

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

Solu- ja molekyylibiologia

2015

Milla Vainio & Minna Vuorenmaa

BISFOSFONAATTIEN VAIKUTUS ETURAUHASSYÖPÄÄN JA KOLMOISNEGATIIVISEEN MATALAN TLR9-EKSPRESSION RINTASYÖPÄÄN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bioanalytikkokoulutus | Solu- ja molekyylibiologia

2015 | 72+10

Johanna Tuomela, FT, dos.; Pirkko Härkönen, LKT, prof.; Ilari Suominen, FT

Milla Vainio & Minna Vuorenmaa

BISFOSFONAATTIEN VAIKUTUS ETURAUHASSYÖPÄÄN JA KOLMOISNEGATIIVISEEN MATALAN TLR9- EKSPRESSION RINTASYÖPÄÄN

Pitkälle edenneen eturauhassyövän sekä kolmoisnegatiivisen rintasyövän, joka ei ilmennä hormoni- eikä HER2-kasvutekijäreseptoreita, hoitovaihtoehdot ovat rajattuja, ja näiden syöpätyyppien ennuste on huono. Laajassa kliinisessä käytössä olevia bisfosfonaatteja käytetään luuston aineenvaihduntasairauksien hoidossa, kuten osteoporoosin ja syövän luustostaapesäkkeiden aiheuttamissa muutoksissa. Viimeaikaisissa tutkimuksissa on todettu, että bisfosfonaatit saattavat estää farmakologisten kohdesolujensa osteoklastien lisäksi myös syöpäsolujen kasvua. Bisfosfonaatit voidaan jakaa kemiallisen rakenteen ja toiminnan perusteella non-amino- ja aminobisfosfonaatteihin, joista jälkimmäiset ovat osoittautuneet tehokkaammiksi. Synnynnäiseen immuunipuolustukseen kuuluva solunsisäinen reseptori, Tollin kaltainen reseptori 9 (TLR9), aktivoituu ja välittää tulehdusreaktiota, kun se tunnistaa virus-, bakteeri- tai selkärankaisten omaa DNA:ta. Matalan TLR9-ekspression on havaittu olevan yhteydessä kolmoisnegatiivisen rintasyövän ennusteeseen, koska kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä se liittyy syövän nopeaan leviämiseen ja huonoon ennusteeseen. On kuitenkin viitteitä siitä, että matalan TLR9-ekspression kolmoisnegatiivisilla rintasyöpäsoluilla ja kokeellisilla kasvaimilla on hyvä vaste aminobisfosfonaattihoitoon.

Tämä opinnäytetyö koostuu kahdesta projektista, joiden tarkoituksena oli tutkia bisfosfonaattien vaikutusta eturauhassyöpään ja matalan TLR9-ekspression kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään *in vitro* ja *in vivo*. Opinnäytetyön tutkimukset painottuivat kolmoisnegatiiviseen matalan TLR9-ekspression rintasyöpäprojektiin, jossa vertailtiin non-amino- ja aminobisfosfonaattien vaikutusta kolmoisnegatiivisten matalan TLR9-ekspression rintasyöpäsolujen proliferaatioon, elinkykyisyyteen ja solusykliin. Eturauhassyöpäprojektissa tutkittiin aminobisfosfonaattien vaikutusta eturauhassyöpäsolujen solutukirankaan ja hiirten eturauhassyöpäkasvaimiin. Tuloksissa todettiin, että tutkimuksissa käytetyt aminobisfosfonaatit selkeästi estivät tai hidastivat syöpäsolujen kasvua verrattuna non-amino-aminobisfosfonaatteihin. Aikaisemmat tutkimukset ja opinnäytetyön tulokset viittaavat siihen, että aminobisfosfonaatteja voidaan harkita käytettäväksi kolmoisnegatiivisen matalan TLR9-ekspression rintasyövän ja levinneen eturauhassyövän liitännäishoitona.

ASIASANAT:

Bisfosfonaatit, Eturauhassyöpä, Rintasyöpä, TLR9

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree programme in Biomedical Laboratory Science | Cell and Molecular Biology

2015 | 72+10

Johanna Tuomela, PhD, Adj.Prof.; Pirkko Härkönen, MD, PhD, Prof.; Ilari Suominen, PhD

Milla Vainio & Minna Vuorenmaa

THE EFFECTS OF BISPHOSPHONATES ON PROSTATE CANCER AND ON TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER WITH LOW TLR9 EXPRESSION

Advanced prostate cancer and triple-negative breast cancer, which does not express hormone or HER2-receptors, have poor prognosis with only few therapies. Bisphosphonates are commonly used and effective drugs for the treatment of metabolic bone disorders, such as osteoporosis and tumor-induced osteolysis. Lately, there is preclinical evidence that bisphosphonates have also direct anticancer effects. Bisphosphonates can be classified into two groups based on differences in their chemical structure and functional properties, non-aminobisphosphonates and aminobisphosphonates, and the latter has been proved to be more effective. Toll-like receptor 9 (TLR9) is an innate immune system receptor, which mediates the activation of inflammatory response when it recognizes viral, bacterial or self-DNA. Recent study shows that low TLR9 expression defines an aggressive subtype of triple-negative breast cancer with poor prognosis and significantly shortened breast cancer-specific survival. However, there is evidence that cancer cells and xenograft tumors with low TLR9 may be sensitive to aminobisphosphonate treatment.

The aim of this bachelor's thesis was to study the effects of bisphosphonates on prostate cancer and on triple-negative breast cancer with low TLR9 expression in two individual projects *in vitro* and *in vivo*. Our studies focused more into triple-negative breast cancer, and included comparative studies between non-aminobisphosphonates and aminobisphosphonates effects on triple-negative breast cancer cell proliferation, viability and cell cycle. The effects of aminobisphosphonates were studied also on prostate cancer cell actin skeleton and on prostate tumors in mice. The results of this study showed that the aminobisphosphonates had a clear effect on the inhibition of cancer cell growth compared to non-aminobisphosphonates. Our studies confirmed previous results indicating that aminobisphosphonates could be considered as adjuvant therapy for triple-negative breast cancer with low TLR9 expression, as well as in advanced prostate cancer.

KEYWORDS:

Bisphosphonates, TLR9, Triple-negative breast cancer, Prostate cancer

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	7
1 JOHDANTO	8
2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTINEN TAUSTA	10
2.1 Eturauhassyöpä	10
2.2 Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä	10
2.3 Tollin kaltainen reseptori 9 (TLR9)	11
2.4 Bisfosfonaatit	15
2.5 Kofiliini	19
3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT	21
4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS	24
4.1 Toteutussuunnitelma	24
4.2 Metodologiset lähtökohdat	24
4.3 Eettiset lähtökohdat	25
5 TUTKIMUKSISSA KÄYTETYT MENETELMÄT	27
5.1 Western blot	27
5.2 Virtausytometria	28
5.3 Hiirikokeet	30
6 TUTKIMUSTEN KOKEELLINEN SUORITUS	32
6.1 Eturauhassyöpäprojekti	32
6.1.1 Hiirikoe	32
6.1.2 Western blot	33
6.2 Rintasyöpäprojekti	36
6.2.1 Hiirikoe	37
6.2.2 IncuCyte	38
6.2.3 Cell Counting Kit-8	39
6.2.4 Virtausytometria	41
7 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	42
7.1 Eturauhassyöpäprojekti	42
7.1.1 Hiirikoe	42
7.1.2 Western blot	43
7.2 Rintasyöpäprojekti	47

7.2.1 Hiirikoe	47
7.2.2 IncuCyte	48
7.2.3 Cell Counting Kit-8	53
7.2.4 Virtaussytometria	55
8 POHDINTA	62
8.1 Eturauhassyöpäprojekti	63
8.2 Rintasyöpäprojekti	63
8.3 Jatkotutkimusaiheet	65
LÄHTEET	67

LIITTEET

Liite 1. Toimeksiantosopimus	
Liite 2. Reagenssiluettelo	
Liite 3. Western blot -työohjeet	
Liite 4. Solulaskut 96- ja 6-kuoppalevyille	
Liite 5. Zoledronaatti- ja klodronaattiliuosten laimennossarjat	
Liite 6. MDA-MB-231(SA)-solujen viljely 6-kuoppalevyille	
Liite 7. Virtaussytometrianäytteiden natriumsitraattipuskuri ja työohje	
Liite 8. PC-3-hiirten kasvainten mittaustulokset	
Liite 9. 4T1-hiirten kasvainten mittaustulokset	
Liite 10. Cell Counting Kit-8:n alkuperäisdata	

KUVAT

Kuva 1 Matalan TLR9-ekspression vaikutus kolmoisnegatiivisen rintasyövän suhteelliseen elossaolo-osuuteen verrattuna korkean TLR9-ekspression kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään. (Tuomela ym. 2012)	13
Kuva 2 Kolmoisnegatiivisen matalan TLR9-ekspression rintasyövän huonon ennusteen hypoteesi. (Mukaillen Tuomela ym. 2013, a)	15
Kuva 3 ECL-reaktion periaate Western blot -menetelmässä. (Mukaillen GE Healthcare 2009)	28
Kuva 4. Virtaussytometrian periaate. (Mukaillen Abcam 2010)	29
Kuva 5. Eukaryoottisolun solusyklin vaiheet virtaussytometrin kuvaajassa. (Mukailltu Karns 2014 & Ormerod 2008)	30
Kuva 6. Solujen elinkykyisyyden määrittäminen CCK-8:n WST-8-reagenssilla. (Mukaillen Dojindo Molecular Technologies Inc 2014)	39
Kuva 7. Geeli 1: PC-3 mock, kofiliini.	44
Kuva 8. Geeli 2: PC-3 kofiliini, kofiliini.	44
Kuva 9. Geeli 1: PC-3 mock, α -tubuliini.	45
Kuva 10. Geeli 2: PC-3 kofiliini, α -tubuliini.	45
Kuva 11. Eri vahvuisten klodronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. VEH (n=10), CLO 10 μ M (n=5), CLO 100 μ M (n=5)	49

Kuva 12. Eri vahvuisten zoledronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. VEH (n=10), ZOL 1 µM (n=5), ZOL 10 µM (n=5), ZOL 100 µM (n=5)	49
Kuva 13. Eri vahvuisten klodronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. VEH (n=10), CLO 10 µM (n=5), CLO 100 µM (n=5)	50
Kuva 14. Eri vahvuisten zoledronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. VEH (n=10), ZOL 1 µM (n=5), ZOL 10 µM (n=5), ZOL 100 µM (n=5)	50
Kuva 15. Vahvimalla zoledronaattipitoisuudella (100 µM) käsitellyt MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solut kokeen aloituspäivänä ja kolmantena inkubaatiopäivänä verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen.	51
Kuva 16. Vahvimalla zoledronaattipitoisuudella (100 µM) käsitellyt MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solut kokeen aloituspäivänä ja kolmantena inkubaatiopäivänä verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen.	52
Kuva 17. Zoledronaattipitoisuuksien 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ja 100 µM vaikutus MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen solusykliin verrattuna käsittelemättömiin kuljetinnäytteisiin. Kuljetin = vihreä kuvaaja, ZOL = punainen kuvaaja.	57
Kuva 18. Zoledronaattipitoisuuksien 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ja 100 µM vaikutus MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen solusykliin verrattuna käsittelemättömiin kuljetinnäytteisiin. Kuljetin = vihreä kuvaaja, ZOL = punainen kuvaaja.	60

KUVIOT

Kuvio 1. Aminobisfosfonaattien vaikutus mevalonaattireittiin. (Mukaiillen Thurnher, Nussbaumer, & Gruenbacher 2013; Buhaescu & Izzedine 2007)	18
Kuvio 2. Alendronaatti- ja PBS-hoidon vaikutus <i>athymic nude</i> -hiirten PC-3-kasvainten kasvukäyrään (n=16).	43
Kuvio 3. BALB/c-hiirten 4T1 Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -kasvainten kasvukäyrä (n=16) kokeen alussa.	47
Kuvio 4. MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen absorbanssiarvot WST-8-reagenssin lisäyksen ja tunnin inkubaation jälkeen.	54

TAULUKOT

Taulukko 1. Western blot: PC-3 mock -näytteiden pipetointijärjestys.	34
Taulukko 2. Western blot: PC-3 kofiliini -näytteiden pipetointijärjestys.	34
Taulukko 3 Eri zoledronaatti- ja klodronaattikonsentraatioilla käsiteltyjen MDA-MB-231(SA)-solujen 96-kuoppalevyn kartta. Punaisella reunustetun alueen kuoppiin pipetoitiin 10 µl WST-8-reagenssia. (VEH = kuljetin, ZOL = zoledronaattikäsittely, CLO = klodronaattikäsittely)	40
Taulukko 4 Geeli 1: PC-3 mock -solujen vyöhykkeiden intensiteeteistä määritetyt kofiliini- ja α-tubuliinipitoisuudet ja niiden suhde.	46
Taulukko 5 Geeli 2: PC-3 kofiliini -solujen vyöhykkeiden intensiteeteistä määritetyt kofiliini- ja α-tubuliinipitoisuudet ja niiden suhde.	46
Taulukko 6 MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen 96-kuoppalevyltä mitatut absorbanssiarvot WST-8-reagenssin lisäyksen ja tunnin inkubaation jälkeen.	53

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

4T1	Hiiren kolmoisnegatiivinen rintasyöpäsoluminija (ATCC® 2014, a)
ALN	Alendronaatti (engl. <i>alendronate</i>)
CCK-8	Solujen elinkykyisyyden määrittävä kaupallinen kitti (engl. <i>Cell Counting Kit-8</i> , Dojindo Molecular Technologies Inc 2014)
CLO	Klodronaatti (engl. <i>clodronate</i>)
Ctrl	Kontrolli (engl. <i>control</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich 2014)
Ekspressio	Ilmentymä, ilmentyminen (engl. <i>expression</i>)
HER2	Ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 2 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
In vitro	Tutkimus suoritetaan elävän organismin ulkopuolella (lat. "lasissa")
In vivo	Tutkimus suoritetaan elävässä organismissa (lat. "elävässä")
MDA-MB-231	Ihmisen kolmoisnegatiivinen rintasyöpäsoluminija (ATCC® 2014, b, d)
Mock	Matkia, jäljitellä (engl. <i>mock</i>)
PBS	Fosfaattipuskuri (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PC-3	Ihmisen eturauhassyöpäsoluminija (ATCC® 2014, c)
siRNA	Pieni häiritsevä ribonukleiihappo (engl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>)
TBS-T	Trispuuskuri ja Tween 20 -detergentti (engl. <i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>)
TLR9	Tollin kaltainen reseptori 9 (engl. <i>Toll-like receptor 9</i>)
VEH	Kuljetin (engl. <i>vehicle</i>)
WST-8	Vesiliukoinen tetrazolium-suola (engl. <i>water-soluble tetrazolium salt 8</i> , Dojindo Molecular Technologies Inc 2014)
ZOL	Zoledronaatti (engl. <i>zoledronate</i>)

1 JOHDANTO

Suomessa yleisin syöpätyyppi on miehillä eturauhassyöpä ja naisilla rintasyöpä. Syövän ennuste riippuu sen ominaisuuksista ja toteamisajankohdasta, mutta pääsääntöisesti eturauhas- ja rintasyövän ennusteet ovat varsin hyviä verrattuna moneen muuhun syöpätyyppiin. Vuosina 2009–2011 diagnosoitujen potilaiden suhteellinen viiden vuoden elossaolo-osuus oli rintasyövässä 87 % ja eturauhassyövässä 92 %. Paikallisella, hyvin erilaistuneella eturauhassyövällä on hyvä ennuste, mutta levinneen eli metastoituneen eturauhassyövän tapauksessa potilaiden viiden vuoden suhteellinen elossaolo-osuus on tällä hetkellä vain 33 %. Sekä eturauhas- ja rintasyöpä ovat hormoniriippuvaisia, minkä vuoksi niitä voidaan hoitaa myös hormonihoidoilla. Rintasyövän eräs aggressiivinen alatyppi, kolmoisnegatiivinen rintasyöpä, ei ilmennä hormonireseptoreita eikä HER2-kasvutekijäreseptoria, mikä tekee siitä vaikeasti hoidettavan. Kolmoisnegatiivisella matalan TLR9-ekspression rintasyövällä on korkea uusiutumiskorkeus, ja potilaiden elossaolo-osuus viiden vuoden sisällä oli seurattuna ajanjaksolla vain hieman yli 60 %. (Engholm ym. 2014; Eturauhassyöpä: Käypä hoito -suositus 2014; Jousimaa ym. 2012; Tuomela ym. 2012; Vehmanen 2012, b.)

Tollin kaltainen reseptori yhdeksän (TLR9, engl. *Toll like receptor 9*) on solunsisäinen DNA-reseptori, joka on osa synnynnäistä immuunipuolustusta (Wagner 2004). Useiden syöpätyyppien tiedetään ilmentävän tätä reseptoria, mutta sen rooli syövän ennustetekijänä on kaksijakoinen. Kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä matalan TLR9-ekspression on todettu olevan yhteydessä huonoon ennusteeseen, kun taas eturauhassyövässä päinvastaisesti korkea TLR9-ekspressio näyttää olevan yhteydessä huonoon ennusteeseen (Väisänen ym. 2013; Tuomela ym. 2012). Bisfosfonaatit ovat luuston aineenvaihduntasairauksien hoidossa käytettäviä lääkkeitä, jotka estävät luun osteoklastivälitteistä hajoamista. Bisfosfonaatit voidaan luokitella kahteen toiminnalliseen ja rakenteelliseen pääryhmään niiden kemiallisten sivuketjujen perusteella, non-aminobisfosfonaatteihin ja aminobisfosfonaatteihin, joista jälkimmäiset ovat

monien tutkimusten mukaan tehokkaampia. Kiinteät kasvaimet, kuten eturauhas- ja rintasyöpä, muodostavat usein luun rakennetta heikentäviä luustoetäpesäkkeitä. Bisfosfonaattien luun hajotusta estävän vaikutusmekanismin vuoksi niitä käytetään usein syövän luustoetäpesäkkeiden hoidossa. Viimeaikaisissa tutkimuksissa on todettu, että bisfosfonaatit saattavat vaikuttaa myös syöpäsoluihin luultua enemmän. (Clézardin 2013; Virtanen 2010; Tuomela 2009.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia bisfosfonaattien vaikutusta eturauhassyöpään ja kolmoisnegatiiviseen matalan TLR9-ekspression rintasyöpään *in vivo* ja *in vitro*. Opinnäytetyön tutkimukset painottuivat pääosin kolmoisnegatiivisen matalan TLR9-ekspression rintasyöpään, johon liittyvistä tutkimuksista käytetään selkeyden vuoksi lyhyempää nimitystä rintasyöpäprojekti. Tavoitteena oli saada uutta tietoa erityisesti aminobisfosfonaattien vaikutuksista eturauhassyöpään ja kolmoisnegatiiviseen matalan TLR9-ekspression rintasyöpään. Tutkimusten tavoitteina olivat myös tutkimustulosten toistaminen julkaistavaa artikkelia varten sekä uusien kokeiden tekeminen, jotka selvittävät TLR9-reseptorin merkitystä kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä.

2 OPINNÄYTETYÖN TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Eturauhassyöpä

Eturauhassyöpä on Suomessa miesten yleisin syöpätyyppi ja keuhkosyövän jälkeen miesten toiseksi yleisimmin kuolemaan johtava syöpä (Kujala 2012). Vuonna 2012 Suomessa diagnosoitiin 4 659 uutta eturauhassyöpätapausta, ja yleisin sairastumisikä ajoittui keskimääräisesti 70–74 ikävuoden kohdalle vuosien 2008–2012 aikana (Suomen Syöpärekisteri 2014, a, c). Eturauhassyövän ennuste on erinomainen, mikäli syöpä on pieni, paikallinen ja hyvin erilaistunut, jolloin syövän 10 vuoden eloonjäämisennuste on yli 90 %. Hoitokeinoina voidaan käyttää leikkaus- tai sädehoitoa tai ainoastaan aktiivista seurantaa, mikäli ennuste on hyvä. Paikallisesti levinneen ja etäpesäkkeitä lähettäneen eturauhassyövän ennuste on kuitenkin huono, ja sen hoito on vaativaa. (Eturauhassyöpä: Käypä hoito -suositus 2014; Kellokumpu-Lehtinen & Tammela 2013; Jousimaa ym. 2012; Mirtti & Rannikko 2012.) Eturauhassyövän oireet ovat vähäiset, ja oireita esiintyy usein vasta, kun etäpesäkkeitä on jo muodostunut. Etäpesäkkeitä esiintyy usein luustossa, jossa syöpäsolut muuttavat luuta muodostavien osteoblastien ja luuta hajottavien osteoklastien toimintoja. Tämä saa aikaan noidankehän, jossa osteoklastivälitteisen luun hajoaminen edistää syöpäsolujen kasvua ja lisääntymistä. (Kujala 2012; Virtanen 2010.) Levinnyt eturauhassyöpä voi olla myös kastraatioresistentti, jolloin syöpä leviää kastraation mahdollistamasta alhaisesta testosteronitasosta huolimatta. Tähän syöpätyyppiin ei ole olemassa tehokasta hoitoa, ja odotettu elinikä on vain 6–8 kuukautta. (Eturauhassyöpä: Käypä hoito -suositus 2014.)

2.2 Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä

Rintasyöpä on maailmanlaajuisesti naisten yleisin syöpätyyppi ja syöpäkuolemien aiheuttaja. Rintasyövän ilmaantuvuus on Suomessa ja Pohjoismaissa maailman korkeimpia, mutta rintasyöpään sairastuneen ennuste on kuitenkin Suomessa Euroopan parhaimpia. Vuonna 2012 Suomessa todettiin 4 694 uutta

rintasyöpätapausta, joita diagnosoitiin keskimääräisesti eniten 60–64-vuotiailla vuosien 2008–2012 aikana. (Suomen Syöpärekisteri 2014, b, d; Joensuu 2013.) Paikallisen rintasyövän tärkein hoito on leikkaus, jossa rinnan kasvain pyritään poistamaan kokonaan. Leikkausta seuraa usein kemoterapia- ja sädehoito sekä rintasyöpätyypistä riippuen muut liitännäishoidot, kuten hormoni- tai HER2-vasta-ainehoidot. (Vehmanen 2012, a.) Yksi rintasyövän alatyypeistä on huonoennusteinen kolmoisnegatiivinen rintasyöpä, jossa syöpäsolut eivät ilmennä estrogeeni-, progesteroni- eivätkä HER2-reseptoreita. Tämän vuoksi liitännäishoitona käytetään leikkauksen lisäksi usein vain solusalpaajahoitoa. Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä on vaikeasti hoidettava heterogeeninen syöpätyyppi, koska tuntemattomista syistä osa näistä syövistä parantuu, kun taas osa leviää aggressiivisesti ja uusiutuu. Etäpesäkkeitä muodostuu tavallisimmin luustoon. Syöpätyypin heterogeenisyyden vuoksi kolmoisnegatiivisille rintasyöpäpotilaille on vaikeaa löytää yhteistä hoitokeinoa, minkä vuoksi tämän syövän eri alatyypien tunnistaminen on tärkeää sopivien hoitokeinojen löytymiseksi. (Huovinen & Tanner 2013; Tuomela ym. 2012; Vehmanen & Saarto 2010.) Kolmoisnegatiivisen rintasyövän leviämismekanismia ei vielä tunneta tarkalleen, joten nykypäivänä se onkin monen tutkimusryhmän mielenkiinnon kohteena (Ouyang ym. 2014; Paul ym. 2014; Tuomela ym. 2013, b).

2.3 Tollin kaltainen reseptori 9 (TLR9)

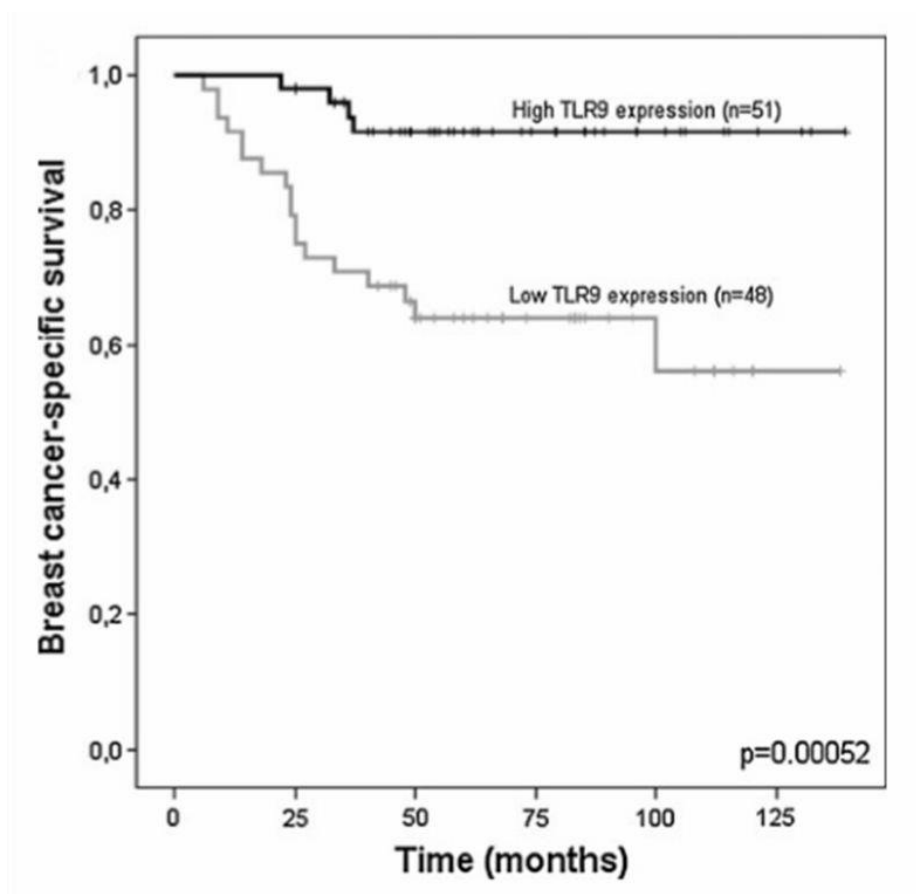
Tollin kaltaiset reseptorit (TLR:t) ovat keskeinen joukko immuunipuolustuksen tunnistereseptoreja, jotka muodostavat ison osan synnynnäisen immuunipuolustuksen tunnistereseptorien ryhmästä (PRR, engl. *pattern recognition receptor*). PRR-ryhmän tehtävä on aktivoida synnynnäinen immuunipuolustus tunnistamalla patogeenisiä rakenteita (PAMP, engl. *pathogen-associated molecular pattern*) ja vaarasignaaleja, jotka vapautuvat soluista infektion tai kudosaaurion yhteydessä (DAMP, engl. *danger-associated molecular pattern*). Tunnistereseptoreiden aktivoima immuunivaste saa aikaan esimerkiksi infektoituneen solun toipumisen tai apoptoosin. (Kerminen 2011; Alberts ym. 2007.) Ihmisillä TLR-perheeseen kuuluu ainakin 10 reseptoria, ja suurin osa

niistä sijaitsee solun pinnalla. Tollin kaltaisia reseptoreita löytyy immuunijärjestelmän soluista, kuten makrofageista ja dendriittisoluista, sekä muista immuunijärjestelmään kuulumattomista soluista, kuten epiteelisoluista. Erilaiset ligandit aktivoivat eri Tollin kaltaisia reseptoreita, kuten esimerkiksi TLR5 tunnistaa bakteerin flagellan muodostavan proteiinin. (Alberts ym. 2007.) Tässä opinnäytetyössä Tollin kaltaisista reseptoreista käytetään lyhennettä TLR.

TLR9 on solunsisäinen DNA-reseptori, joka tunnistaa bakteeri-, virus- ja selkärankaisten omaa DNA:ta (Wagner 2004). TLR9 tunnistaa DNA:n metyloimattomia sytosiini-guaaniini-nukleotideja (CpG, engl. *cytosine-phosphate-guanine*), joita esiintyy runsaasti virusten ja bakteerien DNA:ssa. Nisäkkäiden CpG-DNA on suurimmaksi osaksi metyloitunutta, mikä auttaa TLR9:ää erottamaan ulkopuolisen DNA:n kehon omasta DNA:sta. Myös selkärankaisten oma DNA toimii TLR9-ligandina ihmisen autoimmuunisairauksissa, kuten psoriasiksessa ja nivelreumassa, aktivoiden tulehdustilan ja tätä kautta adaptiivisen immuunipuolustuksen. Pääasiallisesti omaa DNA:ta ei esiinny vapaana solujen ulko- tai sisäpuolella, koska nukleaasit hajottavat vapaat ja tarpeettomat nukleiinihapot. (Kerminen 2011; Wagner 2004.) Kuitenkin syövän hoidossa käytetyn kemoterapian yhteydessä tilanne on erilainen, koska kuolleista soluista peräisin olevaa omaa vapaata DNA:ta on poikkeuksellisen paljon solujen ulkopuolisessa tilassa (Tuomela ym. 2013, a).

TLR9:ää on tutkittu paljon immuunipuolustuksessa, mutta TLR9:n merkitys syövän ennusteellisena tekijänä vaikuttaa olevan kaksijakoinen (Tuomela ym. 2013, a). Useiden syöpätyyppien tiedetään ilmentävän tätä reseptoria, ja kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä matala TLR9-ekspressio on yhteydessä huonoon ennusteeseen (kuva 1). Vaikka kolmoisnegatiivisille korkean ja matalan TLR9-ekspression rintasyöpäpotilaille luokitellaan kliinisesti samankaltainen ennuste, matalan TLR9-ekspression potilaiden suhteellinen elossaolo-osuus seurantajakson aikana oli viiden vuoden kuluttua vain hieman yli 60 %, kun taas korkean TLR9-ekspression potilaiden vastaava osuus oli yli 90 %. (Tuomela ym. 2012.) Eturauhassyövässä taas päinvastaisesti korkea TLR9-

pitoisuus vaikuttaa olevan yhteydessä huonoon ennusteeseen, mutta TLR9:n mekanismi on myös tässä yhteydessä osittain epäselvä (Väisänen ym. 2013).



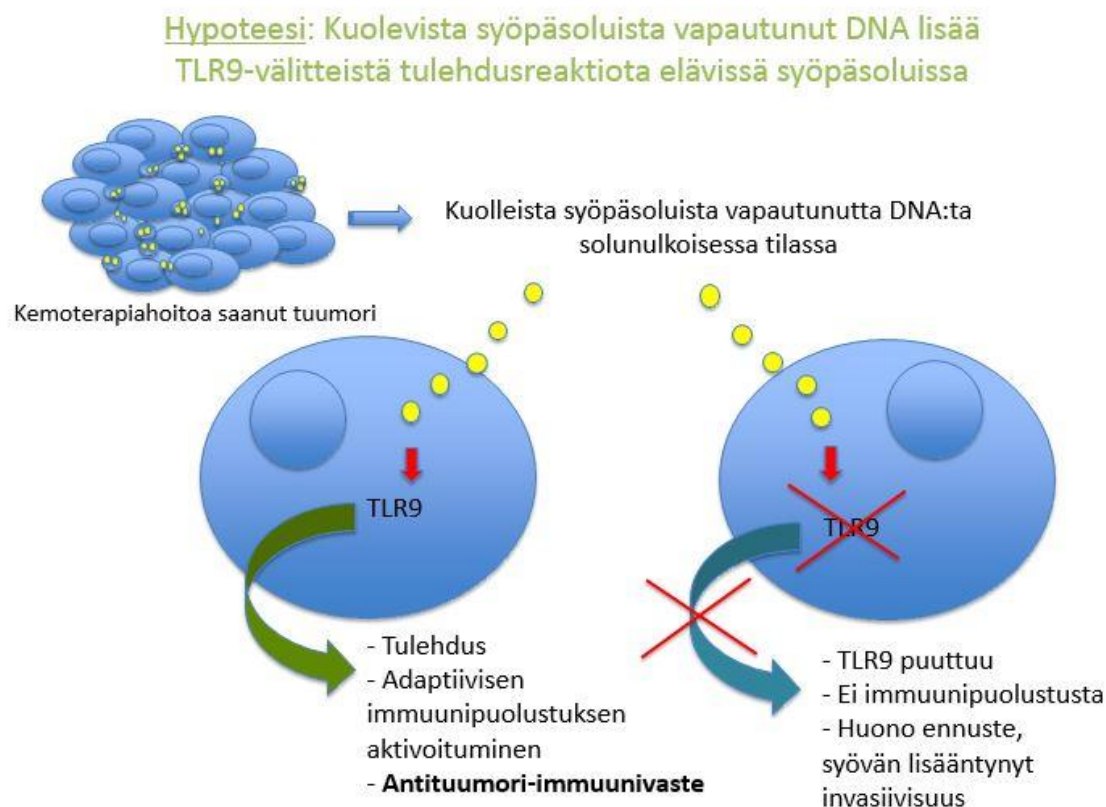
Kuva 1 Matalan TLR9-ekspression vaikutus kolmoisnegatiivisen rintasyövän suhteelliseen elossaolo-osuuteen verrattuna korkean TLR9-ekspression kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään. (Tuomela ym. 2012)

Tuomela ym. (2013, a) havainnollistivat ensimmäistä kertaa, että ainakin kolmoisnegatiivisilla rintasyöpäsoluilla TLR9-ekspressio on tärkeä immunologinen säätelijä syöpää vastaan. Synteettisten bakteerien DNA:ta muistuttavien TLR9-ligandien on osoitettu lisäävän syövän invasiivisuutta monissa eri syöpäsoluissa *in vitro*, jolloin korkean TLR9-ekspression on todettu olevan yhteydessä syövän lisääntyneeseen invasiivisuuteen. Sen sijaan TLR9:n luontaisia fysiologisia ligandeja ei ole tutkittu tätä aiemmin syövän yhteydessä,

ja ensimmäistä kertaa havaittiin kehon oman DNA:n toimivan TLR9-ligandina syövässä. Kolmoisnegatiivisissa rintasyöpäsoluissa TLR9-ligandit toimivatkin odotettua päinvastoin, koska kemoterapiaa saaneen syövän invasiivisuus kasvoi vielä enemmän TLR9-ekspression ollessa nimenomaan matala verrattuna korkean TLR9-ekspression hiirikokeissa *in vivo*. Kolmoisnegatiivisten matalan TLR9-ekspression rintasyöpäsolujen invasiivisuus ei kuitenkaan lisääntynyt soluviljelyssä *in vitro*, kun eläviä syöpäsoluja altistettiin kemoterapialla tapettujen syöpäsolujen DNA:lle, joka kulkeutui elävien syöpäsolujen sisään. (Tuomela ym. 2013, a; Tuomela ym. 2012.) Tämä viittaa siihen, että matalan TLR9-ekspression kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä invasiivisuutta voi välittää TLR9:n sijaan immuunijärjestelmän jokin toinen osa tai osat.

Kemoterapian vuoksi kuolleista syöpäsoluista vapautuu poikkeavaa biologisesti aktiivista DNA:ta, joka saattaa olla resistentti solujen ulkopuolisen tilan DNA:ta hajottavia nukleaaseja vastaan. Eri kemoterapialääkkeet voivat saada aikaan tämän erityisen nukleasiresistentin rakenteen muodostumisen. Kuolleista syöpäsoluista vapautunut oma DNA kulkeutuu elävien syöpäsolujen sisälle, jolloin tämä DNA toimii TLR9-ligandina. Korkean TLR9-ekspression soluilla kuolleista syöpäsoluista vapautunut DNA ja muut vaarasignaalit aktivoivat TLR-perhettä, jolloin synnynnäinen immuunipuolustus käynnistyy ja myöhemmin myös adaptiivinen immuunipuolustus, joka hyökkää syöpää vastaan. Immuunipuolustuksen aktivoituessa syöpää vastaan ennuste paranee, vaikka syöpäsoluista vapautunut DNA toimii TLR9-ligandina, ja toisaalta myös edistää syövän invasiivisuutta. Kemoterapiasta saattaa siis olla enemmän haittaa kuin hyötyä matalan TLR9-ekspression kolmoisnegatiivisten rintasyöpäpotilaiden tapauksessa, koska näiden potilaiden adaptiivinen ja kasvainta vastaan kohdistuva immuunipuolustus, ns. antituumori-immuunivaste, ei aktivoidu tarpeeksi mahdollisesti potilaan puutteellisen immuunivasteen vuoksi. Tällöin syövän ennuste on huono, koska potilaat eivät saavuta immunologista hyötyä kemoterapiasta ja syöpä etenee aggressiivisemmin immuunipuolustuksen hillitsemättä sitä. (Kuva 2) Sen sijaan käytössä olevat immuunijärjestelmää aktivoivat immunoterapiset liitännäishoidot voivat olla kolmoisnegatiivisille rintasyöpäpotilaille hyödyllisiä. Matalan TLR9-ekspression yhteys rintasyövän

invasiivisuuteen näytti olevan yhteydessä spesifisesti vain kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään, koska matala TLR9-ekspressio ei lisännyt hormonipositiivisten rintasyöpäsolujen invasiivisuutta *in vitro* eikä vaikuttanut kasvainten kokoon *in vivo*. (Tuomela ym. 2013, a; Tuomela ym. 2012.)



Kuva 2 Kolmoisnegatiivisen matalan TLR9-ekspression rintasyövän huonon ennusteen hypoteesi. (Mukaihen Tuomela ym. 2013, a)

2.4 Bisfosfonaatit

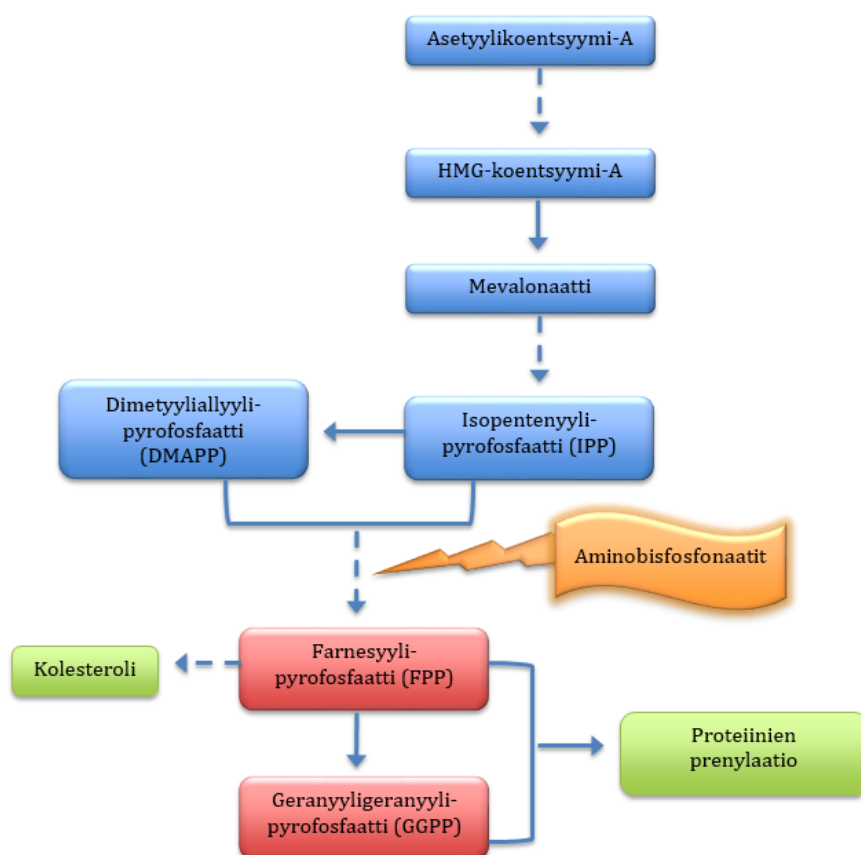
Bisfosfonaateilla tarkoitetaan inorgaanista pyrofosfaattia muistuttavia synteettisiä yhdisteitä, jotka voidaan jaotella kahteen eri pääryhmään fosfaattimolekyylien sivuketjujen rakenteen perusteella. Pyrofosfaatti on monien biosynteettisten reaktioiden sivutuote, joka estää kalkkeutumista pehmytkudoksissa, mutta epästabiliin rakenteen vuoksi se ei pääse vaikuttamaan luustoon. Bisfosfonaatit ovat laajasti käytettyjä tehokkaita lääkkeitä luuston aineenvaihduntasairauksiin,

joita ovat esimerkiksi osteoporoosi ja syövän luustoetäpesäkkeiden aiheuttamat haitalliset luustotapahtumat. Viime aikoina bisfosfonaateilla on havaittu olevan suoria vaikutuksia myös syövän kasvun hidastamiseen, mutta tarkat vaikutusmekanismit ovat vielä epäselviä ja monien tutkimusten kohteina. Non-aminobisfosfonaatit ovat ensimmäisen sukupolven bisfosfonaatteja, jotka muistuttavat rakenteeltaan luonnollista pyrofosfaattia. Aminobisfosfonaatit sisältävät sivuketjussaan aminoryhmän, joka estää luun osteoklastivälitteistä hajoamista jopa 10 000-kertaisesti non-aminobisfosfonaatteihin verrattuna. Non-aminobisfosfonaatteja ovat esimerkiksi klodronaatti ja etidronaatti, kun taas aminobisfosfonaatteja ovat esimerkiksi alendronaatti ja zoledronaatti. (Räikkönen 2011; Virtanen 2010; Vehmanen & Saarto 2010.)

Bisfosfonaattien biokemiallisen rakenteen vuoksi ne sitoutuvat voimakkaasti luuston hydroksiapatiittikiteisiin. Luuspesifisyyden vuoksi bisfosfonaatteja käytetään useimmiten osteoporoosin hoidossa, mutta bisfosfonaattien käyttö on muodostunut standardihoidoksi myös rintasyövän luustoetäpesäkkeiden hoidossa. (Vehmanen & Saarto 2010; Virtanen 2010.) Amino- ja non-aminobisfosfonaatit aiheuttavat luuta hajottavien osteoklastien inaktivaation ja lopulta apoptoosin eri mekanismien avulla. Non-aminobisfosfonaatit fagositoidaan osteoklasteihin, joissa ne metaboloituvat sytotoksisiksi ATP:n kaltaisiksi yhdisteiksi, minkä seurauksena on osteoklastien toiminnan estyminen ja lopulta apoptoosi. Aminobisfosfonaatit estävät osteoklastien kypsymistä, erilaistumista, kiinnittymistä luuhun ja proteiinien prenylaatiota vaikuttamalla osteoklastien mevalonaattireittiin, jonka lopputuloksena on myös apoptoosia aiheuttava sytotoksinen ATP-analogi. On osoitettu, että bisfosfonaatit muodostavat farmakologisten kohdesolujensa eli osteoklastien lisäksi samalla mekanismilla sytotoksisia analogeja myös syöpäsoluissa. Tosin bisfosfonaattien vaikutus eri syöpätyyppeihin on vaihtelevaa, koska erilaisilla syöpäsoluilla on monenlaisia metaboliaominaisuuksia. (Räikkönen 2011; Virtanen 2010.)

Mevalonaattireitti (kuvio 1) on tärkeä metabolinen tapahtumasarja, joka on kolesterolin biosynteesin ja tiettyjen GTP:tä sitovien proteiinien prenylaation eli proteiinisynteesin jälkeisen proteiinien toiminnallisen muokkaamisen

kannalta välttämätön. Nämä proteiinit ovat olennaisesti mukana säätelemässä syöpäsolujen proliferaatiota, selviytymistä, invaasiota ja etäpesäkkeiden muodostumista. Mevalonaattireitti on usein syöpäsoluilla yliaktiivinen, minkä vuoksi se on tärkeä kohde syöpälääkkeissä. Mevalonaattireitissä asetyyli-koentsyymi-A syntetisoituu HMG-koentsyymi-A:ksi (engl. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*), joka muuntuu entsyymien katalysoimana mevalonaatiksi. Mevalonaatti metaboloituu isopentenyylipyrofosfaatiksi (IPP) ja sen isomeeriksi, dimetyyliallyylipyrofosfaatiksi (DMAPP). Yhdessä nämä syntetisoivat farnesyylipyrofosfaattia (FPP), josta muodostuu edelleen geranyyligeranyylipyrofosfaattia (GGPP). Molempia välituotteita, FPP:a ja GGPP:a, tarvitaan proteiinien prenylaatioon. Aminobisfosfonaattien vaikutus perustuu FPP:n synteessin estämiseen, jolloin soluihin kertyneestä IPP:sta muodostuu sytotoksinen ATP-analogi, joka vaikuttaa syöpäsolujen proliferaatioon ja migraation vähenemiseen sekä aiheuttaa apoptoosia. Aminobisfosfonaateilla voi olla myös kasvainta vastaan kohdistuvia immuunipuolustusvaikutuksia, koska zoledronaatin on myös osoitettu aktivoivan T-soluja eturauhas- ja rintasyövässä syöpäsolujen mevalonaattireitin estyessä. (Thurnher, Gruenbacher & Nussbaumer 2013; Thurnher, Nussbaumer & Gruenbacher 2013; Räikkönen 2011; Tuomela 2009.)



Kuvio 1. Aminobisfosfonaattien vaikutus mevalonaattireittiin. (Mukaihen Thurnher, Nussbaumer, & Gruenbacher 2013; Buhaescu & Izzedine 2007)

Bisfosfonaattien molekyyli-tason vaikutusmekanismia syöpäsoluihin ei ole tutkittu paljon, ja saadut tulokset ovat monimutkaisia. Viime vuosikymmenen aikana on keskitytty tutkimaan enemmän aminobisfosfonaattien vaikutusta erilaisissa syöpäsoluissa non-aminobisfosfonaattien sijaan. Useissa tutkimuksissa on osoitettu, että aminobisfosfonaatit aiheuttavat eturauhas- ja rintasyöpäsolujen apoptoosia *in vitro* ja estävät rintasyöpäsolujen kasvua. Zoledronaatin on osoitettu estävän ihmisen MDA-MB-231-rintasyöpäsolujen kasvua pysäyttämällä solusykli G1/S-vaiheeseen sekä estävän etäpesäkkeiden muodostumista sisäelimiin hiiren rintasyöpämallissa *in vivo*. (Virtanen 2010; Merrell ym. 2007.) On myös viitteitä siitä, että matalan TLR9-ekspression kolmoisnegatiivisilla rintasyöpäsoluilla ja kokeellisilla kasvaimilla on hyvä vaste aminobisfosfonaattihoitoon (Tuomela, sähköpostiviesti 8.2.2015).

Bisfosfonaatteja annostellaan yleensä suonensisäisesti tai oraalisesti, mutta ne imeytyvät hyvin huonosti suolistosta biologisen hyötysuhteen ollessa käytännössä vain < 2 %. Vereen imeytyneestä osuudesta puolet hakeutuu heti luustoon, ja puolet poistuu virtsan mukana. Luuhun palautumattomasti sitoutuneiden bisfosfonaattien puoliintumisaika on yli 10 vuotta, joten lääkityksen haitat voivat ilmetä siis pitkälläkin viiveellä. (Räikkönen 2011; Nurmenniemi, Hannonen & Tuovinen 2007.) Bisfosfonaatit ovat yleensä hyvin siedettyjä lääkkeitä, mutta aminobisfosfonaattien, kuten zoledronaatin, on havaittu aiheuttavan pitkäaikaiskäytössä hyvin harvinaisena (0,1 %) haittavaikutuksena leukaluun nekroosia. Tietyt riskitekijät, kuten tupakointi ja invasiiviset hammasoperaatiot, voivat nostaa riskiä jopa 10 %:iin asti. (Virtanen 2010; Tuomela 2009.) Bisfosfonaattien pitkäaikaiskäytöllä on myös epäilty olevan yhteys vakaviin epätavallisiin reisiluun murtumiin (Uutispalvelu Duodecim 2012). Nykyaikaisen nanoteknologian avulla voidaan kuljettaa lääkeaineita nanopartikkeleihin pakattuna kohdekudokseen, jolloin hoitomuoto on tehokkaampi, turvallisempi ja edullisempi muihin annostelutapoihin verrattuna. Nanolääkkeitä tutkitaan jatkuvasti myös syövän hoidossa. (Rosenholm, Mamaeva, Sahlgren & Lindén 2012; Virtanen 2010.) Myös aminobisfosfonaattien, kuten zoledronaatin, annostelu nanolääkkeenä on tutkimuksen kohteena parasta aikaa (Sandholm, sähköpostiviesti 16.1.2015).

2.5 Kofiliini

Solun tukiranka koostuu kolmentyyppisistä proteiinisäiejärjestelmistä: mikrotubuluksista, välikokoisista säikeistä ja mikrofilamenteista. Nämä kaikki toimivat yhteistyössä säädellen solun muotoa, liikettä ja soluorganellien paikkaa solussa. Mikrofilamenttien dynaaminen toiminta on perustana solujen liikkumiseen kudoksissa. Mikrofilamentit muodostuvat pallomaisesta proteiinista, aktiinista, jota on kahdentyyppistä: monomeeristä G-aktiinia (engl. *globular*) ja säikeessä olevaa F-aktiinia (engl. *filamentous*). Yksittäiset pallomaiset G-aktiinit muodostavat säikeistä F-aktiinia, jolla on positiivinen ATP-pää ja negatiivinen ADP-pää ATP:n hydrolysoituessa ADP:ksi. Aktiiniin sitoutuu

erilaisia proteiineja, jotka säätelevät aktiinisäikeiden jatkuvan muodostumisen ja hajoamisen tasapainoreaktiota sen molemmista päistä. (Heino & Vuento 2009.)

Yksi näistä aktiinia säätelevistä keskeisistä proteiineista on kofiliini, joka katkaisee aktiinisäikeitä negatiivisesta ADP-päästä. Kofiliini sitoutuu pitkin aktiinifilamenttia ja pakottaa sen kietoutumaan tiukemmin, jolloin kiertymisestä aiheutuvan mekaanisen rasituksen vuoksi filamentista tulee hauraampi ja helpommin katkaistava. (Alberts ym. 2007.) Kofiliini-proteiiniperheeseen kuuluvat kolme hyvin samankaltaista ryhmää: kofiliini-1, kofiliini-2 ja ADF (engl. *actin depolymerizing factor*). Kofiliini-2 esiintyy lihassoluissa, kofiliini-1 muissa soluissa ja ADF erityisesti epiteeli- ja endoteelisoluissa. Kofiliiniperheestä käytetään usein yhteisnimitystä ADF/kofiliini kofiliinien ja ADF:n niiden samankaltaisuuden vuoksi. (Virtanen 2010.) Tässä opinnäytetyössä kofiliineista käytetään selvyden vuoksi pelkistetympää yhteisnimitystä kofiliini. Monien syöpäsolujen tiedetään yliekspressoivan kofiliinia, mikä tekee niistä invasiivisempia (Virtanen 2010).

Virtanen (2010) tutki väitöskirjatyössään bisfosfonaattien vaikutusta eturauhassyöpäsoluihin *in vivo* ja *in vitro*. Tutkimuksessa selvitettiin erityisesti alendronaatin vaikutusta solun aktiinitukirangan säätelyyn osallistuvien proteiinien, kuten kofiliinin, toimintaan. Tutkimuksessa todettiin, että alendronaatti esti eturauhassyöpäsolujen tarttumista, invaasiota ja migraatiota *in vitro*. Myös solun aktiinitukiranka hajosi alendronaatin vaikutuksesta, ja kofiliinin määrä väheni sekä eturauhassyöpäsoluista että kokeellisista eturauhassyöpäkasvaimista. Alendronaatin on myös havaittu estävän eturauhassyövän leviämistä häiritsemällä kofiliinin säätelyä ja täten solun tukirangan järjestäytymistä (Virtanen ym. 2014, julkaisematon). Koska Virtasen väitöskirjatyön julkaisuvuonna 2010 eikä tälläkään hetkellä ole vielä tiedossa tehokasta hoitoa pitkälle levinneeseen eturauhassyöpään, aminobisfosfonaatteja voidaan harkita Virtasen tutkimuksen perusteella eturauhassyövän leviämistä estäviksi lääkkeiksi (Eturauhassyöpä: Käypä hoito -suositus 2014; Virtanen 2010).

3 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITTEET JA TEHTÄVÄT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia bisfosfonaattien vaikutusta eturauhassyöpään ja kolmoisnegatiiviseen matalan TLR9-ekspression rintasyöpään *in vitro* ja *in vivo*. Opinnäytetyön tutkimuksissa käytettiin kahta kaupallista solulinjaa, ihmisen eturauhassyöpäsoluja (PC-3) ja hiiren kolmoisnegatiivisia rintasyöpäsoluja (4T1), sekä San Antoniosta lahjoituksena saatuja ihmisen kolmoisnegatiivisia korkean TLR9-ekspression rintasyöpäsoluja, MDA-MB-231(SA), jotka on jalostettu luuhakuisiksi. Matala TLR9-ekspressio saatiin MDA-MB-231(SA)-soluihin hiljentämällä stabiilisti TLR9-ekspressio siRNA-tekniikalla (siRNA, engl. *small interfering RNA*). Opinnäytetyön tutkimukset koostuvat kahdesta erillisestä projektista, eturauhassyöpäprojektista ja rintasyöpäprojektista.

Tutkimusten tavoitteena oli saada tutkimustuloksia bisfosfonaattien vaikutuksesta eturauhassyöpään ja kolmoisnegatiiviseen matalan TLR9-ekspression rintasyöpään, jotka toistavat julkaistavaan artikkeliin tehtyjä tutkimuksia ja selvittävät matalan TLR9-ekspression merkitystä bisfosfonaattien vaikutuksen kannalta. Tutkimustehtävät on jaoteltu erikseen eturauhassyöpä- ja rintasyöpäprojektien mukaisesti.

A) Eturauhassyöpäprojekti

1. Hiirikoe

Tutkimustehtävä: Istutetaan immunopuutteisiin *athymic nude* -uroshiiriin PC-3-soluja, ja PC-3-kasvainten muodostuttua hiiret jaetaan kasvainten kokojen perusteella kahteen ryhmään. Puolille hiiristä injektoidaan alendronaattiliuosta ja lopuille fosfaattipuskuria

(PBS). Hiirten painon ja kasvainten koon muutoksia seurataan 2–3 päivän välein.

Hypoteesi: Alendronaattihoidon pitäisi hidastaa kasvainten kasvua kontrolliryhmään verrattuna.

2. Western blot

Tutkimustehtävä: Vertaillaan eri PC-3-solujen kofiliinipitoisuutta eri vahvuisten alendronaattikäsittelyjen jälkeen Western blot -menetelmän avulla. Tutkittaviin PC-3-soluihin kuuluvat normaalia kofiliinitasoa ekspressoiva kontrolliryhmä (mock) ja kofiliiniryhmä, jonka PC-3-solut ovat transfektoitu yliekspressoimaan kofiliinia.

Hypoteesi: Ainakin vahvimman alendronaattikonsentraation pitäisi vähentää kofiliinin määrää PC-3-soluissa.

B) Rintasyöpäprojekti

1. Hiirikoe

Tutkimustehtävä: BALB/c-naarashiiret jaetaan painon mukaan kontrolliryhmään ja matalan TLR9-ekspression ryhmään. Kontrolliryhmälle istutetaan hiiren kolmoisnegatiivisia 4T1-soluja, jotka on transfektoitu stabiilisti Ctrl siRNA:lla. Matalan TLR9-ekspression ryhmän hiirille istutetaan 4T1-soluja, jotka on transfektoitu stabiilisti TLR9 siRNA:lla. Hiirten painon ja kasvainten koon muutoksia seurataan 2–3 päivän välein.

Hypoteesi: TLR9 siRNA -hiirten kasvainten pitäisi kasvaa nopeammin ja aggressiivisemmin Ctrl siRNA -hiirten kasvaimiin verrattuna.

2. IncuCyte

Tutkimustehtävä: Viljellään MDA-MB-231(SA)-soluja, jotka on transfektoitu stabiilisti Ctrl siRNA:lla ja TLR9 siRNA:lla. Solut siirretään 96-kuoppalevyille, jossa osaa soluista käsitellään eri vahvuusil-

la klodronaatti- ja zoledronaattipitoisuuksilla. Tutkitaan näiden bisfosfonaattien vaikutusta solujen kasvuun IncuCyte-kuvantamislaitteen avulla.

Hypoteesi: Ainakin vahvimman zoledronaattipitoisuuden pitäisi estää MDA-MB-231(SA)-solujen kasvua.

3. Cell Counting Kit-8 (CCK-8)

Tutkimustehtävä: Tutkitaan samojen 96-kuoppalevyllä olevien MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen elinkykyisyyttä eri vahvuisten klodronaatti- ja zoledronaattikäsittelyjen jälkeen kaupallisella Cell Counting Kit-8:lla.

Hypoteesi: Ainakin vahvimman zoledronaattipitoisuuden pitäisi heikentää MDA-MB-231(SA)-solujen elinkykyisyyttä.

4. Virtaussytometria

Tutkimustehtävä: Viljellään MDA-MB-231(SA)-soluja, jotka on transfektoitu stabiilisti Ctrl siRNA:lla ja TLR9 siRNA:lla. Solut siirretään 6-kuoppalevyille, joissa osaa soluista käsitellään eri vahvuisilla zoledronaattipitoisuuksilla. Tutkitaan zoledronaatin vaikutusta MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen solusykliin analysoidulla solut FACSCalibur-virtaussytometrillä.

Hypoteesi: Ainakin vahvimalla zoledronaattipitoisuudella käsiteltyjen solujen solusyklin pitäisi pysähtyä G1/S-vaiheeseen.

4 OPINNÄYTETYÖN KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS

4.1 Toteutussuunnitelma

Tutkimuslupa opinnäytetyölle haettiin ja saatiin bioanalytikkokoulutuksen koulutuspäällikkö Leila Tiilikalta keväällä 2014. Opinnäytetyö toteutettiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen solubiologian ja anatomian oppiaineessa toimivissa dosentti Johanna Tuomelan ja professori Pirkko Härkösen tutkimusryhmissä. Opinnäytetyön kokeellinen osuus toteutettiin pääasiallisesti Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen solubiologian ja anatomian oppiaineen sekä Turun yliopiston koe-eläinkeskuksen tiloissa keväällä 2014, ja opinnäytetyö valmistui talvella 2015. Opinnäytetyön lähtökohdista olivat parasta aikaa meneillä oleva tutkimus bisfosfonaattien vaikutuksesta kolmoisnegatiiviseen matalan TLR9-ekspression rintasyöpään, Virtasen (2010) väitöskirjatutkimuksen tulokset ja Virtasen ym. (2014) tekeillä oleva julkaisematon artikkeli. Bisfosfonaattien vaikutuksia eturauhassyöpä- ja kolmoisnegatiivisiin rintasyöpäsoluihin tutkittiin käyttämällä erilaisia solu- ja molekyylibiologian menetelmiä. Opinnäytetyön tekeminen ei aiheuttanut kustannuksia opinnäytetyön tekijöille, mutta kohtuullisia kustannuksia aiheutui opinnäytetyön tarjoavalle organisaatiolle. Opinnäytetyön toimeksiantajina toimivat Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen solubiologian ja anatomian oppiaineen dosentti Johanna Tuomela ja biolääketieteen laitosjohtaja professori Pirkko Härkönen. Opinnäytetyön ohjaajana toimi bio- ja elintarviketekniikan yliopettaja Ilari Suominen. Opinnäytetyön tekijöiden, toimeksiantajan ja ohjaavan opettajan kanssa tehtiin opinnäytetyön toimeksiantosopimus (liite 1). Opinnäytetyön tekijät toimivat tiiviissä yhteistyössä niin teoreettisessa kuin kokeellisessakin osuudessa, joten tekijöiden eri osuuksia ei voida opinnäytetyössä varsinaisesti eritellä.

4.2 Metodologiset lähtökohdat

Kvantitatiivisen eli määrällisen tutkimusmenetelmän tavoitteena on selittää ihmisen toimintaa numeraalisesti, teknisesti ja kausaalisesti. Kvantitatiivinen

tutkimusmenetelmä ei ole kiinnostunut aineiston poikkeavuuksista, vaan ne karsiutuvat tutkimuksessa pois. (Vilka 2005.) Kvantitatiivisessa tutkimuksessa keskeisiä asioita ovat johtopäätökset aiemmista tutkimuksista ja teorioista, esitetyt hypoteesit ja käsitteiden määrittely. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa päätelmien teko perustuu havaintoaineiston tilastolliseen analyysiin, koska muuttujat muodostetaan taulukkomuotoon, ja aineisto muunnetaan tilastollisesti käsiteltävään muotoon. Kootusta ja käsitellystä havaintoaineistosta tehdään päätelmiä tilastolliseen analysointiin perustuen, ja myös tulosten merkitsevyyttä testataan tilastollisesti. Aineiston keruun suunnitelmassa otetaan huomioon, että havaintoaineisto soveltuu määrälliseen, numeeriseen mittaamiseen. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2004.) Tämä opinnäytetyö on kvantitatiivinen opinnäytetyö, koska opinnäytetyön tutkimusaineisto soveltuu numeeriseen mittaamiseen, ja sen analysoimiseen käytettiin tilastollisia analyysimenetelmiä. Tutkimusaineiston valinta perustui aiempiin tutkimuksiin ja hypoteeseihin, ja osa tutkimuksista on toistettu aiemmin.

4.3 Eettiset lähtökohdat

Opinnäytetyön tutkimusluvut ovat osana Johanna Tuomelan ja Pirkko Härkösen tutkimusryhmien tutkimuslupia. Opinnäytetyössä tehtiin tutkimukseen liittyviä eläinkokeita viranomaisen hyväksymissä ja valvomissa laitoksissa koe-eläinhiirillä. Opinnäytetyön tekijät eivät itse käsitelleet hiiriä, koska opinnäytetyön tekijöillä ei ollut tutkimusten tekohetkellä lain tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta (497/2013) edellyttämää pätevyyttä. Eläinkokeet tehtiin noudattaen 3 R:n sääntöä, mikä tarkoittaa mahdollisimman vähän eläimille haittaa aiheuttaen (engl. *refinement*), tutkimuksen suorittamista mahdollisimman pienellä eläinmäärällä (engl. *reduction*), ja eläinkoe korvataan aina toisella menetelmällä, kun mahdollista (engl. *replacement*) (Turun yliopiston koe-eläinkeskus 2015). GMO II-jätteet hävittiin asianmukaisesti geenitekniikkalain 377/1995 mukaisesti, ja soluviljelyssä käytettiin vain kaupallisia solulinjoja. Opinnäytetyön kirjoittamisessa kunnioitettiin muiden tutkijoiden tekemää työtä merkitsemällä lähdeviitteet asianmukaisesti plagioimatta muiden tekstejä. Opinnäytetyölle tehtiin asianmukainen tutkimus-

suunnitelma, ja toteutusvaiheet kirjattiin laboriopiiväkirjaan. Opinnäytetyö tehtiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä noudattaen, eli sen tekemisessä noudatettiin rehellisyyttä, tarkkuutta ja huolellisuutta kaikissa tutkimuksen vaiheissa ja tulosten käsittelyssä. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2012.) Laboriopiiväkirjien säilytetään yli vuoden ajan tutkimuksen päättymisestä.

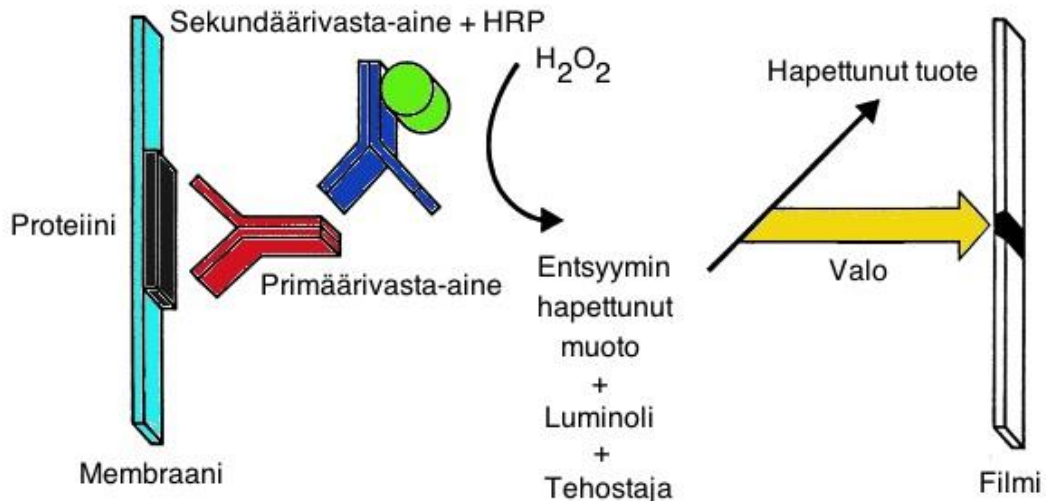
5 TUTKIMUKSISSA KÄYTETYT MENETELMÄT

5.1 Western blot

Western blot eli immunoblottaus on menetelmä, jonka avulla haluttu kohdeproteiini tunnistetaan spesifisten vasta-aineiden avulla (Thorpe & Thorpe 2005). Proteiinit siirretään elektroforeettisesti SDS-PAGE:n (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) avulla geeliltä huokoiselle membraanille ja tunnistetaan vasta-aineiden avulla. Membraanimateriaaleina käytetään useimmiten nitroselluloosaa tai polyvinyylideenifluoridia (PVDF). Materiaalin valinta riippuu proteiinin sitomiskyvystä. (Westermeier 2011.) Proteiinin kolmiulotteinen rakenne täytyy ensin avata eli denaturoida ennen SDS-PAGE-ajoa, jotta proteiiniin sitoutuva vasta-aine voisi kiinnittyä siihen. Tämä saadaan aikaan kuumentamalla näytettä ensin SDS:a sisältävässä näytepuskurissa ja β -merkaptotoetanolissa, joka hajottaa proteiinien rakenteiden väliset rikkisillat. SDS ympäröi proteiinin ja tekee siitä negatiivisesti varautuneen. Näytteet ajetaan kokomarkkerin kanssa, jonka avulla voidaan arvioida tutkittavan proteiinin kokoa. Geelillä olevien näytteiden tasaisen lataamisen varmistamiseksi voidaan käyttää eri latauskontrolleja, kuten α -tubuliinia. (Abcam 2014.)

Jotta vasta-aineet eivät sitoudu membraaniin kohdeproteiinin sijaan, blokataan epäspesifinen sitoutuminen ensin blokkauspuskurilla, joka voi olla esimerkiksi maitojauheliuos (Westermeier 2011). Primäärivasta-aine laimennetaan sopivassa suhteessa, jotta liika vasta-ainemäärä ei aiheuta epäspesifisiä vyöhykkeitä. Jos membraanien primäärivasta-aineinkubaatio tapahtuu blokkauspuskurissa yön yli, on inkubointilämpötilan oltava $+4\text{ C}^\circ$ proteiineja tuhoavien kontaminaatioiden estämiseksi. (Abcam 2014.) Proteiinien havaitseminen membraanilta voidaan tehdä sekundäärisen vasta-aineen avulla, joka on päällystetty esimerkiksi entsyymillä (Thorpe & Thorpe 2005). Entsyymileimaisena sekundäärivasta-aineena voidaan käyttää piparjuuriperoksidaasia (HRP,

engl. *horseradish peroxidase*), joka voidaan havaita ECL-reagenssien avulla (Abcam 2014). ECL-reaktiossa (engl. *enhanced chemiluminescence*) eli tehostetussa kemiluminesenssireaktiossa saadaan kemiallisen reaktion avulla sinistä valoa aallonpituudella 428 nm. Vetyperoksidi (H_2O_2) muuttaa HRP:n hapetettuun muotoon, joka katalysoi luminolin hapettumista kemiallisten tehostajien, kuten fenolien, avulla, jolloin saadaan hapettunut tuote ja valoa (kuva 3). Kemiallinen tehostaja lisää valon säteilyä noin 1000-kertaisesti ja pidentää kemiluminesenssireaktion aikaa merkittävästi verrattuna tehostamattomaan kemiluminesenssiin. Lopuksi syntynyt valo havaitaan esimerkiksi röntgenfilmin avulla. (GE Healthcare 2009.)

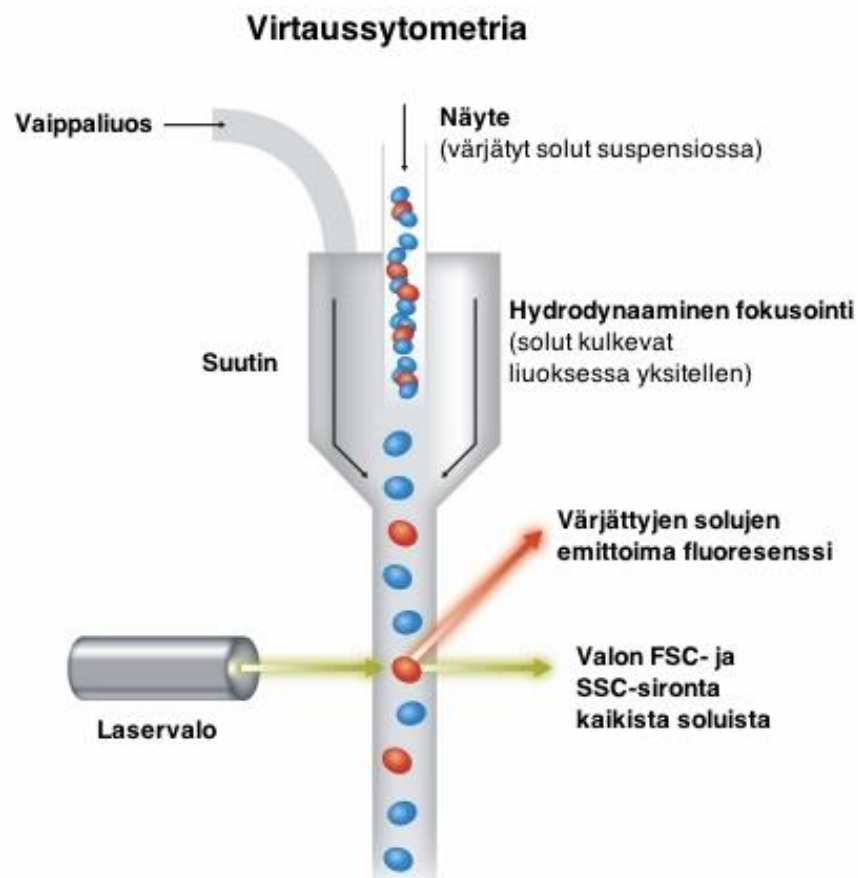


Kuva 3 ECL-reaktion periaate Western blot -menetelmässä. (Mukaan GE Healthcare 2009)

5.2 Virtaussytometria

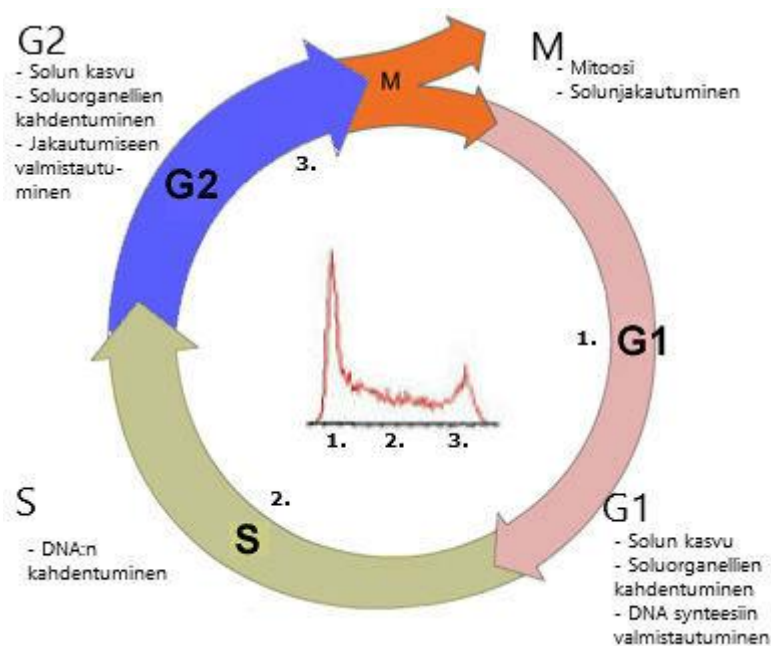
Virtaussytometria on partikkelien, pääasiassa solujen, fysikaalisten ominaisuuksien mittaukseen ja analysointiin käytettävä tekniikka, joka perustuu yksittäisten partikkelien virtaamiseen virtaussytometrissä nestepatsaan sisällä valonsäteen läpi. Soluja sisältävä näyteliuos syötetään virtaussytometriin, jossa solut ohjataan kulkemaan yksitellen hyvin pienen suuttimen ja vaippaliuoksen (engl.

sheath fluid) avulla. Tätä kutsutaan hydrodynaamiseksi fokusoinniksi. Partikkelin emittoima fluoresenssi, ja siitä siroavat valonsäteet mitataan eri aallonpituuksilla, jolloin saadaan tietoa partikkelin suhteellisesta koosta, granulaarisuudesta tai sisäisistä rakenteista, ja sen emittoiman fluoresenssin voimakkuudesta. (Abcam 2010.) Siroava laservalo mitataan yleensä kahden eri kanavan kautta, joista FSC (engl. *forward scattered light*) mittaa partikkelista kohtisuoraan siroavat valonsäteet ja SSC (engl. *side scattered light*) mittaa valonsäteet 90 asteen kulmassa partikkelista. Partikkelista kohtisuoraan siroava valo on suhteessa sen koon kanssa ja 90 asteen kulmassa mitattu valo antaa tietoa partikkelin monimutkaisuudesta ja rakenteesta. Muita käytettäviä mittauskanavia ovat FL1, FL2, FL3 ja FL4, jotka mittaavat partikkelin emittoimaa fluoresenssiä. (Shevach 2005.) Virtausytometrian periaate on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Virtausytometrian periaate. (Mukaiillen Abcam 2010)

Virtaussytometrian DNA-analyysin avulla voidaan mitata yksittäisten solujen sisältämää DNA:n määrää. Analyysin avulla saadaan tietoa solun ploidisuudesta, ja solujen jakautumisesta solusyklin eri vaiheisiin (kuva 5) tietyn solupopulaation osalta. Solut värjätään fluorokromilla, joka sitoutuu DNA:han, ja jonka määrä on siten verrannollinen solujen sisältämän DNA:n määrään. Yleisimmin käytetty DNA:han sitoutuva fluorokromi on propidium jodidi (PI). (Ormerod 2008.)



Kuva 5. Eukaryoottisolun solusyklin vaiheet virtaussytometrin kuvaajassa. (Mukailtu Karns 2014 & Ormerod 2008)

5.3 Hiirikokeet

Athymic nude -hiiri on yleisesti käytetty *in vivo* -koe-eläinmalli, jota käytetään esimerkiksi onkologisissa, immunologisissa ja muissa biolääketieteellisissä tutkimuksissa (The Jackson Laboratory 2014; Harlan Laboratories 2009). *Athymic nude* -hiirillä on *nu*-geenin resessiivinen mutaatio, jonka seurauksena hiiret ovat karvattomia, ja niiltä puuttuu kateenkorva. Kateenkorvan puuttuminen aiheuttaa hiirille immuunipuutoksen, koska T-solut eivät kehity esiasteita

pidemmälle. (The Jackson Laboratory 2014.) Hiirten B-solut toimivat sen sijaan normaalisti. T-solujen puutoksen vuoksi hiirillä ei tapahdu käänteishyljintää (GVHD, engl. *graft-versus-host-disease*), joten niihin voidaan istuttaa saman lajin välisiä vierassiirteitä eli allografteja tai jopa eri lajien välisiä siirteitä, ksenografteja. *Athymic nude* -hiirimallin avulla voidaan tutkia esimerkiksi alendronaattilääkityksen hoitovaikutusta ihmisen ksenograftikasvaimeen hiiressä. (Harlan Laboratories 2009.)

BALB/c-hiiret ovat albiinoja, immunokompetentteja eli normaalin immuniteetin omaavia hiiriä, joita käytetään esimerkiksi syövän hoitoon ja immunologiaan liittyvissä tutkimuksissa. Ominaista näille hiirille on urosten ja naaraiden välisten painojen minimaalinen vaihtelu, kohonnut herkkyys karsinogeneille ja toisaalta alentunut herkkyys maitorauhaskasvaimien muodostamiseen. BALB/c-hiiriin istutetut hiiren kolmoisnegatiiviset 4T1-maitorauhaskasvainsolut muodostavat syngeneisia kasvaimia. Syngeneisillä kasvaimilla tarkoitetaan siirrettävän materiaalin olevan peräisin geneettisesti lähes identtisestä lähteestä, kuten tässä opinnäytetyössä BALB/c-hiiriin istutettava solulinja oli peräisin BALB/c-hiirestä. Mallin etuna on mahdollisuus tutkia immuniteetin vaikutusta syövän etenemisessä. 4T1-kasvaimet muistuttavat ominaisuuksiltaan ja etäpesäkkeiden muodostumismekanismeiltaan hyvin läheisesti ihmisen kolmoisnegatiivista rintasyöpää. Kasvaimet kehittävät usein etäpesäkkeitä keuhkoihin, maksaan, imusolmukkeisiin ja aivoihin. (Tuomela, sähköpostiviesti 8.2.2015; ATCC® 2014, a; Johnson 2014.)

6 TUTKIMUSTEN KOKEELLINEN SUORITUS

6.1 Eturauhassyöpäprojekti

Opinnäytetyön eturauhassyöpäprojektissa tutkittiin alendronaatin vaikutusta ihmisen PC-3-eturauhassyöpäsoluihin *in vitro* ja PC-3-eturauhassyöpäkasvaimiin *in vivo*. *In vitro* -tutkimuksessa Johanna Tuomelan transfektoimia PC-3 mock- ja PC-3 kofiliini -soluja käsiteltiin eri vahvuisilla alendronaattipitoisuuksilla, ja alendronaatin vaikutusta solujen kofiliiniekspressioon analysoitiin Western blot -menetelmällä. PC-3-eturauhassyöpäsolut muodostivat kasvaimia hiiriin, minkä jälkeen tutkittiin alendronaattihoidon vaikutusta kasvaimiin. Koe-eläintutkimukset suoritettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksen tiloissa, ja koe-eläimiä käsitelivät vain lain vaatiman koe-eläinurssin suorittaneet henkilöt eli dosentti Johanna Tuomela ja laborantti Jaakko Lehtimäki. Eturauhassyöpäprojektissa käytetyt reagenssit koottiin reagenssiluetteloon (liite 2).

6.1.1 Hiirikoe

Eturauhassyöpäprojektin hiirikokeessa seurattiin ja analysoitiin alendronaattihoidon vaikutusta *in vivo*. Koe-eläiminä käytettiin 16:a *athymic nude* -hiirtä, joihin istutettiin ihonalaisesti 1,28 miljoonaa ihmisen PC-3-eturauhassyöpäsolua. Eturauhassyöpäsolut muodostivat hiirille kasvaimia, joiden kokojen perusteella hiiret satunnaistettiin neljään häkkiin. Kuhunkin häkkiin sijoitettiin neljä korvamerkittyä hiirtä. Hiiret jaettiin kahteen ryhmään niiden saaman hoidon mukaan, joka aloitettiin 16. päivänä kokeen käynnistymisestä. Kontrolliryhmän hiiret saivat viisi kertaa viikossa 100 µl PBS-liuosta, joka injektoidiin hiiren vatsaonteloon (*i.p.*, intraperitoneaalisesti). Puolet hiiristä sai viisi kertaa viikossa yhtä suuren tilavuuden (0,025 mg/100 µl PBS) alendronaattiliuosta samalla tavalla annosteltuna. Hiiret punnittiin, ja niiden vointia sekä kasvainten kokojen muutoksia seurattiin. Kasvaimet mitattiin pituus- ja

leveyssuunnassa 2–3 päivän välein koko tutkimuksen keston eli 29 päivän ajan. Opinnäytetyössä ei käsitellä hiirten painodataa.

6.1.2 Western blot

Johanna Tuomela oli transfektoinut PC-3-solut Fugene-menetelmällä yliekspressoimaan kofiliinia. Kontrollisoluina toimivat Johanna Tuomelan transfektoimat PC-3 mock -solut, jotka ekspressoivat kofiliinia normaalisti. Johanna Tuomela oli käsitellyt sekä PC-3 mock- että PC-3 kofiliini -soluja eri vahvuisilla alendronaattiliuoksilla, joiden konsentraatiot näkyvät taulukoissa 1 ja 2. Käsitelyn jälkeen solut kerättiin RIPA-puskuriin (engl. *radioimmunoprecipitation assay buffer*), ja niitä säilytettiin -20 °C:ssa. Puskuroidut näytteet otettiin pakkasesta sulamaan huoneenlämpöön jäämurskan joukkoon. Näytteisiin pipetoitiin 0,5 µl β-merkaptotetanolia, ja niitä kuumennettiin +95 °C:ssa lämpöblokkissa viiden minuutin ajan. Näytteitä pyöräytettiin lyhyesti sentrifugissa, jotta saatiin kuumennuksessa räiskyneet pisarat kannesta putkeen. Alageelin vahvuus valittiin Western blot -työohjeen mukaisesti kohdeproteiinin koon perusteella (liite 3, työohje 1). Kohdeproteiini kofiliini on noin 20 kDa:n kokoinen, joten geelin vahvuudeksi valittiin tällä perusteella 15 %. Ylä- ja alageelit valmistettiin työohjeen mukaisesti (liite 3, työohjeet 2 ja 3). Valmiit 1,00 mm paksuiset 15 % alageelit asetettiin Bio-Radin geelinajolaitteeseen, joka täytettiin ajopuskurilla. Näytteet pipetoitiin ylägeelien näytekaivoihin taulukoiden 1 ja 2 osoittamalla tavalla.

Taulukko 1. Western blot: PC-3 mock -näytteiden pipetointijärjestys.

Geeli 1		
Kaivon numero	Näyte	Näytemäärä
2	Kokomarkkeri	5 µl
3	PC-3 mock kuljetin	20 µl
4	PC-3 mock 10 ⁻⁴ M ALN	20 µl
5	PC-3 mock 10 ⁻⁵ M ALN	20 µl
6	PC-3 mock 10 ⁻⁶ M ALN	20 µl
7	PC-3 mock 10 ⁻⁷ M ALN	20 µl
8	PC-3 mock 10 ⁻⁸ M ALN	20 µl

Taulukko 2. Western blot: PC-3 kofiliini -näytteiden pipetointijärjestys.

Geeli 2		
Kaivon numero	Näyte	Näytemäärä
3	Kokomarkkeri	5 µl
4	PC-3 kofiliini kuljetin	20 µl
5	PC-3 kofiliini 10 ⁻⁴ M ALN	20 µl
6	PC-3 kofiliini 10 ⁻⁵ M ALN	20 µl
7	PC-3 kofiliini 10 ⁻⁶ M ALN	20 µl
8	PC-3 kofiliini 10 ⁻⁷ M ALN	20 µl
9	PC-3 kofiliini 10 ⁻⁸ M ALN	20 µl

Ajolaitteisto kytkettiin Bio-Radin Power Basic -virtalaitteeseen. Geelejä ajettiin 90 voltin jännitteellä noin 20 minuuttia ja 140 voltin jännitteellä noin 50 minuuttia. Virta katkaistiin, kun kokomarkkerien ja vyöhykkeiden väririntamat erottuivat kokonaan geelien alaosista. Uusi astia täytettiin siirtopuskurilla, ja karhunkielet sekä suodatinpaperit laitettiin imeytymään siirtopuskuriin. PVDF-membraania imeytettiin ensin minuutin ajan absoluuttisessa etanolissa, minkä

jälkeen membraani siirrettiin ddH₂O:hon. Proteiinien siirtoa varten koottiin proteiinitransferi työohjeen mukaisesti (liite 3, työohje 4.) Proteiinitransferi asetettiin siirtolaitteeseen astiaan, joka täytettiin siirtopuskurilla, ja pohjalle lisättiin magneetti sekä jäähdytyslementti. Siirtolaite asetettiin jäihin styrokso-laatikkoon magneettisekoittajan päälle. Proteiinit siirrettiin geeleiltä membraaneille kytkemällä siirtolaite virtalaitteeseen, jonka jännitteeksi säädettiin 100 voltia tunnin ajaksi.

Blokkauspuskuri (5 % maito-TBS-T 0,1 %) jaettiin kahteen 50 ml:n putkeen. Molempiin putkiin laitettiin PVDF-membraani, johon proteiinit olivat kiinnittyneet geeliltä siirron aikana. Membraaneja inkuboitiiin rullasekoittajassa noin kahden tunnin ajan huoneenlämmössä. Jäinen primäärivasta-aineliuos (Abcam cofilin 5 % maito-TBS-T, 1:1000, kerran käytetty) sulatettiin +37 °C:ssa vesihauteessa ja pipetoitiin blokkauspuskurin tilalle 50 ml:n putkiin. Membraaneja inkuboitiiin primäärivasta-aineliuoksessa yön ajan +4 °C:ssa rullasekoittajassa. Primäärivasta-aineinkubaation jälkeen membraanit pestiin noin 20 ml:lla TBS-T-liuosta kolme kertaa 10–15 minuutin ajan.

Sekundäärivasta-aineliuosta varten otettiin käyttöön edellisenä päivänä valmistettu 1 % maito-TBS-T-liuos. Piparjuuriperoksidaasilla leimattua sekundäärivasta-ainetta pipetoitiin TBS-T-liuokseen suhteessa 1:2000 eli 5 µl/10 ml. Sekundäärivasta-aineliuosta pipetoitiin 5 ml/membraani ja inkuboitiiin huoneenlämmössä rullasekoittajassa ensin 50 minuuttia, ja sitten +4 °C:ssa rullasekoittajassa 30 minuutin ajan. Sekundäärivasta-aineiden inkubaation jälkeen membraanit pestiin noin 20 ml:lla TBS-T-liuosta kolme kertaa 10–15 minuutin ajan. Sekundäärivasta-aineet saatiin näkyviin ECL-reagensseilla, joita pipetoitiin yhteen 50 ml:n putkeen suhteessa 1:1 eli 2 ml A-liuosta ja 2 ml B-liuosta. ECL-reagenssien sekoittamisen jälkeen pipetoitiin 2 ml käyttövalmista ECL-liuosta yhtä membraania kohden, jota inkuboitiiin minuutin ajan ECL-liuoksessa parafilmillä päällä. Tämän jälkeen membraanit siirrettiin valosuojattuun koteloon filmien kehitystä varten. Koteloon membraanien päälle asetettiin filmejä eri valotusajoilla, joista kolmen minuutin valotusaika osoittautui parhaaksi. Filmit kehitettiin ADFA:n Curix 60 -kehityslaitteessa ja kuvattiin Bio-

Radin Gel-Doc XR System -laitteella. Membraanit laitettiin yön ajaksi TBS-T-liuokseen 50 ml:n putkiin.

Seuraavana päivänä membraanit pestiin noin 20 ml:lla TBS-T-liuosta kaksi kertaa 10–15 minuutin ajan. Membraaneihin sitoutuneet vasta-aineet irrotettiin vasta-aineiden irrotuspuskurilla, jota pipetoitiin 5 ml membraania kohden. Putkia inkuboitiin lasisessa pyörivässä putkessa +50 °C:ssa 30 minuutin ajan, minkä jälkeen membraanit pestiin TBS-T-liuoksella kolme kertaa samoin kuin edellä. Jäinen primäärivasta-aineliuos (Abcam α -tubulin 5 % maito-TBS-T, 1:20 000; 0,5 μ l/10 ml, useasti käytetty) sulatettiin +37 °C:ssa vesihauteessa, ja sitä pipetoitiin 5 ml membraania kohti TBS-T-liuoksen tilalle. Primäärivasta-aineliuosta inkuboitiin rullasekoittajassa huoneenlämmössä 45 minuuttia, minkä jälkeen membraanit pestiin vastaavasti TBS-T-liuoksella kolme kertaa. Sekundäärivasta-aine oli sama kuin edellä, ja vasta-aineliuoksen valmistus tehtiin samoin kuin edellä. Sekundäärivasta-aineliuosta pipetoitiin 5 ml membraania kohti TBS-T-liuoksen tilalle, ja vasta-aineita inkuboitiin huoneenlämmössä rullasekoittajassa 20 minuuttia. Lopuksi membraanit pestiin TBS-T-liuoksella kolme kertaa, inkuboitiin ECL-reagensseilla ja filmit kehitettiin kuten edellä.

6.2 Rintasyöpäprojekti

Opinnäytetyön rintasyöpäprojektin tutkimuksissa käytettiin kolmoisnegatiivisia hiiren 4T1- ja ihmisen MDA-MB-231(SA)-rintasyöpäsolulinjoja. Molemmista solulinjoista oli käytössä Johanna Tuomelan transfektoimia TLR9 siRNA -soluja, joilta oli stabiililla siRNA-tekniikalla hiljennetty TLR9-ekspressio. Kontrollisoluna toimivat Johanna Tuomelan transfektoimat Ctrl siRNA -solut, joilla oli normaali tai korkea TLR9-ekspressio. Rintasyöpäprojekti koostui monista eri osatutkimuksista, joissa tutkittiin pääasiallisesti zoledronaatin vaikutusta matalan TLR9-ekspression kolmoisnegatiivisiin rintasyöpäsoluihin.

Amino- ja non-aminobisfosfonaatin, zoledronaatin ja klodronaatin, vaikutusta kolmoisnegatiivisten rintasyöpäsolujen proliferaatioon tutkittiin viljelemällä MDA-

MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -soluja 96-kuoppalevyllä, käsittelemällä soluja eri bisfosfonaattipitoisuuksilla ja kuvaamalla niitä IncuCyte-kuvantamislaitteella. Lisäksi klodronaatin ja zoledronaatin vaikutusta rintasyöpäsolujen elinkykyisyyteen tutkittiin kaupallisen CCK-8:n avulla. Rintasyöpäprojektin tutkimuksissa toistettiin myös aikaisemmin tehty tutkimus, jossa tutkittiin zoledronaatin vaikutusta kolmoisnegatiivisten rintasyöpäsolujen solusykliin virtaussytometrialla. MDA-MB-231(SA)-soluja kasvatettiin +37 °C:ssa inkubaattorissa 5 %:n CO₂-pitoisuudessa, DMEM-kasvatusliuos vaihdettiin 3–4 päivän välein, ja soluja jaettiin tarvittaessa uusille maljoille trypsiiniliuoksen avulla. Osana rintasyöpäprojektia seurattiin ja analysoitiin hiirikoetta, jossa BALB/c-hiiriin istutettiin ortotooppisesti hiiren kolmoisnegatiivisia 4T1 Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -rintasyöpäsoluja, jotka muodostivat syngeneisiä kasvaimia. Koe-eläintutkimus suoritettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksen tiloissa, ja koe-eläimiä käsitelivät vain lain vaatiman koe-eläinlupien suorittaneet henkilöt eli dosentti Johanna Tuomela ja laborantti Jaakko Lehtimäki. Rintasyöpäprojektissa käytetyt reagenssit koottiin reagenssiluetteloon (liite 2).

6.2.1 Hiirikoe

Rintasyöpäprojektin hiirikokeessa tutkittiin ja seurattiin hiiren kolmoisnegatiivisten 4T1 Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -rintasyöpäsolujen muodostamia kasvaimia. Tutkimuksen aloituspäivänä kaikki 16 BALB/c-hiirtä punnittiin ja satunnaistettiin painon mukaan neljään eri häkkiin. Kahdesta häkistä koostuva kontrolliryhmä sisälsi hiiriä, joihin istutettiin ortotooppisesti 2×10^4 4T1 Ctrl siRNA -solua. Loput kaksi häkkiä kuuluivat matalan TLR9-ekspression ryhmään, jossa hiirille istutettiin ortotooppisesti 2×10^4 4T1 TLR9 siRNA -solua. Koe kesti 27 päivää, mutta opinnäytetyössä esitetyn hiirten kasvainten kasvukäyrän kuvaajassa käytettiin ainoastaan 25:n päivän aikana kirjattuja mittaustuloksia. Tutkimuksen päättymispäivänä hiirten lopetuksen yhteydessä kirjatut kasvainten mittaustulokset poikkesivat tarkkuudeltaan kokeen muista mittaustuloksista. Hiiret punnittiin, ja niiden kasvaimia mitattiin pituus- ja leveyssuunnassa 2–3 päivän

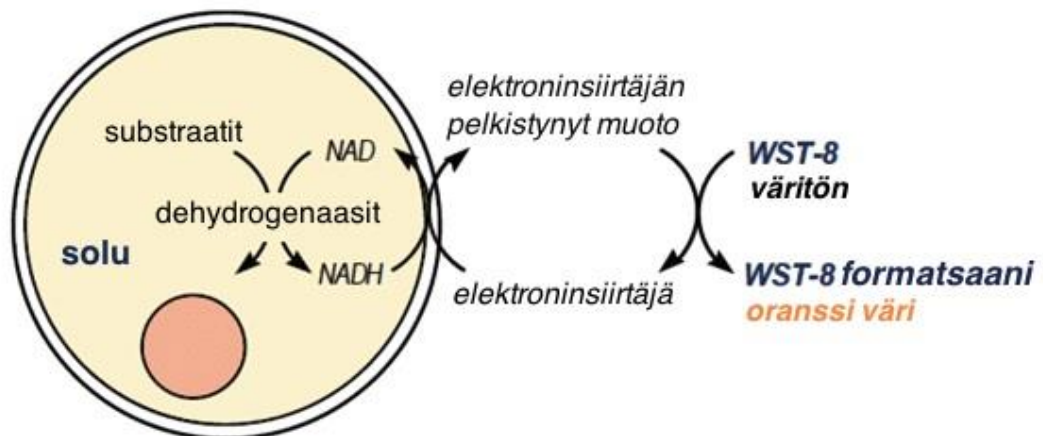
välein koko tutkimuksen ajan. Kolme hiiristä lopetettiin ennen kokeen päättymistä kakektisten oireiden vuoksi. Opinnäytetyössä ei käsitellä myöskään rintasyöpäprojektin hiirten painodataa.

6.2.2 IncuCyte

IncuCyte ZOOM on elävien solujen kuvantamiseen käytettävä inkubaattorin sisäinen mikroskopointijärjestelmä, joka voidaan yhdistää ulkoisiin tietokoneisiin. IncuCyte ZOOM:in avulla on mahdollista tarkastella ja analysoida viljeltyjä soluja reaaliaikaisesti useiden päivien ajan niitä häiritsemättä. (Essen BioScience 2014.) Tässä opinnäytetyössä IncuCyte ZOOM-kuvantamislaitteesta käytetään lyhyempää nimitystä IncuCyte-kuvantamislaitte. IncuCyte-kuvantamislaitteella tehdyissä tutkimuksissa 96-kuoppalevylle viljeltiin ihmisen kolmoisnegatiivisia MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -rintasyöpäsoluja, ja niitä käsiteltiin eri vahvuisilla zoledronaatti- ja klodronaattikonsentraatioilla. Bisfosfonaattien vaikutusta MDA-MB-231(SA)-solujen jakautumisnopeuteen tutkittiin IncuCyte-kuvantamislaitteella. Haluttu solumäärä 96-kuoppalevyn kuoppaa kohti oli 2 000, mutta laskuvirheen vuoksi TLR9 siRNA -soluja pipetoitiin kuoppiin 10-kertainen määrä (liite 4), mikä huomattiin vasta jälkikäteen. Soluja viljeltiin 96-kuoppalevylle taulukon 3 osoittamalla tavalla siten, että Ctrl siRNA -solut kattoivat puolet levystä ja TLR9 siRNA -solut toisen puolen. 96-kuoppalevyn reunoille viljeltiin kuljetinsolut, ja levyn keskellä olevat solut käsiteltiin riveittäin (n=5) eri zoledronaatti- ja klodronaattikonsentraatioilla (taulukko 3). Käytettyjen zoledronaattiliuosten pitoisuudet olivat 1 μM , 10 μM ja 100 μM , ja klodronaattiliuosten pitoisuudet olivat 10 μM ja 100 μM . Bisfosfonaattikäsittelyjen jälkeen 96-kuoppalevyä kuvattiin IncuCyte-kuvantamislaitteella kolmen päivän ajan. Zoledronaatti- ja klodronaattiliuokset laimennettiin eri pitoisuuksiin laimennossarjan kaavion mukaisesti (liite 5).

6.2.3 Cell Counting Kit-8

CCK-8 on solujen proliferaation ja sytotoksisuuden määrittämiseen soveltuva kolorimetriseen mittaukseen perustuva menetelmä, jonka avulla on mahdollista selvittää elinkykyisten solujen osuus tutkittavasta näytteestä. Kitin WST-8-reagenssi eli vesiliukoinen tetrazolium-suola pelkistyy elävissä soluissa toimivien dehydrogenaasientsyymien elektroninsiirtoketjujen avulla liukoiseksi värilliseksi lopputuotteeksi, formatsaaniksi, jonka pitoisuus on suoraan verrannollinen elinkykyisten solujen määrään (kuva 6). CCK-8-menetelmän herkkyys on parempi moniin muihin tetrazolium-suoloihin perustuviin menetelmiin verrattuna. (Dojindo Molecular Technologies Inc 2014.)



Kuva 6. Solujen elinkykyisyyden määrittäminen CCK-8:n WST-8-reagenssilla. (Mukaan Dojindo Molecular Technologies Inc 2014)

Amino- ja non-aminobisfosfonaatin, zoledronaatin ja klodronaatin, vaikutusta MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -rintasyöpäsolujen proliferaatioon tutkittiin kaupallisella Dojindo Molecular Technologies Inc:n CCK-8:lla. Tutkittavat MDA-MB-231(SA)-solut olivat samoja soluja, joita oli aiemmin viljelty 96-kuoppalevyille, käsitelty eri vahvuisilla bisfosfonaattiliuoksilla ja kuvattu kolmen päivän ajan IncuCyte-kuvantamislaitteella. Soluja käsiteltiin CCK-8:n

WST-8-reagenssilla taulukon 3 osoittamalla tavalla pipetoimalla valittuihin kuoppiin 10 µl WST-8-reagenssia. Kuoppien määrää rajoitettiin reagenssin rajallisen määrän vuoksi neljään rinnakkaiseen kuoppaan jokaisesta eri vahvuisesta bisfosfonaattikäsittelystä. Myös kuljetin-käsitelyihin soluihin pipetoitiin 10 µl WST-8-reagenssia, mutta niiden käsittelyä ei otettu huomioon lopullisissa tuloksissa. WST-8-reagenssin lisäämisen jälkeen 96-kuoppalevyä pidettiin inkubaattorissa tunnin ajan, minkä jälkeen kuoppien absorbanssiarvot mitattiin TECAN Ultra spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm.

Taulukko 3 Eri zoledronaatti- ja klodronaattikonsentraatioilla käsiteltyjen MDA-MB-231(SA)-solujen 96-kuoppalevyn kartta. Punaisella reunustetun alueen kuoppiin pipetoitiin 10 µl WST-8-reagenssia.
(VEH = kuljetin, ZOL = zoledronaattikäsittely, CLO = klodronaattikäsittely)

	Ctrl siRNA						TLR9 siRNA					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VEH											VEH
B												
C		ZOL 1 µM	ZOL 10 µM	ZOL 100 µM	CLO 10 µM	CLO 100 µM	ZOL 1 µM	ZOL 10 µM	ZOL 100 µM	CLO 10 µM	CLO 100 µM	
D												
E												
F												
G												
H												

6.2.4 Virtausytometria

Zoledronaatin vaikutusta tutkittiin kolmoisnegatiivisten MDA-MB-231(SA)-rintasyöpäsolujen solusykliin virtausytometrialla. Tutkimuksessa verrattiin Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen solusyklin muutoksia eri vahvuisilla zoledronaattikonsentraatioilla. Solut viljeltiin 6-kuoppalevyille liitteen 6 osoittamalla tavalla siten, että Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -soluja viljeltiin kutakin kahdelle 6-kuoppalevyille. Yhteen kuoppaan pipetoitiin 200 000 solua (liite 4). Jokaisesta kuoppalevystä kaksi kuoppaa jätettiin käsittelemättä, ja loput kuopista käsiteltiin eri zoledronaattipitoisuuksilla, jotka olivat 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM ja 100 μM . Zoledronaatin laimennossarja tehtiin vastaavasti kuin 96-kuoppalevyille (liite 5), ja jokaisesta pitoisuudesta oli kaksi rinnakkaista kuoppaa. Ennen näytteiden ajoa virtausytometrillä valmistettiin natriumsitraattipuskuri (liite 7). Irrotetut solut suspensoitiin työohjeen mukaisesti valmistettuun natriumsitraattipuskuriin, ja näytteet ajettiin FACSCalibur-virtausytometrillä Turun Biotekniikan keskuksen (BTK) tiloissa tutkija Jouko Sandholmin kanssa.

7 TUTKIMUSTULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

7.1 Eturauhassyöpäprojekti

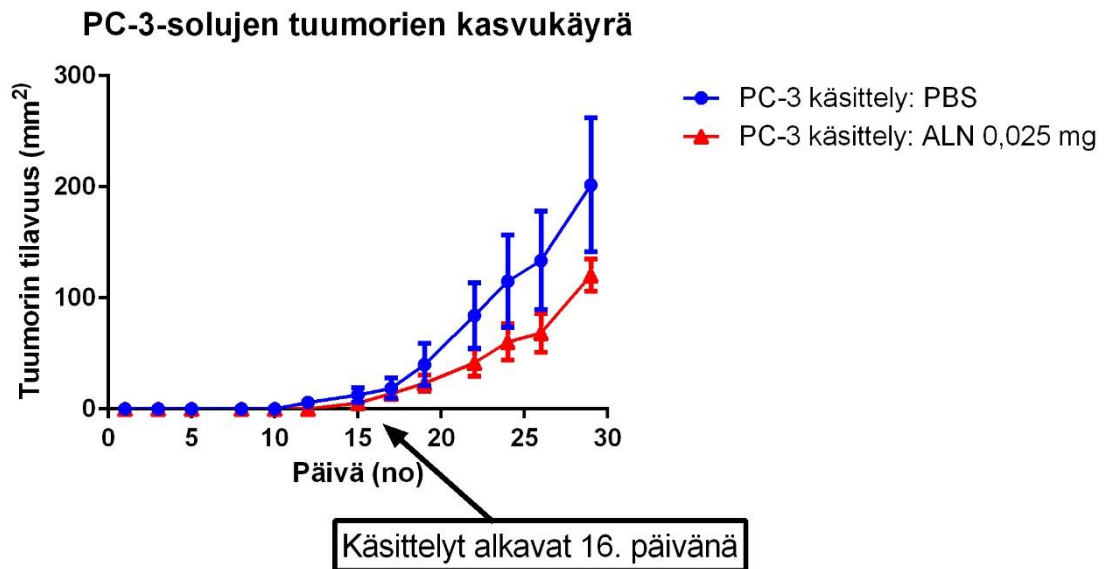
Opinnäytetyön eturauhassyöpäprojektin tutkimustulokset vastasivat hypoteeseja ja toistivat aiemmin suoritettujen kokeiden tuloksia. Hiirikokeessa hiiriin istutettujen ihmisen PC-3-eturauhassyöpäsolujen muodostamat kasvaimet reagoivat alendronaattihoitoon hypoteesin mukaisesti. Western blot -menetelmällä analysoitujen PC-3-solujen kofiliinitaso laski odotetusti vahvimman alendronaattipitoisuuden vaikutuksesta, mutta epäspesifisen sitoutumisen vuoksi tuloksissa oli hieman poikkeavuuksia.

7.1.1 Hiirikoe

Hiirikokeen aikana kerättiin tietoja hiirten PC-3-kasvaimista, ja ne koottiin taulukkomuotoon (liite 8). Kasvainten pituus- ja leveysmittojen perusteella laskettiin kasvainten tilavuudet, joiden muutokset kokeen edetessä on esitetty kuviossa 2. Kasvainten tilavuudet laskettiin Microsoft Excelillä likimääräisen tuloksen antavalla kaavalla, joka on sovellettu ellipsoidin tilavuuden määrittämisen kaavasta (kaava 1). Kaavalla saadut tilavuudet ovat likimääräisiä arvioita, koska kasvaimen syvyysmittaa ei voitu mitata hiiristä kokeen aikana.

$$V = \left(\frac{\pi}{6}\right) \times (d_1 \times d_2)^2$$

Kaava 1. Hiiren kasvaimen likimääräisen tilavuuden laskemisen kaava, jossa d_1 ja d_2 ovat kasvaimen kohtisuoraan mitatut leveys- ja pituusmitat (Tuomela ym. 2013, a).

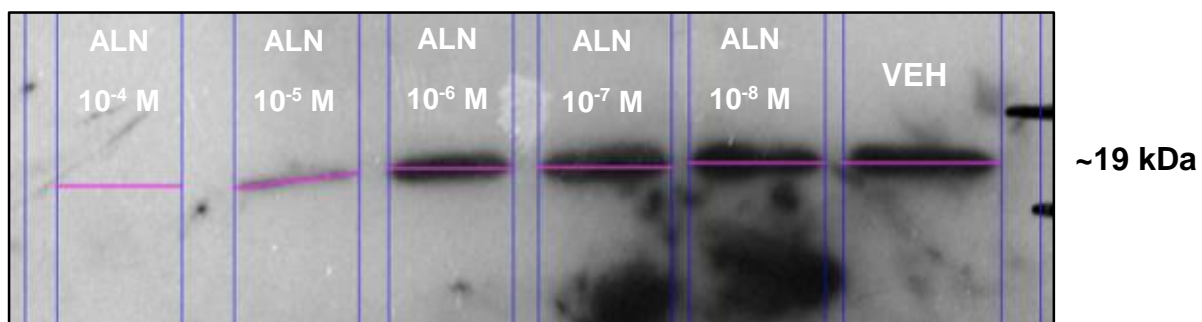


Kuvio 2. Alendronaatti- ja PBS-hoidon vaikutus *athymic nude*-hiirten PC-3-kasvainten kasvukäyrään (n=16).

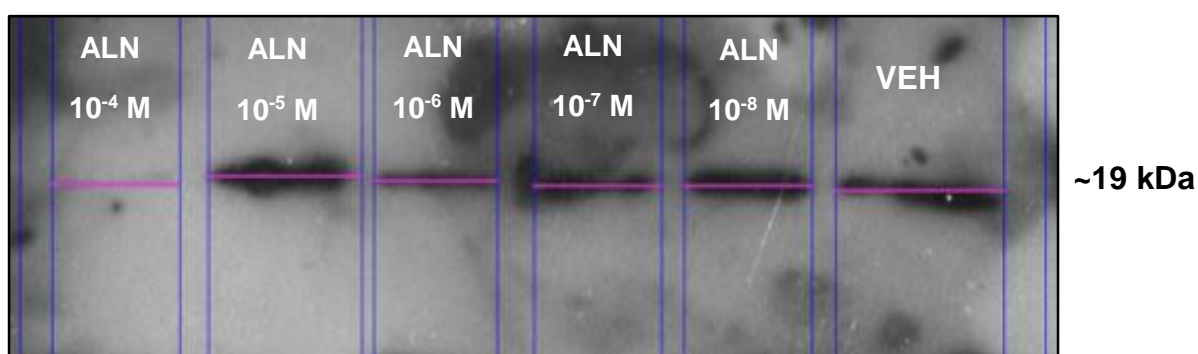
Kuvion 2 perusteella vaikuttaa siltä, että alendronaattihoito hidastaa PC-3-kasvainten etenemistä. Kontrolli- ja alendronaattiryhmien hiirten kasvainten kasvuvauhti pysyy melko samana hoitojen aloitukseen asti ja muutamia päiviä sen jälkeen. Kolmen päivän kuluttua hoitojen aloituksesta ryhmien välillä on nähtävissä jo pieni ero, joka kasvaa kokeen edetessä.

7.1.2 Western blot

Western blot -menetelmästä saadut tulokset vastasivat pääosin hypoteesia kofiliinitason vähenemisestä ainakin vahvimman alendronaatin vaikutuksesta. Western blot -menetelmällä saadut PC-3 mock- ja PC-3 kofiliini -solujen kofiliinitasoja kuvaavat filmit kuvattiin BTK:n tiloissa tutkija Jouko Sandholmin kanssa Bio-Rad Gel-Doc XR System -laitteella (kuvat 7 ja 8). Kuvissa on nähtävissä eri alendronaattikonsentraatioilla käsiteltyjen näytteiden ja käsittelemättömän kuljetinnäytteen muodostamat vyöhykkeet.

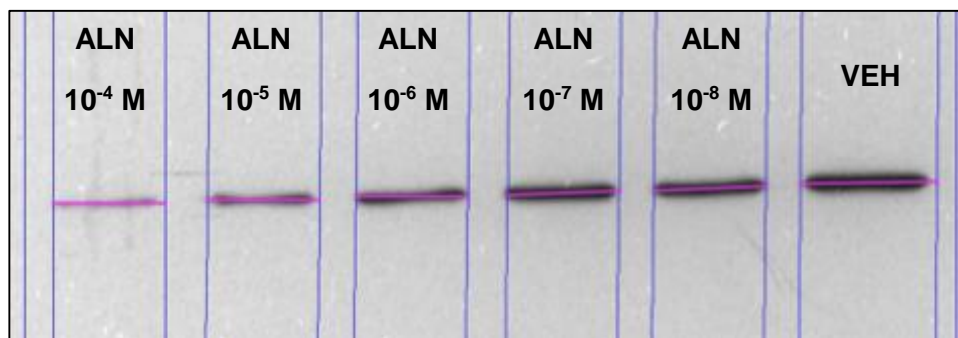


Kuva 7. Geeli 1: PC-3 mock, kofiliini.

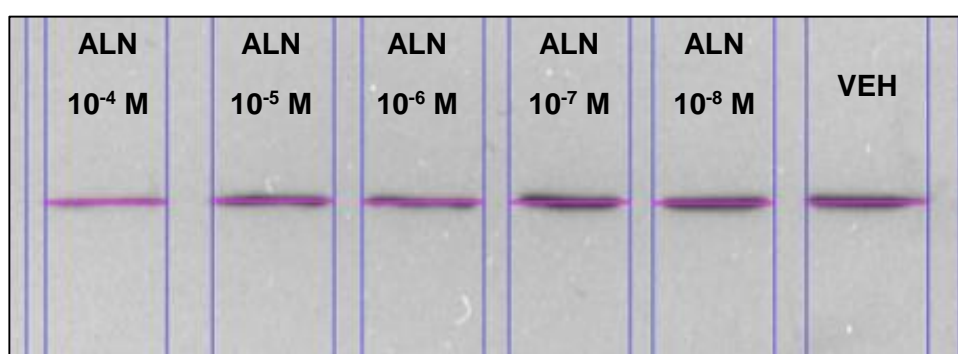


Kuva 8. Geeli 2: PC-3 kofiliini, kofiliini.

Kofiliinin määrä suhteutettiin latauskontrollin eli α -tubuliinin määrään Bio-Rad Gel-Doc XR System -laitteella. Laitteen analysointiohjelmalla määriteltiin muodostuneiden kofiliini- ja α -tubuliini-vyöhykkeiden intensiteetit geeleiltä 1 ja 2 (kuvat 9 ja 10). Määritettyjen intensiteettien avulla laskettiin kofiliinin ja α -tubuliinin suhde (taulukko 4 ja taulukko 5). Näin pystyttiin analysoimaan kofiliinin määrän muutoksia, vaikka latauskontrollin perusteella näytteiden pipetoiminen ylägeeleille oli epätasaista. Määritetyt intensiteettimuutokset eivät johtunut yksinomaan alendronaatin vaikutuksesta, vaan osittain myös siitä, että kuvien 7 ja 8 vyöhykkeet eivät ole tasaisia epäspesifisen sitoutumisen vuoksi. Tämän vuoksi todellisia intensiteettiarvoja ei voitu määrittää luotettavasti Bio-Rad Gel-Doc XR System -laitteella. Epäspesifinen sitoutuminen näkyy kuvissa pallomaisina rakenteina vyöhykkeiden ympärillä.



Kuva 9. Geeli 1: PC-3 mock, α -tubuliini.



Kuva 10. Geeli 2: PC-3 kofiliini, α -tubuliini.

Kun kofiliinivyöhykkeitä tarkastellaan visuaalisesti kuvista, ja verrataan niitä kofiliinin ja latauskontrollin suhteeseen, voidaan silti havaita, että ainakin vahvimmat alendronaattikonsentraatiot (ALN 10^{-5} M ja 10^{-4} M) näyttivät vähentävän kofiliinitason määrää PC-3-soluissa. Vahvimmalla alendronaattiliuoksella (ALN 10^{-4} M) käsiteltyjen PC-3 mock- ja PC-3 kofiliini -solujen kofiliinitaso näyttää häviävän kuvista jopa kokonaan, ja havaitut intensiteetit ovat hyvin pieniä. PC-3 mock -solujen kofiliinitason määrä laskee myös toisiksi vahvimmalla (ALN 10^{-5} M) alendronaattiliuoksella. Vastaavaa arviota ei voida tehdä PC-3 kofiliini -solujen vyöhykkeestä, koska tulkintaa häiritsee epäspesifinen sitoutuminen. Karkeasti arvioituna PC-3 mock -soluissa laimeammat alendronaattikäsittelyt (ALN 10^{-6} - 10^{-8} M) näyttivät olevan samalla tasolla käsittelemättömän kuljetinnäytteen kanssa, eli laimeammat alendronaattipitoisuudet eivät näyttäneet vähentävän kofiliinin määrää merkittävästi. Sen sijaan

kofiliinia yliekspressoivilla PC-3 kofiliini -soluilla myös laimeammat alendronaattikäsittelyt (ALN 10^{-6} - 10^{-8} M) vaikuttivat vähentävän solujen kofiliinitason määrää verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen.

Taulukko 4 Geeli 1: PC-3 mock -solujen vyöhykkeiden intensiteeteistä määritetyt kofiliini- ja α -tubuliinipitoisuudet ja niiden suhde.

Geeli 1: PC-3 mock						
Pitoisuus	ALN 10^{-4} M	ALN 10^{-5} M	ALN 10^{-6} M	ALN 10^{-7} M	ALN 10^{-8} M	VEH
Kofiliini	116 508	21 315 606	86 838 474	95 323 401	115 956 368	121 389 408
α -tubuliini	10 317 832	23 964 822	36 034 894	51 147 082	50 215 984	66 430 815
Kofiliini/ α -tubuliini	0,011	0,889	2,410	1,864	2,309	1,827

Taulukko 5 Geeli 2: PC-3 kofiliini -solujen vyöhykkeiden intensiteeteistä määritetyt kofiliini- ja α -tubuliinipitoisuudet ja niiden suhde.

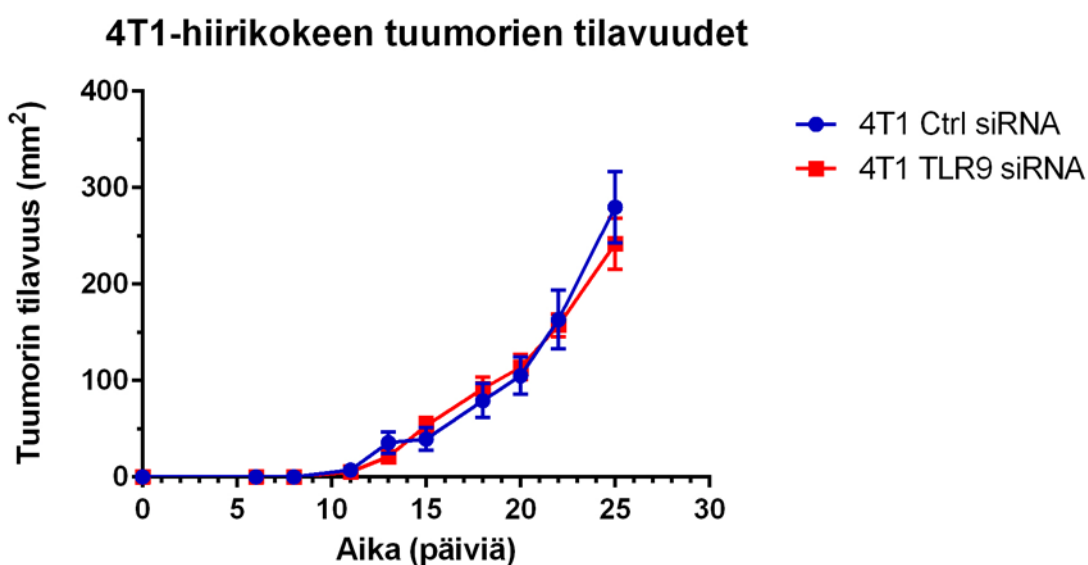
Geeli 2: PC-3 kofiliini						
Pitoisuus	ALN 10^{-4} M	ALN 10^{-5} M	ALN 10^{-6} M	ALN 10^{-7} M	ALN 10^{-8} M	VEH
Kofiliini	3 175 416	91 438 655	24 039 184	40 930 488	44 688 672	67 579 362
α -tubuliini	12 114 744	23 356 368	22 518 336	30 026 454	29 199 234	30 097 956
Kofiliini/ α -tubuliini	0,262	3,915	1,068	1,363	1,530	2,245

7.2 Rintasyöpäprojekti

Rintasyöpäprojektin tutkimustulokset vastasivat osittain aiemmin asetettuja hypoteeseja, mutta osa tuloksista oli yllättäviä. Hiirikokeen tulokset eivät vastanneet hypoteesia, jonka mukaan kolmoisnegatiivisten 4T1 TLR9 siRNA -rintasyöpäkasvainten odotettiin kasvavan nopeammin ja aggressiivisemmin verrattuna Ctrl siRNA -kasvaimiin. Eri zoledronaatti- ja klodronaattikonsentraatioilla käsitellyistä ja IncuCyteillä kuvannetuista MDA-MB-231(SA)-soluista saadut tulokset vastasivat pääosin hypoteeseja. Virtausytometrialla analysoitujen MDA-MB-231(SA)-solujen solusykliä vastasivat osittain odotuksia, mutta myös yllättäviä uusia tuloksia saatiin.

7.2.1 Hiirikoe

Hiirikokeen aikana hiiriin muodostuneiden 4T1-kasvainten kokojen muutokset koottiin taulukkomuotoon (liite 9). Kasvainten leveys- ja pituusmitoista laskettiin kasvainten likimääräiset tilavuudet vastaavasti kuin eturauhassyöpäprojektin hiirikokeessa Microsoft Excelillä kaavalla 1. Kasvainten tilavuuksien muutoksista muodostettiin kuvio 3.

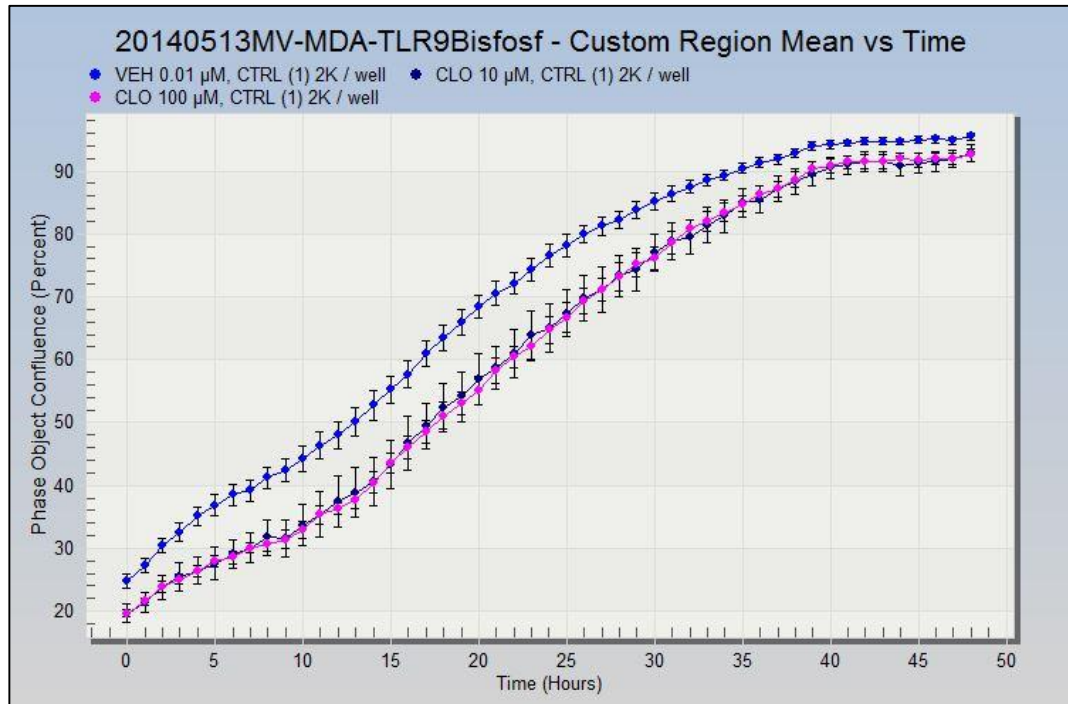


Kuvio 3. BALB/c-hiirten 4T1 Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -kasvainten kasvukäyrä (n=16 kokeen alussa).

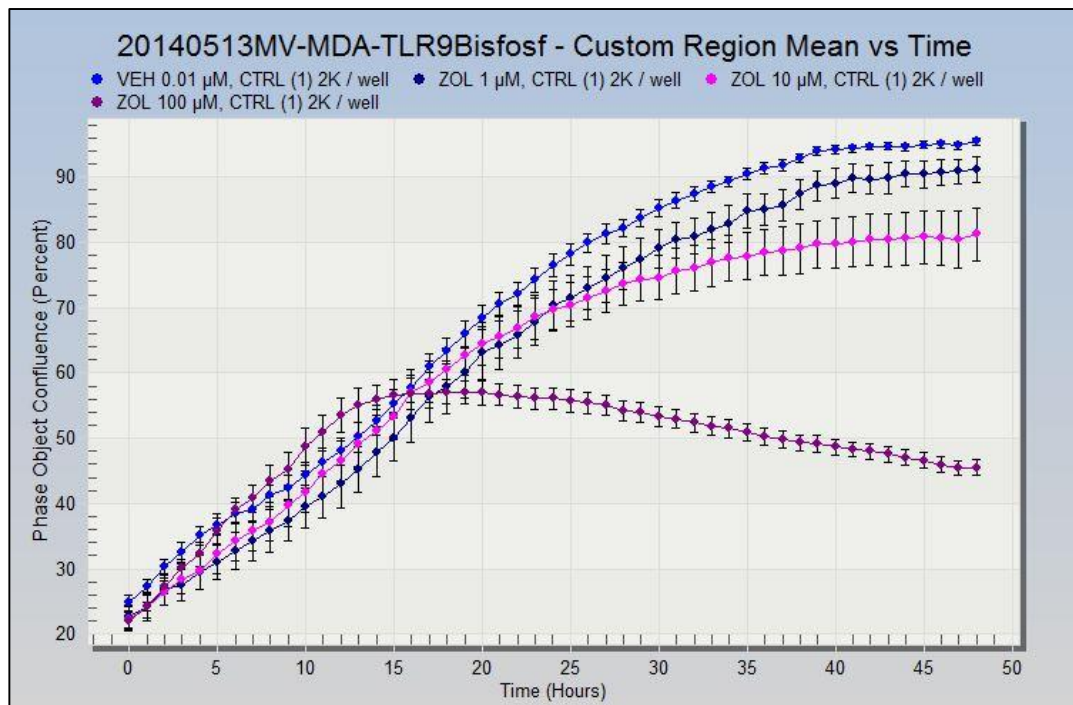
Hiirikokeen tulokset eivät vastanneet aikaisempien hiirikokeiden tuloksia, koska BALB/c-hiirten kolmoisnegatiivisten 4T1 Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -rintasyöpäsolujen muodostamissa kasvaimissa ei ollut merkittävää eroa. Toisaalta hypoteesiin pohjautuneessa Tuomelan ym. (2012) tutkimuksessa käytettiin ihmisen kolmoisnegatiivisia MDA-MB-231(SA)-rintasyöpäsoluja, joita istutettiin immuunipuutteisiin *athymic nude* -hiiriin. Koska TLR9 liittyy keskeisesti immuunijärjestelmään, ero saattaa selittyä opinnäytetyön hiirikokeessa käytetyillä BALB/c-hiirillä, joiden immuunijärjestelmä on kehittyneempi *athymic nude* -hiiriin verrattuna.

7.2.2 IncuCyte

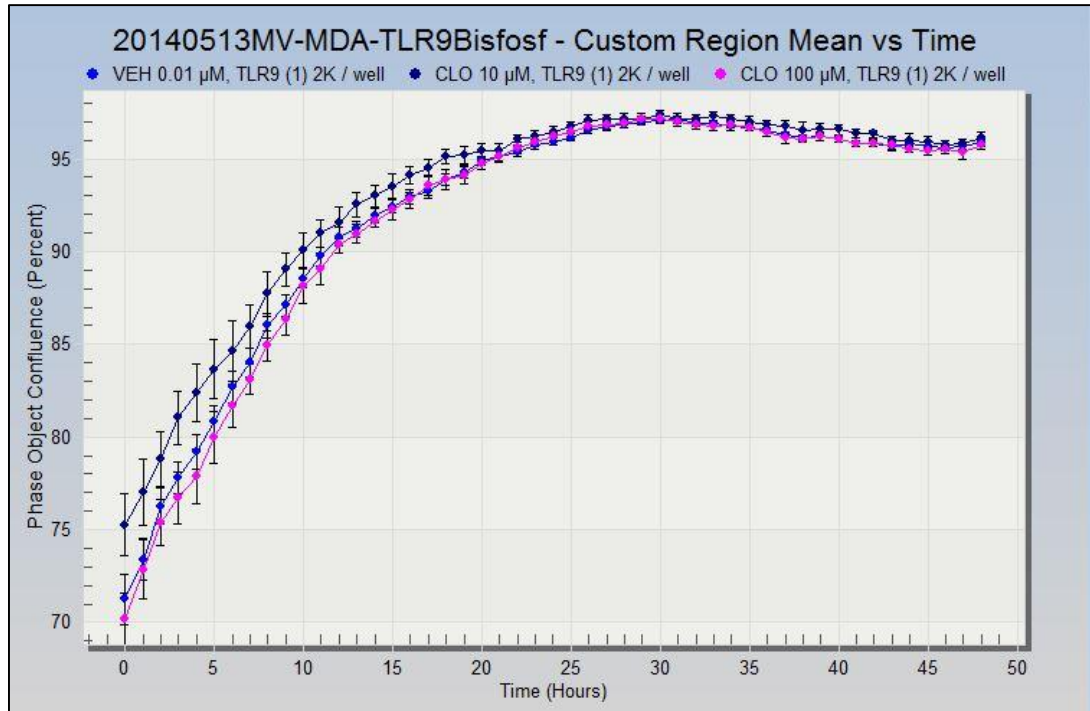
IncuCyte-kvantamislaitteella kuvannetuista 96-kuoppalevyllä olevista eri zoledronaatti- ja klodronaattikonsentraatioilla käsitellyistä MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -rintasyöpäsoluista muodostettiin IncuCyte-analyysiohjelmalla kuvaajia. Zoledronaatin ja klodronaatin vaikutusta solujen proliferaatioon kuvattiin myös IncuCyte-kvantamislaitteen ottamilla kuvilla. Klodronaattipitoisuuksilla 10 μM ja 100 μM käsiteltyjen MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen kuvaaja verrattuna käsittelemättömään kuljettimeen on esitetty kuvassa 11. Saman solulinjan zoledronaattipitoisuuksilla 1 μM , 10 μM ja 100 μM käsiteltyjen solujen kuvaaja verrattuna käsittelemättömään kuljettimeen on esitetty kuvassa 12. Klodronaattipitoisuuksilla 10 μM ja 100 μM käsiteltyjen MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen solujen kuvaaja verrattuna käsittelemättömään kuljettimeen on esitetty kuvassa 13. Saman solulinjan zoledronaattipitoisuuksilla 1 μM , 10 μM ja 100 μM käsiteltyjen solujen kuvaaja verrattuna käsittelemättömään kuljettimeen on esitetty kuvassa 14.



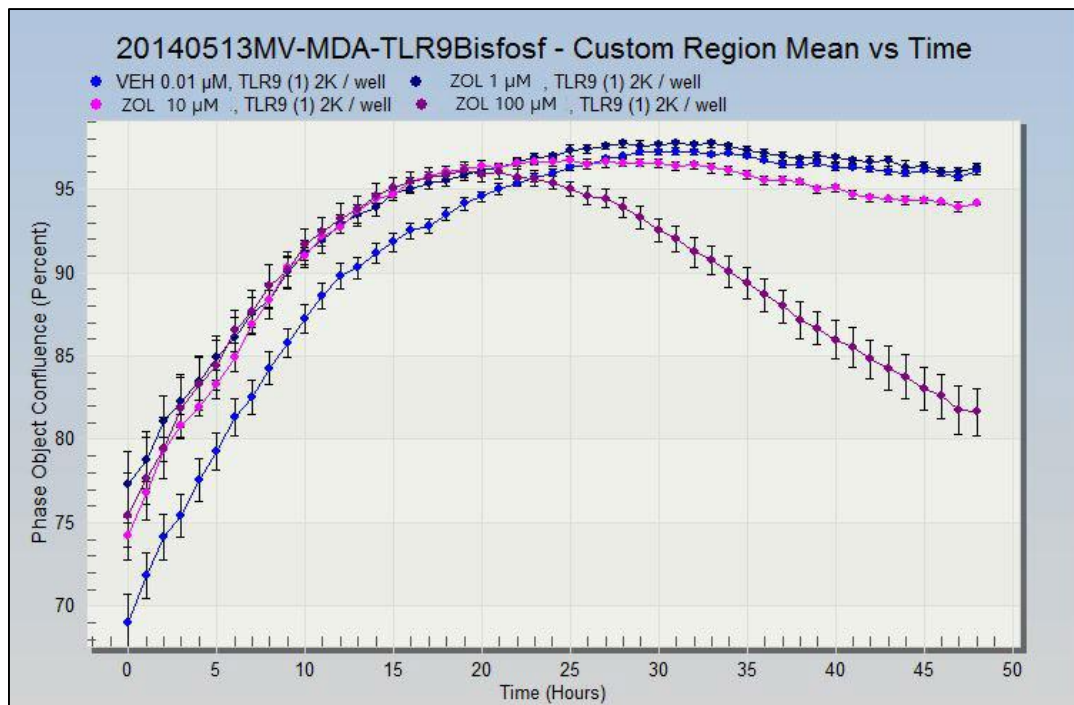
Kuva 11. Eri vahvuisten klodronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteen. VEH (n=10), CLO 10 µM (n=5), CLO 100 µM (n=5)



Kuva 12. Eri vahvuisten zoledronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteen. VEH (n=10), ZOL 1 µM (n=5), ZOL 10 µM (n=5), ZOL 100 µM (n=5)

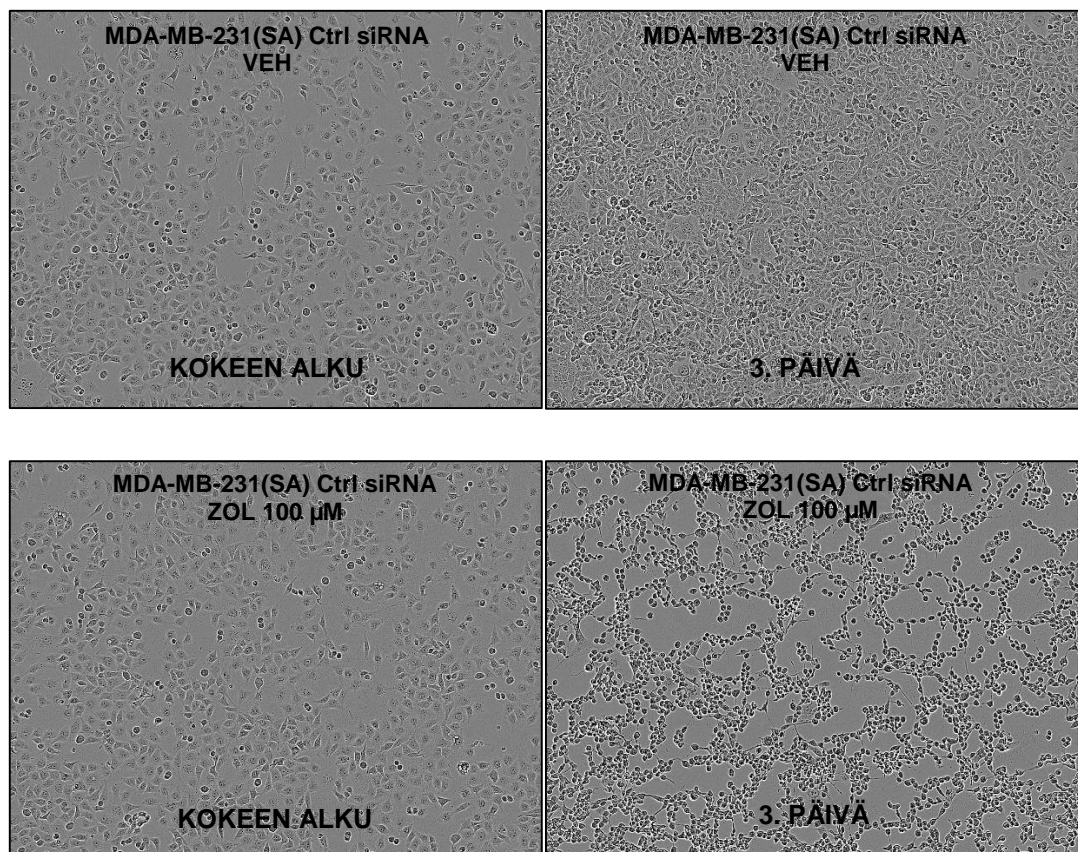


Kuva 13. Eri vahvuisten klodronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. VEH (n=10), CLO 10 μM (n=5), CLO 100 μM (n=5)

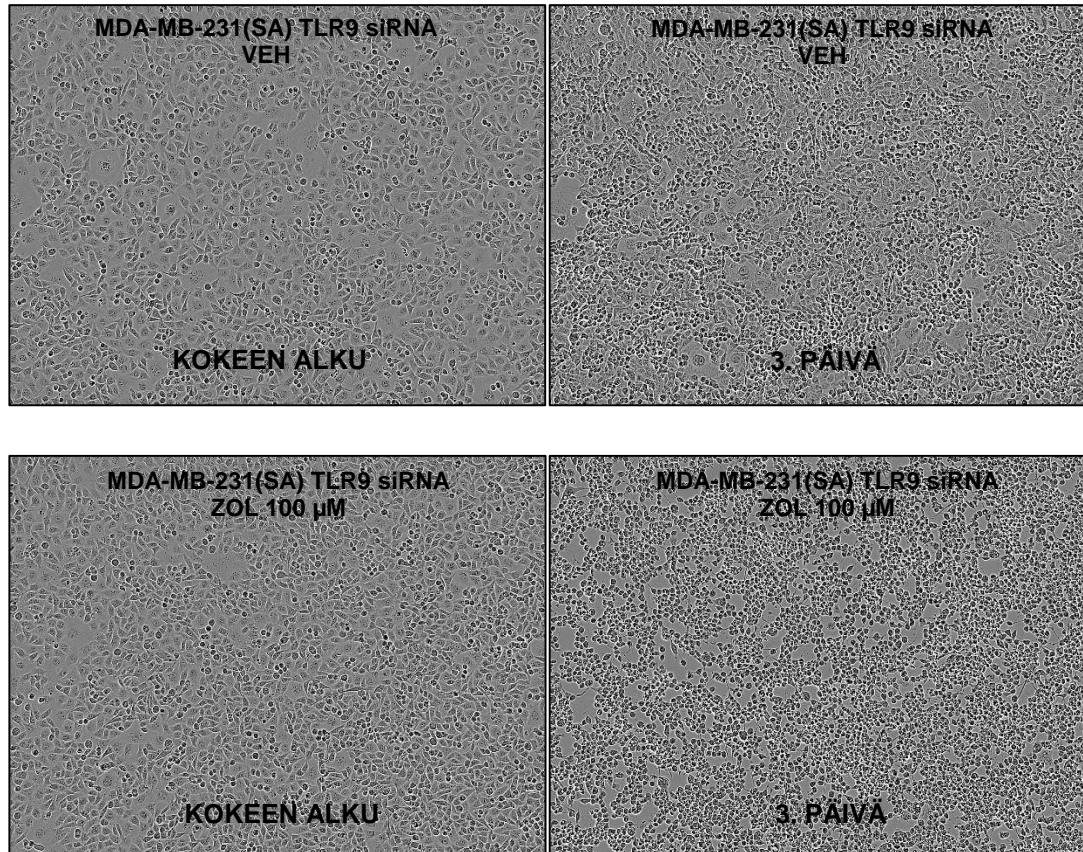


Kuva 14. Eri vahvuisten zoledronaattikäsittelyjen vaikutus MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. VEH (n=10), ZOL 1 μM (n=5), ZOL 10 μM (n=5), ZOL 100 μM (n=5)

Sekä MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- että TLR9 siRNA -soluista kuvaajista voidaan havaita, ettei klodronaatilla ole vaikutusta solujen proliferaatioon käsittelyvoimakkuudesta riippumatta. Myöskään laimeimmat zoledronaattipitoisuudet (1 μM ja 10 μM) eivät näytä juurikaan heikentävän solujen proliferaatiota. Sen sijaan vahvin zoledronaattipitoisuus (100 μM) näyttää vaikuttavan solujen proliferaatioon selvästi verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. Tämän havainnon vuoksi vain vahvimman zoledronaattipitoisuuden (100 μM) vaikutus Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen proliferaatioon esitetään myös IncuCyte-kuvantamislaitteen ottamissa kuvissa 15 ja 16.



Kuva 15. Vahvimmalla zoledronaattipitoisuudella (100 μM) käsitellyt MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solut kokeen aloituspäivänä ja kolmantena inkubaatiopäivänä verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen.



Kuva 16. Vahvimmalla zoledronaattipitoisuudella (100 µM) käsitellyt MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solut kokeen aloituspäivänä ja kolmantena inkubaatiopäivänä verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen.

Kuvassa 15 nähdään vahvimman zoledronaattipitoisuuden (100 µM) vaikutus Ctrl siRNA -solujen proliferaatioon kokeen aloituspäivänä ja kolmantena inkubaatiopäivänä verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen. Vahvin zoledronaattipitoisuus näyttää selvästi vaikuttavan proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen, koska alemmassa kuvassa nähdään zoledronaatin aiheuttama solujen kuolema solujen tiivistymisenä. MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen IncuCyte-kvantamislaitteen ottamista kuvista huomattiin, että TLR9 siRNA -soluja oli pipetoitu jo kokeen alkaessa kuoppiin huomattavasti enemmän kuin Ctrl siRNA -soluja. Solulaskuja tarkistettaessa havaittiin laskuvirhe, jonka vuoksi TLR9 siRNA -soluja pipetoitiin kuoppiin 10-kertainen määrä (liite 4). TLR9 siRNA -soluja oli siis kuopissa jo kokeen alkaessa liian suuri määrä (konfluenssi 70 %), minkä vuoksi näiden kuoppien

konfluenssi kasvoi kokeen edetessä liian suureksi. Tästä syystä suuri osa TLR9 siRNA -soluista kuoli kokeen loppupuolella, mikä vaikuttaa tulosten luotettavuuteen ja vertailtavuuteen Ctrl siRNA -soluihin (konfluenssi alussa 20 %). Suuresta solumäärästä huolimatta kuvassa 16 nähdään vahvimman zoledronaattikonsentraation (100 μ M) vaikutus TLR9 siRNA -solujen proliferaatioon verrattuna käsittelemättömään kuljetinnäytteeseen vastaavasti kuin Ctrl siRNA -soluilla.

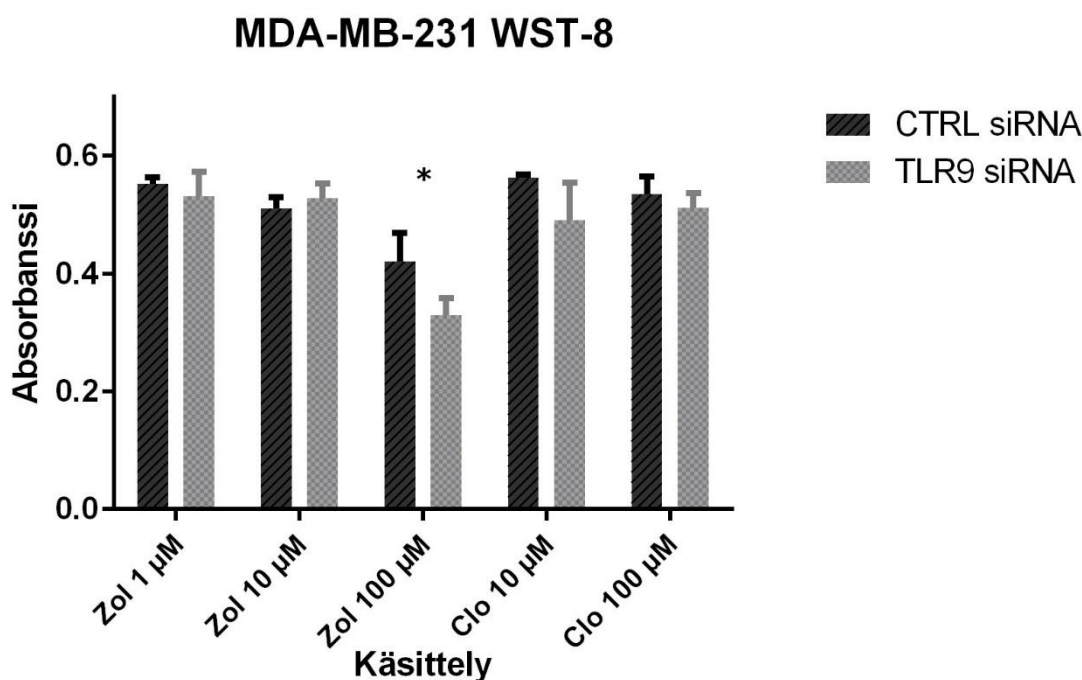
7.2.3 Cell Counting Kit-8

96-kuoppalevyllä viljellyistä MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -rintasyöpäsoluista mitattiin CCK-8:n WST-8-reagenssilla käsittelyn jälkeen absorbanssiarvot, jotka on esitetty alkuperäisessä muodossaan liitteessä 10. Kuopista mitatut absorbanssiarvot koottiin taulukkomuotoon (taulukko 6). Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen eri zoledronaatti- ja klodronaattipitoisuuksilla käsitellyt kuopat on merkitty taulukkoon vihreällä taustalla, ja koevirheen vuoksi hylätyt kuopat on merkitty punaisella taustalla.

Taulukko 6 MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen 96-kuoppalevyllä mitatut absorbanssiarvot WST-8-reagenssin lisäyksen ja tunnin inkubaation jälkeen.

	Ctrl siRNA						TLR9 siRNA					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,144	0,145	0,136	0,144	0,144	0,146	0,151	0,152	0,155	0,154	0,153	0,149
B	0,146	0,148	0,156	0,153	0,153	0,153	0,155	0,154	0,158	0,155	0,155	0,149
C	0,501	0,559	0,491	0,402	0,555	0,569	0,561	0,563	0,328	0,536	0,499	0,475
D	0,430	0,539	0,498	0,411	0,564	0,512	0,509	0,526	0,322	0,153	0,515	0,507
E	0,442	0,563	0,543	0,387	0,568	0,511	0,483	0,505	0,301	0,297	0,489	0,472
F	0,485	0,549	0,528	0,396	0,563	0,550	0,571	0,518	0,369	0,446	0,545	0,461
G	0,145	0,147	0,151	0,150	0,148	0,149	0,154	0,152	0,144	0,163	0,150	0,145
H	0,144	0,144	0,147	0,147	0,163	0,149	0,151	0,155	0,150	0,150	0,146	0,145

Tuloksista tehtiin kuvaaja (kuvio 4). Kuvaajaan valittiin kustakin laimennoskäsittelystä neljä rinnakkaista arvoa, joiden keskiarvo on nähtävissä kuvaajasta. Poikkeuksellisesti klodronaattipitoisuudella 10 μM käsitellyistä TLR9 siRNA -soluista valittiin vain kaksi rinnakkaista arvoa lopulliseen tulokseen. Tällä klodronaattipitoisuudella käsiteltyjen kuoppien D10 ja E10 absorbanssiarvoja ei otettu mukaan muodostettuun kuvaajaan, sillä ne olivat epäluotettavia ja viittasivat koevirheeseen. Kuopan D10 arvo on sama kuin käsittelemättömien kuoppien, mikä viittaa siihen, että kuoppaan ei pipetoitu WST-8-reagenssia. Kuopan E10 arvo on taas poikkeuksellisen matala. Solujen konfluenssia tarkasteltiin IncuCyte-kuvantamislaitteen ottamista kuvista ja tällöin huomattiin, että kyseisen kuopan konfluenssi oli liian suuri, minkä vuoksi valtaosa soluista oli kuollut. Tästä syystä kuopan E10 absorbanssiarvo ei siis tarjonnut luotettavaa tulosta, ja se poistettiin lopullisista tuloksista.

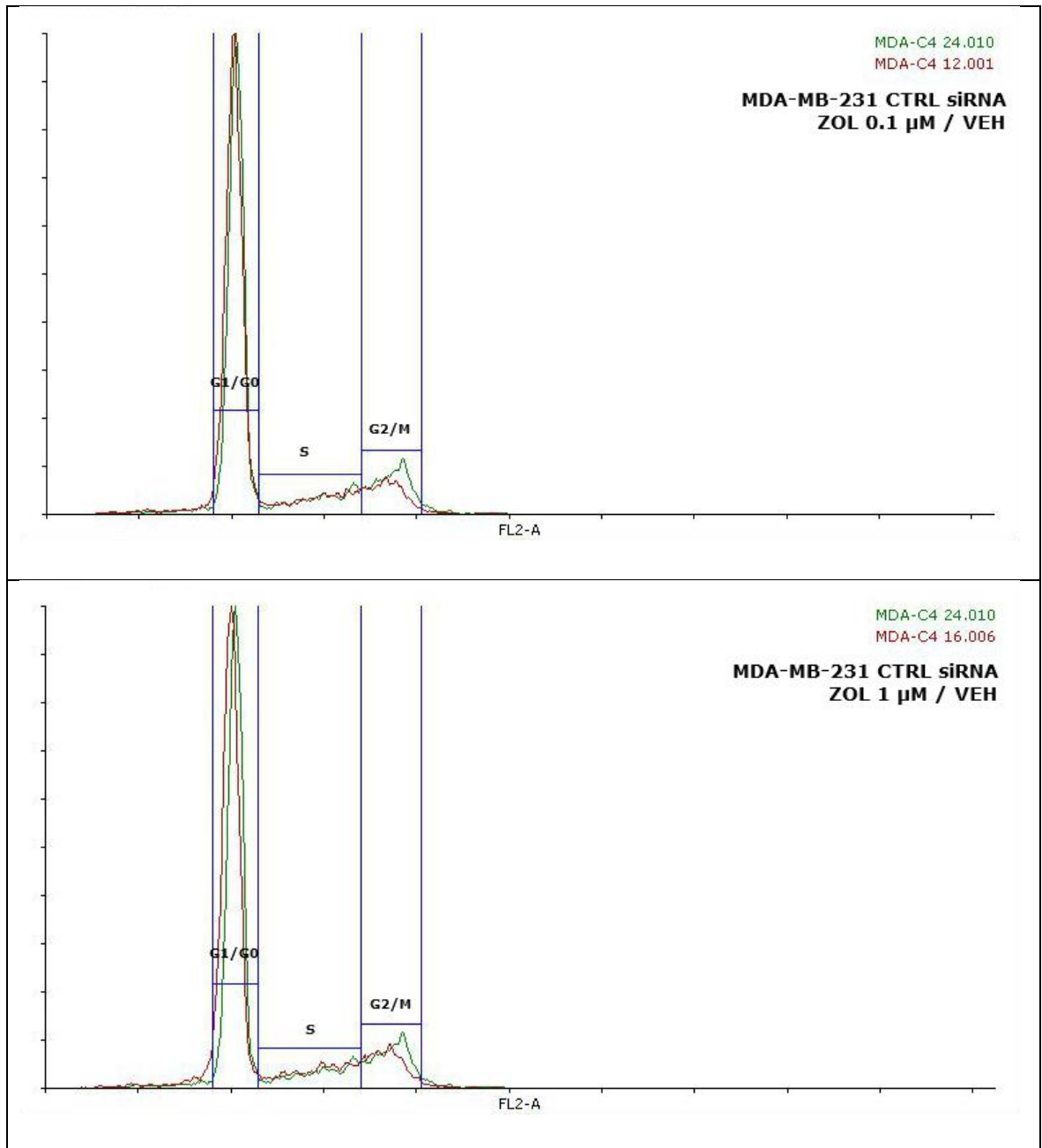


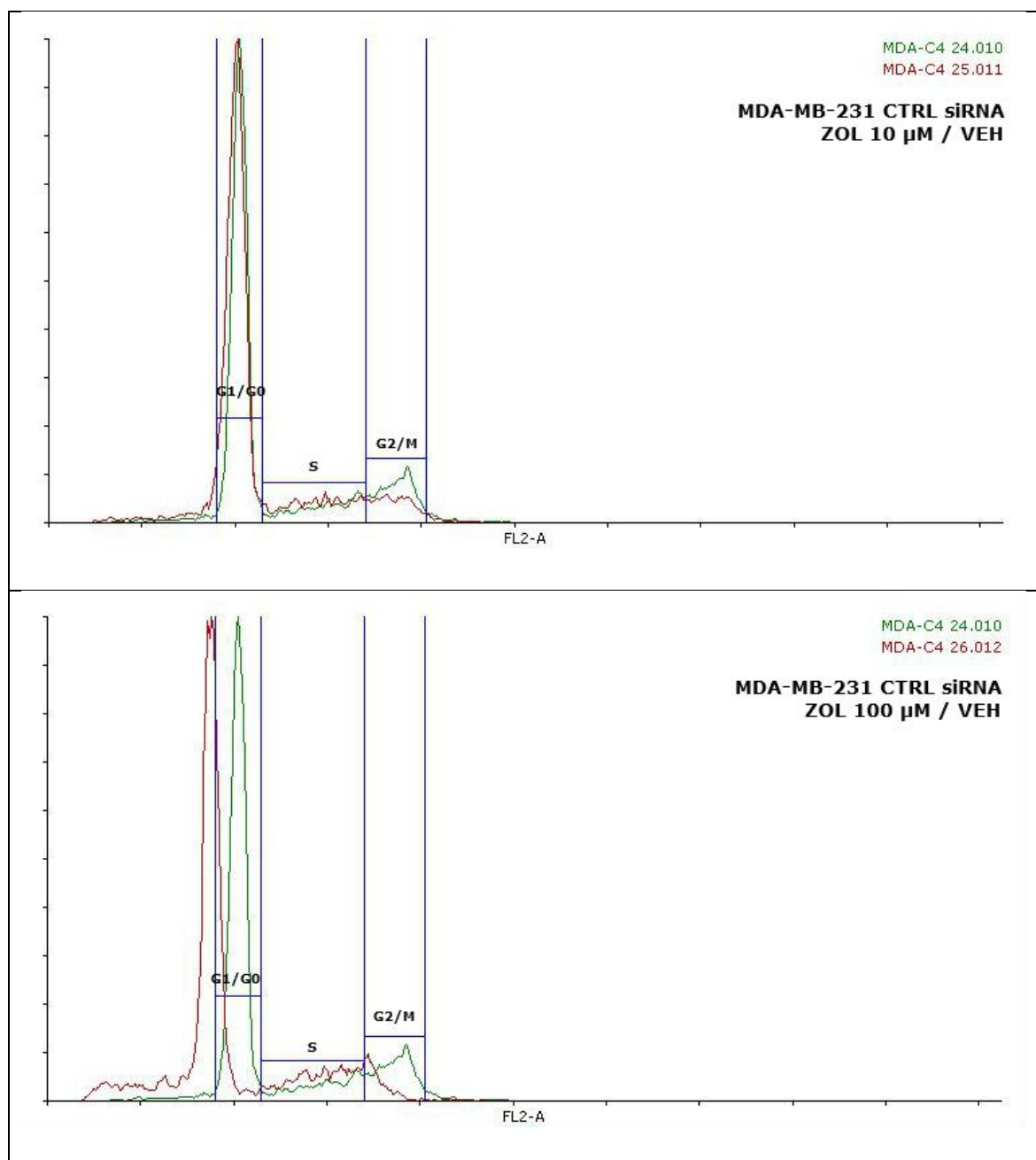
Kuvio 4. MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen absorbanssiarvot WST-8-reagenssin lisäyksen ja tunnin inkubaation jälkeen.

Kuvaajasta voidaan silmämääräisesti todeta, että Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen vaste bisfosfonaattikäsittelyihin ei näytä eroavan merkittävästi toisistaan lukuun ottamatta vahvinta zoledronaattipitoisuutta. Vahvimmalla zoledronaattipitoisuudella (100 μM) käsiteltyjen Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen absorptiossaarvojen välinen ero on tilastollisesti jokseenkin merkittävä, koska laskettu p-arvo on 0,03. Ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä muissa käsittelyvoimakkuuksissa. Tulokset viittaavat siihen, että vahvin zoledronaattipitoisuus (100 μM) vaikuttaa solujen elinkykyyn, mutta yhtä voimakkaalla (100 μM) klodronaattipitoisuudella ei näytä olevan vaikutusta solujen elinkykyisyyteen. Tulosten otanta on kuitenkin hyvin pieni, eikä niiden perusteella voida tehdä laajempia johtopäätöksiä. Tutkimus tulisi toistaa useita kertoja suuremmilla otantamäärillä, jotta tulokset olisivat luotettavia.

7.2.4 Virtausytometria

Natriumsitraattipuskurilla valmistettuja MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -soluja ajettiin sama määrä FACSCalibur-virtausytometrillä, minkä jälkeen saatua dataa käsiteltiin Flowing Software-tietokoneohjelmalla. Zoledronaattipitoisuuksien 0,1 μM , 1 μM , 10 μM ja 100 μM vaikutus MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen solusykliin verrattuna käsittelemättömiin kuljetinnäytteisiin on esitetty kuvassa 17. Kuhunkin kuvaajaan on yhdistetty käsittelemättömän kuljetinnäytteen solusyklin kuvaaja vihreällä sekä eri zoledronaattipitoisuudella käsiteltyjen solujen solusyklin kuvaaja punaisella. Kuljetinnäytteen kuvaajassa on esillä myös solusyklin jaottelu G1/G0-, S- ja G2/M-vaiheisiin. Kuvaajat on järjestetty laimeimmasta zoledronaattikäsittelystä vahvimpaan.



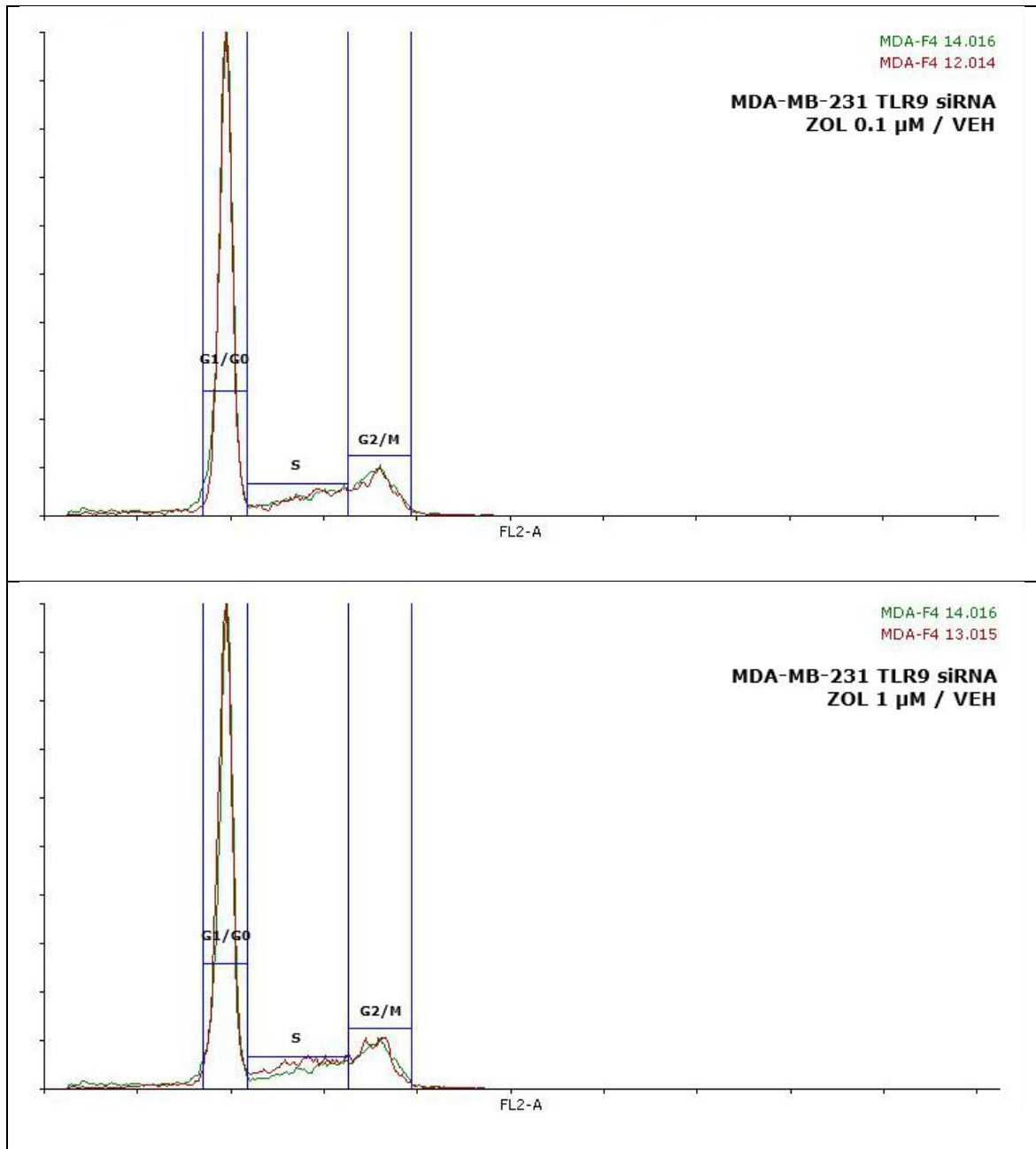


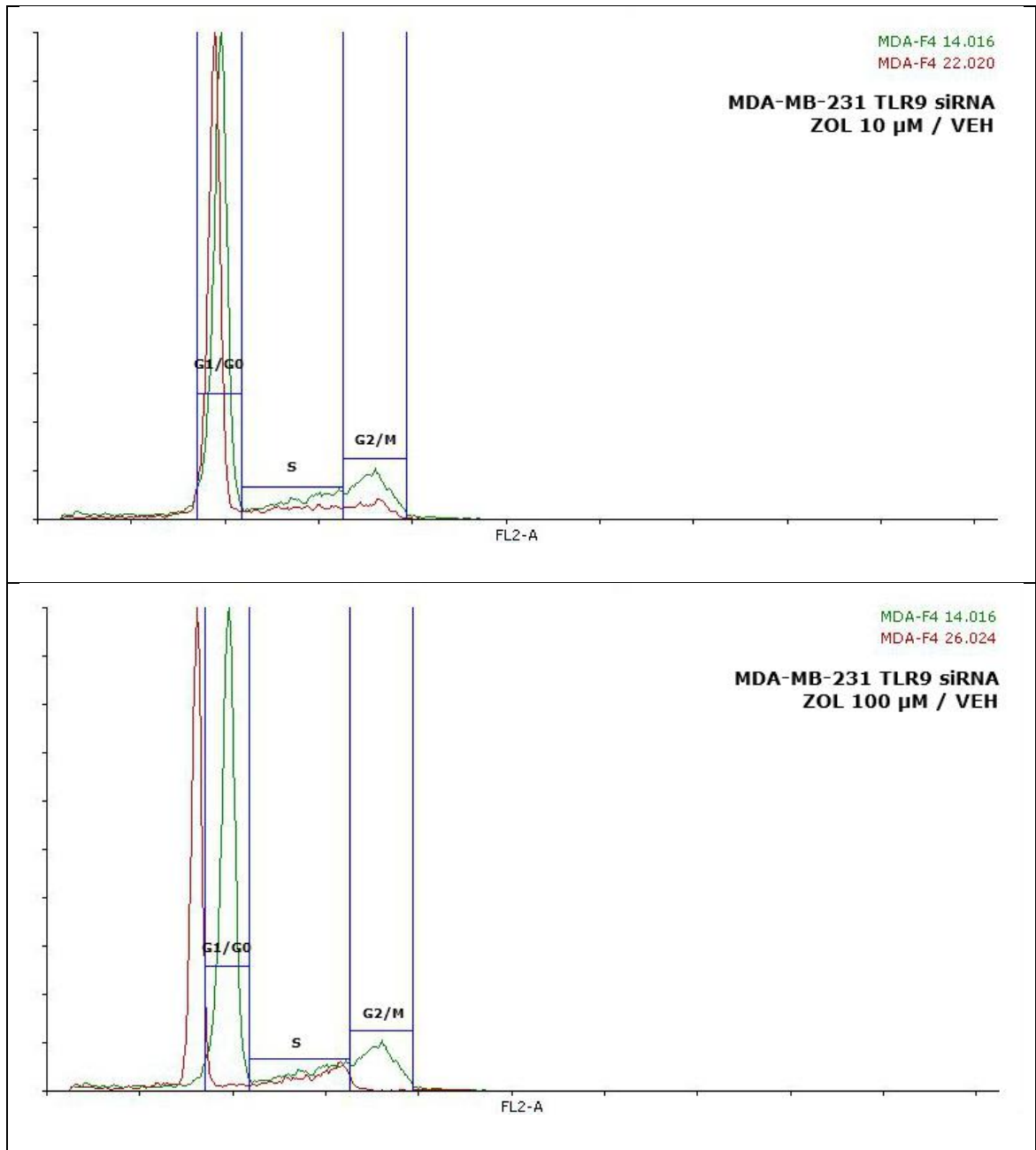
Kuva 17. Zoledronaattipitoisuuksien 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ja 100 µM vaikutus MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen solusykliin verrattuna käsittelemättömiin kuljetinnäytteisiin. Kuljetin = vihreä kuvaaja, ZOL = punainen kuvaaja.

MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA -solujen kuljetinnäytteen solusyklin kuvaaja mukailee DNA-pitoisuuksiltaan normaalisti etenevää solusykliä. Kuvaajissa on nähtävissä selkeästi G1/G0-vaihetta edeltävän apoptoottisten solujen osuuden kasvu zoledronaattikäsittelyn voimakkuuden lisääntyessä. Apoptoottisesti

kuolevia soluja näkyy myös hieman kuljetinnäytteiden kuvaajissa. Zoledronaattipitoisuuksilla 0,1 μM ja 1 μM käsiteltyjen solujen kuvaajat eivät poikkea juurikaan kuljetinnäytteiden kuvaajista, mutta toiseksi vahvimmalla zoledronaattipitoisuudella (10 μM) käsiteltyjen solujen kuvaaja poikkeaa jo hieman kuljetinnäytteestä. Vahvimmalla zoledronaattipitoisuudella (100 μM) käsiteltyjen solujen kuvaaja poikkeaa selkeästi kuljetinnäytteen kuvaajasta, koska kuvaajassa apoptoottisten solujen osuus on lähes yhtä suuri kuin S- ja G2/M-vaiheessa olevien solujen osuus. Tämä voi viitata siihen, että Ctrl siRNA -solut kuolevat apoptoottisesti, kun niitä käsitellään vahvimmalla zoledronaattipitoisuudella. Myös G2/M-vaiheessa olevien solujen osuus on pienentynyt kuljetinnäytteen kuvaajaan verrattuna, mutta osa Ctrl siRNA -soluista näyttää kuitenkin jatkavan solusyklissä.

Zoledronaattipitoisuuksien 0,1 μM , 1 μM , 10 μM ja 100 μM vaikutusta MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen solusykliin verrattuna käsittelemättömiin kuljetinnäytteisiin on esitetty kuvassa 18. Kuhunkin kuvaajaan on yhdistetty käsittelemättömän kuljetinnäytteen solusyklin kuvaaja vihreällä sekä eri zoledronaattipitoisuudella käsiteltyjen solujen solusyklin kuvaaja punaisella. Kuljetinnäytteen kuvaajassa on esillä myös solusyklin jaottelu G1/G0-, S- ja G2/M-vaiheisiin. Kuvaajat on järjestetty laimeimmasta zoledronaattikäsittelystä vahvimpaan.





Kuva 18. Zoledronaattipitoisuuksien 0,1 µM, 1 µM, 10 µM ja 100 µM vaikutus MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen solusykliin verrattuna käsittelemättömiin kuljetinnäytteisiin. Kuljetin = vihreä kuvaaja, ZOL = punainen kuvaaja.

MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solujen kuljetinnäytteiden tuloksista muodostettu solusyklin kuvaaja mukailee DNA-pitoisuuksiltaan normaalisti etenevää solusykliä. Laimeampien zoledronaattikäsittelyiden (0,1 µM ja 1 µM) kuvaajat mukailevat käsittelemättömien kuljetinnäytteiden solusyklin kuvaajia, joten

nämä zoledronaattipitoisuudet eivät siis näytä vaikuttavan myöskään TLR9 siRNA -solujen solusykliin. Kaikissa kuvaajissa, kuten myös kuljetinnäytteissä, on nähtävissä G1/G0-vaihetta edeltävä pieni apoptoottisten solujen osuus, joka on matalampi Ctrl siRNA -soluihin verrattuna. Kuvaajista havaitaan myös, että apoptoottisesti kuolevien solujen osuus ei nouse käsittelyvoimakkuuksien lisääntyessä, toisin kuin Ctrl siRNA -soluilla. Vahvimilla zoledronaattipitoisuuksilla (10 μ M ja 100 μ M) käsiteltyjen solujen kuvaajat poikkeavat selkeästi DNA-pitoisuuksiltaan käsittelemättömien kuljetinnäytteiden kuvaajista, ja ero korostuu erityisesti vahvimman zoledronaattipitoisuuden (100 μ M) kohdalla. Kyseisissä kuvaajissa S- ja G2/M-vaiheet jäävät poikkeuksellisen mataliksi, mikä saattaa johtua G1-vaiheen jälkeisestä blokista solujen solusykliissä. Tämän vuoksi solut eivät etenisi G1-vaiheen tarkastuspisteestä eteenpäin, vaan jäisivät G1-vaiheeseen ja kuolisivat kenties nekroottisesti apoptoosin sijaan.

Virtaussytometrialla saadut tulokset viittaavat siihen, että MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA -solut voivat olla herkempiä zoledronaatin vaikutukselle kuin Ctrl siRNA -solut. Ctrl siRNA -soluja kuolee erityisesti vahvimmassa zoledronaattipitoisuudessa (100 μ M) apoptoottisesti, mutta osa soluista myös etenee edelleen solusykliissä G2/M-vaiheeseen. Sen sijaan samalla zoledronaattipitoisuudella käsiteltyjen TLR9 siRNA -solujen solusyklikuvaajissa ei puolestaan ole selkeästi nähtävissä suurta apoptoottisten solujen osuutta, ja G2/M-vaiheessa olevien solujen osuus on matalampi Ctrl siRNA -soluihin verrattuna. TLR9 siRNA -solut saattavat kuolla siis pääosin nekroottisesti, kun niitä altistetaan voimakkaille zoledronaattipitoisuuksille.

8 POHDINTA

Opinnäytetyön aihe oli ajankohtainen ja erittäin mielenkiintoinen, mikä edesauttoi perehtymistä vieraan aiheen teoreettiseen viitekehykseen. Toteutuksessa käytetyt menetelmät olivat opinnäytetyön tekijöille uusia, mikä toi haasteita tutkimusten toteutukseen. Menetelmien periaatteiden ja käytännön opiskelun jälkeen tutkimuksia tehtiin ensin yhdessä ohjaajan kanssa ja myöhemmin itsenäisesti. Näin ollen opinnäytetyön tekijöillä ei ollut kokemuksen tuomaa taitoa, mikä saattoi vaikuttaa joidenkin tutkimustulosten luotettavuuteen. Kokemattomuus näkyi erityisesti virheinä soluviljelyn laskuissa sekä Western blot- ja CCK-8-menetelmissä. Toisaalta näiden uusien menetelmien oppimisen mahdollisuus ja tehdyt virheet antoivat tekijöille arvokasta kokemusta. William Mageeta lainaten: ”Ihminen, joka ei tee virheitä, ei tavallisesti tee muutakaan.”

Solujen elinkykyisyyden määrittävän kaupallisen kitin WST-8-reagenssin pipetoitavan annoksen tilavuus oli erittäin pieni, vain 10 µl. Tämän vuoksi oli tärkeää, että pipetoitu tilavuus päätyi nestepintaan asti, eikä jäänyt esimerkiksi kuopan seinämään. Pipetointi suoritettiin manuaalisesti yksikärkisellä pipetillä, minkä vuoksi oli suurempi mahdollisuus epähuomiossa jättää jokin tai jotkin 96-kuoppalevyn kuopista käsittelemättä. Tämä virhe olisi luultavasti voitu välttää käyttämällä monikärkkipipettiä, jolloin kuoppien väliin jäämisen mahdollisuus olisi ollut todennäköisesti pienempi. Pipetointivirheitä saattoivat aiheuttaa myös työskentelijöiden kokemattomuus ja monet meneillään olevat osatutkimukset. Erityisesti Western blot on menetelmänä aikaa vievä, sillä yksi analyysi kestää pääsääntöisesti kaksi päivää. Virhe missä tahansa työskentelyn vaiheessa saattaa käydä ilmi vasta kehitetystä filmistä, jolloin virheen laajuudesta riippuen menetelmän loppuun vieminen on saattanut olla turhaa ja lopputulos käyttökelvoton.

Soluviljelyssä kasvatetuille MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -soluille ei tehty missään vaiheessa mykoplasmatestiä. Mykoplasmatestin avulla olisi voitu poissulkea mykoplasmakontaminaation mahdollisuus, joka saattaa

muuttaa solujen käyttäymistä ja vaikuttaa tutkimustuloksiin. Mykoplasmatesti olisi ollut tarpeellinen, kun MDA-MB-231(SA)-soluja viljeltiin 96-kuoppalevyille, jossa niitä käsiteltiin eri zoledronaatti- ja klodronaattikonsentraatioilla. IncuCyte-kuvantamislaitteella ei saatu luotettavia tuloksia solujen kasvukäyristä, koska suurin osa myös käsittelemättömistä kuljettimista kuolivat 96-kuoppalevyllä. Näitä tuloksia ei ole esitetty opinnäytetyössä. Koe toistettiin muutamaaan kertaan, mutta syy solujen kuolemaan ei selvinnyt.

8.1 Eturauhassyöpäprojekti

Aminobisfosfonaatteihin kuuluva alendronaatti näytti vähentävän PC-3-eturauhassyöpäsolujen kofiliinimäärää ainakin opinnäytetyössä tutkitulla vahvimmalla (10^{-4} M) alendronaattipitoisuudella. Lisäksi kofiliinia yliekspressoivat PC-3-solut näyttivät olevan herkempiä alendronaatin vaikutukselle kontrollisoluihin verrattuna. Eturauhassyöpä voi yliekspressoida kofiliinia, mikä mahdollistaa sen invasiivisuuden. Koska alendronaatti näytti vähentävän kofiliinia yliekspressoivien PC-3-solujen kofiliinimäärää, alendronaatti voi tätä kautta hajottaa solun aktiinitukirankaa ja estää eturauhassyöpäsolujen leviämistä. Hiirikokeessa PC-3-kasvainten kasvu vaikutti hidastuvan alendronaattihoidon vaikutuksesta verrattuna kontrolliryhmään, mikä vahvistaa tätä mahdollisuutta. Tulosten luotettavuudeksi kokeita täytyisi toistaa, ja laskea kuvaajista tilastolliset merkitsevyydet p-arvojen avulla.

8.2 Rintasyöpäprojekti

Hiirikokeen tutkimustulokset eivät vastanneet hypoteesia, jonka mukaan TLR9 siRNA -kasvainten odotettiin kasvavan nopeammin ja aggressiivisemmin verrattuna Ctrl siRNA -kasvaimiin. Tuomelan ym. (2012) suorittamissa aiemmissa hiirikokeissa, joissa todettiin TLR9 siRNA -kasvainten kasvavan Ctrl siRNA -kasvaimia aggressiivisemmin, käytettiin immuunipuutteisia *athymic nude* -hiiriä ja ihmisen kolmoisnegatiivisia MDA-MB-231-rintasyöpäsoluja. Opinnäytetyön hiirikokeessa käytetyt solut olivat hiiren kolmoisnegatiivisia 4T1-

rintasyöpäsoluja. Lisäksi tutkimuksen hiiret olivat BALB/c-hiiriä, joiden immuunijärjestelmä on kehittyneempi, koska niiltä ei puutu kateenkorvaa, toisin kuin *athymic nude* -hiiriltä. Immuunipuolustus on monimutkainen järjestelmä, joten TLR9-välitteinen syövän invasiivisuus voi liittyä mahdollisesti moniin muihin välillisiin tekijöihin. Myös Tuomelan ym. (2013, a) tekemässä tutkimuksessa todettiin, että kolmoisnegatiivisten MDA-MB-231-rintasyöpäsolujen invasiivisuus ei lisääntynyt soluviljelyssä, kun eläviä syöpäsoluja altistettiin kuolleista syöpäsoluista peräisin oleville fysiologisille TLR9-ligandeille. Koska tutkimus tehtiin *in vitro* ilman immuunijärjestelmän läsnäoloa, tämä voi viitata siihen, että kolmoisnegatiivisen matalan TLR9-ekspression rintasyövän invasiivisuutta lisäävä tekijä ei välttämättä olekaan TLR9, vaan ehkäpä välillisesti jokin toinen TLR-perheenjäsen tai -jäsenet.

In vitro -tutkimuksissa zoledronaatti näytti alentavan MDA-MB-231(SA)-solujen elinkykyä ja proliferaatiota vahvimmalla pitoisuudella (100 μ M), mutta yhtä vahvalla klodronaattipitoisuudella ei ollut havaittavaa vaikutusta solujen elinkykyisyyteen tai proliferaatioon. Virtaussytometriatutkimuksessa havaittiin, että matalan TLR9-ekspression kolmoisnegatiiviset rintasyöpäsolut näyttivät olevan herkempiä zoledronaatille verrattuna korkeamman TLR9-ekspression kontrollisoluihin. Virtaussytometriatutkimuksessa pystyttiin vertaamaan zoledronaatin vaikutusta kontrolli- ja matalan TLR9-ekspression soluihin, koska virtaussytometrilla ajettiin sama määrä molempia solutyyppejä. 96-kuoppalevyllä viljellyissä soluissa zoledronaatin vaikutusta ei voitu verrata luotettavasti, koska matalan TLR9-ekspression soluja oli laskuvirheen vuoksi pipetoitu huomattavasti enemmän kuin kontrollisoluja.

Kolmoisnegatiivisten matalan TLR9-ekspression rintasyöpäsolujen herkkyys zoledronaatille saattaa johtua aminobisfosfonaattien ominaisuudesta metaboloida myös syöpäsoluihin sytotoksia ATP-analogeja mevalonaattireitin kautta. Nämä poikkeavat nukleotidianalogit voivat toimia mahdollisesti TLR9-ligandeina, jotka voivat aiheuttaa syövän invasiivisuuden lisäksi myös immuunijärjestelmän aktivoitumista, ja tätä kautta mahdollisesti myös syöpäsolujen apoptoosia. Toisaalta virtaussytometriatutkimuksessa havaittiin

myös, että vahvin zoledronaattipitoisuus vaikutti matalan TLR9-ekspression rintasyöpäsolujen solusykliin merkittävästi eri tavalla kuin kontrollisolujen solusykliin. Matalan TLR9-ekspression soluista paljon pienempi osa näytti etenevän solusyklissä, ja apoptoottisten solujen osuus oli myös huomattavasti pienempi kontrollisoluihin verrattuna. Matalan TLR9-ekspression rintasyöpäsolut saattoivat siis kuolla vahvimman zoledronaattipitoisuuden vaikutuksesta joko nekroottisesti, tai solujen solusykli pysähtyi esimerkiksi G1/S-vaiheen blokkiin. Tähän viittaisi se, että kuvaajassa näkyy vain hyvin pieni solumäärä G2/M-vaiheessa. InCuCyte-kuvantamislaitteen ottamien kuvien perusteella havaittiin, että myös 6-kuoppalevyille viljellyt solut kuolivat vahvimman zoledronaattipitoisuuden vaikutuksesta kuten 96-kuoppalevyllä. 6-kuoppalevyn kuvia ei ole esitetty opinnäytetyössä.

Nekroottisesti kuolleet solut eivät välttämättä näy virtausytometrillä solusyklikuvaajissa, koska virtausytometrillä rajattiin tietyt kriteerit täyttävä solupopulaatio. Hallitsemattomasti hajonneet solut ja niiden kappaleet eivät luultavasti valikoituisi tähän populaatioon. Toisaalta solujen nekroottinen solukuolema synnyttää elimistössä tulehdusreaktion, joka aktivoi immuunijärjestelmää. Ehkä zoledronaatin aikaansaama kolmoisnegatiivisten rintasyöpäsolujen mahdollinen nekroottinen kuolema ja immuunijärjestelmän stimuloiminen voisivat jopa hyödyttää kolmoisnegatiivisia matalan TLR9-ekspression rintasyöpäpotilaita. Toisaalta, jos näiden potilaiden immuunijärjestelmä on puutteellinen tai heikentynyt, mahdollinen tulehdusreaktio saattaisi aiheuttaa entistä enemmän ongelmia. TLR9-ekspression merkitys kolmoisnegatiivisessa rintasyöpässä on siis kokonaisuutena hyvin monimutkainen, minkä vuoksi lisätutkimuksia tarvitaan.

8.3 Jatkotutkimusaiheet

Mahdollisia jatkotutkimusaiheita on monia, kuten molempien projektien osatutkimusten toistaminen luotettavampien tulosten saamiseksi. Rintasyöpäprojektin mielenkiintoisin jatkotutkimusaihe olisi laajempi tutkimus zoledronaatin

tai muun aminobisfosfonaatin vaikutuksesta MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solujen solusykliin. Opinnäytetyössä jäi epäselväksi, mihin kohtaan solusykli mahdollisesti pysähtyy, ja kuolevatko solut zoledronaatin vaikutuksesta nekroottisesti apoptoosin sijaan. Eturauhassyöpäprojektin osatutkimuksia voisi laajentaa myös soluviljelyn puolelle, ja tutkia eri aminobisfosfonaattikonsentraatioiden vaikutusta soluihin.

Bisfosfonaattien ongelmallisuus syöpälääkkeenä on kuitenkin niiden voimakas luuhakuisuus ja matala biologinen hyötysuhde, minkä vuoksi annostuksen kohdentaminen itse syöpäkudokseen on vaikeaa. Opinnäytetyön tulokset vahvistavat myös useissa aikaisemmissa tutkimuksissa todettua havaintoa, jossa aminobisfosfonaatit hidastavat tai estävät syöpäsolujen kasvua huomattavasti tehokkaammin verrattuna ensimmäisen sukupolven non-aminobisfosfonaatteihin. Tulevaisuudessa aminobisfosfonaattien kohdentamista syöpäkudokseen voitaisiin tutkia esimerkiksi nanopartikkeliteknologian avulla, joka voisi mahdollisesti vähentää bisfosfonaattien pitkäaikaiskäytössä esiintyviä vakavia haittavaikutuksia. Erityisesti aminobisfosfonaatteja voidaan harkita käytettäväksi ainakin kolmoisnegatiivisen matalan TLR9-ekspression rintasyövän ja levinneen eturauhassyövän liitännäishoitona. Tämä vaatii tosin vielä useita prekliinisiä tutkimuksia, joiden tietojen perusteella voidaan mahdollisesti siirtyä kliinisiin tutkimuksiin.

LÄHTEET

Abcam. 2014. Definitive guide to western blot (pdf). Viitattu 21.11.2014. <http://www.abcam.com/> > Support > Protocols and troubleshooting > Protocol guides and diagrams > Detailed application guides > Western blotting guide > Download the western blot detailed guide PDF

Abcam. 2010. Introduction to flow cytometry (pdf). Viitattu 1.12.2014. <http://www.abcam.com/> > Products > Resources > Flow cytometry product selector > Introduction to flow cytometry > View the full flow cytometry introduction (pdf)

Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. & Walter, P. (Toim.) 2007. Teoksessa Molecular Biology of the Cell. 5. painos. USA: Garland Science. 994, 1001–1004, 1530–1537.

ATCC®. 2014, a. 4T1 (ATCC® CRL-2539™). Viitattu 13.11.2014. <https://www.lgcstandards-atcc.org/> > Search > 4T1 > 4T1 (ATCC® CRL-2539™) > General information, Characteristics

ATCC®. 2014, b. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). Viitattu 13.11.2014. <https://www.lgcstandards-atcc.org/> > Search > MDA-MB-231 > MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) > General information

ATCC®. 2014, c. PC-3 (ATCC® CRL-1435™). Viitattu 13.11.2014. <https://www.lgcstandards-atcc.org/> > Search > PC-3 > PC-3 (ATCC® CRL-1435™) > General information

ATCC®. 2014, d. Triple-Negative Breast Cancer Panel 3 (ATCC® TCP-1003™). Viitattu 13.11.2014. <https://www.lgcstandards-atcc.org/> > Search > Triple-negative > Triple-Negative Breast Cancer Panel 3 (ATCC® TCP-1003™) > General information

Baydoun, A. R. 2005. Teoksessa Wilson, K. & Walker, J. (Toim.) Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6. painos. New York. Cambridge University Press. 87–88.

Buhaescu, I. & Izzedine. H. 2007. Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications. Clinical Biochemistry Volume 40: 575–584. Viitattu 25.1.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467679>

Clézardin, P. 2013. Mechanisms of action of bisphosphonates in oncology: a scientific concept evolving from antiresorptive to anticancer activities. BoneKEy Reports 2. Article number: 267. Viitattu 27.1.2015. <http://www.nature.com/bonekeyreports/2013/130206/bonekey20131/full/bonekey20131.html>

Dojindo Molecular Technologies Inc 2014. Cell Counting Kit-8 – Cell Proliferation Assay and Cytotoxicity Assay. Viitattu 3.11.2014. <http://www.dojindo.com/> > Products > Cell Analysis / Oxidative Stress > Cell Counting Kit-8 > Manual

Engholm, G. Ferlay, J. Christensen, N. Kejs, AMT. Johannesen, TB. Khan, S. Milter, MC. Ólafsdóttir, E. Petersen, T. Pukkala, E. Stenz, F. & Storm, HH. 2014. NORDCAN: Cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Survival in the Nordic Countries, Version 7.0. Association of the Nordic Cancer Registries. Danish Cancer Society. Viitattu 15.1.2015. <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/frame.asp> > Syöpätietoja lyhyesti > Eturauhanen, Rinta > Suomi

Essen BioScience. 2014. IncuCyte ZOOM (pdf). Viitattu 3.11.2014.
<http://www.essenbioscience.com/> > Products > IncuCyte ZOOM > IncuCyte ZOOM brochure > Download pdf

Eturauhassyöpä: Käypä hoito -suositus. 2014. Viitattu 15.1.2015.
<http://www.kaypahoito.fi/web/kh/suosituksset/suositus?id=hoi11060>

Geenitekniikkalaki. 377/1995. Sosiaali- ja terveysministeriö. Viitattu 22.10.2014.
<https://www.finlex.fi/fi/laki/ajantasa/1995/19950377>

GE Healthcare. 2009. Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system – Product Booklet (pdf). Viitattu 22.11.2014.
<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/Home/en/GELifeSciences-fi/> > Products & Solutions > Research Tools > Protein Research > Amersham ECL start > Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent > Related Documents > Instruction/Protocol > Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system

Harlan Laboratories. 2009. Athymic nude mouse. Viitattu 22.11.2014.
www.harlan.com > Products and Services > Research Models > Athymic Nude Mice > Related Downloads & Links: Datasheet (PDF)

Heino, J. & Vuento, M. 2009. Biokemian ja solubiologian perusteet. Helsinki: WSOYpro Oy. 209–211.

Hirsjärvi, S; Remes, P. & Sajavaara, P. 2004. Tutki ja kirjoita. 10. uudistettu painos. Helsinki: Tammi. 131, 136–138.

Huovinen, R. & Tanner, M. 2013. Rintasyövän liittämisseläkehoito. Teoksessa Suomen Rintasyöpäryhmä ry – Finnish Breast Cancer Group. (Toim.) Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus. Viitattu 25.1.2015.
<http://rintasyoparyhma.yhdistysavain.fi/> > Hoitosuositus > Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus 2013 (pdf)

Joensuu, H. 2013. Rintasyövän yleisyys, ennuste, riskitekijät ja ehkäisy. Teoksessa Suomen Rintasyöpäryhmä ry – Finnish Breast Cancer Group. (Toim.) Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus. Viitattu 18.1.2015.
<http://rintasyoparyhma.yhdistysavain.fi/> > Hoitosuositus > Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus 2013 (pdf)

Johnson, M. 2014. Laboratory Mice and Rats. Viitattu 25.11.2014.
<http://www.labome.com/> > Recent Articles > More > Laboratory Animals/Model Organisms > Laboratory Mice and Rats

Jousimaa, J. Alenius, H. Atula, S. Kattainen, A. Kunnamo, I. Pelttari, H. & Teikari, M. (Toim.) 2012. Eturauhassyöpä. Ajankohtaista Lääkärin Käsikirjasta. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Volume 1:99-102.

Karns, J. 2014. Cell Cycle Diagram (png). Viitattu 2.1.2015.
<http://www.centergrove.k12.in.us/Page/2567> > 2nd 9-week Course Outline > Cells to Organ Systems > Cell Cycle Diagram (png)

Kellokumpu-Lehtinen, P. & Tammela, T. 2013. Uusilla lääkkeillä parempaa hoitoa eturauhassyöpään. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Volume 9:923–930.
http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&viewType=viewArticle&tunnus=duo10956

Kerminen, J. 2011. Innate Immune Recognition of RNA-virus infection in human macrophages. Väitöskirja. Helsingin yliopiston julkaisuja. 8, 20–22, 25–27. Viitattu 20.11.2014. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-6958-1>

Kujala, P. 2012. Eturauhasen syöpä. Teoksessa Mäkinen, M. Carpén, O. Kosma, V-M. Lehto, V-P. Paavonen, T. & Stenbäck, F. (Toim.) Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim. 803–807.

Laki tieteellisiin tai opetustarkoituksiin käytettävien eläinten suojelusta. 497/2013. Maa- ja metsätalousministeriö. Viitattu 20.11.2014. <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20130497>

Merrell, MA. Wakchoure, S. Lehenkari, PP. Harris, KW. & Selander, KS. 2007. Inhibition of the mevalonate pathway and activation of p38 MAP kinase are independently regulated by nitrogen-containing bisphosphonates in breast cancer cells (Abstract). Eur J Pharmacol. Volume 10:27–37. Viitattu 25.1.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640631>

Mirtti, T. & Rannikko, A. 2012. Eturauhassyövän yksilöllinen hoitovalinta - apuna molekyylipatologiset merkkiaineet ja biopankki. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Volume 128:2497–2499. Viitattu 3.8.2014. http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/haku?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_lifecycle=0&Article_WAR_DL6_Articleportlet_hakusana=mirtti&Article_WAR_DL6_Articleportlet_p_frompage=haku&Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo10676

Nurmenniemi, P. Hannonen, P. & Tuovinen, V. 2007. Bisfosfonaattilääkitykseen liittyvä leukojen osteonekroosi. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 123(20):2443-2448. Viitattu 25.1.2015. http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/haku;jsessionid=A71C2232EE1430D5A9CF270D0E999591?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_lifecycle=0&Article_WAR_DL6_Articleportlet_p_frompage=uusinnumero&Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo96814

Ormerod, M. 2008. Flow Cytometry – A basic introduction: DNA Analysis. Viitattu 1.1.2015. <http://flowbook.denovosoftware.com/> > Chapter 6: DNA Analysis

Ouyang, M. Li, Y. Ye, S. Ma, J. Lu, L. Lv, W. Chang, G. Li, X. Li, Q. Wang, S. & Wang, W. 2014. MicroRNA Profiling Implies New Markers of Chemoresistance of Triple-Negative Breast Cancer (Abstract). PLoS One. Volume 2:9. Viitattu 6.6.2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788655>

Paul, A. Gunewardena, S. Stecklein, S. R. Saha, B. Parelkar, N. Danley, M. Rajendran, G. Home, P. Ray, S. Jekar, I. Vielhauer, G.A. Jensen, R. A. Tawfik, O. & Paul, S. 2014. PKC α signaling promotes triple-negative breast cancer growth and metastasis (Abstract). Cell Death and Differentiation. Volume 21:1469–1481. Viitattu 10.10.2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24786829>

Rosenholm, JM. Mamaeva, V. Sahlgren, C. & Lindén, M. 2012. Nanoparticles in targeted cancer therapy: mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage (Abstract). Nanomedicine (Lond). Volume 7:111–120. Viitattu 25.1.2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22191780>

Räikkönen, J. 2011. Bisphosphonate-induced IPP/Apppl accumulation in cells. Väitöskirja. Itä-Suomen yliopiston julkaisuja. VII, 7–9. Viitattu 25.1.2015. http://epublications.uef.fi/pub/urn_isbn_978-952-61-0516-1/urn_isbn_978-952-61-0516-1.pdf

Sandholm, J. 16.1.2015. Re: Vielä hieman asioita opinnäytetyöhön liittyen. Vastanottaja Milla Vainio. [Sähköpostiviesti] Viitattu 24.1.2015.

Shevach, EM. 2005. Chapter 4.2: Flow Cytometry Analysis Using the Becton Dickinson FACS Caliber. Teoksessa Coligan, JE. Bierer, BE. Margulies, DH. Shevach, EM. & Strober, W. (Toim.) Short Protocols in Immunology: a compendium of methods from current protocols in immunology. Hoboken: John Wiley & Sons. 4–8.

Sigma-Aldrich. 2014. Classical Media and Salts: DMEM. Viitattu 13.11.2014.
<http://www.sigmaaldrich.com/> > Products > Life Science > Cell Culture > Classical Media & Salts > DMEM Media

Suomen Syöpärekisteri. 2014, a. Uusien syöpätapausten määrät keskimäärin vuosina 2008–2012 primaaripaikoittain ja iän mukaan, MIEHET. Viitattu 10.2.2015.
<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/> > Tilastot > Ajantasaiset perustaulukot > Koko maa > Insidenssi ikäryhmittäin: Uusien tapausten määrät > Miehet

Suomen Syöpärekisteri. 2014, b. Uusien syöpätapausten määrät keskimäärin vuosina 2008–2012 primaaripaikoittain ja iän mukaan, NAISSET. Viitattu 10.2.2015.
<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/> > Tilastot > Ajantasaiset perustaulukot > Koko maa > Insidenssi ikäryhmittäin: Uusien tapausten määrät > Naiset

Suomen Syöpärekisteri. 2014, c. Yleisimmät syövät vuonna 2012, MIEHET. Viitattu 10.2.2015.
<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/> > Tilastot > Ajantasaiset perustaulukot > Koko maa > Insidenssi: Yleisimmät syövät > Miehet

Suomen Syöpärekisteri. 2014, d. Yleisimmät syövät vuonna 2012, NAISSET. Viitattu 10.2.2015.
<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/> > Tilastot > Ajantasaiset perustaulukot > Koko maa > Insidenssi: Yleisimmät syövät > Naiset

The Jackson Laboratory. 2014. JAX® mice database – Strain name: J:NU. Viitattu 22.11.2014.
www.jax.org > Find JAX® Mice > Most popular JAX® Mice strains > Immunodeficient strains: NU/J (Stock number: 002019)

Thorpe, R. & Thorpe, S. 2005. Immunochemical techniques. Teoksessa Wilson, K. & Walker, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 6. painos. New York. Cambridge University Press. 328–331.

Thurnher, M. Gruenbacher, G. & Nussbaumer, O. 2013 Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells (Abstract). Biochim Biophys Acta. Volume 1831:1009–1015. Viitattu 25.1.2015.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198113000619>

Thurnher, M. Nussbaumer, O. & Gruenbacher, G. 2013. Novel Aspects of Mevalonate Pathway Inhibitors as Antitumor Agents. Clinical Cancer Research. Volume 18:3524–3531. Viitattu 25.1.2015.
<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/13/3524.full.pdf+html>

Tuomela, J. 8.2.2015. Opinnäytetyö. Vastaanottajat Minna Vuorenmaa, Milla Vainio. [Sähköpostiviesti] Viitattu 10.2.2015.

Tuomela, J. 2009. Orthotopic PC-3 tumor xenografts in studies on prostate cancer growth and metastasis. Akateeminen väitöskirja. Turun yliopiston julkaisuja. Sarja D: Osa 888. 34–35. Saatavilla myös www-muodossa.
<http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-4176-6>

Tuomela, J. Sandholm, J. Kaakinen, M. Patel, A. Kauppila, JH. Ilvesaro, J. Chen, D. Harris, KW. Graves, D. & Selander, KS. 2013, a. DNA from dead cancer cells induces TLR9-mediated invasion and inflammation in living cancer cells. Breast Cancer Research and Treatment. Volume 142:477–487. Viitattu 6.5.2014.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847512>

Tuomela, J. Sandholm, J. Kauppila JH. Lehenkari, P. Harris, KW. Selander KS. 2013, b. Chloroquine has tumor-inhibitory and tumor-promoting effects in triple-negative breast cancer. *Oncology Letters*. Volume 6:1665–1672. Viitattu 6.6.2014.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24273604>

Tuomela, J. Sandholm, J. Karihtala, P. Ilvesaro, J. Vuopala, KS. Kauppila, JH. Kauppila, S. Chen, D. Pressey, C. Härkönen, P. Harris, KW. Graves, D. Auvinen, PK. Soini, Y. Jukkola-Vuorinen, A. & Selander, KS. 2012. Low TLR9 expression defines an aggressive subtype of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. Volume 135:481–493. Saatavilla myös www-muodossa:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847512>

Turun yliopiston koe-eläinkeskus. 2015. Koe-eläinkeskuksen esittely. Viitattu 2.1.2015.
<http://www.utu.fi/fi/Sivut/home.aspx> > Tiedekunnat ja yksiköt > Lääketieteellinen tiedekunta > Yksiköt > Muut > Koe-eläinkeskus

Tutkimuseettinen neuvottelukunta. 2012. Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa (pdf). Viitattu 22.2.2014.
<http://www.tenk.fi/fi> > HTK-ohje 2012 > Hyvä tieteellinen käytäntö ja sen loukkausepäilyjen käsitteleminen Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelulautakunnan ohje 2012 (pdf)

Uutispalvelu Duodecim. 2012. Osteoporoosilääke voi altistaa osan potilaista harvinaisille murtumille. Viitattu 22.1.2015.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=uut15679&p_teos=uut&p_osio=100&p_selaus=

Vehmanen, L. 2012, a. Paikallisen rintasyövän hoito. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 11.11.2014.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00468

Vehmanen, L. 2012, b. Rintasyöpä: toteaminen ja ennuste. Lääkärikirja Duodecim. Viitattu 6.5.2014.
http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00618

Vehmanen, L. & Saarto, T. 2010. Bisfosfonaatit ja rintasyöpä. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Volume 126:1229–1237. Viitattu 6.6.2014.
http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/arkisto?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_action=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&viewType=viewArticle&tunnus=duo98828

Vilka, H. 2005. Tutki ja kehitä. Helsinki: Tammi. 49–50.

Virtanen, S. 2010. Bisphosphonate inhibition of prostate cancer cell invasion, migration and cytoskeletal organization. Akateeminen väitöskirja. Turun yliopiston julkaisuja. Sarja D: osa 939. 4–5, 11–12, 21–23, 31–36, 48–50, 53–57. Saatavilla myös www-muodossa:
<http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-29-4486-6>

Virtanen, S.S. Sandholm, J. Tuomela, J. Väänänen, H. K. & Härkönen, P. L. 2014 (julkaisematton). Alendronate-induced disruption of actin cytoskeleton is associated with decrease of cofilin in PC-3 prostate cancer cells.

Väisänen, MR. Jukkola-Vuorinen, A. Vuopala, KS. Selander, KS. & Vaarala, MH. 2013. Expression of Toll-like receptor-9 is associated with poor progression-free survival in prostate cancer. *Oncology Letters*. Volume 5:1659–1663. Viitattu 6.5.2014.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3678868/>

Wagner, H. 2004. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends in Immunology*. Volume 25: 381–386. Viitattu 10.2.2015.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490604001504>

Westermeier, R. 2011. Teoksessa Janson, J-C. (toim.) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. 3. painos. New Jersey: John Wiley & Sons. 442–447.

Liite 1. Toimeksiantosopimus



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖN TOIMEKSIANTOSOPIMUS

1

OPISKELIJAN TIEDOT

Nimi Milla Vainio & Minna Vuorenmaa
 Osoite Resinaraitti 8 as 15, 20100 Turku
 Puhelin koti [REDACTED] Puhelin työ _____
 Sähköposti milla.vainio@students.turkuamk.fi
 Koulutusohjelma Bioanalytiikan ko

OPINNÄYTETYÖ

Aihe/ työnimi Bisfosfonaattien vaikutus
eturauhas- ja kolmoisnegatiiviseen
rintasyöpään
 Aikataulu Kevät 2014 - Syksy 2014

TOIMEKSIANTAJA

Organisaatio Turun yliopisto / Biolääketieteen laitos, solubiologia ja anatomia
 Työn ohjaaja / yhteyshenkilö Johanna Tuomela
 Osoite Bio City Turku, Tykistökatu 6B, 20521 Turku
 Puhelin [REDACTED] Sähköposti jomitv@utu.fi

OHJAAVAN OPETTAJAN YHTEYSTIEDOT

Ohjaava opettaja Ilari Suominen
 Puhelin [REDACTED] Sähköposti ilari.suominen@turkuamk.fi

Turun ammattikorkeakoulu
 Joukahaisenkatu 3 A, 20520 Turku
 puh. 02 263 350 faksi 02 2633 5791
 sposti etunimi.sukunimi@turkuamk.fi

OPINNÄYTETYÖN SOPIMUSEHDOT*

OHJAUS JA VASTUUT

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

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

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

OIKEUDET

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

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

TYÖSUHDE JA KUSTANNUKSET

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

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

TULOsten JULKISTAMINEN JA LUOTTAMUKSELLISUUS

Opinnäytetyöstä laaditaan Turun ammattikorkeakoulun ohjeen mukainen kirjallinen raportti.

Mitä liike- tai ammatillisuuksiin liittyviä asioita ei esitetä opinnäytetyöraportissa?

Tulokset saa esittää opinnäytetyöraportissa.

OLEMME YHTEISESTI SOPINEET OPINNÄYTETYÖN TOTEUTUKSESTA YLLÄ ESITETTYLLÄ TAVALLA

1 20 14

8/5 20/14

Minna Vuorenmaa & Milla Vainio
Opiskelija

Joranna Tuomela
Toimeksiantaja

LIITE : OPINNÄYTETYÖSUUNNITELMA



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

Liite 2. Reagenssiluettelo

DMEM MDA-MB-231(SA)-soluille

- DMEM medium 5.3.2014/SJ
- iFBS (inactive fetal bovine serum) 10 %
Gibco, #10106-169, 500 ml
LOT: 41G5670F, 22.1.2014/SJ
- Penicillin-Streptomycin 1 %
Gibco #15140-122, 100 ml

Trypsiiniliuos MDA-MB-231(SA)-solujen irrotukseen

- 10 ml / Trypsiini, laimennettu 2,5 % (EDTA-liuokseen) 5.3.2014/JL
- 90 ml / VERSENE pH 7.3, 31.10.2013

Western blot: Näytepuskuri

- ddH₂O
- 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8
- Glyseroli
- 20 % SDS
- 0,05 % bromofenolisininen

Western blot: Ajopuskuri (1 x Running Buffer)

- 100 ml / 10 x Running Buffer, 3.2.2014/J
- 900 ml / ddH₂O

Western blot: Siirtopuskuri (1 x Transfer Buffer)

- 100 ml / 10 x Transfer Buffer 18.3.2013/ KH, SJ
- 200 ml / EtOH
- 700 ml / ddH₂O

Western blot: Blokkaukspuskuri ja vastaaineliuos, 1 % ja 5 % maito-TBS-T 0,1 %

- Valio rasvaton maitojauhe (500 g)
LOT: 134, exp. 17.11.2009
- 1 x TBS-T 0,1 %

Western blot: TBS-T liuos eli 1 x TBS-T 0,1 %

- 100 ml / 10 x TBS, pH 7.6 (1/2014, JL)
- 1 ml / MP Tween 20
MP Biomedicals LLC, LOT: R24847
- 899 ml / ddH₂O

Western blot:

Omatekoinen SDS-PAGE-ylä- ja alageeli

- 20 % SDS (15.07.12 Lan)
Sodium dodecyl sulfate, C₁₂H₂₅NaO₄S
Fluka Chemiko
LOT: 409773/1 20201
- Autoklaavattu H₂O
- Ammoniumpersulfaatti 10 %
- Acrylamide/Bis solution 40 %
Bio-Rad 37.5: Acrylamide: N,N'-methylene-bis-acrylamide
- Electrophoresis purity reagent 2.6 % crosslinker
Cat #161-0148, Ctrl: 200006502
exp. 2016-03-21
- TEMED
(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
- 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (12.6.13 EK)
- Trizma base, SIGMA
C₄H₁₁NO₃. MW: 121.4 g/mol
P code: 1001461180. LOT: SLBF1158V
- ddH₂O
- pH:n säätö: HCl väkevä, HCl 1:1
- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (23.2.12 SJ)

Western blot: Vasta-aineiden irrotuspuskuri (Stripping Buffer)

- 20 ml / PBS (9.10.13/JT)
- 1,875 ml / 20 % SDS (15.7.2012/Lan)
Sodium dodecyl sulfate, C₁₂H₂₅NaO₄S
Fluka Chemiko, LOT: 409773/1 20201
- 140 µl / β-mercaptoethanol, SIGMA
C₂H₆OS, batch #024K0117

Western blot: Kokomarkkerit

- Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, 500 µl
LOT: 350001837, exp. 2015-09-06

Western blot: Membraani

- MILLIPORE
Immobilon Transfer Membranes:
Immobilon-P
Pore size: 0.45 µm, Filter type: PVDF
LOT: K4AA6899TK

Western blot: ECL-reagenssit

- RPN2106 Amersham ECL Western
Blotting Detection Reagents
GE Healthcare
LOT: 9488350, Pack: W9488333
Exp. 2015-02-13

Western blot: Primäärivasta-aineet

- Abcam Rb pAb to Cofilin
333.33 µl (0.3 mg/ml)
ab42824-100, LOT: 542405
- α-tubulin 5 % milk (2013/Lan)
Abcam ab 4074
Rabbit polyclonal to alpha Tubulin
(50 kDa), 1:20 000, 0.5 µl/10 ml

Western blot: Sekundäärivasta-aine

- Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat
Anti-Rabbit IgG (H+L)
SARSTEDT Jackson ImmunoResearch
Laboratories
LOT: 89368, Code: 111-035-003

Virtaussytometria: Natriumsitraattipuskuri

- Sodium citrate tribasic dihydrate
 $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$
Riedel-de Haën 32320
M = 294.10 g/mol, LOT: 51860
- Triton X-100, SIGMA
(t-Octylphenoxy polyethoxy ethanol)
9002-93-1, LOT: 45H0481
- Propidium iodide (PI)
Molecular probes by Life Technologies
mg/ml solution in water
LOT: 1453328, P3566
Protect from light
- 1 x PBS (9.10.2013/JT)

Liite 3. Western blot -työohjeet

Työohje 1. Geelin vahvuus

Proteiinin koko (kDa)	Geelin prosenttisuus (%)
4 – 40	20
12 – 45	15
10 – 70	12
15 – 100	10
25 – 200	8

Työohje 2. Kahden alageelin (*engl. separating gel*) valmistaminen, noin 5 ml per geeli

	8 %	10 %	12 %	15 %
ddH₂O	5,4 ml	4,9 ml	4,4 ml	3,65 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Akrylamide/BIS (40 %)	2 ml	2,5 ml	3 ml	3,75 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
10 % ammonium persulfate (APS)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Kampaväli täytetään ddH₂O:lla alageelin valun jälkeen. Ylägeelin voi alustaa valmiiksi, mutta APS ja TEMED lisätään vasta juuri ennen valua.

Työohje 3. Kahden ylägeelin (engl. *stacking gel*) valmistaminen, noin 2,5 ml per geeli

	4 %
ddH₂O	3,175 ml
0.5 M Tris-HCl	1,25 ml
Akrylamide/BIS (40 %)	0,5 ml
20 % SDS	25 µl
10 % ammonium persulfate (APS)	50 ul
TEMED	5 ul

Työohje 4. Proteiinitransferin rakentaminen

Kirkas puoli

- 1) Karhunkieli (sieni) alimmaisena
- 2) Suodatinpaperi
- 3) PVDF-membraani

Musta puoli

- 1) Karhunkieli
- 2) Suodatinpaperi
- 3) Geeli

Liite 4. Solulaskut 96- ja 6-kuoppalevyille

Solupitoisuuden kaava Bürker-Türk-laskukammionle:

$$\text{solu/ml} = \frac{\text{laskettujen solujen lukumäärä}}{\text{laskettujen kenttien lukumäärä}} \times \text{muuntokerroin} \times \text{laimennuskerroin}$$

Muuntokerroin perustuu laskukammion pikkuruuden pinta-alasta laskettuun tilavuuteen (Baydoun 2005).

96-kuoppalevy: MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solu IncuCyteen

MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA

Haluttu solumäärä: 2 000 solua/kuoppa × 48 kuoppaa = 96 000 solua

Kuoppaan pipetoitava tilavuus: 90 µl

Haluttu pitoisuus: 22 222,22... solua/ml

Bürker-Türk-laskukammionle solupitoisuus:

$$\frac{140 + 135 + 132 + 136}{4} \times 10\,000 \times 2 = 2\,715\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}}$$

5 ml:n suspension solumäärä yhteensä:

$$2\,715\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}} \times 5 \text{ ml} = 13\,575\,000 \text{ solua}$$

96-kuoppalevy täytetään puoliksi Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA- soluilla.

48 kuoppaa × 90 µl = 4,32 ml suspensiota. Suspensiota tehdään pipetointivaran kanssa yhteensä 10 ml, jossa tulee olla 22 222,22...solua/ml. Soluja tarvitaan lopulliseen 10 ml:n suspensioon yhteensä:

$$10 \text{ ml} \times 22\,222,22 \dots \frac{\text{solua}}{\text{ml}} = 222\,222,22 \dots \approx 222\,200 \text{ solua}$$

Solususpensiota tarvitaan:

$$\frac{222\,200 \text{ solua}}{2\,715\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}}} = 0,08184 \dots \text{ml} \approx 82 \mu\text{l}$$

DMEM:n määrä 10 ml:n suspensioon yllä olevan perusteella:

$$10 \text{ ml} - 0,082 \text{ ml} = 9,918 \text{ ml}$$

MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA

Haluttu solumäärä: 2 000 solua/kuoppa × 48 kuoppaa = 96 000 solua

Kuoppaan pipetoitava tilavuus: 90 μl

Haluttu pitoisuus: 22 222,22... solua/ml

Bürker-Türk-laskukammioista solupitoisuus:

$$\frac{151 + 140 + 132 + 137}{4} \times 10\,000 \times 2 = 2\,800\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}}$$

5 ml:n suspension solumäärä yhteensä:

$$2\,800\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}} \times 5 \text{ ml} = 14\,000\,000 \text{ solua}$$

Lopullisen 10 ml:n solususpension määrä samoin kuin Ctrl siRNA -soluilla olisi:

$$\frac{222\,200 \text{ solua}}{2\,800\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}}} = 0,07935 \dots \text{ml} \approx 80 \mu\text{l}$$

Virheellisesti oli laskettu:

$$\frac{2\,222\,000 \text{ solua}}{2\,800\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}}} = 0,7935 \dots \text{ml} \approx 795 \mu\text{l}$$

DMEM:n määrä 10 ml:n suspensioon yllä olevan perusteella:

$$10 \text{ ml} - 0,795 \text{ ml} = 9,205 \text{ ml}$$

Soluja tuli siis vahingossa 10-kertainen määrä alkuperäiseen verrattuna eli 20 000 solua/kuoppa.

6-kuoppalevy: MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA- ja TLR9 siRNA -solut virtausytometriaan

MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA

Haluttu solumäärä: 200 000 solua/kuoppa × 12 kuoppaa = 2 400 000 solua

Kuoppaan pipetoitava tilavuus: 2 ml

Haluttu pitoisuus: 100 000 solua/ml

Bürker-Türk-laskukammioista solupitoisuus:

$$\frac{110 + 152 + 134 + 135}{4} \times 10\,000 \times 2 = 2\,655\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}}$$

5 ml:n suspension solumäärä yhteensä:

$$2\,655\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}} \times 5 \text{ ml} = 13\,275\,000 \text{ solua}$$

6-kuoppalevyjä tehdään kaksi rinnakkaista eli solususpensiota tarvitaan:

$$2 \text{ levyä} \times 6 \text{ kuoppaa} \times 2 \text{ ml} = 24 \text{ ml}$$

Suspensiota tehdään pipetointivarauksen kanssa yhteensä 30 ml, jossa tulee olla 100 000 solua/ml. Soluja tarvitaan 30 ml:n suspensioon yhteensä:

$$30 \text{ ml} \times 100\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}} = 3\,000\,000 \text{ solua}$$

Tehdään lopullinen 30 ml:n solususpensio 5 ml:n putkessa olevasta suspensiosta (sis. 13 275 000 solua, pitoisuus 2 655 000 solua/ml) ja DMEM:sta:

$$\frac{3\,000\,000 \text{ solua}}{2\,655\,000 \text{ solua/ml}} = 1,1299 \dots \text{ ml} \approx 1\,130 \mu\text{l}$$

30 ml:n solususpension DMEM-määrä:

$$30 \text{ ml} - 1,13 \text{ ml} = 28,87 \text{ ml}$$

MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA

Haluttu solumäärä: 200 000 solua/kuoppa × 12 kuoppaa = 2 400 000 solua

Kuoppaan pipetoitava tilavuus: 2 ml

Haluttu pitoisuus: 100 000 solua/ml

Bürker-Türk-laskukammioista solupitoisuus:

$$\frac{173 + 156 + 190 + 165}{4} \times 10\,000 \times 2 = 3\,420\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}}$$

5 ml:n suspension solumäärä yhteensä:

$$3\,420\,000 \frac{\text{solua}}{\text{ml}} \times 5 \text{ ml} = 17\,100\,000 \text{ solua}$$

Lopullinen 30 ml:n solususpensio samoin kuin Ctrl siRNA -soluilla:

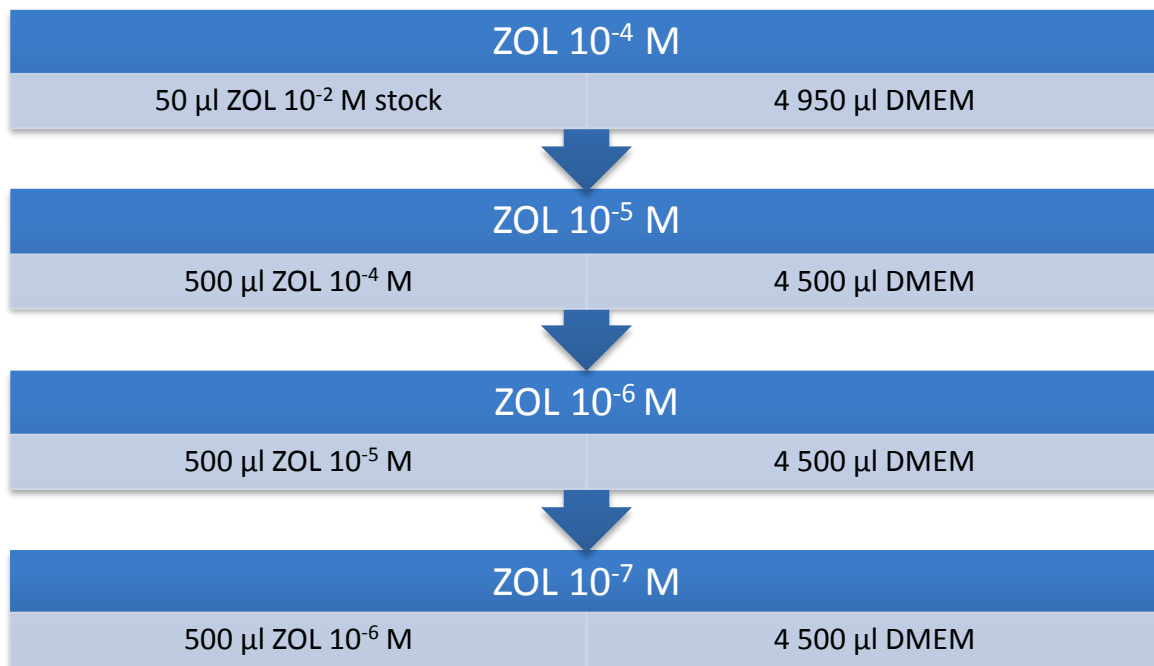
$$\frac{3\,000\,000 \text{ solua}}{3\,420\,000 \text{ solua/ml}} = 0,87719 \dots \text{ ml} \approx 880 \mu\text{l}$$

30 ml:n solususpension DMEM-määrä:

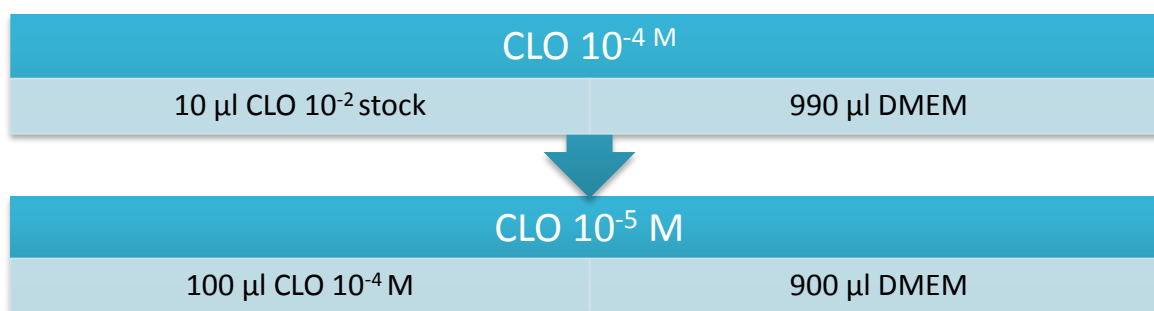
$$30 \text{ ml} - 0,88 \text{ ml} = 29,12 \text{ ml}$$

Liite 5. Zoledronaatti- ja klodronaattiliuosten laimennossarjat

Zoledronaattiliuoksen laimennossarja (kokonaistilavuus 5 ml):



Klodronaattiliuoksen laimennossarja (kokonaistilavuus 1 ml):



Liite 6. MDA-MB-231(SA)-solujen viljely 6-kuoppalevyille

MDA-MB-231(SA) Ctrl siRNA:

- 200 000 solua/kuoppa

LEVY 1			
4.	VEH	1.	VEH
5.	ZOL 0,1 μ M	2.	ZOL 0,1 μ M
6.	ZOL 1 μ M	3.	ZOL 1 μ M

LEVY 2			
4.	VEH	1.	VEH
5.	ZOL 10 μ M	2.	ZOL 10 μ M
6.	ZOL 100 μ M	3.	ZOL 100 μ M

MDA-MB-231(SA) TLR9 siRNA:

- 200 000 solua/kuoppa

LEVY 1			
4.	VEH	1.	VEH
5.	ZOL 0,1 μ M	2.	ZOL 0,1 μ M
6.	ZOL 1 μ M	3.	ZOL 1 μ M

LEVY 2			
4.	VEH	1.	VEH
5.	ZOL 10 μ M	2.	ZOL 10 μ M
6.	ZOL 100 μ M	3.	ZOL 100 μ M

Liite 7. Virtaussytometrianäytteiden natriumsitraattipuskuri ja työohje

Käyttöliuoksen pitoisuudet

- 40 mM Na-Citratt
- 0,3 x Triton X-100
- 0,05 mg/ml PI

Stock to 10 ml in PBS

- 500 mM Na-Citratt 800 µl
- 10 x Triton 300 µl
- 10 mg/ml PI 80 µl

Kantaliuoksen kokonaistilavuuden haluttiin olevan 15 ml, joten laskettiin uudet tilavuudet:

- 500 mM Na-Citratt 800 µl * 1,5 = 1 200 µl
- 10 x Triton 300 µl * 1,5 = 450 µl
- 1 mg/ml PI 800 µl * 1,5 = 1 200 µl

=> Käytettiin 10 mg/ml:n pitoisuuden sijaan 1 mg/ml PI:ta

Työohje

- solut irrotetaan trypsiinillä, 0,5 ml trypsiiniä/kuoppa
- normaali fuugaus, supernatantti pois
- n. 4 ml PBS suspensio (Vortex)
- fuugaus, PBS pois
- suspensoi Na-sitraattipuskuriin (Vortex)
- inkuboi n. 20 min RT => analyysi
- kääri putket folioon (PI valonarka)

Liite 8. PC-3-hiirten kasvainten mittaustulokset

	Day no	cage	animal number	tumor 1 length	tumor 1 width	tumor 2 length	tumor 2 width	tumor 1 area	tumor 2 area	tumor 1 volume	tumor 2 volume
3.3.2014	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	2	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	3	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	4	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
3.3.2014	1	4	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	1	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	2	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	3	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	4	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	4	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
5.3.2014	3	4	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	1	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	2	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	2	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	3	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	3	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	4	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
7.3.2014	5	4	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	1	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	2	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	2	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	3	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	3	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	3	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	4	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	4	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
10.3.2014	8	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0

10.3.2014	8	4	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	1	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	2	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	2	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	3	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	3	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	3	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	4	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	4	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
12.3.2014	10	4	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	1	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	2	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	2	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	3	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	3	3	3	3	0	0	9	0	14,14	0
14.3.2014	12	3	4	4	4	0	0	16	0	33,51	0
14.3.2014	12	4	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	4	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
14.3.2014	12	4	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	1	4	5	4	0	0	20	0	46,83	0
17.3.2014	15	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	2	2	4	3	0	0	12	0	21,77	0
17.3.2014	15	2	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	3	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	3	3	3,8	3,5	0	0	13,3	0	25,40	0
17.3.2014	15	3	4	4,2	3,5	0	0	14,7	0	29,51	0
17.3.2014	15	4	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	4	2	3	4	0	0	12	0	21,77	0
17.3.2014	15	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
17.3.2014	15	4	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	1	4	5,5	5	0	0	27,5	0	75,51	0
19.3.2014	17	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	2	2	4,2	2,8	0	0	11,76	0	21,12	0
19.3.2014	17	2	3	3	3	0	0	9	0	14,14	0
19.3.2014	17	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	3	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	3	2	3	3	0	0	9	0	14,14	0
19.3.2014	17	3	3	3,8	3,6	0	0	13,68	0	26,49	0
19.3.2014	17	3	4	4,4	3,6	0	0	15,84	0	33,01	0
19.3.2014	17	4	1	3,8	3,3	0	0	12,54	0	23,25	0
19.3.2014	17	4	2	3,4	3,8	0	0	12,92	0	24,32	0
19.3.2014	17	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
19.3.2014	17	4	4	4	3,5	0	0	14	0	27,43	0
21.3.2014	19	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
21.3.2014	19	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
21.3.2014	19	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0

21.3.2014	19	1	4	5,5	5,5	0	0	30,25	0	87,11	0
21.3.2014	19	2	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
21.3.2014	19	2	2	4,5	4	0	0	18	0	39,99	0
21.3.2014	19	2	3	4	4	0	0	16	0	33,51	0
21.3.2014	19	2	4	0	0	0	0	0	0	0,00	0
21.3.2014	19	3	1	3	3,5	0	0	10,5	0	17,81	0
21.3.2014	19	3	2	4	3,5	0	0	14	0	27,43	0
21.3.2014	19	3	3	4	4	0	0	16	0	33,51	0
21.3.2014	19	3	4	8	5,5	0	0	44	0	152,82	0
21.3.2014	19	4	1	5	4,3	0	0	21,5	0	52,20	0
21.3.2014	19	4	2	3,5	4	0	0	14	0	27,43	0
21.3.2014	19	4	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
21.3.2014	19	4	4	4,5	3,5	0	0	15,75	0	32,73	0
24.3.2014	22	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
24.3.2014	22	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
24.3.2014	22	1	3	0	0	0	0	0	0	0,00	0
24.3.2014	22	1	4	6,5	6,5	0	0	42,25	0	143,79	0
24.3.2014	22	2	1	2	2	0	0	4	0	4,19	0
24.3.2014	22	2	2	5	3,8	0	0	19	0	43,36	0
24.3.2014	22	2	3	6	4,2	0	0	25,2	0	66,24	0
24.3.2014	22	2	4	2	2	0	0	4	0	4,19	0
24.3.2014	22	3	1	5	6	0	0	30	0	86,04	0
24.3.2014	22	3	2	7	5,4	0	0	37,8	0	121,68	0
24.3.2014	22	3	3	6	5	0	0	30	0	86,04	0
24.3.2014	22	3	4	8,4	7	0	0	58,8	0	236,08	0
24.3.2014	22	4	1	6	5,5	0	0	33	0	99,26	0
24.3.2014	22	4	2	4,5	5	0	0	22,5	0	55,88	0
24.3.2014	22	4	3	2	2	0	0	4	0	4,19	0
24.3.2014	22	4	4	4,5	5	0	0	22,5	0	55,88	0
26.3.2014	24	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
26.3.2014	24	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
26.3.2014	24	1	3	4	3	0	0	12	0	21,77	0
26.3.2014	24	1	4	6,5	6,8	0	0	44,2	0	153,86	0
26.3.2014	24	2	1	2	2	0	0	4	0	4,19	0
26.3.2014	24	2	2	6	5,5	0	0	33	0	99,26	0
26.3.2014	24	2	3	6	5,5	0	0	33	0	99,26	0
26.3.2014	24	2	4	4	4	0	0	16	0	33,51	0
26.3.2014	24	3	1	5	6,5	0	0	32,5	0	97,01	0
26.3.2014	24	3	2	7	5,5	0	0	38,5	0	125,08	0
26.3.2014	24	3	3	7	6,7	0	0	46,9	0	168,17	0
26.3.2014	24	3	4	11	7	0	0	77	0	353,78	0
26.3.2014	24	4	1	6	6,6	0	0	39,6	0	130,48	0
26.3.2014	24	4	2	4,5	5	0	0	22,5	0	55,88	0
26.3.2014	24	4	3	2	2	0	0	4	0	4,19	0
26.3.2014	24	4	4	4,5	5	0	0	22,5	0	55,88	0
28.3.2014	26	1	1	0	0	0	0	0	0	0,00	0
28.3.2014	26	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
28.3.2014	26	1	3	5,3	3,5	0	0	18,55	0	41,83	0
28.3.2014	26	1	4	7,4	7,5	0	0	55,5	0	216,49	0
28.3.2014	26	2	1	2	2	0	0	4	0	4,19	0
28.3.2014	26	2	2	6,5	5,1	0	0	33,15	0	99,94	0
28.3.2014	26	2	3	7,7	4,2	0	0	32,34	0	96,30	0
28.3.2014	26	2	4	6,2	3,9	0	0	24,18	0	62,26	0
28.3.2014	26	3	1	6	5,3	0	0	31,8	0	93,89	0
28.3.2014	26	3	2	7,6	4,9	0	0	37,24	0	118,99	0
28.3.2014	26	3	3	9	7	0	0	63	0	261,82	0
28.3.2014	26	3	4	10,8	6,9	0	0	74,52	0	336,83	0
28.3.2014	26	4	1	7,3	6	0	0	43,8	0	151,78	0
28.3.2014	26	4	2	5,2	4,4	0	0	22,88	0	57,30	0
28.3.2014	26	4	3	2	2	0	0	4	0	4,19	0
28.3.2014	26	4	4	5,7	4,6	0	0	26,22	0	70,30	0
31.3.2014	29	1	1	7,9	4	0	0	31,6	0	93,01	0
31.3.2014	29	1	2	0	0	0	0	0	0	0,00	0
31.3.2014	29	1	3	5,3	2,9	0	0	15,37	0	31,55	0
31.3.2014	29	1	4	9,7	9	0	0	87,3	0	427,09	0
31.3.2014	29	2	1	7,2	5,4	0	0	38,88	0	126,94	0
31.3.2014	29	2	2	6,4	6,6	0	0	42,24	0	143,74	0
31.3.2014	29	2	3	7,5	6,7	0	0	50,25	0	186,51	0

31.3.2014	29	2	4	6	5,6	0	0	33,6	0	101,98	0
31.3.2014	29	3	1	5,3	6,6	0	0	34,98	0	108,32	0
31.3.2014	29	3	2	9,3	6	0	0	55,8	0	218,25	0
31.3.2014	29	3	3	9	7,8	0	0	70,2	0	307,97	0
31.3.2014	29	3	4	11,2	7,8	0	0	87,36	0	427,53	0
31.3.2014	29	4	1	6,2	7,1	0	0	44,02	0	152,92	0
31.3.2014	29	4	2	6	4	0	0	24	0	61,56	0
31.3.2014	29	4	3	5	5,5	0	0	27,5	0	75,51	0
31.3.2014	29	4	4	6	6	0	0	36	0	113,10	0

Liite 9. 4T1-hiirten kasvainten mittaustulokset

	Day no	animal cage	animal number	tumor 1 length	tumor 1 width	tumor 2 length	tumor 2 width	tumor 1 area	tumor 2 area	tumor 1 volume	tumor 2 volume
13.3.2014											
19.3.2014	6	1	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	1	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	1	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	1	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	2	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	2	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	2	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	2	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	3	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	3	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	3	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	4	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	4	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	4	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
19.3.2014	6	4	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	1	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	1	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	1	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	1	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	2	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	2	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	2	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	2	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	3	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	3	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	3	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	4	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	4	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	4	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
21.3.2014	8	4	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	1	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	1	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	1	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	1	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	2	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	2	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	2	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	2	4	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	3	2	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	3	3	3,9	3,6	0	0	14,04	0,00	27,55	0,00
24.3.2014	11	3	4	4,7	4,3	0	0	20,21	0,00	47,57	0,00
24.3.2014	11	4	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
24.3.2014	11	4	2	3	3	0	0	9,00	0,00	14,14	0,00
24.3.2014	11	4	3	3,5	3	0	0	10,50	0,00	17,81	0,00
24.3.2014	11	4	4	4,3	4	0	0	17,20	0,00	37,35	0,00
26.3.2014	13	1	1	3,8	3,8	0	0	14,44	0,00	28,73	0,00
26.3.2014	13	1	2	4,3	4,2	0	0	18,06	0,00	40,19	0,00
26.3.2014	13	1	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
26.3.2014	13	1	4	4	4	0	0	16,00	0,00	33,51	0,00
26.3.2014	13	2	1	4,2	3,9	0	0	16,38	0,00	34,71	0,00
26.3.2014	13	2	2	3,9	3,9	0	0	15,21	0,00	31,06	0,00
26.3.2014	13	2	3	3,7	4	0	0	14,80	0,00	29,81	0,00
26.3.2014	13	2	4	4,8	5	0	0	24,00	0,00	61,56	0,00
26.3.2014	13	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
26.3.2014	13	3	2	3,5	4,5	5	7	15,75	35,00	32,73	108,42

26.3.2014	13	3	3	4,5	3,6	0	0	16,20	0,00	34,14	0,00
26.3.2014	13	3	4	5,5	5,2	0	0	28,60	0,00	80,08	0,00
26.3.2014	13	4	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
26.3.2014	13	4	2	4,3	4,2	0	0	18,06	0,00	40,19	0,00
26.3.2014	13	4	3	4,8	3,2	0	0	15,36	0,00	31,52	0,00
26.3.2014	13	4	4	4,2	4,4	0	0	18,48	0,00	41,60	0,00
28.3.2014	15	1	1	3,7	4	0	0	14,80	0,00	29,81	0,00
28.3.2014	15	1	2	4	4	0	0	16,00	0,00	33,51	0,00
28.3.2014	15	1	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
28.3.2014	15	1	4	4,5	3,6	0	0	16,20	0,00	34,14	0,00
28.3.2014	15	2	1	5	4,5	0	0	22,50	0,00	55,88	0,00
28.3.2014	15	2	2	5,4	4,7	0	0	25,38	0,00	66,95	0,00
28.3.2014	15	2	3	4,2	4,5	0	0	18,90	0,00	43,02	0,00
28.3.2014	15	2	4	5,5	5,6	0	0	30,80	0,00	89,50	0,00
28.3.2014	15	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
28.3.2014	15	3	2	4,5	4,2	0	0	18,90	0,00	43,02	0,00
28.3.2014	15	3	3	5,2	4	0	0	20,80	0,00	49,67	0,00
28.3.2014	15	3	4	6,1	5,3	0	0	32,33	0,00	96,25	0,00
28.3.2014	15	4	1	4,5	4,5	0	0	20,25	0,00	47,71	0,00
28.3.2014	15	4	2	5	4,2	4,7	5,1	21,00	23,97	50,39	61,45
28.3.2014	15	4	3	4,4	5,2	5,5	5	22,88	27,50	57,30	75,51
28.3.2014	15	4	4	5,2	3,6	6	5,7	18,72	34,20	42,41	104,72
31.3.2014	18	1	1	5,5	5,3	4,8	5	29,15	24,00	82,41	61,56
31.3.2014	18	1	2	5,9	5,4	0	0	31,86	0,00	94,16	0,00
31.3.2014	18	1	3	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
31.3.2014	18	1	4	5	4,5	0	0	22,50	0,00	55,88	0,00
31.3.2014	18	2	1	5,5	5,8	0	0	31,90	0,00	94,34	0,00
31.3.2014	18	2	2	5,5	4,8	0	0	26,40	0,00	71,02	0,00
31.3.2014	18	2	3	5,7	5,9	6,1	5	33,63	30,50	102,11	88,20
31.3.2014	18	2	4	7,2	6,7	0	0	48,24	0,00	175,43	0,00
31.3.2014	18	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
31.3.2014	18	3	2	5,2	4,9	0	0	25,48	0,00	67,34	0,00
31.3.2014	18	3	3	8,6	4,9	0	0	42,14	0,00	143,23	0,00
31.3.2014	18	3	4	7,5	6,5	0	0	48,75	0,00	178,22	0,00
31.3.2014	18	4	1	5	5,5	0	0	27,50	0,00	75,51	0,00
31.3.2014	18	4	2	5,4	4,8	5,5	5,4	25,92	29,70	69,10	84,75
31.3.2014	18	4	3	6,4	6	6,5	6,5	38,40	42,25	124,59	143,79
31.3.2014	18	4	4	5,6	5,6	5	4,6	31,36	23,00	91,95	57,76
2.4.2014	20	1	1	5	5,2	6,5	6,3	26,00	40,95	69,42	137,21
2.4.2014	20	1	2	6,6	6,3	0	0	41,58	0,00	140,39	0,00
2.4.2014	20	1	3	4	4,2	0	0	16,80	0,00	36,05	0,00
2.4.2014	20	1	4	4,8	5,2	0	0	24,96	0,00	65,29	0,00
2.4.2014	20	2	1	5,8	6	0	0	34,80	0,00	107,49	0,00
2.4.2014	20	2	2	6,5	5,5	0	0	35,75	0,00	111,92	0,00
2.4.2014	20	2	3	6,6	6,5	5,8	6	42,90	34,80	147,12	107,49
2.4.2014	20	2	4	6,4	5,8	0	0	37,12	0,00	118,42	0,00
2.4.2014	20	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
2.4.2014	20	3	2	6,4	6	6,8	6	38,40	40,80	124,59	136,45
2.4.2014	20	3	3	8,8	5,6	0	0	49,28	0,00	181,14	0,00
2.4.2014	20	3	4	7,7	6,8	0	0	52,36	0,00	198,38	0,00
2.4.2014	20	4	1	5,4	5,3	0	0	28,62	0,00	80,17	0,00
2.4.2014	20	4	2	6,6	5,8	6,8	5,6	38,28	38,08	124,01	123,04
2.4.2014	20	4	3	7	6,6	8	6,7	46,20	53,60	164,42	205,47
2.4.2014	20	4	4	6	4,6	6,7	5,9	27,60	39,53	75,92	130,13
4.4.2014	22	1	1	6	5,6	7	6,6	33,60	46,20	101,98	164,42
4.4.2014	22	1	2	7,1	6	0	0	42,60	0,00	145,58	0,00
4.4.2014	22	1	3	5,6	5,8	0	0	32,48	0,00	96,92	0,00
4.4.2014	22	1	4	6,5	6,6	0	0	42,90	0,00	147,12	0,00
4.4.2014	22	2	1	6,2	6,4	0	0	39,68	0,00	130,87	0,00
4.4.2014	22	2	2	7	6	0	0	42,00	0,00	142,52	0,00
4.4.2014	22	2	3	6,8	6,9	6,2	6,6	46,92	40,92	168,28	137,06
4.4.2014	22	2	4	7,2	6,8	6,2	5	48,96	31,00	179,37	90,37
4.4.2014	22	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
4.4.2014	22	3	2	8,1	4,6	8,1	8,3	37,26	67,23	119,09	288,63
4.4.2014	22	3	3	10	6,6	0	0	66,00	0,00	280,75	0,00
4.4.2014	22	3	4	9	7,5	0	0	67,50	0,00	290,37	0,00

4.4.2014	22	4	1	6,1	6,2	0	0	37,82	0,00	121,78	0,00
4.4.2014	22	4	2	7,5	6,5	6,9	6,2	48,75	42,78	178,22	146,51
4.4.2014	22	4	3	8,2	7,5	8,3	6,6	61,50	54,78	252,53	212,29
4.4.2014	22	4	4	7	5,3	6,4	7	37,10	44,80	118,32	157,01
7.4.2014	25	1	1	6,2	6,3	8,2	8,2	39,06	67,24	127,82	288,70
7.4.2014	25	1	2	7,9	8,2	0	0	64,78	0,00	273,00	0,00
7.4.2014	25	1	3					0,00	0,00	0,00	0,00
7.4.2014	25	1	4	7,6	7,6	0	0	57,76	0,00	229,85	0,00
7.4.2014	25	2	1	7	7,3	0	0	51,10	0,00	191,26	0,00
7.4.2014	25	2	2	7,7	7	0	0	53,90	0,00	207,20	0,00
7.4.2014	25	2	3	8,1	8,1	9	8,5	65,61	76,50	278,26	350,34
7.4.2014	25	2	4	8	8,5	6,3	7	68,00	44,10	293,60	153,34
7.4.2014	25	3	1	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00
7.4.2014	25	3	2	8,5	7,6	8,3	7,6	64,60	63,08	271,86	262,32
7.4.2014	25	3	3	10	6,6	0	0	66,00	0,00	280,75	0,00
7.4.2014	25	3	4	9	7,5	0	0	67,50	0,00	290,37	0,00
7.4.2014	25	4	1					0,00	0,00	0,00	0,00
7.4.2014	25	4	2	7,4	8	8	7,9	59,20	63,20	238,50	263,07
7.4.2014	25	4	3	9,2	8,4	9,8	8,8	77,28	86,24	355,71	419,34
7.4.2014	25	4	4					0,00	0,00	0,00	0,00

Liite 10. Cell Counting Kit-8:n alkuperäisdata

ULTRA; Serial number: 12901000053; Firmware: V 2.20 03/02 ULTRA;
XFLUOR4 Version: V 4.51

Date: 30.5.14
Time: 15:47

Measurement mode: Absorbance

Measurement wavelength: 450 nm

Number of flashes: 10

Plate definition file: COS96fw.pdf

Shake duration (Linear Normal): 10 s

ctrl siRNA tlr9 siRNA
Rawdata Temperature: 23,2 °C

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,1436	0,1448	0,1361	0,1435	0,1444	0,1464	0,1512	0,1517	0,1553	0,1537	0,1534	0,1487
B	0,1463	0,1475	0,1559	0,1533	0,1529	0,1533	0,1550	0,1541	0,1581	0,1552	0,1550	0,1494
C	0,5014	0,5592	0,4905	0,4023	0,5548	0,5686	0,5606	0,5629	0,3283	0,5358	0,4994	0,4749
D	0,4303	0,5390	0,4982	0,4113	0,5639	0,5121	0,5087	0,5259	0,3222	0,1532	0,5148	0,5065
E	0,4420	0,5634	0,5425	0,3870	0,5678	0,5105	0,4832	0,5053	0,3012	0,2974	0,4894	0,4722
F	0,4847	0,5489	0,5282	0,3956	0,5634	0,5501	0,5714	0,5182	0,3686	0,4464	0,5450	0,4611
G	0,1453	0,1467	0,1509	0,1501	0,1478	0,1486	0,1542	0,1522	0,1440	0,1628	0,1497	0,1449
H	0,1438	0,1437	0,1468	0,1467	0,1627	0,1488	0,1505	0,1552	0,1500	0,1502	0,1456	0,1454