausta ei ehditty suorittamaan, emme saaneet laskettua virherajoja (virhepalkit, error bars) mitkä olisivat antaneet lisäinformaatiota tulosten hajonnasta ja luotettavuudesta ilmaisten graafisesti potentiaaliset virhemahdollisuudet (NC State University 2004).

Tällä menetelmällä saimme hyvin alustavat tulokset γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksista käyttämiimme solulinjoihin. Tuloksissa oli paljon vaihtelua, eikä selvää vastausta inhibiittorien vaikutuksista saatu millään solulinjalla. Tämän takia solujen laskemista Scepter™-solulaskijalla ja tätä koetta tulisi toistaa riittävän monta kertaa. Mikään yksittäinen mittaus laboratorioissa ei ole täydellisen tarkka, vaan luotettavuuden lisäämiseksi mittauksia tulee toistaa riittävän monta kertaa. Riittävän monesta mittauksesta saa muodostettua keskiarvon ja laskettua keskiarvon hajonnan. (NC State University 2004).

Menetelmän ongelmana oli hankaluus saada soluja yksisolususpensioksi, jolloin tulokset olivat epäluotettavia, koska Scepter™-solulaskija ei pysty laskemaan soluryppäitä. Menetelminä yksisolususpension saamiseksi olisi voitu käyttää esimerkiksi erilaisia suodattimia. Solujen irroitus oli hankalaa, solulinja MCF-12F irtosi huonosti ja osa soluista jäi kuoppiin kiinni pitkästä trypsiinin vaikutusajasta (15 min.) huolimatta. Pitkä trypsiini-inkubaatio myös saattoi vaikuttaa solujen elinkykyyn, lisäten mahdollisesti solujen hajoamista, mikä saattoi näkyä omana solupopulaationa Scepter™-histogrammeissa. DMSO:a käytettiin inhibiittoreiden laimennoksiin. DMSO on solumyrkky, joten sen pitoisuus pyrittiin pitämään mahdollisimman pienenä. DMSO:n vaikutusta soluihin mitattiin ja sen vaikutus poistettiin laskennallisesti lopullisista tuloksista.

Jatkossa vaikutukset tulisi mitata vähintään kolme kertaa samalla tavalla, jolloin tuloksia voitaisiin pitää luotettavina ja muun muassa pipetointivirheet minimoida. (Metsämuuronen 2005, 9.) Lisäksi tulisi kiinnittää huomiota solujen irrotukseen alustastaan sekä solujen saamiseen yksisolususpensioksi.

Näiden tulosten perusteella valitsimme lupaavimmat inhibiittorien konsentraatiot WST-1-mittaukseen.

DAPT inhibiittorilla näytti olevan MCF-7-solujen kasvuun konsentraatiolla 20 μ M kasvua hillitsevää vaikutusta kaikilla vaikutusajoilla, koska solumäärä oli pienempi kuin kontrollissa. Muissa DAPT:n vaikutuksissa MCF-7-soluihin oli epäloogista vaihtelua eri vaikutusaikojen välillä (kuvio 1). Joillakin solulinjoilla 48 tunnin vaikutusajalla näyttäisi olevan solujen kasvua hillitsevää vaikutusta (esimerkiksi kuvio 2). Tällöin voisi ajatella, että 24 tunnin vaikutusaika ei ole vielä riittävän pitkä aika solujen kasvun rajoittamiseen ja 72 tunnissa inhibiittorin vaikutus on jo loppunut. Koetta voisi jatkaa vaihtamalla medium ja lisäämällä uudestaan inhibiittorit 48 ja 72 tunnin jälkeen ja katsoa onko sillä solujen kasvua hillitsevää vaikutusta. Selkeää eroa rintasyöpäsolujen ja kontrollisoluihin käytetyn MCF-12F-solulinjan välillä ei ollut havaittavissa (Kuviot 1–6).

9.2 WST-1 tulosten pohdinta

WST-1-kokeella saadut tilastollisesti merkitsevät tulokset olivat yksittäisiä. Tarvitaan jatkotutkimuksia, jotta nuo muutamat merkitsevyydet varmistuisivat. Lisäksi voisi kokeilla muita inhibiittorikonsentraatioita ja mahdollisesti myös pidempiä käsittelyaikoja. Rintasyöpäsolujen ja kontrollisoluihin käytetyn MCF-12F-solulinjan välillä ei ollut havaittavissa selkeää eroa.

Ongelmana WST-1-kokeessa oli MDA-MB-453-solujen irtoaminen mediumin vaihdon yhteydessä, jolloin mahdollisesti osa soluista irtosi imettäessä mediumia pois, joten tulimme siihen tulokseen, ettei imua kannata käyttää tässä kokeessa. Luotettavamman tuloksen saamiseksi uusimme kokeen niin, että emme vaihtaneet mediumia inhibiittorien lisäyksen yhteydessä. Ensin mittasimme absorbanssi-arvot puolen tunnin – neljän tunnin WST-1-reagenssin lisäämisen jälkeen. Jätimme myös puolen tunnin inkubointiajan pois, koska siinä ajassa WST-1-reagenssi ei ollut ehtinyt toimia kunnolla.

9.3 Ammatillinen kasvu

Tämän opinnäytetyön tekeminen lisäsi ammatillista kasvuamme. Bioanalytiikan ammattitaidon muodostaa kliinisen laboratoriotieteen ja muiden siihen liittyvien tieteenalojen teoreettisen tiedon soveltaminen käytäntöön. Ammattipätevyyttä voi osoittaa hallitsemalla laboratoriotutkimusprosessin. Laboratoriotutkimusprosessin toteutuksessa tarvitaan muun muassa asiakaspalvelu-, tiedonhankinta-, viestintä- ja kielitaitoa sekä työturvallisuus- ja menetelmäosaamista. Laboratoriotutkimusprosessiin kuuluu preanalyttisen, analyttisen ja postanalyttisen vaiheen osaaminen, laatuosaaminen, opetus- ja ohjausosaaminen sekä tutkimus- ja kehittämistyö ja johtaminen. Tutkimustyössä preanalyttisistä osaamista vaaditaan muun muassa tutkimusympäristön ja laitteiden käyttöön liittyvässä valmistelutyössä. (Opetusministeriö 2006, 22–25.) Opinnäytetyötä tehdessä ammatillinen osaamisemme kehittyi kokeiden järjestelyiden suunnittelussa ja valmistelutöissä. Suunnitteluvaiheeseen kuului muun muassa ajankäytön suunnittelu. Ennen kokeiden suorittamista tilat, välineet ja reagenssit piti valmistella koetta varten ja niiden riittävydestä huolehtia.

Analyttisessä vaiheessa bioanalytikolta vaaditaan analyysimenetelmien hallintaa, laitteiden tuntemusta ja teknistä osaamista (Opetusministeriö 2006, 22–25). Opinnäytetyötä tehdessämme opimme uusia analyysimenetelmiä kuten solujen proliferaation ja viabiliteetin tutkimista käyttämällä Scepter™-solulaskijaa ja WST-1-reagenssia. Syvensimme aiempaa osaamistamme soluviljelystä. Post-analyttisen vaiheen osaamisvaatimukseen kuuluu muun muassa tulosten luotettavuuden kriittinen arviointi, tulosten selkeä raportointi sekä ongelmanratkaisukyky (Opetusministeriö 2006, 22–25). Näitä kaikkia taitoja opimme opinnäytetyötä tehdessämme. Microsoft® Excel sovelluksen käyttäminen tuli lisää harjaannusta muun muassa taulukoiden ja diagrammien tekemisen myötä.

Bioanalyttikon laatuosaamiseen kuuluu laboratorion laatujärjestelmän ymmärtäminen työyhteisöä ohjaavana tekijänä sekä toimiminen laatukäsikirjan mukaisesti. Bioanalyttikon pitää ymmärtää sisäisen ja ulkoisen laaduntarkkailun menetelmät. Lisäksi osaamisvaatimuksia ovat laboratoriotutkimusprosessin hallitseminen sekä tulosten luotettavuuden arvioiminen. (Opetusministeriö 2006, 22–25.) Kliinisen lääketieteen yksikkö on sitoutunut noudattamaan Itä-Suomen yliopiston ja Terveystieteiden tiedekunnan laatu politiikkaa ja tavoitteita, mitkä kuuluvat yliopiston laadunhallintajärjestelmään. Kliinisen lääketieteen yksikkö osallistuu sisäisiin ja ulkoisiin laadunarviointeihin, korkeakoulujen arviointineuvoston (KKA) arviointeihin sekä muihin kansallisiin ja kansainvälisiin arviointeihin. (Jääskeläinen, Nyman ja Tirkkonen 2010.) Opinnäytetyöprosessin aikana laatu näkökulmat piti ottaa huomioon jokaisessa työvaiheessa. Työn tekeminen alkoi tiedonhaulla, tiedonlähteiksi valitsimme PubMed hakupalvelun kautta löytyneitä tieteellisiä artikkeleita, jotka olivat mahdollisimman uusia. Tiedon oikeellisuutta arvioimme artikkelien julkaisulehden arvostuksen perusteella. Käytännöntyön osuudessa toimimme soluviljelylaboratoriossa annettujen ohjeiden mukaan aseptisesti. Aseptiikka on tärkeä osa laatua etenkin soluviljelytiloissa, koska tilojen kontaminoiminen aiheuttaisi suuren haitan tutkimustyölle. Laboratoriotutkimusprosessin hallintataitomme kehittyi, koska suunnittelimme kokeiden suorittamisen opinnäytetyötämme ohjaavan tutkijan kanssa alusta loppuun asti. Laadunarviointia teimme myös tulosten tarkastelussa.

Bioanalyttikoiden ammatillisiin osaamisvaatimukseen kuuluvat tutkimus-, kehittämis- ja johtamistyön osalta muun muassa oman ammattitaidon kehittäminen, terveysalan ja ammatinharjoittamista koskevan lainsäädännön sekä eettisten periaatteiden mukaan toimiminen. Osaamisvaatimukseen kuuluu myös tutkimus- ja kehittämistoimintaan osallistuminen, näyttöön perustuvien tutkimusten hyödyntäminen, tiimi- ja projektityöskentelyyn osallistuminen, työ- ja toimintaohjeiden kehittäminen sekä muun muassa validointeihin osallistuminen. Lisäksi bioanalyttikon tulee osata ajatella kustannustehokkuutta työssään. (Opetusministeriö 2006, 22–25.) Opinnäytetyötä tehdessämme oma ammattitaitomme kehittyi kokoajan tiedonhaun ja menetelmien opettelun myötä. Opinnäytetyöprosessi sisälsi jatkuvaa tiedonhakua lähinnä tieteellisistä artikkeleista. Oppimisprosessimme alkoi uuteen aiheeseen, γ -sekretaasin inhibiittoreihin, perehtymisellä ja syveni kokoajan asiaan paneutumisen myötä. Artikkelit olivat englanninkielisiä, joten opinnäytetyöhömme liittyviä asioita opiskellessa kehittyi samalla englanninkielen taito. Työssä käytetyt menetelmät olivat myös osittain uusia, mutta vähitellen niiden käytön oppi ja menetelmiä ja omia työtapojaan pystyi kehittämään.

9.4 Opinnäytetyön tutkimustehtävien, tarkoitusten ja tavoitteiden arviointi

Tämän opinnäytetyön tutkimustehtävinä oli ylläpitää MCF-7, MCF-12F ja MDA-MB-453-solulinjoja. Solulinjoja ylläpidettiin kokeiden ajan ja ne jäivät kasvamaan yliopiston tutkimusyksikön soluviljelytiloihin. Kokeiden suorittamiseksi kuoppalevyille siirrettyihin soluihin lisättiin γ -sekretaasin inhibiittoreita. Solujen proliferaation ja viabiliteetin tarkasteluun käytettiin WST-1-reagenssia ja ELISA-lukijaa ja soluja laskettiin ScepterTM-solulaskijalla. Inhibiittorien vaikutuksista soluihin muodostettiin pylväsdiagrammit (Kuviot 1–9), joiden perusteella inhibiittoreiden vaikutusta syöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin eli solujen lukumäärän kasvuun ja elinkykyyn analysoitiin. Tässä opinnäytetyössä on kuvattuna keskeiset laboratoriomenetelmät, joiden avulla solulinjoja kasvatetaan ja inhibiittoreiden vaikutuksia tarkastellaan.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kokeellisesti todeta, vaikuttaako γ -sekretaasin toiminnan inhiboiminen käytössämme olevilla inhibiittoreilla (DAPT, L-6 ja CE) rintasyöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin. Opinnäytetyömme tarkoituksena oli kokeilla kahta eri menetelmää γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutusten selvittämiseksi ja raportoida laboratoriotutkimusprosessin työosuus eli kertoa menetelmistä työn toteutuksessa sekä esittää tulokset pylväsdiagrammeina.

Tämän opinnäytetyön kokeellinen osuus toteutettiin noin kuusi viikkoa kestäväenä projektina yliopiston tutkimusryhmän tiloissa. Työtä tehdessä havainnoimme menetelmien ongelmia ja kehitimme niiden pohjalta menetelmiä ja työtapoja paremmiksi. Kuuden viikon aikana saimme menetelmistä alustavat tulokset, mutta lopulliseen menetelmien arviointiin ja luotettavien tulosten saamiseen aika ei ollut riittävä. Raportoimme tähän työhön tulokset, tehdyt laboratoriotyöt sekä menetelmien ongelmat. ScepterTM-kokeen perusteella emme saaneet vastattua kysymykseen, vaikuttaako γ -sekretaasin toiminnan inhiboiminen käytössämme olevilla inhibiittoreilla (DAPT, L-6 ja CE) syöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin. WST-1-kokeen perusteella saimme muutamia merkitseviä tuloksia mitattaessa inhibiittorien vaikutusta syöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin.

Opinnäytetyömme tavoitteena oli saamiemme tulosten avulla lisätä tietoa γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksista syöpäsoluihin. Tavoitteena oli lisätä omaa ammatillista kasvuamme ja oppimistamme tässä työssä käsitellyistä aiheista sekä tarjota tietoa muille asiasta kiinnostuneille opiskelijoille. Opinnäytetyömme oli pieni kokeellinen osa yliopiston laajaa rintasyöpätutkimusta. Opinnäytetyömme toimeksiantaja oli Itä-Suomen yliopisto, Terveystieteiden tiedekunta, Lääketieteen laitos, Kliinisen lääketieteen yksikkö, Kliinisen patologian ja oikeuslääketieteen oppiaine. Opinnäytetyömme tavoitteena oli olla tälle tutkimukselle hyödyksi ja tarjota jatkotutkimusmahdollisuuksia työmme tuloksista.

Tämän opinnäytetyön tulokset lisäsivät tietoa γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksista syöpäsoluihin sillä perusteella, että WST-1-kokeen tuloksena saatiin muutamia merkitseviä inhibiittorien vaikutuksia. Opinnäytetyön tekeminen lisäsi ammatillista kasvuamme. Tähän tavoitteeseen pääsimme niin teorian tiedon, kuin menetelmien oppimisen osalta. Lisäksi tutustuimme yliopistoilla tapahtuvaan tutkimustyöhön ja tutkimusryhmään ollen osa tiimiä. Tähän opinnäytetyöhön keräsimme paljon tietoa

sellaisista aiheista, mitä ei opetussuunnitelman mukaisilla kursseilla opeteta. Asiasta kiinnostuneet opiskelijat saavat siis tämän työn kautta helposti luettavaa, suomenkielistä tekstiä aiheesta.

Opinnäytetyömme tavoitteena oli olla Itä-Suomen yliopiston tutkimusryhmän rintasyöpätutkimukselle hyödyksi ja tarjota jatkotutkimusmahdollisuuksia työmme tuloksista. Tämän työn perusteella tutkimusryhmä voi suunnitella omia jatkotutkimuksia aiheesta. Tässä opinnäytetyössä kuvattiin myös havaitsemamme menetelmien ongelmat, jotta ne voidaan jatkotutkimuksissa välttää ja kehittää menetelmiä toimivimmiksi.

9.5 Tulosten luotettavuus

Opinnäytetyömme oli kvantitatiivinen eli määrällinen tutkimus. Kvantitatiivisen tutkimuksen avulla selvitetään syy-seuraussuhteita. Tutkimus vastaa kysymyksiin Mikä? Missä? Paljonko? Kuinka usein? Tutkimuksessa asioita kuvataan numeeristen suureiden avulla. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa käsitellään lukumääriä ja prosentiosuuksia, tuloksia voidaan havainnollistaa taulukoiden tai kuvioiden avulla. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa keskeistä on muun muassa aiempien teorioiden ja tutkimusten huomiointi, hypoteesin esittäminen, koejärjestelyiden suunnittelu, aineiston muuntaminen tilastollisesti käsiteltävään muotoon ja tilastollinen analysointi. (Heikkilä 2010, 16–17; Hirsjärvi, Remes ja Sajavaara 2004, 130–131.)

Kokeellisen tutkimuksen avulla etsitään kvantitatiivisen tutkimuksen syy-seuraussuhteita, mitä monilla tieteellisillä tutkimuksilla pyritään selvittämään. Lääketieteessä lähes kaikki uudet lääkehoidot tai hoitomenetelmät testataan kokeellisen tutkimuksen menetelmin. Kokeellisin keinoin saatua informaatiota arvostetaan luotettavimmaksi mahdolliseksi tiedoksi systemoidun kirjallisuuskatsauksen kannalta, varsinkin silloin kun halutaan tehdä mahdollisimman aukottomia päätelmiä tai saada tietoa syy-seuraussuhteesta. (Metsämuuronen 2005, 6–7, 9.) Opinnäytetyössämme halusimme tietoa γ -sekretaasin inhibiittorien vaikutuksesta rintasyöpäsolujen proliferaatioon ja viabiliteettiin. Hypoteesina oli, että γ -sekretaasin inhibiittorit vähentävät syöpäsolujen proliferaatiota ja viabiliteettiä. Opinnäytetyömme oli myös kahden eri proliferaatiota ja viabiliteettiä mittaavan menetelmän testaamista. Tämän työn tuloksena oli se, että γ -sekretaasin inhibiittorit vähentävät syöpäsolujen proliferaatiota ja viabiliteettiä osalla solulinjoista tietyillä konsentraatioilla ja inhibiittorin vaikutusajoilla. Aina inhibiittoreilla ei kuitenkaan ollut odotettua vaikutusta. Scepter™- ja WST-1-menetelmä vaikuttivat kuitenkin hyviltä menetelmiltä proliferaation ja viabiliteetin mittaamiseen.

Kokeellisissa tutkimuksissa on tarkoitus kontrolloida vaihtelua niin, että tulos on mahdollisimman luotettava ja virheellisen johtopäätöksen riski voidaan minimoida. Kokeellisen asetelman tuloksen syynä tulisi olla tekijä, minkä vaikutusta olemme mitanneet, eli riippumaton muuttuja. Tuloksia tulkitessa pitää kuitenkin myös kysyä, olisiko joku muu tekijä voinut saada aikaan mitatun vaikutuksen. Tutkimuksen pätevyyttä, eli validiteettiä uhkaavia tekijöitä ovat muun muassa aikaan ja mittaukseen liittyvät tekijät. Aikaan liittyvä uhka on koeasetelmaan kahden mittauksen välillä tapahtuvat asiat, joilla on vaikutusta tulokseen. (Metsämuuronen 2005, 12.) WST-1-kokeessa mittaukset tehtiin

kolmena rinnakkaisena yhtä aikaa, jolloin ajan vaikutus tuloksiin saatiin minimoitua. Solut kasvavat, kypsyvät ja kuolevat ajan vaikutuksesta. Luonnollinen solusykli otettiin huomioon tuloksissa mittamalla myös kontrollisolut, joille ei inhibiittorikäsittelyä tehty. Mittaukseen liittyviä uhkia ovat muun muassa mittarin muuttuminen sekä tutkijan odotukset ja toiminta (Metsämuuronen 2005, 12–13). Mittarin muuttumisen uhat ehkäistiin suorittamalla mittaukset aina samalla tavalla sekä huolellisesti työskentelemällä.

Tutkimuksen reliabiliteettiä ja validiteettiä pitää arvioida. Reliabiliteetti eli mittaustulosten toistettavuus, ilmaisee miten luotettava mittaus- tai tutkimusmenetelmä on. Reliabiliteetti kertoo mittauksen kyvystä antaa ei-sattumanvaraisia tuloksia. Silloin kun tutkimusasetelma ja mittari säilyvät kokeen ajan samanlaisina, ei tuloksissakaan pitäisi olla suurta vaihtelua. (Hirsjärvi, Remes ja Sajavaara 2007, 226–227.) Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa toistimme mittaukset aina samalla tavalla, käytimme samoja reagensseja, laitteita ja mittareita. Mittauksissa käytetyt laitteet olivat kalibroituja ja huollettuja. Kokeellisen osuuden pitäisi olla toistettavissa niin, että toistetun kokeen tulokset vastaavat edellisiä.

Validiteetti tarkoittaa mittausmenetelmän tai tutkimuksen kykyä mitata sitä mitä halutaan selvittää eli validiteetti on hyvä silloin kun tutkimuksen kohderyhmä sekä kysymykset ovat oikeat. Validiteetti voidaan arvioida monesta eri näkökulmasta. Näkökulmia ovat muun muassa ennustevalidius, tutkimusasetelmavaliudius ja rakennevalidius. (Hirsjärvi, Remes ja Sajavaara 2007, 226–227.) Opinnäytetyömme tutkimustuloksia ja tutkimuksen tekovaiheita olemme käsitelleet kriittisesti muun muassa arvioimalla voivatko tulokset olla mahdollisia ja miettimällä tuloksiin vaikuttavia tekijöitä. Olemme vaihtaneet koeasetelmia ja –tapoja tarvittaessa epäillessämme virhettä tuloksissa sekä raportoineet huomaamamme ongelmakohdat tutkimuksen edetessä. Ennen kokeen suoritusta valitsimme mittausmenetelmät yhdessä tutkijan kanssa niin, että menetelmät mittasivat haluttua asiaa. Tämän opinnäytetyön teoreettinen tieto on hankittu mahdollisimman uusista lähteistä ja teorian tiedossa on keskitytty kiinteästi kokeelliseen osuuteen liittyvään aineistoon niin, että teorian tieto palvelee kokeellisen osuuden ja mittaustulosten ymmärtämistä.

Tämän opinnäytetyön reliabiliteettiä ja validiteettiä voisi parantaa toistamalla mittaukset riittävän monta kertaa, mittaamalla tulokset mahdollisesti myös muilla menetelmillä ja käyttämällä mahdollisesti korkeampia inhibiittorien konsentraatioita. Scepter™-kokeen mittausmenetelmän luotettavuutta alentaa saatujen tulosten hajonta, joka selittyy osittain mittauksien vähäisestä määrästä. Mittauksia ei voitu tehdä menetelmän työläydestä johtuen enempää kuin yksi kullekin solulinjalle ja inhibiittorin vaikutusajalle. Näin ollen Scepter™-koe voidaan luokitella esikokeelliseksi tutkimukseksi, koetta voidaan pitää kokeellisista tutkimuksista heikoimpana asetelmana. Esikokeen tuloksista on riski tehdä vääriä tai puutteellisia johtopäätöksiä. WST-1-koe tehtiin kolmena rinnakkaisena tutkimuksena. Kolmen tapauksen perusteella pystytään tekemään kliinisesti merkittäviä päätelmiä (Metsämuuronen 2005, 7–9).

9.6 Eettisyys

Tutkimuseettinen neuvottelukunta on antanut tutkimuseettiset ohjeet tutkimushankkeissa työskenteleville. Ohjeiden mukaan tutkimushankkeissa työskentelevien tulee noudattaa hyvää tieteellistä käytäntöä sekä voimassaolevaa lainsäädäntöä. Hyvä tieteellinen käytäntö edellyttää kriittisen tiedon hankinnan, muiden tutkijoiden työn ja tutkimusten huomioimisen sekä tutkimuksen huolellisen suunnittelun. Tutkimusmenetelmien tulee olla eettisesti kestäviä. Tutkimustyössä pitää noudattaa rehellisyyttä, tutkimuksen tulee olla huolellista ja tarkkaa. Hyvä tieteellinen käytäntö takaa tieteellisen hyväksyttävyyden ja tulosten luotettavuuden. (Suomen Akatemia 2003, 5–6.)

Eettisyys tutkimuksessa on tieteellisen toiminnan ydin. Tulosten raportoinnissa pitää noudattaa eettisiä periaatteita. Tutkimustulokset raportoidaan yksityiskohtaisesti ja tulosten julkaisussa noudatetaan tieteellistä avoimuutta. Epäeettistä käyttäytymistä on myös plagiointi, tekaistujen tulosten esittäminen, puutteellinen raportointi sekä toisten tutkijoiden tulosten vähättely. (Kankkunen ja Vehviläinen-Julkunen 2013, 224–225.)

Opinnäytetyömme toimeksiantaneella yliopiston tutkimusryhmällä on Tutkimuseettisen toimikunnan myöntämä lupa rintasyöpätutkimukseen. Toimimme tämän luvan alaisuudessa opinnäytetyötä tehdessämme. Opinnäytetyössämme on noudatettu eettisiä periaatteita. Raportointi tehtiin etsimällä mahdollisimman ajantasaista tietoa luotettavina pidettävistä lähteistä, kuten tieteellisistä artikkeleista ja alan kirjoista sekä käyttämällä lähdeviitteitä. Kokeellinen osuus oli huolellisesti suunniteltu niin, että materiaaleja ja aikaa ei turhaan kulutettu. Kokeellinen osuus dokumentointiin huolellisesti ja tarkasti niin, että kokeet ovat tarvittaessa toistettavissa ja raportointia varten oleelliset asiat tarkistettavissa. Dokumentoinnin avulla tutkimusryhmä pystyy myös jatkamaan koetta. Tulokset esitettiin sellaisina kuin ne saatiin, vääristelemättä tuloksia. Tässä työssä käytetyt solulinjat olivat kaupallisia ja niitä käytettiin in vitro tutkimukseen, joten niiden käytössä ei ollut eettisiä ongelmia.

γ-sekretaasin inhibiittoreiden tutkiminen on tärkeää, koska ne ovat potentiaalisia uusia hoitomuotoja rintasyöpään. Rintasyöpä on yleisin naisten syöpäsairaus Suomessa ja rintasyöpään sairastuneiden määrä kasvaa kokoajan. Tällä hetkellä yksi suuri ongelma lääkehoidon toteuttamisessa on lääke-resistenssi. Siksi rintasyövän hoitaminen vaatii lääkekehitystä ja uusia lääkkeitä. Opinnäytetyömme oli pieni kokeellinen osa Itä-Suomen yliopiston tutkimusryhmän laajaa rintasyöpätutkimusta, antaen alustavia tuloksia käyttämistämme menetelmistä, menetelmien ongelmista ja antaen tutkijoille jatko-tutkimusmahdollisuuksia aiheesta. Näillä perusteilla tämän opinnäytetyön tekeminen oli eettisesti perusteltua.

LÄHTEET

- Al- Hussain, H., Subramanyam, D., Reedijk, M., Sridhar, S. 2011. Notch Signaling Pathway as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* [verkkolehti] 10: 9–15 [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://mct.aacrjournals.org/content/10/1/9.full>.
- ATCC 2012a. MCF-12F (ATCC® CRL-10783TM) [verkkojulkaisu], [viitattu 09.09.2013]. Saatavissa: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10783.aspx>.
- ATCC 2012b. MCF-7 (ATCC® HTB-22TM) [verkkojulkaisu], [viitattu 09.09.2013]. Saatavissa: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>.
- ATCC 2012c. MDA-MB-453 (ATCC® HTB-131TM) [verkkojulkaisu], [viitattu 09.09.2013]. Saatavissa: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-131.aspx>.
- Corning 1994- 2013. *Corning Cell Culture Surfaces: Corning® CellBIND® Surface* [verkkojulkaisu], [viitattu 9.1.2014]. Saatavissa: http://www.corning.com/lifesciences/us_canada/en/technical_resources/surfaces/culture/corning_cellbind_polystyrene.aspx.
- De Strooper, B. 2003. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active γ -Secretase Complex. *Neuron* [verkkolehti] 38: 9–12 [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627303002058>.
- EMD Millipore Corporation 2013. *Cell Analysis Scepter™ Automated Cell Counter* [verkkojulkaisu], [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: http://www.millipore.com/life_sciences/flx4/scepter_automated_cell_counter#tab1=1.
- Enzo Life Sciences 2014. *Compound E* [verkkojulkaisu], [viitattu 7.1.2014]. Saatavissa: <http://www.enzolifesciences.com/ALX-270-415/compound-e/>
- Fortini, M. E. 2002. γ -secretase- mediated proteolysis in cell-surfacerceptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [verkkolehti] 3: 673–684 [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://web.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=3900f4ed-8881-45c8-80ef-58a0a96effaa%40sessionmgr113&vid=2&hid=122>.
- Groth, C., Fortini, M.E. Therapeutic approaches to modulating Notch signaling: Current challenges and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [verkkolehti] 23: 465–472 [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952112000262>.
- Haapasalo, A., Kovacs, D. M. 2011. The Many Substrates of Presenilin/ γ -Secretase. *Journal of Alzheimer's Disease* [verkkolehti] 25: 3–28 [viitattu 13.09.2013]. Saatavissa:

<http://web.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=4e016e0f-975b-49f5-829a-4226820e7cf0%40sessionmgr114&vid=2&hid=122>.

Heikkilä, T. 2010. Tilastollinen tutkimus. 7.–8. painos. Helsinki: Edita Prima Oy.

Heino, J., Vuento, M. 2010. *Solubiologia*. 2. Uudistettu painos. Porvoo: WSOYpro Oy.

Hirsjärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2007. *Tutki ja kirjoita*. 13. osin uudistettu painos. Helsinki: Tammi.

Hirsjärvi, S., Remes, P., Sajavaara, P. 2004. *Tutki ja kirjoita*. 10. osin uudistettu laitos. Helsinki: Tammi.

Holliday, D., Speirs, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* [verkkolehti]. 13:215 [viitattu 16.01.2014]. Saatavissa: <http://breast-cancer-research.com/content/pdf/bcr2889.pdf>.

IARC 2014. *Globacan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012* [verkkosivusto]. World Health Organization [viitattu 12.2.2014]. Saatavissa: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.

Isola, J. 2013. Syövän synty kasvu ja leviäminen. Teoksessa H. Joensuu, P. Roberts, P-L. Kellokumpu- Lehtinen, S. Jyrkkiö, M. Kouri, L. Teppo (toim.). *Syöpätaudit*. 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 9–29.

Isola, J., Kallioniemi, A. 2013. Syövän synty, kasvu ja leviäminen. Teoksessa H. Joensuu, P. Roberts, P-L. Kellokumpu- Lehtinen, S. Jyrkkiö, M. Kouri, L. Teppo (toim.). *Syöpätaudit*. 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 9–29.

Itä-Suomen yliopisto. *Molecular Pathology and Genetics of Cancer* [verkkojulkaisu], [viitattu 16.01.2014]. Saatavissa: <https://www.uef.fi/fi/kliinisenlaaketieteenyksikko/molecular-pathology-and-genetics-of-cancer>.

Jääskeläinen, J., Nyman, L., Tirkkonen, T. 2010. *Kliinisen lääketieteen yksikön laatukäsikirja* [verkkojulkaisu]. Itä-Suomen yliopisto [viitattu 17.01.2014]. Saatavissa: <http://www.uef.fi/documents/1293627/1293644/Kliinisen+l%C3%A4%C3%A4ketieteen+yksikk%C3%B6%20laatuk%C3%A4sikirja.pdf/6ae07bfa-9eb9-45bb-93a9-b8bd4a30a328>.

Joensuu, H., Huovinen, R. 2013. Rintasyöpä. Teoksessa H. Joensuu, P. Roberts, P-L. Kellokumpu- Lehtinen, S. Jyrkkiö, M. Kouri, L. Teppo. (toim.). *Syöpätaudit*. 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 593–621.

Kivelä, T. ym. 2007. Lääketieteen termit. W. Niensted (päätoim.), J. Kellosalo (toim.). 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim.

Kankkunen, P., Vehviläinen-Julkunen, K. 2013. *Tutkimus hoitotieteessä*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Leidenius, M., Joensuu, H. 2013. Yleisyys, ehkäisy ja diagnostiikka. Teoksessa H. Joensuu, P. Roberts, P-L. Kellokumpu- Lehtinen, S. Jyrkkiö, M. Kouri, L. Teppo (toim.). *Syöpätaudit*. 5. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim, 593–621.

Life technologies TM. *Cell culture basics* [verkkójulkaisu], [viitattu 10.3.2014]. Saatavissa: <http://www.vanderbilt.edu/vibre/CellCultureBasicsEU.pdf>.

Metsämuuronen, J. 2005. *Kokeellisen tutkimuksen perusteet ihmistieteissä*. Helsinki: International Methelp Ky.

NC State University 2004. *Using Error Bars in your Graph* [verkkójulkaisu], [viitattu 15.01.2014]. Saatavissa: <http://ncsu.edu/labwrite/res/gt/gt-stat-home.html>.

Niemi, M., Virtanen, I., Vuorio, E. 1994. *Solu- ja molekyylibiologia*. 5. uudistettu painos. Porvoo: WSOY.

Olsauskas-Kuprys, R., Zlobin, A., Osipo, C. 2013. Gamma secretase inhibitors of Notch signaling. Dove press: *Onco Targets and Therapy* [verkkolehti] 6, 943–955 [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3726525/>.

Ongena, K., Das, C., Smith, J. L., Gil, S., Johnston, G. 2010. Determining Cell Number During Cell Culture using the Scepter Cell Counter. *Journal of Visualized Experiments* [verkkolehti] 45 [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://www.jove.com/video/2204/determining-cell-number-during-cell-culture-using-scepter-cell>.

Opetusministeriö 2006. *Ammattikorkeakoulusta terveydenhuoltoon* [verkkójulkaisu], [viitattu 24.01.2014]. Saatavissa: <http://www.minedu.fi/export/sites/default/OPM/Julkaisut/2006/liitteet/tr24.pdf?lang=fi>.

Roche 2013. *Rintasyöpä.fi* [verkkosivusto], [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://www.rintasyopa.fi/rintasyovan-hoito/hoitaminen/>.

Roche Applied Science 2005. *Cell Proliferation Reagent WST-1* [verkkójulkaisu], [viitattu 03.12.2013]. Saatavissa: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11644807001_en_11.pdf.

- Roche Diagnostics 2008. *Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation* [verkkojulkaisu]. [viitattu 12.09.2013]. Saatavissa: https://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf.
- Roche Diagnostics 1996–2013a. *Cell Proliferation and Viability Assay Methods* [verkkojulkaisu], [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://www.roche-applied-science.com/shop/en/fi/products/cell-proliferation-and-viability-assay-methods>.
- Roche Diagnostics 1996–2013b. *Cell Proliferation Reagent WST-1* [verkkojulkaisu], [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://www.roche-applied-science.com/shop/products/cell-proliferation-reagent-wst-1>.
- Ryan, J. 2012. *Subculturing Monolayer Cell Cultures* [verkkojulkaisu], [viitattu 9.1.2014]. Saatavissa: http://catalog2.corning.com/Lifesciences/media/pdf/Subculturing_protocol.pdf.
- Shih, I-M., Wang, T-L. 2007. Notch Signaling, γ -Secretase Inhibitors, and Cancer Therapy. *American Association for Cancer Research* [verkkojulkaisu] 67:1879 - 1882 [viitattu 10.09.2013]. Saatavissa: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/5/1879.short>.
- Sigma-aldrich 2014a. *Cell Dissociation* [verkkojulkaisu], [viitattu 7.1.2014]. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin/cell-dissociation.html>.
- Sigma-aldrich 2014b. *Dimethyl sulfoxide* [verkkojulkaisu], [viitattu 7.1.2014]. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/d5879?lang=fi®ion=FI>
- Sigma-aldrich 2014c. *DAPT* [verkkojulkaisu], [viitattu 7.1.2014]. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d5942?lang=fi®ion=FI>
- Sigma-aldrich 2014d. *L-685,458* [verkkojulkaisu], [viitattu 7.1.2014]. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l1790?lang=fi®ion=FI>
- Solunetti 2006a. *Syövän aiheuttajat* [verkkojulkaisu], [viitattu 12.09.2013]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/syovan_aiheuttajat/2/.
- Solunetti 2006b. *Esisyöpägeenit ja syöpägeenit* [verkkojulkaisu], [viitattu 12.09.2013]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/syovan_synty/2/.
- Solunetti 2006c. *Aseptinen työskentely* [verkkojulkaisu], [viitattu 12.09.2013]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/aseptinen_tyoskentely/2/.

Solunetti 2006d. *Transkriptio* [verkkójulkaisu], [viitattu 12.09.2013]. Saatavissa: http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/transkriptio_1/2/.

Suomen Akatemia 2003. *Suomen Akatemian tutkimuseettiset ohjeet* [verkkójulkaisu]. Xerox Business services [viitattu 11.09.2013]. Saatavissa: <http://193.167.96.163/Tiedostot/Tiedostot/Julkaisut/Suomen%20Akatemian%20eettiset%20ohjeet%202003.pdf>.

Syöpäjärjestöt 2013. *Rintasyöpä* [verkkójulkaisu], [viitattu 12.09.2013]. Saatavissa: <http://www.cancer.fi/tietoasyovasta/syopataudit/rintasyopa/>.

Tapana, P. 2010. *Elävä solu*. Helsinki: Gaudeamus Helsinki University Press.

Vranic, S., Gatalica, Z., Wang, Z-Y. 2011. Update on the molecular profile of the MDA-MB-453 cell line as a model for apocrine breast carcinoma studies. *Oncology Letters* [verkkolehti] 2: 1131–1137 [viitattu 20.9.2013]. Saatavissa: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224077/pdf/OL-02-06-1131.pdf>.

Wolfe, M. S. 2009. γ -Secretase in biology and medicine. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [verkkolehti] 20: 219–224 [viitattu 13.09.2013]. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952108001560>.

Yin, L., Velazquez, O., Liu, Z-J. 2010. Notch signaling: Emerging molecular targets for cancer therapy. *Biomedical pharmacology* [verkkolehti] 80: 690–701 [viitattu 13.09.2013]. Saatavissa: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295210002145>.

LIITE 1: SOLUJEN JAKAMINEN (MENETELMÄOHJE)

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Kliinisen lääketieteen yksikkö

Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

MENETELMÄOHJE

SOLUJEN JAKAMINEN

Solut jaetaan niiden ollessa noin 80 % kasvukonfluentissa.

Tarvittavat välineet: Soluviljelypulloja tai maljoja
kertakäyttöisiä 5 ml, 10 ml, 25 ml -mittapipettejä
lasisia pasteuripipettejä

Tarvittavat reagenssit: Kasvatusmediumia
Trypsin
PBS

Merkitse uudet soluviljelypullot: solulinja, jakosuhte ja päivämäärä.

1. Lämmitä kasvatusmediumia ja trypsiiniä vesihauteella + 37 °C:ssa 10 – 15 min.
2. Poista kasvatusmedium soluviljelypullosta (imua käyttäen).
3. Pipetoi 75 cm² soluviljelypulloon 5 ml PBS:ää ja
25 cm² soluviljelypulloon 2 ml PBS:ää, huuhtelee solumattoa heiluttelemalla PBS:ää pullon pohjalla ja ime imulla PBS pois.
4. Toista edellinen toimenpide.
5. Pipetoi 75 cm² soluviljelypulloon 3 ml ja 25 cm² soluviljelypulloon 2 ml TRYPSIN- EDTA:ta, siirrä soluviljelypullo inkubaattoriin. Seuraa solujen irtoamista pohjasta, mikroskopoimalla välillä pulloa. Trypsin tuhoaa soluja, joten ole tarkkana, älä anna vaikuttaa 5 min. kauempaa.
6. Kun solut alkavat irrota soluviljelypullon pohjasta, pipetoi 75 cm²:n soluviljelypulloon 1 ml PBS:ää ja 25 cm²:n soluviljelypulloon 0,5 ml PBS:ää ja suspensoi parikertaa pipetillä.
7. Pipetoi seuraavaksi 75 cm² soluviljelypulloon 4 ml ja 25 cm² soluviljelypulloon 2,5 ml kasvatusmediumia ja suspensoi solut, välttä vaahtoamista.

Itä-Suomen yliopisto
Terveystieteiden tiedekunta
Lääketieteen laitos
Kliinisen lääketieteen yksikkö
Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

MENETELMÄOHJE

SOLUJEN JAKAMINEN

8. Lisää pulloihin tarvittava määrä kasvatusmediumia (ennakkoon merkittyihin). 75 cm² soluviljelypullon lopullinen tilavuus 12 ml ja 25 cm² soluviljelypullon lopullinen tilavuus 4 ml.
9. Jaa solususpensio uusiin soluviljelypulloihin. Yritä saada solut tasaisesti pullon pohjalle liikuttamalla pulloa laminaarikaapin tasolla, tehden pullolla kahdeksikon kuviota.
10. Siirrä soluviljelypullot CO₂ inkubaattoriin.
11. Vaihda kasvatusmediumia solujen kasvuvauhdista riippuen noin 1- 3 kertaa viikossa.
12. Kasvata soluja, kunnes ovat noin 80 – 90 % kasvukonfulentissa ja jaa edelleen.

LIITE 2: MCF-12F KASVATUSMEDIUMIN VALMISTUS (MENETELMÄOHJE)

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Kliinisen lääketieteen yksikkö

Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

MENETELMÄOHJE

Kasvatusmediumin valmistus

Solulinja:

MCF-12F

Medium: 1 osa DMEM + 1 OSA Ham's F12 (1:1)

Tarvittavat reagenssit ja niiden pitoisuudet kasvatusmediumissa:

5 % FBS	(-20°C)
0,1 µg/ml cholera toxin	(-20°C)
0,5 µg/ml hydrokortisoni	(-20°C)
0,020 µg/ml epidermaalinen kasvutekijä	(-20°C)
Pen- Sterp	(-20°C)
10 µg/ml insuliinia	(+4°C)

Liuksen valmistus

1. Sulatetaan vesihauteella tarvittava määrä FBS, hydrokortisoni, pen-strep ja cholera toxin.
Epidermaalisen kasvutekijän ja insuliinin voi nostaa suoraan laminaarikaappiin sulamaan.
2. Mitataan tarvittava määrä DMEM ja Ham's mediumia steriiliin pulloon.
3. Lisätään seuraavaksi tarvittavat reagenssit ja sekoitetaan huolella.
4. Merkitään pullon kylkeen mediumin tiedot: solulinja (jolle medium on tarkoitettu), mediumin nimi, lot.nro, päivämäärä ja valmistaja.

Reagenssin nimi		Esimerkiksi 500 ml mediumia	Nyt mitattu määrä	Lot. tai pvm.
DMEM	(+4°C)	234 ml		
Ham's F 12	(+4°C)	234 ml		
FBS	(-20°C)	25 ml		
Cholera toxin stokki 1 mg/ml	(-20°C)	50 µl		
Hydrokortison stokki 500 µg/ml	(-20°C)	500 µl		
Insuliini (human) stokki 10 mg/ml	(+4°C)	500 µl		
Epidermaalinen kasvu tek. stokki 10 µg/ml	(-20°C)	1ml		
Pen-sterp.	(-20°C)	5 ml		

Säilytys: +4°C

Säilyvyys: 4 vko

Päivämäärä:

Tekijän allekirjoitus:

LIITE 3: MDA-MB-453 KASVATUSMEDIUMIN VALMISTUS (MENETELMÄOHJE)

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Kliinisen lääketieteen yksikkö

Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

MENETELMÄOHJE

Kasvatusmediumin valmistus

Solulinja:

MDA-MB-453 (rintasyöpäsolut)

Medium: D- MEM

Tarvittavat reagenssit ja niiden pitoisuudet kasvatusmediumissa:

10 % FBS inaktivoitu (-20°C)

1 ml/100 ml Pen-sterp. (-20°C)

Liuoksen valmistus:

1. Sulatetaan vesihauteella tarvittava määrä FBS ja Pen-sterp.
2. Mitataan tarvittava määrä mediumia steriiliin pulloon.
3. Lisätään tarvittavat reagenssit ja sekoitetaan huolella.
4. Merkataan pullon kylkeen kasvatusmediumin tiedot: solulinja (jolle medium on tarkoitettu), mediumin nimi, lot.nro, päivämäärä ja valmistaja.

Reagenssin nimi	Esim. 500 ml mediumia	Nyt mitatut reagenssit	Lot. tai pvm.
D-MEM (+4°C)	500 ml		
FBS inaktivoitu (-20°C)	50 ml		
Pen-sterp. 1ml/100ml (-20°C)	5 ml		

Säilytys: +4°C

Päivämäärä:

Säilyvyys: 4 vko

Tekijän allekirjoitus:

LIITE 4: MCF-7 KASVATUSMEDIUMIN VALMISTUS (MENETELMÄOHJE)

Itä-Suomen yliopisto

Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Kliinisen lääketieteen yksikkö

Kliininen patologia ja oikeuslääketiede

MENETELMÄOHJE

Kasvatusmediumin valmistus

Solulinja: **MCF-7 (rintasyöpäsolut)**

Medium: MEM- Earl's

Tarvittavat reagenssit ja niiden pitoisuudet kasvatusmediumissa:

10 % FBS inaktivoitu	(-20°C)
1 mM Sodumpyryvate	(+4°C)
1,5 g/l Sodumbicarbonate	(+4°C)
1 x Non-Essential Amino Acid	(+4°C)
2 mM L-glutamine	(-20°C)
0,01 mg/ml Insulin	(+4°C)
1 ml/100 ml Pen-sterp.	(-20°C)

Liuoksen valmistus:

1. Sulatetaan vesihauteella tarvittava määrä FBS, L-glutamin ja Pen-strep.
2. Mitataan tarvittava määrä mediumia steriiliin pulloon.
3. Lisätään tarvittavat reagenssit ja sekoitetaan huolella.
4. Merkitään pullon kylkeen kasvatusmediumin tiedot: solulinja (jolle medium on tarkoitettu), mediumin nimi, lot.nro, päivämäärä ja valmistaja.

Reagenssin nimi		Esimerkiksi 500 ml mediumia	Nyt mitattu määrä	Lot. tai pvm.
MEM- Earl's	(+4°C)	450 ml		
FBS inaktivoitu	(-20°C)	50 ml		
Sodumpyrovaatti 100 mM	(+4°C)	5 ml		
Sodumbicarbonate 7,5 %	(+4°C)	10 ml		
Non-Essential Amino Acids 100 x stokki	(+4°C)	5 ml		
L-Glutamin 200 mM	(-20°C)	5 ml		
Insuliini (human) stokki 10 mg/ml	(+4°C)	0,5ml		
Pen-sterp. (10 000 units penicil. + 10 mg sterptom)	(-20°C)	5 ml		

Säilytys: +4°C

Päivämäärä:

Säilyvyys: 4 vko

Tekijän allekirjoitus:

LIITE 5: KUVALUETTELO

Kuvaluettelo

Kuva 3 Mediumia sisältävä soluviljelypullo.....	18
Kuva 4 Scepter™-solulaskija.....	20
Kuva 5 Scepter™-sensorit.....	20
Kuva 6 Scepter™-histogrammin esimerkkikuva MCF-7 soluista.....	21
Kuva 7 Scepter™-histogrammin esimerkkikuva MCF-12F soluista.....	22
Kuva 8 6-kuoppalevy.....	26
Kuva 9 Scepter™-kokeen suoritus.....	28
Kuva 10 96-kuoppalevyt.....	33
Kuva 11 WST-1-kokeen suoritus.....	35

Kaikki kuvat © Kastinen Miia ja Lemettinen Marjo 2013.