

# **Integriini $\beta 1$ -välitteinen solujen välisten liitosten sääntely epiteelisissä rintasyöpäsoluissa**

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Biokemia

Huhtikuu 2020

Tatu Aalto

*Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä.*

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

AALTO TATU: Integriini  $\beta 1$  -välitteinen solujen välisten liitosten säätely  
epiteelisissä rintasyöpäsoluissa

Pro gradu -tutkielma, 64 s.

Biokemia

Huhtikuu 2020

---

Integriinit ovat solureseptoreja, joita eläinsolut käyttävät ympäristöönsä tarttumiseen. Tämän lisäksi integriinit säätelevät useita erilaisia solun toimintoja kuten liikkumista, jakautumista ja erilaistumista. Integriinit vaikuttavat merkittävästi myös syövän syntymiseen ja kehittymiseen, sillä useat syövän olennaiset ominaisuudet liittyvät integriinivälitteisiin prosesseihin. Erikoistyössä tutkittiin, miten integriini  $\beta 1$  -alaysikkö vaikuttaa rintasyöpäsolulinjoihin.

Erikoistyön alussa havaittiin BT474-rintasyöpäsolulinjan epiteelisen fenotyypin muuttuvan radikaalisti mesenkymaaliseen suuntaan, kun niiltä hiljennettiin *ITGB1*-geeni RNA-interferenssin avulla. Vastaavia fenotyypimuutoksia tehtiin myös muissa rintasyöpäsolulinjoissa. Proteiinitasolla *ITGB1*-hiljennys vaikutti E-kadheriinin ilmenemiseen, sillä sen prosessoimattoman muodon määrä kasvoi *ITGB1*-hiljennyksen jälkeen, kun asiaa tarkasteltiin western blot -menetelmällä. Immunofluoresenssikuvissa havaittiin puolestaan, että osassa *ITGB1*-hiljennetyistä soluista E-kadheriinia ei ollut solukalvolla, vaan sitä esiintyi solun sisäosissa. E-kadheriinin sisäänotto ei kuitenkaan vaikuttanut endosytoosikokeen ja kolokalisaatioanalyysin perusteella lisääntyneen. *ITGB1*-hiljennys lisäsi myös BT474-solujen satunnaisliikehdintää, ja koehaavan sulkeutuminen nopeutui. Proliferaationopeudessa ei tapahtunut muutoksia. Erikoistyön loppuvaiheessa havaittiin, että *ITGB1*-hiljennyksellä oli myös epäspesifisiä sivukohdevaikutuksia, ja BT474-solulinjan fenotyypin muuttuminen oli näiden seurausta. Näin ollen ainakin osa tuloksista johtuu tuntemattoman proteiinien hiljentymisestä.

Tutkimuksen jatkoon kannalta olisi ensisijaisen tärkeää selvittää, minkä tuntemattoman proteiinin ilmenemiseen *ITGB1*-hiljennys on vaikuttanut. Mahdollisia vaihtoehtoja ovat PWWP2A- ja ARHGEF10-proteiinit, mutta tämä tulisi selvittää kokeellisesti esimerkiksi RNA-sekvensointia hyödyntäen. Erikoistyössä löydetyllä fenotyypillä on kiinnostavia ja syövän kehittymisen kannalta olennaisia ominaisuuksia kuten lisääntynyt liikkuvuus. Jatkotutkimukset voisivat siis tuottaa merkittävää perustutkimustason tietoa rintasyövästä.

Asiasanat: E-kadheriini, integriini  $\beta 1$ , rintasyöpä, RNA-interferenssi

## Sisältö

<b>Lyhenteet</b>	3
<b>1 Kirjallisuuskatsaus</b>	5
1.1 Integriinit	5
1.1.1 Integriinien kaksisuuntainen signalointi	7
1.1.2 Integriinit ja solujen kiinnittyminen ympäristöönsä	8
1.1.3 Solujen liikkuminen ja integriinit	12
1.1.4 Integriinit solun jakautumisen, erilaistumisen ja selviytymisen säätelyssä	16
1.2 Syöpä	18
1.2.1 Syövän olennaiset ominaisuudet	19
1.2.2 Syöpä ylläpitää kasvusignaaleja	20
1.2.3 Syöpä vastustaa kasvua heikentäviä signaaleja	22
1.2.4 Syöpä väistää apoptoosia	22
1.2.5 Syöpä jakautuu hallitsemattomasti	23
1.2.6 Syöpä laajentaa verisuonistoa	24
1.2.7 Syöpä tunkeutuu uusille alueille	25
1.2.8 Rintasyöpä	29
1.3 Tutkielman tavoite	31
<b>2 Tulokset</b>	33
2.1 Ensihavainto	33
2.2 ITGB1-hiljennys eri rintasyöpäsolulinjoissa	34
2.3 E-kadheriini hajaantuvassa fenotyypissä	37
2.3.1 ITGB1-hiljennyksen vaikutus BT474-linjan proteiinitasoihin	37
2.3.2 ITGB1-hiljennyksen vaikutus E-kadheriinin lokalisaatioon	39
2.3.3 E-kadheriinin endosytoosi ITGB1-hiljennetyissä BT474-soluissa	42
2.4 Toiminnalliset kokeet	44
2.4.1 Hajaantuvan fenotyypin liikkuminen ja jakautuminen	45

2.4.2	AIIB2-kiinnittymiskoe – johtuuko hajaantuva fenotyyppi integriini $\beta$ 1:n tarttumis- vai signalointiominaisuuksista	48
2.5	Hajaantuvan fenotyypin toistuminen sekvenssiltään erilaisilla ITGB1:n siRNA:illa	49
<b>3</b>	<b>Pohdinta</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Materiaalit ja menetelmät</b>	<b>58</b>
4.1	Solujen kasvatus	58
4.2	RNA-hiljennykset	58
4.3	Proteiinitasojen tunnistaminen Western blot -menetelmällä	59
4.4	Solujen kuvaus, värjäykset ja kolokalisaatioanalyysi	60
4.5	Kolokalisaatioanalyysi ja solujen keskimääräisen pinta-alan mittaaminen	61
4.6	E-kadheriinin biotiinipohjainen endosytoosikoe	61
4.7	Haavanparantumiskoe	63
4.8	Proliferaatiokoe	63
4.9	AIIB2-kiinnittymiskoe	63
	<b>Lähteet</b>	<b>65</b>

## **Lyhenteet**

**AKT** proteiinikinaasi B

**ALT** telomeerien vaihtoehtoinen pidentyminen

**BSA** naudan seerumin albumiini

**DAPI** 4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli

**ECM** soluväliaine

**EDTA** etyleenidiamiinitetraetikkahappo

**EEA1** aikaisen endosomin antigeeni 1

**EMT** epiteelis-mesenkymaalinen siirtymä

**ER** estrogeenireseptori

**ERK** solun ulkoisten signaalien säätelemä kinaasi

**FAK** fokaaliadheesiokinaasi

**FBS** naudan sikiön seerumi

**GAPDH** glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi

**GEF** guaniininukleotidin vaihtotekijä

**GTP** guanosiinitrifosfaatti

**GTPaasi** guaniinitrifosfaattia sitova proteiini

**HER2** ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 2

**ITGB1** integriini  $\beta$ 1

**LAMP1** Lysosomeihin liitetty kalvoproteiini 1

**MET** mesenkymaalis-epiteelinen siirtymä

**MLC** myosiinin kevytketju

**Neg. ctrl** negatiivinen kontrolli

**PBS** fosfaattipuskuroitu suolalius

**PI3K** fosfatidyli-inositoli-3-kinaasi

**PIP<sub>3</sub>** fosfatidyli-inositoli-3,4,5-trisfosfaatti

**PR** progesteronireseptori

**PTEN** fosfataasi- ja tensiinihomologi

**RISC** RNA:n indusoima hiljennyskompleksi

**RGD** arginiini-glysiini-asparagiini tripeptidi

**SDS** natriumdodekyylisulfaatti

**siRNA** pieni häiritsevä RNA

**siTGB1** integriini  $\beta 1$  -hiljennetty

**TAZ** transkriptiokoaktivaattori PDZ:a sitovalla motiivilla

**TBST** Tween 20 tris-puskuroidussa suolaliuoksessa

**VASP** vasodilaattorin stimuloima fosfoproteiini

**VEGF** verisuonen endoteelin kasvutekijä

**WASp** Wiskott–Aldrich-syndroomaproteiini

**YAP1** Yes:iin liitetty proteiini 1

## 1 Kirjallisuuskatsaus

Solu on elämän perusyksikkö, jossa on lukuisa määrä erilaisia toimintoja ja ohjelmia. Näiden avulla solu reagoi ympäristöönsä ja pyrkii säilymään hengissä yksilönä tai monisoluisena kokonaisuutena. Ohjeet erilaisille toiminnoille tulevat pohjimmiltaan solun perimästä. Perimässä tapahtuu kuitenkin jatkuvasta muutoksia erilaisten ympäristötekijöiden vaikutuksesta, jolloin myös toimintojen kokonaisuus voi lopulta peruuttamattomasti muuttua. Monisoluisessa eliössä muutosten kasautuminen johtaa solun toimintaa säätelevien viestiketjujen epätasapainoon, ikään kuin kapinaa muistuttavaan tilaan, jota kutsutaan syöväksi.

Erikoistyössä tutkittiin  $\beta$ 1-integriini-alayksikköä rintasyöpäsoluissa, joten kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan ensiksi integriinien rakennetta ja tehtäviä. Aiheen käsittelyä jatketaan integriinivälitteisillä prosesseilla, jotka ovat oleellisia syövän kehittymiselle, kuten solujen liikkumisella. Toinen puoli johdannosta käsittelee syövän tärkeimpiä ominaisuuksia, näihin liittyviä tapahtumasarjoja ja rintasyöpää. Kirjallisuuskatsauksessa on pyritty perehtymään tutkimusaiheen ja tuloksien kannalta oleellisimpaan tutkimustietoon.

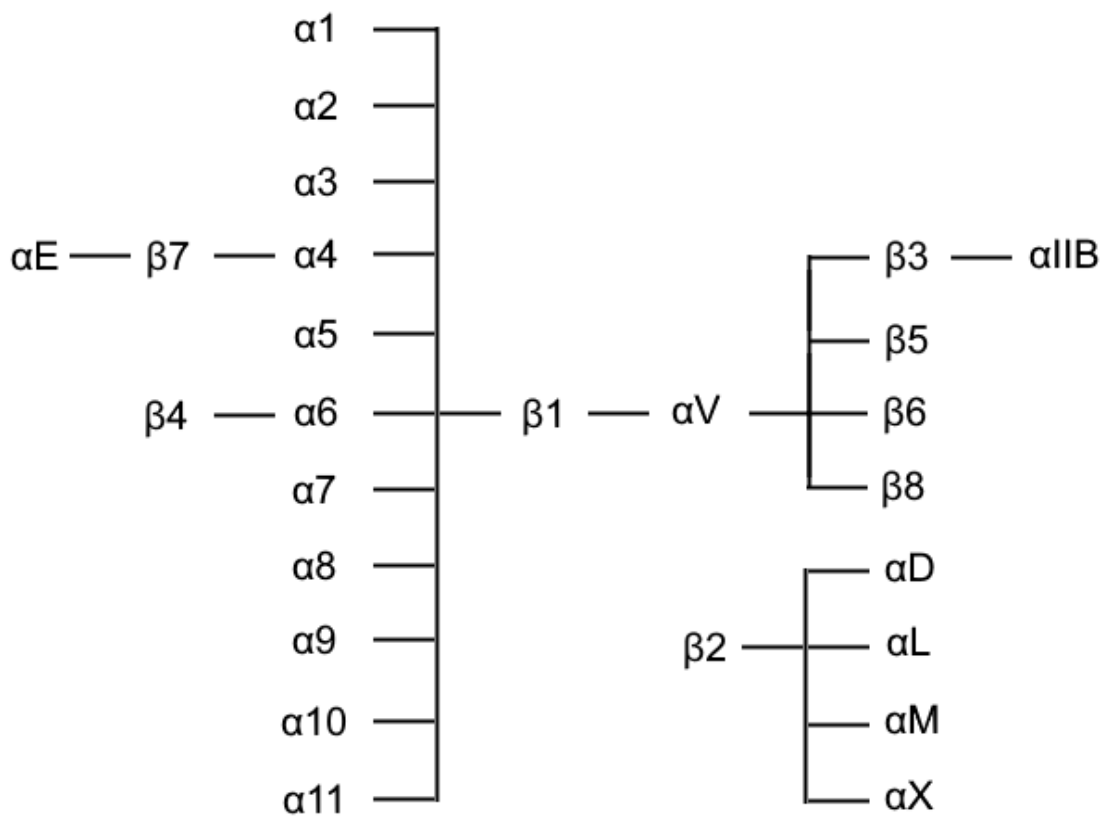
### 1.1 Integriinit

Integriinit ovat perhe tarttumisreseptoreja, jotka kiinnittävät solutukirangan ympäröivään solunulkoiseen soluväliaineeseen eli ECM:ään (engl. *extracellular matrix*). Integriinejä ilmennetään vain eläinkunnan soluissa (Whittaker ja Hynes 2002). Rakenteeltaan integriinit ovat solukalvon läpäiseviä heterodimeerejä, jotka koostuvat kahdesta glykoproteiini-alayksiköstä  $\alpha$  ja  $\beta$ . Ihmisellä tunnetaan 24 erilaista integriiniä, ja ne muodostuvat yhteensä 18  $\alpha$ - ja 8  $\beta$ -alayksiköstä (kuva 1).  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketjujen aminohapposekvenssit ovat selvästi erilaiset, eivätkä ne ole homologeja keskenään. Eri dimeerit poikkeavat toisistaan ominaisuuksiltaan ja toiminnaltaan. (Takada ja muut 2007; Alberts ja muut 2014.)

Integriinit vuorovaikuttavat solun ulkopuolella olevien ligandien kanssa N-terminaalisten domeeniensa avulla. Nämä domeenit sitoutuvat tiettyihin



aminohapposekvenssin motiiveihin, jotka ovat osa ECM:n proteiineja tai toisen solun pintaproteiineja. Ihmisen integriinit voidaankin karkeasti luokitella niiden ligandien perusteella kollageenia, laminiinia ja RGD-motiivia (arginiini-glysiini-asparagiinihappo) sitoviin reseptoreihin sekä leukosyyttireseptoreihin. Solun sisäpuolelle jäävät integriinialayksiköiden C-terminaaliset hännät, ja ne puolestaan kiinnittyvät useista proteiineista koostuvan kompleksin avulla solun tukirankaan. Esimerkkeinä tällaisista adapteriproteiineista voidaan mainita taliini ja vinkuliini. Integriini  $\beta$ 4:ä lukuun ottamatta C-terminaaliset hännät ovat lyhyitä: alle 75 aminohapon mittaisia. Integriinialayksikön transmembraaninen domeeni läpäisee solukalvon vain kerran, joten suurin osa yli 1600 aminohapon mittaisesta alayksiköstä on solun ulkopuolella. (Hynes 2002; Takada ja muut 2007; Alberts ja muut 2014.)



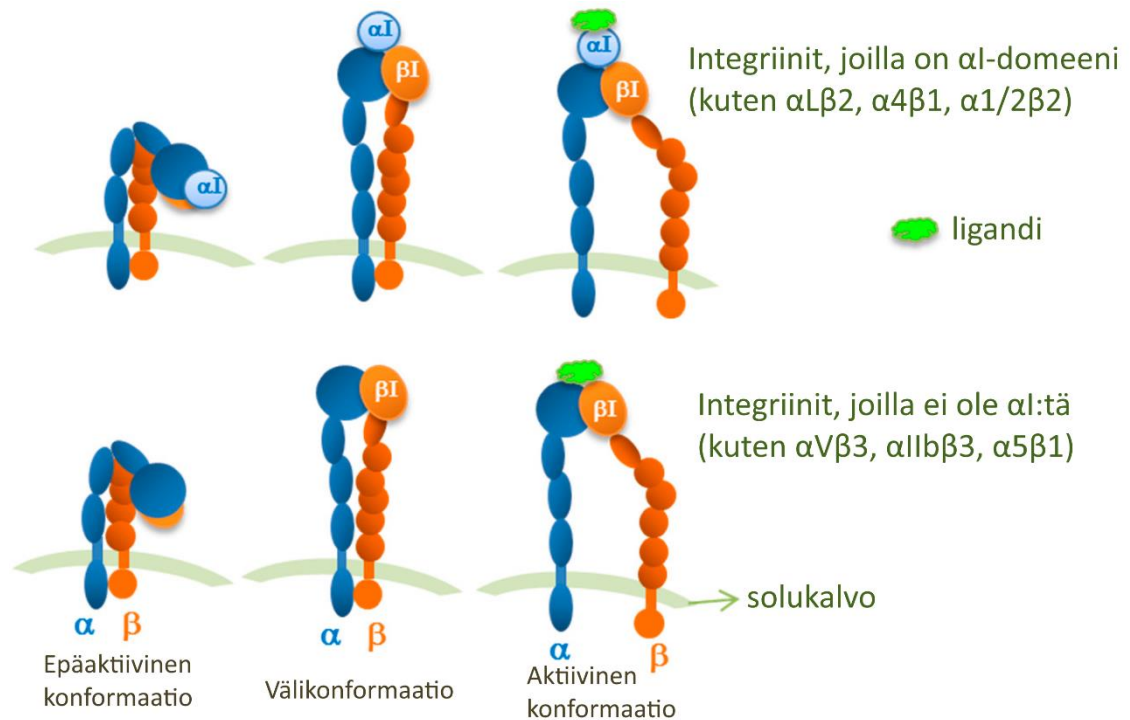
**Kuva 1. Ihmisen integriinien  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alayksiköt ja niiden pariutuminen keskenään. Integriinireseptoreja on ihmisessä yhteensä 24. (Piiretty kuvan Takada ja muut 2007 perusteella.)**

### 1.1.1 Integriinien kaksisuuntainen signalointi

Jotta integriinit voisivat oikea-aikaisesti suorittaa lukuisia tehtäviään solussa, niiden aktiivisuuden on oltava säädeltävissä. Tätä varten on erilaisia konformaatioita, joilla on vaihteleva kyky muodostaa sidoksia solun sisä- ja ulkopuolella. Integriinireseptorit eivät siis jatkuvasti ole sitoutumiskykyisiä, vaan ovat usein epäaktiivisessa tilassa. Tällöin C-terminaaliset hännät ovat kiinnittyneet, ja niillä on vain pieni affiniteetti solutukirankaan yhdistäviin proteiineihin. Solun ulkoiset osat ovat taas laskostuneet tiiviisti, joten ne eivät voi sitoutua ECM:ään. Aktiivisessa tilassa sytoplasman puoleiset hännät ovat irrallaan, ja integriinin jalat suoristuvat ja pääosat avautuvat (kuva 2). Näin integriinin molemmat päät kykenevät sitomaan ligandejaan suurella affiniteetillä. Tätä muutosta kutsutaan usein integriinin aktivoitumiseksi. Näiden konformaatioiden lisäksi tunnetaan välikonformaatio, jossa reseptori on jo suoristunut, mutta jalkaosat ovat edelleen rinnakkain. (Takagi ja muut 2002; Luo ja muut 2007; Alberts ja muut 2014.)

Aktiivisen ja epäaktiivisen tilan vaihtelu on pohjimmiltaan integriinien tapa välittää signaaleja, ja tämä voi tapahtua kahteen suuntaan. Sisältä ulos - signaloinnissa (engl. *inside-out signaling*) solun sisäiset signalointireitit aktivoivat erityisesti taliinia. Se sitoutuu  $\beta$ -alaysikköön ja murtaa integriinialaysikköiden solunsisäisen vuorovaikutuksen (Ye ja muut 2010). Kindliini-niminen proteiini kiinnittyy myös  $\beta$ :aan ja avustaa taliinia, jotta integriinireseptori aktivoituisi (Montanez ja muut 2008). Kun  $\alpha$ :n ja  $\beta$ :n solunsisäisten häntien välinen suolasilta (engl. *salt bridge*) hajoaa, koko integriinin konformaatio muuttuu. Näin integriinin affiniteetti myös solun ulkoisia ligandeja kohtaan kasvaa. (Alberts ja muut 2014.)

Myös solun ulkopuoliset ligandit voivat aktivoida integriinireseptorin, ja tällöin on kyseessä ulkoa sisään -signaali (engl. *outside-in signaling*). Ligandin heikko kiinnittyminen pakottaa integriinin aktiiviseen korkean affiniteetin konformaatioon (kuva 2). Tämä vapauttaa myös sitoutumiskohtat soluliman puolella, jolloin adapteri- ja signaalintiproteiinit voivat vuorovaikuttaa reseptorin kanssa. Näin solu reagoi ympäröivään ECM:ään ja luo edellytykset mekaanisen voiman käytölle sekä integriinien välittämälle solunsisäiselle signaalinnille.



**Kuva 2. Integriinireseptorien kolme konformaatiota.** Alayksiköiden häntien välinen vuorovaikutus lukitsee integriinin epäaktiiviseen tilaan. Kun liitos murtuu, reseptori siirtyy välikonformaation kautta aktiiviseen asentoon. (Muokattu kuvasta Tolomelli ja muut 2017, joka on avoimen saatavuuden alainen.)

### 1.1.2 Integriinit ja solujen kiinnittyminen ympäristöönsä

Yksittäiset integriinit sitoutuvat ECM:ään varsin heikosti, joten niiden on oltava osa suurempaa kokonaisuutta, jotta solu voi kiinnittyä ympäristöönsä tukevasti. Integriinipohjaisten adheesioiden koko, sijainti ja morfologia vaihtelevat runsaasti erilaisissa soluissa ja ympäristöissä. Kun yksittäiset integriinit aktivoituvat, ne alkavat kerääntyä yhteen ja muodostaa erilaisia

”adheesiokeskittymiä”. Lyhytikäiset ja pistemäiset fokaalikompleksit (engl. *focal complex*) voivat joko purkautua tai kehittyä kypsiksi fokaaliadheesioiksi (engl. *focal adhesion*). Molempia muodostuu erityisesti lamellipodi-ulokkeisiin (engl. *lamellipodium*). Pitkät säiemäiset adheesiot (engl. *fibrillar adhesion*) syntyvät ECM-säikeiden yhteyteen, ja niitä esiintyy pääasiassa solun keskiosissa. Lisäksi tunnetaan pienet sylinterimäiset podosomit, joita löytyy muun muassa makrofageista ja osteoklasteista. Ne ovat tyypillisiä myös pahanlaatuisille soluille, jolloin puhutaan invadopodeista. Integriinien ECM-adheesiot ovat siis monimuotoisia, ja niiden rakenteet ovat hyvin dynaamisia. Erityisesti ”klassisten” fokaaliadheesioiden koostumusta ja tehtäviä on tutkittu laajasti. (Geiger ja Yamada 2011.)

Esimerkiksi liikkuvan solun johtavalla reunalla (engl. *leading edge*) ECM-adheesion muodostuminen alkaa fokaalikompleksista. Tämä muutaman sadan proteiinin kokonaisuus sisältää muun muassa integriinejä, taliinia ja paksilliinia. Vinkuliinin sitoutuu taliiniin, mikä puolestaan kokoaa aktiivisia integriinejä yhteen (Humphries ja muut 2007). Vinkuliini kiinnittyy myös polymerisoituviin aktiinisäikeisiin ja vahvistaa integriinien liitosta tukirankaan. Kypsyminen vaatii vielä muutoksia muun muassa tyrosiinien fosforylaatioissa ja proteiinkoostumuksessa. Tämä on vain yksi esimerkki fokaaliadheesion muodostumiseen ja kasvuun vaikuttavista tapahtumista. Integriiniadheesiot koostuvat reilusti yli sadasta proteiinikomponentista, joita yhdessä kutsutaan integriiniadhesomiksi. Komponenttien välillä tunnetaan yli 700 suoraa vuorovaikutusta, ja ne voidaan jakaa karkeasti teline- sekä säätelyvuorovaikutuksiin (Zaidel-Bar ja muut 2007; Zaidel-Bar ja Geiger 2010). Telineproteiinit muodostavat nimensä mukaisesti rakennelman, joka mekaanisesti kiinnittää integriinin aktiinitukirankaan. Telineproteiinit ovat myös sitoutumisalustoja eri signaalintikomponenteille. Signaalintikomponentit puolestaan muokkaavat adhesomiproteiineja, ja näin mahdollistavat adheesioverkoston paikallisen säätelyn. (Geiger ja Yamada 2011.)

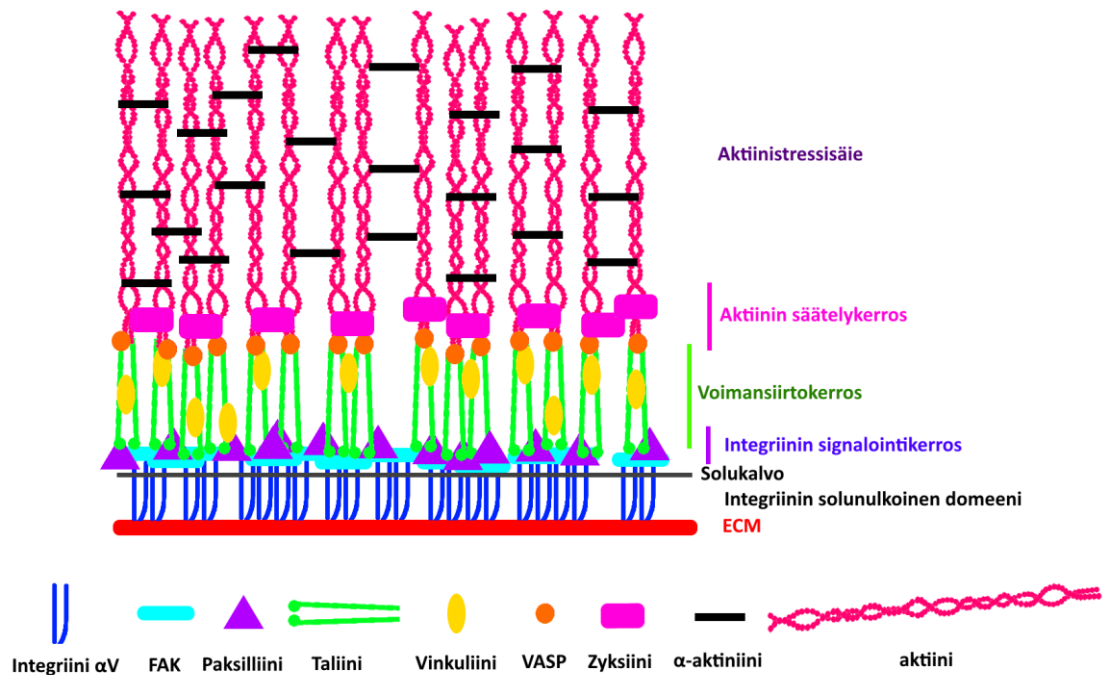
Tuoreemmassa tutkimuksessa integriiniadhesomi laajeni 2412 proteiiniin, joista tarkempi analyysi rajasi 60 proteiinin ”konsensusadhesomin”. Tämä rajattu kokonaisuus on todennäköisesti solun kiinnittymisen ja siihen liittyvän soluviestinnän pääkoneisto. Se puolestaan jakautuu edelleen neljään

keskenään vuorovaikuttavaan signalointiakseliin: ILK–PINCH–kindliini-, FAK–paksilliini-, taliini–vinkuliini- ja  $\alpha$ -aktiniini–zyksiini–VASP-akseli (engl. *integrin-linked protein kinase* eli integriineihin liitetty proteiinikinaasi; engl. *particularly interesting new cystein-histidine-rich protein* eli erityisen kiinnostava uusi kysteini- ja histidiinirikas proteiini; engl. *focal adhesion kinase* eli fokaaliadheesiokinaasi; engl. *vasodilator-stimulated phosphoprotein* eli vasodilaattorin stimuloima fosfoproteiini). Kukin näistä siis yhdistää integriinit aktiinitukirankaan. (Horton ja muut 2015.)

Fokaaliadheesioilla on myös kyky havaita ja reagoida mekaaniseen voimaan, koska ne ovat kiinnittyneet supistumiskykyiseen aktiinitukirankaan. Tukiranka vetää adheesiokohtia solun sisäosia päin, jolloin ECM:n jäykkyydestä riippuu, kuinka suuri venytys fokaaliadheesioon kohdistuu. Muutokset mekaanisessa jännityksessä vaikuttavat ECM-liitoksen molekyylikoostumukseen ja kokoon (Wolfenson ja muut 2011; Kechagia ja muut 2019). Voimanhavaitsemisen takana on useita molekylaarisia mekanismeja (Wolfenson ja muut 2011; Kechagia ja muut 2019). Esimerkiksi taliinin kyky sitoa vinkuliinia kasvaa mekaanisen jännityksen seurauksena, koska venytys avaa taliinin rakennetta, ja vinkuliinin sitoutumiskohdat paljastuvat (del Rio ja muut 2009). Ylimääräisiä aktiinisäikeitä hakeutuu vinkuliinin luokse vahvistaen fokaaliadheesiota. (Alberts ja muut 2014.)

Fokaaliadheesioiden kolmiulotteisesta rakenteesta on ainakin kolme koostumukseltaan ja toiminnaltaan eroavaa kerrosta (Kanchanawong ja muut 2010). Nämä ovat osittain päällekkäisiä ja sijoittuvat integriinien sekä aktiinisäikeiden välillä olevaan noin 40 nm korkeaan tilaan (kuva 3). Lähimpänä solukalvoa on integriinin signalointikerros, jonka tehtävä on välittää viesti ECM-sitoutumisesta eteenpäin solun signalointireitteihin. Fokaaliadheesiokinaasi ja paksilliini ovat hyviä esimerkkejä tämän alueen proteiineista. Keskimmäisenä on voimansiirtokerros, jossa erityisesti taliini ja vinkuliini tukevat integriinien ja aktiinisäikeiden välistä yhteyttä ja voimansiirtoa. VASP:n, zyksiinin (engl. *zyxin*) ja  $\alpha$ -aktiniinin sijoittuminen määrittää viimeisen eli aktiinin säätelykerroksen. Sen tehtävä on vahvistaa aktiinitukirankaa, kun mekaanisen voiman määrä kasvaa (Yoshigi ja muut 2005). Erityisesti taliini vaikuttaisi olevan tärkeä, kun

fokaaliadheesiokerrokset asemoituvat keskenään (Kanchanawong ja muut 2010).



**Kuva 3. Yksinkertaistettu luonnos fokaaliadheesioita molekyylirakenteesta.** Fokaaliadheesioissa on valtava määrä erilaisia proteiineja, mutta ainakin osa niistä asettuu koostumukseltaan ja toiminnaltaan erilaisiin kerroksiin. Kuvassa proteiinien määrät eivät ole stoikiometriset. (Piirretty kuvan Kanchanawong ja muut 2010 perusteella.)

Toinen merkittävä merkittävä proteiinikompleksi, jossa integriniit kiinnittävät solua ECM:ään, on hemidesmosomi. Hemidesmosomien tehtävä on ankkuroida epiteelisolun basaali- eli pohjapuoli tyvikalvon laminiiniin (engl. *laminin*). Ne siis vahvistavat epiteelikudoksen mekaanista kestävyttä. Solukalvon ylittävät proteiiniosat ovat integrini  $\alpha6\beta4$ , tyypin XVII kollageeni BP180 ja CD151, kun taas plektiini ja BP230 yhdistävät kokonaisuuden solutukirankaan. Epiteelisolun sisällä hemidesmosomit tarttuvat välikokoisten säikeiden keratiiniin. Tämän tyypin I hemidesmosomin lisäksi ohutsuolessa esiintyy yksinkertaisempaa tyypin II hemidesmosomia, joka koostuu vain  $\alpha6\beta4$  integrinistä ja plektiinistä. (de Pereda ja muut 2009.)

### 1.1.3 Solujen liikkuminen ja integriinit

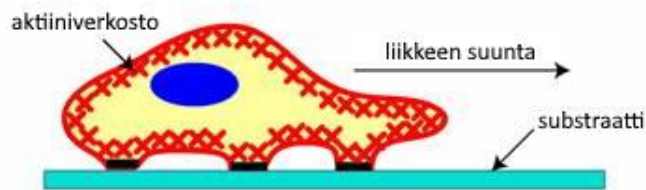
ECM-adheesiot ja näin ollen myös integriinit ovat tärkeitä, kun solu liikkuu (kuva 4). Kaksiulotteisessa ympäristössä tapahtumasarja alkaa johtavan reunan ulostyöntymisestä. Solutyypistä riippuen nämä ulokkeet ovat morfologialtaan ja toiminnaltaan hyvin erilaisia, mutta kaikki sisältävät säiemäistä aktiinia. Esimerkkeinä voidaan mainita piikkimäiset ja käytännössä yksiulotteiset filopodit sekä levymäiset lamellipodit. Ulokkeet muodostuvat spontaanisti tai kemokiinien ja kasvutekijöiden vaikutuksesta. Aktiinisäikeiden polymerisaatio on ensisijainen prosessi, joka työntää johtavan reunan solukalvoa kohti liikesuuntaa. Solukalvo kuitenkin vastustaa puskevaa voimaa, joten säieverkoston on oltava valmiiksi kiinnittynyt ECM:ään fokaaliadheesioiden välityksellä. Näin aktiini ei liu'u taaksepäin polymerisaation seurauksena, ja säikeiden taaksepäinvirtausnimistä ilmiötä (engl. *retrograde flow*) ei pääse tapahtumaan. (Friedl ja Wolf 2003; Huttenlocher ja Horwitz 2011.)

Kun uloke on muodostunut, sen on niin ikään muodostettava kiinnitys ECM:ään adheesiomolekyylien avulla. Aluksi syntyy lyhytikäisiä adheesioita, jotka hajoavat tai kypsyvät aktiinipolymerisaation ja myosiini II:n toiminnan seurauksena. Myosiini II niputtaa säikeitä yhteen ja antaa niille supistumiskyvyn, joka mahdollistaa aktiinisäikeiden liikuttelun suhteessa toisiinsa. Molemmat ominaisuudet ovat tarpeellisia adheesioiden kypsymiselle (Vicente-Manzanares ja muut 2009). Aktomyosiinin supistuminen synnyttää myös solun liikkumiseen tarvittavan voiman. Jännittyminen vetää solun osia kohti fokaaliadheesioita ja lyhentää solun pituutta erityisesti takaosista. Samanaikaisesti solun vetäytyvällä reunalla (engl. *trailing edge*) solu irtoaa väliaineesta, kun ECM-integriini- tai integriini-tukirankaliitokset purkautuvat. Prosessissa integriinit voivat irrota adheesioista ja pysyä sitoutuneena väliaineeseen, jolloin solu jättää ne taakseen ”integriinijalanjälkinä”. (Friedl ja Wolf 2003; Huttenlocher ja Horwitz 2011.)

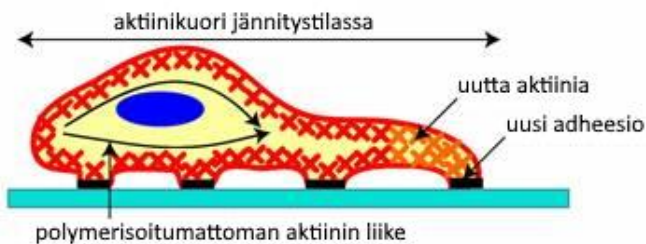
Solun liikkumisen kannalta on välttämätöntä, että sen etu- ja takaosat eroavat toiminnaltaan ja rakenteeltaan toisistaan eli polarisoituvat. Solun tukirangan säätely on keskeisessä asemassa polarisaatioon liittyvissä tapahtumissa. Erilaiset solunulkoiset ja -sisäiset signaalit yhdistyvät Rho-proteiiniperheen

pienissä guanosiinitrifosfaatteja (GTP) sitovissa proteiineissa (GTPaasit), joita ovat Cdc42, Rac ja Rho. Nämä kytkimen tavalla toimivat säätelyproteiinit aktivoituvat, kun niiden sitoma guanosiinidifosfaatti (GDP) vaihtuu GTP:ksi. Tätä reaktiota katalysoivat lukuiset guaniininukleotidin vaihtotekijät (engl. *guanine nucleotide exchange factor*, GEF). Rho GTPaasit ovat tärkeitä adheesioiden, solun tukirangan ja liikkumisen säätelijöitä. (Ridley ja muut 2003; Alberts ja muut 2014.)

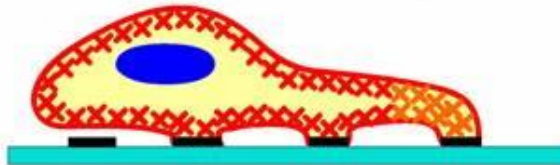
### 1) Johtavan reunan työntyminen



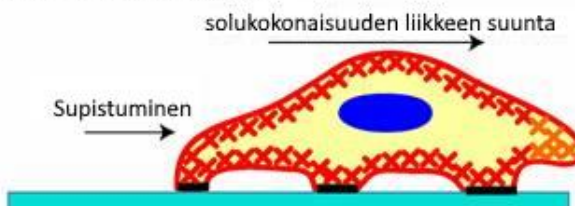
### 2) Adheesio johtavalle reunalle



### Adheesio irrottautuminen vetäytyvällä reunalla



### 3) Solukokonaisuuden liike



**Kuva 4. Luonnos solun liikkumisen vaiheista kaksisolteisessa ympäristössä.** Solu muodostaa ulokkeen etenemissuuntaansa, ja kiinnittyy tämän avulla ECM:ään. Solu siirtää itseään eteenpäin supistamalla tukirankaansa ja samalla purkaa takaosissa olevia vanhoja adheesioita. (Muokattu kuvasta Ananthakrishnan ja Ehrlicher 2007, joka on avoimen saatavuuden alainen.)



Aktiivisena Cdc42 ja Rac lisäävät aktiinin polymerisoitumista muun muassa Wiskott–Aldrich-syndroomaproteiinin (engl. *Wiskott–Aldrich syndrome* protein, WASp) kautta. GTPaasi lukitsee WASp:n avoimeen konformaation, jolloin se kykenee sitoutumaan aktiiniin liittyvä proteiini 2/3 -kompleksiin (engl. *actin-related protein 2/3 complex*, Arp 2/3), mikä voimistaa aktiinihaarojen syntymistä (Campellone ja Welch 2010). Cdc42 on liitetty filopodien ja Rac lamellipodien muodostumiseen. Cdc42 ja Rho taas säätelevät formiineja, joiden tehtävä on pidentää aktiinisäikeitä (Campellone ja Welch 2010). Rho:n aktivoituminen myös stabiloi kyseisiä filamentteja ja lisää myosiinin kevytketjun (engl. *myosin light chain*, MLC) fosforylaation määrää. MLC:n kohonnut fosforylaatio johtaa myosiinin II -välitteiseen supistumiseen solussa. (Ridley ja muut 2003; Huttelocher ja Horwitz 2011.)

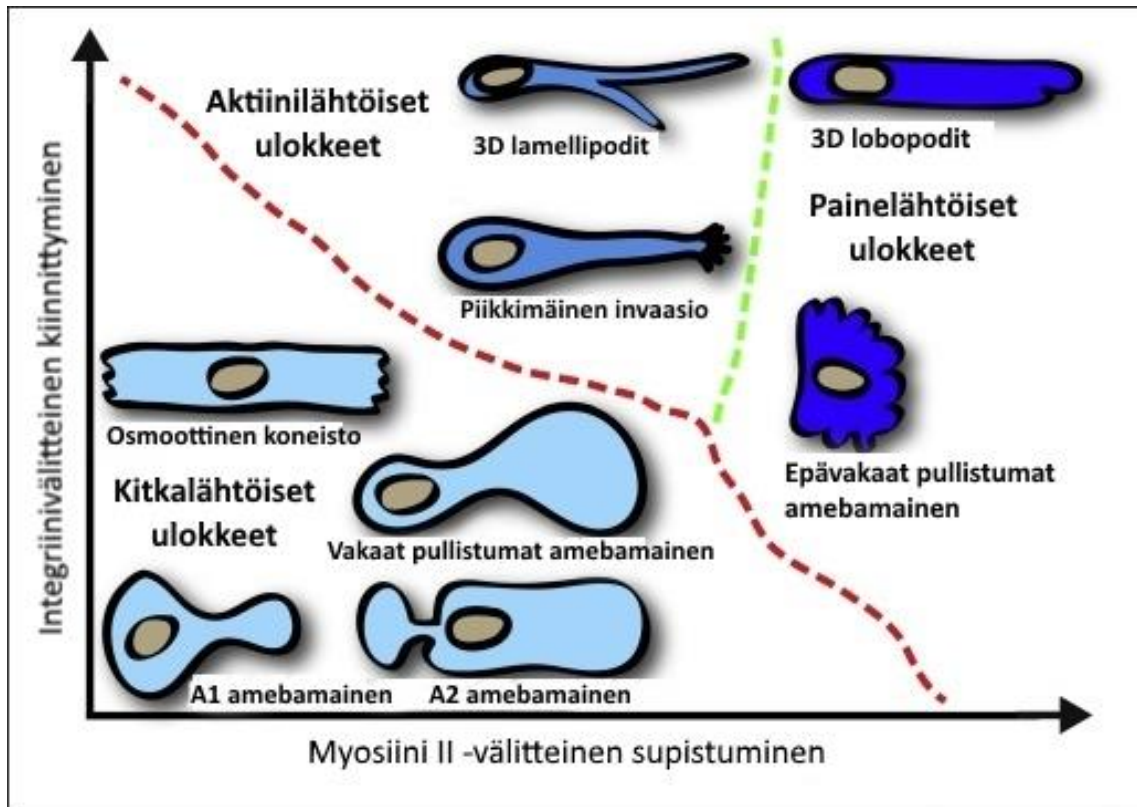
Esimerkiksi kemotaksian (engl. *chemotaxis*) kontekstissa aktiivisen Rac:n ja Rho:n jakautuminen solussa määrittää solun etu- ja takaosan. Lyhytikäisen fosfatidyylinositoli-3,4,5-trisfosfaatin (engl. *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* PIP<sub>3</sub>) määrä kasvaa paikallisesti johtavalla reunalla, kun solu havaitsee kohonneen kemoatraktanttikonentraation (engl. *chemoattractant*) G-proteiinikytketyllä reseptorillaan. Fosfataasi- ja tensiinihomologi (engl. *phosphatase and tensin homolog*, PTEN) defosforyloi tämän signaalintimolekyylin nopeasti, mutta sen ilmentyminen on rajoittunut solun sivuille ja takaosaan. PIP<sub>3</sub> aktivoi Rac:iä, mikä johtaa ulokkeiden muodostumiseen johtavalle reunalle. Sama G-proteiinikytketty reseptori aktivoi Rho:ta G<sub>12</sub>- ja G<sub>13</sub>-proteiinien kautta. Koska Rho:n ja Rac:n toiminnat inhihoivat toisiaan, Rac on aktiivinen solun etuosissa ja Rho solun sivuilla ja takaosassa. (Ridley ja muut 2003; Alberts ja muut 2014.) Lisäksi PIP<sub>3</sub> paikallistaa Cdc42 aktiivisuuden solun etuosaan, mikä myös rajaa PTEN:n pois ulokkeista (Li ja muut 2003). Näin ulokkeiden muodostuminen ja myosiinin supistuminen tapahtuvat eri puolilla solua.

Aktiinitukirangan lisäksi niin ikään mikrotubulukset ja välikokoiset säikeet vaikuttavat solun polarisoitumisen ja liikkumisen säätelyyn. Mikrotubulukset osallistuvat ulokkeiden syntymiseen ja säätelevät adheesioiden muodostumista, kypsymistä sekä purkamista. Erityisesti solun yhtämittäinen ja kohdistettu liike riippuu pääosin mikrotubulusverkoston polarisoitumisesta. (Etienne-Manneville

2013.) Välikokoisten säikeiden koostumukset vaihtelevat runsaasti, joten myös niiden vaikutukset migraatioon ovat erilaiset (Leduc ja Etienne-Manneville 2015). Ne osallistuvat solun liikkeen eri vaiheisiin yhdessä mikrotubulusten ja aktiinisäikeiden kanssa. Esimerkiksi tyypillistä mesenkymaalisten solujen merkkiproteiinia vimentiniä tarvitaan, kun epiteelisolut sulkevat haavan (Rogel ja muut 2011).

Kolmiulotteisessa ECM-ympäristössä, kuten dermiksessä, solujen liikkuminen on merkittävästi erilaista verrattuna kaksiulotteiseen migraatioon. Aiemmin tässä luvussa kuvattua PIP<sub>3</sub>:n ja aktiivisten Rho GTPaasien polarisoitumista ei välttämättä tarvita, kun mesenkymaaliset solut liikkuvat kolmiulotteisessa ECM:ssä käyttäen apunaan integriinejä (Petrie ja muut 2012). Solut voivat myös liikkua kolmiulotteisessa kudoksessa amebamaisesti, valkosolun tai alkueläimen tavoin pujotellen. Tässä tapauksessa integriiniadheesiot eivät aina ole tarpeellisia (Lammermann ja muut 2008). Migraatio voi olla huomattavasti nopeampaa ja liikesuunta suurempi (Fraley ja muut 2010). Kaiken kaikkiaan solujen liikkumisesta tulee hyvin monimuotoista, ja erillisiä migraatiomekanismeja on useita kolmiulotteisessa ympäristössä (Petrie ja Yamada 2016). Yksittäisillä soluilla on jopa kyky vaihtaa liikkumismekanismiaan, mitä kutsutaan migratoriseksi plastisuudeksi (engl. *migratory plasticity*). Nämä vaihdokset ovat seurausta ECM-ympäristön tai liukoisten signaalien muuttumisesta (Petrie ja Yamada 2016). Migraatiomekanismin vaihtuminen on niin nopeaa, että se ei luultavasti johdu muutoksista proteiinien ekspressioissa, vaan migraatioproteiinien uudelleenjärjestäytymisestä (Petrie ja muut 2012; Petrie ja muut 2016).

Solujen liikkumistapoja voidaan luokitella myös solu-ECM-adheesioiden voimakkuuden ja aktomyosiinin supistumisen perusteella (kuva 5). Toistaiseksi vain ihmisen primäärysten fibroblastien tiedetään hyödyntävän kaikkia tunnettuja liikkumismekanismieja (Petrie ja Yamada 2016). Tosin monet syöpäsolutkin ovat migraation suhteen erittäin plastisia. Luultavasti migraatiotapa valikoituu kolmiulotteisessa ympäristössä pääosin niin, että tuman liikuttaminen on mahdollisimman helppoa (Petrie ja Yamada 2016). Tuma on suuri ja jäykkä, joten sen liikuttelu ahtaassa ECM-ympäristössä on usein migraationopeutta rajoittava vaihe.



**Kuva 5. Yksittäisten solujen liikkumismekanismit kolmiulotteisessa ympäristössä.** Migraatiotavan valintaan luultavasti vaikuttaa integriniadheesioden määrä ja aktomyosiinin supistuminen. Liikkumismekanismeja voidaan karkeasti jaotella myös sen perusteella, miten liikkuvat ulokeosat syntyvät: paineen, aktiinisäikeiden vai kitkan tuottamana. (Muokattu kuvasta Petrie ja Yamada 2016. Kuvan käyttämiseen ja kääntämiseen on saatu lupa.)

#### 1.1.4 Integriinit solun jakautumisen, erilaistumisen ja selviytymisen säätelyssä

Kun tarkastellaan integriinien rakennetta, sijoittumista ja toimintaa, niiden osallistuminen solujen kiinnittymiseen ja liikkumiseen on hyvinkin intuitiivista. Näiden luvuissa 1.1.2 ja 1.1.3 tarkasteltujen prosessien lisäksi integriinit vaikuttavat suuresti myös muihin merkittäviin tapahtumiin solussa. Seuraavaksi tarkastellaan lyhyesti integriinejä solujen jakautumisen, erilaistumisen ja selviytymisen säätelyssä.

Proliferaatio on tarkkaan säädelty prosessi, jonka tehtävä on taata oikea-aikainen ja hallittu solun jakautuminen. Jotta solu voi edetä ensimmäisen G1-tarkastuspisteen ohi solusyklissä, se vaatii ympäristöstään viestiä suotuisista olosuhteista. Tarvitaan signaali sekä soluväliaineesta integriinien välityksellä että liukoisista kasvutekijöistä tyrosiinikinaasireseptorien kautta (Assoian ja Schwartz 2001). Nämä kaksi reseptorityyppiä ohjaavat yhteistyönä solun ulkoisten signaalien säätelemää kinaasia eli ERK:iä (engl. *extracellular signal-regulated kinase*), Rho-GTPaaseja ja G1-faasin sykliiniriippuvaisia kinaaseja (Assoian ja Schwartz 2001). Integriinidheesiot vaikuttavat siis solusykliin erityisesti ennen DNA:n replikoitumista, mutta integriinejä tarvitaan myös sukkularihmaston oikeanlaisen asettautumiseen (Humphries ja muut 2019). ECM-adheesioilla epäillään olevan yhteyksiä muihinkin solusyklin tarkastuspisteisiin (Humphries ja muut 2019).

Integriinit vaikuttavat osaltaan myös kantasolujen erilaistumiseen. Ympäröivän ECM:n jäykkyys ohjaa kantasolut erilaistumaan tarvittaviksi kudostyypeiksi, ja tätä ympäristön ominaisuutta solu aistii fokaalidheesiodien sekä solutukirangan yhteistyönä (Lv ja muut 2015). Tällaista mekaanisten signaalien muuttamista biokemialliseksi vasteeksi kutsutaan mekanotransduktioksi (engl. *mechanotransduction*). Esimerkiksi kindliini-2-proteiini säätelee mesenkymaalisen kantasolun erilaistumista osteoblastiksi tai adiposyytiksi (Guo ja muut 2018). Tämä tapahtuu:n YAP1- ja TAZ-proteiinien sekä näiden mRNA:iden tasoja muuttamalla, ympäristön jäykkyyden mukaan (engl. *Yes-associated protein 1* eli Yes:iin liitetty proteiini 1; engl. *transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* eli transkriptiokoaktivaattori PDZ:a sitovalla motiivilla). Kindliini-2 on integriineihin ja aktiiniin sitoutuva proteiini, joka osaltaan myös ohjaa näiden toimintaa (Montanez ja muut 2008; Bledzka ja muut 2016; Guo ja muut 2018). Toisena esimerkkinä voidaan mainita, että integriinit kykenevät vaikuttamaan epiteelisolujen erilaistumiseen Notch-signaalintireittiä säätelemällä (Gómez-Lamarca ja muut 2014).

Erityisen tärkeitä integriinit ovat epiteeli- ja endoteelisoluille, sillä ECM-liitosten irtoaminen saa niissä aikaan ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin (Pan ja muut 2016). Apoptoosista, joka johtuu ECM-kiinnitysten puutteesta, käytetään myös nimitystä "anoikis" (Frisch ja Ruoslahti 1997). Integriinit siis edistävät

eräiden solutyypin selviytymistä, ja tämä tapahtuu säätelemällä tiettyjä proapoptoottisia proteiineja AKT- (engl. *protein kinase B*, proteiinikinaasi B), PI3K–AKT- (engl. *phosphatidylinositol 3-kinase*, fosfatidyylinositoli-3-kinaasi) ja ERK-signalointireittien kautta (Naci ja Aoudjit 2014; Pan ja muut 2016).

## 1.2 Syöpä

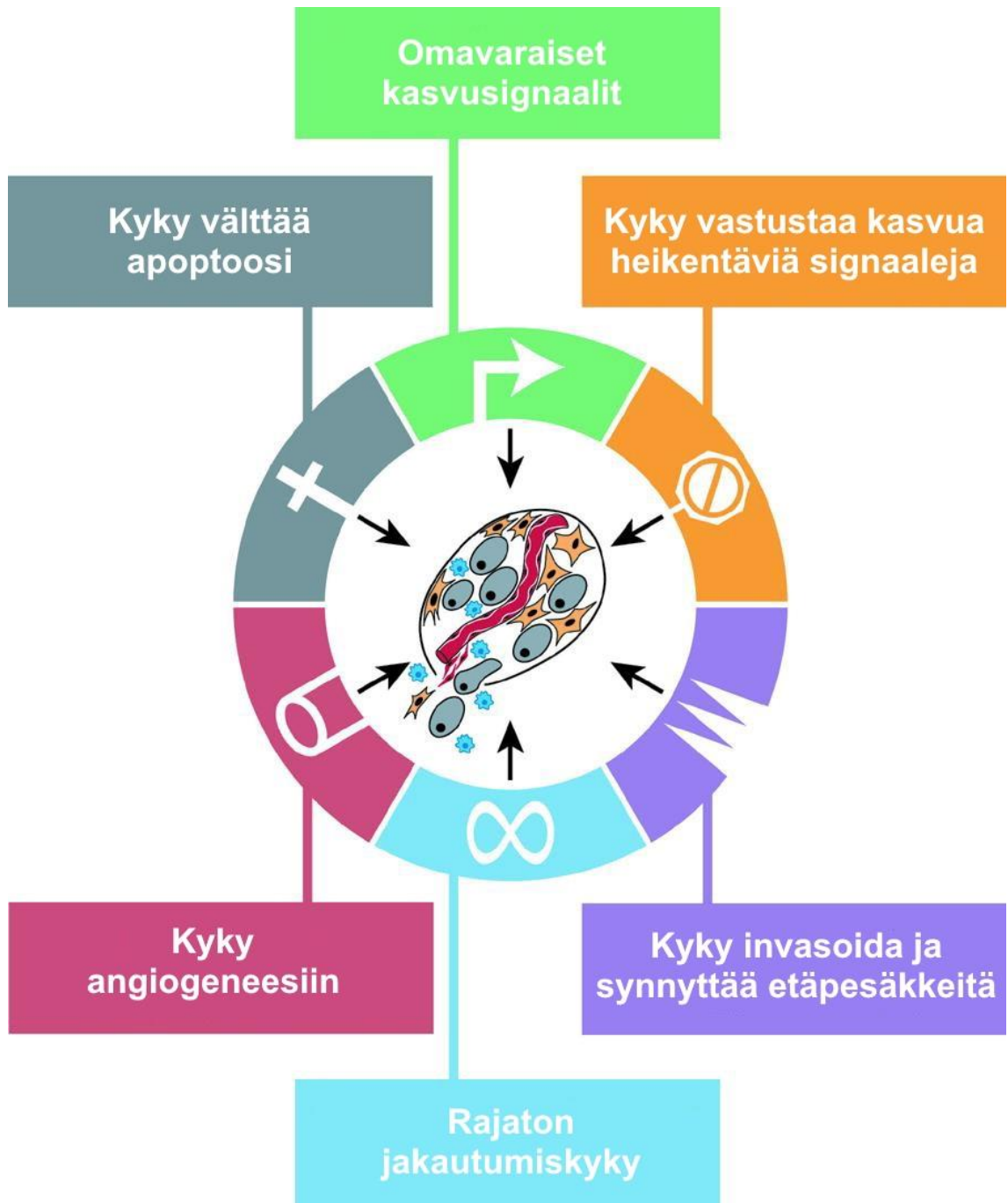
Vuonna 2017 noin joka viides kuolemantapaus Suomessa johtui kasvaimista, ja ne olivat toiseksi yleisin kuolinsyy (Suomen virallinen tilasto 2017). Syöpä aiheuttaa maailmanlaajuisesti mittavaa kärsimystä, joten luonnollisesti se on ollut vuosikymmeniä merkittävä tutkimuskohde. Suurista ponnistuksista huolimatta vuonna 1971 julistettu sota syöpää vastaan jatkuu edelleen (Sporn 1996). Vaikka syöpää usein käsitellään yhtenä kokonaisuutena, se on todellisuudessa hyvin monimuotoinen joukko eri tavalla käyttäytyviä sairauksia.

Monisoluisessa eliössä solujen päämäärä on yhteistyönä varmistaa sukusolujen selviytyminen ja mahdollistaa eliön lisääntyminen (Alberts ja muut 2014). Tätä varten solut ovat pitkälle erikoistuneita eri tehtäviin ja kontrolloivat toistensa toimintaa viestimällä keskenään. Syöpäsolut eroavat normaaleista soluista siinä, että ne kapinoivat tavallista soluviestintää vastaan (Alberts ja muut 2004). ”Kapina” saa alkunsa satunnaisista mutaatioista, joista pieni osa mahdollistaa muutokset solun käyttäytymisessä. Syövän kannalta oleellisimpia ovat proto-onkogeeneit ja tuumorisuppressorigeeneit. Tavallisen ja tarpeellisen proto-onkogeenin aktiivisuuden lisääntyminen ajaa solua kohti syöpää, jolloin sitä nimitetään onkogeeniksi. Vastaavasti mutaatiot tuumorisuppressorigeenissä aiheuttaa sen resessiivisen toiminnan heikentymisen tai loppumisen, mikä jälleen edistää syövän kehittymistä. Sattumalta johonkin soluun muodostuu jonkinlainen kokoonpano syövän kannalta hyödyllisiä mutaatioita, ja kasvain alkaa kehittyä. Kasvaimen sisällä hyödyllisimmät mutaatiot saaneet solut pystyvät lisääntymään parhaiten, jolloin syövän kehittyminen alkaa muistuttaa luonnonvalinnan kaltaista kilpailua. Näin hyvänlaatuisen kasvaimen solut jalostuvat ja hiljalleen kehittävät uusia ominaisuuksia. Lopulta syöpäsolut kasvavat ja jakautuvat hallitsemattomasti sekä siirtyvät väärille alueille elimistössä. Kasvainta aletaan kutsumaan varsinaiseksi syöväksi, kun siitä tulee

pahanlaatuinen. Lisäksi monet kasvaimet, kuten rintasyöpä, jaetaan paikallisiin in-situ kasvaimiin ja invasiivisiin kasvaimiin. Jälkimmäisessä tapauksessa syöpäsolut ovat tunkeutuneet tyvikalvon läpi ympäröivään kudokseen ja kykenevät siirtymään verenkierron mukana muihin kehon osiin. Näin syntyviä sekundaarisia kasvaimia kutsutaan etäpesäkkeiksi. Ne aiheuttavat 90 prosenttia syöpäkuolemista (Sporn 1996; Lambert ja muut 2017).

### **1.2.1 Syövän olennaiset ominaisuudet**

Syövän syntymistä ja hoitamista käsittelevä tieteellinen kirjallisuus on kasvanut viime vuosikymmeninä valtavaksi. Vuonna 2000 Hanahan D. ja Weinberg R. A. aloittivat tämän tietomäärän kokoamisen ja käsitteellistämisen tietyiksi periaatteiksi, joita he nimittivät syövän perusominaisuuksiksi (Hanahan ja Weinberg 2000). Nämä ominaisuudet ovat yhteisiä lähes kaikille syöpätyypeille, joten niiden muodostuminen on luultavasti olennaista syövän syntymiselle (Hanahan ja Weinberg 2000). Näin ollen kyseisten ominaisuuksien ymmärtäminen on erittäin hyödyllistä sekä syövän tutkimisen että hoidon kannalta. Alkuperäisessä julkaisussa esiteltiin kuusi syöväälle kriittisen tärkeää ominaisuutta: omavaraiset kasvusignaalit, kyky vastustaa kasvua heikentäviä signaaleja, kyky invasoida kudoksiin ja synnyttää etäpesäkkeitä, rajaton jakautumiskyky, kyky angiogeneesiin sekä kyky välttää apoptoosi (kuva 6). Vuosikymmen myöhemmin sama parivaljakko palasi aiheen äärelle. Päivitysten lisäksi he laajensivat näitä kuutta kriittisen tärkeää ominaisuutta kahdella orastavalla ominaisuudella: energia-aineenvaihdunnan uudelleenjärjestäminen ja immuunijärjestelmän väistäminen (Hanahan ja Weinberg 2011). Samassa yhteydessä esiteltiin myös kaksi kriittisiä ominaisuuksia tukevaa erityispiirrettä: perimän epävakaas ja kasvaimia suosiva tulehdustila (Hanahan ja Weinberg 2011).



**Kuva 6. Syövän olennaiset ominaisuudet.** Hanahan ja Weinberg ovat koonneet syöpään liittyvää tutkimustietoa, ja muodostaneet sen pohjalta kuusi syövän perusominaisuutta. Näiden ominaisuuksien kehittyminen on luultavasti välttämätöntä kaikkien syöpien syntymiselle. (Muokattu kuvasta Hanahan ja Weinberg 2000. Kuvan käyttämiseen ja kääntämiseen on saatu lupa.)

### 1.2.2 Syöpä ylläpitää kasvusignaaleja

Elimistössä solujen lisääntymistä säädellään hyvin tarkasti erilaisilla kasvusignaaleilla, jotka ovat tavallisten solujen jakautumiselle välttämättömiä (Alberts ja muut 2014). Tällaisessa biokemiallisessa kontrollissa syöpäsoluille perustavanlaatuinen käyttäytyminen, hallitsematon jakautuminen, ei ole mahdollista, vaan syövän kehittyminen estyy. Tätä varten syövän on jollain tavalla ylläpidettävä kasvusignalointia ja toisaalta vastustettava kasvua heikentäviä signaaleja. Terveen kudoksen mitogeenisestä signaloinnista tiedetään vielä suhteellisen vähän, mutta syövän kontekstissa tutkimus on edennyt pidemmälle (Hanahan ja Weinberg 2011).

Syöpäsoluista on löydetty useita tapoja, joilla ne saavuttavat omavaraisuuden suhteessa proliferaatiosignaaleihin. Ensinnäkin syöpäsolut voivat alkaa itse valmistaa tarvitsemiaan mitogeenejä ja ilmentämään vastaavia reseptoreja, jolloin ne ylläpitävät proliferaatiota autokriinisesti (Hanahan ja Weinberg 2011). Toinen tätä muistuttava strategia on kasvaimen strooman tavallisten solujen manipuloiminen, jotta nämä alkaisivat valmistaa erilaisia mitogeenejä (Hanahan ja Weinberg 2011). Syöpäsolut siis kykenevät aktivoimaan terveitä naapureitaan aloittamaan parakriinisen signaloinnin. Kasvainsolut eivät aina tarvitse lisääntynyttä mitogeenituotantoa, vaan ne voivat kompensoida mitogeenien vähäisyyttä myös yliekspressoimalla jakautumiseen tarvittavia reseptoreja (Hanahan ja Weinberg 2011). Tällöin pienikin määrä ligandia riittää käynnistämään erittäin herkiksi muuttuneet signalointireitit. Tästä tyypillinen esimerkki on ihmisen epidermaalisen kasvutekijäreseptori 2:n (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2) yliekspressio 20–25 prosentissa rintasyöivistä (Puglisi ja muut 2016). Lisäksi syöpäsolut voivat kokonaan kiertää mitogeenin tarpeensa, jos ne onnistuvat saamaan oikeanlaisen mutaation johonkin signalointireitin komponenttiin. Rakenteelliset muutokset voivat lukita signalointiproteiinin aktiiviseen tilaan, jolloin tämän komponentin alavirta pysyy jatkuvasti toiminnassa ylävirran aktivoitumisesta riippumatta (Hanahan ja Weinberg 2011). Muut mahdolliset signalointihaarat toimivat lähtökohtaisesti edelleen normaalisti, mikäli muutos ei ole tapahtunut ketjun huipulla eli reseptorissa. Hyvin tunnettu esimerkki tällaisesta lukittautumisesta ovat rasproteiinit, jotka ovat pysyvästi aktiivisessa tilassa noin 25 prosentissa kasvaimista (Hanahan ja Weinberg 2000).



### 1.2.3 Syöpä vastustaa kasvua heikentäviä signaaleja

Syöpäsolujen jatkuva jakautuminen edellyttää myös kasvua heikentävien signaalien tehottomuutta. Niiden tehtävä on ylläpitää terveen kudoksen homeostasiaa ja estää solujen jakautuminen esimerkiksi perimän vaurioitumisen tai epäedullisten olosuhteiden takia (Hanahan ja Weinberg 2011). Tällaisia olosuhteita ovat muun muassa epäoptimaalinen nukleotidi- tai happipitoisuus. Kaksi tyypillistä syöpään liittyvää jakautumisen säätelijää ovat tuumorisuppressorien tuotteet p53 ja retinoblastoomaproteiini (engl. *retinoblastoma protein*, Rb) perheineen. Nämä kaksi ovat keskeisessä asemassa, kun säätelyjärjestelmät valitsevat solun kohtaloa jakautumisen, jakautumisen lopettamisen eli seneskenessin (engl. *senescence*) ja apoptoosin väliltä. Rb ja p53 siis kokoavat proliferaation vastaiset signaalit ja vastaavat solusyklin pysäyttämistä normaaleissa soluissa, joten ei ole yllättävää, että niiden toiminta on useissa syövässä häiriintynyt. Vaikka näiden kahden tuumorisuppressorin merkitys onkin todella huomattava, ne toimivat osana suurempaa kokonaisuutta (Hanahan ja Weinberg 2011). Siis pelkästään Rb:n tai p53:n toimintahäiriö ei riitä aiheuttamaan poikkeavuuksia solun jakautumiskäyttäytymiseen.

### 1.2.4 Syöpä väistää apoptoosia

Kasvaimen kehittymisen aikana solut kohtaavat suuren määrän erilaisia stressi- ja häiriötiloja, jotka terveissä soluissa aiheuttaisivat ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin. Itse asiassa apoptoosin ajatellaan olevan eräs evoluution ratkaisu, jolla se taistelee syövän kehittymistä vastaan (Lowe ja muut 2004). Syövän kannalta oleellisimpia apoptoosia laukaisevia stressitiloja ovat onkogeenisignaloinnin lisääntyminen ja vauriot DNA:ssa. Koska nämä solustressiä aiheuttavat tapahtumat ovat syövän kehittymiselle kutakuinkin välttämättömiä, osan kasvainsoluista on kyettävä väistämään apoptoosi. Tyypillisin tapa on p53-tuumorisuppressorin mutaatio, joka tekee tästä DNA-vaurioita, hapenpuutetta ja onkogeeniaktiivisuutta tarkkailevasta

proteiinituotteesta toimimattoman (Hanahan ja Weinberg 2000). Toimiva p53 kasvattaisi apoptoosia edistävien (engl. *proapoptotic*) proteiinien Noxa ja Puma ilmentämistä, ja johtaisi apoptoosikaskadin aktivoitumiseen (Hanahan ja Weinberg 2011). Toinen yleinen kasvainsolujen keino estää apoptoosi on PI3K–AKT-signaalintireitin manipulointi. Tämän reitti ylläpitää selviytymissignaalia, ja kasvaimissa sitä voidaan yliaktivoida useilla tavoilla (Hanahan ja Weinberg 2000).

### 1.2.5 Syöpä jakautuu hallitsemattomasti

Neljäs syövän olennainen ominaisuus on rajaton jakautumiskyky. Terveillä soluilla on vain rajallinen määrä jakautumiskertoja, minkä jälkeen ne ajautuvat elinkelpoiseen jakautumisen lopettamiseen eli seneskenssiin. Solut, jotka onnistuvat väistämään tämän mekanismin, jatkavat jakautumista ja päätyvät lopulta kriisivaiheeseen (engl. *cellular crisis*). Kriisissä kromosomit muuttuvat epävakaisiksi, ja yleensä se johtaa lopulta solujen autofagiseen kuolemaan (engl. *autophagy*), mutta hyvin pieni osa soluista muuttuu neoplastisiksi eli kasvainmaisiksi (Nassour ja muut 2019). Solut, jotka onnistuvat ohittamaan kriisivaiheen, kykenevät jakautumaan rajattomasti, jolloin niitä kutsutaan immortalisoiduiksi (Hanahan ja Weinberg 2000). Seneskenssin ja kriisin on päätelty olevan solun suoja mekanismeja, joiden tarkoitus on rajoittaa kasvain- ja syöpäsolujen hallitsematonta jakautumista (Hanahan ja Weinberg 2011). Seneskenssi-, kriisi- ja immortalisoitumisprosessien aktivoituminen johtuu kromosomien päissä olevien telomeerien lyhentymisestä. Telomeerit koostuvat kuuden emäsparin jaksosta, joka toistuu peräkkäin jopa tuhansia kertoja. Ne lyhenevät solun jokaisessa jakautumisessa, koska DNA-polymeraasi ei kykene kopioimaan kromosomin 3'-päättä kokonaan. Lyhennyttyään tarpeeksi telomeerit eivät enää pysty suorittamaan tehtäväänsä, eli estämään kromosomien päitä yhdistymästä.

Kyetäkseen jakautumaan rajattomasti, ja selviämään kriisivaiheesta, syöpäsolujen on voitava estää telomeerien lyhentymisen. Suurimmassa osassa syöivistä telomeerejä huoltaa käänteiskopioijaentsyymi telomeraasin yliaktiivisuus (Cesare ja Reddel 2010). Ihmisen telomeraasi syntetisoi telomeeri-

DNA:n päähän lisää kuuden emäsparin mittaisia telomeeritoistojaksoja *de Novo*. Noin 10 prosentissa syövästä taas telomeerien vaihtoehtoinen pidentyminen -mekanismi (engl. *alternative lengthening of telomeres*, ALT) hoitaa ylläpidon (Cesare ja Reddel 2010). ALT pohjautuu homologiseen rekombinaatioon, mutta muuten siitä tiedetään varsin vähän (Sobinoff ja Pickett 2017).

### **1.2.6 Syöpä laajentaa verisuonistoa**

Niin terveeseen solun kuin syöpäsolun täytyy saada ympäristöstään useita erilaisia yhdisteitä, kuten ravintoaineita ja happea, toimiakseen ja elääkseen. Toisaalta niiden on päästävä eroon myös aineenvaihdunnan sivutuotteista. Jotta yhdisteiden vaihto solun ja ympäristön välillä toimisi tehokkaasti, on jokaisen solun oltava lähellä verisuonistoa. Näin ollen kasvaimien on kyettävä muodostamaan uusia verisuonia voidakseen kasvaa vähänkin suuremmiksi (Hanahan ja Weinberg 2000). Tätä verisuonien uudismuodostusta olemassa olevasta suonistosta kutsutaan angiogeneesiksi (Viallard ja Larrivé 2017). Angiogeneesiä säätelee useat viestimolekyylit, joista esimerkiksi verisuonen endoteelin kasvutekijä (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) on merkittävä (Viallard ja Larrivé 2017). Aikuisen terveissä kudoksissa angiogeneesiä ei tapahdu muutamia hetkellisiä poikkeuksia lukuun ottamatta, kun taas syövässä uusia suonia syntyy jatkuvasti (Hanahan ja Weinberg 2011). Kasvaimien verisuonet ovat kuitenkin ominaisuuksiltaan poikkeavia. Suonisto on epäkypsää, kiemuraista, laajentunutta ja läpäisevää, mistä seuraa huono läpivirtaus kasvaimiin (Viallard ja Larrivé 2017). Kehno läpivirtaus ja epätasainen suonien jakautuminen taas synnyttää hapenpuuteesta kärsiviä mikroympäristöjä. Kasvaimen hapenpuute on merkittävä angiogeneesin aktivoitumisen aiheuttaja. Onkogeenin tai tuumorisuppressorigeenin mutaatiot myös edistävät angiogeneesiä, sillä tämä muuttaa inhibitoristen ja indusoivien viestimolekyylien tasapainoa (Hanahan ja Weinberg 2000; Viallard ja Larrivé 2017).

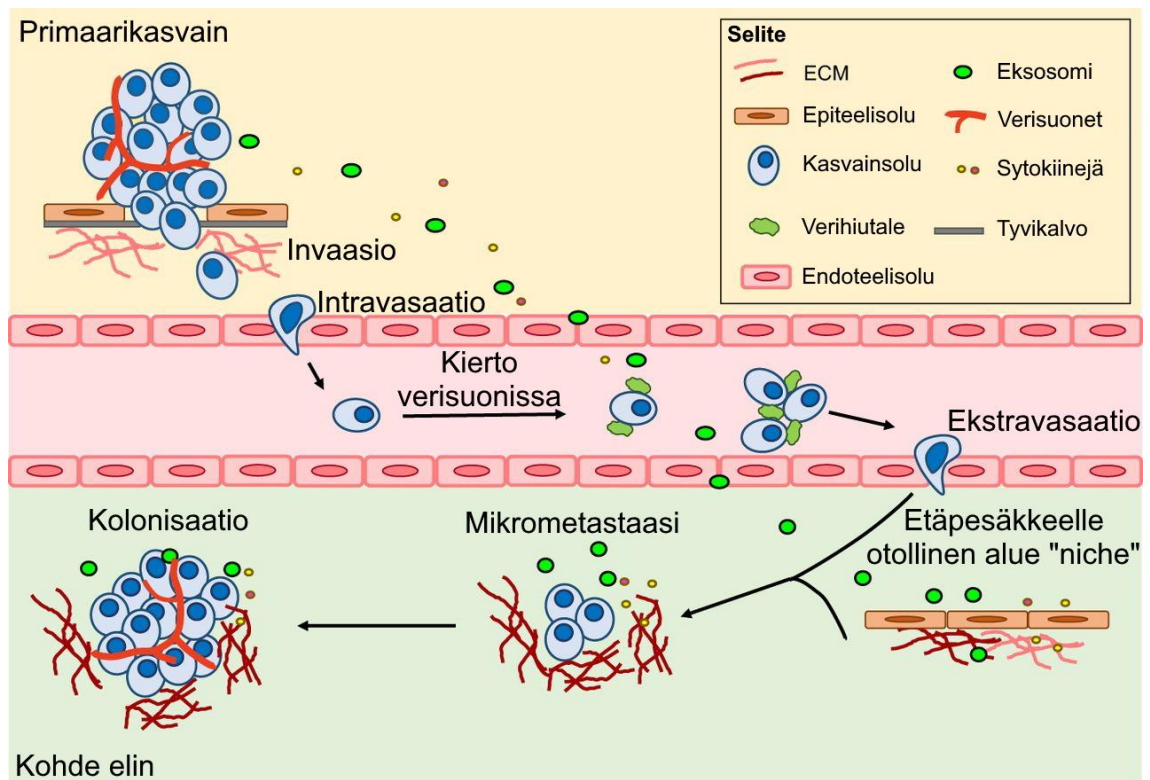
### 1.2.7 Syöpä tunkeutuu uusille alueille

Yleensä syövän on kyettävä siirtymään syntypaikastaan uusille alueille, jotta se saavuttaa kuolettavuutensa huipun. Kun syöpä alkaa levitä, jokaisen kasvaimen yksittäin poistamisesta tulee lähes mahdotonta. Syövän viimeinen olennainen ominaisuus ”kyky invasoida ja muodostaa etäpesäkkeitä” on monivaiheinen ja melko huonosti tunnettu prosessien sarja (Hanahan ja Weinberg 2011; Alberts ja muut 2014). Etäpesäkkeiden muodostumisen vaiheet voidaan kuitenkin karkeasti jakaa seuraavasti: primaarikasvaimen kehittyminen, syöpäsolujen invasoituminen ympäröivään kudokseen ja veri- tai imusuonistoon, syöpäsolujen siirtyminen suonistossa, syöpäsolujen tunkeutuminen suonistosta ympäröivään kudokseen eli ekstravasaatio sekä mikrometastaasien ja etäpesäkkeiden syntyminen (kuva 7).

Etäpesäkkeiden muodostuminen edellyttää ensinnäkin, että syöpäsolut pystyvät irrottautumaan primaarikasvaimesta, selviämään ja matkustamaan elimistössä. Tätä kokonaisuutta on erityisesti tutkittu karsinoomissa, jotka ovat epiteelisoluista alkavia syöpiä (Lambert ja muut 2017). Karsinoomien metastoituminen riippuu suurelta osin ohjelmasta, jota kutsutaan epiteelis-mesenkymaaliseksi siirtymäksi (engl. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT). EMT on keskeinen prosessi myös alkionkehityksessä ja kudosten korjautumisessa (Thiery ja muut 2009). Epiteelisolut saavat EMT:n seurauksena uusia mesenkymaalisia ominaisuuksia kuten lisääntynyt liikkuvuus, fibroblastimainen morfologia, ECM:ä hajottavien entsyymien ilmentäminen ja solu–solu-liitosten menettäminen (Thiery ja muut 2009; Hanahan ja Weinberg 2011). Nämä piirteet ovat syöpäsolujen invasiivisuuden ja levittäytymisen kannalta olennaisia. EMT:n jälkeen useat karsinoomasolutyyppit voivat myös saada kantasoluille tyypillisiä ominaisuuksia ja kyvyn aloittaa kasvaimia (Lambert ja muut 2017).

EMT:n käynnistyminen johtuu signaaleista, joita karsinoomasolut saavat kasvaimen strooman monimuotoiselta solujen joukolta (Hanahan ja Weinberg 2011; Lambert ja muut 2017). EMT-ohjelmaa ohjaa joukko transkriptiotekijöitä – huomattavia ovat muun muassa Snail, Slug, Twist ja Zeb1 (Lambert ja muut 2017). Usein EMT ei toimi ”kaikki tai ei mitään” -periaatteella vaan epiteelisten

ja mesenkymaalisten piirteiden välisellä jatkumolla (Nieto ja muut 2016; Lambert ja muut 2017). Epiteelisolu siis luopuu vain osasta epiteelisiä ominaisuuksia ja saa joitain mesenkymaalisia piirteitä. Tämän lisäksi EMT ei ole lopullinen prosessi, vaan sillä on myös käänteinen ohjelma eli mesenkymaalis-epiteelinen siirtymä (engl. *mesenchymal-epithelial transition*, MET). MET vaikuttaakin olevan tärkeä vaihe, jotta syntyneet mikrometastaasit voivat kehittyä edelleen eli kolonisoitua (engl. *colonization*) makrometastaaseiksi (Thiery ja muut 2009; Nieto ja muut 2016).



**Kuva 7. Etäpesäkkeiden syntymisen vaiheet.** Syöpäsolujen levittäytyminen ja sekundaarikasvainien muodostuminen ympäri kehoa on monimutkainen ilmiö. Se voidaan kuitenkin jaotella tiettyihin päävaiheisiin, jotka tunnetaan vielä melko huonosti. (Muokattu kuvasta Gómez-Cuadrado ja muut 2017, joka on avoimen saatavuuden alainen.)

EMT:n seurauksena alkava mesenkymaalinen invasointi ei ole ainoa syöpäsolujen keino levittäytyä primaarikasvaimesta ympäröivään kudokseen. Syöpäsoluilla on useita mekanismeitaan ja kokoluokaltaan vaihtelevia liikkumisstrategioita aina yksittäisen solun migraatiosta kollektiiviseen soluryhmien liikkeeseen ja kokonaisten kudosten dynamiikkaan (Friedl ja muut

2012). Erityisesti solujoukkona liikkuminen on monien kasvaintyyppien yleisin invaasiomenetelmä (Friedl ja muut 2012). EMT on joka tapauksessa merkittävä prosessi invasoinnin kannalta, sillä sen epäillään osallistuvan myös solujen kollektiiviiseen migraatioon (Ye ja muut 2015).

Primaarikasvaimen solujen invaasio ympäröiviin kudoksiin johtaa lopulta siihen, että ne saavuttavat verenkierron tai imusuoniston eli intravasoituvat (engl. *intravasation*). Erityisen helposti syöpäsolut pääsevät verenkiertoon kasvainten verisuonien kautta, sillä ne ovat tavallista läpäisevämpiä ja muiltakin ominaisuuksiltaan poikkeavia (Viallard ja Larrivé 2017). Verisuonisto kattaa koko elimistön, joten sitä kautta syöpäsoluille avautuu pääsy kaikkialle elimistössä. Imusuonisto ei luultavasti ole niin merkittävä kasvainsolujen leviämisreitti etäpesäkkeiden muodostumisen kannalta (Lambert ja muut 2017). Kiertävät syöpäsolut ovat verenkierrossa uudessa ympäristössä ja joutuvat selviytymään useista merkittävistä haasteista. Itse asiassa valtaosa ei ikinä selviä kohdekudokseen, vaan hyökkäävä immuunijärjestelmä, soluliitosten ja soluväliaineadheesioiden puute sekä fysikaaliset voimat tuhoavat ne (Lambert ja muut 2017). Selviytyneet kasvainsolut siirtyvät kohdekudokseen tyypillisesti kapeista hiusuonista, joissa ne voivat kokonsa puolesta juuttua kiinni tai niiden liike hidastua (Reymond ja muut 2013). Ekstravasaatio on oma monimutkainen prosessinsa, jonka yksityiskohdat vaihtelevat paljon sijainnin mukaan (Lambert ja muu 2017). Yksinkertaistetusti esitettynä syöpäsolut vuorovaikuttavat verisuonen endoteelisolujen kanssa, tunkeutuvat endoteeliseinämän läpi ja siirtyvät kudoksen parenkyymiin (Reymond ja muut 2013).

Vaikka syöpäsolut pääsisivätkin levittäytymään uuteen kudokseen, kehittyminen etäpesäkkeeksi on vielä kaukana. Vain hyvin pieni osa syöpäsoluista alkaa jakautua ja muodostaa metastaaseja, sillä uusi mikroympäristö soluineen ja viestimolekyyleineen poikkeaa primaarikasvainympäristöstä (Lambert ja muut 2017). Tuhoutumisen ja jakautumisen lisäksi syöpäsoluja siirtyy uinuvaan tilaan. Se voi käynnistyä tuttujen ja tarpeellisten signaalien puutteesta, uuden ympäristön aktiivisista käskyistä, angiogeneesin puutteesta tai immuunipuolustuksen pakottamana (Sosa ja muut 2014; Lambert ja muut 2017). Uinuvat kasvainsolut ovat luultavasti taas vastuussa syöpien uusiutumisista, jotka alkavat jopa vuosia primaarikasvaimen hoidon jälkeen.

Soluja irtoaa primaarikasvaimesta pitkin sen kehitystä – myös hyvin varhaisessa vaiheessa (Hüsemann ja muut 2008). Aikaisin levinneet ja itsenäisesti kehittyneet kasvainsolut ja mikrometastaasit voivat poiketa merkittävästi primaarikasvaimesta (Sosa ja muut 2014). Tällöin ne voivat selviytyä hoidoista, ja vaatia omat räätälöidyt ratkaisunsa (Sosa ja muut 2014).

Varsinaisten makrokokoisten etäpesäkkeiden syntyminen eli kolonisoituminen edellyttää, että kasvainsoluilla on kyky aloittaa uuden kasvaimen muodostus ja kyky sopeutua vieraaseen mikroympäristöön (Lambert ja muut 2017). Syöpäsolupopulaatio on saman kasvaimenkin sisällä hyvin heterogeeninen, ja vain osa syöpäsoluista pystyy tehokkaasti synnyttämään uusia kasvaimia (Reya ja muut 2001). Näitä kutsutaan syövän kantasoluiksi. Syövän kantasolut toimivat kuten aikuisen kantasolut, eli ne pystyvät uusiutumaan rajattomasti ja tuottavat muut kudoksen lyhytikäiset solut, tässä tapauksessa tosin syöpäsolut (Batlle ja Clevers 2017). Syövän kantasolut eivät ole rajattu ryhmä, vaan niiden ajatellaan muuttuvan tavallisiksi syöpäsoluiksi ja toisinpäin joko ympäristön tai sattuman ohjaamana (Batlle ja Clever 2017). Pääasiassa siis vain kantasolutilassa olevat levinneet syöpäsolut perustavat mikrometastaaseja suurempia etäpesäkkeitä (Lambert ja muut 2017). Syövän kannalta on oleellista myös, että syövän kantasolut ovat vastustuskykyisiä säteily- ja lääkehoidoille sekä pystyvät uinumaan pitkiä aikoja (Clevers 2011). Syövän kantasolujen ajatellaankin olevan syyllisiä sille, että syöpä uusiutuu myöhemmin hoitojen päätyttyä (Batlle ja Clevers 2017).

Syöpäsolut hyödyntävät uuden mikroympäristön kolonisaatiossa laajaa valikoimaa erilaisia sopeutumishohjelmia (Lambert ja muut 2017). Osa näistä on eräänlaisia yleisohjelmia, jotka esimerkiksi edistävät selviytymistä useissa kudoksissa, kun taas osa on tarkkaan tiettyihin tilanteisiin rajoittuneita erikoisohjelmia (Obenauf ja Massagué 2015). Sopeutumisen lisäksi myös muutokset itse mikroympäristössä voivat laukaista etäpesäkkeiden synnyn. Tällaisia tapahtumia ovat esimerkiksi viestimolekyyylimäärien vaihtelut, angiogeneesin eteneminen ja tulehdustilan käynnistyminen (Lambert ja muut 2017).

### 1.2.8 Rintasyöpä

Rintasyöpä on sekä maailmanlaajuisesti että Suomessa naisten yleisin syöpä, ja sen osuus kaikista naisten uusista syöpätapauksista on Suomessa noin 30 prosenttia (Bray ja muut 2018; Suomen syöpärekisteri 2019). Yleisyytensä takia rintasyöpä myös aiheuttaa lukumäärällisesti eniten naisten syöpäkuolemia (Bray ja muut 2018; Suomen syöpärekisteri 2019). Vaikka rintasyöpä on pääasiassa naisten sairaus, siihen sairastuu toisinaan myös miehiä. Vuonna 2017 rintasyöpään sairastui Suomessa 4960 naista ja 28 miestä (Suomen syöpärekisteri 2019).

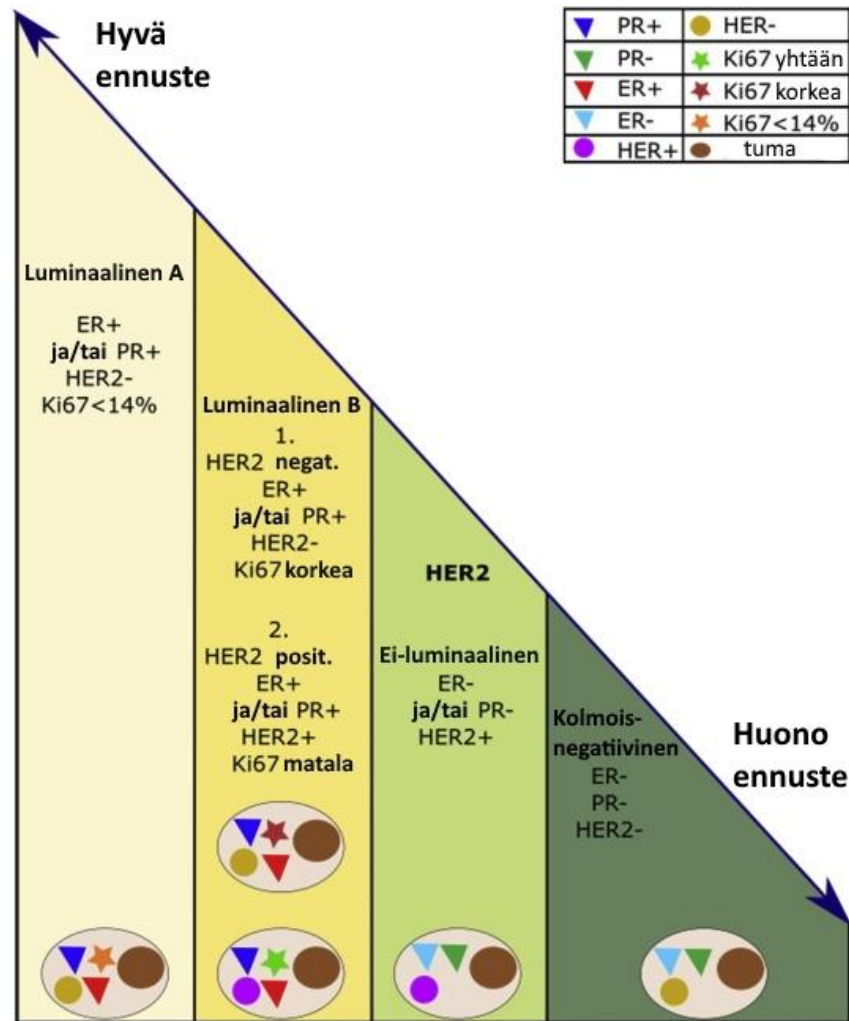
Rintasyöpä on joukko erittäin heterogeenisiä sairauksia, jotka poikkeavat toisistaan muun muassa ennusteltaan, hoidoltaan, geeniekspressioltaan ja histopatologisilta ominaisuuksiltaan (Januškevičienė ja Petrikaitė 2019). Hoidolliset päätökset on tyypillisesti tehty histologisten havaintojen ja tiettyjen biomarkkerien pohjalta (Provenzano ja muut 2018). Rintasyövän piirteiden kartoittamisella pyritään siihen, että kasvaimen käyttäytymistä voidaan ennakoida (Provenzano ja muut 2018). Näin vältetään haitallisten hoitojen turhaa käyttöä ja edistetään voimakasta puuttumista ennusteeltaan hankaliin syöpätapauksiin.

Geeniekspressionensa perusteella rintasyövät on jaettu neljään alatyyppiin: luminaalinen A, luminaalinen B, basaalityyppinen (engl. *basal-like*) ja HER2:ta yliekspressoiva (Perou ja muut 2000; Sørlie ja muut 2001; Sørlie ja muut 2003). Aluksi jaotteluun kuului myös normaalin kaltainen (engl. *normal-like*) alatyyppi, mutta siitä on myöhemmin luovuttu (Provenzano ja muut 2018). Geeniekspressioprofiilien selvittäminen laajamittaisesti terveydenhuollossa on vielä hankalaa, joten tässä ympäristössä on päädytty hyödyntämään immunohistokemiaa. Estrogeenireseptorin (ER), progesteronireseptorin (PR) ja HER2:n arviointi immunohistokemiallisella värjäyksellä pyrkii karkeasti jäljittelemään geeniekspressioprofiiloinnin jaottelua alatyyppejä. Luminaaliset alatyypit ovat ER-positiivisia ja/tai PR-positiivisia, HER2-rikastunut alatyyppi on vain HER2-positiivinen ja kolmoisnegatiivinen alatyyppi, nimensä mukaisesti, ei ilmennä mitään näistä kolmesta reseptorista (kuva 8). (Fragomeni ja muut 2018.) Luminaalinen A ja luminaalinen B on pyritty erottelemaan toisistaan



muun muassa Ki67-proliferaatiomarkkerin perusteella (Cheang ja muut 2009). Lisäksi tunnetaan luminaalinen-HER2-positiivinen alatyypin, joka monesti sisällytetään luminaalinen B -ryhmään. Kolmoisnegatiivinen alatyypin voidaan edelleen jaotella sytokeratiinien 5 ja 6 sekä epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) ilmentämisen pohjalta. Jommankumman ekspressio viittaa ydinbasaaliseen fenotyyppiin (engl. *core basal phenotype*), joka vastaa geeniekspressioprofiloinnin basaalityypisiä, ja kaikkien negatiivisuus taas viitoisnegatiiviseen fenotyyppiin (Blows ja muut 2010).

Sekä geeniekspressio- että immunohistoanalyysin tulokset antavat tietoa rintasyövän ennusteesta ja hoitomahdollisuuksista. Neljästä alatyypistä luminaalinen A:lla on paras ennuste ja luminaalinen B:llä huomattavasti tätä huonompi (Dai ja muut 2015). Yleisesti luminaalisten kasvainten ennuste on kuitenkin verrattain hyvä (Dai ja muut 2015). HER2:ta yliekspressoivat ja kolmoisnegatiiviset kasvaimet on aggressiivisimpia, mutta HER2-kasvaimia vastaan on olemassa kohdennettuja hoitoja, jotka parantavat sen ennustetta (Fragomeni ja muut 2018).



**Kuva 8. Rintasyövän vakiintuneet immunohistokemialliset alatyypit.** Rintasyövät voidaan karkeasti jakaa niiden hormonireseptoriekspression perusteella ainakin neljään alatyypiin. Näiden hoidot ja ennusteet poikkeavat toisistaan huomattavasti. (Muokattu kuvasta Januškevičienė ja Petrikaitė 2019. Kuvan käyttämiseen ja kääntämiseen on saatu lupa.)

### 1.3 Tutkielman tavoite

Pro gradu -tutkielman tarkoitus oli tutkia  $\beta$ 1-integriinin tehtäviä rintasyöpäsoluissa. Kun  $\beta$ 1 integriini poistettiin BT474-rintasyöpäsolulinjasta RNA-interferenssin avulla, solujen epiteelinen morfologian muuttui merkittävästi. Tämä havainto oli erikoistyon perusta. Sen syitä ja vaikutuksia rintasyöpäsoluihin lähdettiin tutkimaan sekä toiminnallisilla että molekyyllitason kokeilla. Erityisesti haluttiin tutkia, onko havainto seurausta EMT:stä tai vastaavasta prosessista. Lisääntykö solujen liikkuvuus? Muuttuuko

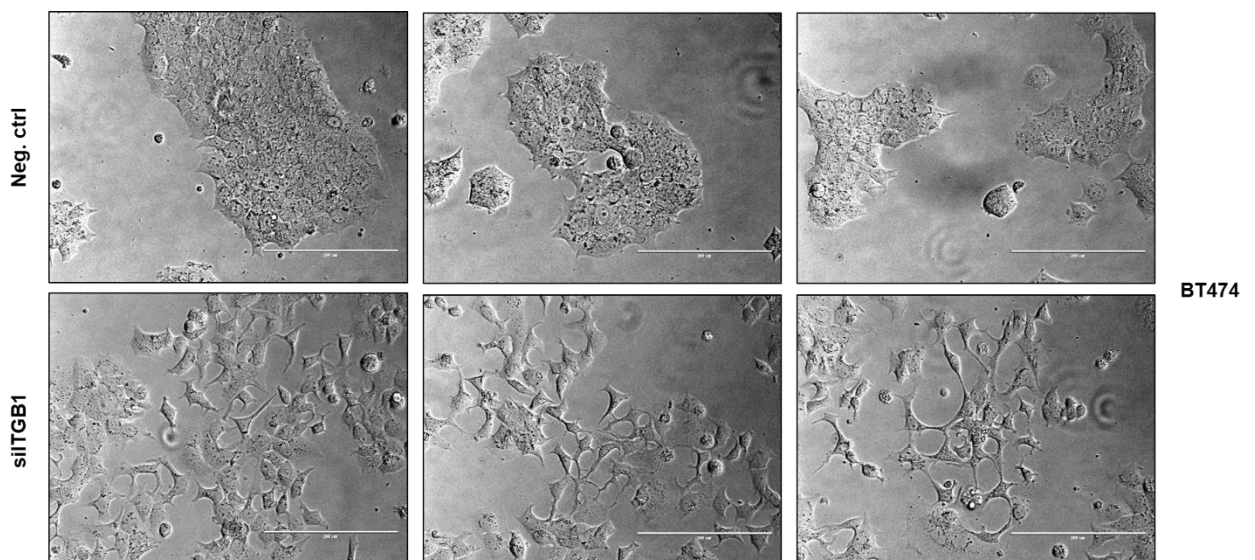
proliferaationopeus? Vaikuttaako morfologian muutos muiden molekyylien ilmenemiseen? Lisäksi oltiin kiinnostuneita tapahtuuko vastaava morfologian muutos muissa rintasyöpäsolulinjoissa.

Rintasyöpä on maailmanlaajuisesti merkittävä fyysistä, psyykkistä ja sosiaalista kärsimystä aiheuttava sairaus, joka voi edelleen johtaa potilaan kuolemaan hoidoista huolimatta. Erikoistyön tavoitteena oli syventää tietämystä rintasyövästä ja tuottaa siitä perustutkimustason tietoa, jota voidaan myöhemmin hyödyntää esimerkiksi hoitojen kehittämisessä.

## 2 Tulokset

### 2.1 Ensihavainto

Erikoistyö perustuu yllättävään havaintoon, jota haluttiin tutkia laajemmin opinnäytetyönä. Ihmisen epiteelisen BT474-rintasyöpäsolulinjan morfologia muuttuu radikaalista, kun niistä hiljennettiin integriini  $\beta 1$  -geeni eli *ITGB1* RNA-interferenssin avulla (kuva 9). Yhtenäiset epiteelisolupesäkkeet hajaantuivat, solujen väliset liitokset vähenivät ja solujen ulkomuoto muuttui pyöreähköstä vörtinämäiseksi.



**Kuva 9. BT474-rintasyöpäsolut muuttuivat *ITGB1*-hiljennyksen vaikutuksesta.** BT474-rintasyöpäsolulinjassa tapahtui merkittävä morfologian muutos *ITGB1*-RNA-hiljennyksen seurauksena. Tiukasti yhteenkiinnittyneet epiteelisolut siirtyivät kohti mesenkymaalista ulkomuotoa, jossa solujen rajat erottuvat selvästi ja liitosten määrä vähenee huomattavasti.

Pieni häiritsevä RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA) suunnitellaan kohdegeenin perusteella, ja sitä transfektoidaan hiljennettäviin soluihin esimerkiksi liposomivektorilla. Solun sisällä kaksijuosteinen siRNA:n purkautuu yksijuosteiseksi opasjuosteeksi ja matkustajajuosteeksi. Näistä opasjuoste liitetään osaksi RNA:n indusoimaa hiljennyskompleksia (engl. *RNA-induced silencing complex*, RISC). Kompleksi tunnistaa siRNA:n opasjuosteen avulla kohdegeenin lähetti-RNA:n, jonka RISC:n katalyyttiset osat sitten pilkkovat.

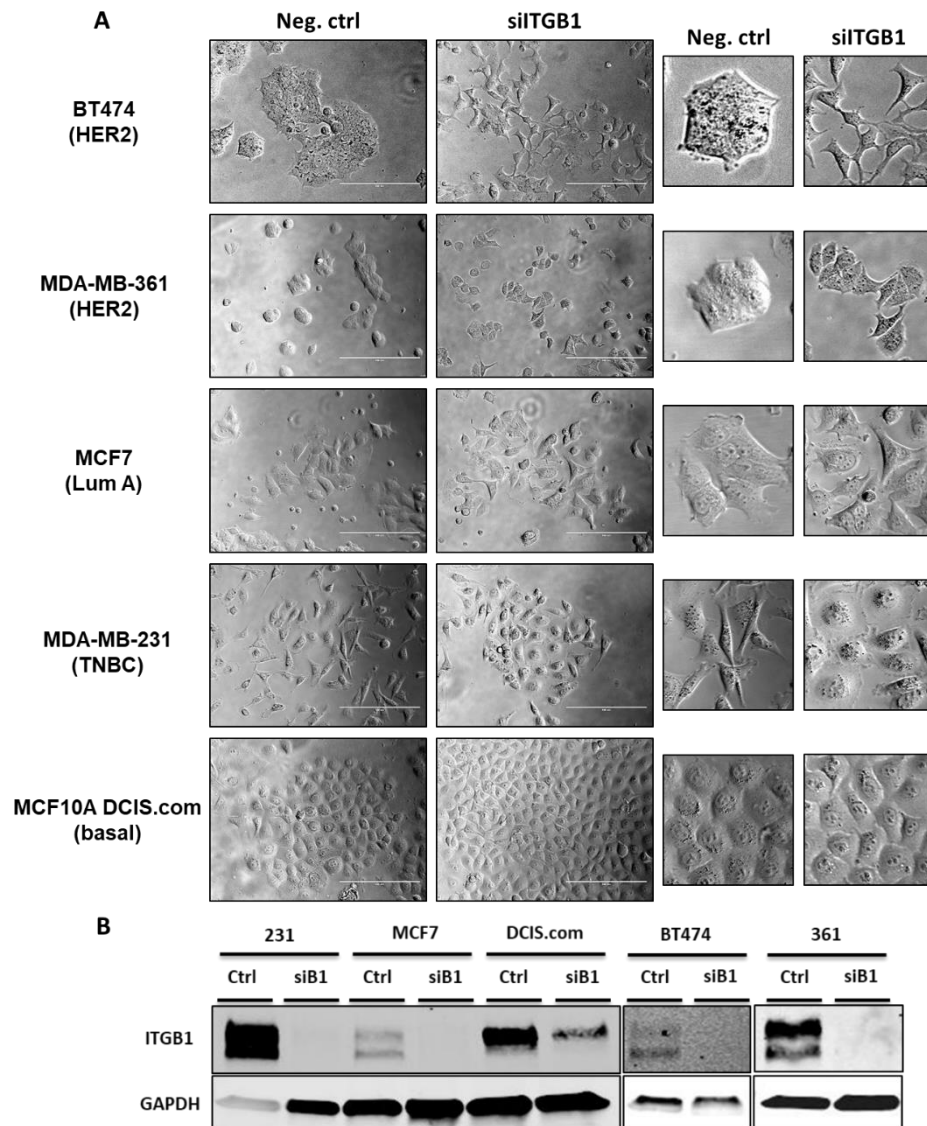
Näin kohdegeenin translaatio ei onnistu, ja kyseistä proteiinia ei synny soluun niin kauan, kuin siRNA:ta on läsnä. RNA-hiljennyksellä proteiinin ilmentäminen voidaan siis väliaikaisesti pysäyttää osittain tai lähes kokonaan.

## 2.2 ITGB1-hiljennys eri rintasyöpäsolulinjoissa

Koska ITGB1-hiljennyksen havaittiin aiheuttavan BT474-rintasyöpäsolulinjassa merkittävän fenotyypin muutoksen, päätimme kokeilla, vaikuttaako se muihin rintasyöpäsolulinjoihin samalla tavalla. Hiljensimme ITGB1:n siis myös muista tutkimusryhmän käyttämistä rintasyöpäsolulinjoista, joita olivat: MDA-MB-231, MDA-MB-361, MCF7 ja MCF10A DCIS.com (kuva 10A). BT474-linjassa havaittu hajaantuminen käynnistyi myös MDA-MB-361- ja MCF7-solulinjoissa, vaikkakin muutos ei ollut yhtä silmiinpistävä (kuva 10). MDA-MB-361-linjassa myös yksittäisten solujen ulkomuoto muuttui värttinämaiseseen suuntaan ja pyöreistä pesäkkeistä tuli epäsäännöllisemmän muotoisia. Kiinnostavasti alunperin mesenkymaalinen MDA-MB-231-linja muuttui kohti epiteelisempää fenotyyppiä, sillä solut alkoivat kerääntyä yhteen ja muodostaa enemmän solujen välisiä liitoksia (kuva 10A). Tämä muutos on siis päinvastainen BT474:ssä tapahtuneelle hajaantumiselle. MCF10A DCIS.com -solulinjan ei puolestaan huomattu muuttuvan ITGB1-hiljennyksen vaikutuksesta (kuva 10A). Hiljennys oli muissa paitsi MCF10A DCIS.com soluissa hyvin tehokasta (kuva 10B). Tässäkin solulinjassa hiljennys tapahtui, mutta integriini  $\beta 1$ :tä on western blotin perusteella solussa vielä kohtuullisen runsaasti. On olemassa mahdollisuus, että näissäkin soluissa morfologian muutos voisi tapahtua, mutta heikompi hiljennysteho ei vain ole tähän riittänyt. ITGB1-hiljennystä kokeiltiin myös 5637-virtsarakkosalinjoissa ja HCC1419-rintasyöpäsolulinjassa, mutta näissä tapauksissa minkäänlaista morfologian muutosta ei havaittu, vaikka itse hiljentäminen onnistui.

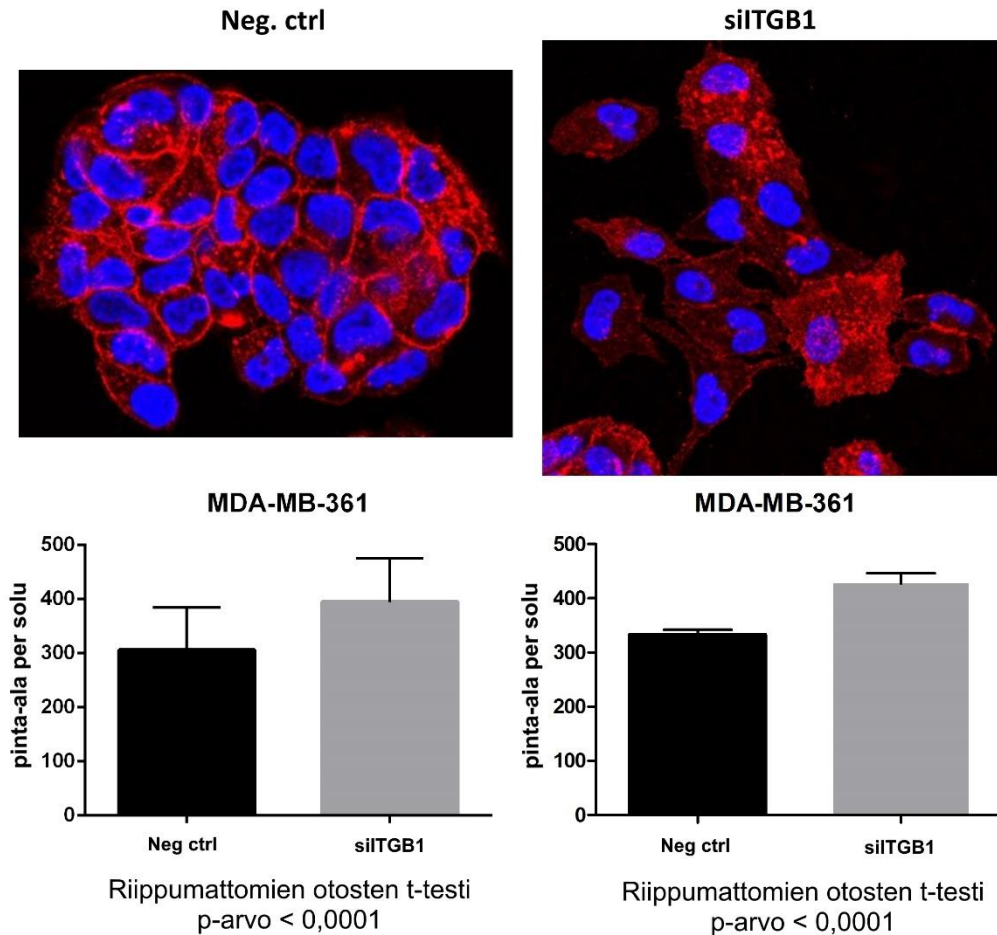
Koska MDA-MB-361- ja MCF7-linjoissa morfologian muutos ei ollut yhtä helposti nähtävissä kuin BT474:ssä, päädyimme kvantifioimaan sitä vertaamalla kontrollisolujen ja siITGB1-solujen pinta-aloja keskenään. Vertailu toteutettiin immunofluoresenssivärjätyistä soluista siten, että keskitasosta otetusta kuvasta mitattiin pesäkkeen pinta-ala ImageJ-ohjelmalla. Näin saatu pesäkkeiden

kokonaispinta-ala jaettiin tumien lukumäärällä. Koska aikaa oli rajallisesti, ehdimme opinnäytetyön aikana tekemään tämän vertailun vain MDA-MB-361-solulinjassa. Kontrolli- ja siITGB1-solujen keskimääräisissä pinta-aloissa



**Kuva 10. ITGB1-hiljennys viidessä rintasyöpäsolulinjassa. ITGB1-geenin hiljentäminen muutti neljän rintasyöpäsolulinjan morfologiaa (A). BT474-linjassa fenotyyppi muuttui radikaalisti kohti mesenkymaalista varttinämäistä morfologiaa ja solujen väliset liitokset vähenivät. MDA-MB-361-linjan havaittiin vastaavaa muutosta, mutta se oli heikompaa. MCF7-solujen väliset liitokset vähenivät. MDA-MB-231-linjassa taas havaittiin päinvastainen siirtymä mesenkymaalisesta kohti epiteelimäisempää morfologiaa. MCF10A DCIS.com soluissa ei havaittu muutosta. Hiljennyksen onnistuminen varmistettiin western blot-menetelmällä (B).**

havaittiin tällä tavalla tilastollisesti merkittävä ero (kuva 11). Vertailu tehtiin kahdesti, ja molemmilla kerroilla p-arvo kuvasti erittäin suurta tilastollista merkittävyyttä. MDA-MB-361 tapauksessa siis voidaan katsoa, että visuaalisesti hieman epävarmaa havaintoa tukee myös numeerisesti vakuuttava tulos.



**Kuva 11. Kontrolli ja ITGB1-hiljennettyjen MDA-MB-361-solujen keskimääräisten pinta-alojen ero. ITGB1-hiljennyksen aiheuttama morfologian muutos kvantifioitiin vertailemalla kontrolli- ja siITGB1-solujen keskimääräisiä pinta-aloja. Samalla suurennoksella otetuista immunofluoresenssikuvista (solun pinnalla sijaitseva HER2 värjättyinä) mitattiin pesäkkeiden pinta-ala, ja se jaettiin tumien lukumäärällä (värjätty DAPI:lla). Tilastollisesti merkittävän tuloksen perusteella ITGB1-hiljennettyjen solujen pinta-ala on noin kolmanneksen kontrolleja suurempi.**

## 2.3 E-kadheriini hajaantuvassa-fenotyypissä

### 2.3.1 ITGB1-hiljennyksen vaikutus BT474-linjan proteiinitasoihin

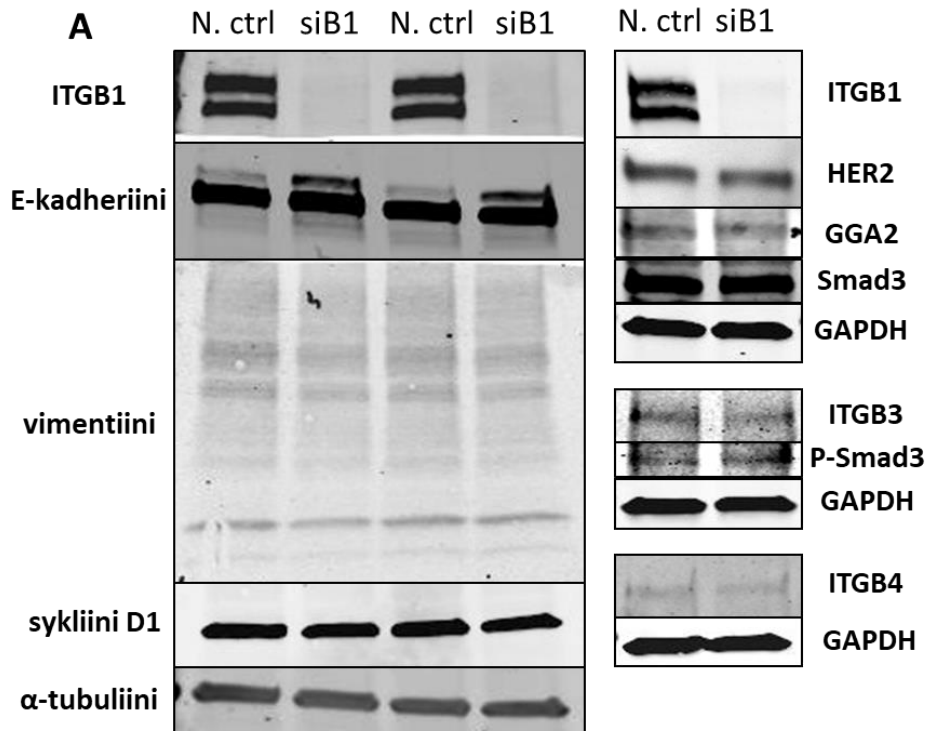
BT474-solulinjan ITGB1-geenin hiljennys siis tuotti alun perin epiteelisestä solulinjasta hajaantuvan fenotyypin, joka ulkoisilta ominaisuuksiltaan muistuttaa mesenkymaalista linjaa. Ensihavainnot herättävät epäilyksen, että hiljennys olisi voinut käynnistää solulinjassa EMT:n tai tämän kaltaisen prosessin. EMT on oleellinen vaihe, kun karsinoomat alkavat invasoida ja muodostaa etäpesäkkeitä.

EMT-hypoteesia testattiin western blot -menetelmällä siten, että ITGB1-hiljennettyjen (siITGB1) ja kontrollikäsiteltyjen (neg. ctrl) BT474-lysaattien proteiinitasoja verrattiin keskenään. Lysaateista tunnistettiin vasta-aineilla epiteelimerkki E-kadheriini ja mesenkymaalimerkki vimentiini (kuva 12). Samalla varmistettiin, että hiljennys oli onnistunut vertailemalla neg. ctrl ja siITGB1-lysaattien ITGB1-proteiinin määriä toisiinsa (kuva 12). Neg. ctrl -solut ovat käyneet läpi samat vaiheet kuin siITGB1-solut, mutta niihin transfektoitu siRNA ei sitoudu spesifisesti yhteenkään solun lähetti-RNA:han. Toisin kuin itse hiljennyskäsitelyyn, kontrollikäsitelyyn ei pitäisi vaikuttaa solun proteiinitasoihin, joten sitä kutsutaan negatiiviseksi kontrolliksi. Mahdolliset muutokset soluissa olisivat tällöin vain työvaiheiden sivutuote.

Kuvasta 12 nähdään, että ITGB1 hiljentäminen on onnistunut ja ollut todella tehokasta. Neg. ctrl -solujen lysaattien ITGB1-nauhat näkyvät selvästi, kun taas siITGB1-solujen lysaateissa tämän proteiinin määrä on verrattain olematonta. Hiljennyksen onnistuminen tarkistettiin jokaisesta kokeesta käytetystä soluerästä, ja se toimi poikkeuksetta yhtä tehokkaasti. Mesenkymaalista merkkiproteiinia vimentiiniä ei merkittävästi löytynyt BT474-soluista ennen hiljennystä tai sen jälkeen (kuva 12). Kalvolla näkyvät verhomaiset värjäytymät johtuvat siitä, että leimaamisessa käytetyt vasta-aineet sitoutuvat vähäisissä määrin myös epäspesifisesti. Vimentiinin määrä oli siis lysaateissa niin vähäinen, että se ei ylitä tämän menetelmän "taustaa" (engl. *background*). E-kadheriinia, epiteelisolujen merkkiproteiinia, BT474-solut puolestaan ekspressoivat RNA-hiljennyksestä riippumatta (kuva 12). E-kadheriini-vasta-aine kuitenkin leimasi kaksi erillistä nauhaa, joiden proteiinien koot siis



poikkeavat hieman toisistaan. ITGB1-hiljennys lisäsi merkittävästi kooltaan suuremman E-kadheriinivariantin määrää (kuvassa 12 ylempi nauha). Lisäksi selvitettiin ITGB1-hiljennyksen vaikutus useiden mielenkiintoisten ja mahdollisesti solumorfologiaan vaikuttavien proteiinien määrään (kuva 12). Hiljennyksen ei kuitenkaan western blotin avulla havaittu muuttavan muiden kuin aiemmin mainittujen proteiinien ekspressiotasoja.



**Kuva 12. ITGB1-hiljennettyjen BT474-rintasyöpäsolujen proteiini-ekspressio western blot -menetelmällä.** Integriini  $\beta$ 1 hiljennettiin onnistuneesti siITGB1-soluista, sillä proteiininauhat puuttuvat näistä lyaattinäytteistä. BT474 siITGB1 -soluista tarkistettiin myös, vaikuttiko hiljennys muiden kiinnostavien proteiinien ekspressioon. Vain E-kadheriinin ekspressiossa tapahtui jonkinlainen muutos. E-kadheriinivasta-aine värjäsi kaksi erillistä nauhaa, joista proteiinkooltaan suuremmat määrä kasvoi, kun ITGB1 hiljennettiin. Lysaattien vertailukelpoisuus varmistettiin  $\alpha$ -tubuliinin ja GAPDH:n vasta-ainevärjäyksellä.

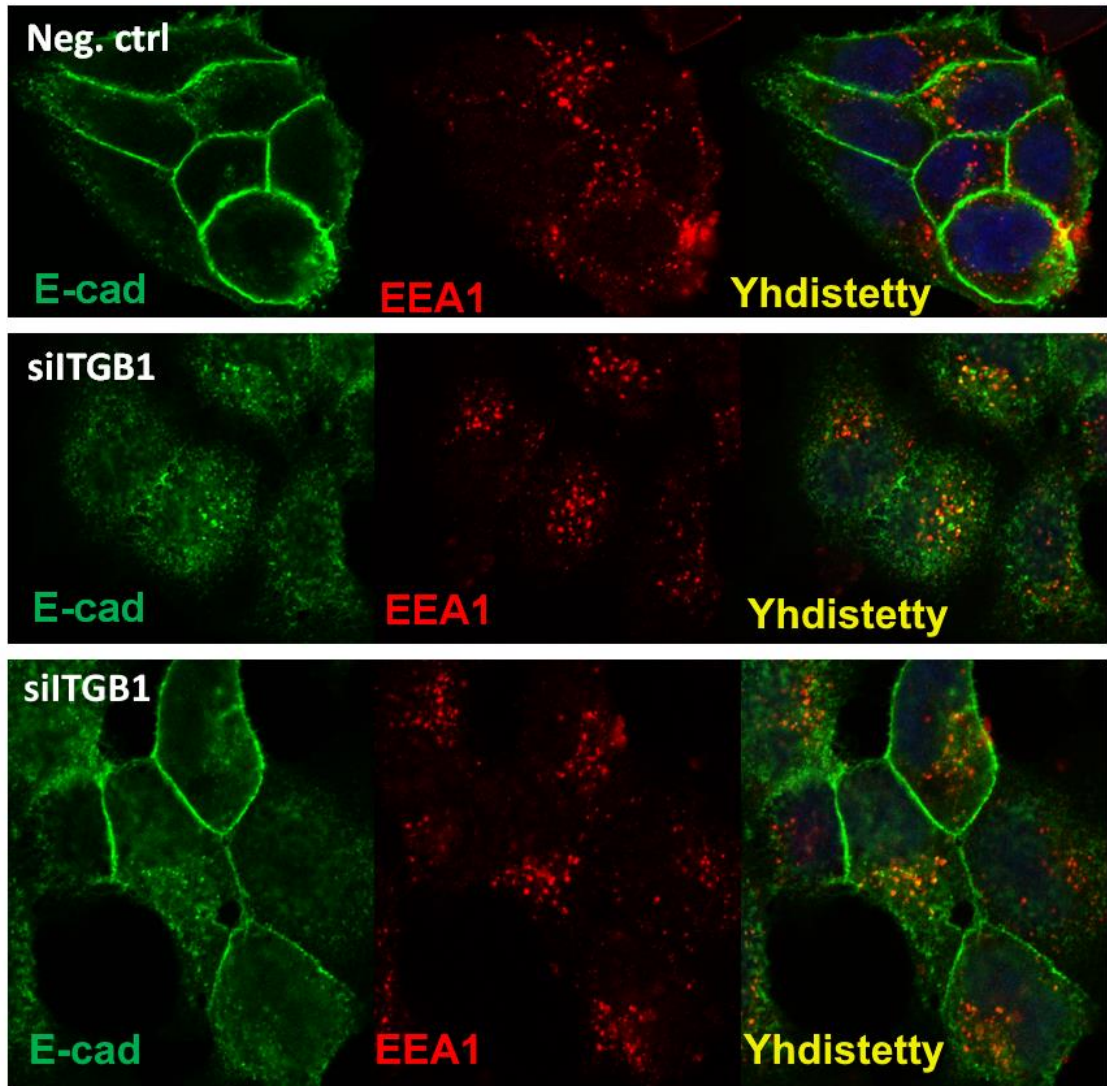
Lysaattinäytteiden yhtäsuuri annostelu varmistettiin värjäämällä western blot -kalvolta  $\alpha$ -tubuliini tai glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi (GAPDH).

Useimmat solut ilmentävät näitä tasaisesti, jatkuvasti ja runsaasti, minkä takia ne ovat hyviä latauskontrolleja vahvistamaan näytteiden vertailukelpoisuuden.

### 2.3.2 ITGB1-hiljennyksen vaikutus E-kadheriinin lokalisatioon

Halusimme tarkastella E-kadheriinia hajaantuvassa BT474-fenotyypissä vielä tarkemmin, koska silITGB1-käsittelystä seurasi solujen välisten liitosten väheneminen ja western blot -kalvolle E-kadheriini muodosti kontrollista poikkeavan kaksoisnauhan. E-kadheriinin määrä ei Western blotin perusteella vähentynyt hiljennyksen vaikutuksesta, vaikka solujen välinen kiinnittyminen häiriintyi merkittävästi. Vertailimme BT474 kontrolli- ja silITGB1-solujen E-kadheriinin lokalisatiota toisiinsa immunofluoresenssimikroskopian avulla (kuva 13). Näin yritimme selvittää, minne E-kadheriini päätyy, kun soluliitokset häiriintyvät. E-kadheriinin lisäksi kuvattavista soluista värjättiin aikaisen endosomin antigeeni 1 (engl. *early endosome antigen 1*, EEA1). EEA1:n ja E-kadheriinin lokalisoituminen samoille alueille viittaisi E-kadheriinin takaisinottoon eli endosytoosiin solun pinnalta.

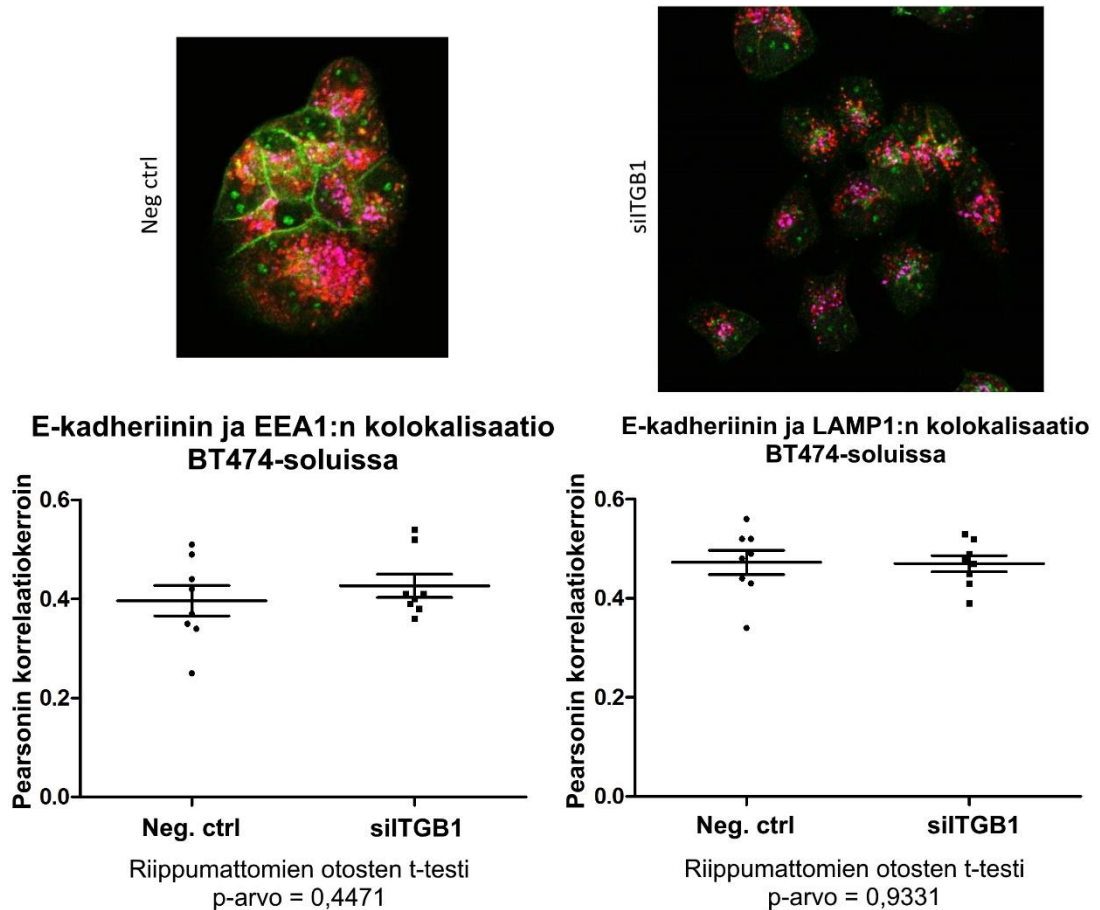
Odotetusti kontrollikäsitellyissä BT474-pesäkkeissä E-kadheriini esiintyi valtaosin solukalvolla solujen välisillä rajapinnoilla (kuva 13). E-kadheriinin ja EEA1:n lokalisoituminen samoille alueille oli vähäistä. ITGB1-hiljennetyt BT474-solut puolestaan paljastuivat heterogeeniseksi populaatioksi, sillä solujen muoto, liitosten määrä ja E-kadheriinin sijainti vaihtelivat runsaasti. ITGB1-hiljennetyjen solujen joukosta löydettiin kolme ryhmää, joista ensimmäinen muistutti ominaisuuksiltaan kontrollikäsiteltyjä soluja. Toisessa ryhmässä solujen muoto oli muuttunut mesenkymaalisen väärtinämäiseksi ja ne olivat vain väljästi kiinnittyneitä toisiin soluihin, mutta E-kadheriini pysyi enimmäkseen solukalvolla. Kolmannessa ryhmässä solujen muoto vaihteli normaalista pyöreähkөөn, mikä luultavasti riippui siitä olivatko solut vastaavasti kiinnittyneitä vai ei. Tässä ryhmässä vaikutti siltä, että E-kadheriinia ja EEA1:tä lokalisoituu huomattavasti samoille alueille. Ainakin kontrolliin ja kahteen muuhun ITGB1-hiljennettyyn ryhmään verrattuna ero näytti huomattavalta.



**Kuva 13. Immunofluoresenssivärjäys ITGB1-hiljennettyjen BT474-solujen E-kadheriinista ja EEA1:stä.** Kontrollikäsitellyt solut muodostavat tiukkoja pesäkkeitä, joissa E-kadheriini esiintyy pääasiassa solukalvolla. E-kadheriinia lokalisoituu vain vähän samoille alueille kuin EEA1. ITGB1-hiljennetyt solut ovat taas muodoltaan ja E-kadheriini-ekspressioltaan varsin heterogeenisiä. Osa muistutti kontrollisoluja, kun taas toiset olivat mesenkymaalisen muotoisia, mutta E-kadheriini oli edelleen pääosin solukalvolla. Lopuilla muoto vaihteli, mutta E-kadheriini oli pääasiassa solun sisällä ja lokalisoitui samoille alueille kuin EEA1.

E-kadheriinin ja EEA1:n kolokalisoitumista (engl *colocalization*) BT474-linjassa kvantifioitiin vielä immunofluoresenssikuvista ImageJ-ohjelman avulla. Samassa yhteydessä tehtiin kolokalisaatioanalyysi myös lysosomeihin liitetty

kalvoproteiini 1:lle (engl. *Lysosome associated membrane protein 1*, LAMP1), jota ilmennetään endolysosomaalisilla kalvoilla. E-kadheriinin ja LAMP1:n lisääntynyt kolokalisaatio tarkoittaisi sitä, että solu ohjaa E-kadheriinia lysosomeihin hajotettavaksi. Analyysin perusteella E-kadheriinin kolokalisaatio ei lisääntynyt kummankaan markkeriproteiinin kanssa, kun ITGB1 hiljennetään (kuva 14). Vastaava analyysi tehtiin myös MDA-MB-361-solulinjalle, jossa E-kadheriinin ja EEA1:n kolokalisaatio ei kasvanut merkittävästi p-arvolla 0,4248. E-kadheriinin ja LAMP1:n kolokalisaatio puolestaan väheni hiljennyksen vaikutuksesta, mutta tulos oli vain lievästi merkitsevän puolella p-arvolla 0,0311.



**Kuva 14. E-kadheriinin (vihreä) ja EEA1:n (punainen) sekä E-kadheriinin ja LAMP1:n (violetti) kolokalisaatio ITGB1-hiljennetyissä BT474-soluissa.** Immunofluoresenssikuvista määritettiin ImageJ-ohjelmalla, että muuttuuko E-kadheriinin kolokalisaatio aikaisten endosomien markkeri EEA1:n tai lysosomimarkkeri LAMP1:n kanssa, kun BT474 soluista hiljennetään ITGB1-geeni. Analyysistä ei saatu tilastollisesti merkittävää tulosta. Otokset olivat toki kohtuullisen pieniä (n=8 per käsittely).

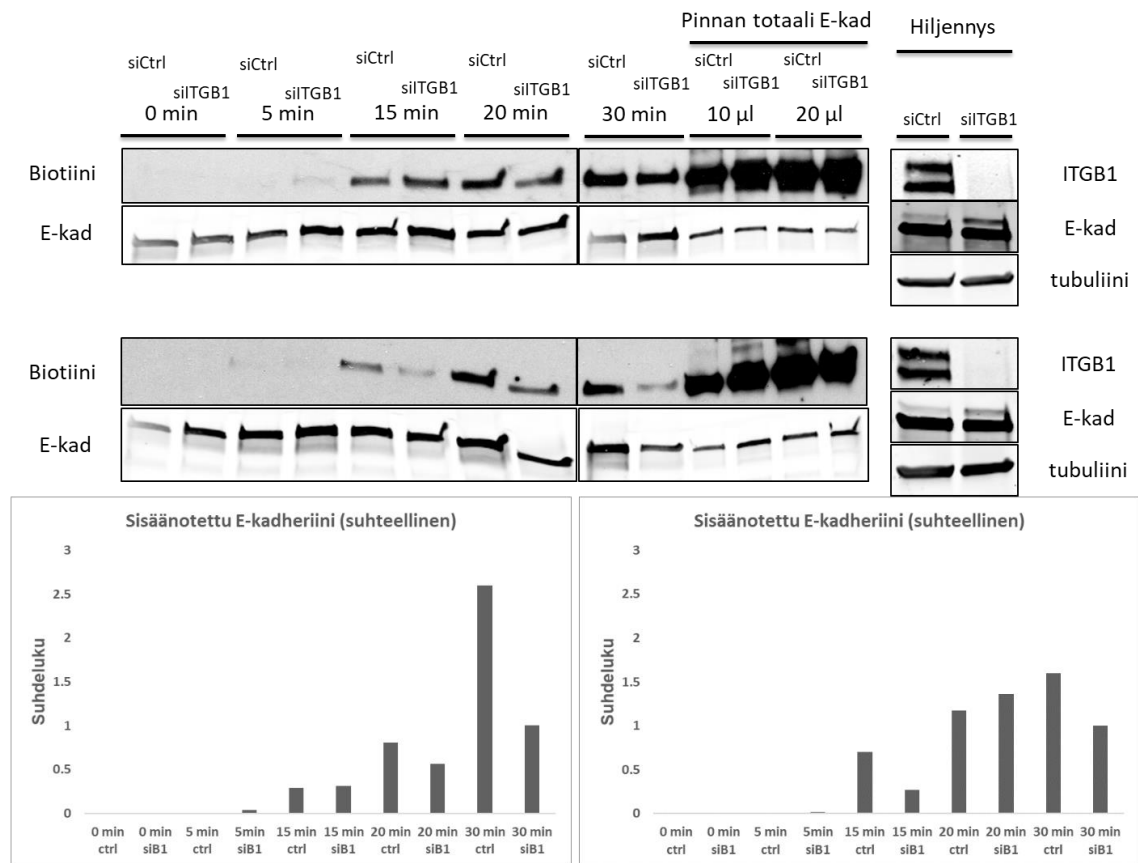
### 2.3.3 E-kadheriinin endosytoosi ITGB1-hiljennetyissä BT474-soluissa

Immunofluoresenssikuvien perusteella E-kadheriinia on runsaasti solun sisällä ainakin osassa ITGB1-hiljennettyjä BT474-soluja (kuva 13). E-kadheriinin kolokalisaatio EEA1:n tai LAMP1:n kanssa ei viitannut siihen, että tämä johtuisi endosytoosista, mutta tämä haluttiin vielä varmistaa biotiini-pohjaisella endosytoosikokeella. Menetelmässä solujen pintaproteiinit biotinyloidaan, ja solujen annetaan ottaa näitä sisäänsä eripituisia aikoja. Määritellyn ajan kuluttua pinnan proteiineilta poistetaan biotiini-merkki, jolloin vain endosytoosiin

aloittaneet proteiinit säilyttävät tämän leiman. Solut hajotetaan, ja niistä eristetään tutkittava pintaproteiini immunopresipitaation avulla. Western blot -menetelmällä tunnistetaan näytteistä eristetty proteiini ja biotiini, joka on edelleen kiinnittyneenä solun sisällä käyneissä proteiineissa. Näytteiden suhteellisia biotiinimääriä vertailemalla voidaan tehdä johtopäätöksiä endosytoosin määrästä.

Pinnan totaali-E-kad -näytteistä pinnalle jäänyttä biotiinia ei ole poistettu, joten sen signaali vastaa solukalvolla ollutta E-kadheriinia. Nämä näytteet ovat kuitenkin selvästi ylivalottuneita, vaikka tätä on yritetty välttää lataamalla niitä geelille vähemmän. Koska pinnan totaali-E-kad-näytteiden biotiini-signaalin on moninkertainen muihin näytteisiin verrattuna, voidaan silti päätellä, että endosytoosin käy läpi vain pieni osa pinnan e-kadheriinista (30 minuutissa). Tarkempiin kvantifointeihin niitä ei voida kuitenkaan käyttää.

Endosytoosikokeiden perusteella ITGB1-hiljennys ei ainakaan lisää E-kadheriinin endosytoosia aikavälillä 0–30 min (kuva 15). Näin ollen solun sisäinen E-kadheriini ITGB1-hiljennetyissä soluissa tuskin johtuu lisääntyneestä sisäänotosta. Pikemminkin vaikuttaisi siltä, että ITGB1-hiljennys saattaisi heikentää E-kadheriinin endosytoosia varsinkin 30 minuutin näytteissä. Kovin radikaaleja johtopäätöksiä tämän kokeen tuloksista ei voi tehdä, sillä erot eivät ole kovin selviä. Kaksi toistoa riittää korkeintaan hyvin selvien erojen havaitsemiseen. Yhdessä endosytoosikoe ja kolokalisaatio analyysi viittaavat siihen, että joissakin BT474-soluissa sisällä oleva E-kadheriini ei luultavasti johdu lisääntyneestä endosytoosista.

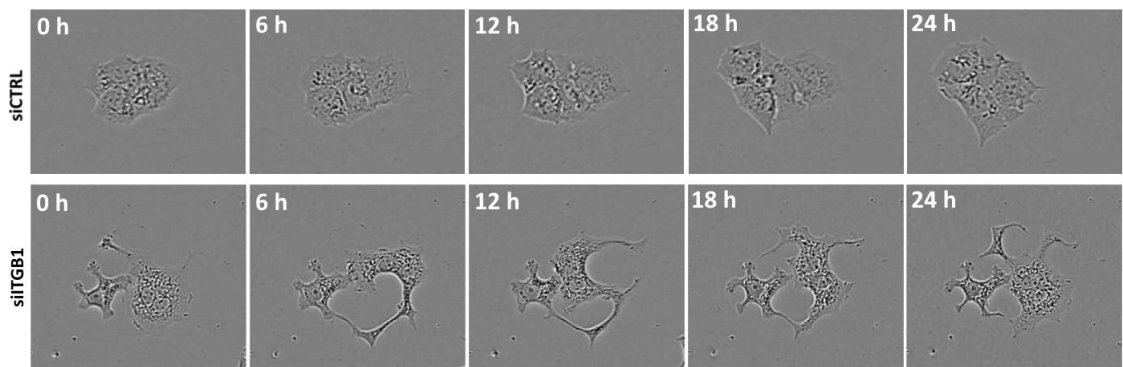


**Kuva 15. Biotiini-pohjaiset endosytoosikokeet E-kadheriinille ITGB1-hiljennetyissä BT474-soluissa: western blotit ja niiden kvantifiointi.** Soluun sisäännotettua E-kadheriinia edustaa sen biotiinileimaus. Biotiinin määrä suhteutetaan näytteen kokonais-E-kadheriinin, jolloin endosytoosia voidaan vertailla suhteellisesti eri näytteiden välillä. Kvantifiointissa sisäännotettu E-kadheriini on normalisoitu 30 min siITGB1 -näytteen suhteen. Kontrolli- ja siITGB1-käsittelyjen välillä ei huomata suuria eroja endosytoosin määrässä. Ainoastaan 30 minuutin aikapisteessä huomataan siITGB1 käsittelyn ehkä hieman heikentävän E-kadheriinin sisäänottoa. Pinnan totaali-E-kad -näytteiden biotiinia voidaan käyttää solukalvon E-kadheriinin määrän arvioimiseen, sillä pinnalle jäänyttä biotiini-merkkiä ei lopuksi poistettu. Näytteet ovat kuitenkin selvästi ylivalottuneita, joten niistä voidaan silmämääräisesti päätellä vain, että pieni osa E-kadheriinista osallistuu endosytoosiin. Hiljennyksen onnistuminen varmistettiin samasta soluerästä.

## 2.4 Toiminnalliset kokeet

### 2.4.1 Hajaantuvan fenotyypin liikkuminen ja jakautuminen

Kun ITGB1-hiljennettyjä eläviä BT474-soluja kuvattiin valomikroskoopilla ajastetusti (engl *time-lapse microscopy*) havaittiin, että tämä fenotyyppi liikkuu runsaasti (kuva 16). Liike oli koko solun laajuista ja satunnaista. Ne myös vetivät perässään pitkiä ja ohuita ulokkeita ikään kuin jäisivät joistain kohdista kiinni alustaansa. Kontrollikäsitellyt solut olivat huomattavasti vähäliikkeisempiä eivätkä muodostaneet pitkiä perässä laahaavia ulokkeita. Ne lähinnä vain liikahtelevat osana pesäkettä.

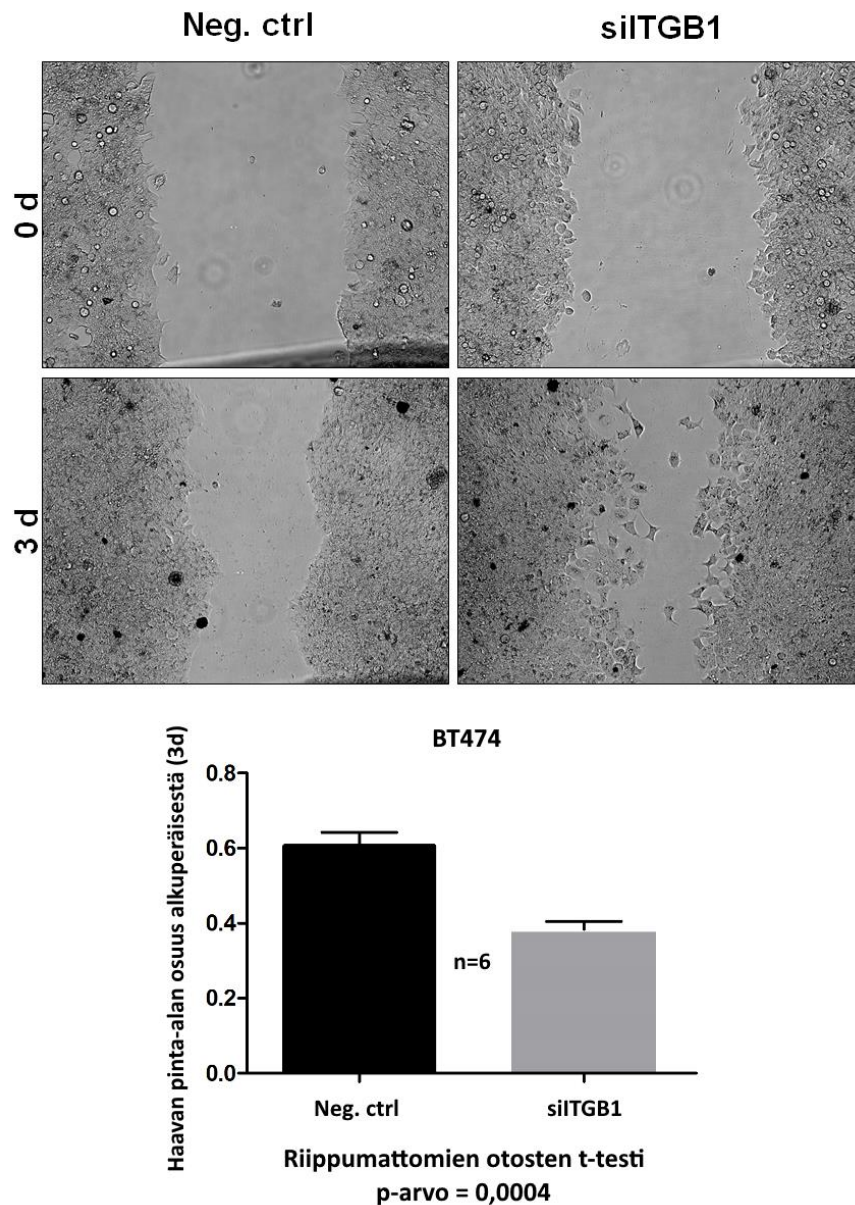


**Kuva 16. Ajastetulla mikroskoopilla otettu kuvasarja ITGB1-hiljennettyjen BT474-solujen liikkumisesta.** Kuvista nähdään, että ITGB1-hiljennetyt solut liikkuvat huomattavasti kontrollisoluja enemmän. Kontrollisolut pysyvät tiiviisti yhdessä ja nytkähtelevät, kun taas hajaantuva fenotyyppi liikkuu satunnaisesti ympäriinsä. Kuvasarja on pieni mutta edustava näyte laajemmasta videosta. Tässä esitetyt sarjat edustavat noin vuorokauden liikehdintää samalla noin 250  $\mu\text{m}$  leveällä alueella. Kuvia otettiin Incucyte-järjestelmällä kahden tunnin välein kuuden päivän ajan.

ITGB1-hiljennettyjen BT474-solujen migraatiota haluttiin vielä kvantifioida haavanparantumiskokeella, jotta visuaaliselle havainnolle olisi myös numeerista tukea. Kokeen tasalaatuisuus varmistettiin käyttämällä haavan tekemiseen muotteja, joihin sopivan konfluentti solumäärä voitiin myös laskea tarkasti. Haava kuvattiin samasta kohdasta päivittäin. Haavanparantumiskoe vahvisti aiemman visuaalisen vainnon: ITGB1-hiljennys lisäsi BT474-solujen migraatiota tilastollisesti merkittävästi (kuva 17). Haavan pinta-ala oli ITGB1-hiljennetyissä soluissa kolmen päivän jälkeen noin kolmanneksen pienempi kuin



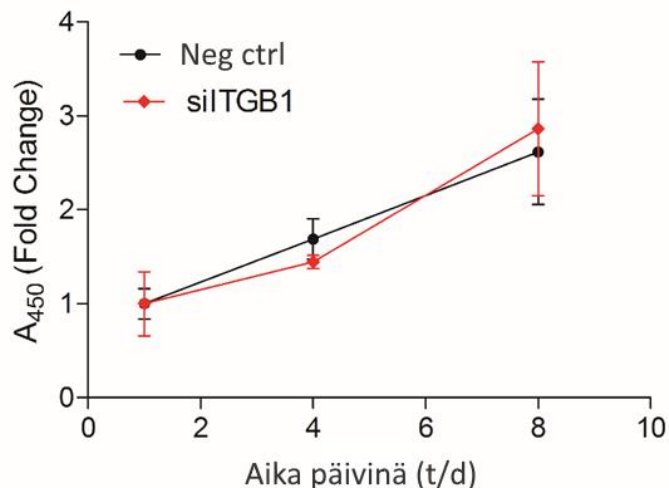
kontrollisoluissa. Lisäksi havaittiin, että hiljennetyt BT474-solut alkoivat, kontrollisoluista poiketen, liikkua myös yksittäisinä soluina (kuva 17).



**Kuva 17. Haavanparantumiskoe ITGB1-hiljennetyillä BT474-soluilla.** Kokeessa vertailtiin kontrolli- ja siITGB1-käsittelyjen vaikutusta BT474-solujen kykyyn liikkua ja sulkea ”haava”. Haava, eli rako kahden solurintaman välissä, luotiin siirtämällä muottiin sellainen määrä soluja, että muodostuu konfluentti mutta yksikerroksinen solupesäke raon molemmin puolin. Solujen annettiin liikkua kolme päivää. Haavan pinta-ala mitattiin nolla päivää ja kolme päivää - kuvista, ja nämä suhteutettiin toisiinsa. ITGB1-hiljennetyt solut sulkivat haavan nopeammin ja alkoivat, kontrollista poiketen, liikkua myös yksittäin.

Haavanparantumiskokeen vertailukelpoisuuden kannalta on oleellista, että solutyypit jakautuvat yhtä nopeasti, sillä haavan sulkeutuminen voi johtua migraation ohella myös solujen lukumäärän kasvusta. ITGB1-hiljennettyjen ja kontrollikäsiteltyjen BT474-solujen proliferaatiota vertailtiin WST-8-reagenssin avulla. WST-8 on tetratsoliumsuola, joka pilkkoutuu formatsaani-väriaineeksi solun mitokondrion dehydrogenaasien toiminnan vaikutuksesta. Vapautuvan formatsaanin määrä on suoraan verrannollinen elinkelpoisten solujen lukumäärään. Väriaineen muodostumista voidaan seurata mittaamalla absorbanssi 450 nm:ssä.

BT474-solujen proliferaatiota seurattiin 8 päivän ajan (kuva 18). ITGB1-hiljennettyjen ja kontrollikäsiteltyjen solujen jakautumisnopeuksien ei havaittu poikkeavan toisistaan (kuva 18). Kaksi eri henkilöä toisti kokeen yhteensä kolme kertaa samoin tuloksin. Koska BT474-fenotyypit jakautuvat yhtä nopeasti, haavanparantumiskokeessa tehty havainto nopeammasta haavan sulkeutumisesta ei johdu lisääntyneestä proliferaatiosta. Voidaan siis katsoa, että haavan sulkeutuminen kiihtyi nimenomaan nopeutuneen migraation seurauksena.



**Kuva 18. BT474 silTGB1-fenotyypin proliferaatio.** ITGB1-hiljennyksen vaikutusta BT474-solujen proliferaatioon tutkittiin kolorimetrisesti WST-8-reagenssilla. Kontrollisolujen ja silTGB1-solujen jakautumisnopeudessa ei havaittu merkittävää eroa tässä eikä toistokokeissa.

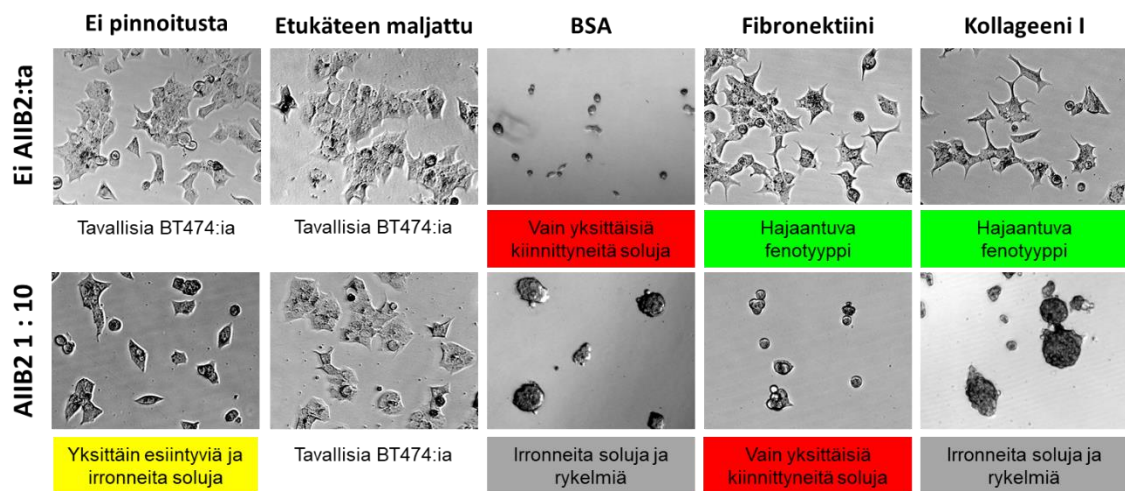
## 2.4.2 AIB2-kiinnittymiskoe – johtuuko hajaantuva fenotyyppi integriini $\beta$ 1:n tarttumis- vai signalointiominaisuuksista

BT474:n hajaantuvan fenotyypin varsinainen syy oli vielä epäselvä: miksi *ITGB1*-geenin hiljentäminen muuttaa solujen morfologiaa? Kysymystä haluttiin rajata selvittämällä, mikä *ITGB1*:ssä ylläpitää normaalia epiteelistä morfologiaa. Tarvitseeko BT474-solu sitä lähinnä signalointiin ja kiinnittymiseen, vai onko sillä myös jonkinlainen tehtävä telineproteiinina? Tätä lähdettiin selvittämään *ITGB1*:n monoklonaalisen vasta-aineen AIB2:n avulla. AIB2 inhiboi *ITGB1*:tä sitoutumalla sen solun ulkoiseen domeeniin (Park ja muut 2006). Periaatteessa siis AIB2:n pitäisi sammuttaa *ITGB1* -välitteinen signalointi ja muuttaa BT474:n morfologiaa *ITGB1*-hiljennyksen tapaan, ellei *ITGB1*:llä ole myös jokin teline tehtävä solussa.

Kokeessa BT474 solut ja AIB2-vasta-aine lisättiin eri tavalla pinnoitetuille alustoille, ja seurattiin visuaalisesti, mitä soluille tapahtuu (kuva 19). Pinnoitteet olivat seuraavat: BSA (engl. *bovine serum albumin*, naudan seerumin albumiini), fibronectiini, kollageeni I ja ei pinnoitetta. BSA:lla pinnoitettuun alustaan solujen ei pitäisi kiinnittyä. Fibronectiini ja kollageeni I ovat puolestaan ligandeja useille *ITGB1*-alaysikön integriineille, joten AIB2:n pitäisi häiritä kiinnittymistä näihin pintoihin. Lisäksi yhdessä käsittelyssä BT474-solujen annettiin kiinnittyä pinnoittamattomaan alustaan ennen AIB2:n lisäystä.

AIB2 vaikutus BT474-soluihin vaihteli runsaasti eri pinnoitusten mukaan (kuva 19). BSA:han solut eivät odotetusti juuri kiinnittyneet. Yksittäiset alustaan tarttuneet solut johtuvat luultavasti pinnoituksen paikallisesta epätasaisuudesta. Fibronectiinille ja kollageeni I:lle siirretyt solut tarttuivat alustansa ilman AIB2:ta, kun taas vasta-aineen kanssa lisätyt solut eivät kiinnittyneet olleenkaan. Kiinnostavana sivuhuomiona havaittiin, että fibronectiiniin tai kollageeni I:een tarttuneet käsittelemättömät BT474-solut muistuttavat ulkomuodoltaan paljon *ITGB1*-hiljennyksessä syntyvää hajaantuvaa fenotyyppiä (kuva 19). Etukäteen muoville maljatut solut, joille AIB2 lisättiin vasta maljausta seuraavana päivänä, eivät reagoineet vasta-aineeseen mitenkään. Yhdessä AIB2:n kanssa siirretyt solut puolestaan häiriintyivät vasta-aineen läsnäolosta,

sillä kaikki solut eivät onnistuneet kiinnittymään alustaansa. Lisäksi niitä esiintyi paljon yksittäisinä soluina, mikä on BT474-linjalle epätyypillistä. AIB2:n ei siis havaittu aiheuttavan varsinaista morfologian muutosta BT474-soluissa. Tämä viittaa siihen, että ITGB1:n poistuminen BT474-soluista on edellytys morfologian muutokselle. Pelkkä signaloinnin ja tarttumisen inhibiointi ei näytä riittävän, joten ITGB1:llä saattaa olla jokin tehtävä myös telineproteiinina.



**Kuva 19. Inhiboivan monoklonaalisen ITGB1-vastaisen AIB2:n vaikutus BT474-soluihin eri pinnoilla.** AIB2-avulla yritettiin replikoida ITGB1-hiljennyksen aiheuttamaa morfologiaa BT474-soluissa. Vasta-aineen oikea toiminta vahvistettiin käyttämällä erilaisia pinnoitteita. Solut tarttuvat fibronectiiniin ja kollageeni I:een, mutta AIB2:n lisäys esti tarttumisen inhiboimalla ITGB1-alayksikön reseptoreja. BSA:han solut eivät kykene tarttumaan. Muovilla AIB2 häiritsi BT474-linjan kiinnittymistä alustaan ja toisiinsa, mutta maljauksen jälkeen lisätyllä vasta-aineella ei ole silmämääräistä vaikutusta soluihin. Ei havaittu vastaavaa morfologian muutosta kuin ITGB1-hiljennyksellä.

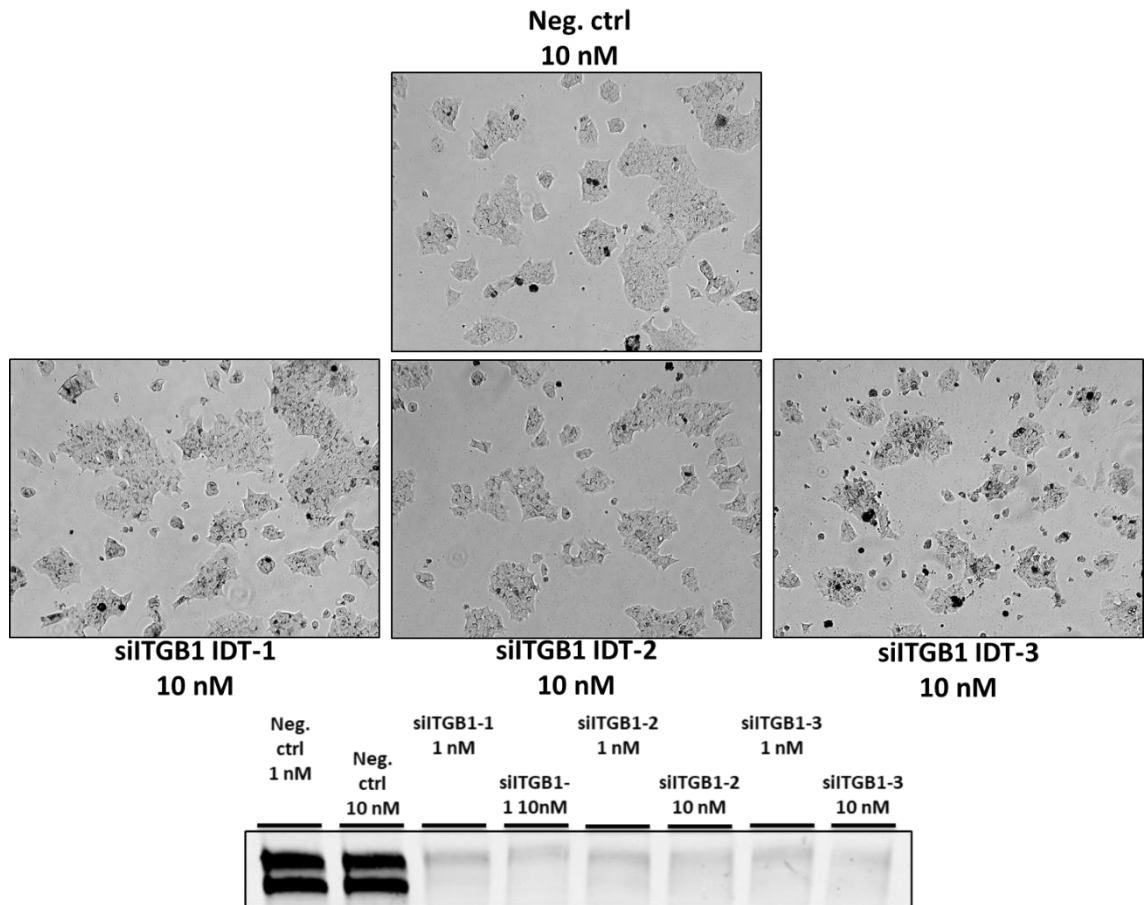
## 2.5 Hajaantuva fenotyyppi toistuminen sekvenssiltään erilaisilla ITGB1:n siRNA:illa

Kun työskennellään RNA-hiljennyksen kanssa, on tärkeää ottaa huomioon siRNA:iden niin sanottu sivukohdevaikutus (engl. *off-target effect*). Tällä

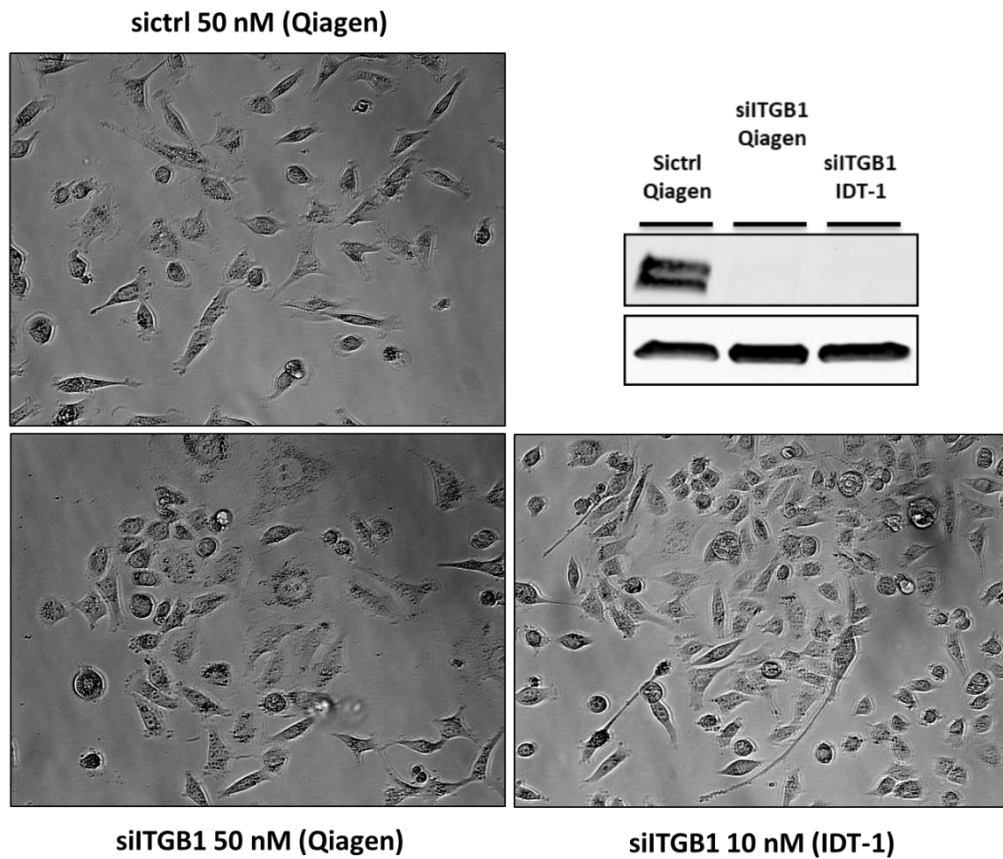
tarkoitetaan siRNA:iden epäspesifisyyttä, eli ne voivat vaikuttaa myös muiden kuin suunnitellun kohdegeenin ilmenemiseen. Yleinen tapa kiertää sivukohdevaikutusta on käyttää useita sekvenssiltään erilaisia siRNA:ita. Jos sama ilmiö havaitaan usealla eri siRNA:lla, se luultavasti johtuu nimenomaan kohdegeenin ekspression loppumisesta eikä sivukohdevaikutuksista.

Myös tässä erikoistyössä BT474-linjan hajaantuva fenotyyppi yritettiin toistaa kolmella uudella ITGB1:n siRNA:lla (IDT-1, IDT-2 ja IDT-3 siRNA), joiden sekvenssit poikkeava toisistaan ja alkuperäisestä (Qiagen siRNA). IDT:n kolmen ITGB1-siRNA:n ei havaittu muuttavan BT474-solujen morfologiaa samaan tapaan kuin Qiagenin ITGB1-siRNA (kuva 20). Visuaalisesti arvioiden ne eivät poikkea kontrollista ollenkaan. Western blotin perusteella IDT-siRNA:t hiljensivät ITGB1:n tehokkaasti (kuva 20). Korkeistaakaan (1, 10, 20 ja 40 nM) pitoisuuksista huolimatta hiljennys ei kuitenkaan ollut ikinä yhtä voimakasta kuin Qiagenin siRNA:lla. Joka tapauksessa vaikuttaa hyvin todennäköiseltä, että BT474-linjassa havaittu hajaantuva fenotyyppi johtuu ITGB1-siRNA:n epäspesifisistä vaikutuksista tai näiden ja ITGB1-hiljennyksen yhdistelmästä. Periaatteessa siis kaikkien aiemmin esitetyt tulokset voivat johtua osittain tai kokonaan sivukohdevaikutuksista.

Koska paljastui, että BT474-linjan muutos epiteelisestä kohti mesenkymaalisempaa morfologiaa johtuu luultavasti siRNA:n sivuvaikutuksista, toistettiin myös MDA-MB-231-linjan ITGB1-hiljennykset uudella siRNA:lla. MDA-MB-231 oli aiemmin reagoanut ITGB1-hiljennykseen päinvastoin kuin BT474: mesenkymaaliset solut muuttui kohti epiteelimäisempää morfologiaa. Mikroskooppikuvien perusteella uusi IDT-1-siRNA vaikutti MDA-MB-231-soluihin samaan tapaan kuin Qiagenin siRNA, eli ulkomuoto muuttui epiteelimäisemmäksi (kuva 21). Ero kontrolliin ei tosin ole kiistattoman selkeä. Ajan loppumisen takia MDA-MB-231-linjassa hiljennys ehdittiin toistaa vain yhdellä IDT:n siRNA:lla.



**Kuva 20. ITGB1-geenin hiljennykset BT474-linjassa kolmella IDT:n siRNA:lla.** Alunperin Qiagenin ITGB1-siRNA:lla BT474-linjassa toteutetut hiljennykset toistettiin IDT:n sekvenssiltään erilaisilla siRNA:illa. Nyt ITGB1-hiljennetyt solut eivät silmämääräisesti poikkea kontrollisoluista, vaikka hiljennys on western blotin perusteella onnistunut hyvin. On todennäköistä, että Qiagenin siRNA:n aiheuttama morfologian muutos johtui kokonaan tai osittain sivukohdevaikutuksesta.



**Kuva 21. ITGB1-geenin hiljennys MDA-MB-231-linjassa alkuperäisellä (Qiagen) ja sekvenssiltään poikkeavalla (IDT-1) siRNA:lla. Silmämääräisestä arvioituna molemmat ITGB1-siRNA:t muuttavat MDA-MB-231-solulinjan morfologiaa mesenkymaalisesta epiteelimäisempään. Western blot vahvistaa hiljennyksen onnistuneen tehokkaasti.**

### 3 Pohdinta

Erikoistyössä tutkittiin, miten ITGB1-geenin hiljentäminen vaikuttaa rintasyöpäsoluminjojen, erityisesti BT474-linjan, morfologiaan, migraatioon ja proteiinien ilmenemiseen. ITGB1-hiljennys muutti BT474-linjan epiteelimäisiä ominaisuuksia mesenkymaaliseen suuntaan. Vastaavia muutoksia havaittiin myös muissa rintasyöpäsoluminjoissa. Hiljennyksellä oli vaikutuksia myös E-kadheriinin ilmenemiseen. Western blot -kalvolla erottui kaksi erikokoista E-kadheriiniproteiinia, ja immunofluoresenssivärjäys paljasti ITGB1-hiljennetyillä BT474-soluilla olevan useita fenotyyppisiä suhteissa E-kadheriiniekspressioon. Vaikka osassa siITGB1-soluista E-kadheriinia ei juuri esiintynyt solukalvolla, sen endosytoosi ei ollut lisääntynyt koko populaation tasolla. E-kadheriinin kolokalisaatioanalyysi EEA1:n ja LAMP1:n kanssa ei myöskään antanut viitteitä, että se siirtyisi endosomaaliseen kuljetukseen tai lysosomaaliseen hajotukseen. ITGB1-hiljennys lisäsi BT474-linjan migraatiota mutta ei vaikuttanut jakautumisnopeuteen. ITGB1-geeni hiljennettiin myös kolmella muulla sekvenssiltään poikkeavalla siRNA:lla, jolloin aiemmin havaittua morfologian muutosta ei havaittu. Tämä viittaa siihen, että ainakin osa erikoistyön tuloksista johtuu siRNA:n sivukohdevaikutuksista.

Koska kaikki kokeet suoritettiin Qiagenin siRNA:lla, sen sivukohdevaikutus asettaa kaikki erikoistyön tulokset jossain määrin kyseenalaisiksi. Tässä kohtaa onkin helppo todeta, että on aina tärkeää toistaa kokeet useammalla siRNA:lla. Näin toimittiin myös tässä erikoistyössä. Rinnakkaiset siRNA:t olisi hyvä ottaa käyttöön riittävän ajoissa, että mahdolliset epäspesifiset vaikutukset huomataan aikaisessa vaiheessa, jolloin niihin voidaan myös reagoida paremmin. Toisaalta on myös arvioitava, milloin tehty havainto on riittävän merkittävä, että rinnakkaisiin siRNA:ihin ja toistokokeisiin on mielekästä käyttää aikaa ja muita resursseja. Toistokokeet kuitenkin tehdään vain kokeille, joista on saatu kiinnostavilta tai epävarmoilta vaikuttavia tuloksia.

Vaikka on todennäköistä, että BT474:n hajaantuva fenotyyppi johtuu siRNA:n epäspesifisyydestä, on vielä poissuljettava erilaisten hiljennystehojen vaikutus. Qiagenin ITGB1-siRNA:lla hiljensi aina kohdegeeninsä visuaalisesti arvioituna aika lailla 100-prosenttisesti. IDT:n siRNA:t olivat myös tehokkaita, mutta ne



jättivät kuitenkin jonkin verran  $\beta$ 1-integriiniä soluihin. On mahdollista että hajaantuvan fenotyypin ilmeneminen edellyttää ITGB1:n kokonaisvaltaista poistamista. ITGB1-hiljennys toistettiin myös korkeammilla 20 nM:n ja 40 nM:n pitoisuuksilla, mutta hiljennysteho ei merkittävästi parantunut. Yksinkertaisin tapa varmistua asiasta lienee ITGB1:n poistaminen CRISPR-Cas9-tekniikalla, mutta sitä ei erikoistyön aikana ehditty saattamaan loppuun. CRISPR-Cas9-menetelmä tosin kärsii myös samasta sivukohdevaikutuksien mahdollisuudesta. Huomautetaan vielä, että hajaantuva fenotyyppi onnistuttiin toistamaan Qiagenin ITGB1-siRNA:lla myös IDT-siRNA-hiljennyksien jälkeen. Näin ollen ero ei selity sillä, että BT474-linja olisi muuntunut erikoistyön aikana.

Seuraavaksi olisi selvitettävä, mihin geeneihin Qiagenin ITGB1-siRNA hajaantuvassa fenotyypissä vaikuttaa. Varma tapa selvittää asia olisi vertailla kontrolli- ja siITGB1-solujen RNA-tasoa RNA-sekvensoinnilla, mutta ainakin erikoistyön suorittamisen aikaan (2016–2017) se oli vielä kohtuullisen kallista. Qiagen itse ehdottaa kahta geeniä, joihin heidän ITGB1-siRNA:nsa voi vaikuttaa epäspesifisesti: PWWP2A ja ARHGEF10. PWWP2A on kromatiiniin sitoutuva transkription säätelijä, joka ohjaa ihmisessä mitoosin etenemistä (Link ja muut 2018). ARHGEF10 puolestaan säätelee E-kadheriinin saatavuutta ja stabiilisuutta (Welsh 2014). Sitä pidetään myös tuumorisuppressorigeeninä haiman duktaaliossa adenokarsinoomassa (Joseph ja muut 2019). ARHGEF10 vaikuttaa hieman lupaavammalta ehdokkaalta, koska Qiagenin siRNA:lla tehty hiljennys vaikutti soluliitoksien määrään ja E-kadheriinin sijaintiin BT474-linjassa. Nämä muutokset voisivat periaatteessa johtua ARHGEF10:n kuvatus toiminnan häiriintymisestä. Tämän hypoteesin testaaminen vaatisi toki lisätutkimuksia.

Kaikesta huolimatta vaikuttaisi siltä, että nimenomaan ITGB1-geenin hiljentäminen muutti kuitenkin MDA-MB-231-linjan morfologiaa. Tämä tulos ei ollut aivan selvä, koska ero ei ollut suuri, arvio tehtiin lähinnä silmämääräisesti ja käytettiin vain yhtä IDT:n siRNA:ta. Qiagenin ja IDT:n ITGB1-siRNA:lla käsitellyt MDA-MB-231 solut muistuttivat kuitenkin enemmän toisiaan kuin kontrollia. Tämän varmistamiseksi MDA-MB-231 ITGB1-hiljennys olisi hyvä vielä toistaa kaikilla neljällä siRNA:lla, ja yrittää löytää tapa kvantifioida

muutosta. Periaatteessa on mahdollista, että esimerkiksi hieman erilaiset konfluenssit voivat häiritä silmämääräistä arviointia.

Erikoistyössä ei saatu selville, miksi Qiagenin ITGB1-RNA:lla tehty hiljennys tuottaa western blot kalvolle toisen E-kadheriininauhan, tai mikä se on. Vastaavia kaksoisnauhoja olivat löytäneet muutkin, ja he kutsuivat proteiinikooltaan suurempaa prosessoimattomaksi E-kadheriiniksi (Fujita ja muut 2002; Yang ja muut 2006). E-kadheriini tuotetaan 135 kDa:n esiaste-proteiinina, josta leikataan N-terminaalinen osa pois (Beavon 2000). Esiaste-E-kadheriinin leikkaaminen on välttämätöntä sen oikealle toiminnalle, eikä leikkaamatonta muotoa edes toimiteta trans-Golgista solukalvolle asti (Ozawa ja Kemler 1990; Geng ja muut 2012). Immunofluoresenssikuvissa nähty solun sisäinen E-kadheriini, jota oli runsaasti ITGB1-soluissa, voisi näin olla prosessoimatonta muotoa, joka ei pääse solukalvolle. Tämä selittäisi myös tuloksen kolokalisaatioanalyysistä, jossa siITGB1-käsittely ei lisännyt E-kadheriinin esiintymistä EEA1:n tai LAMP1:n läheisyydessä, vaikka solun sisäinen E-kadheriini vaikutti lisääntyvän. Solun sisäinen E-kadheriini ei siis johtuisi endosytoosista, vaan häiriöstä esiasteen käsittelyssä.

Kolokalisaatioanalyysin ja endosytoosikokeen tulokset sinänsä sopivat yhteen esiaste-E-kadheriinihypoteesin kanssa, mutta on huomautettava ongelmista niiden toteutuksessa. Ensinnäkin kumpikaan koe ei ota huomioon immunofluoresenssikokeen havaintoa, että siITGB1-käsittely tuotti useita erilaisia populaatioita, joissa E-kadheriini käyttäytyi eritavalla. Epäselvää on myös se, miksi näitä erilaisia populaatioita edes syntyi. Biologisten tulosten vaihtelu on toki tyyppillistä, eikä välttämättä edellytä suuria toimenpiteitä. Näin vähillä tiedoilla eri fenotyypeistä oli kuitenkin luotettavampaa ja yksinkertaisempaa käsitellä eri populaatioita yhtenä ryhmänä. Lisäksi molemmissa kokeissa toistomäärät ovat vielä liian pienet. Varsinkin E-kadheriinin endosytoosikokeen kaksi toistoa on vielä täysin riittämätön kunnollisiin johtopäätöksiin, ja sen tilastollinen käsittely olisi yliampuvaa. Joskus kokeen ei-merkittävä tulos voi jopa paljastua tilastollisesti merkitseväksi ihan vain toistomäärää kasvattamalla. Tässä vaiheessa tuloksia tulisi ehkä nimittää alustaviksi.

E-kadheriinin endosytoosikokeessa käytettyjä aikapisteitä on myös hieman kritisoitava. Ne oikeastaan valittiin mielivaltaisesti. Ennen kokeen suorittamista ei ollut mitään käsitystä, kuinka kauan E-kadheriinin endosytoosissa kestää. Ehkä esimerkiksi pidemmällä (yli 30 min) endosytoosiajoilla tulisi selvemmin esille, onko kontrollin ja siITGB1-solujen sisäännotetun E-kadheriinin määrässä eroja. Tilanne saattaa ollakin juuri tämä, sillä 30 minuutin kohdalla jonkinlaista eroa alkoi muodostua kontrollin ja siITGB1:n välillä. Lyhyempiä aikoja ei kuitenkaan tarvitse enää kokeilla, koska lyhyemmällä ajoilla ei tunnistettu havaittavaa määrää sisäännotettua E-kadheriinia.

Maljan kaksikulotteinen *in vitro* -ympäristö on eläinsoluille epätyypillinen, joten niiden käyttäytyminen saattaa poiketa paljon verrattuna kudosympäristöön. Näin ollen on tärkeää pyrkiä toteuttamaan kokeita myös kolmiulotteisesti ja mielellään jopa *in vivo*. Erikoistyön aikana yritettiin esimerkiksi tarkastella siITGB1 BT474-solujen morfologiaa kolmiulotteisessa matrigeelissä, mutta siinä ei onnistuttu toivotusti. Tämä linja jakautuu varsin hitaasti, jolloin siITGB1-hiljennys ehtii hiipua, ennen kuin pesäkkeet ovat kasvaneet riittävän suuriksi. Ensisijaisesti pyrittiin tarkastelemaan hajaantuvan fenotyypin morfologiaa ja migraatiota. Tämän ongelman voi välttää CRISPR-Cas9-tekniikalla, jolla haluttu proteiini saadaan poistettua pysyvästi. ITGB1-poistogeenistä BT474-linjan valmistus tosiaan aloitettiin, mutta ei sitä ehditty saattamaan loppuun erikoistyön aikana.

Erikoistyössä kokeiltiin myös jonkinlaista *in vivo* -koetta, kun siITGB1 BT474-soluja injektointiin seeprakalan (*Danio rerio*) alkioihin. Näin oltaisiin voitu esimerkiksi vertailla kontrolli- ja siITGB1-solujen migraatiota ja invaasiota. Kummatkaan solut eivät kuitenkaan selvinneet tässä malliorganismissa riittävän kauan, jotta kokeesta oltaisiin saatu edes jonkinlaisia tuloksia.

Yhteenvetona löydettiin useista rintasyöpäsolulinjoista tavanomaisesta poikkeavia fenotyyppisiä. Mikä fenotyyppi aiheuttaa, jää kuitenkin suuressa osassa epäselväksi, sillä ITGB1-geenin lisäksi sivukohdevaikutus hiljensi soluista myös ainakin yhden toistaiseksi tuntemattoman geenin. Ensisijaisen tärkeää olisi selvittää, mitä soluista on poistettu, jotta pystytään arvioimaan muiden tulosten merkittävyyttä. Tuntemattoman geenin poisto, yhdessä tai

yksin ITGB1-geenin, lisäsi tarkemmin tutkitun rintasyöpäsolulinjan liikkuvuutta, joten sillä voi olla merkitystä rintasyövän leviämisessä. Kun syöpien levittäytymistä opitaan tulevaisuudessa tuntemaan paremmin, voidaan niiden hoitamiseksi kehittää entistä tehokkaampia ja kohdennetumpia hoitoja.

## 4 Materiaalit ja menetelmät

### 4.1 Solujen kasvatus

**BT474**-solut (ATCC HTB-20) kasvatettiin RPMI-1640-mediumissa (Sigma-Aldrich R5886), johon oli lisätty 10 % (V/V) naudan sikiön seerumia (engl. *fetal bovine serum*, FBS, Sigma-Aldrich F7524), 10 mmol L-glutamiinia (Sigma-Aldrich G7513) ja 1 % (V/V) penisilliini/streptomysiiniä (Sigma-Aldrich P0781). **MDA-MB-361**-solut (ATCC HTB-27) kasvatettiin Dulbecco's modified essential medium -mediumissa (Sigma-Aldrich D5796), johon oli lisätty 20 % (V/V) FBS:ä, 10 mmol L-glutamiinia ja 1 % (V/V) penisilliini/streptomysiiniä. **MCF7**- (ATCC HTB-22) ja **MDA-MB-231**-solut (ATCC HTB-26) kasvatettiin Dulbecco's modified essential medium -mediumissa, johon oli lisätty 10 % (V/V) FBS:ä, 10 mmol L-glutamiinia ja 1 % (V/V) penisilliini/streptomysiiniä. **MCF10A DCIS.com**-solut (saatu kuten Pietilä ja muut 2019) kasvatettiin DMEM/F12 -mediumissa (Invitrogen #11330-032), johon oli lisätty 5 % (V/V) hevosen seerumia (Invitrogen #16050-122), 20 ng/ml ihmisen epidermaalista kasvutekijää (Sigma-Aldrich E9644), 0,5 mg/ml hydrokortisonia (Sigma-Aldrich H0888), 10 ng/ml koleratoksiinia, 10 µg/ml insuliinia (Sigma-Aldrich I9278) ja 1 % (V/V) penisilliini/streptomysiiniä.

Solut kasvatettiin 37 °C:ssa 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa. Mediumi pestiin pois fosfaattipuskuroidulla suolaliuoksella (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, Sigma-Aldrich D8537) ja solut irrotettiin trypsiini–etyleenidiamiinitetraetikkahapolla (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA, Sigma-Aldrich T4174).

### 4.2 RNA-hiljennykset

Transfektiot toteutettiin Lipofectamine RNAiMAX-reagenssilla (Invitrogen 13778). RNAiMAX ja siRNA sekoitettiin erillisiin putkiin, joissa oli Opti-MEM reduced serum medium -mediumia (31985 Gibco). Putket yhdistettiin, ja seosta inkuboitiin 10 minuuttia huoneenlämmössä. Transfektioseos lisättiin solujen päälle niiden tavanomaiseen mediumiin, joka vaihdettiin juuri ennen transfektiota. RNAiMAX:n loppupitoisuus solujen päällä oli 0,2 % (V/V), siRNA:n 50 nM (IDT:n siRNA:iden kanssa 1–40 nM) ja OptiMEM:n 20 %. Käytettyjen siRNA:iden tiedot on esitetty taulukossa 1. Transfektion annettiin tapahtua kaksi

vuorokautta tai viikonlopun yli, minkä jälkeen solut jaettiin ja/tai medium vaihdettiin.

**Taulukko 1. Transfektioissa käytetyt siRNA:t**

<b>siRNA</b>	<b>juosteparin sekvenssit</b>	<b>Valmistaja Luettelo #</b>
FlexiTube siRNA Hs_ITGB1_9	5'-AGAUGAAGUUAACAGUGAATT-3' 5'-UUCACUGUUAACUUCAUCUGT-3'	Qiagen, SI02662590
TriFECTa Kit DsiRNA duplex hs.Ri.ITGB1.13.1	5'-ACUCUUGUCAGCUAAGGUCACA UTG-3' 5'-CAAUGUGACCUUAGCUGACAAG AGUAA-3'	IDT 153303114
TriFECTa Kit DsiRNA duplex hs.Ri.ITGB1.13.2	5'-JUGGUGGCAUUGUUUUACCAA UGA-3' 5'-UCAUUUGGUAAAACAAUGCCAC CAAGU-3'	IDT 153303111
TriFECTa Kit DsiRNA duplex hs.Ri.ITGB1.13.3	5'-GACUGUUCUUUGGAUACUAGUA CTT-3' 5'-AAGUACUAGUAUCCAAAGAACAG UCAC-3'	IDT 153303108
Allstars negative control	Ei ilmoitettu	Qiagen 1027281

#### **4.3 Proteiinitasojen tunnistaminen Western blot -menetelmällä**

Solujen medium pestiin pois PBS:llä, ja ne hajotettiin lyysauspuskurilla (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% triton X-100, 0,5% glyseroli, 1% natriumdodekyylisulfaatti (SDS), complete protease inhibitor tabletti (Roche), phos-stop tabletti (Roche)). Lysaatti kaavittiin maljoilta Eppendorf-putkiin, näytteitä sonikoitiin 5 minuuttia 30 sekunnin jaksoilla ja tauoilla. Lysaattien proteiinipitoisuus määritettiin tarvittaessa DC protein assay:n (BioRad) avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Näytteisiin lisättiin SDS-näytepuskuri, ja niitä inkuboitiin 10 minuuttia 90 °C. Näytteet ajettiin 4–20 % Mini-PROTEAN TGX Gel -geelillä, ja erotellut proteiinit siirrettiin nitroselluloosamembraanille Trans-

Blot Turbo Transfer System -laitteella (BioRad). Membraanit blokattiin 5 % (m/V) maitojauhe-TBST:ssä (Tris-puskuroitu suolaliuos ja 0,1 % Tween 20) heilutuksessa 30 minuuttia. Membraania inkuboitiin primääri-vasta-aineessa yön yli 4 °C lämpötilassa. Seuraavana päivänä membraani pestiin TBST:llä 3 kertaa 5 minuutin inkubaatiolla heilutuksessa huoneenlämmössä. Membraani siirrettiin sekundäärivasta-aineeseen, ja sitä inkuboitiin 1 h pyörittimestä huoneenlämmössä. Membraanin kolme TBST-pesua toistettiin, minkä jälkeen se skannattiin Odyssey-infrapunakuvauslaitteella (LI-COR). Vasta-aineet laimennettiin Odyssey Blocking Buffer:n ja PBS:n 1:1 -seokseen.

Käytetyt vasta-aineet ja laimennussuhteet olivat seuraavat: **integrin  $\beta$ 1**, rabbit, Abcam, ab183666, 1:1000; **integrin  $\beta$ 3**, rabbit, CST, 4702S, 1:1000; **integrin  $\beta$ 4**, mouse, Abcam, ab29042, 1:1000; **E-cadherin**, mouse, Abcam, ab1416, 1:500;  **$\alpha$ -tubulin**, mouse, Hybridoma bank, 1:3000; GAPDH, mouse, Hytest Ltd., 5G4 Mab6C5, 1:2000; **vimentin**, mouse, Santa Cruz, sc-6260; **cyclin D1**, mouse, Santa Cruz, 72-13G, 1:1000; **HER2**, mouse, Invitrogen, MA5-14057, 1:1000; **GGA2**, mouse, BD Biosciences, 612612, 1:1000; **anti-mouse IRDye 800CW**, donkey, LI-COR, 926-32212, 1:2000; **anti-mouse IRDye 680RD**, donkey, LI-COR, 926-68072, 1:2000; **anti-rabbit IRDye 800CW**, donkey, LI-COR, 926-32213, 1:2000; **anti-rabbit IRDye 680RD**, donkey, LI-COR, 926-68073, 1:2000.

#### 4.4 Solujen kuvaus, värjäykset ja kolokalisaatioanalyysi

Valomikroskooppikuvat otettiin EVOS fl -mikroskoopilla. Ajastettu kuvaus tehtiin Incucyte-järjestelmällä (Essen BioScience), jolla soluja kuvattiin samoista kohdista kahden tunnin välein viikon ajan.

Immunofluoresenssikuvauksista varten solut siirrettiin  $\mu$ -slide 8 well -liuskalle (Ibidi). Medium pestiin pois PBS:llä, ja solut fiksattiin 4 % (m/V) paraformaldehydillä PBS:ssä huoneenlämmössä 15 minuuttia. Fiksausaine pestiin pois PBS:llä kolme kertaa. PFAH vaimennettiin 50 mM NH<sub>4</sub>Cl:lla 15 minuuttia huoneenlämmössä. Solut muutettiin läpäiseviksi inkuboimalla 15 minuuttia huoneenlämmössä 0,3 % (V/V) Triton X-100:ssa, joka oli sekoitettu 30 % (V/V) hevosen seerumiin PBS:ssä. Primäärivasta-aineet ja sekoitettiin 30 % (V/V) hevosen seerumiin PBS:ssä, ja soluja inkuboitiin seoksessa yön yli 4 °C

lämpötilassa. Vasta-aineseos pestiin pois PBS:llä kolme kertaa, ja soluja inkuboitiin 1h huoneenlämmössä sekundäärivasta-aineissa ja DAPI:ssa (4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli, 1:1000), jotka oli sekoitettu 30 % (V/V) hevosen seerumiin PBS:ssä. Lopuksi pestiin solut kolme kertaa ja jätettiin PBS:ään. Kuvat otettiin Zeiss LSM780 -konfokaalimikroskoopilla.

Immunofluoresenssivärjäyksissä käytettiin seuraavia primäärivasta-aineita: **E-cadherin**, mouse, Abcam, ab1416, 1:300; **E-cadherin**, rabbit, Cell Signaling, 3195S, 1:300; **EEA1**, goat, Santa Cruz, sc-6415, 1:50; **LAMP1**, mouse, Santa Cruz, sc-20011, 1:50, **HER2**, mouse, Thermo Fisher Scientific, MA5 14057, 1:400. Sekundäärivasta-aineina käytettiin Thermo Fisher Scientificin vasta-aineita 1:300 laimennoksella. Näitä olivat: anti-mouse AlexaFluor 488, anti-rabbit AlexaFluor 488, anti-mouse AlexaFluor 568, anti-goat AlexaFluor 568 ja anti-mouse AlexaFluor 647.

#### **4.5 Kolokalisaatioanalyysi ja solujen keskimääräisen pinta-alan mittaus**

Tutkittaville soluille tehtiin immunofluoresenssivärjäys, ja ne kuvattiin Zeiss LSM780 -konfokaalimikroskoopilla. ImageJ-ohjelmalla kuvien fluoresenssi-signaalit jaettiin omille kanavilleen aallonpituuden perusteella. Pearsonin korrelaatio kerroin laskettiin eri kanavien väliltä coloc2-liitännäisohjelman avulla oletusasetuksilla. Saaduille korrelaatiokertoimille tehtiin riippumattomien otosten t-testi GraphPad Prism -ohjelmalla.

MDA-MB-361-solujen keskimääräinen pinta-ala mitattiin immunofluoresenssikuvista, jotka oli otettu Zeiss LSM780:llä solun keskitasosta. Kaikki kuvat otettiin samalla objektiivilla 40x objektiivilla. ImageJ-ohjelmalla rajattiin manuaalisesti yli kolme solua sisältävät pesäkkeet, ja saatu pinta-ala jaettiin tumien lukumäärällä. Eri tavalla käsiteltyjen solujen keskimääräisiä pinta-aloja vertailtiin toisiinsa GraphPad Prism -ohjelman riippumattomien otosten t-testillä.

#### **4.6 E-kadheriinin biotiinipohjainen endosytoosikoe**

Ennen kokeen aloittamista solut hiljennettiin 4.2-luvussa kuvatulla tavalla ja jaettiin tämän jälkeen tasaisesti pienemmille 6 cm maljoille. Seuraavana päivänä maljat aseteltiin jäälle, ja medium pestiin pois kylmällä PBS:llä. Solun



pintaproteiinit leimattiin 0,5 mg/ml EZlink cleavable sulfo-NHS-SS-biotin -valmisteella (Thermo Fisher Scientific 21331), joka oli liuotettu jääkylmään Hanks' Balanced Salt solution -liuokseen (Sigma-Aldrich H9269). Soluja inkuboitii tässä seoksessa jäällä 30 minuuttia. Biotiiniliuos poistettiin, ja endosytoosin annettiin käynnistyä lisäämällä 37 °C lämmintä seerumitonta mediumia. Solut pidettiin tässä lämpötilassa näytteestä riippuen 0–30 minuuttia, mutta 0 minuuttia -näyte pidettiin jäällä, ja biotiinin tilalle vaihdettiin jääkylmä seerumiton medium. Kun näytteen endosytoosiaika tuli täyteen, solut siirrettiin jäälle, medium imettiin, ja pinnalle jäänyt biotiini poistettiin 60 mM natrium-2-merkaptotaanisulfonaatilla (MesNa) MesNa-puskurissa (50 mM Tris-HCl pH 8,6; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,2 % (m/V) BSA). Pinnan totaali E-kadheeri -näytteet käsiteltiin kuten 0 minuuttia, mutta Mesnan sijasta soluille lisättiin vain Mesna-puskuria. Kun kaikki aikapisteet olivat tässä vaiheessa, soluja inkuboitii jäällä vielä 30 minuuttia. MesNa vaihdettiin 100 mM jodiasetamidiin PBS:ssä, ja inkuboitii 15 minuuttia jäällä. Jodiasetamidi poistettiin, ja solut hajotettiin kaapimalla lyysauspuskurissa (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1,5 % (V/V) Triton X-100; 100 mM NaCl, complete protease inhibitor tabletti (Roche), phos-stop tabletti (Roche)).

Lysaatit siirrettiin Eppendorf-putkiin ja pyöritettiin 30 minuuttia 4 °C, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin (10000 g, 10 min, 4 °C). Säästettyihin supernatanttiin lisättiin E-kadheriinivasta-ainetta (Abcam, ab1416, 1:50) immunosaostusta varten, ja inkuboitii 4°C:ssa pyöriyksessä yön yli. Seuraavaksi lysaatteja inkuboitii Protein G Sepharose -helmissä (GE Healthcare) 2 h 4 °C pyöriyksessä. Helmet oli ennen tätä pesty kolme kertaa 1:3 lyysauspuskuri-PBS-seoksella. Lyysauspuskuri-PBS-pesut toistettiin inkubaation päätyttyä. Pesujen jälkeen proteiinit eluoiitiin helmistä ei-pelkistävällä Laemmli-näytepuskurilla. Näytteet denaturoitiin 100 °C 7 minuuttia heiluttaen. Western blot suoritettiin kuten 4.3-luvussa, mutta biotiini havaittiin anti-biotin horseradishperoxidase-linked Ab -vasta-aineella (Cell Signaling Technology #7075) kemiluminesenssimenetelmällä (engl. *enhanced chemiluminescence*). Aikapistenäytteiden E-kadheriinin kokonaismäärä tarkistettiin samalta membraanilta Odyssey-infrapunakuvauslaitteella. Proteiinitasot kvantifioitiin

ImageJ-ohjelmalla, ja biotiinin määrä normalisoitiin kyseisen näytteen E-kadheriinin kokonaismäärään.

#### **4.7 Haavanparantumiskoe**

6-kuoppalevyn kaivoihin aseteltiin silikoniset scratch-insertit (Ibidi). Kuhunkin insertin kuoppaa siirrettiin 120 000 solua, ja niiden annettiin kiinnittyä alustaansa vuorokauden. Sopiva solumäärä oli määritetty aiemmin silmämääräisesti. Seuraavana päivänä insertit irroitettiin varovasti, ja kuvattiin 0 päivän kuvat. Haavan parantumista kuvattiin vuorokauden välein viikon ajan samasta kohdasta. Haavan pinta-ala mitattiin valomikroskooppikuvista (EVOS fl) ImageJ-ohjelmalla. Viimeisen päivän haavan pinta-ala jaettiin 0-päivän haavan pinta-alalla, ja kontrolli- sekä siTGB1-käsiteltyjen solujen lukuja vertailtiin GraphPad Prism -ohjelman riippumattomien otosten t-testillä.

#### **4.8 Proliferaatiokoe**

Kontrolli- tai siTGB1-hiljennettyjä soluja siirrettiin 96-kuoppalevylle 3000 solua per kuoppa 100 µl tilavuuteen. Taustana käytettiin RPMI-1640-mediumia, ja haihtumisen vähentämiseksi testikuopat ympäröitiin PBS-kuopilla. Solujen annettiin kasvaa 1, 4 tai 8 päivää. Kun solut olivat kasvaneet nimetyn ajan, niille lisättiin 10 µl WST-8-reagenssia (Sigma-Aldrich 96992) ja inkuboitiin 2h 37°C 5 % hiilidioksidissa. Kunkin kuopan absorbanssi mitattiin 450 nm. Kunkin solukuopan absorbanssista vähennettiin soluttoman taustan absorbanssi. 4 ja 8 d absorbanssilukemat normalisoitiin 1 d absorbanssiin. Proliferaatiokäyrä piirrettiin GraphPad Prism ohjelmalla.

#### **4.9 AIB2-kiinnittymiskoe**

Kokeen aloitusta edeltävänä päivänä pinnoitettiin 48-kuoppalevyn kuoppia 1 % (m/V) BSA:lla, 10 µg/ml fibronektiinillä tai 10 µg/ml kollageeni I:llä PBS:ssä. Lisäksi osaan pinnoittamattomista kuopista lisättiin 20000 BT474-solua kiinnittymään ennen koepäivää. Inkuboitiin yön yli 37 °C.

Koepäivänä pinnoittamattomiin, BSA-, fibronektiini- tai kollageeni I -kuoppiin siirrettiin 20000 BT474-solua, joita oli inkuboitu 15 minuuttia huoneenlämmössä koemediumissa (vain 1 % (V/V) FBS) ja AIB2-vasta-aineessa (Hybridoma

bank; 0, 1:50, 1:25 tai 1:10). Maljauksen jälkeen kuoppiin lisättiin vasta-ainetta puolet inkubaatiossa käytetystä (0, 1:100, 1:50 tai 1:20). Valmiiksi maljatuille soluille vaihdettiin koemedium ja lisättiin AIB2-vasta-aine. Soluja kasvatettiin koemedium–AIB2:ssa seuraavaan päivään ja kuvattiin EVOS fl -mikroskoopilla.

## Lähteet

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2014) *Molecular biology of the cell*, 6. painos, s. 565–1144. Garland Science, New York.

Ananthakrishnan, R. & Ehrlicher, A. (2007) The forces behind the cell movement. *Int J Biol Sci* **3**:303–317.

Assoian, R. K. & Schwartz, M. A. (2001) Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* **11**:48–53.

Battle, E. & Clevers, H. (2017) Cancer stem cells revisited. *Nat Med* **23**:1124–1134.

Beavon, I. R. G. (2000) The E-cadherin–catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer* **36**:1607–1620.

Bledzka, K., Bialkowska, K., Sossey-Alaoui, K., Vaynberg, J., Pluskota, E., Qin, J. & Plow, E. F. (2016) Kindlin-2 directly binds actin and regulates integrin outside-in signaling. *J Cell Biol* **213**:97–108.

Blows, F. M., Driver, K. E., Schmidt, M. K., Broeks, A., van Leeuwen, F. E., Wesseling, J., Cheang, M. C., Gelmon, K., Nielsen, T. O., Blomqvist, C., Heikkilä, P., Heikkinen, T., Nevanlinna, H., Akslen, L. A., Bégin, L. R., Foulkes, W. D., Couch, F. J., Wang, X., Cafourek, V., Olsen, J. E., Baglietto, L., Giles, G. G., Severi, G., Mclean, C. A., Southey, M. C., Rakha, E., Green, A. R., Ellis, I. A., Sherman, M. E., Lissowska, J., Anderson, W. F., Cox, A., Cross, S. S., Reed, M. W. R., Provenzano, E., Dawson, S. J., Dunning, A. M., Humphreys, M., Easton, D. F., García-Closas, M., Caldas, C., Pharoah, P. D. & Huntsman, D. (2010) Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* **7**:e1000279.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and

mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**:394–424.

Campellone, K. G. & Welch, M. D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:237–251.

Cesare, A. J. & Reddel R. R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* **11**:319–330.

Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J. & Nielsen, T. O. (2009) Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**:736–750.

Clevers, H. (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**:313–319.

Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J. & Shi, B. (2015) Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* **5**:2929–2943.

de Pereda, J. M., Ortega, E., Alonso-García, N., Gómez-Hernández, M. & Sonnenberg, A. (2009) Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* **3**:361–364.

del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J. M. & Sheetz, M. P. (2009) Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* **323**:638–641.

Etienne-Manneville, S. (2013) Microtubules in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **29**:471–499.

Fragomeni, S. M., Sciallis, A. & Jeruss, J. S. (2018) Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* **27**:95–120.

Fraley, S. I., Feng, Y., Krishnamurthy, R., Kim, D.-H., Celedon, A., Longmore, G. D. & Wirtz, D. (2010) A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional motility. *Nat Cell Biol* **12**:598–604.

Friedl, P. & Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**:362–374.

Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. & Segall, J. E. (2012) Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* **14**:777–783.

Frisch, S. M. & Ruoslahti, E. (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**:701–706.

Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T. & Birchmeier W. (2002) Hakai, a c-Cbl protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol* **4**:222–231.

Geiger, B. & Yamada, K. M. (2011) Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a005033.

Geng, F., Zhu, W., Anderson, R. A., Leber, B. & Andrews, D. W. (2012) Multiple post-translational modifications regulate E-cadherin transport during apoptosis. *J Cell Sci* **125**:2615–2625.

Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B., & Brunton, V. G. (2017) Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Dis Model Mech* **10**:1061–1074.

Gómez-Lamarca, M. J., Cobreros-Reguera, L., Ibáñez-Jiménez, B., Palacios, I. M. & Martín-Bermudo, M. D. (2014) Integrins regulate epithelial cell differentiation by modulating Notch activity. *J Cell Sci* **127**:4667–4678.

Guo, L., Cai, T., Chen, K., Wang, R., Wang, J., Cui, C., Yuan, J., Zhang, K., Liu, Z., Deng, Y., Xiao, G. & Wu, C. (2018) Kindlin-2 regulates mesenchymal stem cell differentiation through control of YAP1/TAZ. *J Cell Biol* **217**:1431–1451.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57–70.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**:646–674.

- Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D. & Humphries, M. J. (2015) Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* **17**:1577–1587.
- Humphries, J. D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M. J. & Ballestrem, C. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* **179**:1043–1057.
- Humphries, J. D., Chastney, M. R., Askari, J. A. & Humphries, M. J. (2019) Signal transduction via integrin adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* **56**:14–21.
- Hüsemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G. & Klein, C. A. (2008) Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* **13**:58–68.
- Huttenlocher, A. & Horwitz A. R. (2011) Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**:a005074.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**:673–687.
- Januškevičienė, I. & Petrikaitė, V. (2019) Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sci* **239**:117009.
- Joseph, J., Radulovich, N., Wang, T., Raghavan, V., Zhu C. Q. & Tsao M. S. (2019) Rho guanine nucleotide exchange factor ARHGEF10 is a putative tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **39**:308–321.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F. & Waterman, C. M. (2010) Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**:580–584.

- Kechagia, J. Z., Ivaska, J. & Roca-Cusachs, P. (2019) Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**:457–473.
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. (2017) Emerging biological principles of metastasis. *Cell* **168**:670–691.
- Lammermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Förster, R., Critchley, D. R., Fässler, R. & Sixt, M. (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**:51–55.
- Leduc, C., Etienne-Manneville, S. (2015) Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects. *Curr Opin Cell Biol* **32**:102–112.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A. V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C. K. & Wu, D. (2003) Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**:215–227.
- Link, S., Spitzer R. M. M., Sana, M., Torrado, M., Völker-Albert, M. C., Keilhauer, E. C., Burgold, T., Pünzeler, S., Low, J. K. K., Lindström, I., Nist, A., Regnard, C., Stiewe, T., Hendrich, B., Imhof, A., Mann, M., Mackay, JP., Bartkuhn, M. & Hake S. B. (2018) PWWP2A binds distinct chromatin moieties and interacts with an MTA1-specific core NuRD complex. *Nat Commun* **9**:4300.
- Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**:307–315.
- Luo, B.-H., Carman, C. V. & Springer, T. A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**:619–647.
- Lv, H., Li, L., Sun, M., Zhang, Y., Chen, L., Rong, Y. & Li, Y. (2015) Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness. *Stem Cell Res Ther* **6**:103.



- Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bösl, M., Zent, R., Moser, M. & Fässler, R. (2008) Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev* **22**:1325–1330.
- Naci, D. & Aoudjit, F. (2014) Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways. *Cell Signal* **26**:2008–2015.
- Nassour, J., Radford, R., Correia, A., Fusté, J. M., Schoell, B., Jauch, A., Shaw, R. J. & Karlseder, J. (2019) Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. *Nature* **565**:659–663.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. (2016) EMT:2016 *Cell* **166**:21–45.
- Obenauf, A. C. & Massagué, J. (2015) Surviving at a distance: organ specific metastasis. *Trends Cancer* **1**:76–91.
- Osawa, M. & Kemler, R. (1990) Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J Cell Biol* **111**:1647–1650.
- Pan, L., Zhao, Y., Yuan, Z., Qin, G. (2016) Research advances on structure and biological functions of integrins. *Springerplus* **5**:1094.
- Park, C. C., Zhang, H., Pallavicini, M., Gray, J. W., Baehner, F., Park, C. J. & Bissell, M. J. (2006)  $\beta$ 1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures in vivo. *Cancer Res* **66**:1526–1535.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O. & Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**:747–752.
- Petrie, R. J., Gavara, N., Chadwick, R. S. & Yamada, K. M. (2012) Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3D cell migration. *J Cell Biol* **197**:439–455.

Petrie, R. J. & Yamada, K. M. (2016) Multiple mechanisms of 3D migration: the origins of plasticity. *Curr Opin Cell Biol* **42**:7–12.

Pietilä, M., Sahgal, P., Peuhu, E., Jäntti, N. Z., Paatero, I., Närvä, E., Al-Akhrass, H., Lilja, J., Georgiadou, M., Andersen, O. M., Padzik, A., Sihto, H., Joensuu, H., Blomqvist, M., Saarinen, I., Boström, P. J., Taimen, P. & Ivaska, J. (2019) SORLA regulates endosomal trafficking and oncogenic fitness of HER2. *Nat Commun* **10**:2340.

Provenzano, E., Ulaner, G. A. & Chin, S. F. (2008) Molecular classification of breast cancer. *PET Clin* **13**:325–338.

Puglisi, F., Fontanella, C., Amoroso, V., Bianchi, G. V., Bisagni, G., Falci, C., Fontana, A., Generali, D., Gianni, L., Grassadonia, A., Moscetti, L., Portarena, I., Rossi, E. & Marchetti, P. (2016) Current challenges in HER2-positive breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **98**:211–221.

Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105–111.

Reymond, N., d'Água, B. B. & Ridley, A. J. (2013) Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* **13**:858–870.

Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parson, J. T. & Horwitz, A. R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**:1704–1709.

Rogel, M. R., Soni, P. N., Troken, J. R., Sitikov, A., Trejo, H. E. & Ridge, K. M. (2011) Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells. *FASEB J* **25**:3873–3883.

Sobinoff, A. P. & Pickett, H. A. (2017) Alternative lengthening of telomeres: DNA repair pathways converge. *Trends Genet* **33**:921–932.

Sosa, M. S., Bragado, P. & Aguirre-Ghiso, J. A. (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* **14**:611–622.

Sporn, M. B. (1996) The war on cancer. *Lancet* **347**:1377–1381.

Suomen syöpärekisteri. (2019) Syöpä 2017. <[https://syoparekisteri.fi/assets/files/2019/10/sy%C3%B6p%C3%A42017\\_raportti.pdf](https://syoparekisteri.fi/assets/files/2019/10/sy%C3%B6p%C3%A42017_raportti.pdf)> (Luettu 19.11.2019).

Suomen virallinen tilasto SVT (2017) 1. Kuolemansyyt 2017. <[http://www.stat.fi/til/ksyyt/2017/ksyyt\\_2017\\_2018-12-17\\_kat\\_001\\_fi.html](http://www.stat.fi/til/ksyyt/2017/ksyyt_2017_2018-12-17_kat_001_fi.html)>. (Luettu 14.8.2019).

Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E. & Børresen-Dale A. L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10869–10874.

Sørlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A. L. & Botstein, D. (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8418–8423.

Takada, Y., Ye, X. & Simon, S. (2007) The integrins. *Genome Biol* **8**:215.

Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. & Springer, T. A. (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**:599–611.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transition in development and disease. *Cell* **139**:871–890.

Tolomelli, A., Galletti, P., Baiula, M. & Giacomini, D. (2017) Can integrin agonists have cards to play against cancer? A literature survey of small molecules integrin activators. *Cancers (Basel)* **9**:78.

Viallard, C. & Larrivé, B. (2017) Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* **20**:409–426.

Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:778–790.

- Welsh, N. J. (2014) Guanine nucleotide exchange factor regulation of adherens junction biogenesis and maturation. Imperial college London. Department of life sciences. PhD Thesis.
- Whittaker, C. A. & Hynes, R. O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* **13**:3369–3387.
- Wolfenson, H., Bershadsky, A., Henis, Y. I. & Geiger B. (2011) Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions. *J Cell Sci* **124**:1425–1432.
- Yang, J. Y., Zong, C. S., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Li, Z., Broglio, K., Berry, D. A. & Hung, M. C. (2006) MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol* **26**:7269–7282.
- Ye, F., Hu, G., Taylor, D., Ratnikov, B., Bobkov, A. A., McLean, M. A., Sligar, S. G., Taylor, K. A. & Ginsberg, M. H. (2010) Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J Cell Biol* **188**:157–173.
- Ye, X., Tam, W. L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Eaton, E. & Weinberg, R. A. (2015) Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* **525**:256–260.
- Yoshigi, M., Hoffman, L. M., Jensen, C. C., Yost, H. J. & Beckerle, M. C. (2005) Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J Cell Biol* **171**:209–215.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. & Geiger, B. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**:858–867.
- Zaidel-Bar, R. & Geiger, B. (2010) The switchable integrin adhesome. *J Cell Biol* **123**:1385–1388.