

# **TMED5 JA DR1 VIRTSARAKON LEVYEPITEELISYÖVÄSSÄ**

Sini Tulisalmi

syventävien opintojen kirjallinen työ

Tampereen yliopisto

Lääketieteen laitos

Eturauhassyövän tutkimusryhmä

03/2013

# TIIVISTELMÄ

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Eturauhassyövän tutkimusryhmä

TULISALMI SINI: TMED5 JA DR1 VIRTSARAKON LEVYEPITEELISYÖVÄSSÄ

Kirjallinen työ, sivumäärä 19  
Ohjaaja: professori Tapio Visakorpi  
Maaliskuu 2013

Avainsanat: virtsatiet, karsinooma, 1p22, amplifikaatio, patogeneesi

**Johdanto:** Virtsarakon levyepiteelikarsinoomaa on alle 5 % kaikista virtsarakon syöivistä. Suurin osa virtsarakon levyepiteelisyöivistä on invasiivisia (T2-4) ja ne metastasoivat useimmiten virtsateihin tai eturauhaseen. Metafaasi-CGH – ja aCGH-tutkimuksissa on löydetty amplifikaatiot 1p22-lokuksessa tutkittaessa virtsarakon syöpiä. Kyseisessä lokuksessa sijaitsevat tutkittavat geenit DR1 ja TMED5. DR1:n koodaama proteiini alentaa transkriptiota estämällä transkriptiotekijöiden sitoutumisen TATA-binding proteiiniin. TMED5 koodaa p28-proteiinia, joka kuuluu Golgin laitteen proteiinierityksestä vastaavien proteiinien ryhmään.

**Aineisto ja menetelmät:** Tutkimuksessa käytin virtsarakon levyepiteelisyöpäsolulinjaa (ScaBER), niistä valmiiksi eristettyä RNA:ta sekä 20 ihmiskudoksesta eristettyä mRNA:ta. Vertasin qPCR:n avulla DR1-ekspressiota virtsarakossa 20 ihmiskudoksen DR1-ekspressioon amplifikaation merkityksen selvittämiseksi. Tutkin TMED5-geenin osuutta ScaBER-solulinjan kasvuun ja invaasiokykyyn estämällä TMED5:n ekspression tehokkaan siRNA:n avulla ja vertaamalla kyseisten solujen kasvua kontrolli-siRNA:lla transfektoitujen solujen kasvuun.

**Tulokset ja pohdinta:** DR1-ekspressio normaalissa virtsarakossa ei ole erityisen matala tai korkea. TMED5:llä ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta syöpäsolujen kasvukykyyn ( $p = 0,46$ ), joten se ei todennäköisesti ole osallinen virtsarakon levyepiteelisyövän patogeneesiin. DR1-geenin osalta tutkimusryhmässä jatketaan toiminnallisiin tutkimuksiin.

# SISÄLLYS

|  |    |
|--|----|
| 1. Johdanto.....                           | 1  |
| 1.1. Virtsarakon kasvaimet.....            | 1  |
| 1.2. Virtsarakon levyepiteelisyöpä.....    | 2  |
| 1.3. DNA-amplifikaatiot ja –deleetiot..... | 2  |
| 1.4. DR1.....                              | 3  |
| 1.5. TMED5.....                            | 3  |
| 1.6. siRNA.....                            | 4  |
| 1.7. Tutkimuksen tarkoitus.....            | 5  |
| 2. Tutkimusaineisto ja menetelmät.....     | 5  |
| 2.1. Tutkimusaineisto.....                 | 5  |
| 2.2. Geeniekspression tutkiminen.....      | 6  |
| 2.2.1. cDNA-synteesi.....                  | 6  |
| 2.2.2. qPCR.....                           | 6  |
| 2.2.3. TMED5.....                          | 8  |
| 2.2.4. DR1.....                            | 9  |
| 2.2.5. Tulosten analysointi.....           | 9  |
| 2.3. Kasvukäyrä.....                       | 10 |
| 2.3.1. Solulaskenta.....                   | 10 |
| 2.3.2. siRNA-transfektio.....              | 11 |
| 2.3.3. Solujen proliferaatiomittaus .....  | 12 |
| 3. Tulokset.....                           | 12 |
| 3.1. DR1.....                              | 12 |
| 3.2. TMED5.....                            | 13 |
| 4. Pohdinta.....                           | 14 |
| 4.1. Tulokset.....                         | 14 |
| 4.2. Virhelähteet.....                     | 15 |
| 4.3. Lopuksi.....                          | 15 |
| 5. Lähteet.....                            | 18 |

# JOHDANTO

## 1.1 Virtsarakon kasvaimet

Virtsarakon syöpä on neljänneksi yleisin syöpä Euroopassa. Sen ilmaantuvuus on suurin teollisuusmaissa asuvilla miehillä ja on noin kolminkertainen verrattuna vähemmän kehittyneisiin maihin. Vallitsevuus on jopa 3–8-kertainen ilmaantuvuuteen verrattuna, sillä tauti uusii helposti ja kuoleman sekä taudin etenemisen riski on pieni. Länsimaissa yli 90 % virtsarakon syövästä on uroteelin karsinomia, joille altistava tekijä on tupakointi. 5–8 % virtsarakkosyövästä on levyepiteeliperäisiä. Adenokarsinomat sekä lihassoluperäiset sarkoomat ovat harvinaisia virtsarakossa. (Nurmi ym. 2002, Joensuu ym. 2007, Nord ym. 2010, Jemal ym. 2011.)

Virtsarakon kasvaimet ovat heterogeeninen joukko, sillä ne vaihtelevat noninvasiivisista (Ta) vakavampiin (T4) muotoihin. Pääsääntöisesti alhaisen T-luokan tuumorit ovat paremmin erilaistuneita kuin korkean T-luokan. Poikkeuksena on carsinoma in situ (Tis), joka kasvaa matalana ja laaja-alaisena virtsarakon limakalvoa pitkin, mutta on huonosti erilaistunut (gradus 3). Carsinoma in situ pidetäänkin invasiivisten virtsarakon kasvainten esiasteena. Tärkeää ennusteen ja hoidon kannalta on jako pinnallisiin, limakalvoon rajoittuviin kasvaimiin (Ta ja T1) sekä syvemmälle lihaskerrokseen tunkeutuviin kasvaimiin (T2-T4). (Nurmi ym. 2002, Joensuu ym. 2007.) Yli puolet uusista diagnosoiduista virtsarakon karsinomista on noninvasiivisia ja gradusaste on alhainen (Nord ym. 2010). Levyepiteelikarsinomat sen sijaan ovat lähes aina invasiivisia (T2-4) ja metastaaseja syntyy erityisesti prostataan sekä virtsanjohtimiin (Rundle ym. 1982, Serretta ym. 2000).

Tyypillinen oire virtsarakon syöpää sairastavalla potilaalla on kivuton ja näkyvä verivirtsaisuus. Verivirtsaisuus voi joskus olla havaittavissa vain mikroskoopilla, jolloin puhutaan mikroskooppisesta hematuriasta. Verivirtsaisuutta on noin 85 %:lla potilaista. Muita oireita ovat virtsaamiskipu, kirvely, virtsarakon tunne sekä virtsaamistarpeen tihentyminen. Kasvaimen tukkiessa ylempiä virtsateitä, voi seurauksena voi olla hydronefroosi, eli munuaisaltaan laajeneminen paineen noustessa virtsanjohtimessa ja munuaisessa. (Nurmi ym. 2002, Joensuu ym. 2007.)

## 1.2 Virtsarakon levyepiteelisyöpä

Alkueliö Bilharzian aiheuttama krooninen tulehdus ja siitä johtuva karsinooma kattaa suurimman osan levyepiteelisyöivistä rakossa (Jemal ym. 2011). Alkueliöön liittyvä muoto on yleisempi vähemmän kehittyneissä maissa. Sitä esiintyy miehillä viisi kertaa enemmän kuin naisilla ja tavallisin sairastumisikä on yli 50-vuotiaana. Kyseiseen syöpään liittyy hyvä ennuste, sillä syöpäsolut ovat hyvin erilaistuneita, vaikka metastaaseja on 18–19 %:lla. (Shokeir 2004.)

Puhdas levyepiteelisyöpä ilman alkueliöaltistusta on harvinainen ja sille altistava tekijä on katetrisaatio. Sitä esiintyy eniten länsimaissa, yli 70-vuotiaassa väestössä, miehillä hieman useammin kuin naisilla. Karsinooma diagnosoidaan usein myöhäisessä vaiheessa, jolloin solut ovat jo huonosti erilaistuneet. Taudilla onkin huono ennuste, vaikka metastaaseja esiintyy vain alle 10 %:lla. (Shokeir 2004.)

## 1.3 DNA-amplifikaatiot ja -deleetiot

Metafaasi-CGH:n avulla voidaan selvittää DNA-sekvenssien määrää amplifikaatioiden ja deleetioiden löytämiseksi. Tutkimuksella ei saada selville absoluuttista kopiomäärää, ainoastaan suhteellisia eroja. Metafaasissa oleviin soluihin hybridisoidaan tuumori-DNA:ta sekä normaalia DNA:ta samanaikaisesti. DNA:t merkitään erivärisillä merkkiaineilla, jotta ne voidaan erottaa toisistaan fluoresenssimikroskopiassa. Mikäli tuumori-DNA:ssa on monistuma, sitä vastaavan merkkiaineen intensiteetti kasvaa, sillä tuumori-DNA:ta on enemmän kuin vertailukohtana käytettävää normaalia DNA:ta. Deleetiossa vastaavasti normaalia DNA:ta on enemmän, ja sitä vastaavaa signaalia vastaanotetaan enemmän. DNA:n amplifikaatiot ja deleetiot tekevät syöpäsolujen genomista epästabiliin ja usein kyseisillä alueilla sijaitsevat geenit toimivatkin joko onkogeeneinä tai tuumorisuppressorigeeneinä.

Kallioniemi ym. (1995) löysivät monistuman 1p22:ssa yli 10 %:ssa 26:sta virtsarakon syövästä. Samassa tutkimuksessa havaittiin myös, että geenimonistumat ovat usein kromosomialueilla, joilla ei ole vielä tunnettuja onkogeenejä. Samat amplifikaatiot löydettiin tarkemman aCGH:n avulla vielä julkaisemattomassa tutkimuksessa (Asero, Saramäki, Visakorpi). DNA-sekvenssien määrän ja genomisen instabiliteetin on havaittu liittyvän T-luokitukseen ja potilaan ennusteeseen

kiinteissä uroteeliperäisissä kasvaimissa (Blaveri ym. 2005).

Eturauhassyövän tutkimusryhmässä on ennen tämän tutkimuksen alkua tehty fluoresenssi in situ hybridisaatio (FISH) virtsarakon syöpäsolulinjoille amplifikaation tarkkojen rajojen ja potentiaalisten kohdegeenien selvittämiseksi. ScaBER-syöpäsolulinjassa merkittävää amplifikaatiota 1p21-22-lokuksessa oli seuraavilla geneillä: DR1 (down-regulator of transcription 1), TMED5 (transmembrane emp24 protein transport domain containing 5), EVI5 (ecotropic viral integration site 5) ja RPL5 (ribosomal protein L5). Tässä tutkimuksessa keskitytään 1p22:ssa sijaitseviin geeneihin DR1 ja TMED5 (Lander ym. 2001, The vertebrate genome annotation database.uk).

## 1.4 DR1

DR1-geeni (toiselta nimeltään NC2) koodaa proteiinia nimeltä Protein Dr1. Kyseinen proteiini rakentuu alfa- sekä beeta-alayksiköstä. Protein Dr1 estää transkription aloituksen muodostamalla dimeerin DRAP1:n (DR1 associated polypeptide) kanssa, joka sitten sitoutuu TBP:hen (TATA-binding protein). Dimeerin ja TBP:n sitoutumisen seurauksena yleiset transkriptiotekijät TFIIA ja TFIIB eivät pysty sitoutumaan TBP:hen. Preinitiaatiokompleksin synty sekä RNA-polymeraasi II -riippuvainen transkriptio estyy. (Inostroza ym. 1992, Mermelstein ym. 1996, Creton ym. 2002.)

Aiemmassa tutkimuksessa havaittiin, että DR1:n beeta-alayksikkö on osallinen neuroblastooman patogeneesiin ja syöpäsolujen proliferaatioon. 1p22-lokuksessa havaittiin tässä tapauksessa deleetioita ja geeniä vastaavat mRNA-määrät olivat alhaiset. Näiden perusteella tutkimuksessa ehdotettiin, että DR1 voisi olla toimiva markkeri neuroblastooman diagnostiikassa. (Di Pietro ym. 2008.) Manttelisolulymfoomassa havaittiin deleetio 1p22:ssa ja DR1-ekspressio oli vähentynyt kvantitatiivisessa PCR:ssä. Tämä viittaa siihen, että ekspressio on riippuvaista geenin kopiomäärästä. (Schraders ym. 2008.)

## 1.5 TMED5

TMED5 koodaa p28-nimistä proteiinia, joka kuuluu p24-proteiinien ryhmään. p28 sijaitsee cis-Golgissa sekä Golgin laitteen ja solulimakalvoston välisillä (ERGIC) alueilla. (Koegler ym.

2010.) p24-proteiinit ovat tyypin I transmembraaniproteiineja, joiden rakenteelle on yhteistä alfahelixketju, lyhyt sytoplasminen osa, oligomerisaation mahdollistava osa sekä GOLD-osa, joka viittaa proteiinien rooliin Golgin laitteen toiminnassa ja erityksessä (Anantharaman & Aravind 2002, Koegler ym. 2010). p24-proteiinit mahdollistavat solujen proteiinierityksen aiheuttamalla konsentraatiogradientteja Golgin laitteen ja solulimakalvoston välille sekä toimimalla itse kuljetusvesikkelien osana (Schimoller ym. 1995, Stamnes ym. 1995, Jenne ym. 2002). Estämällä p28:n toiminta havaittiin, että Golgin laite fragmentoituu ja proteiinien kulku Golgin laitteen kalvostojen välillä häiriintyy (Koegler ym. 2010).

Myeloomassa TMED5-geeniä vastaavalla kromosomialueella todettiin eniten deleetioita. Geenin alentunut ekspressio ei kuitenkaan vaikuttanut negatiivisesti myeloomasta selviytymiseen. Deletoitunut alue on todennäköisesti osallinen patogeneesiin, mutta siihen vaikuttavaa geeniä ei ole vielä pystytty identifioimaan. (Boyd ym. 2011.) Kun tutkittiin kaulan imusolmukemetastaasien esiintymistä 30:ssä suun levyepiteelikarsinoomassa, havaittiin TMED5-ekspression olevan tilastollisesti merkittävästi lisääntynyt metastasoineissa tapauksissa. TMED5 osallistuu siten suun levyepiteelisyöpien tuumorigeneesiin ja vaikuttaa potilaan ennusteeseen. On kuitenkin huomioitava, että TMED5 ei ollut kaikkein merkittävimpiä patogeneesiin vaikuttavia geenejä kyseisessä syövässä. TMED5-geenin sekvenssimäärän muutoksia ei tässä tutkimuksessa huomioitu. (Nguyen ym. 2007.)

## 1.6 siRNA

siRNA:t (small interfering RNA) ovat 21–25 nukleotidia pitkiä RNA-ketjuja, jotka säätelevät lähetti-RNA:n toimintaa RNA-interferenssiksi kutsutulla mekanismilla. Solut käyttävät kyseistä mekanismia hyväksi suojautuessaan viruksilta sekä hillitessään normaalia geeniekspressiotaan. siRNA-molekyylejä voidaan käyttää hyväksi solujen geeniekspression estämisessä ja tutkimisessa.

Dicer-niminen entsyymi hajottaa ensin kaksijuosteisen RNA:n lyhyemmiksi kaksijuosteisiksi siRNA-molekyyleiksi. siRNA:t kiinnittyvät RISC-kompleksiin (RNA-induced silencing complex), joka aktivoituu samalla hajottaen siRNA:n yksijuosteisiksi molekyyleiksi. Syntynyt yksijuosteinen siRNA kiinnittyy komplementaariseen lähetti-RNA:han sytoplasmassa, minkä

seurauksena lähetti-RNA hajoaa ja geeniekspressio estyy. ( Hannon 2002.)

## 1.7 Tutkimuksen tarkoitus

Aiemmissä aCGH- ja metafaasiCGH -tutkimuksissa havaittiin amplifikaatiot 1p22-lokuksessa, jossa sijaitsevat tutkittavat geenit TMED5 ja DR1. Saattaa olla mahdollista, että kyseiset geenit toimivat onkogeneeinä tai tuumorisuppressorigeeneinä virtsarakon levyepiteelisyövässä. Lisäksi muissa syövässä kyseisillä geeneillä on havaittu kopiomäärän muutoksia ja niiden osallistuvan patogeneesiin.

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää, onko TMED5:llä vaikutusta virtsarakon levyepiteelisyövän kasvuun ja invaasiokykyyn. DR1-geenin ekspressiota normaalissa virtsarakossa verrataan geenin ekspressioon muissa ihmiskudoksissa. Tarkoituksena on arvioida, mikä amplifikaation merkitys on.

## TUTKIMUSAINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Tutkimusaineisto

Aineistona käytin ScaBER-solulinjan (ATCC, Rockville, MD, USA) virtsarakon levyepiteelisyöpäsoluja, joita kasvatin suositelluissa olosuhteissa: Eagle elatusaine (2 mM L-glutamiinia ja BSS:ää, joka sisältää 1.5 g/L natriumbikarbonaattia, 0.1 mM non-essentiellejä aminohappoja ja 1.0 mM natriumpyruvaattia, 90%; sikiön boviiniseerumia, 10%), 37 astetta ja 5% CO<sub>2</sub>. Käytin myös kyseisistä soluista valmiiksi eristettyä RNA:ta (TriReagent, Molecular Research Center Inc.). Lisäksi käytin 20 ihmiskudoksesta (lueteltu taulukossa 1) eristettyä lähetti-RNA:ta, jotka ovat kaupallisesti saatavilla (Ambion FirstChoice® Total Human RNA Survey Panel).



## 2.2 Geeniekspression tutkiminen

### 2.2.1 cDNA-synteesi

Aluksi valmistin ScaBER-syöpäsoluista valmiiksi eristetystä RNA:sta sekä 20 ihmiskudoksesta eristetystä lähetti-RNA:sta käänteiskopioimalla komplementaarista DNA:ta (cDNA), jonka synteesi tapahtuu seuraavasti:

1. 1 ul satunnaisia heksomeerialukkeita, 1 ul RNA:ta ja 8 ul vettä sekoitettiin
2. seosta kuumennettiin 70:ssä asteessa 10 minuuttia, jonka jälkeen se laitettiin jäihin
3. valmistettiin reaktioseosta 15 ul kutakin näytettä kohti:
  1. 2,5 ul reaktiopuskuria (Finnzymes)
  2. 2,5 ul dNTP seosta (10mM)
  3. 0,5 ul RNAasi-inhibiittoria (Fermentas)
  4. 0,5 ul AMV-entsyymiä (Finnzymes)
  5. 9 ul vettä
4. inkuboitiin 42:ssa asteessa tunnin ajan
5. reaktio lopetettiin inkuboimalla 70:ssä asteessa 10 minuuttia
6. cDNA varastoitettiin -20:ssä asteessa

RNAasi-inhibiittori estää RNA:n hajoamista reaktion aikana RNAasin vaikutuksesta. dNTP- seos sisältää neljää deoksiribonukleotidia (adeniini, sytosiini, guaniini ja tymiini), joista syntyvä cDNA-ketju rakentuu. AMV toimii uutta DNA-ketjua rakentavana entsyyminä. Näytteiden lisäksi tein negatiivisen kontrollin, johon pipetoin muut aineet lukuunottamatta RNA:ta. Negatiivisen kontrollin avulla varmistetaan, että näytteet eivät ole kontaminoituneet vieraalla DNA:lla.

### 2.2.2 qPCR

Monistin syntetisoitua cDNA:ta kvantitatiivisella polymeraasioketjureaktiolla (qPCR). Monistettavan DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti toistuvien kopiosykliden aikana, jolloin pieniäkin DNA-määriä voidaan tutkia. Kvantitatiivisella menetelmällä (qPCR) voidaan verrata monistuvien DNA-partikkelien suhteellista määrää toisiinsa. Monistuneiden DNA-partikkelien

suhteiden avulla saadaan selville suhteelliset aloitusmäärät. Samalla vertasin tutkittavien geenien (DR1 ja TMED5) monistumista kaikissa kudoksissa tasaisesti ekspressoituvien geenien monistumiseen. Tässä normalisoinniksi kutsutussa menetelmässä saadaan selville solun geeniekspressio normaalitilassa, joka voidaan huomioida analyyseissä. Käytin siihen yleistä transkriptiotekijää nimeltä TBP (TATA-binding protein), sekä sytoskeletonin muodostumiseen osallistuvaa beeta-aktiinia.

Yhtä näytettä kohti PCR-reaktio on seuraavanlainen (Master Mix):

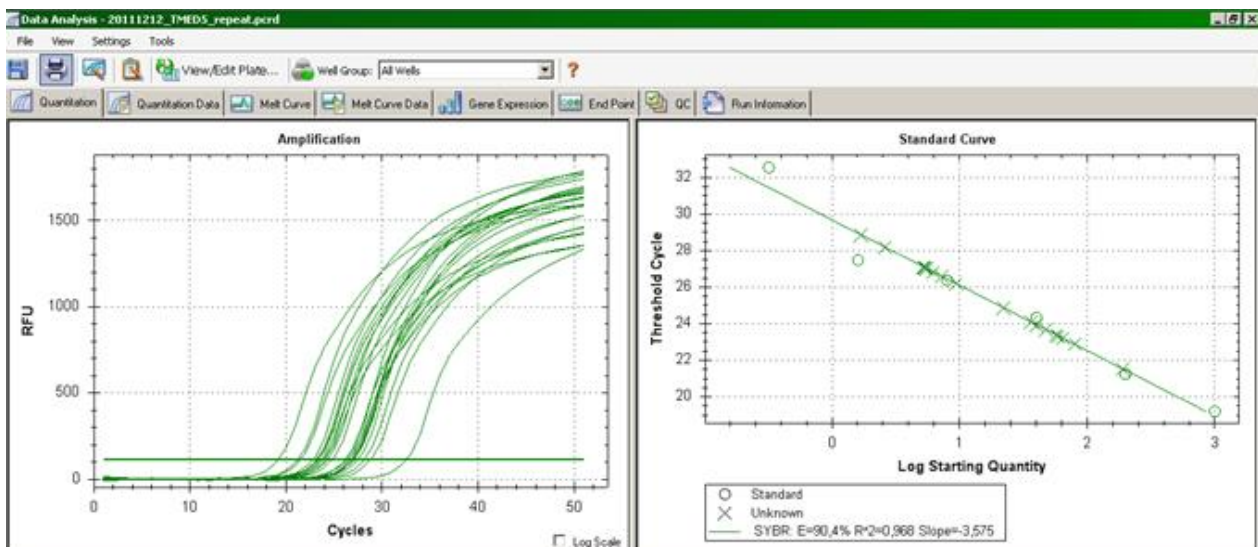
1. 0,125 ul aluketta (forward)
2. 0,125 ul aluketta (reverse)
3. 12,5 ul SYBR green
4. 7,25 ul vettä
5. 2 ul cDNA:ta, joka on laimennettu 1:50
6. sekoitetaan

Tein yhden Master Mix-sekoituksen kumpaakin tutkittavaa geeniä varten, jotka jaoin näytteiden kesken kummassakin qPCR-ajossa. cDNA:n laimensin monistusta varten 1:50 (2ul cDNA:ta ja 98ul vettä), jotta sen määrä alussa olisi mahdollisimman pieni ja erot monistuksen jälkeen selvemmin havaittavissa. Samalle näytelevylle pipetoin myös negatiivisen kontrollin kontaminaation havaitsemiseksi sekä kuuden näytteen standardikäyrän. Standardikäyrään valmistamiseen käytin 5ug virtsarakon syöpäsolulinjoista peräisin olevaa RNA:ta, jonka käänteiskopioin ensin aiemmin mainitulla tavalla. Standardikäyrän tein jatkuvalla laimennoksella 1:5, jolloin ensimmäinen näyte vastasi pitoisuutta 1000 ja kuudes 0.32.

SYBR green vapauttaa fluoresoivaa valoa sitoutuessaan kaksijuosteiseen DNA:han qPCR-syklien aikana. Vapautuvan valon määrä on verrannollinen kaksijuosteisen DNA:n konsentraatioon, joka kasvaa kopiosyklien edetessä. Tästä seuraa, että mitä nopeammin DNA monistuu, sitä nopeammin fluoresoivaa valoa vapautuu ja näytettä vastaava käyrä piirtyy qPCR-ohjelmaan. qPCR-ohjelma piirtää fluoresenssin perusteella käyrän kustakin näyteputkesta (Kuva1). Standardikäyrän suhteiden perusteella ohjelma antaa tutkittavien näytteiden aloitusmäärälle arvon, jota käytetään analyyseissä. Näytteitä vastaavien käyrien tulee asettua ensimmäisen ja viimeisen standardikäyrän väliin, jotta suhteelliset aloitusmäärät on mahdollista määrittää ja qPCR olisi luotettava.

### 2.2.3 TMED5

TMED5-geenille qPCR:ää sovelsin siten, että pyrin löytämään geeniä vastaan tehokkaan siRNA:n, joka hiljentäisi geenin ilmentymisen. Lisäsin kuhunkin näyteputkeen yhtä kolmesta kaupallisesti saatavilla olevasta siRNA:sta (Ambion Silencer® Select siRNA, ID: s27204, s27202, s27203), jotka on suunniteltu sitoutumaan TMED5-geeniä vastaavalle kromosomialueelle. Samaan aikaan vertasin TMED5-ekspressiota solujen normaaliin ekspressioon, joten pipetoin näytelevylle myös TBP:tä vastaavaa DNA:ta. Pipetoin myös standardikäyrän samalle näytelevylle. Vaikka kaikki kolme siRNA:ta on suunniteltu TMED5-geeniä vastaan, niiden sitoutumistehokkuudessa voi olla eroja, joka oli tarkoitus havaita qPCR:n avulla. Tehokkaan siRNA:n löytäminen oli tärkeää, jotta pystyin myöhemmin tutkimaan geenin osuutta ScaBER-syöpäsolujen kasvukykyyn.



**Kuva 1.** TMED5-qPCR. Vasemmanpuoleisessa kuvassa näkyvät kopiosyklien edetessä ilmestyvät amplifikaatiokäyrät, joista yksittäinen käyrä vastaa yhtä näytettä tai standardinäytettä. Oikeanpuoleisessa kuvassa näytteet (merkitty rasteilla) asettuvat standardinäytteiden (merkitty palloilla) muodostamalle suoralle. qPCR-ajo on ollut luotettava, jos näin tapahtuu.

### 2.2.4 DR1

qPCR:n avulla vertasin DR1-ekspressiota eri ihmiskudoksissa. Pipetoin näytelevylle 20:stä eri ihmiskudoksesta eristettyä DNA:ta, negatiivisen kontrollin sekä standardikäyrän taulukon 1

osoittamalla tavalla. Standardikäyrän valmistin eturauhasesta peräisin olevasta laimentamattomasta DNA-näytteestä, jota käytin 2 ul ensimmäiseen näytteeseen ja loput tein jatkuvalla laimennoksella 1:5. Tällä kertaa standardinäytteitä oli seitsemän. qPCR-reaktioon käytin jo aiemmin mainittua Master Mix -seosta, jonka jaoin kaikkien näytteiden kesken. Nyt normalisoin näytteet TBP:llä sekä beeta-aktiinilla. Tein molemmat normalisoinnit erikseen, sillä qPCR:n optimaalinen annealing lämpötila on eri kummallekin geenille. Annealing tarkoittaa lämpötilaa, jossa aluke sitoutuu monistettavaan DNA:han. Koko taulukko 1 ajettiin kerralla yhtä geeniä (TBP ja beeta-aktiini) varten.

**Taulukko 1.** DR1-qPCR: tutkittavat ihmiskudokset. Pipetoin tutkittavat näytteet, standardikäyrän sekä negatiivisen kontrollin taulukon osoittamalla tavalla qPCR-levylle.

|             |               |             |             |             |             |                       |                        |
|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|------------------------|
| Paksusuoli  | Perna         | Munasarja   | Henkitorvi  | Virtsarakko | Kives       | Poikkijuovainen lihas | Kateenkorva            |
| Eturauhanen | Kilpirauhanen | Rasvakudos  | Istukka     | Kohdunkaula | Ruokatorvi  | Aivot                 | Ohutsuoli              |
| Keuhkot     | Maksa         | Munuainen   | Sydän       |             |             |                       |                        |
| Standardi 1 | Standardi 2   | Standardi 3 | Standardi 4 | Standardi 5 | Standardi 6 | Standardi 7           | Negatiivinen kontrolli |

### 2.2.5 Tulosten analysointi

qPCR-ohjelma antoi suhteelliset aloitusmäärät kullekin geenille, jotka syötin Microsoft Excel -ohjelmaan. Normalisoin TMED5:n jakamalla sen aloitusarvot TBP:n aloitusarvoilla. Piirsin normalisoiduista arvoista kuvaajat Microsoft Excel -ohjelmalla, jolloin näin mikä oli tehokkain siRNA estämään TMED5-ekspressiota. DR1:n aloitusarvot jaettiin erikseen sekä TBP:n, että beeta-aktiinin aloitusarvoilla. Näistä piirsin kaksi eri kuvaajaa (Kuva 2 ja Kuva 3), joiden avulla pystyin vertaamaan DR1-ekspressiota eri kudoksissa.

## 2.3 Kasvukäyrä

Kasvukäyrän tarkoituksena on tutkia syöpäsolujen kasvua ja invaasiokykyä elatusmaljalla. Vertailtavia ovat normaalit syöpäsolut, kontrollisolut sekä knockdown-syöpäsolut, joilta on estetty tietyn geenin ekspressio siRNA:n avulla. Tässä tutkimuksessa vertasin normaaleja ScaBER-syöpäsoluja, yhtä negatiivista kontrollia sekä ScaBER-syöpäsoluja, joilta estin TMED5-ekspression siRNA-transfektioilla (s27204).

### 2.3.1 Solulaskenta

Solujen jakaantumisenopeuden määrittämiseksi irroitin solut ensin kasvumaljastaan trypsiinillä, laskin solut Burker-kammiossa ja siirsin halutun määrän soluja 24-kuoppalevyille. Solut on laskettava, jotta kullekin kasvatusalustalle siirrettäisiin sama määrä soluja, ja niiden kasvua voitaisiin verrata. Burker-kammiossa on yhdeksän isoa ruutua, joista kolmen kulmittain olevan ruudun solut lasketaan yhteen. Solujen määrä elatusaineessa saadaan selville laskemalla kolmessa ruudussa olevien solujen määrän keskiarvo ja kertomalla se 10 000:lla. Solujen määrä ilmoitetaan kappalemääränä/ml. Elatusmaljoille siirrettävä solumäärä riippuu solutyypistä sekä sen kasvunopeudesta. Nyt siirsin 20 000 solua 24-kuoppalevyn 12 kasvualustalle.

Solulaskenta tapahtuu seuraavasti:

1. vanha elatusaine poistetaan
2. maljaan lisätään 10 ml PBS:ää, joka poistetaan heiluttelun jälkeen
3. lisätään 4ml trypsiiniä
4. maljaa inkuboidaan 37:ssä asteessa, kunnes solut irtoavat maljalta
5. valmistetaan Burker-lasi
6. lisätään 6ml elatusainetta kun solut ovat irronneet, sekoitetaan
7. koko elatusaine soluineen siirretään 15 ml:n näyteputkeen, sekoitetaan
8. pipetoidaan näytettä 10 ul Burker-lasin yläosaan
9. solut lasketaan
10. 1ml elatusnestettä, joka sisältää 20 000 solua siirretään kullekin kasvatusalustalle
11. solut jätetään kasvamaan inkubaattoriin vuorokaudeksi (37 astetta, 5% CO<sub>2</sub>)

### 2.3.2 siRNA-transfektio

Solulaskentaa seuraavana päivänä siirsin soluihin kontrollinukleiinihapot sekä tehokkaimmaksi todetun siRNA:n (s27204) estämään TMED5-ekspression. Kontrollinukleiinihapo on lyhyt RNA-ketju, jonka ei tiedetä kohdistuvan mihinkään tunnettuun replikoniin. Lisäksi kasvatin yhden linjan taustakontrollina: ScaBER-syöpäsoluja normaalissa mediumissa ilman käsittelyä. Kontrollisolujen ja tavallisten ScaBER-solujen kasvun pitäisi siten olla miltei samanlaista. Kutakin vertailtavaa linjaa kohti tein useita kasvualustoja, jotta tulokset olisivat luotettavampia. Tässä tapauksessa neljä, kuten taulukko 2. osoittaa.

**Taulukko 2.** Kasvukäyrässä tutkittavat solulinjat. siTMED5 = siRNA TMED5-geeniä vastaan, NEG = siRNA-kontrollinukleiinihapo, NT = taustakontrolli

|           |           |           |           |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| siTMED5 1 | siTMED5 2 | siTMED5 3 | siTMED5 4 |
| NEG 1     | NEG 2     | NEG 3     | NEG 4     |
| NT 1      | NT 2      | NT3       | NT 4      |

siRNA-transfektio tapahtuu seuraavasti:

1. siRNA:ta konsentraatioltaan 50uM saadaan lisäämällä 30pmoolia siRNA:ta 100ul:n totaalivolyyymiin OptiMEM-elatusainetta
2. 2ul interferiiniä lisätään seokseen
3. inkuboidaan 10 minuuttia huoneenlämmössä
4. seosta lisätään 100 ul kasvualustaa kohti totaalivolyyymiin 600ul
5. solut jätetään kasvamaan inkubaattoriin (37 astetta, 5% CO<sub>2</sub>)

### 2.3.3 Solujen proliferaatiomittaus

Solujen kasvua ja invaasiokykyä voidaan tutkia ottamalla kasvualustoista kuvia valomikroskoopin avulla. Tässä tutkimuksessa tein valomikroskopian kerran vuorokaudessa päivinä 1,2,3, ja 5. Otin ensimmäiset kuvat vuorokausi nukleiinihappojen siirron jälkeen. Lopetin

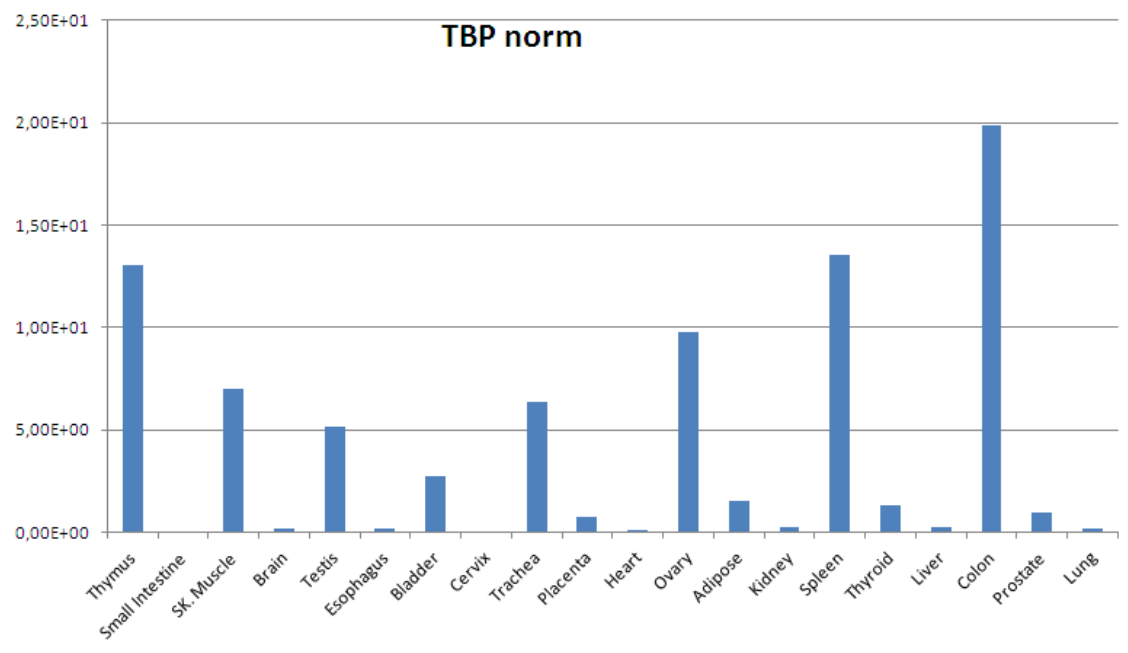
kuvien ottamisen, kun kasvualustat alkoivat olla täynnä soluja. Tällöin muutoksia kasvussa on enää vaikea havaita ja solut alkavat kuolla ravinnon- sekä tilanpuutteen takia. Analysoin valomikroskopian ImageJ-ohjelmalla, joka vertaa solujen täyttämää alaa tyhjään pohjan pinta-alaan kasvualustoilla.

Virtuaalimikroskopian tuloksen varmistin AlamarBlue-tekniikalla, joka on solumetaboliaan perustuva spektrofotometrinen mittaus. Menetelmässä kasvatettavien solujen elatusaineen sekaan pipetoidaan REDOX-nimistä indikaattoria, joka muuttaa solumetabolian vuoksi muotoaan hapettuneesta (sininen, ei-fluoresoiva) pelkistyneeseen (punainen, fluoresoiva). Datan keräys perustui absorbanssiin ( VICTOR<sup>3</sup> multilabel reader).

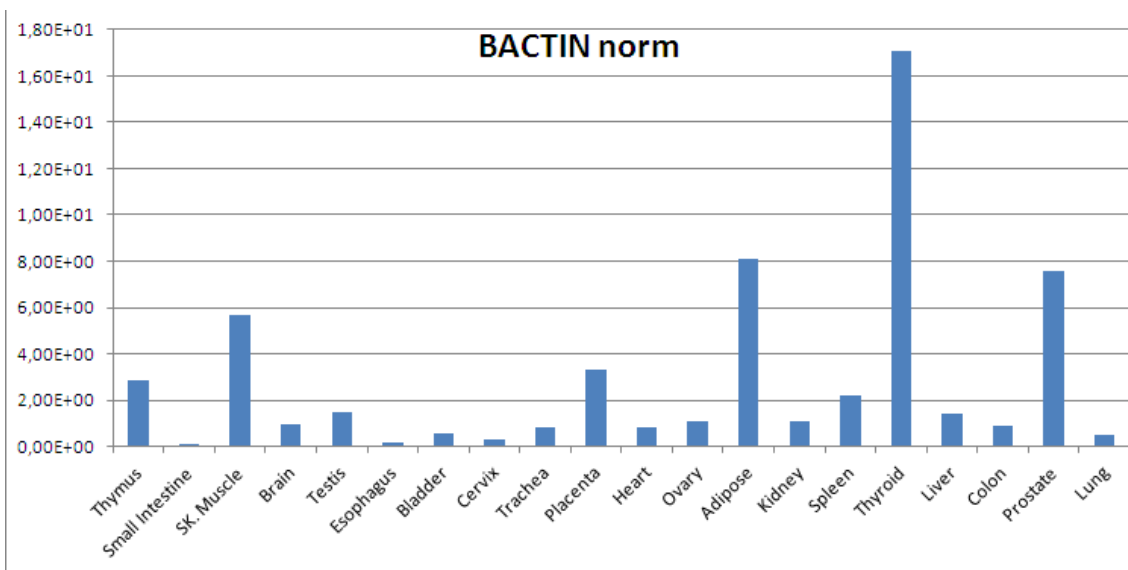
## **TULOKSET**

### **3.1 DR1**

Kudospaneelissa normaalin virtsarakon DR1-ekspressio ei ollut erityisen matala eikä korkea verrattuna TBP:hen ja beeta-aktiiniin. Kuvassa 2 on esitetty DR1-ekspressiot normalisoituna TATA-binding proteiinilla ja kuvassa 3 beeta-aktiinilla normalisoituna. Kudosten suhteellista ekspressiota kuvaavien pylväiden korkeus riippuu, kumpaa normalisointitapaa tarkastellaan. Kuitenkaan virtsarakkoa kuvaavien pylväiden korkeus ei oleellisesti muutu riippumatta siitä kumpaa kuvaa katsotaan.



**Kuva 2.** Kudosten DR1-ekspressoio TATA-binding-proteiinilla normalisoituna.



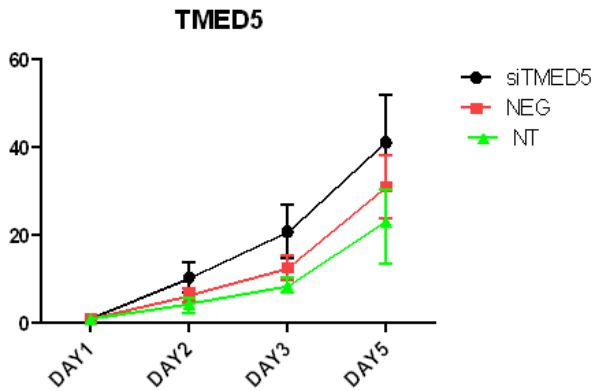
**Kuva 3.** Kudosten DR1-ekspressoio beeta-aktiinilla normalisoituna.

### 3.2 TMED5

qPCR:n avulla TMED5-geeniä vastaan löytyi tehokas siRNA, joka on kaupallisesti saatavilla Ambionilta (s27204). Käytin kyseistä siRNA:a kasvukäyrässä estämään TMED5-ekspression.



Geenin ekspression estolla ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa solujen kasvuun ( $p=0,46$ ). Päinvastoin kuvan 4 mukaan siRNA-solut kasvoivat enemmän kuin kontrollinukleiinihapolla transkfectoidut solut tai normaalit solut. Myös AlamarBlue-värjäys antoi samankaltaisen tuloksen (taulukko 6).

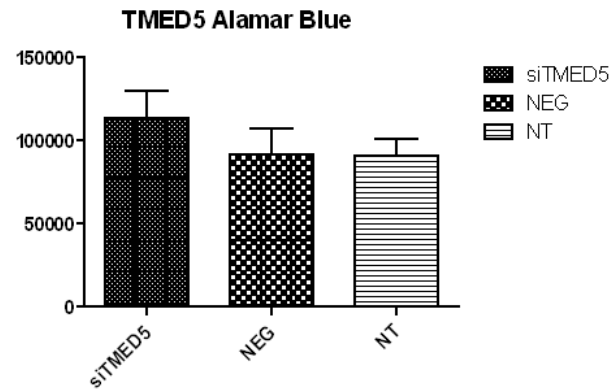


**Kuva 4.** Kasvukäyrä.

siTMED5 = siRNA TMED5-geeniä vastaan,

NEG = siRNA- kontrollinukleiinihappo,

NT= taustakontrolli



**Kuva 5.** Alamar Blue -värjäys.

Lyhenteet ovat vastaavat kuin kuvassa 4.

## POHDINTA

### 4.1 Tulokset

Kasvukäyrässä tehokkaan siRNA:n käyttö ei vähentänyt TMED5-ekspressiota tilastollisesti merkittävästi ( $p = 0,46$ ). Tämä viittaisi siihen, että TMED5 ei vaikuta virtsarakon levyepiteelisyövän kasvuun tai invaasiokykyyn. TMED5 ei siis toimi onkogeeninä tällä mekanismilla, vaikka amplifikaatiota havaitaankin. DR1-ekspressio normaalissa virtsarakossa ei erityisemmin poikkea muista kudoksista. Jatkossa tutkimusryhmässä etsitään DR1-geeniä vastaan tehokas siRNA ja tehdään kasvukäyrä geenin toiminnallisen merkityksen selvittämiseksi.

## 4.2 Virhelähteet

Merkittävin virhelähde tässä tutkimuksessa on pipetointivirhe, jota on voinut tapahtua missä tahansa tutkimuksen vaiheessa. qPCR:n osalta luotettavuutta parantaa standardikäyrän pipetointi sekä cDNA:n laimentaminen. Tällöin erot DNA:n monistumisessa ovat suurempia ja iso määrä monistunutta DNA:ta johtuu todennäköisemmin voimakkaasta ekspressiosta eikä suuresta alkuperäisvolyymista. Lisäksi käytin käänteiskopioinnissa ja qPCR:ssä negatiivisia kontrolleja kontaminaation havaitsemiseksi. Kudosvertailussa käytetyt normalisoijat (TBP ja beeta-aktiini) lisäävät myös tulosten luotettavuutta.

Virheen mahdollisuutta kasvukäyrässä pyrin välttämään tekemällä neljä kasvualustaa kutakin tutkittavaa kasvulinjaa kohti, sekä käyttämällä siRNA-kontrollinukleiinihappoa ja taustakontrollia. Kasvukäyrässä virheen mahdollisuus oli pipetoinnin lisäksi virtuaalimikroskopiassa, sillä kamera ei luotettavasti tarkenna kaikkiin soluihin riittävästi. Virtuaalimikroskopian varmensin AlamarBlue-värjäyksellä sekä spektrofotometrisellä mittauksella. Menetelmässä on vähän välivaiheita (pipeointi ja mittaus), joten virhelähteitä ei ollut montaa. Lisäksi indikaattori ei tapa tutkittavia soluja, joten se ei todennäköisesti vaikuta metaboliaan ja mittaustulokseen juuri ollenkaan.

## 4.3 Lopuksi

TMED5 ei kasvukäyrän perusteella vaikuta syöpäsolujen kasvuun tai invaasiokykyyn, joten sen osalta tutkimuksia ei enää jatketa. DR1-geenin toiminnallista merkitystä tutkitaan jo aiemmin mainitun kasvukäyrän avulla. Mikäli ilmenee, että DR1 on osallinen patogeneesiin, on jatkossa mahdollista tutkia sen toimivuutta markkerina virtsarakon levyepiteelisyövän havaitsemiseksi.

DR1:n ja TMED5:n osuutta virtsarakon kasvaimien patogeneesiin ei ole aiemmin tutkittu, joten tästä tutkimuksesta saatu tieto antanee perustan myöhemmälle tutkimukselle ja niiden tavoitteille. TMED5:n ja DR1:n osallisuutta muiden kuin virtsarakon kasvaimien patogeneesiin on myös tutkittu hyvin vähän. Eräisiin syöpiin liittyen on kuitenkin havaittu kopiomäärän muutoksia tai geenin vaikuttavan potilaan ennusteeseen. Suun alueen levyepiteelisyövässä TMED5-ekspressio on hieman lisääntynyt. Seurauksena kaulan alueen imusolmukemetastasointi lisääntyi ja

potilaiden ennuste huononi. (Nguyen ym. 2007.) Myeloomassa TMED5-deleetioilla ei ollut vaikutusta potilaiden selviämiseen (Boyd ym. 2011). Myös manttelisolulymfoomassa havaitaan TMED5-deleetioita, muttei siitä aiheutuvaa ekspresion vähentymistä. Deleetion vaikutusta taudin ennusteeseen ei artikkelissa tutkittu. (Schraders ym. 2008.)

Vähäisen tutkimusnäytön perusteella on vaikea arvioida, miten merkittävä vaikutus TMED5:llä on eri syöpien patogeneesissä ja mikä geenin vaikutusmekanismi kussakin tapauksessa on. Syövät, joissa TMED5:n roolia on tutkittu ovat hyvin erilaisia luonteeltaan ja patogeneesiltään, joten johtopäätöksiä ei näiden tutkimusten perusteella voida juurikaan tehdä. Näyttäisi kuitenkin siltä, että pelkästään TMED5-geenin sekvenssimäärän muutoksilla ei pysty ennakoimaan, toimiiko se onkogeeninä vai ei.

DR1:n havaittiin vaikuttavan neuroblastooman patogeneesiin ja solujen proliferaatioon. Geeniä vastaavan lähetti-RNAn määrä oli vähentynyt ja siihen liittyi useimmiten deleetio vastaavassa lokuksessa. (Di Pietro ym. 2008.) Kyseisessä tutkimuksessa ehdotetaan, että DR1 voisi olla toimiva markkeri neuroblastooman diagnostiikassa. Neuroblastoomassa geenin sekvenssimäärän muutos ja ekspresio korreloivat toisiinsa. Omassa tutkimuksessani DR1-ekspresio ei muihin kudoksiin verrattuna ollut erityisen korkea, vaikka DNA:n amplifikaatiota onkin aiemmissä tutkimuksissa havaittu. Näyttäisi siltä, että DR1:n kohdalla ekspresio ei aina ole riippuvainen sekvenssimäärän muutoksista. DR1:n toiminnallinen merkitys virtsarakon levyepiteelisyövässä selviää tutkimusryhmässä myöhemmin. Tämän jälkeen amplifikaation muita vaikutuksia ja mahdollisia lisätutkimuksia voidaan pohtia.

Vaikuttaa siltä, että syövästä riippuen saman geenin sekvenssimäärä voi olla lisääntynyt tai vähentynyt. Mielenkiintoista on, miksi kopiomäärä kussakin tapauksessa muuttuu tiettyyn suuntaan ja onko sekvenssimäärän muutoksella jompaankumpaan suuntaan enemmän potentiaalia vaikuttaa tuumorigeneesiin. Vastaus tähän selvinnee vasta useiden tutkimusten jälkeen.

Jatkossa voidaan selvittää, onko TMED5:llä ja DR1:llä sekvenssimäärän muutoksia muissa kuin aiemmin mainituissa kasvaimissa ja toimivatko ne näissä tapauksissa mahdollisesti onkogeneeinä. Myös muita patogeneesimahdollisuuksia on pohdittava, sillä aiempien tutkimusten perusteella TMED5 voi vaikuttaa kasvainten patogeneesiin, vaikka sekvenssimäärän muutoksia ei havaittaisikaan.

1p21-22 lokuksessa on myös kaksi muuta geeniä (EVI5 ja RPL5), joiden havaittiin

amplifikoituneen virtsarakon levyepiteelikarsinoomassa. Eturauhassyövän tutkimusryhmässä tutkitaan kyseisten geenien merkitystä vastaavalla tavalla kuin tässä tutkimuksessa. Näidenkin geenien mahdollisuutta toimia markkerina voidaan pohtia vasta, kun niiden toiminnallinen merkitys on selvinnyt. Tavoitteena olisi löytää geeni, joka vaikuttaisi merkittävästi virtsarakon levyepiteelisyövän patogeneesiin, jonka jälkeen sitä voitaisiin mahdollisesti käyttää kyseisessä syövässä diagnosoimisen apuna.

## LÄHTEET

Anantharaman V, Aravind L. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol* 2002;3.

Blaveri E, Brewer JL, Roydasgupta R, Fridlyand J, DeVries S, Koppie T, et al. Bladder cancer stage and outcome by array-based comparative genomic hybridization. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(19):7012-22.

Boyd KD, Ross FM, Walker BA, Wardell CP, Tapper WJ, Chiecchio L et al. Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p21 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res.* 2011;17(24):7776-84.

Creton S, Svejstrup JQ, Collart MA. The NC2  $\alpha$  and  $\beta$  subunits play different roles in vivo. *Genes & Dev.* 2002;16:3265-3276.

Di Pietro C, Ragusa M, Barbagallo D, Duro LR, Guglielmino MR, Majorana A et al. Involvement of GTA protein NC2beta in neuroblastoma pathogenesis suggests that it physiologically participates in the regulation of cell proliferation. *Mol Cancer.* 2008;7:52.

Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418:244-251.

Inostroza JA, Mermelstein FH, Ha I, Lane WS, Reinberg D. Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* 1992;70:477-489.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2011 Mar-Apr; 61(2):69-90.

Jenne N, Frey K, Brugger B, Wieland FT. Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 2002;277:46504–46511.

Joensuu H, Roberts PJ, Teppo L, Tenhunen M, toim. Syöpätaudit. 3. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2007.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Seuter G, DeVries S, Kerschmann R, et al. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995 Mar; 12(3):213-219.

Koegler E, Bonnon C, Waldmeier L, Mitrovic S, Helbeisen R, Hauri HP. P28, A novel ERGIC/*cis* Golgi protein, required for golgi ribbon formation. *Traffic* 2010;11:70-89.

Lander ES et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001 Feb 15;409:860-921.

Mermelstein F, Yeung K, Cao J, Inostroza JA, Erdjument-Bromage H, Egelson K et al. Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription. *Genes Dev.* 1996;10:1033-1048.

Nguyen ST, Hasegawa S, Tsuda H, Tomioka H, Ushijima M, Noda M et al. Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell

carcinoma. *Cancer Science* 2007 May; 98(5):740-746.

Nord H, Segersten U, Sandgren J, Wester K, Busch C, Menzel U, et al. Focal amplifications are associated with high grade and recurrences in stage Ta bladder carcinoma. *Int. J. Cancer*. 2010 Mar 15;126(6):1390-1402.

Nurmi M, Lukkarinen O, Ruutu M, Taari K, Tammela T, toim. *Urologia*. 2. painos. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2002.

Rundle JSH, Hart AJL, McGeorge A, Smith JS, Malcolm AJ, Smith PM. Squamous Cell Carcinoma of Bladder. A Review of 114 Patients. *Brit J Urol*. 1982;54:522–526.

Schimmoller F, Singer-Kruger B, Schroder S, Kruger U, Barlowe C, Riezman H. The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J* 1995;14:1329–1339.

Schraders M, Jares P, Bea S, Schoenmakers E, Van Krieken J, Campo, E. Integrated genomic and expression profiling in mantle cell lymphoma: identification of gene-dosage regulated candidate genes. *BJH* 2008;143:210–221.

Serretta V, Pomara G, Piazza F, Gange E. Pure squamous cell carcinoma of the bladder in western countries. *Eur Urol*. 2000 Jan; 37(1):85-9.

Shokeir A. Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment. *BJU Int*. 2004;93:216–220.

Stamnes MA, Craighead MW, Hoe MH, Lampen N, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. An integral membrane component of coatamer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8011–8015.

The vertebrate genome annotation database (Vega). [päivitetty 26.6.2012].  
[Http://vega.sanger.ac.uk/Homo\\_sapiens/Info/Index](http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Info/Index)