



**Kollageenireseptori α_2 -integriini säätelee
eturauhassyöpäsolujen geeniekspressiota ja invaasiota**

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Biokemia

Helmikuu 2018

Marjaana Parikainen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO
Biokemian laitos

PARIKAINEN, MARJAANA: Kollageenireseptori α_2 -integriini säätelee eturauhassyöpäsolujen geeniekspressiota ja invaasiota

Pro gradu -tutkielma, 75 s., 3 liites.
Biokemia
Helmikuu 2018

Syövän kantasolut ovat kantasolunkaltaisia erilaistumattomia syöpäsoluja, jotka pystyvät synnyttämään uuden kasvaimen. Syövän kantasolujen solusykli on hitaampaa ja ne kestävät syöpähoitoja paremmin kuin erilaistuneet syöpäsolut. Siten ne saattavat aiheuttaa syövän uusiutumisen. Eturauhassyövän kantasoluissa ilmentyy paljon $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä, joka välittää solujen sitoutumista soluväliaineeseen, erityisesti kollageeni I:een. $\alpha_2\beta_1$ -integriinillä on tärkeä rooli eturauhassyövän leviämisessä luuhun, jonka soluväliaine koostuu pääasiassa $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ligandista, kollageeni I:stä. Erikoistyössä tutkittiin, miten α_2 -integriini vaikuttaa DU145-eturauhassyöpäsolujen geenien ilmentymiseen ja invaasioon.

Erikoistyössä käytettiin neljää DU145-solutyyppeä: 1) $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentäviä villityypin soluja DU145WT (α_2^+), 2) DU145KO (α_2^-) -soluja, joista α_2 -integriinin geeni on poistettu CRISPR/Cas9-tekniikalla, 3) DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluja, joihin α_2 -integriinin ilmentyminen on palautettu transfektoimalla DU145KO (α_2^-) -soluihin α_2 -integriinin geeni sekä 4) DU145KO+vektori (α_2^-) -soluja, joihin on transfektoitu kontrollivektori. Tutkimuksessa käytettiin 2D- ja 3D-solukasvatusmalleja sekä 2D-kasvatuksissa erilaisia kasvualustoja. DU145-solutyyppeiden välillä NGS-tulosten perusteella erilaisesti ilmentyvien geenien ekspressiota tutkittiin qPCR:llä RNA-tasolla ja Western blot -menetelmällä proteiinitasolla. Proteiinien lokalisaatiota tarkasteltiin immunofluoresenssimikroskopialla. Lisäksi tutkittiin solujen invaasiota Matrigeeliin ja kollageeni I:een.

qPCR:llä tutkittujen 12 geenin solutyyppeiden väliset ilmentymiserot noudattivat sekvenssinnin tuloksia. qPCR-tulosten perusteella valikoitujen VWA2:n (tyvikalvoproteiini) ja PKP1:n (soluadheesioproteiini) ilmentymiserot proteiinitasolla olivat samansuuntaiset kuin RNA-tasolla. Lisäksi havaittiin, että $\alpha_2\beta_1$ -kollageeni I -vuorovaikutus lisäsi solutyyppeiden välisiä RNA-ilmentymiseroja suurimmalla osalla tutkituista 12 geenistä, minkä perusteella α_2 -integriinin aktivoituminen säätelee näiden geenien ilmentymistä. Mikroskopialla tutkittujen VWA2-, PKP1- ja SVEP1 (soluadheesioproteiini) -proteiinien lokalisaatiossa ei havaittu eroja solutyyppeiden välillä. Invaasiokokeiden tulosten perusteella α_2 -integriiniä ilmentävät DU145-solut olivat invasiivisempia sekä Matrigeeliin että kollageeni I:een. Erikoistyön tulosten perusteella α_2 -integriini säätelee eturauhassyöpäsolujen geeniekspressiota ja lisää solujen invaasiota. Siten $\alpha_2\beta_1$ -integriiniin kohdentuvan syöpähoidon avulla voitaisiin mahdollisesti estää eturauhassyövän luuetäpesäkkeiden muodostuminen.

ASIASANAT: $\alpha_2\beta_1$ -integriini, eturauhassyöpä, geeniekspressio, invaasio

Kiitos koko integriiniperheelle sekä erityisesti ohjaajilleni Marjaana Ojalillille, Elina Siljamäelle ja Jyrki Heinolle kaikesta avusta, tuesta, kahvihetkistä ja ystävydestä erikoistyön aikana ja sen jälkeen.

SISÄLTÖ

LYHENTEET	4
OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS	7
1 JOHDANTO KIRJALLISUUSKATSAUKSEEN	7
2 SYÖVÄN TUNNUSPIIRTEET	8
2.1 Proliferaatiota ylläpitävä signaali.....	8
2.2 Kasvua estävien tekijöiden torjuminen.....	9
2.3 Solukuoleman estäminen.....	10
2.4 Kyky jakautua rajattomasti.....	10
2.5 Angiogeneesin käynnistäminen.....	11
2.6 Genomin epävakaas ja mutatoituminen.....	11
2.7 Kasvainta edistävä tulehdus.....	11
2.8 Energia-aineenvaihdunnan uudelleenohjelmointi.....	12
2.9 Immunituholta välttyminen.....	12
2.10 Invaasion ja metastaasin aktivoituminen.....	13
2.10.1 Syövän mikroympäristö ja metastaasi.....	14
2.10.2 Epiteeli-mesenkyymitransitio.....	16
2.10.3 Kiertävät syöpäsolut.....	17
2.10.4 Syövän kantasolut.....	19
2.10.5 Kolonisaatio.....	22
2.10.6 Luumetastaasi.....	24
3 INTEGRINIIT JA SYÖPÄ	27
3.1 Integriinit.....	27
3.2 Integriinit syövässä.....	28
3.3 $\alpha_2\beta_1$ -integriini syövässä.....	30
3.3.1 $\alpha_2\beta_1$ -integriini syövän invaasiassa ja metastaasissa.....	30
3.3.2 $\alpha_2\beta_1$ -integriini syöpäsolujen proliferaation säätelijänä.....	32

3.3.3 $\alpha_2\beta_1$ -integriini syövän angiogeenisissä.....	33
3.3.4 $\alpha_2\beta_1$ -integriini kemoresistenssissä ja syövän kantasoluissa.....	33
3.3.5 α_2 -integriinin ilmentymisen säätely.....	34
3.4 Eturauhassyövän kantasolut ja $\alpha_2\beta_1$ -integriini.....	34
3.4.1 $\alpha_2\beta_1$ -integriini normaalin eturauhaskudoksen kantasoluissa.....	35
3.4.2 $\alpha_2\beta_1$ -integriini eturauhassyövän kantasoluissa.....	35
3.4.3 Eturauhassyövän kantasolumarkkerien kyseenalaisuus.....	36
3.5 $\alpha_2\beta_1$ -integriini eturauhassyövän luumetastaasissa.....	38
3.5.1 $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ja kollageeni I:n välinen vuorovaikutus invaasiassa.....	38
3.5.2 $\alpha_2\beta_1$ -integriini ja matriksin hajotus.....	38
3.5.3 $\alpha_2\beta_1$ -integriini–kollageeni I -vuorovaikutus eturauhassyövän luumetastaasissa.....	39
3.5.4 $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ilmentyminen luumetastaasissa.....	40
OSA II: KOKEELLINEN OSUUS.....	43
4 TYÖN TAVOITTEET.....	42
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	43
5.1 Käytetyt solulinjat ja kasvatusolosuhteet.....	43
5.1.1 Käytetyt solulinjat ja solujen kasvatus.....	43
5.1.2 Kasvualustat.....	43
5.1.3 α_2 -integriinin ilmenemisen määrittäminen virtaussytometrisesti.....	44
5.1.4 Sferoidien kasvatus.....	44
5.2 Geenien RNA-tason ilmentymisen tutkiminen.....	45
5.2.1 RNA:n eristäminen ja cDNA-synteesi.....	45
5.2.2 Käytetyt alukkeet ja koettimet.....	45
5.2.3 Kvantitatiivinen PCR.....	46
5.3 Geenien proteiinitason ilmentymisen tutkiminen.....	47
5.3.1 Proteiinitason ilmentyminen Western blot -menetelmällä.....	47
5.3.2 Proteiinien lokalisaatio 2D-kasvatusmallissa.....	48
5.3.3 Proteiinien lokalisaatio sferoideissa.....	48
5.4 Solujen invaasiokyvyn tutkiminen.....	49

5.4.1 DU145-solujen invaasio Matrigeelin läpi.....	49
5.4.2 Sferoidien levittäytyminen kollageeni I:llä.....	50
5.4.3 Sferoidien invaasio kollageeni I:een.....	50
5.5 Tulosten tilastollinen tarkastelu ja kuvaajien piirtäminen.....	50
6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU.....	51
6.1 DU145-solutyypit ilmentävät eri määriä α_2 -integriiniä solukalvoillaan.....	51
6.2 Geenit ilmenevät erilaisesti solutyypin välillä RNA- ja proteiinitasolla.....	52
6.2.1 Sekvensoinnin tulokset toistuivat kvantitatiivisen PCR:n avulla.....	55
6.2.2 Samansuuntaisia geenien ilmentymiseroja havaittiin myös proteiinitasolla.....	57
6.2.3 α_2 -integriini ei vaikuta tutkittujen proteiinien lokalisaatioon.....	60
6.2.4 $\alpha_2\beta_1$ -integriinin aktivoituminen ligandivuorovaikutuksessa säätelee useimpien tutkittujen geenien ilmentymistä.....	63
6.3 α_2 -integriini lisää DU145-solujen migraatiota ja invaasiota.....	65
6.3.1 α_2 -integriini lisää solujen invaasiota Matrigeelin läpi.....	65
6.3.2 α_2 -integriini lisää DU145-solujen liikettä ja invaasiota kollageeni I:een.....	67
7 POHDINTA.....	70
LIITTEET.....	76
LÄHTEET.....	79

LYHENTEET

APS	ammoniumpersulfaatti
ATP	adenosiinitrifosfaatti, <i>engl.</i> adenosine triphosphate
BMP	luun morfogeneettinen proteiini, <i>engl.</i> bone morphogenetic protein
BSA	naudan seerumin albumiini, <i>engl.</i> bovine serum albumin
CHD5	kromodomeenihelikaasi-DNA:ta sitova proteiini 5: <i>engl.</i> chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5
CDH5	kadheriini 5, <i>engl.</i> cadherin 5
C _t -arvo	kynnyssykli; alin fluoresenssitaso, jolla voidaan havaita taustasta erottuva amplifikaatiosta johtuva fluoresenssi
DABCO	1,4-diaatsabisyklo[2.2.2]oktaani
DAPI	4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli, <i>engl.</i> 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DTT	ditiotreitoli
DU145WT (α_2^+)	$\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentävät villityypin DU145-solut
DU145KO (α_2^-)	DU145-solut, joista on CRISPR/Cas9-tekniikalla poistettu α_2 -integriinin geeni
DU145KO+ α_2 (α_2^+)	solut, joihin α_2 -integriinin ilmentyminen on palautettu transfektoimalla DU145KO (α_2^-) -soluihin α_2 -integriinin geeni
DU145KO+vektori (α_2^-)	$\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentämättömät solut, joihin on transfektoitu kontrollivektori
EGF	epidermaalinen kasvutekijä, <i>engl.</i> epidermal growth factor
EMT	epiteeli-mesenkyymitransitio
FAK	fokaaliadheesiokinaasi
FC	<i>engl.</i> fold change, kuvastaa sitä, kuinka moninkertainen jokin arvo on toiseen arvoon verrattuna
FCS	naudan sikiön seerumi, <i>engl.</i> fetal calf serum
FGF	fibroblastikasvutekijä, <i>engl.</i> fibroblast growth factor
FITC	fluoreseiini-5-isotiosyanaatti, <i>engl.</i> fluorescein-5-isothiocyanate

FN	fibronektiini
HIF	hypoksian indusoima tekijä, <i>engl.</i> hypoxia-inducible factor
IGF	insuliininkaltainen kasvutekijä, <i>engl.</i> insulin-like growth factor
IL	interleukiini
kDa	kilodalton
KIF26B	kinesiiniperheen jäsen 26B, <i>engl.</i> kinesin family member 26B
Kol I	kollageeni I
KSF-medium	seerumiton keratinosyyttimediumi, <i>engl.</i> keratinocyte serum-free medium
LGI1	leusiinipitoinen gliomassa inaktivoitu 1, <i>engl.</i> leucine rich glioma inactivated 1
MAPK	mitogeenien aktivoima proteiinikinaasi
MET	mesenkyymi-epiteelitransitio
MMP	matriksin metalloproteinaasi
NF-κB	tumatekijä kappa B, <i>engl.</i> nuclear factor kappa B
NGS	uuden sukupolven sekvensointi, <i>engl.</i> next-generation sequencing
PAP	eturauhasen hapan fosfataasi, <i>engl.</i> prostatic acid phosphatase
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos, <i>engl.</i> phosphate buffered saline
PBST	PBS, johon on lisätty 0,1 % Triton X-100
PCR	polymeraasiketjureaktio, <i>engl.</i> polymerase chain reaction
PDGF	verihitulekasvutekijä, <i>engl.</i> platelet-derived growth factor
PenStrep	penisilliini-streptomysiini
PFA	paraformaldehydi
PET	positroniemissiotomografia
PI3K	fosfoinositidi-3-kinaasi, <i>engl.</i> phosphoinositide 3-kinase
PKP1	plakofiliini 1, <i>engl.</i> plakophilin 1
PSA	prostataspesifinen antigeeni
RANK	NF-κB:n reseptoriaktivaattori, <i>engl.</i> receptor activator of NF-κB
RBP1	retinoliin sitoutuva proteiini 1, <i>engl.</i> retinol-binding protein 1
SCARA5	keräilijäreseptorien luokka A jäsen 5, <i>engl.</i> scavenger receptor class A member 5

SDC2	syndekaani 2, <i>engl.</i> syndecan 2
SDS	natriumdodekyylisulfaatti, <i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi, <i>engl.</i> SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	keskiarvon standardivirhe, <i>engl.</i> standard error of the mean
SVEP1	sushi, von Willebrand -tekijä tyyppi A, EGF- ja pentraksiini-domeenin sisältävä proteiini 1; <i>engl.</i> sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing protein 1
SYK	pernan tyrosiinikinaasi, <i>engl.</i> spleen tyrosine kinase
TBST	Tris-puskuroitu suolaliuos, jossa 0,05 % Tween-20; <i>engl.</i> 0,05 % Tween-20 in Tris-buffered saline
TGF- β	transformoiva kasvutekijä β , <i>engl.</i> transforming growth factor β
TEMED	tetrametyylietyleenidiamiini, <i>engl.</i> tetramethylethylenediamine
VEGF	vaskulaarinen endoteelikasvutekijä, <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor
VE-kadheriini	vaskulaarinen endoteelikadheriini, <i>engl.</i> vascular endothelial cadherin
VWA2	von Willebrandin tekijä A -domeenin sisältävä proteiini 2, <i>engl.</i> von Willebrand factor A domain containing protein 2

OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS

1 JOHDANTO KIRJALLISUUSKATSAUKSEEN

Syövän eteneminen on monivaiheinen prosessi, jonka yhteydessä syöpäsoluille usein kehittyy kyky lähteä liikkeelle primäärikasvaimesta ja muodostaa etäpesäkkeitä muualle elimistöön. Metastaattisen syövän hoitoon ei tällä hetkellä ole tehokkaita hoitokeinoja, ja metastaasien muodostuminen johtaa tyypillisesti syöpäpotilaan menehtymiseen. Hoitokeinojen kehittäminen edellyttää syövän kehityksen mekanismien sekä metastaaseja aiheuttavien tekijöiden tuntemusta.

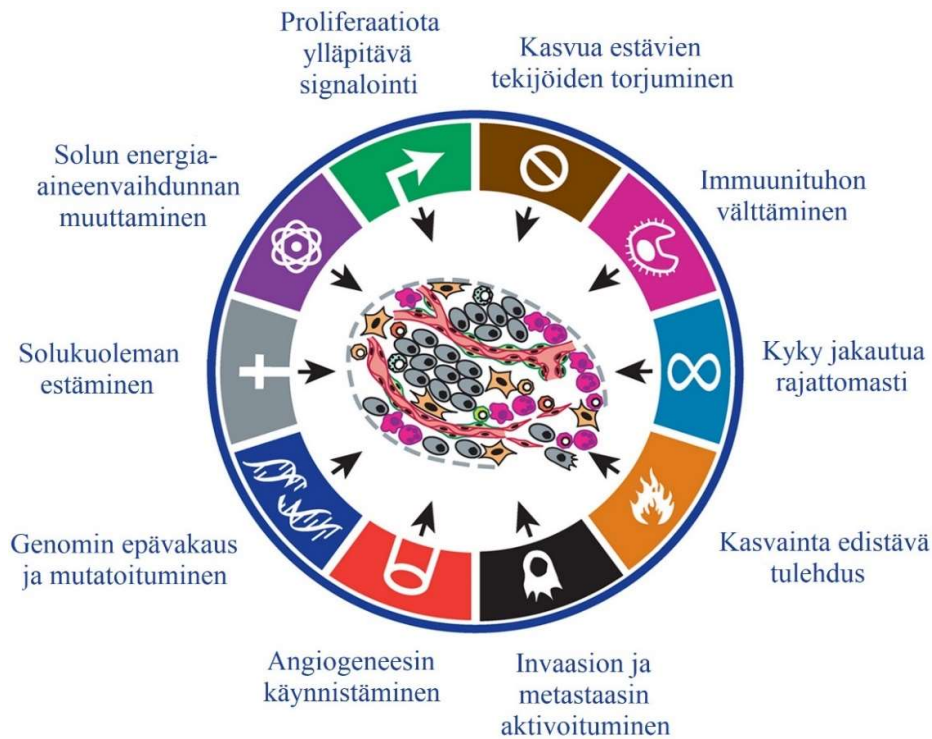
Kirjallisuuskatsauksessa esitellään syöpäkasvaimien tyypilliset piirteet sekä syöpäsolujen invaasion ja metastaasin mekanismeja. Erikoistyössä tutkittiin α_2 -integriinin roolia eturauhassyöpäsolujen geeniekspression ja invaasion säätelijänä, joten myös kirjallisuuskatsauksessa keskitytään erityisesti eturauhassyövän metastaasien muodostumiseen sekä integriinien ja soluväliaineen rooliin syövässä. Eturauhassyöpä lähettää etäpesäkkeitä tyypillisesti luuhun, joten $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ja sen ligandin, luuympäristön yleisimmän proteiinin kollageeni I:n, välinen vuorovaikutus voi olla merkittävä tekijä eturauhassyövän metastaasissa.

2 SYÖVÄN TUNNUSPIIRTEET

Syöpää esiintyy useissa eri muodoissa ja eri kudoksissa, ja jokaiseen syöpään liittyy erilaiset yhdistelmät geneettisiä ja epigeneettisiä muutoksia, joihin vaikuttaa syövän paikallinen ympäristö. Syövän kehittymisessä kuitenkin pätevät pääsääntöisesti samat peruspiirteet, niin kutsutut syövän tunnuspiirteet (Hanahan ja Weinberg 2000 ja 2011). Syövän tunnuspiirteet ovat toiminnallisia ominaisuuksia, jotka mahdollistavat syöpäsolujen selviytymisen, proliferaation eli kasvun ja jakautumisen sekä leviämisen. Eri syövissä nämä ominaisuudet saadaan eri mekanismeilla ja eri vaiheissa monivaiheista syövän kehityskaarta. Syövän tunnuspiirteinä voidaan pitää proliferatiivisen signaloinnin ylläpitämistä, kasvua estävien tekijöiden ja solukuoleman välttämistä, kykyä jakautua rajattomasti sekä muodostaa uusia verisuonia angiogeneesillä, invaasion ja metastaasin aktivoitumista, energia-aineenvaihdunnan uudelleenohjelmointia ja immuunipuolustuksen tuhon välttämistä (kuva 1). Näitä tunnuspiirteitä mahdollistavat mutaatioita tuottava genomisen epävakaas, kasvainta edistävä tulehdusreaktio sekä kasvaimen strooman solut ja mikroympäristö. Alla on lyhyesti esitelty Hanahanin ja Weinbergin määrittelemät syövän tunnuspiirteet, erityisesti invaasion ja metastaasin aktivoitumiseen keskittyen.

2.1 Proliferaatiota ylläpitävä signaali

Solujen signaali koostuu useista toisiinsa vaikuttavista ja keskenään risteävistä signaalintireiteistä, ja syöpäsoluihin kohdistuu niiden sisäisen signaloinnin lisäksi ulkoisia signaaleja strooman soluista ja soluväliaineesta. Solusignaloinnin avulla solut mukauttavat geeniekspressiotaan, sopeutuvat ympäristöönsä ja proliferoivat. Syövässä solujen proliferaatio on häiriytynyt normaalista tarkasti säädellystä tilastaan, ja syöpäsolut kasvavat ja jakautuvat hallitsemattomasti. Tämä piirre johtuu proliferaatiota säätelevien signaalintireittien epänormaalista toiminnasta, esimerkiksi kasvua edistäviä signaaleja välittävien reseptorien lisääntyneestä aktivaatiosta kohonneen kasvutekijä-konsentraation seurauksena tai jopa ilman ligandia. Syöpäsolut voivat tuottaa itse kasvutekijöitä tai saada strooman solut tuottamaan niitä (Bhowmick ja muut 2004; Cheng ja muut 2008). Akt on yksi useimmin hyperaktivoituneista proteiiniokinaaseista syövässä ja lähes kaikista Akt-signaalintireitin osista on löydetty mutaatioita tai amplifikaatioita useissa eri syövissä (Cheng ja muut 2005; Yuan ja Cantley 2008). Ras-ERK-signaalintireitti osallistuu solujen proliferaation ja selviytymisen lisäämiseen, ja myös tämän signa-



Kuva 1. Syövän tunnuspiirteet. Jokaisella syöpätyypillä on omat ominaispiirteensä ja jokaisen syövän kehittyminen tapahtuu erilaisten geneettisten ja epigeneettisten mutaatioiden kautta. Syöpäkasvaimilla on kuitenkin myös yhteisiä tunnuspiirteitä, jotka ovat edellytyksiä syövän kehittymiselle tai seurauksia syöpäsolujen kontrolloimattomasta kasvusta ja syöpäkasvaimen olosuhteista. Syöpäsolujen proliferaatio on tyypillisesti hallitsematonta ja rajatonta, ja syöpäsolujen täytyy välttää erilaiset solukuolemaa aiheuttavat tekijät. Kasvua ylläpitääkseen syöpäkasvain muodostaa oman verisuonistonsa kuljettamaan ravinteita ja aineenvaihduntatuotteita. Syöpäsolujen täytyy sietää genomin epävakautta ja uusia ominaisuuksia aiheuttavia mutaatioita sekä välttyä immuunijärjestelmän puolustusmekanismeilta. Kasvaimen ympäristössä vallitseva tulehdusreaktio sekä kasvaimen mikroympäristö ja strooman solut edesauttavat syöpäsolujen selviytymistä ja kehittymistä. Syöpäsolut voivat lähteä liikkeelle primäärikasvaimesta ja muodostaa metastaaseja kaukaisiin kohde-elimiin. Metastaasin muodostuminen johtaa tyypillisesti potilaan menehtymiseen. Kuva muokattu lähteestä Hanahan ja Weinberg (2011).

lontireitin osat ovat usein mutatoituneet syövässä. Noin kolmasosa kaikista ihmisen kasvaimista ilmentää jatkuvasti aktiivisessa muodossa olevaa Ras-GTPaasia (Bos 1989). Ras voi ERK-signalointireitin lisäksi aktivoida myös Akt-signaloinnin (Rodriguez-Viciano ja muut 1994).

2.2 Kasvua estävien tekijöiden torjuminen

Proliferaation kasvattamisen lisäksi syöpäsolujen täytyy välttää kasvua rajoittavat tekijät, jotka monesti aktivoituvat solun signaaloinnin joutuessa epätasapainoon epänormaalin proliferaation seurauksena. Tällaisia kasvua rajoittavia tekijöitä ovat monet tuumorin suppressorigeenit, kuten retinoblastoomaproteiini ja p53. Retinoblastoomaproteiini säätelee solusykliä estämällä etenemisen S-vaiheeseen ja edistämällä solujen

erilaistumista (Weinberg 1995), kun taas p53 säätelee solujen vastetta stressitiloihin, kuten DNA-vaurioon, hapen puutteeseen ja onkogeenien aktivoitumiseen, ja voi estää solusykliin etenemisen tai tarvittaessa käynnistää apoptoosin (Bieging ja muut 2014; Muller ja Vousden 2014). Syövässä suppressorigeenit usein inaktivoituvat; p53 on syövässä useimmin mutatoitunut geeni, josta löytyy muutoksia noin 50 % ihmisen syövästä (Kandoth ja muut 2013).

2.3 Solukuoleman estäminen

Syöpäsolu on erilaisten apoptoosia aiheuttavien stressiolosuhteiden alaisena, esimerkiksi sen genomissa on usein mittavia vaurioita ja signalointi on epätasapainossa. Syövän etenemisen kannalta on tärkeää, että syöpäsoluille kehittyy kyky välttää apoptoosi, esimerkiksi inaktivoimalla proapoptoottisia proteiineja ja p53:n kaltaisia tuumorin suppressorigenejä tai lisäämällä apoptoosin vastaista signalointia. Esimerkiksi Bim, Bel-2-perheen apoptoosia edistävä tekijä, voi estää leukemiaa välittämällä Myc-transkriptiotekijän aiheuttamaa apoptoosia (Huang ja Strasser 2000), ja siten Bim-proteiinin puute voi edistää syövän kehitystä aktivoituneiden onkogeenien yhteydessä.

2.4 Kyky jakautua rajattomasti

Makroskooppisen kasvaimen muodostuminen edellyttää, että syöpäsolut pystyvät jakautumaan rajattomasti. Normaaliin solujen jakautumista rajoittaa kromosomien päissä olevien telomeerien lyhentymisen seurauksena, sillä DNA-polymeraasi ei pysty kopioimaan kromosomien 3'-päästä täydellisesti (Harley ja muut 1990). Telomeerit estävät kromosomien päiden yhteenliittymistä ja DNA:n hajoamista (Blackburn ja muut 2006). Kun telomeereista tulee kriittisen lyhyet, käynnistyy DNA-vauriovaste, ja solut ajautuvat replikaatiiviseen seneskenssiin ja apoptoosiin. Apoptoottisen signaloinnin ollessa häiriytynyt syöpäsolussa, esimerkiksi p53:n inaktivoitumisen seurauksena, syöpäsolut pystyvät välttymään telomeerien lyhentymisen aiheuttamalta apoptoosilta ja jakautumaan, mikä johtaa lopulta kromosomiston epävakauteen (Hackett ja Greider 2002). Siten telomeerien lyhentymisen voi sekä estää syövän etenemistä aiheuttamalla solukuolemaa tai, apoptoottisen signaalin ollessa häiriytynyt, edistää syövän kehitystä aiheuttamalla genomien mutatoitumista. Useimmissa syövässä solut alkavat normaalista poiketen tuottamaan telomeraasiensyymiä, joka pystyy pidentämään telomeerejä (Greider ja Blackburn 1985). Telomeraasiaktiivisuus on

välttämätöntä rajattomalle solukasvulle, ja siten sillä on tärkeä rooli kasvaimen muodostumisessa ja kehityksessä (Kim ja muut 1994).

2.5 Angiogeneesin käynnistäminen

Syöpäkasvaimen kasvaessa sen nopeasti jakautuvat solut tarvitsevat jatkuvasti uutta verisuonistoa kuljettamaan ravinteita ja happea soluille sekä aineenvaihdunnan jätteitä ja hiilidioksidia pois. Aikuisen yksilön normaalit solut kykenevät muodostamaan uusia verisuoniharoja angiogeneesissä esimerkiksi kudoksen yhteydessä, kun taas syöpäsoluissa angiogeneesi on jatkuvasti aktiivisena (Hanahan ja Folkman 1996). Angiogeneesiin johtava signalointi on syöpäsoluissa häiriintynyt, ja kasvaimen verisuonisto on rakenteeltaan poikkeava: verisuonet muodostavat ylimääräisiä haaroja ja niiden seinämät ovat heikompia ja vuotavampia sekä suoniston endoteelisolujen käyttäytyminen epänormaalia (Baluk ja muut 2005). Kasvaimen verisuoniston vaste angiogeneesin vastaiseen hoitoon vaihtelee. VEGF:ää (*engl.* vascular endothelial growth factor, vaskulaarinen endoteelikasvutekijä) inhivoiva hoito estää vastamuodostuneiden verisuonten kasvua mutta on vähemmän tehokas vakinaisempia kasvaimen verisuonia kohtaan (Bergers ja Hanahan 2008; Helfrich ja muut 2010; Sitohy ja muut 2012).

2.6 Genomin epävakaas ja mutatoituminen

Syövän epävakaas genomi ja vähentynyt kasvukontrolli mahdollistavat jatkuvat uudet mutaatiot, joiden seurauksena syöpäsolut voivat saada kasvaimen kehitystä edistäviä uusia ominaisuuksia. Useimmissa syövässä vallitsee kromosomiston epävakaas, jossa kromosomien rakenne ja lukumäärät syöpäsoluissa ovat muuttuneet (Albertson ja muut 2003; Bayani ja muut 2007; Ye ja muut 2007). Kasvutekijäsignaloinnin aktivoituminen edistää heterotsygotian menetystä ja genomin epävakausta solukasvatuksissa *in vitro*, ihmisen syöpien ksenograffeissa sekä hiirimalleissa (Denko ja muut 1994; Felsner ja Bishop 1999; Di Micco ja muut 2006). Syöpäsoluissa useat genomin ylläpitosysteemin osat, kuten DNA-vaurioita havaitsevat ja korjausmekanismeja aktivoivat sekä toteuttavat tekijät toimivat epänormaalisti (Jackson ja Bartek 2009; Ciccio ja Elledge 2010).

2.7 Kasvainta edistävä tulehdus

Lähestulkoon jokaisessa syöpäkasvustossa on mukana vaihteleva määrä immuunisoluja (Pagès ja muut 2010). Kasvaimen mikroympäristössä olevat tulehdussolut ja niiden

tuottamat sytokiinit, kemokiinit ja prostaglandiinit säätelevät useita tulehdusreaktiota edistäviä vasteita, jotka voivat vaikuttaa sekä kudoksessa oleviin syöpäsoluihin että normaaleihin soluihin (Mantovani ja muut 2008). Prostaglandiinit edistävät syövän kehitystä inhiboimalla apoptoosia, edistämällä angiogeneesiä sekä lisäämällä syöpäsolujen migraatiota (Masferrer ja muut 2000). Prostaglandiinien tuotantoa lisäävien syklo-oksigenaasientsyymien määrä on koholla useassa eri syövässä, kuten rinta-, keuhko- ja eturauhassyövässä (Hwang ja muut 1998; Wolff ja muut 1998; Gupta ja muut 2000). Sytokiinit ja kemokiinit vaikuttavat useisiin syövän tunnuspiirteisiin, ja voivat esimerkiksi stimuloida epiteeli-mesenkyymitransitiota eli EMT:tä ja metastaasia (Giovanni ja muut 2008; Hanahan ja Coussens 2012).

2.8 Energia-aineenvaihdunnan uudelleenohjelmointi

Solujen kiihtynyt kasvu ja jakautuminen luovat paineita solun aineenvaihdunnalle tuottaa jatkuvasti solun proliferaatiota tukevia rakennusaineita. Syöpäsolut muuttavat energiantuotantaan niin kutsutun Warburgin vaikutuksen kautta, ja rajoittavat glukoosiainevaihduntansa myös hapen läsnä ollessa suurimmaksi osaksi glykolyysiin (Zheng 2012). Energiantuotannoltaan tehottomampaa glykolyysiä varten syöpäsolut lisäävät glukoosin kuljettajien määrää (Medina ja Owen 2002; Szablewski 2013). Glykolyysin suosimisen taustalla saattaa olla syöpäsolujen kasvanut tarve biosynteesin lähtöaineille, joita glykolyysin välituotteista voidaan muodostaa (Lunt ja Vander Heiden 2011). Glykolyysi on myös sitruunahappokiertoa nopeampi tapa tuottaa ATP:ta. Siten glykolyysin hyödyntäminen sitruunahappokierron sijaan voi olla proliferaatiota ajavien onkogeenien aktivaation seurausta. Kasvaimien lisääntyntä glukoosin sisäänottoa voidaan hyödyntää diagnostiikassa ja syövän seurannassa käyttämällä ¹⁸F-fluorodeoksiglukoosia PET-kuvantamisessa (positroniemissiotomografia) (Gambhir 2002). Glykolyysin tuottamat aineenvaihduntatuotteet, kuten laktaatti ja H⁺-ioni, aiheuttavat kasvaimen ympäristön happamoitumista, mikä edistää syövän invaasiota (Schornack ja Gillies 2003; Smallbone ja muut 2005).

2.9 Immunituholta välttyminen

Immuunipuolustus tunnistaa ja tuhoaa suurimman osan elimistössä epänormaalisti käyttäytyvistä soluista. Muodostaakseen makroskooppisia kasvaimia on syöpäsolujen onnistuttava välttämään immuunipuolustuksen tunnistus ja eliminointi. Monet kasvaimet

ilmentävät syövälle spesifisiä antigeenejä, joiden avulla immuunipuolustuksen solut voivat tunnistaa syöpäsolut tuhottavaksi. Syöpäsolut yksinään pystyvät aktivoimaan sytotoksiset T-solut mutta kasvaimen mikroympäristö pystyy suojaamaan syöpäsoluja tuholta ja säätelemään syöpäantigeenin tasoa ja tunnistusta (Ochsenbein ja muut 1999). Kasvaimesta lähtöisin olevat liukoiset tekijät voivat käynnistää useita mekanismeja, joiden avulla syöpäsolut välttyvät immuunipuolustukselta kasvaimen mikroympäristössä. Primäärikasvaimen ympäristöön eritetyt immunosuppressiiviset tekijät voivat levitä imusolmukkeisiin ja siten edistää syövän leviämistä. (Kim ja muut 2006.) Syöpä saattaa muodostua tilanteissa, joissa yksilön immuunijärjestelmän toiminta on heikentynyt. Suurempi syöpäriski on havaittu esimerkiksi immunosuppressoituilla munuais- (Birkeland ja muut 1995; Morath ja muut 2004) tai sydänsiirtopotilailla (Pham ja muut 1995). Joillekin elinsiirtopotilaille on kehittynyt luovuttajasta peräisin oleva syöpä, joka on mahdollisesti luovuttajalla pysynyt kurissa täysin toimivan immuunijärjestelmän ansiosta (Strauss ja Thomas 2010).

2.10 Invaasion ja metastaasin aktivoituminen

Erikoistyön tulosten kannalta syövän invaasion mekanismien tunteminen on tärkeää, ja siksi myös kirjallisuuskatsauksessa keskitytään seuraavaksi tarkemmin invaasion ja metastaasin aktivoitumiseen. Syövän eteneminen metastaattiseksi koituu usein potilaan kohtaloksi, ja metastaasit aiheuttavat suurimman osan syöpäkuolemista hoitokeinojen kehityksestä huolimatta. Metastaasien muodostumista on pidetty syövän kehittymisen viimeisenä vaiheena, ja prosessia on kuvattu niin kutsutun invaasio–metastaasikaskadin avulla (Fidler 2003). On kuitenkin myös mahdollista, että syöpäsolujen leviäminen tapahtuu jo varhaisessa vaiheessa syövän kehityskaarta (Hüsemann ja muut 2008). Joissakin tapauksissa primäärikasvain voi tuottaa levinneiden solujen kasvua estäviä tekijöitä, ja primäärikasvaimen poiston jälkeen nämä pienet metastaattiset kasvustot voivat kasvaa räjähdysmäisesti (Demicheli ja muut 2008).

Syöpäsolujen kehittyminen ja metastaasikaskadin läpikäyminen muistuttavat Darwinin luonnonvalintaa, jossa vain pieni osa edellisen vaiheen suorittaneista soluista pystyy etenemään seuraavaan vaiheeseen kaskadia (Fidler 2003). Metastaasikaskadin aikana solut ilmentävät monenlaisia fenotyyppejä piirteitä, joiden täytyy pysyä mukautuvina solujen läpikäydessä uusia metastaasin etenemiseen tarvittavia geneettisiä ja epigeneet-

tisiä muutoksia. Alussa syöpäsolun fenotyyppi muuttuu invasiivisemmaksi, usein niin sanotun epiteeli-mesenkyymitransition (EMT) avulla, jolloin syöpäsolu pystyy lähtemään liikkeelle primäärikasvaimesta ja tunkeutumaan ympäröivään kudokseen. EMT:n seurauksena solu tyypillisesti menettää solu–solukontaktinsa ja pystyy irrottautumaan primäärikasvaimesta. Muutoksia solu–solukontaktien tiiviissä liitoksissa, vyöliitoksissa ja aukkoliitoksissa on raportoitu syövän kehityksen yhteydessä (Knights ja muut 2012).

Tärkeä osa metastaasia on syöpäsolun kyky välttää solukuolema apoptoosin ja anoikiksen eli solun soluväliaineesta ja muista soluista irtoamisen aiheuttaman apoptoosin kautta. Invasiiviset syöpäsolut voivat siirtyä veri- tai imusuonistoon, mitä helpottaa syöpäkasvaimen suonien seinämien läpäisevyys. Suonistossa syöpäsolujen täytyy välttää immuunipuolustuksen hyökkäykset sekä mekaaninen stressi. Syöpäsolut voivat liikkua suonistoa pitkin ja lopulta tarttua suonien pintaan ja poistua suonistosta ekstravasaatioissa. Tämän jälkeen syöpäsolun täytyy pystyä sopeutumaan ja proliferoitumaan uudessa mikroympäristössä. Jo ennen kuin ensimmäinen syöpäsolu saapuu metastaattiseen elimeen, on kohdepaikkaan tyypillisesti muodostunut etäpesäkkeen kasvua tukeva mikroympäristö, joka soveltuu syöpäsolun kolonisoitumiseen (Sceneay ja muut 2013). Jokainen vaihe kaskadissa on tarpeellinen metastaasin muodostumiselle ja siten mahdollinen kohde antimetastaattisille hoidoille.

Metastaasien muodostuminen tapahtuu siis tyypillisesti monivaiheisen invaasio–metastaasikaskadin kautta, vaikka viitteitä varhaisesta leviämisestä onkin olemassa (Hüsemann ja muut 2008). EMT lisää karsinoomasolujen invasiivisuutta ja mahdollisesti lisää syöpäsolujen kykyä muodostaa uusia kasvaimia (Mani ja muut 2008). Muodostaakseen makroskooppisia etäpesäkkeitä täytyy syöpäsolujen välttää immuunijärjestelmän aiheuttama eliminaatio sekä kolonisoitua uuteen ympäristöönsä.

2.10.1 Syövän mikroympäristö ja metastaasi

Syöpäsolujen lisäksi syövän kehitykseen vaikuttavat kasvaimen ja sen ympäristön muut solut sekä soluväliaineen rakenne. Metastaasien muodostuminen edellyttää sitä edistävän mikroympäristön kehittymistä (Langley ja Fidler 2011). Soluväliaine muodostaa tukirakenteen, jonka pohjalta kudokset järjestäytyvät, ja säätelee solujen kasvua, selviytymistä, liikkumista ja erilaistumista sekä verisuonien muodostumista ja immuuni-

järjestelmän toimintaa. Siten soluväliaine on tärkeä tekijä myös syövän kehittymisessä ja metastaasissa. Esimerkiksi primäärikasvaimen fibroottinen, reaktiivinen strooma korreloi potilaan lyhentyneen tautivapaan ajan kanssa (Ayala ja muut 2003).

Ihmisen rintasyöpäkudoksessa lisääntynyt kollageeni I:n määrä ja siten rintakudoksen kasvanut tiheys lisää syövän paikallisen uusiutumisen riskiä (Park ja muut 2009). Kasvaimen yhteydessä olevan kudoksen jäykkyys ja muunneltu matriksi edistävät syöpäsolujen proliferaatiota ja metastaasia (DuFort ja muut 2011; Charras ja Sahai 2014). Kollageeni I:n yliekspressio rintasyövän hiirimallissa lisäsi kasvaimien muodostumista ja keuhkometastaaseja, ja strooman kollageenin uudelleenjärjestäytyminen edisti syöpäsolujen paikallista invaasiota etenkin kollageenihiheissä kudoksissa (Provenzano ja muut 2008). Lisääntynyt kollageeni I:n määrä metastaasin mikroympäristössä pystyi aiheuttamaan dormanttien eli niin sanotussa horroksessa olevien solujen proliferaatiota metastaattiseksi kasvaimiksi β_1 -integroinin signaaloinnin kautta (Barkan ja muut 2010). Kollageenipitoinen, fibroottinen ympäristö siis osallistuu kasvaimen muodostumiseen ja syövän metastaasiin.

Kun syöpäsoluja kasvatetaan tavallisten fibroblastien kanssa yhdessä, voivat fibroblastit estää syöpäsolujen kasvua (Sadlonova ja muut 2007; Flaberg ja muut 2011). Tavallisten fibroblastien tuottama soluväliaine on pehmeämpää kuin syöpään yhdistettyjen fibroblastien (*engl.* cancer-associated fibroblasts) tuottama, ja tämä pehmeä matriksi rajoittaa syöpäsolujen kasvua ja muuttaa niiden geeniekspressiota matriksin jäykkyydestä riippuvaisesti (Kaukonen ja muut 2016). Matriksin jäykkyys ja syöpään yhdistettyjen fibroblastien läsnäolo kasvaimen stroomassa korreloivat syövän etenemisen ja metastaasien muodostumisen kanssa (Pickup ja muut 2014).

Heterotyyppinen signaali syöpäsolujen ja strooman välillä muokkaa kasvaimen mikroympäristöä. Primäärikasvain voi muokata metastaattista mikroympäristöä jo ennen kuin syöpäsolut lähtevät leviämään, jolloin metastaattisten syöpäsolujen saapuessa kohde-elimien on strooma jo ainakin osittain aktivoitunut ja etäpesäkkeen kasvua edistävä (Sceneay ja muut 2013). Kuten kirjallisuuskatsauksesta on jo tähän mennessä käynyt ilmi, on kasvaimen strooman soluilla ja soluväliaineella merkittävä vaikutus syövän kehityksen ja metastaasin sekä kaikkien syövän tunnuspiirteiden säätelyssä.

2.10.2 Epiteeli-mesenkyymitransitio

EMT on prosessi, jonka myötä epiteelisolut muuttuvat enemmän mesenkymaalisten solujen kaltaisiksi, esimerkiksi muuttamalla solun pinnallaan ilmentämien proteiinien, kuten E-kadheriinin, ekspressiota. EMT on tärkeä sikiön normaalille kehitykselle ja osallistuu myös aikuisen yksilön epiteelikudoksen haavojen parantumiseen. Karsinoomasolut voivat hyödyntää EMT:tä muuttuessaan invasiivisiksi, sillä EMT:n myötä solujen kyky liikkua, invasoida ja hajottaa soluväliainetta kasvaa (Thiery 2002; Nieto ja muut 2016). EMT-prosessi on hieman erilainen eri kudoksissa ja erilaisten karsinoomien välillä, ja EMT:n ja sen käänteisprosessin mesenkyymi-epiteelitransition (MET) kautta solut voivat dynaamisesti ilmentää monenlaisia fenotyyppisiä epiteelisen ja mesenkymaalisen väliltä (Nieto ja muut 2016). EMT-prosessin etenemisen kannalta tärkeiksi on kuvattu niin sanotut EMT-transkriptiotekijät, erityisesti Snail, Slug, Twist ja Zeb1 (Lamouille ja muut 2014).

Ihmisen syöpäkasvainten reunoilla on havaittu stroomaan kurkottavia syöpäsoluja, joita voidaan pitää morfologisena todisteena EMT:stä (Prall 2007). E-kadheriinin menetystä pidetään olennaisena osana EMT:tä, ja se on myös keskeinen tapahtuma adenooman muuttumisessa invasiiviseksi karsinoomaksi (Perl ja muut 1998). Monet signaalintireitit, kuten TGF- β (engl. transforming growth factor β , transformoiva kasvutekijä β), Wnt, Notch, EGF (engl. epidermal growth factor, epidermaalinen kasvutekijä) ja HIF (engl. hypoxia-inducible factor, hypoksian indusoiva tekijä), voivat käynnistää EMT:n sekä normaalissa että syöpäkudoksessa (Yang ja Weinberg 2008). EGF käynnistää EMT:tä muun muassa lisäämällä E-kadheriinin endosytoosia (Lu ja muut 2003). VEGF edistää EMT:tä saamalla aikaan Snail ja Twist EMT-transkriptiotekijöiden ekspression haima- ja rintasyöpäsoluissa (Yang ja muut 2006; Wanami ja muut 2008). Hypoksia ja Notch-signaali voivat yhdessä säädellä EMT:n aktivaatiota: Notch-reseptorin solunsisäinen domeeni sitoutuu Snail-promoottoriin lisäten Snailin ekspressiota, ja lisäksi Notch edistää HIF-1 α :n välittämää lypsylioksidaasin ekspressiota, mikä stabiloi Snail1-proteiinin (Sahlgren ja muut 2008).

EMT:n roolista ja tarpeellisuudesta metastaasien muodostumiselle on käyty keskustelua. Syöpäsolut voivat invasoitua myös kollektiivisesti sen sijaan, että lähtisivät liikkeelle yksittäisinä soluina. Kollektiivisessa invaasiossa solut pysyvät kiinnittyneinä toisiinsa ja

liikkuvat yhdessä ympäröivään kudokseen. EMT-prosessissa solut tyypillisesti menettävät solu–solukontaktinsa, joten EMT ei välttämättä ole tarpeellinen kollektiivisessa invaasiossa. Etäpesäkkeen syöpäsolujen polyklonaalisuus saattaa viitata siihen, että syöpäsolut ovat levinneet kollektiivisesti (Cheung ja muut 2016). Kollektiivisessa invaasiossa liikkuvilla syöpäsoluilla on erilaisia rooleja, ja invasiivisimmat solut ottavat johtosolujen tehtävän ja kulkevat invaasiorintaman edessä kuljettaen muita soluja mukanaan solu–soluliitosten avulla (Cheung ja muut 2013). Myös mesenkymaalisten fibroblastien on osoitettu voivan johtaa syöpäsolujen kollektiivista invaasiota muokkaamalla matriksia ja siten luomalla syöpäsoluille reittejä, mitä pitkin kulkea (Gaggioli ja muut 2007). Toisaalta EMT saattaa osallistua myös kollektiivisen migraation säätelyyn (Ye ja muut 2015). Karsinoomien metastaasien on havaittu muistuttavan primäärikasvainta ja ilmentävän epiteelisiä ominaisuuksia mutta toisaalta EMT:n dynaamisuuden takia solut voivat läpikäydä myös MET-prosessin, mikä palauttaa niiden epiteelisen fenotyypin (Brabletz 2012). EMT voi myös aiheuttaa syöpäsoluille kantasolunkaltaisia ominaisuuksia (Mani ja muut 2008), jolloin syövän kantasolut pystyvät muodostamaan heterogeenisen kasvaimen. EMT saattaa siis olla keskeinen tekijä syövän leviämisessä tai vain yksi monista vaihtoehdoista, joita syöpäsolu voi hyödyntää lähtiessään leviämään.

EMT on tärkeä sikiön kehityksessä ja epiteelikudoksen haavan parantumisessa, mutta sillä voi olla myös haitallisia seurauksia syöpäsoluissa. EMT voi lisätä syöpäsolun invasiivisia ominaisuuksia ja aikaansaada kantasoluominaisuuksia. Siten EMT saattaa edesauttaa erilaistumiskykyisten ja kasvaimenaloituskyvyllisten syöpäsolujen leviämistä primäärikasvaimesta muihin elimiin muodostamaan metastaaseja.

2.10.3 Kiertävät syöpäsolut

Invasiiviset syöpäsolut voivat siirtyä veri- tai imusuonistoon, jota pitkin ne voivat kulkea metastaattiseen kohde-elimeen. Suonistossa syöpäsoluihin kohdistuu immuunipuolustuksen solujen hyökkäykset sekä monet muut fysikaaliset ja kemialliset stressitekijät. Kohde-elimien saavutettuaan syöpäsolut kiinnittyvät suonien pintaan ja tunkeutuvat sen seinämän läpi ekstravasaatioissa. Verenkierrossa kulkevia soluja kutsutaan kiertäviksi syöpäsoluiksi (*engl.* circulating tumor cell). Kiertävät syöpäsolut voivat jäädä jumiin hiusverisuonistoon ja hävitä verenkierrosta nopeasti, mutta on myös

raportoitu jopa kiertävien syöpäsolujen rykelmän pystyvän kulkemaan hiusverisuonten läpi yksisoluketjuna (Au ja muut 2016).

Vuorovaikutukset verenkierron solujen kanssa edistävät kiertävien syöpäsolujen kulkua verenkierrossa sekä poistumista verisuonten seinämien läpi. Verihiutaleiden korkea määrä korreloi useissa karsinoomissa huonon ennusteen kanssa (Gay ja Felding-Habermann 2011). Verihiutaleiden tuottama TGF- β sekä verihiutale-syöpäsolukontaktit aktivoivat syöpäsolujen signaalointia ja muuttavat ne invasiivisemmiksi sekä niiden fenotyypin mesenkymaalisenkaltaiseksi, ja siten verihiutaleet edistävät metastaasia (Labelle ja muut 2011). Syöpäsolujen aktivoimat verihiutaleet edistävät metastaasia myös erittämällä ATP:ta (*engl.* adenosine triphosphate, adensiinitrifosfaatti), mikä aiheuttaa verisuonten seinämien endoteelisolujen väliin aukon, jonka kautta syöpäsolujen on mahdollista poistua verenkierrosta (Schumacher ja muut 2013). Myös neutrofiilit voivat helpottaa ekstravasaatiota erittämällä MMP:itä (matriksin metalloproteiinaasi) ja IL1 β :aa (interleukiini 1 β), ja lisäksi neutrofiilit voivat suojata syöpäsoluja NK-solujen hyökkäykseltä (Spiegel ja muut 2016).

EMT-prosessi edesauttaa sekä syöpäsolujen kykyä siirtyä verenkiertoon että myös selviytyä siellä (Kumar ja muut 2011). Kiertäviä syöpäsoluja voidaan mahdollisesti hyödyntää hoitovasteen ja taudin uusiutumisen seurannassa sekä primäärikasvaimen geneettisten mutaatioiden ja sopivan lääkehoidon määrityksessä kasvattamalla niitä *ex vivo* (Yu ja muut 2014). Suurimpana haasteena kiertävien syöpäsolujen hyödyntämisessä on niiden alhainen määrä verenkierrossa, sillä kiertäviä syöpäsoluja voi olla jopa vain 1:10⁶ tai 1:10⁷ verrattuna leukosyyttien määrään verenkierrossa (Ross ja muut 1993). Lisäksi kiertävien syöpäsolujen välillä on raportoitu olevan solusta soluun vaihtelua (Heitzer ja muut 2013).

Ekstravasaation tarkkaa mekanismia ei tunneta, mutta todennäköisesti sen vaatimukset vaihtelevat kudoksittain. Esimerkiksi luuytimen huokoiset tiehyet saattavat mahdollistaa jopa passiivisen siirtymisen verisuonten seinämän läpi, kun taas aivometastaaseissa syöpäsolujen täytyy pystyä kulkemaan veri-aivoesteen yli. Leong työryhmineen (2014) kuvansi syöpäsolujen ekstravasaatiota *in vivo*, ja havaitsi syöpäsolujen muodostavan invadopodioita endoteelikerroksen läpi verenkierron ulkopuoliseen stroomaan. Syöpäsolut voivat kiinnittyä verisuonten pintaan, jakautua ja lopulta rikkoa verisuonten

seinämät (Al-Mehdi ja muut 2000). Syöpäsolut voivat myös aiheuttaa endoteelisolujen nekroosin (Strilic ja muut 2016). Verenkierrosta poistuttuaan syöpäsolun täytyy sopeutua uuteen ympäristöönsä ja pystyä muodostamaan uusi kasvain.

2.10.4 Syövän kantasolut

Syövän kantasolut ovat pieni alapopulaatio syöpäsoluja, jotka ovat kriittisiä kasvaimen ylläpidossa, metastaasissa ja syöpähoidoista selviytymisessä. Syövän kantasoluja löydettiin aluksi akuutista myeloidisesta leukemiasta, mutta viimeaikaiset tutkimukset viittaavat niiden olemassaoloon myös muun tyyppisissä leukemioissa ja kiinteän kasvaimen syövässä (Kreso ja Dick 2014). Kantasolut sijaitsevat yleensä tyvikalvon lähellä olevassa spesifisessä ympäristössä, kantasolulokerossa (*engl.* stem cell niche). Kantasolujen tunnistamiseksi on kehitetty erilaisia markkereita, ja esimerkiksi integriinit ovat olleet apuna muun muassa ihon kantasolujen tunnistuksessa (Jones ja muut 1995; Li ja muut 1998). Syöpäsolujen jaottelu pintamarkkereiden mukaan on luonut alapopulaatioita, joilla on selvästi kasvanut kyky muodostaa kasvaimia immuunipuutoshiirissä.

Syövän kantasolujen lähtökohta ei ole selvä, ja se saattaa vaihdella eri syövässä. Syövän kantasolut voivat saada alkunsa aikuisen kantasolujen tai tilapäisesti jakautuvien solujen onkogeenisestä transformaatiosta, eivätkä ne välttämättä ilmennä kaikkia ominaisuuksia, jotka liitetään alkion tai aikuisen kantasoluihin; ne esimerkiksi jakautuvat pääasiassa symmetrisesti (Gupta ja muut 2009; Clevers 2011). Syövän kantasolunkaltaisten ominaisuuksien saanti on yhdistetty myös EMT-ohjelmaan (Mani ja muut 2008). Joissakin tapauksissa kasvaimen mikroympäristön solut tuottavat sytokiinejä, jotka aktivoivat syövän kantasolujen uusiutumiskykyä ylläpitäviä signaalintireittejä (Reya ja muut 2001). Strooman solut voivat myös aiheuttaa tulehdusreaktion, jonka signaalit voivat saada erilaistuneet syöpäsolut muuttumaan erilaistumattomiksi syövän kantasoluiksi (Schwitalla ja muut 2013).

Syövän kantasoluilla on kyky uusiutua ja monissa karsinooissa on havaittu hierarkkista järjestäytymistä, minkä mukaan vain syövän kantasoluilla olisi kyky aloittaa uusia kasvaimia (Reya ja muut 2001). Syövän kantasolut on yhdistetty dormanssiuteen ja metastaasiin, sillä syövän kantasoluilla ja dormanteilla soluilla on yhteisiä piirteitä, kuten hiljentyneet jakautuminen ja immuunipuolustuksen välttäminen (Kleffel ja Schatton

2013). Metastaasin aloittavan solupopulaation fenotyyppi on epäselvä, mutta myös näiden solujen uskotaan olevan mitoottisesti hiljentyneitä. Tässä tilassa ne voisivat selviytyä spesifisissä metastaattisissa mikroympäristöissä, ja proliferaation puute sallisi niiden pysyä havaitsemattomina pitkiä aikavälejä sekä antaisi niille sietokykyä antiproliferatiivisia tekijöitä vastaan. Mitoottinen hiljentyneisyys selittäisi sen, kuinka metastaattinen kasvu voi tapahtua vasta vuosia primäärikasvaimen onnistuneen hävittämisen jälkeen. Wang työryhmineen (2015a) pyrki löytämään sellaisten eturauhassyöpäsolujen alapopulaation, jotka aloittavat luumetastaasin. Ryhmä eristi eturauhassyöpäsolulinjoista mitoottisesti hiljentyneet alapopulaatiot, joiden geeniekspressioprofiilia ja kykyä muodostaa luumetastaaseja kateenkorvattomiin hiiriin verrattiin vastaaviin nopeasti jakautuviin soluihin. Mitoottisesti hiljentyneet solut muodostivat merkittävästi enemmän luumetastaaseja kuin nopeasti jakautuvat (55% ja 15%, vastaavasti), ja niillä oli omalaatuinen geeniekspressioprofiili. Hiljentyneet solut eivät olleet ainutlaatuisesti kantasolunkaltaisia, sillä niiltä puuttui eturauhassyövän kantasolujen markkerin, CD133:n ekspressio, ja niillä oli sama ekspressiotaso muissa oletetuissa eturauhasen kantasolumarkkereissa (CD44 ja $\alpha_2\beta_1$ -integroini) kuin nopeasti jakautuvilla soluilla. Hiljentyneissä soluissa oli korkea CXCR4:n tuotto, minkä inhibointi muutti solujen kotiutumista luuhun. Tutkimuksen perusteella mitoottinen dormanssi on ainutlaatuinen fenotyyppi, joka edistää syöpäsolujen kolonisaatiota luustoon eturauhassyövässä. (Wang ja muut 2015a.)

Syövän kantasolujen on havaittu selviytyvän erityisen hyvin metastaasikaskadin rajoittavista tekijöistä, kuten anoikiksen välttämisestä, ekstravasaatiosta ja kolonisaatiosta, ja useat tutkimukset ovat osoittaneet, että syövän kantasolut mahdollistavat metastaasien muodostumisen (Hermann ja muut 2007; Liu ja muut 2010; Todaro ja muut 2014). Ihmisen rintasyövän metastaattisissa syöpäsoluissa kantasolufenotyyppiin, EMT:hen, selviytymiseen ja dormanssiuteen yhdistettyjen geenien ilmentyminen on kohonnutta, ja niillä havaittiin myös olevan syövän kantasolujen kyky aloittaa uusia kasvaimia ja erilaistumalla muodostaa heterogeeninen syöpäkasvain (Lawson ja muut 2015). EMT:n ja syövän kantasolujen välillä on havaittu yhteys aiemminkin, sillä jos solut pakotetaan läpikäymään EMT ekspressoimalla soluissa EMT-transkriptiotekijöitä Twistia ja Snailia, saavat solut samalla kantasoluihin yhdistettyjä ominaisuuksia (Mani ja muut 2008). Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että syövän kantasoluista erilaistuneilla syövän esisoluilla on kyky muuttua takaisin kantasolunkaltaiseksi, jolloin syövän kantasolufenotyyppi on

pikemminkin dynaaminen ominaisuus (Li ja Laterra 2012). Kasvaimen kehitystä tukevat geneettiset ja epigeneettiset muutokset voivat siten muodostua ensin syövän kantasoluissa tai sitten nämä muutokset tapahtuvat esisoluissa, jotka myöhemmin muuntuvat takaisin kantasolunkaltaisiksi.

Syövän kantasolumalli osallistuu syöpäkasvaimen heterogeenisyyden luomiseen, mutta myös syövän kantasolujen fenotyyppi voi vaihdella potilaiden välillä, ja jopa samassa kasvaimessa voi ilmetä erillisiä kantasolupopulaatioita (Visvader ja Lindeman 2012). Syövän kantasolujen monipuolisuus ja vaihtelu tietyn kasvaimen kantasolupopulaation sisällä ovat muokanneet syövän kantasolujen käsitettä pikemminkin dynaamiseksi solun tilaksi kuin erilliseksi solutyypiksi. Dormanssiuden, metastaasin ja syövän kantasolujen välinen yhteys (Kleffel ja Schatton 2013) sekä kantasolupopulaation dynaamisuus tukee myös Wangin työryhmineen (2015) tekemiä havaintoja eturauhassyöpäsolujen mitoottisesti hiljentyneiden solujen kyvystä aloittaa kasvaimia ja saattaa selittää, miksi nämä mitoottisesti hiljentyneet solut eivät ilmentäneet eturauhassyövän kantasoluille tyypillisiä markkereita. Kantasolunkaltaisia ominaisuuksia omaavat syöpäsolut myös tyypillisesti kestävät monenlaisia kemoterapeuttisia hoitoja muita syöpäsoluja paremmin (Singh ja Settleman 2010), mahdollisesti mitoottisen hiljentyneensä ansiosta, mikä voi auttaa selittämään syövän uusiutumisen.

Metastaattisen kolonisaation saattavat aloittaa samat syövän kantasolut, jotka pitävät primääriskasvainta yllä, tai mahdollisesti näiden solujen jälkeläiset, joilla on itseuusiutumiskyvyn lisäksi metastaasin yhteydessä saavutettuja uusia ominaisuuksia. Monissa tapauksissa on kuitenkin mahdollista, että syöpäsolut käyvät läpi kolonisaatiota edistävät geneettiset ja epigeneettiset muutokset jo ennen leviämistä. Koska nämä muutokset aiheutuvat mutaatioista, jotka eivät välttämättä lisää solujen kilpailukykyä primääriskasvaimen olosuhteissa, ne eivät pääse yleistymään. Rintasyövän ja medulloblastooman primääriskasvaimen ja metastaasien sekä munuaissyövän primääriskasvaimen eri alueiden ja metastaasien genomien vertailun perusteella metastaasit ovat peräisin primääriskasvaimen harvinaisesta solujen alapopulaatiosta (Ding ja muut 2010; Wu ja muut 2012). Osa muutoksista syöpäsoluissa tapahtuu todennäköisesti vasta leviämisen jälkeen, ja ne lisäävät levinneiden syöpäsolujen proliferaatiota vieraassa ympäristössä. Haima- ja munuaissyöpien metastaattisissa kasvustoissa onkin havaittu primääriskasvai-

mesta poikkeavia kasvaimen kehitystä ohjaavia mutaatioita (Campbell ja muut 2010; Yachida ja muut 2010; Gerlinger ja muut 2012).

Syövän kantasolut ovat siis kasvaimen syöpäsolujen alapopulaatio, joilla on kyky aloittaa uusi heterogeeninen syöpäkasvain. Syövän kantasolut ovat todennäköisesti hyvin muuntumiskykyisiä soluja, jotka voivat osittaisen erilaistumisen jälkeen muuntua takaisin kantasolunkaltaisiksi. Syövän kantasolut on yhdistetty dormanssiin ja metastaasien muodostumiseen, ja tämän syöpäsolualapopulaation leviäminen on mahdollisesti kriittinen tekijä metastaasien muodostumisessa ja syövän uusiutumisessa. Useita merkkiproteiineja on raportoitu, joiden avulla nämä syövän kantasolut voitaisiin tunnistaa. Näitä markkereita hyödyntämällä voitaisiin syöpähoidot tulevaisuudessa kohdistaa syövän kantasolujen vaaralliseen solualapopulaatioon, ja siten merkittävästi vähentää metastaasien ja uusiutumisen riskiä.

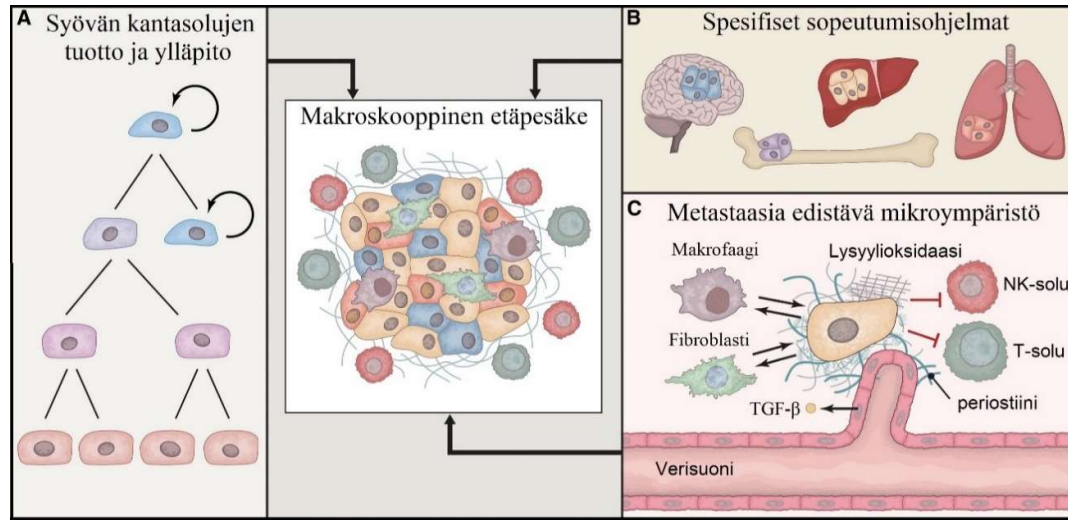
2.10.5 Kolonisaatio

Ei tiedetä tarkkaan, missä vaiheessa syöpäsoluille kehittyy kyky kolonisoitua eli sopeutua vieraaseen ympäristöön. Kolonisaatioon osallistuu lukuisat solubiologiset prosessit ja signaalointireitit, mitkä ovat monimutkaisempia ja monipuolisempia kuin metastaasikaskadin aiemmissa vaiheissa. Kolonisaation mahdollistavat muutokset soluissa voivat tapahtua jo ennen leviämistä, syöpäsolujen ollessa vielä rajautuneena primäärikasvaimen. Vaihtoehtoisesti selektiivinen paine vieraassa ympäristössä aiheuttaa soluissa sopeutumista edistäviä muutoksia. Kolonisaation mekanismien selvitys on tärkeää tulevaisuuden syöpähoidoille, ja edistystä onkin tapahtunut muun muassa tiettyihin kudoksiin muodostuvien etäpesäkkeiden kanssa korreloivien geenien tunnistamisessa. Mahdollisia sopeutumiskeinoja on kuitenkin useita, sillä metastaasin kohde-elinten kudosten ympäristöt voivat olla keskenään hyvin erilaisia. Kolonisaation kannalta tärkeintä on kuitenkin kasvaimen kehitystä edistävän mikroympäristön muodostuminen. Luzzi työryhmineen (1998) havaitsi, että melanoomasolujen metastaasin rajoittavin vaihe oli levinneiden syöpäsolujen kyky kasvaa kohde-elimessä, ja suurin osa levinneistä syöpäsoluista pysyi dormantteina yksittäisinä soluina. Siten myöhemmin saatu kyky kolonisoitua kohde-elimen ympäristöön voi aktivoida nämä dormantit solut muodostamaan kasvaimia.

Vieraassa kudoksessa syöpäsoluilta puuttuvat aktivoituneet strooman solut sekä tutut kasvutekijät ja soluväliaine. Syöpäsolujen metastaattinen kasvu vaatii tai vähintäänkin hyötyy sopivasta soluväliaineesta. Dormanssius voi johtua joko kykenemättömyydestä sopeutua ja hyödyntää uuden ympäristön signaaleja kasvun tukemiseksi tai ympäristöstä tulevista proliferaatiota estävistä signaaleista (Giancotti 2013; Sosa ja muut 2014), esimerkiksi luun stroomasolujen tuottama BMP7 (*engl.* bone morphogenetic protein, luun morfogeneettinen proteiini) voi tehdä eturauhassyöpäsoluista dormantteja (Kobayashi ja muut 2011). Syöpäsolut voivat olla kykenemättömiä käynnistämään angiogeenin, immuunipuolustus voi estää metastaattista kasvua tai syöpäsolujen kasvu voi olla estynyt puutteellisten kasvutekijöiden tai adheesiosignaalien takia, jolloin syöpäsolut ajautuvat dormanssiin (Aguirre-Ghiso 2007). Dormantit kasvustot voivat pysyä inaktiivisina jopa vuosia, ja koska ne eivät proliferoi aktiivisesti, ne myös tyypillisesti kestävät jakautuviin soluihin kohdistuvaa syöpähoitoa. Siten dormantit syöpäsolut voivat aktivoituessaan aiheuttaa syövän uusiutumista jopa vuosien päästä primäärikasvaimen häviämisen jälkeen. Esimerkiksi luuytimessä olevat mikrometastaasit korreloivat rintasyöpäpotilaiden huonon selviytymisen ja kohonneen uusiutumisen kanssa (Braun ja muut 2005).

Adhesiiviset vuorovaikutukset kohde-elimien soluväliaineen kanssa voivat mahdollistaa solujen selviytymisen vieraassa ympäristössä, ja β_1 -integriinin välityksellä tapahtuva solujen adheesioon liittyvä signaali voi aktivoida dormanttien levinneiden syöpäsolujen proliferaation aktivoimalla solunsisäistä signaalia ja uudelleenjärjestämällä solun tukirankaa (Aguirre-Ghiso ja muut 1999; Barkan ja muut 2008; Shibue ja Weinberg 2009). Joissakin tapauksissa metastaasia edistävän ympäristön muokkaaminen saattaa alkaa jo ennen kuin syöpäsolut saapuvat kohde-elimien (Sceneay ja muut 2013). Levinneet syöpäsolut voivat asettua tiettyihin dormanssia aiheuttaviin mikro-ympäristöihin, jotka edistävät solujen selviytymistä, rajoittavat niiden proliferaatiota sekä suojaavat niitä terapeuttisilta tekijöiltä (Ghajar 2015). Syöpäsolut voivat myös kilpailla kudoksen normaalien kantasolujen kanssa kantasolulokerosta, kuten eturauhassyövän luuhun levinneet syöpäsolut kilpailevat hematopoieettisten kantasolujen kanssa (Shiozawa ja muut 2011). Dormanssia aiheuttavan mikro-ympäristön ja kantasolulokeron on myös arveltu olevan sama asia (Ghajar 2015).

Kantasolunkaltaiset ominaisuudet edistävät syöpäsolujen kolonisaatiota, ja metastaattinen potentiaali saattaa riippua kasvaimen kyvystä lähettää syövän kantasoluja aloittamaan uusia kasvustoja (Oskarsson ja muut 2014). Metastaattinen kasvu edellyttää, että levinneillä syöpäsoluilla on kasvaimenaloituskyky, ja ne pystyvät sopeutumaan ja menestymään uudessa ympäristössään. Kolonisaation ja siten myös makroskooppisten etäpesäkkeiden muodostumisen vaatimukset on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Kolonisaation vaatimukset. Makroskooppisten etäpesäkkeiden muodostumisen kannalta kriittisimmät tekijät ovat **A)** kasvaimen kyky tuottaa ja ylläpitää syövän kantasoluja, joilla on kyky aloittaa uuden kasvaimen kasvu, **B)** levinneiden syöpäsolujen sopeutuminen ja proliferaatio etäpesäkkeen kohde-elimen ympäristössä spesifisestä kudospäristöstä riippuvaisin mekanismein sekä **C)** metastaasia edistävän mikroympäristön muodostuminen soluväliainetta muokkaamalla ja strooman soluja aktivoimalla. Primäärikasvain voi mahdollisesti levittää syövän kantasoluja muodostamaan metastaaseja tai sitten syövän kantasolujen dynaamisesta luonteesta johtuen osittain erilaistuneet, metastaasia edistäviä muutoksia läpikäyneet solut, voivat kohde-elimeen saavuttuaan palata takaisin kantasolunkaltaisiksi ja muodostaa kasvaimen. Kuva muokattu lähteestä Lambert ja muut (2017).

2.10.6 Luumetastaasi

Pagetin hypoteesi ennusti jo yli 100 vuotta sitten, että vuorovaikutus syövän ja metastaattisen elimen välillä on kriittinen tekijä metastaasin kehittymisen ja etenemisen kannalta (Paget 1889). Myös luumetastaasissa syöpäsolut ja kohde-elin ovat vuorovaikutuksessa keskenään. Luu on ainutlaatuinen ympäristö verrattuna pehmeään kudokseen, koska se erilaistuu mineralisoituneeksi kiinteäksi luumatriksiksi ja sitä muokataan jatkuvasti, jolloin vapautuu runsaasti liukoisia kasvutekijöitä ja liukenematonta soluväliainetta. Luumetastaasien tutkiminen vaatii sekä syövän patofysiologian että luun biologian tuntemusta.

Luumetastaasin mekanismien kannalta luun mikroympäristön ainutlaatuinen rakenne on tärkeä. Luu on jatkuvan muokkauksen alla oleva elin, joka koostuu monista erilaisista soluista, esimerkiksi hematopoieettisista soluista, stroomasoluista ja endoteelisoluista. Luun resorptiosta vastaavat osteoklastit sekä uutta luumatriksia muodostavat osteoblastit vuorovaikuttavat keskenään ja säätelevät luun muokkausta. Osteoblastien pinnalla oleva RANK-ligandi (*engl.* receptor activator of nuclear factor kappa-B [NF- κ B], NF- κ B:n reseptoriaktivaattori) sitoutuu osteoklastien esisolujen RANK-reseptoriin, ja tämän reseptorin aktivoituminen ohjaa osteoklastien kypsymistä (Dougall ja muut 1999). Lukuisat muut tekijät, kuten erilaiset kasvutekijät ja immuunisolujen tuottamat tekijät, osallistuvat luun muokkauksen säätelyyn (Sims ja Martin 2014). Luun muodostuessa osteoblastit tuottavat kasvutekijöitä, kuten TGF- β , IGF (*engl.* insulin-like growth factor, insuliininkaltainen kasvutekijä), FGF (*engl.* fibroblast growth factor, fibroblastikasvutekijä), PDGF (*engl.* platelet-derived growth factor, verihiutalekasvutekijä) ja BMP:t, luumatriksiin, josta ne jälleen vapautuvat osteoklastien toiminnan seurauksena (Baylink ja muut 1993). Monet näistä kasvutekijöistä voivat stimuloida metastaattisten syöpäsolujen kasvua luussa. Myös luumatriksiin sitoutuminen saattaa edistää syöpäsolujen kykyä muodostaa luumetastaaseja, ja näiden tekijöiden tunnistaminen saattaa auttaa luumetastaasin mekanismien sekä hoitokeinojen löytämisessä. Luuympäristön proteiineista jopa yli 90 % on kollageeni I:tä (Buckwalter ja muut 1996). Kollageeni I:n laaja esiintyminen luustossa saattaa viitata siihen, että sillä on tärkeä rooli luumetastaasin muodostumisessa.

Luumetastaasin muodostumiseen vaikuttaa siis syöpäsolujen sekä luun matriksin ja muiden solujen, kuten osteoblastien ja osteoklastien, välinen vuorovaikutus (Cooper ja muut 2003; Logothetis ja Lin 2005; Chirgwin ja Guise 2007). Luumetastaasit määritellään tyypillisesti luuta tuhoavaksi osteolyyttiseksi tai uutta luuta muodostavaksi osteoblastiseksi luumetastaasiksi (Roodman 2004), riippuen siitä mitä soluja luuhun levinneet syöpäsolut aktivoivat. Myös luuytimen mesenkymaalisten kantasolujen on havaittu vaikuttavan luumetastaasin muodostumiseen (Mognetti ja muut 2013; Luo ja muut 2014). Luuytimeen levinneet syöpäsolut voivat pysyä dormantteina ja muodostaa kliinisesti havaittavia luumetastaaseja vasta pitkän hiljaiselon jälkeen (Ranganathan ja muut 2006; Morgan ja muut 2009; Hensel ja muut 2013). Syövän kantasoluja on pidetty syyllisinä etäpesäkkeiden muodostumiseen. Metastaattisten eturauhassyöpäsolujen on raportoitu hakeutuvan luuytimen hematopoieettisten kantasolujen kantasolulokeroon, ja

levinneet syöpäsolut kilpailevat hematopoeettisten kantasolujen kanssa sijainnista tässä spesifisessä mikroympäristössä (Shiozawa ja muut 2011). Myöhemmin sama ryhmä osoitti, että luuytimeen levinneet syöpäsolut alkoivat ilmentää eturauhassyövän kantasolujen fenotyyppiä CD133⁺/CD44⁺. Hematopoeettisten kantasolujen kantasolulokeron tuottaman GAS6-proteiinin aktivoima Mer/mTOR-signaalointi säätelee levinneiden syöpäsolujen muuttumista kantasolunkaltaisiksi. (Shiozawa ja muut 2016.) mTOR-signaloinnin on jo aiemmin osoitettu ylläpitävän kantasoluja ja dormantteja syöpäsoluja (Schewe ja Aguirre-Ghiso 2008; Huang ja muut 2012; Kim ja muut 2013). Luumetastatit PC-3-eturauhassyöpäsolut sitoutuivat, mahdollisesti kollageenireseptori-integriinien $\alpha_1\beta_1$ ja $\alpha_2\beta_1$ avulla, voimakkaammin luuytimen mesenkymaaliin kantasoluihin ja kollageeni I:een kuin imusolmukemetastaasin LNCaP-eturauhassyöpäsolut. Toisin kuin LNCaP-solut, PC-3-solut käyttivät filopodioita sitoutumisen vahvistamiseksi. (Sariisik ja muut 2013.) Näiden tutkimusten perusteella levinneet eturauhassyöpäsolut hakeutuvat luuytimen kantasolulokeroon, joka mahdollisesti säätelee syöpäsolujen kantasolunkaltaisia ominaisuuksia ja dormanssiutta. Tämä mahdollistaa luumetastaasien muodostumisen jopa vuosien päästä primäärिकासvaimen onnistuneesta hävittämisestä.

Luumetastaasiin johtavat vaiheet ovat samankaltaiset kuin muissakin metastaaseissa: Primäärिकासvaimen syöpäsolut invasoivat ympäröivään kudokseen ja siirtyvät veri- tai imusuonistoon, jota pitkin ne kulkevat metastaasin kohde-elimien. Luumetastaasien muodostuminen edellyttää, että syöpäsolut tunkeutuvat luuytimen tiehyiden seinämien läpi, invasoivat luuytimen stroomaan, luovat oman verisuonistonsa ja kulkevat luun endosteelipinnalle, jossa ne aktivoivat osteoklasteja tai osteoblasteja. Jokainen näistä vaiheista edellyttää syöpäsolujen ja normaalien solujen välistä viestintää, ja jokainen on mahdollinen luumetastaasien hoidon kohde. (Mundy 2002.)

3 INTEGRIINIT JA SYÖPÄ

3.1 Integriinit

Solujen sitoutuminen ympäristöönsä ja viereisiin soluihin on tärkeä osa monessa fysiologisessa tapahtumassa, kuten haavan parantumisessa, sekä useiden tautien kuten syövän kehittymisessä. Solujen sitoutumista välittävät solunpinnan reseptorit, jotka signaloivat solun sisälle reseptorien sitoutuessa solun ulkopuolisiin ligandehinsa. Parhaiten tunnetut solunpinnan adheesioreseptorit ovat integriinit, jotka muodostavat 24 erilaista α - ja β -alaysiköstä koostuvaa heterodimeeriä. Jokainen $\alpha\beta$ -heterodimeeri välittää sitoutumista tiettyihin soluväliaineen proteiineihin tai vastareseptoreihin toisen solun pinnalla. Integriinit vuorovaikuttavat signaalinvälitysketjujen kanssa solun sisäpuolella ja välittävät solutyypistä riippuvaisen signaalin. (Hynes 2002; Miranti ja Brugge 2002.)

Integriinit voivat osallistua joko solun ulkopuolelta solun sisäpuolelle tapahtuvaan signaalointiin tai solun sisäiset tekijät voivat aktivoida integriinit toimimaan solun ulkopuolella. Kun integriinit sitoutuvat solun ulkopuoliseen ligandiinsa, ne muodostavat ryhmittymiä eli klusteroituvat fokaaliadheesioihin. Fokaaliadheesiot välittävät viestejä matriksiin sitoutumisesta solun sisäpuolelle sekä toimivat linkkinä soluväliaineen ja solun sisäisen aktiinitukiverkon sekä tuman välillä. Soluväliaineen rakenne säätelee solujen toimintoja, ja solut myös muokkaavat soluväliainetta jatkuvasti. Koska integriinit muodostavat yhteyden matriksin sekä solun tukirangan ja tuman välille, osallistuvat integriinit myös matriksin jäykkyyteen ja mekaanisiin ärsykkeisiin reagoimiseen (DuFort ja muut 2011). Integriinien avulla solut havainnoivat ympäristöään ja reagoivat siihen, ja ne ovat tärkeitä muun muassa solun proliferaation, selviytymisen ja liikkumisen säätelijöitä.

Jokainen integriinialayksikkö on glykoproteiini, jolla on suuri globulaarinen solun ulkopuolinen domeeni ja transmembraanidomeeni. Useimmilla integriineilla on verrattain pieni solun sisäpuolinen domeeni, joka koostuu alle 60 aminohaposta. (Hynes 1992). Integriineilla ei ole entsyymaattista aktiivisuutta, vaan niiden signaalointi tapahtuu reseptorin solun sisäpuolisten domeenien sitoutuessa solunsisäisiin viestintäproteiineihin. Ligandiin sitoutuminen aiheuttaa integriinin β -alaysikössä konformaation muutoksen, minkä seurauksena α - ja β -alaysikköjen solunsisäiset osat erkanevat toisistaan ja

reseptori aktivoituu (Luo ja muut 2007). Integriinien β -alaysikkö on vuorovaikutuksessa lukuisien solunsisäisten signaalintimolekyylien kanssa, kuten fokaaliadheesiokinaasi FAK ja tyrosiinikinaasi Src (Miranti ja Brugge 2002). β_1 -integriinin kautta tapahtuva signaali välittää monia solun toimintoja, kuten proliferaatiota ja migraatiota, aktivoimalla mitogeenien aktivoiman proteiinikinaasin (MAPK), PI3K:n (fosfoinositidi-3-kinaasi, *engl.* phosphoinositide 3-kinase) tai RhoA-GTPaasin (Longhurst ja Jennings 1998). Integriinit voivat myös säädellä kasvutekijäreseptorien välityksellä tapahtuvaa signaaliota helpottamalla niiden aktivaatiota tai ohjaamalla niiden endosytoosia ja kierrätystä (Ivaska ja Heino 2011).

3.2 Integriinit syövässä

Integriineillä on useita tärkeitä rooleja syövässä, ja integriinivälitteisen sitoutumisen estäminen esimerkiksi vähentää spontaania maksametastaasia ihmisen suolistosyöpäsoluissa (Reinmuth ja muut 2003) sekä estää angiogeneesiä ihmisen eturauhassyövän luumetastaasin hiirimallissa (Nemeth ja muut 2003). Integriinien signaali voi muun muassa ylläpitää syöpäsolujen kantasolunkaltaisuutta, edesauttaa metastaasien muodostumista ja välittää syövän kemoresistenssiä (Seguin ja muut 2015). Useiden integriinien, kuten $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$ ja α_v -integriinien, on myös havaittu olevan välttämättömiä angiogeneesille (Avraamides ja muut 2008).

Integriinit voivat edistää syöpäsolujen selviytymistä stressiolosuhteissa. Verenkierrossa olevien syöpäsolujen täytyy selviytyä ilman adheesiota soluväliaineeseen. Esimerkiksi β_1 -integriini voi edistää syöpäsolujen kasvua kiinnittymisestä riippumattomina (Schooley ja muut 2012; Cagnet ja muut 2013). Integriinien osallistuminen anoikiksen välttämiseen ja soluväliaineeseen sitoutumisesta riippumattomaan kasvuun saattaa selittyä sillä, että integriinit pystyvät klusteroitumaan ja signaloimaan myös kasvutekijöiden tai onkogeeninien aktivoimana (Shin ja muut 2013; Seguin ja muut 2014).

Integriinit voivat myös osallistua syöpäsolujen lääkeresistenssin kehittymiseen. Esimerkiksi β_1 -integriinin on raportoitu säätelevän pään ja kaulan alueen syövän sädehoidon sietokykyä (Eke ja muut 2012) sekä rintasyövän resistenssiä lapatinib-syöpälääkkeelle (Huang ja muut 2011). $\alpha_v\beta_3$ -integriini on markkeri rinta-, keuhko- ja haimakarsinoomien kantasolunkaltaisille soluille, jotka ovat resistenttejä tyrosiinikinaasi-

reseptorien inhibiittoreille kuten erlotinib. $\alpha_v\beta_3$ -integroini pystyy ilman ligandia käynnistämään KRAS-RalB-NF- κ B-signaloinnin, ja siten se välittää syöpäsolujen kantasoluominaisuuksia, soluväliaineeseen sitoutumattomana selviytymistä sekä resistenssiä erlotinibile. (Seguin ja muut 2014.)

Syöpäsolujen invaasio vaatii muuttuneen vuorovaikutuksen solujen ja matriksin välillä. Integroinien ilmentyminen voi olla syövässä joko alentunutta tai kohonnuttua. Solun normaalin fenotyypin ylläpitämiseen tarvittavien integroinien ilmentyminen saattaa alentua, kun taas invaasioon ja matriksin hajotukseen tarvittavat integroinit ovat usein aktivoituneena. (Ruoslahti 1992.) Integroinit säätelevät solun vasteita lukuisiin tekijöihin tunnistamalla erilaiset kudospäristöt. Integroinien spesifiset ligandit mahdollistavat erillisten mikroympäristöjen ja kudusrajojen muodostumisen, sillä vain tiettyjä integroineja ilmentävät solut voivat menestyä tietyssä soluväliaineessa. Syövässä tämä integroinien ominaisuus määrittää syöpäsolujen kykyä invasoitua primäärikasvaimesta erilaisiin kudoksiin sekä muodostaa metastaaseja tiettyihin kohde-eliimiin. Integroinit helpottavat solujen liikkumista kudoksessa myös osallistumalla soluväliaineen hajotuksen säätelyyn (Ivaska ja Heino 2000). Syöpäsolujen kolonisaatio metastaasin kohde-elimessä edellyttää syöpäsolujen ja paikallisen soluväliaineen vuorovaikutusta, ja siten integroinit saattavat olla edellytyksenä syöpäsolujen sopeutumiselle vieraaseen ympäristöön.

Kasvaimen lähettämien eksosomien integroiniekspressio voi vaikuttaa elinspesifiseen metastaasiin muokkaamalla premetastaattista kudosta. Keuhkometastaasin yhteydessä kasvaimen eksosomeissa ilmentyivät integroinit $\alpha_6\beta_4$ ja $\alpha_6\beta_1$, kun taas eksosomien $\alpha_v\beta_5$ -integroini yhdistettiin maksametastaasiin. Eksosomeille spesifisten integroinien targetointi vähensi vastaavien metastaasien muodostumista. Luumetastaattisen syövän hoito keuhkometastaattisen syövän eksosomeilla uudelleenohjasi metastaasin muodostumisen keuhkoihin, joten eksosomit voivat helpottaa myös sellaisten syöpäsolujen metastaasia, jotka muuten kykenisivät huonosti kolonisoitumaan kyseiseen kudokseen. Eksosomien integroiniekspressio korreloi rinta- ja haimasyövän metastaattisen kudoksen kanssa, ja eksosomeja pystyttiin käyttämään metastaasien ennustamisessa. (Hoshino ja muut 2015.)

Integroinit osallistuvat myös kantasolulokeron mikroympäristön kantasoluja ylläpitävään signaalointiin, ja integroinit saattavatkin olla tärkeitä sekä normaaleille että syövän

kantasoluille. Monet aikuisen normaalin kudoksen kantasoluissa runsaasti ilmentyvät integriinit, kuten β_1 , α_6 ja β_3 , ovat myös syövän kantasolujen markkereita (Anderson ja muut 2013). Esimerkiksi α_6 -integriinin ilmentyminen on liitetty rintasyövän (Meyer ja muut 2010), glioblastooman (Lathia ja muut 2010), eturauhassyövän (Garraway ja muut 2010; Yamamoto ja muut 2012) ja suolistosyövän (Haraguchi ja muut 2013) kantasoluihin. Syövän kantasoluihin on myös yhdistetty kyky aloittaa uusia kasvaimia, joten tiettyjen integriinien erilainen ekspressio näiden solujen pinnalla saattaa olla metastaattisten syöpäsolujen merkki. Siten syövän kantasoluille ja metastaasin muodostumiselle tärkeisiin integriineihin kohdistettu syöpähoito saattaa olla tulevaisuudessa keino estää hengenvaarallisten metastaasien kasvu.

3.3 $\alpha_2\beta_1$ -integriini syövässä

Kollageeni on selkärankaisten runsaimmin esiintyvä soluväliaineen proteiini, joka muodostaa rungon sidekudoksille ja pehmeille matrikseille kuten luuytimelle. Solujen sitoutumista kollageeniin välittävät kollageenireseptori-integriinit $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ ja $\alpha_{11}\beta_1$ (White ja muut 2004; Heino 2014). $\alpha_2\beta_1$ -integriini tunnistaa pääasiassa tyyppin I kollageenin, mutta voi sitoutua myös tyyppien III, IV ja XI kollageeneihin, laminiineihin ja joihinkin proteoglykaaneihin (Heino 2000; Heino 2014). $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentyy epiteelisolujen, fibroblastien, endoteelisolujen ja verihiutaleiden sekä monen tyyppisten syöpäsolujen pinnalla (Zutter ja Santoro 1990; Madamanchi ja muut 2014).

3.3.1 $\alpha_2\beta_1$ -integriini syövän invaasiossa ja metastaasissa

α_2 -integriinin on raportoitu välittävän syöpäsolujen invaasiota eturauhas- ja munasarjasyövässä, ja sen lisääntynyt ekspressio on yhdistetty heikentyneeseen ennusteeseen melanoomassa sekä lisääntyneisiin maksametastaaseihin (Hall ja muut 2006; Shield ja muut 2007; Vuoristo ja muut 2007; van Slambrouck ja muut 2009; Yoshimura ja muut 2009). α_2 -integriinin korkea ekspressio korreloi melanooman aggressiivisuuden kanssa (van Duinen ja muut 1994) ja lisää rhabdomyosarkoomasolujen metastaasien muodostusta hiirissä (Chan ja muut 1991). $\alpha_2\beta_1$ -integriini kiihdyttää ihmisen osteosarkoomasolujen liikkumista tyyppin I kollageenilla ja lisää solujen tunkeutumista kollageenimatriksiin (Vihinen ja muut 1996).

Ihmisen munasarja- ja haimasyövän solut sekä sitoutuivat että liikkuivat kohti kollageeni I:tä $\alpha_2\beta_1$ -integroinin välityksellä, joten $\alpha_2\beta_1$ -integroini-kollageeni I -vuorovaikutus saattaa edistää näiden syöpäsolujen invasiivista fenotyyppejä (Fishman ja muut 1998; Grzesiak ja Bouvet 2006). $\alpha_2\beta_1$ -integroinin korkea ilmentyminen metastasoivissa soluissa saattaa ohjata näitä soluja kollageenipitoisiin kudoksiin, kuten kollageeni I -pitoiseen luuhun (Hall ja muut 2006) sekä maksaan, jonka kudospäristössä esiintyy runsaasti kollageeni IV:ää (Yoshimura ja muut 2009). Munuaissyövän primäärikasvaimessa ei ilmentynyt α_2 -integroiniä, kun taas sen metastaaseissa sitä ilmentyi, joten α_2 -integroini saattaa osallistua munuaissyövän metastaasien muodostumiseen (Anastassiou ja muut 1995). Vatsasyöpäsolujen metastaasissa vatsakalvoon $\alpha_2\beta_1$ -integroinin ekspressio on kohonnut primäärikasvaimeen verrattuna, joten $\alpha_2\beta_1$ -integroini saattaa ohjata vatsasyöpäsolujen metastaasia (Matsuoka ja muut 2000). Metastaattisen suolistosyövän hoito $\alpha_2\beta_1$ -inhibiittorilla E7820 on kliinisessä testauksessa (Mita ja muut 2011).

$\alpha_2\beta_1$ -integroinin ekspression katoaminen on yhdistetty rintasyövän etenemiseen (Arihiro ja muut 1993). Ramirez työryhmineen (2011) tutki α_2 -integroinin roolia rintasyövässä α_2 -integroinin suhteen poistogeenisissä, spontaaneja rintasyöpiä muodostavissa hiirissä ja havaitsi, että α_2 -integroinin puute lisää rintasyöpäsolujen liikkeelle lähtöä primäärikasvaimesta ja intravasaatiota sekä metastaasia keuhkoihin. $\alpha_2\beta_1$ -integroinin puute myös nopeutti primäärikasvaimen muodostumista. Samassa tutkimuksessa havaittiin α_2 -integroinin vähentyneen ekspression korreloivan metastaasien muodostumisen ja huonon ennusteen kanssa myös ihmisen rinta- ja eturauhassyövässä. Sottnik ja muut (2013) taas tutkivat $\alpha_2\beta_1$ -integroinin ilmentymistä eturauhasessa sekä eturauhassyövän primäärikasvaimessa ja metastaaseissa, ja havaitsivat että $\alpha_2\beta_1$ -integroinin määrä alenee primäärikasvaimessa ja edelleen pehmytkudosmetastaaseissa normaaliin kudokseen nähden, mutta nousee jälleen luumetastaaseissa, mikä voi kuvastaa $\alpha_2\beta_1$ -integroinin tarvetta syöpäsolujen kolonisaatiossa kollageenipitoiseen luuympäristöön. Myös Ziaee ja Chung (2014) osoittivat, että luumetastaasien muodostuminen korreloi α_2 -integroinin korkean ekspression kanssa.

$\alpha_2\beta_1$ -integroini voi edistää solujen liikettä ja lisätä soluväliaineen proteiinien hajotukseen tarvittavien matriksin metalloproteiinaasien tuotantoa. $\alpha_2\beta_1$ -integroini välittää hiiren rintasyöpäsolujen invasiota MMP-3:n tuotannon kautta (Lochter ja muut 1999). Ihmisen MDA-MB-231-rintasyöpäsolujen migraatio kollageenilla riippuu $\alpha_2\beta_1$ -integroinin

välittämästä p38-MAPK:n aktivoitumisesta, mikä lisää MMP-13:n tuotantoa (Ibaragi ja muut 2011). $\alpha_2\beta_1$ -integriinin lisääntynyt ekspressio saattaa lisätä munasarjakarsinooman syöpäsferoidien metastaattista kykyä edistämällä sferoidirakenteen purkautumista ja soluväliaineen hajotusta MMP-2:n ja MMP-9:n tuotannon kautta (Shield ja muut 2007). Ihmisen melanoomasoluissa $\alpha_2\beta_1$ -integriini säätelee matriksin metalloproteiinaasien 1, 2, 3, 13 ja 14 ilmentymistä (Baronas-Lowell ja muut 2004). $\alpha_2\beta_1$ -integriini voi myös auttaa syöpäsolujen, kuten PC-3-eturauhassyöpäsolujen ja MDA-MB-231-rintasyöpäsolujen, poistumista verenkierrosta aiheuttamalla endoteelisolujen välisten sidosten hajoamista suonen endoteelisen kadheriinin (*engl.* vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) tyrosiinifosforylaation kautta (Haidari ja muut 2012). $\alpha_2\beta_1$ -integriinin on myös esitetty lisäävän MMP-1:n tuotantoa syöpäsoluissa (Riikonen ja muut 1995a).

3.3.2 $\alpha_2\beta_1$ -integriini syöpäsolujen proliferaation säätelijänä

$\alpha_2\beta_1$ -integriini voi myös lisätä solujen proliferaatiota riippuen kollageenimatriksin tyypistä ja fyysisestä tilasta. Säikeinen tyypin I kollageeni voi aiheuttaa solujen jäämisen solusyklin G1/S-tarkistuspisteeseen, kun taas monomeerinen kollageeni vähentää sykliini-inhibiittoreiden määrää, jolloin solusykli pääsee etenemään (Koyama ja muut 1996; Henriet ja muut 2000; Xia ja muut 2008). Monomeerinen kollageeni aiheuttaa myös haimasyöpäsolujen proliferaatiota (Grzesiak ja Bouvet 2006). Näiden tutkimuksien perusteella kollageenisäikeiden proteolyttinen hajotus voi edistää syövän $\alpha_2\beta_1$ -integriinistä riippuvaa kasvua, ja $\alpha_2\beta_1$ -integriini voi olla tärkeä syövän dormanssiuden ja kasvun säätelijänä. $\alpha_2\beta_1$ -integriini voi olla tärkeä myös syöpäsolujen kasvussa runsaasti tyypin IV kollageenia sisältävissä kudoksissa, kuten maksassa. $\alpha_2\beta_1$ -integriinin sitoutuminen ei-säikeiseen kollageeni IV:ään aiheuttaa haimasyöpäsolujen (Öhlund ja muut 2013) ja suolistosyöpäsolujen (Honoré ja muut 2003) proliferaatiota.

$\alpha_2\beta_1$ -integriini on yhdistetty myös EMT-prosessin edistämiseen. Tyypin I kollageeni käynnistää haimasyöpäsolujen EMT:n, mikä johtaa solujen lisääntyneeseen migraatioon ja proliferaatioon JNK-välitteisen N-kadheriinin ilmentämisen seurauksena (Shintani ja muut 2006) sekä hajottamalla E-kadheriinivälitteisiä solu-soluliitoksia (Koenig ja muut 2006). $\alpha_2\beta_1$ -integriini vaikuttaa syövän kasvuun ja metastaasiin okasolukarsinooman hiirimallissa (Tran ja muut 2011). Kadheriini-17 säätelee $\alpha_2\beta_1$ -integriinin aktivoitumista

ja signalointia paksusuolensyövässä, mikä lisää syöpäsolujen proliferaatiota ja maksametastaasien muodostumista (Bartolomé ja muut 2014).

3.3.3 $\alpha_2\beta_1$ -integroini syövän angiogeneesissä

$\alpha_2\beta_1$ -integroini edistää syövän angiogeneesiä. $\alpha_1\beta_1$ - ja $\alpha_2\beta_1$ -integroinien on osoitettu olevan tärkeitä angiogeneesiä lisäävän VEGF:n stimuloimien endoteelisolujen adheesiolle (Tanjore ja muut 2008). VEGF lisää $\alpha_1\beta_1$ - ja $\alpha_2\beta_1$ -integroinien ilmentymistä endoteelisoluissa, mikä puolestaan lisää endoteelisolujen leviämistä, liikkumista ja proliferaatiota sekä verisuonten muodostumista. $\alpha_1\beta_1$ - ja $\alpha_2\beta_1$ -integroinien inhibointi estä VEGF:stä riippuvaisen angiogeneesin. (Senger ja muut 1997; Senger ja muut 2002.) $\alpha_2\beta_1$ -integroinin estämisen seurauksena endoteelisolujen sitoutuminen kollageeni I säikeisiin häiriintyi, ja muodostuneet verisuonet eivät olleet suurelta osin toiminnallisia $\alpha_2\beta_1$ -integroinin puuttuessa (San Antonio ja muut 2009). Toisaalta $\alpha_2\beta_1$ -integroinin geneettinen inaktivaatio edisti kasvaimen angiogeneesiä, sillä $\alpha_2\beta_1$ -integroinin on havaittu välittävän endorepelliinin angiogeneesiä inhiboivaa vaikutusta (Woodall ja muut 2008).

3.3.4 $\alpha_2\beta_1$ -integroini kemoresistenssissä ja syövän kantasoluissa

$\alpha_2\beta_1$ -integroinin ja kollageeni I:n välinen vuorovaikutus auttaa rintasyöpäsoluja selviytymään paklitakselin ja vinkristiinin aiheuttamasta apoptoosista, mikä viittaisi siihen, että $\alpha_2\beta_1$ -integroinin signaali ligandivuorovaikutuksessa saattaa osallistua rintasyövän lääkeresistenssin muodostumiseen. (Aoudjit ja Vuori 2001). $\alpha_2\beta_1$ -integroini osallistuu apoptoosin välttämiseen pienisoluisen keuhkosyövän kemoterapiassa (Sethi ja muut 1999; Hartmann ja muut 2005). $\alpha_2\beta_1$ -integroini-kollageeni I -vuorovaikutus vähensi myös doksorubisiinin aiheuttamaa apoptoosia T-solulinjan syöpäsoluissa (Naci ja muut 2012).

Eturauhassyövän kantasolut ilmentävät runsaasti $\alpha_2\beta_1$ -integroiniä, ja niillä on kyky aloittaa kasvaimia (Collins ja muut 2005). Kollageeni I induoi todennäköisesti $\alpha_2\beta_1$ -integroinin välityksellä ihmisen suolistokarsinooman soluissa EMT-fenotyypin ja estää solujen erilaistumista, klonogeenisyyttä sekä lisää kantasolumarkkerien ekspressiota (Kirkland 2009). Myös kohdun myoomassa eli hyvänlaatuisessa sidekudoskasvaimessa α_2 -integroinin on havaittu olevan kantasolunkaltaisten solujen merkki proteiini (Yin ja muut 2015).

3.3.5 α_2 -integriinin ilmentymisen säätely

α_2 -integriinin ekspressiota voidaan säädellä epigeneettisesti geenin promoottorialueen metyloinnilla (Chin ja muut 2015). Mikro-RNA miR-128 pystyy inhiboimaan osteosarkoomasolujen migraatiota, invaasiota ja EMT:tä targetoimalla α_2 -integriinin lähetti-RNA:n, ja osteosarkoomassa miR-128:n ekspressio on yleensä alhaalla (Liu ja muut 2016). Myös miR-373 targetoi α_2 -integriinin lähetti-RNA:n, ja tästä johtuva α_2 -integriinin alentunut proteiinitason ekspressio johti solu-soluvuorovaikutusten purkautumiseen, aktiinistressisäikeiden depolymerisaatioon ja syöpäsolujen migraatioon sekä lisääntyneisiin imusolmukemetastaaseihin rintasyövässä (Ding ja muut 2015).

α_2 -integriinin rooli syövän kehityksessä ja metastaasissa vaihtelee α_2 -integriinin ekspressiotason ja syöpätyypin mukaan. $\alpha_2\beta_1$ -integriini säätelee syövän metastaasia edistämällä tai inhiboimalla syöpäsolujen leviämistä, ja se voi myös lisätä angiogeneesiä. $\alpha_2\beta_1$ -integriinillä on tärkeä tehtävä syöpäsolujen migraatiossa ja invaasiossa kollageeniin. Todisteita $\alpha_2\beta_1$ -integriinin roolista syövän kemoresistenssissa on löydetty. Lisäksi $\alpha_2\beta_1$ -integriini liitetään syövän kantasoluihin.

3.4 Eturauhassyövän kantasolut ja $\alpha_2\beta_1$ -integriini

Eturauhassyöpä on Suomessa yleisin ja maailmanlaajuisesti toiseksi yleisin miesten syöpä (Globocan 2012, IARC). Lähes kaikki eturauhassyövän aiheuttamat kuolemantapaukset johtuvat primäärikasvaimen leviämisestä eli metastaasista muihin elimiin. Eturauhassyövän viiden vuoden ennusteen mukaan 99 % eturauhassyöpää sairastavista miehistä on hengissä viiden vuoden kuluttua diagnoosista, mutta syövän leviämisen myötä viisivuotisennuste tippuu 28 %:iin (American Cancer Society 2016). Suurimmalla osalla potilaista, joilla on aggressiivinen eturauhassyöpä, muodostuu metastaaseja luumun. Varhaisen havaitsemisen ja hoitokeinojen kehityksestä huolimatta ei ole vielä olemassa tehokasta ja pitkäaikaista parannuskeinoa metastaattiselle eturauhassyöväälle. Tämän hetkisten hoitokeinojen mahdollisuudet ovat rajalliset ja vaste vaihteleva. Syövän kantasolut ovat mahdollisesti syyllisiä metastaattisten kasvustojen aloittamiseen ja syövän uusiutumiseen, ja niiden tunnistaminen on tärkeää syövän hoitokeinojen kehitystä varten.

3.4.1 $\alpha_2\beta_1$ -integriini normaalin eturauhaskudoksen kantasoluissa

Collins työryhmineen (2001) havaitsi eturauhasen $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentävien kantasolujen sijaitsevan eturauhasen basaalikerroksessa. Noin 1 % basaalikerroksen soluista ilmensi runsaasti $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä, ja nämä solut voitiin eristää nopean kollageeni I:een sitoutumisen perusteella. Eristetty solupopulaatio ilmensi basaalisolun fenotyypin sytokeratiineja 5 ja 14 ja niistä puuttui erilaistumiseen liitetyt markkerit PSA (prostata-spesifinen antigeeni) ja PAP (*engl.* prostatic acid phosphatase, eturauhasen hapan fosfataasi). Nämä oletetut kantasolut muodostivat enemmän kolonioita *in vitro*, muodostivat eturauhasenkaltaisia rauhasia *in vivo* ja osoittivat merkkejä eturauhasspesifisestä erilaistumisesta. (Collins ja muut 2001.) Eturauhasen kantasolujen tunnistamiseksi kehitettiin $\alpha_2\beta_1$ -integriinin lisäksi muitakin merkkiproteiineja, kuten solukalvon glykoproteiini CD133. $CD133^+/\alpha_2\beta_1^{\text{korkea}}$ -eturauhassolut pystyvät muodostamaan eturauhasen erilaistuneita rauhasrakkularakenteita hiirissä. (Richardson ja muut 2004.)

3.4.2 $\alpha_2\beta_1$ -integriini eturauhassyövän kantasoluissa

Collins ja muut (2005) tunnistivat ja kuvailivat ensimmäisenä ihmisen eturauhassyövän kantasolut. He käyttivät virtausytometriaa $CD44^+/\alpha_2\beta_1^{\text{korkea}}/CD133^+$ -solupopulaation eristämiseen ihmisen eturauhassyövän primäärikasvaimista, ja osoittivat näiden solujen proliferoituvan ja muodostavan kolonioita sekä pystyvän erilaistumaan fenotyypiltään erilaisiksi soluiksi, jotka ilmentävät erilaistuneiden solujen piirteitä. Noin 0,1 % kasvaimen soluista edusti $CD44^+/\alpha_2\beta_1^{\text{korkea}}/CD133^+$ -fenotyyppiä, eikä näiden solujen määrän ja Gleason-luokan välillä havaittu korrelaatiota. (Collins ja muut 2005.) Patrawala työryhmineen (2006) osoitti, että $CD44^+$ eturauhassyövän soluilla on kantasolunkaltaisia ominaisuuksia muodostaa kasvaimia ja metastaaseja. Nämä $CD44^+$ -solut myös ilmensivät enemmän kantasoluihin yhdistettyjen geenien, kuten Oct-4, Bmi ja β -kateniini, lähetti-RNA:ita ja pystyivät erilaistumaan erilaisiksi solutyypeiksi. Lisäksi pieni osa näistä $CD44^+$ -eturauhassyöpäsoluista pystyivät jakautumaan asymmetrisesti. (Patrawala ja muut 2006.) $\alpha_2\beta_1^{\text{korkea}}/CD133^+$ - ja $\alpha_2\beta_1^{\text{matala}}/CD133^-$ solupopulaatioiden geeniekspressioprofiileja vertailemalla löydettiin 581 erilaisesti ilmentyvää geeniä solupopulaatioiden välillä. Näiden geenien perusteella JAK-STAT-signaalintireitti sekä fokaaliadheesioiden kautta tapahtuva signaali ovat eturauhassyövän kantasolujen toiminnan avainprosesseja. (Birnie ja muut 2008.) Myös ihmisen eturauhassyövän

kudosnäytteiden kantasolunkaltaiset solut edustivat $CD44^+/\alpha_2\beta_1^{\text{korkea}}/CD133^-$ -fenotyyppiä (Guzman-Ramirez ja muut 2009).

Eturauhassyövän kantasoluja on eristetty myös ihmisen eturauhassyövän solulinjoista käyttäen avuksi samoja solunpinnan markkereita. $CD44^+/\alpha_2\beta_1^{\text{korkea}}/CD133^-$ -fenotyyppi on havaittu myös DU145-eturauhassyöpäsolulinjan mahdollisissa kantasoluissa (Wei ja muut 2007). PC3-solulinjan erilaistumattomia ja uusiutuvia kantasolunkaltaisia soluja sisältävät holokloonisolut ovat solupinnaltaan $CD44^+/\alpha_2\beta_1^{\text{korkea}}/\beta$ -kateniini⁺-fenotyyppiä, ja pystyvät hiirikokeissa aloittamaan uusia kasvaimia hiirestä toiseen siirrettynä sekä tuottamaan erilaistuneita solutyyppejä. Erilaistuneemmat ja kantasoluominaisuutensa menettäneet PC3-solutyypit ilmentävät merkittävästi vähemmän kantasolumarkkereita pinnallaan, eivätkä ne pystyneet aloittamaan kasvaimia, eikä niitä voinut holokloonien tapaan ylläpitää kasvussa. (Li ja muut 2008.) Pten/PI3K/Akt-signaaloinnin on osoitettu olevan tärkeä $CD44^+/CD133^+$ -solujen tumorigenisyydelle PC3- ja DU145-solulinjoissa (Dubrovka ja muut 2009).

3.4.3 Eturauhassyövän kantasolumarkkerien kyseenalaisuus

CD44 ja CD133 on yhdistetty syövän kantasoluihin useissa eri kudoksissa (Uchida ja muut 2000; Al-Hajj ja muut 2003; Richardson ja muut 2004; Singh ja muut 2004), mutta niiden spesifisyys syövän kantasolupopulaatioiden tunnistamisessa on kyseenalaistettu. Esimerkiksi CD44:n ilmentyminen sekä hyvän- että pahanlaatuisissa eturauhasen kasvustoissa vaihtelee eri tutkimuksissa ja CD44:n suhde kasvaimen luokitteluun on ristiriitainen (Patrawala ja muut 2006; Ugolkov ja muut 2011). CD133:n havaittu ekspressio voi vaihdella suuresti sen mukaan, mitä värjäystä ollaan käytetty, sillä useimmat käytetyistä vasta-aineista tunnistavat glykolysoidun epitoopin. CD133:n havaittiin ilmentyvän laajalti erilaistuneessa suoliston epiteelissä, ja sekä $CD133^-$ että $CD133^-$ -suolistosyöpäsoluilla oli kantasolunkaltaisia ominaisuuksia. (Shmelkov ja muut 2008.) Oletettujen kantasolumarkkereiden käyttö eturauhassyövän kantasolujen tunnistuksessa ja mahdollisessa lääkehoidon kohdistamisessa on epäselvää ja vaatii lisää tutkimuksia.

Wang ja muut (2015a) vertailivat eturauhassyöpäsolujen mitoottisesti hiljentyneitä alapopulaatioita nopeasti jakautuviin populaatioihin ja havaitsivat, että hiljentyneet solut

eivät ilmentäneet kantasoluihin yhdistettyä markkeria CD133, ja lisäksi niiden CD44:n ja $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ekspressiot olivat samalla tasolla nopeasti jakautuvien solujen kanssa. Tämän mallin mukaan mitoottinen hiljentyminen, eikä sinänsä erityinen kantasolumaisuus, kuvastaa luometastaasin aloittavien eturauhassyöpäsolujen fenotyyppiä.

Eaton ja muut (2010) tutkivat eturauhassyövän oletettujen kantasolumarkkereiden ilmentymistä primäärikasvaimissa ja luometastaaseissa ja huomasivat, että mikään yksittäinen markkeri tai niiden yhdistelmä ei määrittele aktiivisesti kasvavien metastaattisten solujen fenotyyppiä, vaan jokaisessa luometastaasissa ilmeni oma yhdistelmänsä markkereita. CD133:a ilmeni alle 1 %:ssa primäärikasvaimen soluja, ja sen määrä nousi noin puolelta luometastaasinäytteissä, kun taas lopuissa metastaasinäytteissä CD133:n ilmentymistä ei havaittu ollenkaan. Tämän mukaan CD133⁺-solujen läsnäoloa ei välttämättä tarvita metastaasin jatkuvassa kasvussa. $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmeni laajalti luometastaasinäytteissä, mikä voi kuvastaa sen keskeistä roolia eturauhassyöpäsolujen adheesiossa sekä kasvussa luuympäristössä. CD44 ei ilmentynyt juuri lainkaan primäärikasvaimessa, mutta luometastaasinäytteistä suurimmassa osassa oli vaihtelevan tasoisen CD44:n ekspressio. CD44:n ekspression on arveltu yhdessä $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ja CD133:n kanssa määrittävän eturauhassyövän kantasolun fenotyyppiä, ja Eatonin ja muiden (2010) tutkimuksen mukaan ainakin CD44:ää ja $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmenee suurimmassa osassa luometastaaseja. On myös mahdollista, että CD44⁺/ $\alpha_2\beta_1$ ^{korkea}/CD133⁺-soluja tarvittiin luometastaasin muodostumisen alussa, mutta metastaasin kehittyessä dormantista aktiivisen kasvun vaiheeseen nämä syövän kantasolun tunnusmerkit on kadotettu. (Eaton ja muut 2010.) Syövän kantasolujen onkin raportoitu olevan fenotyypiltään dynaamisia ja osoittavan vaihtelua jopa saman kasvaimen sisällä (Li ja Laterra 2012; Visvader ja Lindeman 2012).

$\alpha_2\beta_1$ -integriiniä on pidetty eturauhassyövän kantasolun merkkiproteiinia ja lisäksi sen on raportoitu vaikuttavan syöpäsolujen invaasiokykyyn ja ohjaavan metastaasien muodostumista kollageenipitoisiin elimiin, kuten maksaan ja luuhun. α_2 -integriiniä ilmentävien solujen määrä eturauhassyövän primäärikasvaimessa korreloi lisääntyneen paikallisen invaasion ja luometastaasien muodostumisen kanssa, ja siten heterogeenisen primäärikasvaimen pienellä kantasolunkaltaisella populaatiolla saattaa olla tärkeä rooli syövän leviämisessä (Colombel ja muut 2012). α_2 -integriiniä ilmentävien syöpäsolujen läsnäolo eturauhassyöpäpotilaan luuytimessä korreloi lisääntyneen metastaasin muodos-

tumisen ja eturauhassyövän aiheuttaman kuoleman kanssa (Ricci ja muut 2013). Siten $\alpha_2\beta_1$ -integroini saattaa olla erityisen vaarallisen, metastaaseja aloittavan syöpäsolu-populaation tunnusmerkki.

3.5 $\alpha_2\beta_1$ -integroini eturauhassyövän luumetastaasissa

3.5.1 $\alpha_2\beta_1$ -integroinin ja kollageeni I:n välinen vuorovaikutus invaasiassa

$\alpha_2\beta_1$ -integroinin on osoitettu välittävän solujen kiinnittymistä ja migraatiota kollageeni I:een eturauhassyövän lisäksi rhabdomyosarkoomassa (Chan ja muut 1991), munasarja- (Fishman ja muut 1998) ja haimasyövässä (Grzesiak ja Bouvet 2006) sekä osteosarkoomassa (Vihinen ja muut 1996). α_2 -integroinin yliekspressio kiihdytti melanooma- (Yoshimura ja muut 2009) ja rhabdomyosarkoomasolujen (Chan ja muut 1991) metastaasia, kun taas $\alpha_2\beta_1$ -integroinin inhibointi vasta-aineella vähensi syövän leviämistä maksaan ja imusolmukkeisiin melanoomassa sekä maha- ja suolistosyövässä (Yamaguchi ja muut 2000; van der Bij ja muut 2008; Yoshimura ja muut 2009). Vihinen ja muut (1996) tutkivat kollageenireseptori-integroinien toimintaa ihmisen osteosarkoomasoluilla ja havaitsivat, että kasvaimia muodostavat solut ilmentävät huomattavasti enemmän $\alpha_2\beta_1$ -integroiniä kuin ei-tumorigeeniset solut, ja niiden liike ja invaasio kollageeni I:een on nopeampaa. α_2 -integroinin ilmentäminen ei-tumorigeenisissä osteosarkoomasoluissa lisäsi sitoutumista kollageeni I:een sekä nopeutti liikkumista ja invaasiota siihen.

$\alpha_2\beta_1$ -integroini–kollageeni I -vuorovaikutus edistää useiden solutyypin invasiivisuutta. Sekä kollageeni I:llä että siitä peräisin olevilla fragmenteilla oli kemotaktinen vaikutus syöpäsoluihin ja endoteelisoluihin *in vitro* migraatiokokeissa (Mundy ja muut 1981; Palmieri ja muut 2000). $\alpha_2\beta_1$ -integroiniin kohdistettu syöpähoito saattaisi estää luumetastaaseja muodostumasta, sillä luumetastaasin yhteydessä ihmisellä esiintyy kollageeni I:n hajoamistuotteita veressä (Berruti ja muut 2000).

3.5.2 $\alpha_2\beta_1$ -integroini ja matriksin hajotus

Solujen migraatio ja invaasio edellyttää solujen kykyä hajottaa soluväliainetta erilaisten proteaasien, kuten MMP:iden, välityksellä. Integroinit voivat säädellä MMP:iden ekspressiota. $\alpha_2\beta_1$ -integroinin on esitetty voivan lisätä MMP-1:n ilmentymistä syöpäsoluissa (Riikonen ja muut 1995a), ja MMP-1:n taas on esitetty hajottavan ja mahdollisesti

myös denaturoivan tyypin I kollageenimatriksia, ja siten osallistuvan α_2 -integriinivälitteiseen syöpäsolujen invaasioon. Denaturaatio voi myös tehostaa muiden migraatioon ja invaasioon osallistuvien integriinien toimintaa. On osoitettu, että melanoomasolujen alustava kiinnittyminen tyypin I kollageeniin saattaa olla $\alpha_2\beta_1$ -integriinistä riippuvaista, mutta näiden solujen hajottaessa kollageenia paljastuu $\alpha_v\beta_3$ -integriinin sitoutumiskohtia (Montgomery ja muut 1994). $\alpha_2\beta_1$ -integriini välittää LNCaP-soluista lähtöisin olevien luumetastaattisten C4-2B-eturauhassyöpäsolujen adhesiivisia ja invasiivisia ominaisuuksia reseptorin klusteroinnin ja FAK/Src/paksilliini/JNK/Rac-signalointireitin aktivoitumisen kautta, mikä johtaa matriksin metalloproteiinaasien MMP-2 ja MMP-9 aktivaatioon (van Slambrouck ja muut 2009).

3.5.3 $\alpha_2\beta_1$ -integriini–kollageeni I -vuorovaikutus eturauhassyövän luumetastaasissa

Kollageeni I:n ja $\alpha_2\beta_1$ -integriinin välinen vuorovaikutus saattaa olla tärkeä tekijä eturauhassyöpäsolujen sitoutumisessa ja sopeutumisessa luun ympäristöön. Eturauhassyöpäsolut ilmentävät $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä, joka edistää solujen invaasiota ja sitoutumista luun stroomaan. Sottnik työryhmineen (2013) osoitti, että $\alpha_2\beta_1$ -integriinin yliekspressio voimisti eturauhassyöpäsolujen sitoutumista kollageeni I:een ja siten edisti solujen invaasiota ja kasvua luussa. Vastaavasti $\alpha_2\beta_1$ -integriinin hiljentäminen esti solujen sitoutumista ja migraatiota kohti kollageeni I:tä, ja $\alpha_2\beta_1$ -integriinin geeninpoisto vähensi luumetastaasien muodostumista hiirikokeissa (Sottnik ja muut 2013). PC-3-eturauhassyöpäsolut sitoutuvat osteoblastien *in vitro* tuottamaan luun soluväliaineeseen $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ja matriksin kollageenin välisen vuorovaikutuksen avulla (Kostenuik ja muut 1996). Lang ja muut (1997) tutkivat primääristen eturauhassyöpäsolujen sitoutumista luuytimen stroomaan ja havaitsivat kollageeni I:n lisäävän sekä α_2 - ja β_1 -integriinejä blokkavien vasta-aineiden estävän sitoutumista etenkin pahanlaatuisesta kasvaimesta eristettyjen syöpäsolujen kohdalla. Hall työryhmineen (2006) osoitti, että LNCaP-eturauhassyöpäsolujen sitoutuminen kollageeni I:een on $\alpha_2\beta_1$ -integriinistä riippuvaista, ja solut liikkuvat kohti kasvavaa kollageeni I -gradienttia. Vain sellaiset LNCaP-solut, jotka kykenevät sitoutumaan kollageeni I:een, muodostavat hiirikokeissa kasvaimia luuhun (Hall ja muut 2006). $\alpha_2\beta_1$ -integriinin sitoutuminen luuympäristön kollageeni I:een aktivoi RhoC GTPaasin ja käynnistää signalointiketjun, jonka seurauksena solun tukiranka järjestyy uudelleen, solu liikkuu ja lopulta kollageenin stimuloimana invasoi luuhun (Hall ja muut 2008).

3.5.4 $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ilmentyminen luometastaasissa

TGF- β_1 (Kostenuik ja muut 1997) ja osteoblasteilta kerätty mediumi (Knerr ja muut 2004) lisäsivät $\alpha_2\beta_1$ -integriinin tuottoa ja solujen adheesiota kollageeni I:een. Luun mikroympäristössä runsaasti esiintyvä TGF- β voi lisätä $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ekspressiota (Kostenuik ja muut 1997). α_2 -integriinin lisääntynyt ilmentyminen TGF- β :n vaikutuksesta johtaa kollageenigeelin kontraktion voimistumiseen (Riikonen ja muut 1995b). RANKL:n ilmentyminen edistää luometastaasia ja sen yliekspressio lisää α_2 -integriinin tuottoa ja toimintaa (Ziaee ja Chung 2014). Luometastaaseista eristetyillä eturauhassyöpäsoluilla on kyky sitoutua kollageeni I:een, toisin kuin viskeraalimetastaasisoluilla (Hall ja muut 2006). Hall ja muut (2006) havaitsivat myös, että kollageeni I:een sitoutuvilla LNCaP-eturauhassyöpäsoluilla on 51 % korkeampi $\alpha_2\beta_1$ -integriinin ekspressio kuin normaaleilla LNCaP-soluilla, ja nämä LNCaP_{kol}-solut invasoituivat kollageeni I:een $\alpha_2\beta_1$ -integriinin välityksellä. LNCaP_{kol}-solut myös muodostivat enemmän kasvustoja kuin tavalliset LNCaP-solut luuhun injektoituina (Hall ja muut 2006). Nämä tulokset osoittavat, että eturauhassyöpäsolujen kyky sitoutua kollageeni I:een voi edistää luometastaasien muodostumista, mutta eivät kuitenkaan todista, että $\alpha_2\beta_1$ -integriini välittäisi ihmisen eturauhassyövän luometastaasia todellisuudessa.

Sottnik työryhmineen (2013) selvitti α_2 -integriinin geeniekspression tasoja ihmisen eturauhassyövän metastaaseissa Oncomine-tietokannan avulla, ja kahden erillisen tutkimuksen mukaan α_2 -integriinin ekspressio on kohonnut eturauhassyövän luometastaaseissa verrattuna pehmytkudos- ja etenkin imusolmukemetastaaseihin (LaTulippe ja muut 2002; Tamura ja muut 2007). Myös $\alpha_2\beta_1$ -integriinin proteiinitason ekspressio ihmisen eturauhassyövän kudokseteissä kasvaa luometastaaseissa verrattuna eturauhassyövän primäärikasvaimen tai pehmytkudosmetastaaseihin. $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentyy runsaasti eturauhasen normaalissa kudoksessa sekä hyvälaatuisessa liikkasvussa, kun taas primäärikasvaimessa ja edelleen imusolmukemetastaaseissa $\alpha_2\beta_1$ -integriinin määrä vähenee normaaliin kudokseen verrattuna. Luometastaaseissa $\alpha_2\beta_1$ -integriinin määrä taas kohoaa ei-pahanlaatuisen eturauhaskudoksen ekspressiotasolle. $\alpha_2\beta_1$ -integriinillä vaikuttaisikin olevan mikroympäristöstä riippuvaisia erilaisia rooleja eturauhassyövän kehityksen aikana. (Sottnik ja muut 2013.) Ramirez työryhmineen (2011) havaitsi, että α_2 -integriini hidastaa rintasyöpäsolujen liikkeelle lähtöä primäärikasvaimesta sekä siirtymistä verenkiertoon. Siten on mahdollista, että myös

eturauhassyövän primäärikasvaimessa α_2 -integriinin matala ekspressio mahdollistaa solujen leviämisen, kun taas luumatriksissa kollageeni I:n kanssa vuorovaikutuksessa ollessaan α_2 -integriinin korkea ekspressio on selektiivinen etu, ja siten eturauhassyöpäsolut jälleen ilmentävät α_2 -integriiniä kolonisoituessaan luuhun.

Ramirez ja muut (2011) havaitsivat $\alpha_2\beta_1$ -integriinin estävän metastaasien muodostumista. Toisaalta tutkimuksessa käytettiin poistogeenisiä hiiriä, joten myös kaikista eliön normaaleista soluista puuttui $\alpha_2\beta_1$ -integriini; tämä saattaa vaikuttaa suotuisan premetastaattisen ympäristön muodostumiseen ja kolonisaatioon. Tutkimuksessa ei mainita luumetastaasien muodostumista, mutta α_2 -negatiiviset syöpäsolut proliferoivat vähemmän kollageeni I:llä, viitaten mahdollisesti huonompaan kykyyn kolonisoitua luuhun. On mahdollista, että α_2 -integriinin suhteen negatiivisia syöpäsoluja on levinneenä myös luuytimeen, mutta $\alpha_2\beta_1$ -kollageeni I –vuorovaikutuksen puuttuessa solut jäävät dormanteiksi, eivätkä muodosta havaittavia kasvaimia. Mikäli soluissa myöhemmin selektiivisen paineen aiheuttamana jälleen ilmentyisi $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä, saattaisi se mahdollistaa luumetastaasin kasvun.

Eturauhassyöpäsolujen läsnäolo verenkierrossa tai luuytimessä saattaa ennustaa metastaasien muodostusta (Morgan ja muut 2009; Weckermann ja muut 2009). $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentävien kantasolunkaltaisen solujen määrä paikallisen eturauhassyövän primäärikasvaimessa (Colombel ja muut 2012) sekä luuytimeen levinneinä (Ricci ja muut 2013) korreloi positiivisesti luumetastaasin muodostumisen kanssa.

$\alpha_2\beta_1$ -integriinillä on tärkeä rooli syöpäsolujen invaasiassa ja kolonisaatiossa kollageenipitoisiin ympäristöihin. Lisäksi $\alpha_2\beta_1$ -integriini voi edistää angiogeneesiä ja syövän kemoresistenssiä. $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä pidetään myös eturauhassyövän kantasolujen merkkiproteiinina, joten $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentävät eturauhassyöpäsolut saattavat olla metastaasien kannalta kriittinen solualapopulaatio. $\alpha_2\beta_1$ -integriini on laajalti useissa eri solutyypeissä ilmenetty integriini, joka säätelee monia biologisia prosesseja. α_2 -integriinin suhteen poistogeeniset hiiret ovat kuitenkin täysin elinkelpoisia, kehittyvät normaalisti sekä ovat hedelmällisiä, ja vain pieniä puutteita maitorauhasen haarautumisessa ja verihiutaleiden viivästynyt sitoutuminen kollageeniin havaittiin (Chen ja muut 2002; Holtkötter ja muut 2002). Tämän perusteella $\alpha_2\beta_1$ -integriinin targetointi syövän hoidossa voisi olla turvallista potilaalle ja saattaisi mahdollistaa eturauhassyövän luumetastaasien estämisen.

OSA II. KOKEELLINEN OSUUS

4 TYÖN TAVOITTEET

Erikoistyön tarkoituksena oli tutkia α_2 -integriinin roolia DU145-eturauhassyöpäsolujen geenien ilmentymisen ja invaasion säätelijänä. Aluksi varmennettiin ryhmässä aiemmin saatujen NGS-tulosten perusteella valittujen geenien ilmentymistasot α_2 -integriiniä erilaisesti ilmentävien DU145-solutyypin välillä. RNA-tason ilmentymisen lisäksi oltiin kiinnostuneita siitä, nähdäänkö myös proteiinitasolla samankaltaisia eroja solutyypin välillä sekä siitä, vaikuttaako α_2 -integriini proteiinien lokalisaatioon soluissa. Haluttiin myös selvittää, miten α_2 -integriinin aktivoituminen sen sitoutuessa ligandiinsa, kollageeni I:een, vaikuttaa solutyypin välillä erilaisesti ilmentyvien geenien ilmentymistasoon. Geenien ilmentymisen lisäksi tutkittiin DU145-solujen invaasiokykyä, tarkoituksena selvittää lisääkö α_2 -integriini solujen liikettä tyvikalvoa muistuttavan Matrigeelin läpi tai kollageeni I -pitoisessa ympäristössä. Erikoistyön tavoitteena oli osoittaa, että α_2 -integriinillä on tärkeä rooli eturauhassyövässä ja sen metastaasissa, ja siten tulevaisuudessa voitaisiin hyötyä eturauhassyövän lääkehoidon kohdistamisesta α_2 -integriiniä ilmentäviin syöpäsoluihin.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

5.1 Käytetyt solulinjat ja kasvatusolosuhteet

5.1.1 Käytetyt solulinjat ja solujen kasvatatus

Erikoistyössä käytettiin DU145-solulinjasta (American Type Culture Collection, ATCC) tehtyjä neljää erilaista eturauhassyöpäsolutyyppiä: 1) $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä ilmentäviä villityypin soluja DU145WT (α_2^+), 2) DU145KO (α_2^-) -soluja, joista α_2 -integriinin geeni on poistettu CRISPR/Cas9-tekniikalla, 3) DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluja, joihin α_2 -integriinin ilmentyminen on palautettu transfektoimalla DU145KO (α_2^-) -soluihin α_2 -integriinin geeni sekä 4) DU145KO+vektori (α_2^-) -soluja, joihin on transfektoitu kontrollivektori (Ojalil ja muut, julkaisematonta tietoa). DU145-solulinja on alun perin eristetty ihmisen aivoissa esiintyneestä eturauhassyövän etäpesäkkeestä (ATCC).

DU145-solut kasvatettiin RPMI 1640 -mediumissa (Lonza), johon oli lisätty 10 % (V/V) naudan sikiön seerumi (*engl.* fetal calf serum, FCS, Biowest), 2 mM ultraglutamiini (Lonza) sekä 100 yksikköä/ml penisilliiniä ja streptomysiiniä (PenStrep, Lonza). DU145KO+ α_2 (α_2^+) ja DU145KO+vektori (α_2^-) solujen kasvatusmediumissa oli lisäksi selektiota ylläpitämässä 250 $\mu\text{g/ml}$ G418-antibiotti (#10131, GIBCO).

Soluja kasvatettiin soluviljely- ja koetilanteissa +37 °C:ssa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa. Solujen irrotukseen käytettiin trypsiini-EDTA:ta (etyleenidiamiinitetraetikkahappo, Lonza) ja pesuihin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (*engl.* phosphate buffered saline, PBS, Lonza).

5.1.2 Kasvualustat

Soluja kasvatettiin kokeissa eri soluväliaine proteiineilla päällystetyillä maljoilla. Solumaljat päällystettiin joko 5 $\mu\text{g/cm}^2$ naudan ihon kollageeni I:ä (PureCol, Advanced BioMatrix) tai 1 $\mu\text{g/cm}^2$ ihmisen plasman fibronectiinia (Sigma Aldrich) PBS-puskurissa yli yön +4 °C:ssa. Päällystyksen jälkeen maljat pestiin PBS:llä ja epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi maljojen vapaat kohdat peitettiin 0,1 % (m/V) naudan seerumin albumiinilla (*engl.* bovine serum albumin, BSA, Biowest) PBS:ssä tunnin ajan +37 °C:ssa. Lopuksi maljat pestiin PBS:llä.

5.1.3 α_2 -integriinin ilmenemisen määrittäminen virtausytometrillä

α_2 -integriinin ilmentymistä solujen pinnalla tutkittiin virtausytometrillä. Koetta varten solut pestiin PBS:llä ja irrotettiin trypsiini-EDTA:lla. Trypsiini inhiboitiin lisäämällä 1:1 tilavuussuhteessa 1 mg/ml trypsiini-inhibiittoria (T9128, Sigma Aldrich) PBS:ssä. Näytteitä varten 600 000 solua kerättiin sentrifugoimalla 500 x g /4 min /RT. Epäspesifiset sitoutumiskohdat peitettiin pitämällä soluja blokkauspuskurissa (1 % FCS [V/V] PBS:ssä) jäällä 30 min. Solut kerättiin sentrifugoimalla 500 x g /4 min /+4 °C ja α_2 -integriini värjättiin ihmisen α_2 -integriinin tunnistavalla hiiren monoklonalisella primäärivasta-aineella (12F1, #555668, BD Pharmingen) 7,5 µg/ml pitoisuudessa blokkauspuskurissa tunnin ajan +4 °C:ssa heilutuksessa, minkä jälkeen solut pestiin PBS:llä. Sekundäärivasta-aineena käytettiin kanissa tuotettua hiiren IgG:n tunnistavaa FITC (fluoreseiini-5-isotiosyanaatti) -konjugoitua polyklonaalista vasta-ainetta (A16167, Life Technologies) 7,5 µg/ml pitoisuudessa blokkauspuskurissa 30 min +4 °C:ssa heilutuksessa. Lopuksi solut kerättiin sentrifugoimalla kuten edellä ja pestiin kahdesti PBS:llä. Sekundäärivasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen määritettiin värjäämällä solut pelkästään sekundäärivasta-aineella. Lisäksi valmistettiin laitteen kalibrointia varten värjäämätön näyte, jossa oli 100 000 solua jokaista neljää solutyypistä. Mittausta varten solut suspensoitiin PBS:ään. Näytteet ajettiin LSR II -virtausytometrillä (BD Biosciences; FITC:n eksitaatio 488 nm:ssä) ja tulokset analysoitiin FlowJo-ohjelmalla (FlowJo, LLC).

5.1.4 Sferoidien kasvatus

Tutkimuksessa käytettiin maljakasvatuksen lisäksi kolmiulotteista kasvatusmallia. Solujen sferoidikasvatusta varten agarosista valettiin kasvatusalustoja 24-kuoppalevyille valumuottien avulla valmistajan ohjeiden mukaan (#24-35, 3D Petri Dish, MicroTissues). Solut irrotettiin ja trypsiini inhiboitiin kuten edellä kohdassa 6.1.3. Solut kerättiin sentrifugoimalla 500 x g /4 min /RT ja suspensoitiin seerumittomaan RPMI 1640 -mediumiin. Agarosimuottiin pipetoitiin 280 000 solua (8 000 solua yhtä sferoidia kohti) 75 µl:ssa mediumia, annettiin solujen laskeutua muotin pohjalle ja lisättiin muotin ympärille 1 ml mediumia. Sferoideja kasvatettiin muoteissa standardikasvatusolosuhteissa +37 °C:ssa 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa. Sferoidit kerättiin siirtämällä muotit uudelle 24-kuoppalevyille PBS:ään, kääntämällä ne ylösalaisin ja sentrifugoimalla

lyhyesti 500 x g. Tämän jälkeen sferoidit pipetoitiin kuoppalevyllä eppendorf-putkiin ja kerättiin sentrifugoimalla 500 x g /4 min /RT.

5.2 Geenien RNA-tason ilmentymisen tutkiminen

5.2.1 RNA:n eristäminen ja cDNA-synteesi

RNA:n eristämistä varten soluja kasvatettiin 72 tunnin ajan joko 1) fibronektiinillä tai kollageeni I:llä päällystetyllä solukasvatusmaljalla tai 2) sferoideina kuten kohdassa 6.1.4 siten, että yhteen RNA-eristykseen käytettiin 4 sferoidimuotillista soluja. RNA eristettiin NucleoSpin RNA -kitillä (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeen mukaisesti. β -merkaptoetanolin sijaan solujen hajotuksessa käytettiin 15 mM ditiotreitolia (DTT). RNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher). cDNA (komplementaarinen DNA, *engl.* complementary DNA) valmistettiin SensiFAST cDNA Synthesis Kit -kitin (Bioline) ohjeen mukaisesti 1 μ g:sta RNA:ta. Jokaisesta näytesarjasta valmistettiin kolme biologista toistoa.

5.2.2 Käytetyt alukkeet ja koettimet

Uuden sukupolven sekvensoinnin (*engl.* next-generation sequencing, NGS) perusteella DU145-solutyyppien välillä erilaisesti ilmentyvien geenien (Ojalill ja muut, julkaisematonta tietoa) joukosta valittiin 12 geeniä, joiden ilmentymistä tutkittiin tarkemmin reaaliaikaisella kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla (*engl.* quantitative polymerase chain reaction, qPCR). Kokeessa käytettiin geenit spesifisesti tunnistavia alukkeita (Eurofins Genomics) ja koettimia (Universal ProbeLibrary, Roche). Itse suunniteltujen alukkeiden sekvenssit sekä Universal ProbeLibraryn koettimien numerot on lueteltu taulukossa 1. Näiden lisäksi käytettiin MMP-1:n tunnistavia alukkeita (5'-AAGATGAAACGTGGACCAACAATT-3' ja 5'-CCAAGAGAATGGAAGAGTTC-3') ja koetinta (5'-FAM-CAGAGAGTACAACCTTACATCG TGTTGCGGCTC-TAMRA-3'), jotka saatiin Veli-Matti Kähärin tutkimusryhmältä (Stokes ja muut 2010), sekä taloudenpitogeneeni GAPDH:n alukkeita (5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' ja 5'-TTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3') ja koetinta (5'-FAM-ACGACCACTTTGTC AAGCTCATTTCTGGT-TAMRA-3') (Universal ProbeLibrary, Roche).

Taulukko 1. Kvantitatiivisessa PCR:ssä käytetyt alukkeet ja koettimet

Geeni	Etualuke	Taka-aluke	Koetin
CHD5	TGGGCTACATGGATGAGAAA	CTCACTCTCCACTCTATCCAAGG	11
CDH5	AAGCCTCTGATTGGCACAGT	GACTCGGAAGAACTGGCCC	58
KIF26B	CGTGTTCTTCACACTGCACAT	CTGCGACCTCCAGACATTC	58
LG11	TCACTAACCAAACTGACATTCCTAA	ACACGTCCCCTTTCACTGAG	88
PKP1	AAACAGGCACGTCTGGCA	AAGCCATCATACATGGAACCTC	68
RBP1	ACGCTGAGCACTTTTAGGAACT	ATGCCTGTCAGATCCTCCTC	12
SCARA5	TCCAAGCTGAACCTGTGTGA	AGAATCAGGAAGACCAGCAG	56
SDC2	AAACGGACAGAAGTCTTAGCAG	CCTTCATCCTTCTTTCTCATGC	18
SVEP1	TCTCTGTTGGTTTGCCATA	ATGGAGCCCACAAAAGACTC	26
SYK	AAAGACAAATGGAAAGTTCCTGA	CTTTGTCGATGCGATAGTGC	40
VWA2	GGGTTTGCAGAGGTTGACTG	CTGCGGTACCACCAGGAC	76

5.2.3 Kvantitatiivinen PCR

Geenien lähetti-RNA:n ilmentymistasoja tutkittiin qPCR:llä. PCR-reaktiot (100 nM koetin, 300 nM alukkeet, 2 µl 1:10 laimennettua cDNA:ta) valmistettiin ABI TaqMan Universal Master Mix II -puskuriin (Applied Biosystems) 10 µl:n tilavuuteen. Reaktioista valmistettiin kolme toistoa. Näytteet ajettiin QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System -laitteella (Thermo Fisher) ajopalveluna (Finnish Functional Genomics Centre, Turun biotekniikan keskus, Turun yliopisto). Ajo-ohjelmassa näytteitä denaturoitiin aluksi 10 min 95 °C, sitten 45 sykliä 15 s /95 °C ja 1 min /60 °C. Tulostiedostot analysoitiin Thermo Fisher Cloud -palvelussa (Thermo Fisher), josta saatiin geenien C_t-arvot, eli sen syklin numero, jonka kohdalla näytteen antama signaali erottuu taustasta. Eri solutyypin väliset ilmentymiserot ilmoitettiin fold change -arvoina (FC), jotka kuvastavat sitä, kuinka moninkertaisesti geeni ilmentyy toiseen solutyypin verrattuna. FC-arvot laskettiin kaavalla $2^{-\Delta\Delta C_t}$, jossa $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ mitä verrataan - ΔC_t mihin verrataan ja $\Delta C_t = C_t$ tutkittava geeni - C_t kontrolligeeni (Livak ja Schmittgen 2001). Biologisille toistoille laskettiin keskiarvot eli SEM-arvot (*engl.* standard error of the mean) jakamalla näytteiden keskihajonnat biologisten toistojen lukumäärän neliöjuurella.

5.3 Geenien proteiinitason ilmentymisen tutkiminen

5.3.1 Proteiinitason ilmentyminen Western blot -menetelmällä

Solun proteiinien määrää tutkittiin Western blot -menetelmällä sekä maljakasvatuksista että sferoideista. Joko 10 cm maljalliselta soluja tai neljästä muotillisesta sferoideja eristettiin proteiinit hajottamalla solut 300 µl:aan SDS-puskuria (10 % [V/V] glyseroli; 3,3 % [w/V] natriumdodekyylisulfaatti [SDS]; 3,1 % [w/V] DTT; bromofenolisininen; 0,35 M Tris-HCl pH 6,8). Näytteitä keitettiin 95 °C /5 min ja ne sentrifugoitiin lyhyesti. Näytteet ladattiin joko 10 % SDS-PAGE-geelille (ylägeeli: 4 % [w/V] akryyliamidi-bisakryyliamidi [35,5:1, BIO-RAD]; 0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 0,05 % [w/V] ammoniumpersulfaatti [APS]; 0,2 % [w/V] TEMED [tetrametyyli-etyleenidiamiini] ja alageeli: 10 % [w/V] akryyliamidi-bisakryyliamidi; 0,4 M Tris-HCl pH 8,8; 0,033 % [w/V] APS; 0,067 % [w/V] TEMED) tai 4–20 % gradienttigelille (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, # 4561094, BIO-RAD), 50 µl näytettä yhteen kaivoon. Proteiinien koon tunnistamiseksi geelille lisättiin molekyylipainostandardi (Bluestar Prestained Protein Marker Plus, Nippon Genetics). Geelit ajettiin 120 V:lla ajopuskurissa (0,025 M Tris; 12,5 mM glysiini; 0,1 % [w/V] SDS) kunnes ajorintama saavutti geelin alareunan.

Ajon jälkeen proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle märkäsiirroksena yön yli +4 °C:ssa 35 V siirtopuskurissa (0,025 M Tris; 12,5 mM glysiini; 20 % [V/V] metanoli). Kalvo pestiin TBST-puskurilla (0,15 M NaCl; 0,05 % [V/V] Tween-20; 0,01 M Tris-HCl pH 7,5) ja sitoutumattomat kohdat peitettiin blokkaukspuskurissa (1 % BSA, 5 % maito, TBST:ssä) 30 min RT heilutuksessa. Kalvo pestiin TBST:ssä ja siirrettiin 1:1000 laimennettuun primääri-vasta-aineeseen 5 % BSA/TBST:ssä yön yli +4 °C:ssa putkenpyörittäjässä. Primäärivasta-aineina käytettiin joko PKP1- (ab183512, Abcam) tai VWA2-vasta-ainetta (#18714-1-AP, Proteintech Europe). Tämän jälkeen kalvo pestiin neljä kertaa 5 min TBST:ssä ja siirrettiin 1:15 000 laimennettuun sekundäärivasta-aineeseen (926-32213, LI-COR) 5 % BSA/TBST:ssä 45 min RT valolta suojattuna. Kalvoja pestiin kolme kertaa 5 min TBST:ssä ja kuvattiin Odyssey CLx -kuvauslaitteella (LI-COR). Tämän jälkeen kalvolta katsottiin vielä β-aktiinin määrä eri näytteissä: Kalvo siirrettiin 1:75 000 laimennettuun primäärivasta-aineeseen (A1978, Sigma Aldrich) TBST:ssä 1 h RT putkenpyörittäjässä. Pesut, sekundäärivasta-aine (926-68072, LI-COR) ja kuvaus kuten edellä. Proteiinimäärät analysoitiin Image Studio Lite -ohjelmalla (LI-

COR). Näytteiden latausmäärä tasattiin suhteuttamalla tutkittujen proteiinien antama signaali β -aktiinin signaaliin samasta näytteestä.

5.3.2 Proteiinien lokalisaatio 2D-kasvatusmallissa

Proteiinien lokalisaatiota tutkittiin kasvattamalla DU145-soluja seerumittomassa RPMI 1640 -mediumissa fibronektiinillä tai kollageeni I:llä päällystetyillä (ks. kohta 6.1.2) peitinlaseilla. 24 tunnin kasvatuksen jälkeen solut pestiin +37 °C:lla PBS:llä ja fiksattiin 20 min RT +37 °C:lla 4 % paraformaldehydillä (PFA) PBS:ssä. Solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä ja permeabilisoitiin 0,2 % Triton X-100:lla PBS:ssä 5 min RT. Solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä ja vaihdettiin laselle 1:100 laimennettu PKP1-, SVEP1- (ab121677, Abcam) tai VWA2-primäärivasta-aine (ks. kohta 6.3.1) sekä 1:50 laimennettu α_2 -integriinin tunnistava primäärivasta-aine (tuotettu rotassa, klooni 430903, R&D Systems) 3 % BSA/PBS:ssä 1,5 h ajaksi huoneenlämmössä. Näytteitä pestiin neljä kertaa 5 min PBS:llä ja lisättiin 1:200 laimennetut sekundäärivasta-aineet (A21434, Invitrogen ja A11034, Life Technologies), 1:30 laimennettu falloidiini (A22284, Life Technologies) sekä 1:1000 laimennettu DAPI (4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli, *engl.* 4',6-diamidino-2-phenylindole) 3 % BSA/PBS:ssä 40 minuutiksi valolta suojattuna huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteitä pestiin neljä kertaa 5 min PBS:llä. Objektilaseille pipetoitiin mowiol/DABCO-peitinainetta (30 % [w/V] glyseroli; 12 % [w/V] mowiol; 0,6 M Tris-HCl pH 8,5; 2,5 % [w/V] 1,4-diatsabisyklo[2.2.2]oktaani [DABCO]) ja siirrettiin peitinlasit peitinaineen päälle solupuoli alaspäin. Objektilaseja säilytettiin +4 °C:ssa. Näytteet kuvattiin Zeissin LSM 780 -konfokaalimikroskoopilla (Cell Imaging Core, Turun biotekniikan keskus, Turun yliopisto) 63-kertaisella objektiivilla. Näytteistä otettiin noin 11 kuvaa z-tasossa, joista luotiin projektio BioImageXD-ohjelmalla.

5.3.3 Proteiinien lokalisaatio sferoideissa

Proteiinien lokalisaatiota tutkittiin myös sferoideissa samoilla vasta-aineilla kuin kohdassa 6.3.2; näiden lisäksi osassa näytteistä käytettiin myös toista α_2 -integriinin vasta-ainetta (MCA2025, BIO-RAD). DU145-sferoideja kasvatettiin 72 h seerumittomassa RPMI 1640 -mediumissa, johon oli lisätty 50 μ g/ml L-askorbiinihappo (A4544, Sigma Aldrich). Solut tarvitsevat askorbiinihappoa kollageenin proliini- ja lysini-tähteiden hydroksylaatioon, jolloin muodostuu stabiileja kolmoiskierteisiä kollageenisäikeitä (de Clerck ja Jones 1980, Soucy ja muut 2011). Muottien ympärille vaihdettiin tuore

askorbiinihappomediumi vuorokauden välein. Sferoidit kerättiin kuten kohdassa 6.1.4 ja niitä fiksattiin 3 h +4 °C:ssa 4 % PFA:lla PBS:ssä, johon oli lisätty 1 % Triton X-100 (V/V) solujen permeabilisoimiseksi. Sferoideja pestiin 15 min PBS:llä ja blokattiin 3 % BSA:lla PBST-puskurissa (0,1 % Triton X-100 PBS:ssä) yön yli +4 °C:ssa. Sferoideja pestiin 15 min PBST:ssä ja lisättiin primäärivasta-aine PBST:ssä yön yli +4 °C:ssa heilutuksessa. α_2 -integriinin MCA2025-vasta-aineesta käytettiin 1:100 laimennosta. Sferoideja pestiin kolme kertaa 15 min PBST:llä ja lisättiin sekundäärivasta-aineet (MCA2025-vasta-aineen sekundäärinä käytettiin Life Technologiesin A21424-vasta-ainetta) 1:200 PBST:ssä yön yli +4 °C:ssa heilutuksessa valolta suojattuna. Lopuksi sferoideja pestiin 15 min PBS:ssä ja lisättiin 1:500 PBS:ään laimennettu DAPI 45 min RT valolta suojattuna. Sferoidit siirrettiin objektilaseille, imettiin PBS pois ja lisättiin sferoidien päälle glyserolia ja peitinlasi. Objektilaseja säilytettiin +4 °C:ssa. Näytteet kuvattiin LSM 780 -konfokaalimikroskoopilla 20-kertaisella objektiivilla. Näytteistä otettiin kuvia z-tasossa, ja näistä valittiin keskellä oleva leike. Kuvien käsittely tehtiin BioImageXD-ohjelmalla.

5.4 Solujen invaasiokyvyn tutkiminen

5.4.1 DU145-solujen invaasio Matrigeelin läpi

DU145-solujen kykyä tunkeutua Matrigeelin läpi tutkittiin Matrigeelillä päällystetyillä invaasiokammioilla (Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber, #354480, Corning) valmistajan ohjeen mukaisesti. Soluja lisättiin 100 000 kappaletta yhtä kammiota kohti seerumittomassa RPMI 1640 -mediumissa, johon oli lisätty 0,1 % BSA. Alakammiossa käytettiin 10 % FCS sisältävää RPMI 1640 -mediumia. Solujen annettiin invasoitua 24 tunnin ajan, ennen kuin läpi menneet solut fiksattiin jääkylmässä metanolissa 5 min ja värjättiin 1:1 000 laimennetulla DAPI:lla 30 min. Matrigeeli-invaasioista tehtiin 5 biologista toistoa, joissa jokaisesta solutyypistä oli 3 rinnakkaista invaasiokammiota. Invaasiokammioiden kalvot siirrettiin objektilaseille peitinaineen päälle ja kuvattiin Olympuksen BX60-mikroskoopilla (Cell Imaging Core, Turun biotekniikan keskus, Turun yliopisto) 20-kertaisella objektiivilla, 9 kuvaa eri puolilta lasia. Kuvista laskettiin solumäärät ImageJ-ohjelmalla ja solumääristä laskettiin keskiarvot sekä SEM-arvot.

5.4.2 Sferoidien levittäytyminen kollageeni I:llä

Sferoidissa olevien solujen kykyä liikkua ja levittäytyä tutkittiin kollageeni I:llä päällystetyllä kuoppalevyllä. Yksittäinen sferoidi siirrettiin kollageeni I:llä päällystettyyn kaivoon ja lisättiin sferoidin päälle 100 µl seerumitonta keratinosyytti-mediumia (*engl.* keratinocyte serum-free medium, KSF-medium, Gibco), johon oli lisätty 5 ng/ml ihmisen rekombinanttisesti tuotettua epidermaalista kasvutekijää (#10450-013, Gibco), 50 µg/ml naudan aivolisäkkeestä eristettyä ekstraktia (#13028-014, Gibco), 2 ng/ml rekombinanttisesti tuotettua leukemiaa ehkäisevää tekijää (Sigma Aldrich), 2 ng/ml kantasolutekijää (Sigma Aldrich) sekä PenStrep. Solujen levittäytymistä seurattiin IncuCyte ZOOM System -laitteella (Essen Bioscience) 24 tunnin välein 96 tunnin ajan sekä 4-kertaisella objektiivilla faasikontrastilla. Sferoidien pinta-alat määritettiin ImageJ-ohjelmalla. Migraatiokokeista tehtiin neljä biologista toistoa.

5.4.3 Sferoidien invaasio kollageeni I:een

Sferoidien kykyä invasoitua kolmiulotteiseen kollageeni I:een tutkittiin samoin kuin kohdassa 6.4.2, paitsi kuoppalevyllä olevan sferoidin päälle lisättiin ennen KSF-mediumia 40 µl kollageeni I -geeliä, jossa oli 2,0 mg/ml naudan ihon kollageeni I:tä (Nutragen, Advanced BioMatrix), 4 mM Tris-HCl pH 7,3 sekä 20 mM NaOH:ia seerumittomassa RPMI 1640 -mediumissa. Kollageenigeelin annettiin jähmettyä 2 tuntia solukasvatusolosuhteissa ennen kuin sen päälle lisättiin 100 µl KSF-mediumia. Sferoidien invaasiota seurattiin ja sferoidien pinta-alat määritettiin kuten edellä kohdassa 6.4.2.

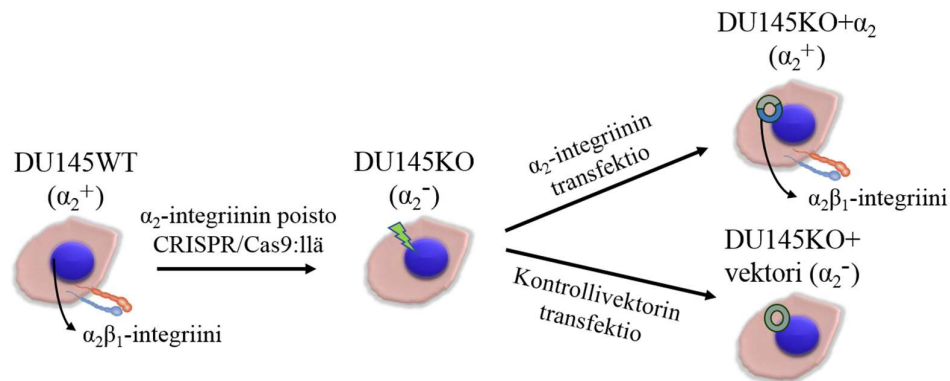
5.5 Tulosten tilastollinen tarkastelu ja kuvaajien piirtäminen

Tilastollisesti merkitsevillä eroilla p-arvo oli alle 0,05. Western blot -tulosten tilastollinen merkitsevyys testattiin saatujen signaaliarvojen 2-kantaisista logaritmeista parittaisella kaksisuuntaisella Studentin t-testillä. Matrigeeli-invaasioidatan solutyypin keskiarvoja vertailtiin one-way ANOVA -testillä sekä parittaiset vertailut tehtiin Tukeyn HSD post hoc -testillä. Sferoidien liikkeen ja invaasion tilastollinen merkitsevyys testattiin sferoidien pinta-aloista parittaisella kaksisuuntaisella Studentin t-testillä. Testejä varten tulosten normalisuus testattiin Shapiro-Wilk-testillä. Tilastotieteelliset testit tehtiin IBM SPSS Statistics -ohjelman versiolla 21. Kuvaajat piirrettiin Origin 2016 -ohjelmalla.

6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

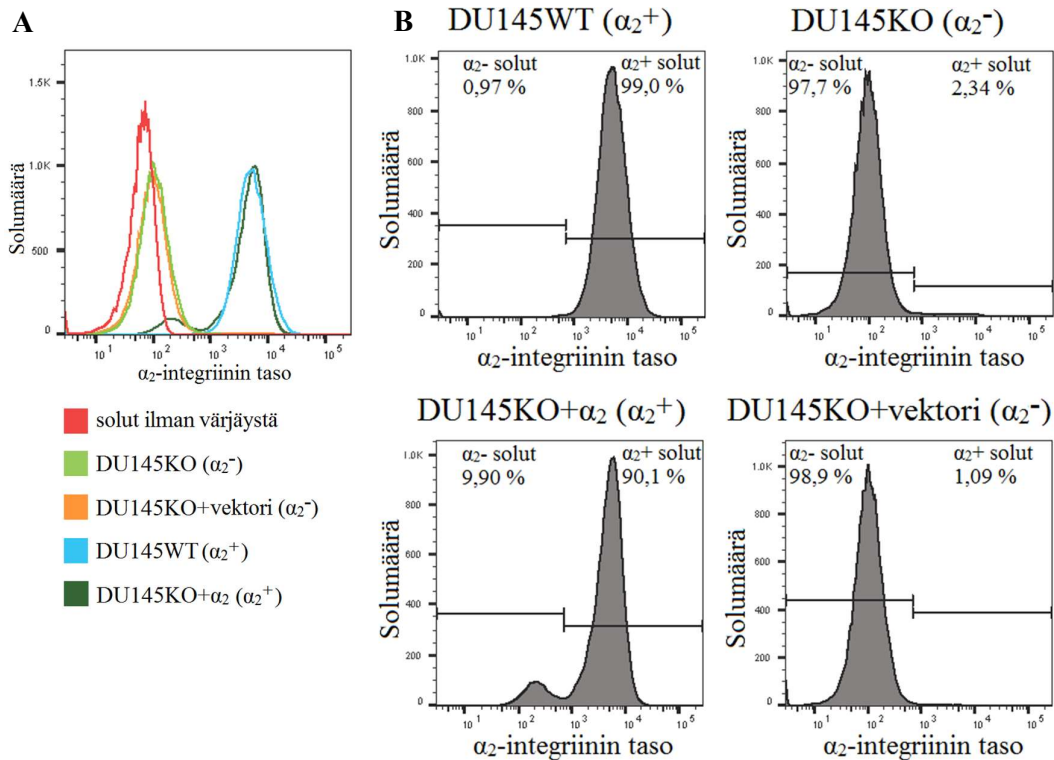
6.1 DU145-solutyypit ilmentävät eri määriä α_2 -integroiniä solukalvoillaan

Erikoistyössä käytettiin neljää erilaista DU145-eturauhassyöpäsolutyyppiä: 1) $\alpha_2\beta_1$ -integroiniä ilmentäviä villityypin soluja DU145WT (α_2^+), 2) DU145KO (α_2^-) -soluja, joista α_2 -integroinin geeni on poistettu CRISPR/Cas9-tekniikalla, 3) DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluja, joihin α_2 -integroinin ilmentyminen on palautettu transfektiolla sekä 4) DU145KO+vektori (α_2^-) -soluja, joihin on transfektoitu kontrollivektori (kuva 3).



Kuva 3. Erikoistyössä käytettiin neljää DU145-solinjasta luotua eturauhassyöpäsolutyyppiä, jotka ilmentävät $\alpha_2\beta_1$ -integroiniä eri tavoin. $\alpha_2\beta_1$ -integroiniä ilmentävistä villityypin soluista on poistettu α_2 -integroinin geeni, ja näihin poistogeenisiin soluihin transfektoitu joko α_2 -integroinin geenin sisältämä vektori tai tyhjä kontrollivektori.

Virtaussytometrian avulla varmistettiin, että solutyypin solupinnan α_2 -integroinin ilmentyminen on erilaista. Virtaussytometriassa soluihin kohdistetaan lasersäde, joka virittää vasta-aineessa olevan fluoresenssileiman. Saadun emissiosignaalin voimakkuus on suoraan verrannollinen tutkittavan kohdemolekyylin ilmentymistasoon. Tulosten perusteella DU145WT (α_2^+) ja DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solut ilmentävät α_2 -integroiniä, kun taas DU145KO (α_2^-) ja DU145KO+vektori (α_2^-) solut eivät (kuva 4). DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa α_2 -integroiniä ilmentämättömien solujen osapopulaatio on hieman suurempi kuin DU145WT (α_2^+) -soluissa (9,90 % ja 0,97 %, vastaavasti), mutta toisaalta näiden solujen keskimääräinen α_2 -integroinin ilmentymistaso on hieman korkeampi kuin villityypin solujen. Sekä DU145KO (α_2^-) -soluissa että vektorikontrollisoluissa α_2 -integroiniä ilmentävien solujen osapopulaatio on hyvin pieni. Tulosten pohjalta voidaan sanoa, että käytetyt DU145-solutyypit ilmentävät α_2 -integroiniä eri lailla toisiinsa nähden ja näiden solujen käyttö α_2 -integroinin toiminnan tutkimisessa on perusteltua.



Kuva 4. Solupinnan α_2 -integriinin ilmentymistasot ovat erilaiset DU145-solutyypien välillä. Ilmentymistasot määritettiin virtaussytometrisesti α_2 -integriinin tunnistavan vasta-aineen avulla. Kuvassa esitettyinä tyypillisen määrittelyn tulokset. (A) DU145WT (α_2^+) (turkoosi) ja DU145KO+ α_2 (α_2^+) (tummanvihreä) -solut ilmentävät pinnallaan α_2 -integriiniä, DU145KO (α_2^-) (vaaleanvihreä) ja DU145KO+vektori (α_2^-) (oranssi) -solut eivät. (B) Solutyypien α_2 -integriiniä ilmentävien (α_2^+) ja α_2 -negatiivisten (α_2^-) solujen osuus prosentteina analysoidusta solupopulaatiosta.

6.2 Geenit ilmenevät eri tavalla solutyypien välillä sekä RNA- että proteiinitasolla

Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, säätelee α_2 -integriini DU145-solujen geeniekspressiota. Ryhmässä oli aiemmin uuden sukupolven sekvensoinnilla tutkittu, mitkä geenit ilmentyvät erilaisesti RNA-tasolla solutyypien välillä (Ojalill ja muut, julkaisematonta tietoa). NGS-tulosten perusteella valittiin 12 geeniä, joiden osalta sekvensoinnin tulosten paikkansapitävyys varmistettiin, ja joiden ilmentymistä tutkittiin tarkemmin kvantitatiivisella PCR:llä. NGS-tuloksissa suurimmat erot solutyypien välillä löytyivät solujen adheesioon liittyvistä geneistä (Ojalill ja muut, julkaisematonta tietoa). α_2 -integriinin on havaittu ilmentyvän eturauhasen ja eturauhassyövän kantasoluissa (Collins ja muut 2001; Collins ja muut 2005). Tutkittavaksi valittiin tämän takia solujen adheesioon ja erilaistumiseen liittyviä genejä. Alla on lyhyesti esitelty valitut 12 geeniä sekä niiden koodaamien proteiinien toimintaa.

MMP-1 (*engl.* matrix metalloproteinase 1) on laajalti ilmenevä soluväliaineen kollageenaasi, jolla on tärkeä rooli matriksin hajotuksessa. MMP-1:n on jo aiemmin osoitettu edistävän eturauhassyövän kehittymistä metastaattiseksi syöväksi (Pulukuri ja Rao 2008) sekä vuorovaikuttavan $\alpha_2\beta_1$ -integriinin kanssa (Riikonen ja muut 1995a).

Kunapuli ja muut osoittivat (2004) LGI1:n (*engl.* leucine-rich glioma-inactivated protein 1) toimivan MMP-1:n ja MMP-3:n tuotannon vaimentajana. LGI1 on pääasiassa hermokudoksessa, mutta myös eturauhasen epiteelissä, esiintyvä eritettävä glykoproteiini, joka muun muassa säätelee jänniteherkkiä kaliumkanavia hidastamalla niiden inaktivoitua. LGI1 on syöpäkasvaimen suppressorigeeni ja sen inaktivaatio on liitetty eturauhassyövän etenemiseen ja invaasioon (Cowell ja muut 2010).

SVEP1 (*engl.* sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing protein 1) on luustokudoksen soluadheesiomolekyyli, joka välittää solujen sitoutumista luuytimen ympäristöön (Shur ja muut 2006). SVEP1:n on raportoitu ilmenevän luustokudoksessa, ihmisen luuytimen mesenkymaalisisissa kantasoluissa, osteoblastien esisoluisissa sekä rintasyöpäsoluisissa, jotka metastasoituvat luuhun (Shur ja muut 2006; Shur ja muut 2007). SVEP1 säätelee solujen adheesiota ja on mahdollisesti tärkeä tekijä metastaattisten syöpäsolujen asettumisessa luustoon.

CDH5 eli kadheriini 5 (VE-kadheriini) on endoteelin solu-soluliitosten adheesioproteiini. CDH5 on yhdistetty glioblastooman kantasolunkaltaisuuteen ja huonoon ennusteseen (Mao ja muut 2013). Labelle työryhmineen (2008) osoitti CDH5:n ilmentyvän invasiivisessa rintasyövässä ja edistävän syövän kehittymistä angiogeneesin ja TGF- β -signaloinnin kautta. Invasiivisten solujen pääsy verenkiertoon edellyttää endoteelisolujen välisten liitosten hajoamista. $\alpha_2\beta_1$ -integriini välittää CDH5:n fosforylaatiota rintasyöpäsolujen kiinnittyessä endoteelisoluihin, ja fosforyloituneen CDH5:n lisääntyminen suhteessa totaali-CDH5:een johtaa kadheriini 5 -liitosten hajoamiseen. Samanlainen vaste havaittiin myös eturauhas- ja munasarjasyöpäsoluilla. (Haidari ja muut 2012.)

SCARA5 (*engl.* scavenger receptor class A member 5) on ferritiinireseptori, joka välittää raudan kuljetusta soluihin. SCARA5:n on havaittu hidastavan solujen proliferaatiota ja invaasiota *in vitro*, ja ilmentyminen on yleensä vähentynyt syövässä (Yan ja muut 2012). Conti työryhmineen (2016) osoitti, että syövän kantasoluja runsaasti sisältävissä

sferoideissa SCARA5:n ilmentyminen oli koholla vastaavien rintasyöpäsoluminjojen maljakasvatuksiin verrattuna.

KIF26B (*engl.* kinesin family member 26B) on välttämätön sikiön munuaisen kehityksessä, missä se lisää mesenkyymisolujen adheesiota virtsajohdinsilmuun (Uchiyama ja muut 2010). KIF26B lisää osteosarkoomasolujen kemoresistanssia (Pu ja muut 2016). Myös suolistosyövässä KIF26B:n ilmentyminen on koholla ja korreloi kasvaimen koon ja syövän kehitysasteen kanssa (Wang ja muut 2015b).

VWA2 (*engl.* von Willebrand factor A domain-containing protein 2, toiselta nimeltään colon cancer secreted protein 2 eli CCSP-2) on tyvikalvon proteiini, jonka solut erittävät soluvälitilaan. VWA2-proteiini ei tavallisesti ilmenny suolistossa, mutta suolistosyövän yhteydessä sen ilmentyminen kasvaa keskimäärin 78-kertaiseksi (Xin ja muut 2005).

RBP1 (*engl.* retinol-binding protein 1) osallistuu solunsisäiseen retinolin kuljetukseen. RBP1-proteiinin määrä on alentunut monessa syövässä, ja tämä johtaa retinolihapproreseptorien toiminnan häiriintymiseen, solujen erilaistuneisuuden menetykseen ja syövän etenemiseen (Farias ja muut 2005).

CHD5 (*engl.* chromodomain-helicase-DNA-binding protein 5) on kromatiinia muokkaava proteiini, joka säätelee transkriptiota. CHD5 on tuumorisuppressori, ja se säätelee solujen proliferaatiota, apoptoosia ja vanhenemista (Bagchi ja muut 2007). CHD5:n ilmentyminen katoaa neuroblastoomissa (Fujita ja muut 2008). CHD5:n puute estää esisolujen erilaistumista hermosoluiksi kehittyvässä neokorteksissa (Egan ja muut 2013).

SYK (*engl.* spleen tyrosine kinase) on tyrosiinikinaasi, joka osallistuu useiden solukalvon reseptorien kautta tapahtuvaan solun signaalinvälitykseen. SYK:n ilmentyminen on kohonnutta eturauhassyövässä ja liittyy syövän kehittymiseen pahanlaatuisiksi ja invasiiviseksi. Solun pinnan $\alpha_2\beta_1$ -integroiniin ja CD44:n määrän havaittiin myös vähenevän SYK:n ekspression puuttuessa. (Ghotra ja muut 2015.)

PKP1 (*engl.* plakophilin 1) on desmosomeissa esiintyvä solu-soluliitoksia välittävä adheesioproteiini. PKP1:llä on raportoitu olevan rooli eturauhassyövän etenemisessä ja sen määrän on havaittu alenevan korkean Gleason-arvon syövässä sekä metastaasin

yhteydessä. Lisäksi PKP1:n on havaittu sitovan RNA:ta sitovia proteiineja ja siten osallistuvan solun transkription jälkeiseen geenisäätelyyn. (Yang ja muut 2013.)

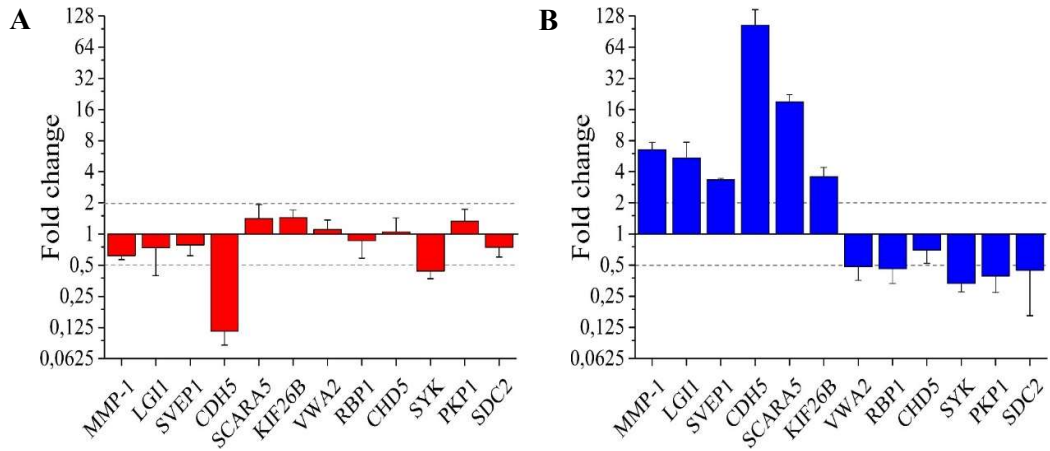
SDC2 eli syndekaani 2 on solupinnan proteoglykaani ja adheesioreseptori. SDC2:n ylituotto lisää kollageeniadheesiota ja solujen invaasiota yhteistyössä $\alpha_2\beta_1$ -integriinin kanssa (Choi ja muut 2009). Popovic ja muut (2010) havaitsivat, että SDC2:n lisääntynyt ilmentyminen liittyy eturauhassyövän kehittymiseen ja etenemiseen.

6.2.1 Sekvensoinnin tulokset toistuivat kvantitatiivisen PCR:n avulla

Ryhmässä aiemmin tehdyllä sekvensoinnilla tutkittiin DU145-solutyypien välisiä ilmentymiseroja sferoideissa, joten myös NGS-tulosten varmentamista varten kvantitatiivinen PCR tehtiin sferoideista. Solutyypien väliset ilmentymiserot tutkittujen 12 geenin osalta olivat kvantitatiivisen PCR:n mukaan samansuuntaiset kuin sekvensoinnissa (tietoa ei näytetä), joten sekvensoinnin tuloksia voidaan pitää luotettavina näiden osalta.

DU145WT (α_2^+) -solut ovat sekapopulaatio, ja geenien ilmentymistaso kuvastaa populaation keskimääräistä ilmentymistasoa. Populaation sisällä yksittäisten solujen välinen hajonta voi olla suurta. DU145KO (α_2^-) -solupopulaatio on valikoitunut CRISPR/Cas9-käsitellyistä villityypin soluista, jotka eivät ilmentäneet α_2 -integriiniä. Solutyypeistä DU145KO+ α_2 (α_2^+) ja DU145KO+vektori (α_2^-) ovat transfektoiduja soluja, joiden antibioottiselektio saattaa vaikuttaa geenien ilmentymiseen. Esimerkiksi Ryu työryhmineen (2017) tutki PenStrepin vaikutusta solujen geeniekspressioon ja havaitsi antibiootin merkittävästi muuttavan solujen geeniekspressiota ja sen säätelyä esimerkiksi lisäämällä luonnolle vieraiden aineiden aineenvaihduntaan ja lääkeaineiden solusta uloskuljettamiseen liittyvien geenien ilmentymistä.

Solutyypien selektioiden vuoksi tehtiin kaksi vertailuparia, joissa toinen solutyyppi ilmentää α_2 -integriiniä ja toinen ei: DU145WT (α_2^+) -solut verrattuna DU145KO (α_2^-) -soluihin sekä uudelleen transfektoidut DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solut verrattuna DU145KO+vektori (α_2^-) -soluihin. Näille kahdelle vertailuparille laskettiin geenien ilmentymisen FC-arvot, jotka tarkoittavat tässä tapauksessa sitä, kuinka moninkertaisesti geeni ilmenee vertailuparin α_2 -integriiniä ilmentävissä soluissa verrattuna α_2 -integriiniä ilmentämättömiin soluihin. Saaduista FC-arvoista piirrettiin pylväskuvaajat (kuva 5).



Kuva 5. DU145-solutyypin väliltä löydettiin eroja geenien ilmentymisessä. NGS-tulosten perusteella valittiin 12 geeniä, joiden RNA-tason ilmentymistä tutkittiin qPCR:llä. (A) DU145WT (α_2^+) -solujen ilmentymistaso verrattuna DU145KO (α_2^-) -soluihin. (B) DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solujen ilmentymistaso verrattuna DU145KO+vektori (α_2^-) -soluihin. Kuvaajissa y-akseli on 2-kantaisella logaritmisella asteikolla, ja pylväiden korkeus vastaa solutyypin välistä FC-arvoa, kolmen rinnakkaisen kokeen keskiarvo \pm SEM. Katkoviivoilla rajatun alueen sisäpuolelle jäävien pylväiden osalta geenin ilmentymistason ei voida sanoa olevan merkittävästi erilainen solutyypin välillä.

Jos FC-arvo on 0,5–2, ei geenien ilmentymistasojen voida sanoa merkittävästi eroavan solutyypin välillä. Kuvassa 5 α_2 -integroiniä ilmentävissä soluissa ylhäällä olevien geenien FC-arvot ovat yli 1, ja niitä vastaavat pylväät lähtevät ylöspäin y-akselin arvon 1 kohdalla olevalta viivalta. Vastaavasti α_2 -integroiniä ilmentävissä soluissa alhaalla olevien geenien FC-arvot ovat alle 1, ja niitä vastaavat pylväät lähtevät alaspäin.

Kun DU145WT (α_2^+) -soluja verrataan DU145KO (α_2^-) -soluihin, ei suurin osa tutkituista geneista eroa ilmentymiseltään solutyypin välillä. Toisessa vertailuparissa transfektoitujen solutyypin välillä taas vain yhden geenin FC-arvo jää välille 0,5–2. Lisäksi ilmentymiserot vertailuparien välillä eivät ole samansuuntaisia yli puolella tutkituista geneista. Vertailuparien erilaisuus voi johtua solutyypin selektioprosesseista, joiden takia luotettavin vertailupari on DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solut verrattuna DU145KO+vektori (α_2^-) -soluihin. Näiden kahden solutyypin välillä on vähiten solujen valikoitumisesta johtuvia eroja. PCR-reaktioiden lineaarisuutta eri cDNA-konsentraatioilla ei ole testattu, mikä saattaa aiheuttaa tuloksiin virhettä.

Transfektoituja solutyyppejä verrattaessa α_2 -integroiniä ilmentävissä soluissa MMP-1 ja SVEP1 ovat koholla, mikä saattaa tehostaa solujen invaasiota ja luumetastaasia. CDH5:n kohonnut määrä saattaa korreloida DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solujen kantasolunkaltaisuuteen

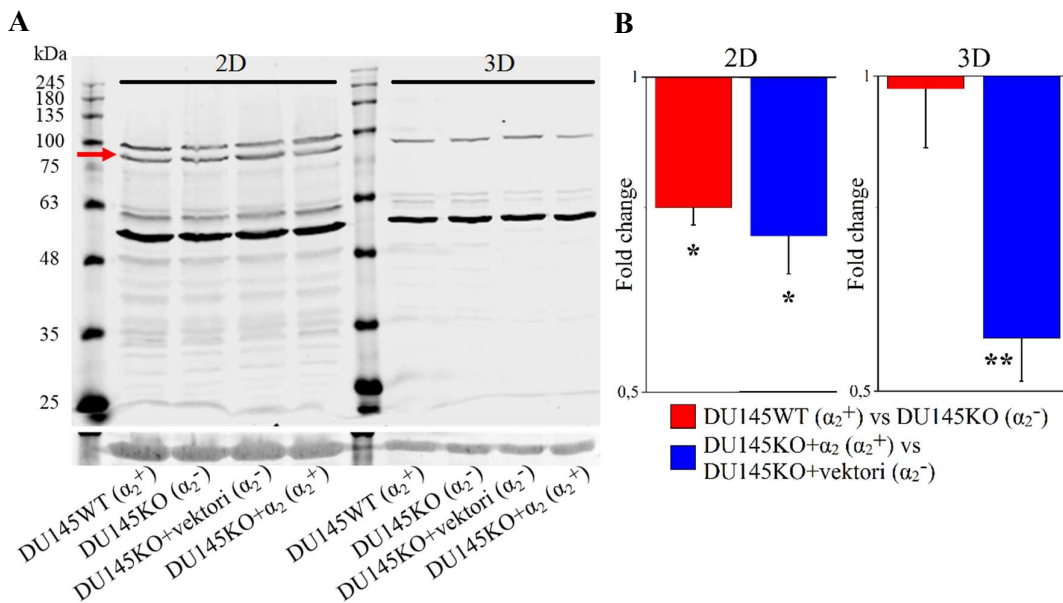
ja auttaa endoteelisoluihin sitoutumisessa. SCARA5:n kohonnut ilmentyminen voisi viitata DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solujen kantasolunkaltaisuuteen, sillä näiden solujen on havaittu ilmentävän runsaasti eturauhassyövän kantasolun merkkiproteiineja $\alpha_2\beta_1$ -integroiniä ja CD44:ää (Ojalil ja muut, julkaisematonta tietoa). Ei-transfektoituja DU145WT (α_2^+) ja DU145KO (α_2^-) -soluja verrattaessa SCARA5:n ilmentymisessä ei nähdä merkitsevää eroa. Myös CDH5 on aiemmin liitetty kantasolunkaltaisuuteen (Mao ja muut 2013), mikä voisi selittää, miksi CDH5:n ilmentyminen ei ole ylhäällä villityypin soluissa. DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solujen on havaittu selviytyvän solunsalpaaja doketakselista vertailupariaan hieman paremmin (Ojalil ja muut, julkaisematonta tietoa), ja KIF26B:n ilmentymisen on aiemmin raportoitu kasvavan syövässä (Wang ja muut 2015b) sekä välittävän syöpäsolujen kemoresistanssia (Pu ja muut 2016). Myös LGI1:n ilmentyminen on ylhäällä DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa. Normaalisti LGI1:tä ilmentyy runsaasti eturauhasen epiteelissä ja syövän yhteydessä sen määrä vähentyy (Cowell ja muut 2010). Toisaalta LGI1:n on raportoitu inhiboivan MMP-1:tä (Kunapuli ja muut 2004), joten näiden molempien kohonnut ilmentyminen saattaa liittyä toisiinsa.

Solu-soluliitoksia välittävän PKP1:n ja soluväliaineen proteiinin VWA2:n alentunut määrä DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa saattaa edesauttaa solujen invaasiota. RBP1:n alentunut määrä on aiemmin yhdistetty erilaistuneisuuden menetykseen (Farias ja muut 2005), mikä tässä tapauksessa lisäisi DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solujen kantasolunkaltaisuutta. CHD5 on tuumorisuppressori, jonka määrän on havaittu alenevan syövässä (Fujita ja muut 2008), tosin ilmentymisessä oleva ero solutyypin välillä ei ole merkittävä. Myös ero SDC2:n ilmentymisessä on pieni ja lisäksi hajonta suurta. SYK osallistuu soluissa useaan prosessiin, ja sen merkityksestä DU145-soluille tiedetään vähän. Molemmissa vertailupareissa SYK:n määrä on alentunut α_2 -integroiniä ilmentävissä soluissa. qPCR-tulosten perusteella α_2 -integroini säätelee useiden geenien ilmentymistä DU145-soluissa.

6.2.2 Samansuuntaisia geenien ilmentymiseroja havaittiin myös proteiinitasolla

qPCR:n avulla selvitettiin solutyypin välisiä eroja geeniekspressiossa RNA-tasolla. Geenien ilmentymistä säädellään kuitenkin myös translaation tasolla, joten RNA-tason erot eivät suoraan kuvasta eroa toiminnallisen proteiinin määrässä. Tutkitun 12 geenin joukosta valittiin kaksi geeniä, VWA2 ja PKP1, joiden ilmentymistä proteiinitasolla tarkasteltiin Western blot -menetelmällä.

VWA2-proteiinilla on kolme isoformia, joiden koot ovat 45, 78 ja 82 kilodaltonia (kDa). VWA2-vasta-aineen valmistajan mukaan vasta-aine tunnistaa yhden proteiinijuovan 85 kDa:n kohdalla. 2D-kasvatuksista eristetyissä proteiineissa nähtiin proteiinijuovat noin 85 ja 95 kDa:n kohdalla, ja sferoideissa vain 85 kDa:n kohdalla (kuva 6A). Lisäksi sekä 2D- että 3D-näytteistä saatiin vahva, noin 55 kDa:n proteiinijuova. Xin työryhmineen (2005) havaitsivat VWA2-proteiinia vastaavan juovan 85 kDa:n kohdalla ja lisäksi 55 kDa:n kokoisen VWA2:sta peräisin olevan peptidin. Näiden tietojen perusteella valittiin analysoitavaksi 85 kDa:n kohdalla oleva proteiinijuova, jonka intensiteetti kunkin näytteen kohdalla määritettiin. VWA2-proteiinin ilmentymistasoja tutkittiin kahden DU145-solutyypin vertailuparin välillä (kuva 6B).

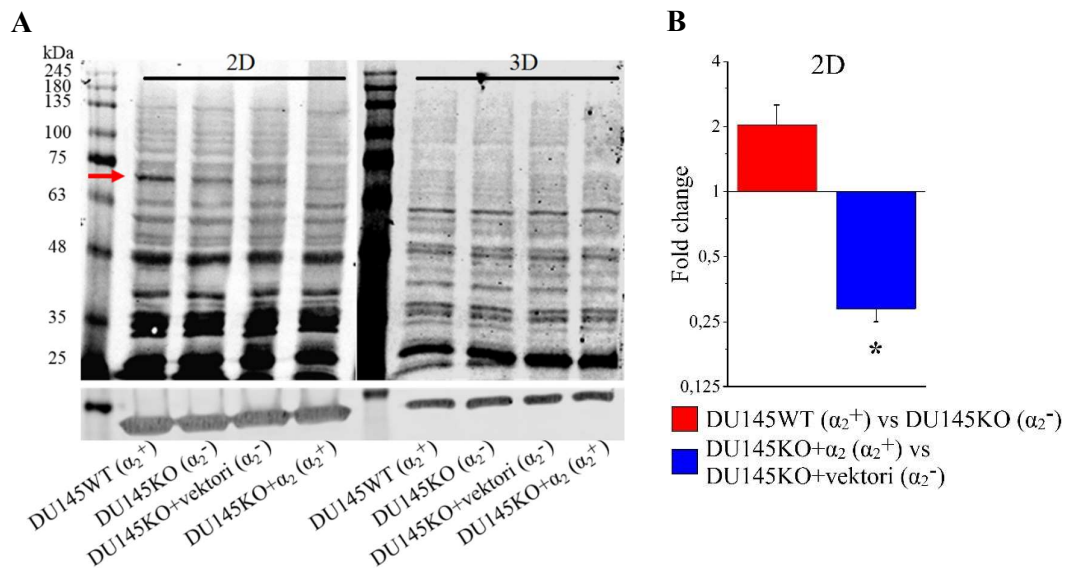


Kuva 6. VWA2-proteiinin ilmentymisessä havaittiin eroja DU145-solutyypin välillä. (A) Western blot -analyysi VWA2-proteiinin määrästä 2D- ja 3D-olosuhteissa 72 tunnin ajan kasvatetuista soluista. VWA2-proteiinijuova havaittiin 85 kDa:n kohdalla (merkitty kuvaan punaisella nuolella). Kokonaisproteiinimäärän tasaisuus kontrolloitiin β -aktiinilla (alla oleva proteiinijuova). (B) Kahden vertailuparin FC-arvot VWA2-proteiinin ilmentymiselle 2D- ja 3D-olosuhteissa. Pylväiden korkeus kuvaa kolmen kokeen keskiarvoa \pm SEM. Tilastollinen merkitsevyys testattiin Studentin kaksisuuntaisella parittaisella t-testillä signaaliarvojen 2-kantaisista logaritmeista. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

2D-olosuhteissa α_2 -integriiniä ilmentävissä solutyypeissä VWA2-proteiinin määrä on alentunut 0,7–0,8-kertaiseksi. 3D-mallissa DU145WT (α_2^+) ja DU145KO (α_2^-) -solujen välillä ei ole eroa VWA2:n ilmentymisessä, sillä ekspressio oli 1,11-kertainen RNA-tasolla ja 0,97-kertainen proteiinitasolla. DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa proteiinitason

ekspressio 3D-mallissa on 0,56-kertainen DU145KO+vektori (α_2^-) -soluihin verrattuna, ja RNA-tasolla vastaava ero oli 0,48-kertainen.

PKP1-proteiinilla on kaksi isoformia, joiden koot ovat 80 ja 83 kDa. Valmistajan mukaan vasta-aine tunnistaa yhden proteiinijuovan 75 kDa:n kohdalla. 2D-näytteissä näkyi mahdollinen PKP1-juova noin 70 kDa:n kohdalla (kuva 7). 3D-näytteissä vastaavaa juovaa ei kuitenkaan näkynyt. Tämä voi johtua siitä, että 3D-näytteissä ladattu proteiinimäärä on alhaisempi, sillä myös taustaa on näissä näytteissä vähemmän. On myös mahdollista, että solut eivät 3D-olosuhteissa tuota PKP1-proteiinia, vaikka RNA-tasolla ekspressiota havaittiinkin. DU145WT (α_2^+) ja DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa PKP1-proteiinin ekspressio oli 2D-olosuhteissa 2,04- ja 0,29-kertainen, vastaavasti, vertailupariinsa nähden. Erot olivat samansuuntaiset kuin 3D-olosuhteissa RNA-tasolla (1,33 ja 0,39; vastaavasti). Proteiinitason tutkimusten mukaan siis sekä VWA2- että PKP1-proteiinin ilmentymistason erot olivat samansuuntaiset kuin RNA-tasolla.

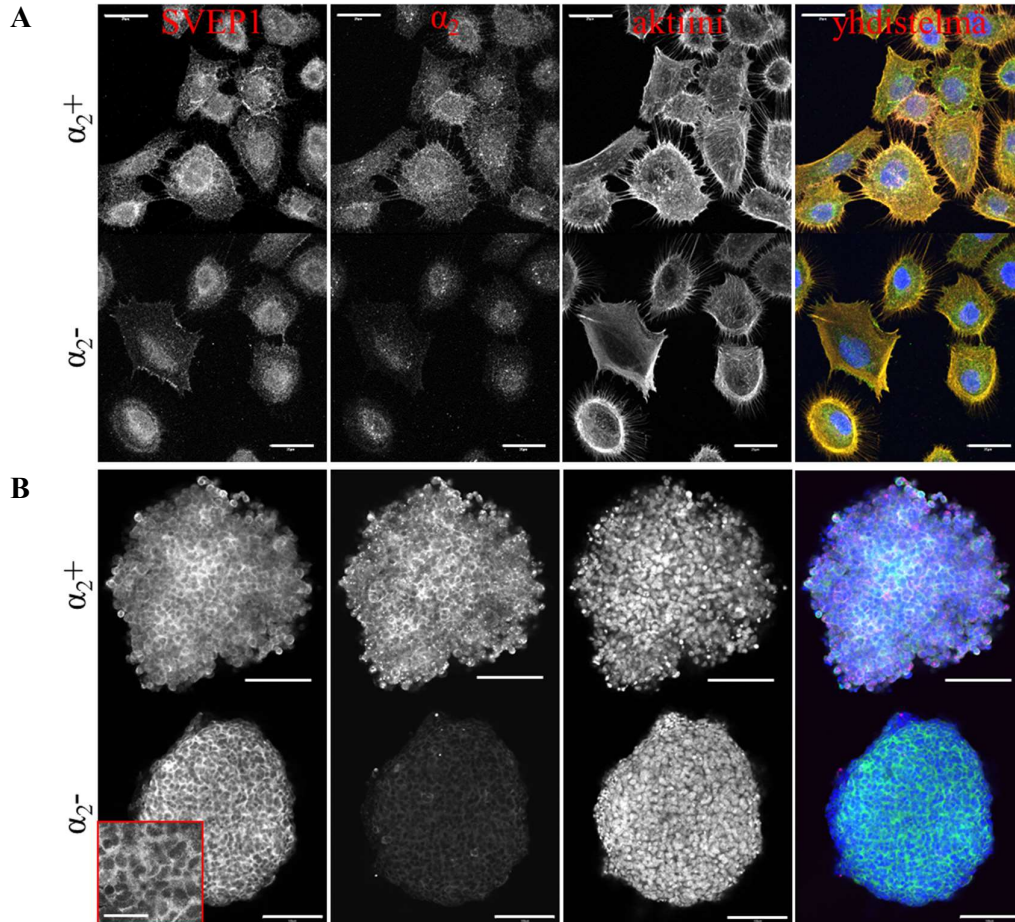


Kuva 7. PKP1-proteiinin ilmentymisessä havaittiin eroja DU145-solutyyppeiden välillä 2D-olosuhteissa. (A) Western blot -analyysi PKP1-proteiinin määrästä 2D- ja 3D-olosuhteissa 72 tunnin ajan kasvatetuista soluista. PKP1-proteiini havaittiin noin 70 kDa:n kohdalla (merkitty kuvaan punaisella nuolella) 2D-näytteistä, mutta ei 3D-näytteistä. Näytteiden latauksen tasaisuus kontrolloitiin β -aktiinilla (alla oleva proteiinijuova). (B) Kahden vertailuparin FC-arvot PKP1-proteiinin ilmentymiselle 2D-olosuhteissa. Pylväiden korkeus kuvaa kolmen kokeen keskiarvoa \pm SEM. Tilastollinen merkitsevyys testattiin Studentin kaksisuuntaisella parittaisella t-testillä signaaliarvojen 2-kantaisista logaritmeista. * $p < 0,05$.

6.2.3 α_2 -integroini ei vaikuta tutkittujen proteiinien lokalisaatioon

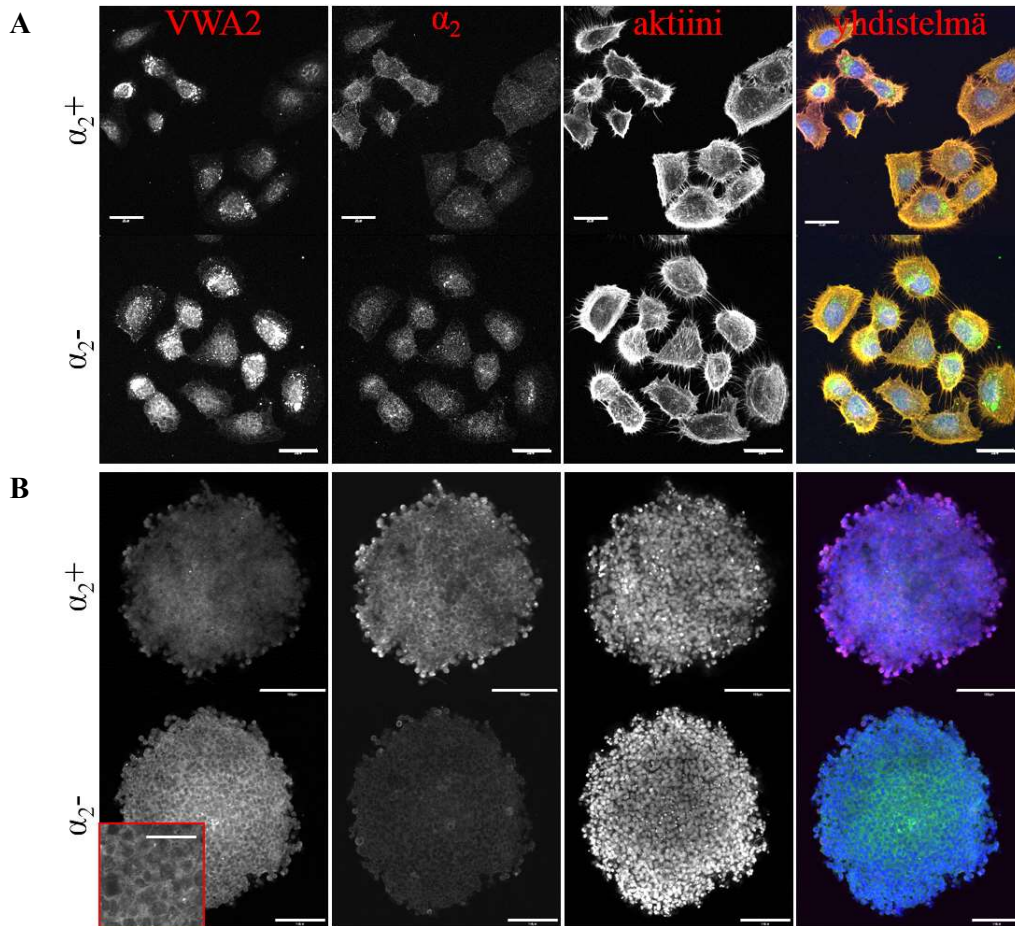
DU145-solutyypin väliltä löydettiin RNA- ja proteiinitasolla eroja geenien ilmentymisessä. Lisäksi haluttiin tutkia, vaikuttaako α_2 -integroini proteiinien lokalisaatioon soluissa. Tätä varten soluja kasvatettiin sferoideina sekä 2D-mallissa fibronektiinin tai kollageeni I:n päällä ja värjättiin soluista SVEP1-, VWA2- ja PKP1-proteiinit.

SVEP1-proteiinia ilmentyy solulimassa, solukalvolla tai sitä eritetään ulos solusta, ja se välittää solujen sitoutumista soluväliaineeseen (Shur ja muut 2006). SVEP1:tä nähtiin DU145-soluissa solulimassa ja solukalvolla (kuva 8A) sekä 3D-mallissa myös solujen välisessä tilassa (kuva 8B). Eroa SVEP1:n lokalisaatiossa ei kuitenkaan havaittu DU145-solutyypin välillä (kuva 8 ja liitekuva 1).



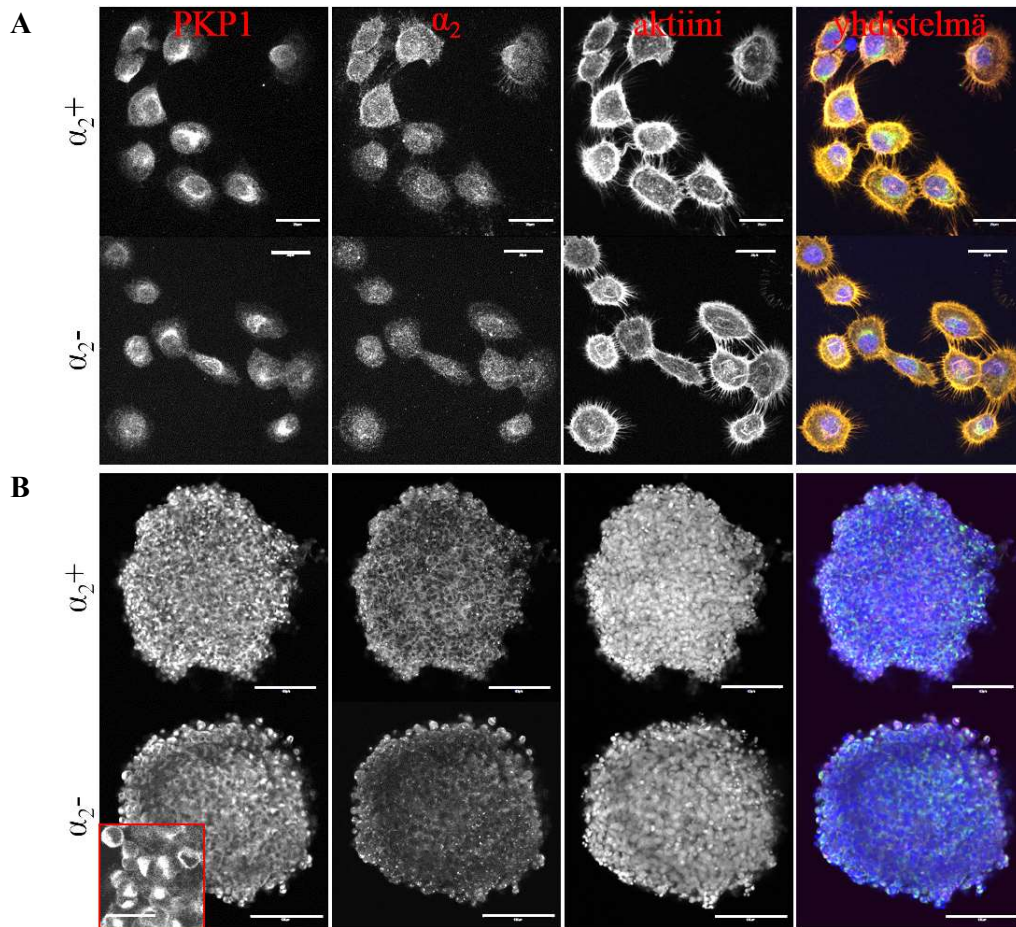
Kuva 8. SVEP1:n lokalisaatiossa ei havaittu eroja DU145-solutyypin välillä. (A) 63-kertaisella suurennoksella otetut konfokaalimikroskooppikuvat fibronektiinillä kasvatetuista DU145KO+ α_2 (α_2^+) ja DU145KO+vektori (α_2^-) -soluista, mittakaava 25 μm , ja (B) vastaavat kuvat 20-kertaisella suurennoksella 3D-mallissa, mittakaava 100 μm . Yhdistelmäkuviissa SVEP1-proteiini on värjätty vihreällä, α_2 -integroini magentalla, DAPI sinisellä ja aktiini oranssilla.

VWA2-proteiini on soluista eritettävä soluväliaineen proteiini, joka muodostaa soluissa vaihtelevan kokoisia aggregaatteja mahdollisesti rikkisilloilla (Sengle ja muut 2003). 2D-mallin kuvissa nähtiin VWA2-aggregaatteja solulimassa (kuva 9A), ja 3D-mallissa VWA2 näyttäisi lokalisoituvan soluväleihin (kuva 9B). Myöskään VWA2:n lokalisaatiossa ei havaittu eroa DU145-solutyypin välillä (kuva 9 ja liitekuva 2).



Kuva 9. VWA2-proteiinin ei lokalisoitu solussa eri tavoin DU145-solutyypin välillä. (A) 63-kertaisella objektiivilla otetut konfokaalimikroskooppikuvat 2D-mallissa DU145KO+ α_2 (α_2^+) ja DU145KO+vektori (α_2^-) -soluista, mittakaava 25 μm , ja (B) vastaavat kuvat sferoideista 20-kertaisella objektiivilla, mittakaava 100 μm . Yhdistelmäkuviissa VWA2-proteiini on vihreällä, α_2 -integriini magentalla, DAPI sinisellä ja aktiini oranssilla.

PKP1-proteiini sijaitsee solu–soluliitosten desmosomeissa (Hatzfeld ja muut 1994) sekä tumassa ja solulimassa (Schmidt ja muut 1997). Sekä 2D- että 3D-malleissa PKP1:tä havaittiin erityisesti tuman ympärillä karkeassa solulimakalvostossa (kuva 10 ja liitekuva 3), jonka ribosomeissa tapahtuu proteiinisynteesiä. Yang ja muut (2013) raportoivat PKP1:n sitoutuvan RNA:ta sitoviin proteiineihin ja osallistuvan proteiinisynteesin sääte-



Kuva 10. DU145-solutyypin välillä ei havaittu eroja PKP1-proteiinin lokalisaatiossa. (A) Konfokaalimikroskooppikuvat 63-kertaisella suurennoksella fibronectiinillä kasvatetuista DU145KO+ α_2 (α_2^+) ja DU145KO+vektori (α_2^-) -soluista, mittakaava 25 μm , ja (B) vastaavat kuvat sferoideista 20-kertaisella suurennoksella, mittakaava 100 μm . Yhdistelmäkuviissa PKP1-proteiini on värjätty vihreällä, α_2 -integroini magentalla, DAPI sinisellä ja aktiini oranssilla.

lyyn. Lisäksi 3D-mallissa PKP1-proteiinia löytyi solukalvoilta (kuva 10B). Eroja proteiinin lokalisaatiossa ei havaittu DU145-solutyypin tai eri kasvatusolosuhteiden välillä.

SVEP1- ja VWA2-värjäysten yhteydessä käytettiin rotassa tuotettua α_2 -integroinin vasta-ainetta, kun taas PKP1-värjäyksissä käytettiin MCA2025-vasta-ainetta. Rotassa tuotettu vasta-aine näyttäisi soveltuvan paremmin mikroskopiaan, sillä MCA2025-vasta-aineella myös α_2 -integroiniä ilmentämättömissä soluissa nähtiin epäspesifistä taustavärjäytymistä. α_2 -integroinin aktivoituminen kollageeni I:llä ei vaikuttanut tutkittujen proteiinien lokalisaatioon (tietoa ei näytetä). Yhdenkään tutkitun proteiinin lokalisaatiossa ei havaittu α_2 -integroinista johtuvia eroja.

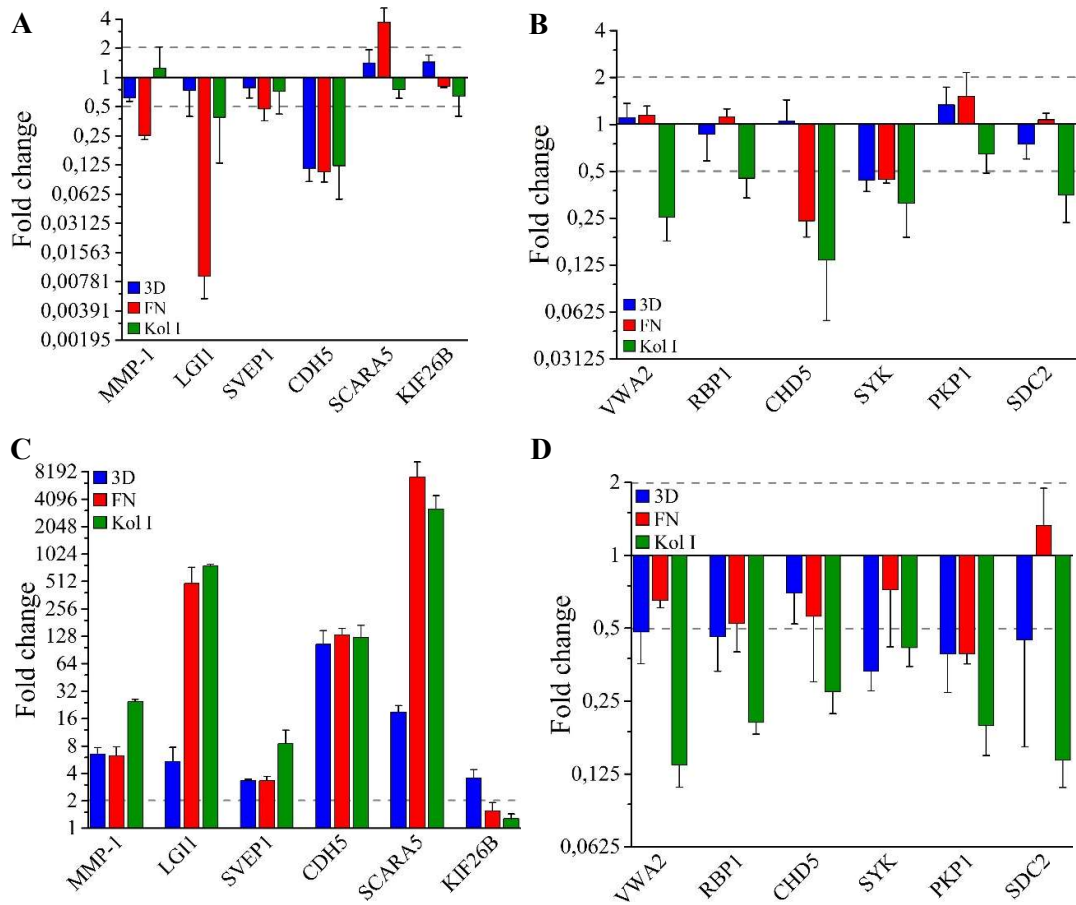
6.2.4 $\alpha_2\beta_1$ -integriinin aktivoituminen ligandivuorovaikutuksessa säätelee useimpien tutkittujen geenien ilmentymistä

Solujen integriinivälitteinen sitoutuminen soluväliaineeseen aiheuttaa solujen kasvua, erilaistumista ja geenien ilmentymistä säätelevien signaalinvälitysketjujen aktivoitumista. Näiden signaalinvälitysketjujen toiminta riippuu siitä, ovatko integriinireseptorit aktiivisessa muodossaan sitoutuneena ligandiinsa. Erikoistyössä haluttiin tutkia, miten $\alpha_2\beta_1$ -integriinin sitoutuminen ligandiinsa, kollageeni I:een, vaikuttaa DU145-solutyypin geeniekspressioon. Tätä varten soluja kasvatettiin sekä fibronektiinillä että kollageeni I:llä päällystetyillä solukasvatusmaljoilla ja verrattiin geenien ilmentymistä DU145-vertailupareissa eri kasvatusolosuhteissa.

Kun verrataan fibronektiinillä ja kollageeni I:llä kasvatettujen solujen FC-arvoja, huomataan niiden käyttäytyvän samoin molemmissa vertailupareissa (Kuva 11). MMP-1:n, LGI1:n ja SVEP1:n FC-arvo kasvaa, kun soluja on kasvatettu fibronektiinin sijaan kollageeni I:llä. CDH5:n ja KIF26B:n kohdalla ero FC-arvoissa on niin pieni, ettei ligandivuorovaikutuksella voida sanoa olevan merkittävää vaikutusta näiden geenien ilmentymiseen. Lopuilla tutkituista geneistä vertailuparin FC-arvo on pienempi kollageeni I:llä kasvatetuissa soluissa verrattuna fibronektiinillä kasvatettuihin soluihin.

Kuvista 11C ja 11D nähdään myös, että transfektoituja DU145-solutyyppejä verrattaessa ligandiin sitoutumisen vaikutus ja geenin FC-arvo 3D-mallissa ovat samansuuntaisia suurimmalla osalla geneistä: Mikäli geeni on ylhäällä 3D-mallissa DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa verrattuna DU145KO+vektori (α_2^-) -soluihin, on geenin FC-arvo suurempi kollageeni I:llä kasvatetuilla soluilla verrattuna fibronektiinillä kasvatettuihin (Kuva 11C). Jos taas geeni on alhaalla 3D-mallissa, on FC-arvo pienempi kollageeni I:llä kuin fibronektiinillä (Kuva 11D). DU145WT (α_2^+) ja DU145KO (α_2^-) -soluja verrattaessa taas ei 3D-mallissa havaittu merkitseviä ilmentymiseroja suurimmalla osalla geneistä, eikä ligandiin sitoutuminen aiheuta samansuuntaista vaikutusta geenien ilmentymiseen.

Tulosten perusteella α_2 -integriini vaikuttaisi käyttäytyvän eri tavalla villityypin soluissa ja transfektoiduissa DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa, vaikka solutyypit ilmentävät suurin piirtein saman verran α_2 -integriiniä (kuva 4). Solupopulaatioiden selektioprosesseista johtuen on vaikea sanoa, johtuvatko erot pelkästään α_2 -integriinistä. Siksi fibronektiinin



Kuva 11. $\alpha_2\beta_1$ -integriinin aktivoituminen ligandivuorovaikutuksessa kollageeni I:n kanssa säätelee useimpien tutkittujen geenien ilmentymistä. Soluja kasvatettiin 72 tunnin ajan fibronektiinin (punainen) tai kollageeni I:n (vihreä) päällä 2D-mallissa tai sferoideina 3D-mallissa (sininen). Geenien ilmentymistasot määritettiin komplementaarista DNA:sta geenit spesifisesti tunnistavilla alukkeilla qPCR:llä. (A) ja (B) DU145WT (α_2^+) ja DU145KO (α_2^-) -solujen väliset FC-arvot. (C) ja (D) DU145KO+ α_2 (α_2^+) ja DU145KO+vektori (α_2^-) -solujen väliset FC-arvot. A- ja C-kuvissa esitetyt geenit ovat ylhäällä DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa verrattuna DU145KO+vektori (α_2^-) -soluihin, kun taas B- ja D-kuvissa esitetyt geenit ovat samassa vertailuparissa alhaalla. Pylväiden korkeus kuvaa kolmen rinnakkaisen kokeen keskiarvoa \pm SEM. FN = fibronektiini, Kol I = kollageeni I.

ja kollageeni I:n välinen vertailu on hyvä, sillä se haastaa solut reagoimaan α_2 -integriinin perusteella. Osa geneista α_2 -integriini säätelee sitoutuessaan ligandiinsa, kun α_2 -integriinin välittämä solun sisäinen signalointi aktivoituu, ja siksi tulokset eivät välttämättä ole loogisia ilman ligandia. Vaikuttaisi siltä, että α_2 -integriinin signalointi on vahvempaa DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa jopa ilman ligandia, kun taas villityypin solut tarvitsevat kollageeni I:n α_2 -integriinin aktivoitumiseen ja samanlaisen vaikutuksen aikaansaamiseksi geeniekspressioon.

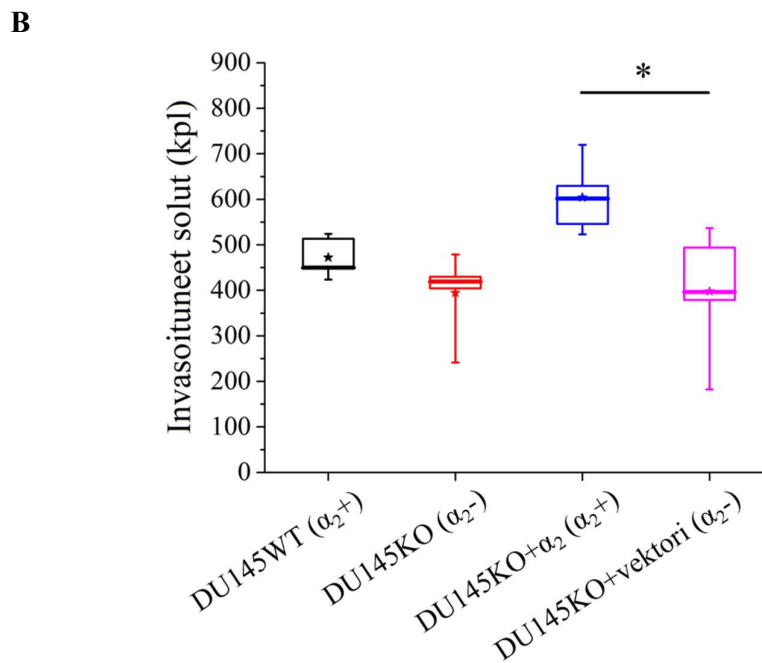
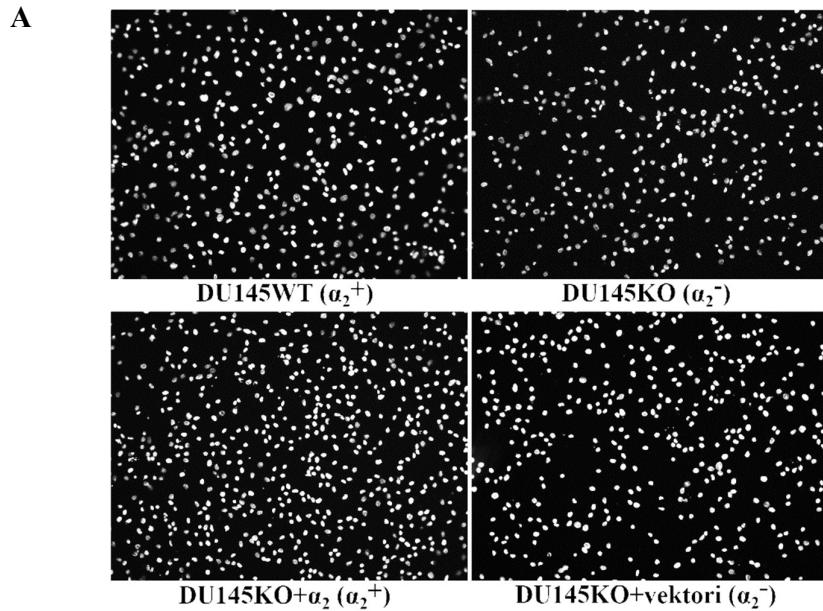
6.3 α_2 -integriini lisää DU145-solujen migraatiota ja invaasiota

Integriinit ovat välttämättömiä solujen liikkumiselle ja invaasiolle, koska ne välittävät solujen sitoutumista soluväliaineeseen ja säätelevät solutukirannan rakennetta, solujen selviytymistä sekä matriksia hajottavien entsyymien tuotantoa. Invaasion kannalta oleellista on, että integriinit tunnistavat matriksin molekyylit ja aktivoivat niiden hajotuksen. Metastaasissa solut invasoituvat ympäröivään kudokseen, joten integriineillä on tärkeä rooli niiden muodostumisessa. Metastaasien muodostuminen on pääasiallinen syöpäkuolemien aiheuttaja. Tehokkaiden hoitokeinojen löytäminen edellyttää metastaasien mekanismien tuntemusta. Erikoistyössä tutkittiin, vaikuttaako α_2 -integriini DU145-eturauhassyöpäsolujen kykyyn liikkua ja invasoitua erilaisiin matrikseihin.

6.3.1 α_2 -integriini lisää solujen invaasiota Matrigeelin läpi

Tyvikalvo on laminiineista, kollageeneista ja proteoglykaaneista koostuva ohut soluväliaineen rakenne, joka tukee epiteeli-, endoteeli- ja mesenkyymisoluja sekä säätelee solujen sitoutumista, erilaistumista ja kasvua. Tyvikalvo muodostaa eri kudoksen osiot toisistaan erottavan esteen, jonka läpi solujen on päästävä invasoituakseen ympäröivään kudokseen. Integriinit säätelevät tyvikalvoa hajottavien entsyymien aktiivisuutta.

Erikoistyössä tutkittiin, miten α_2 -integriini vaikuttaa DU145-solujen invaasioon Matrigeelin läpi. Matrigeeli on hyytelömäinen proteiiniseos, jonka koostumus muistuttaa tyvikalvoa. Tutkimuksessa käytettiin invaasiokammioita, joissa huokoinen kalvo oli päällystetty Matrigeelillä. Kammion alapuolelle lisättiin seerumillista kasvatusmediumia, joka houkutteli soluja invasoitumaan Matrigeeli-kerroksen läpi. Solujen annettiin invasoitua 24 tunnin ajan, minkä jälkeen Matrigeelin läpäisseiden solujen tumat värjättiin ja laskettiin. Kuvasta 12 nähdään, että α_2 -integriini lisää DU145-solujen invaasiota Matrigeelin läpi molemmissa solutyypin vertailupareissa. Villityypin solut invasoivat 20 % enemmän kuin DU145KO (α_2^-) -solut (ei tilastollisesti merkitsevä). DU145KO (α_2^-) -soluilla rinnakkaisissa kokeissa oli poikkeavia arvoja, jotka vaikuttavat tilastolliseen merkittävyyteen. DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solut invasoivat vertailupariaan 52 % enemmän (p-arvo 0,014). α_2 -integriini lisää DU145-solujen invaasiota Matrigeelin läpi ja siten saattaa myös edesauttaa metastaattisten eturauhassyöpäsolujen invasoitumista kasvaimen ympäristöön.

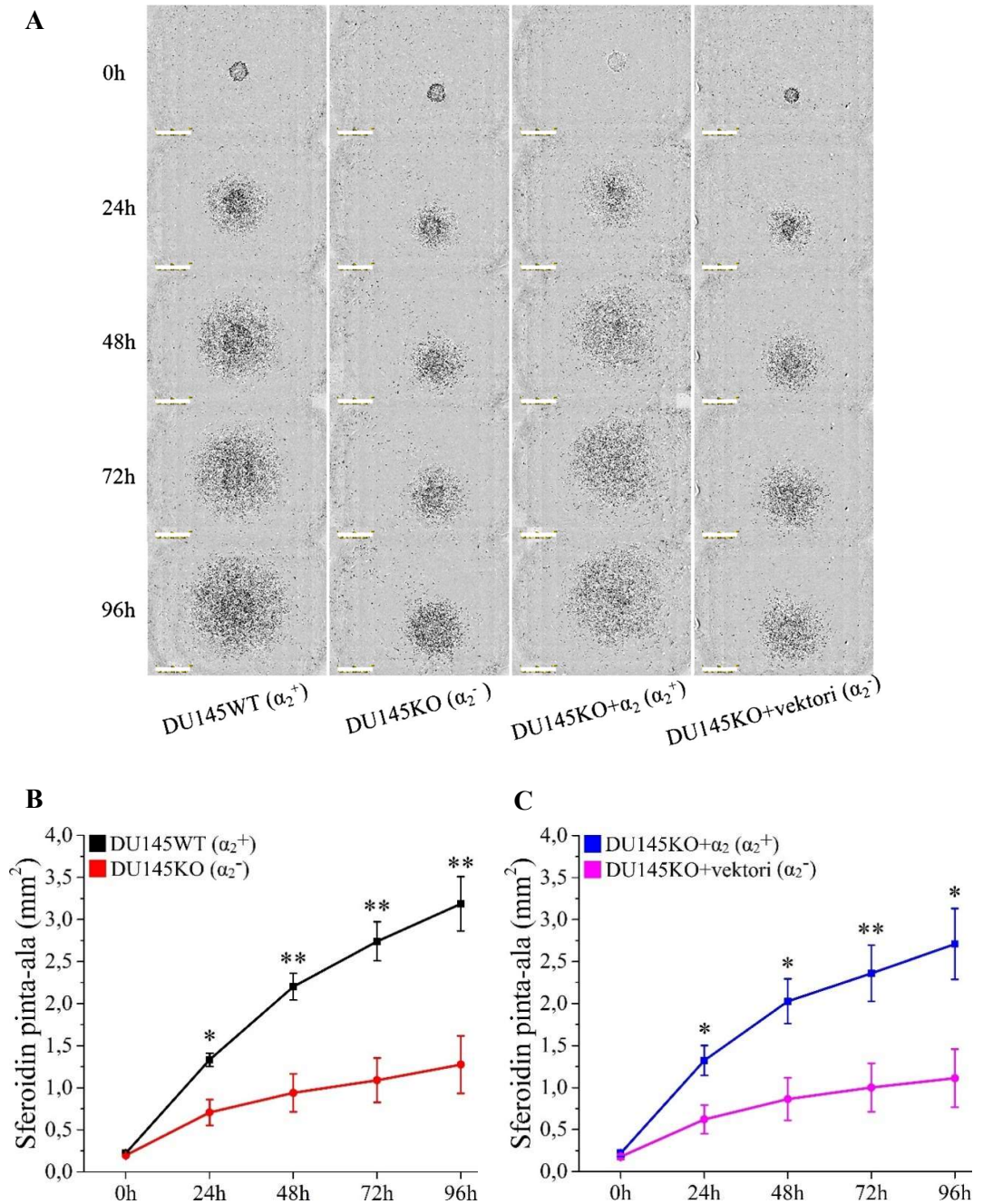


Kuva 12. α_2 -integroini lisää DU145-eturauhassyöpösolujen invaasiota Matrigeelin läpi. Solujen invaasiota tutkittiin tyvikalvon rakennetta muistuttavalla Matrigeelillä päällystetyillä invaasiokammioilla. Kammioon lisättiin 100 000 solua, joiden annettiin invasoitua 24 tunnin ajan ennen kuin läpi menneet solut kiinnitettiin ja niiden tumat värjättiin ja laskettiin. (A) 10-kertaisella objektiivilla otetut esimerkkikuvat tyypillisen kokeen läpi menneistä soluista jokaisesta solutyypistä. (B) Viiden rinnakkaisen kokeen keskiarvoista piirretyt box plot -kuvaajat. Janojen päät vastaavat datan pienintä ja suurinta arvoa, laatikon sisällä oleva viiva toistojen mediaania sekä tähti toistojen keskiarvoa. Tilastollinen merkitsevyys testattiin one way ANOVA - ja Tukeyn HSD post hoc -testeillä. * $p < 0,05$.

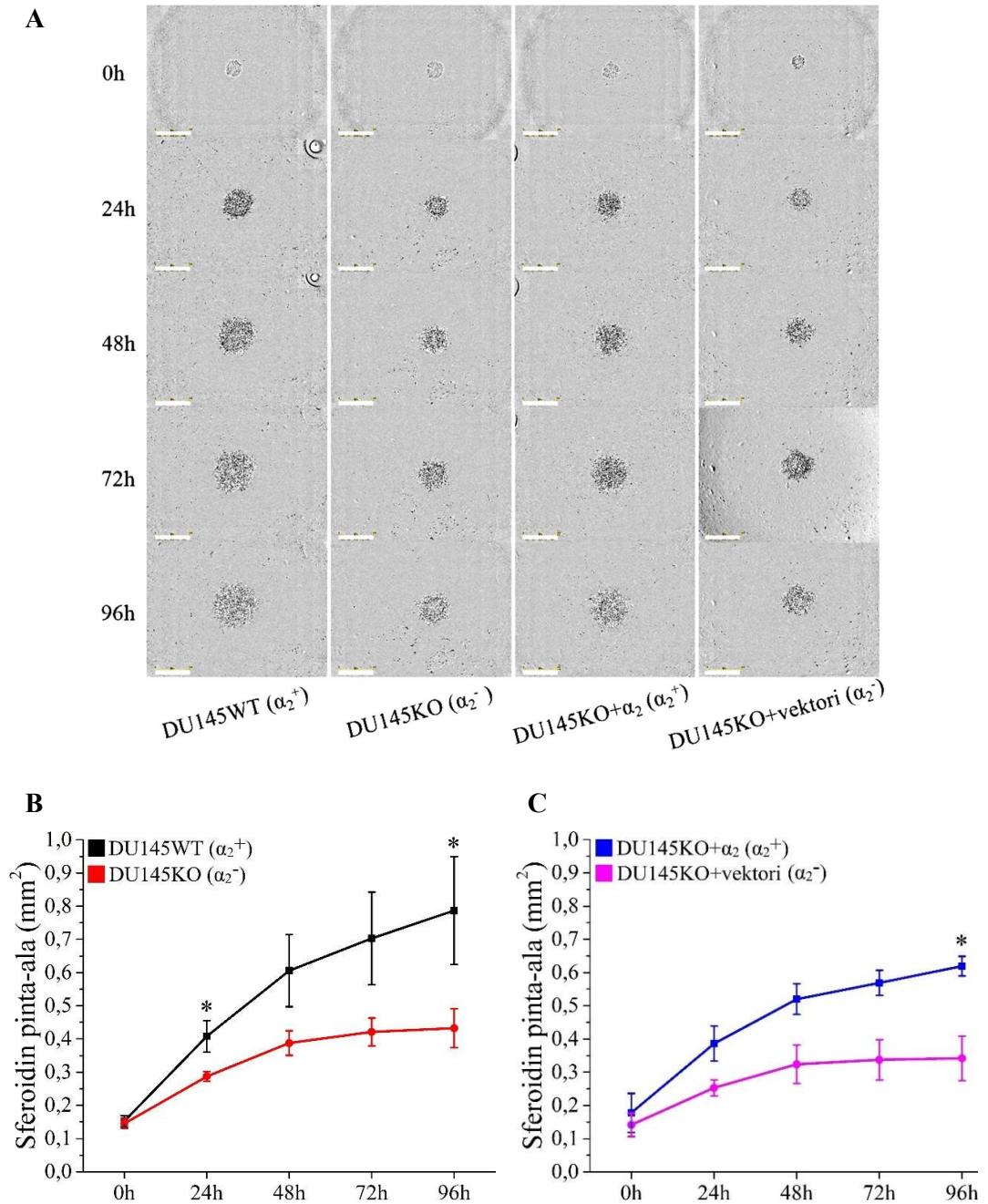
6.3.2 α_2 -integriini lisää DU145-solujen liikettä ja invaasiota kollageeni I:een

Eturauhassyöpä muodostaa etäpesäkkeitä tyypillisesti luustoon. Luustoympäristö koostuu enimmäkseen kollageenisäikeistä, pääasiassa kollageeni I:stä, ja epäorgaanista suoloista. α_2 -integriinin on jo aiemmin havaittu välittävän ja lisäävän syöpäsolujen sitoutumista kollageeni I:een ja luun soluväliaineeseen sekä lisäävän liikettä ja invaasiota kollageeni I:een (Kostenuik ja muut 1996; Vihinen ja muut 1996; Lang ja muut 1997; Hall ja muut 2006; Sottnik ja muut 2013). Erikoistyössä tutkittiin α_2 -integriinin vaikutusta DU145-eturauhassyöpäsolujen liikkeeseen ja invaasioon kollageeni I:een. Soluja kasvatettiin ensin 72 tunnin ajan 3D-mallissa, jonka jälkeen sferoidit siirrettiin kollageeni I:n päälle. Invaasiota mitattaessa sferoidin päälle lisättiin lisäksi kolmiulotteinen kollageeni I -geeli. Sferoidissa olevien solujen annettiin liikkua tai invasoitua 96 tunnin ajan, ja sferoidin pinta-alan kasvua seurattiin 24 tunnin välein faasikontrastimikroskoopilla.

Kuvista 13 ja 14 nähdään, että α_2 -integriini lisää DU145-solujen liikkumista ja invaasiota kollageeni I:een molemmissa solutyypin vertailupareissa. Villityypin soluista kasvatettujen sferoidien pinta-ala oli 96 tunnin migraation jälkeen keskimäärin 2,5-kertainen verrattuna DU145KO (α_2^-)-soluihin. DU145KO+ α_2 (α_2^+)-sferoidien pinta-ala oli migraatioissa 2,4-kertainen vektorikontrollisoluihin verrattuna. Molemmat α_2 -integriiniä ilmentävät solut invasoivat 1,8 kertaa enemmän vertailupariinsa nähden. Yhteenvedon voidaan todeta, että α_2 -integriini säätelee DU145-solujen liikkumista ja invaasiota kollageeni I:een, ja voi siten olla merkittävä tekijä myös luumetastaasien muodostumisen säätelyssä.



Kuva 13. α_2 -integroini lisää DU145-solujen liikkumista kollageeni I:een. Soluja kasvatettiin 72 tunnin ajan 3D-mallissa, minkä jälkeen sferoidit siirrettiin kollageeni I:n päälle. Sferoidien pinta-alan kasvua seurattiin 24 tunnin välein yhteensä 96 tunnin ajan faasikontrastimikroskoopilla solujen liikkussa kollageeni I:een. Pinta-alat määritettiin ImageJ-ohjelmalla. (A) Esimerkkikuvat sferoideista joka aikapisteestä kaikilla solutyypeillä, mittakaava 800 μm . Neljän rinnakkaisen kokeen keskiarvoista \pm SEM piirretyt sferoidien pinta-alojen kasvukäyrät (B) DU145WT (α_2^+) (musta) ja DU145KO (α_2^-) (punainen) -soluille ja (C) DU145KO+ α_2 (α_2^+) (sininen) ja DU145KO+vektori (α_2^-) (magenta) -soluille. Tulosten tilastollinen merkitsevyys testattiin kaksisuuntaisella parittaisella Studentin t-testillä. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Kuva 14. α_2 -integroini lisää DU145-solujen invaasiota kollageeni I -geeliin. Soluja kasvatettiin 72 tunnin ajan 3D-mallissa, minkä jälkeen sferoidit siirrettiin kollageeni I:n päällystetylle kuoppalevyille. Sferoidien päälle lisättiin kollageeni I-geeli ja sferoidien pinta-alan kasvua seurattiin 24 tunnin välein yhteensä 96 tunnin ajan faasikontrastimikroskoopilla solujen invasoituessa kollageeni I:een. Pinta-alat määritettiin ImageJ-ohjelmalla. (A) Esimerkkikuvat sferoideista joka aikapisteestä kaikilla solu-tyypeillä, mittakaava 800 μm . Neljän rinnakkaisen kokeen keskiarvoista \pm SEM piirretyt sferoidien pinta-alojen kasvukäyrät (B) DU145WT (α_2^+) (musta) ja DU145KO (α_2^-) (punainen) -soluille sekä (C) DU145KO+ α_2 (α_2^+) (sininen) ja DU145KO+vektori (α_2^-) (magenta) -soluille. Tulosten tilastollinen merkitsevyys testattiin kaksisuuntaisella parittaisella Studentin t-testillä. * = $p < 0,05$.

7 POHDINTA

Erikoistyössä tutkittiin α_2 -integriinin vaikutusta DU145-eturauhassyöpäsolujen geenien ilmentymiseen sekä solujen migraatioon ja invaasioon neljällä α_2 -integriiniä erilaisesti ilmentävällä DU145-solutyypillä. α_2 -integriinin havaittiin säätelevän tiettyjen geenien ilmentymistä sekä RNA- että proteiinitasolla, mutta se ei vaikuttanut säätelemiensä proteiinien lokalisaatioon. Lisäksi havaittiin, että $\alpha_2\beta_1$ -kollageeni I -vuorovaikutus lisäsi solutyypien välisiä RNA-tason ilmentymiseroja suurimmalla osalla tutkituista 12 geenistä, minkä perusteella α_2 -integriinin aktivoituminen ja signaalointi ligandi-vuorovaikutuksessa säätelee näiden geenien ilmentymistä. α_2 -integriiniä ilmentävät DU145-solutyypit invasoivat enemmän Matrigeelin läpi sekä liikkuivat ja invasoituivat kollageeni I:een paremmin kuin α_2 -integriiniä ilmentämättömät vertailuparinsa. Erikoistyön tulosten perusteella α_2 -integriini säätelee eturauhassyöpäsolujen geeniekspressiota sekä lisää solujen invaasiota ja on siten mahdollisesti tärkeä tekijä eturauhassyövän ja sen luumetastaasin kehittämisessä.

Jotta varmistuttaisiin erikoistyössä saatujen tulosten johtuvan α_2 -integriinistä, voitaisiin tehdä kontrollikokeet, joissa α_2 -integriinin ilmentyminen on hiljennetty esimerkiksi siRNA:lla tai α_2 -integriini on lukittu inaktiiviseen konformaatioon, jolloin se ei voi sitoutua ligandiinsa kollageeni I:een. α_2 -integriinin aktivoituminen voitaisiin estää joko vasta-aineella tai käärmeenmyrkystä eristetyllä rhodosetiinillä (Eble ja Tuckwell 2003). Integriinien toimintaa on estetty syöpätutkimuksessa aiemminkin käärmeenmyrkyn disintegriineillä, joilla on paljon kliinisiä sovellusmahdollisuuksia (Macêdo ja muut 2015).

Kun vertailtiin geeniekspressioeroja sferoideina kasvatettujen DU145-solujen välillä, huomattiin kahden solutyypeistä tehdyn vertailuparin käyttäytyvän eri tavalla (kuva 5). Osittain solutyypien väliset erot voivat johtua siitä, että villityypin solut ovat sekapopulaatio, jonka sisällä yksittäisten solujen geeniekspression taso tai invasiivisuus vaihtelee. Saadut tulokset kuvaavat populaation keskiarvoa. Transfektoitujen solujen antibioottiselektio voi osittain selittää eroja vertailuparien välillä. On myös mahdollista, että transfektoitu α_2 -integriini käyttäytyy soluissa eri tavalla kuin villityypin solujen luontaisesti ilmentämä α_2 -integriini. Vaikka DU145WT (α_2^+) ja DU145KO+ α_2 (α_2^+) -solut ilmentävät lähes saman verran α_2 -integriiniä solupinnoillaan (kuva 2), voi olla että

transfektioprosessin alussa DU145KO+ α_2 (α_2^+)-solujen α_2 -integriinin ilmentymistaso on ollut korkeampi, mikä on vaikuttanut α_2 -integriinistä riippuvaisten geenien ilmentymiseen. Lisäksi virtaussytometrialla tutkittiin vain solujen pinnan α_2 -integriinin ilmentymistä, joten solutyypin solujen sisäisen α_2 -integriinin määrässä voi olla eroja. Tämän varmistamiseksi voitaisiin tarkistaa α_2 -integriinin kokonaismäärä Western blot -menetelmällä. Kun solut vuorovaikuttavat kollageeni I:n kanssa, käyttäytyvät α_2 -integriinin säätelemät geenit kuitenkin samalla tavalla molemmissa vertailupareissa (kuva 11). DU145WT (α_2^+) - ja DU145KO+ α_2 (α_2^+)-solujen α_2 -integriinin aktivoitumistasossa näyttäisi olevan eroja ilman ligandia. α_2 -integriini vaikuttaisi olevan transfektoiduissa soluissa osittain aktiivisena myös ilman ligandia, toisin kuin villityypin soluissa, mikä vaikuttaa α_2 -integriinistä riippuvaisten geenien ekspressioon.

Invaasion ja migraation lisäksi solujen proliferaatio saattaa vaikuttaa sferoidin pinta-alan kasvuun. Jotta voitaisiin varmistua pinta-alan kasvun ja solutyypin välisten erojen johtuvan yksinomaan eroista migraatiossa tai invaasiossa, voitaisiin solujen jakautuminen estää kokeen aikana. α_2 -integriiniä ilmentävät solut saattavat lähteä liikkeelle sferoidista, koska niillä on lisääntynyt kyky liikkua kollageeni I:een tai koska ne ovat sitoutuneet heikommin viereisiin soluihin ja pääsevät siksi helpommin lähtemään liikkeelle sferoidista. Sferoidien rakennetta tulisi tutkia tarkemmin ja selvittää, onko solutyypin välillä eroja solu-solusidoksissa tai solujen sferoidissa tuottamassa matriksissa ja siihen sitoutumisessa. Migraatiota ja invaasiota voitaisiin tutkia myös erilaisilla mediuumeilla, jotta nähtäisiin, kuinka eri kasvutekijät vaikuttavat solujen liikkeeseen.

Tutkimusryhmässä on aiemmin havaittu, että suurempi osa stressitekijöiden aktivoimasta MAP-kinaasi p38:sta on DU145KO+ α_2 (α_2^+)-soluissa muihin solutyyppeihin verrattuna aktiivisessa fosforyloidussa muodossa (Ojalil ja muut, julkaisematonta tietoa), ja tämän signalointireitin vaikutusta DU145-solutyypin geeniekspressioon sekä migraatioon ja invaasioon voitaisiin tutkia estämällä p38:n signalointi. $\alpha_2\beta_1$ -integriinin on aiemmin osoitettu pystyvän aktivoimaan p38 (Ivaska ja muut 1999). Alustavien tulosten mukaan sekä α_2 -integriinin inhibiointi rhodoseitiinillä että p38-signaloinnin estäminen SB203580-p38-MAPK-inhibiittorilla vähentää DU145KO+ α_2 (α_2^+)-solujen migraation ja invaasion kollageeni I:een samalle tasolle DU145KO+vektori (α_2^-)-solujen kanssa (tietoa ei näytetä). Villityypin soluilla nähtiin vastaavanlainen, mutta ei yhtä voimakas, migraation

ja invaasion vähentyminen. Heterogeenisen villityypin solupopulaation sisällä on ehkä enemmän solujen keskinäistä viestintää, ja solut kykenevät paremmin sopeutumaan erilaisiin olosuhteisiin. Näiden alustavien tulosten perusteella DU145-solut tarvitsevat sekä α_2 -integriiniä että p38-MAPK-signaalointia invasoituakseen kollageeni I:een.

Erikoistyössä tutkitut geenit valittiin tietyssä olosuhteessa ja aikapisteessä NGS:llä havaittujen RNA-tason ekspressiotasojen erojen perusteella. Todellisuudessa syöpäsolujen elinympäristö on paljon monimutkaisempi, ja solut vastaanottavat erilaisia niiden geeniekspressiota ja toimintaa muokkaavia signaaleja ympäristöstään. Tutkimuksessa käytetty kolmiulotteinen sferoidimalli antaa kuitenkin paremman kuvan solujen toiminnasta todellisuudessa kuin perinteisesti käytetyt maljakasvatukset. Sferoideissa solut ovat joka puolelta vuorovaikutuksessa toisten solujen kanssa sen sijaan, että suurin osa solujen kontakteista kohdistuisi kasvatusmaljaan. Kiinteät kasvaimet kasvavat kolmiulotteisessa ympäristössä, jossa syöpäsoluihin kohdistuu hapen ja ravinteiden gradientteja sekä vaihtelevat määrät fysikaalisia ja kemiallisia stressitekijöitä. Hapen, ravinteiden, aineenvaihduntatuotteiden ja signalointimolekyylien erilainen jakautuminen ei toteudu kaksikulotteisissa solukasvatuksissa (Pampaloni ja muut 2007). 3D-rakenteiden kemiallisten gradienttien lisäksi kolmiulotteisesti kasvavien solujen solu-solukontaktit vaikuttavat solujen rakenteeseen, sitoutumiseen ja signalointiin muuttaen solujen toimintaa merkittävästi erilaiseksi verrattuna perinteisiin 2D-kasvatuksiin (Baker ja Chen 2012). Solujen tutkiminen kolmiulotteisessa mallissa voi tuoda uutta tietoa, jota perinteisellä 2D-mallilla ei ole mahdollista saavuttaa. Kasvatusolosuhteet vaikuttavat suuresti matriksin komponenttien ja niiden reseptorien tuottoon soluissa (Mueller-Klieser 1997), joten sferoidimallista voi olla hyötyä erityisesti integriinien toiminnan tutkimisessa. Monivaiheinen metastaasi onnistuu vain, jos 3D-ympäristö on suotuisa syöpäsolujen invaasiolle sekä metastaattiselle leviämislle ja kasvulle. Kasvaimen mikroympäristön tekijät, kuten soluväliaine ja hypoksia, edistävät kasvaimen kehitystä lisäämällä soluväliaineen tuotantoa ja muokkausta (Erler ja Weaver 2009). Sitoutuminen matriksiin sekä matriksin ja sen reseptorien tuotantoprofiili kolmiulotteisessa ympäristössä kuvastaa paremmin kasvaimen olosuhteita *in vivo*, ja kolmiulotteinen kasvatusmalli voi indusoida metastaasiin yhdistettyjen proteiinien tuotantoa.

Syövässä solujen ja soluväliaineen välinen vuorovaikutus muuttuu, mikä mahdollistaa syövän invaasion (Ruoslahti 1992). Syöpäsolujen täytyy tunnistaa matriksin komponentit

voidakseen tunkeutua muihin kudoksiin, ja usein integriinien määrä tai niiden toiminnan säätely on muuntunut syövässä invaasion mahdollistamiseksi. $\alpha_2\beta_1$ -integroini säätelee eturauhassyöpäsolujen sitoutumista ja liikettä tyypin I kollageeniin sekä luun soluväliaineeseen (Kostenuik ja muut 1996; Lang ja muut 1997; Hall ja muut 2006; Sottnik ja muut 2013). Myös erikoistyössä havaittiin α_2 -integroinin lisäävän solujen migraatiota ja invaasiota kollageeni I:een (kuvat 13 ja 14). Sekvenssoinnin perusteella DU145-solutyypin välillä ei ainakaan RNA-tasolla ole eroja muiden kollageeni-reseptorien kuin α_2 -integroinin ekspressiossa, joten solutyypin erilaisen kollageeni I -vuorovaikutuksen voidaan sanoa johtuvan eroista α_2 -integroinin ekspressiossa.

Erikoistyössä käytettiin vain yhtä eturauhassyöpäsolulinjaa. Jatkossa olisi tärkeää varmistaa α_2 -integroinin rooli eturauhassyövässä *in vivo*. α_2 -integroiniä erilaisesti ilmentävien DU145-eturauhassyöpäsolujen kykyä muodostaa kasvaimia hiirikokeissa voitaisiin selvittää. Hall työryhmineen (2006) havaitsi $\alpha_2\beta_1$ -integroinin määrän kasvavan LNCaP-eturauhassyöpäsoluissa, kun soluja kasvatettiin kollageeni I:llä. Kun näitä kollageeni I:een invasiivisia soluja injektoidiin hiirien luuhun, ne muodostivat enemmän kasvustoja kuin tavalliset LNCaP-solut (Hall ja muut 2006). Sottnik ja muut (2013) taas selvittivät $\alpha_2\beta_1$ -integroinin ilmentymistä ihmisen eturauhassyövässä ja havaitsivat sen olevan koholla luumetastaaseissa verrattuna pehmytkudoksen metastaaseihin tai primäärikasvaimeen. Näiden tulosten perusteella $\alpha_2\beta_1$ -integroini saattaa ohjata etäpesäkkeiden muodostumista luuhun sekä hiiren ksenografteissa että ihmisen eturauhassyövässä. Luuympäristön proteiineista jopa yli 90 % on kollageeni I:tä (Buckwalter ja muut 1996). Kollageeni I:n laaja esiintyminen luustossa saattaa viitata siihen, että sillä on tärkeä rooli luumetastaasien muodostumisessa. Erikoistyön tulokset vahvistavat $\alpha_2\beta_1$ -integroinin ja kollageeni I:n välisen vuorovaikutuksen roolia eturauhassyöpäsolujen invaasiossa.

Kollageeni I:een sitoutumisen lisäksi saattaa solutyypin välillä olla eroa kollageenaasien tuotossa. Kollageenaasin hajottamaan denaturoituneeseen kollageeniin solut voivat sitoutua myös ilman α_2 -integroiniä (Davis 1992; Montgomery ja muut 1994). $\alpha_2\beta_1$ -integroinin on havaittu lisäävän MMP-1:n ilmentymistä syöpäsoluissa (Riikonen ja muut 1995a), ja MMP-1:n on esitetty hajottavan ja mahdollisesti denaturoivan tyypin I kollageenia. Myös erikoistyössä havaittiin MMP-1:n olevan koholla α_2 -integroiniä ilmentävissä DU145KO+ α_2 (α_2^+) -soluissa vertailupariinsa nähden, sekä MMP-1:n

tuoton lisääntyvän solujen ollessa vuorovaikutuksessa kollageeni I:n kanssa (kuva 11). Luuhun metastaattisissa rintasyöpäsoluissa MMP-1:n määrä oli kohonnut (Kang ja muut 2003). MMP-1:n ilmentäminen ihmisen melanoomasoluissa lisäsi solujen kasvua ja invasiivisuutta kollageeni I -geelissä, ja lisäksi solujen MMP-1 pystyi muuttamaan latentin TGF- β :n aktiiviseen muotoon (Iida ja McCarthy 2007). TGF- β on luun mikroympäristössä runsaasti esiintyvä kasvutekijä, jolla on osoitettu olevan rooli luumetastaaseissa (Chirgwin ja Guise 2007; Massagué 2008). TGF- β voi lisätä $\alpha_2\beta_1$ -integriinin tuottoa, solujen adheesiota kollageeni I:een sekä kollageenigeelin supistumista $\alpha_2\beta_1$ -integriinin välityksellä (Riikonen ja muut 1995b; Kostenuik ja muut 1997). TGF- β :aa voitaisiin lisätä solukasvatusmediumiin ja testata, miten se vaikuttaa DU145-solutyypin geenien ilmentymiseen ja kollageeni I -vuorovaikutukseen.

Ihmisillä, joilla on luussa etäpesäkkeitä, ilmentyy kollageeni I:n hajoamistuotteita veressä ja virtsassa (Berruti ja muut 2000). Koska sekä kollageeni I että trimeerinen karboksyyliproteptidi ovat mahdollisia kemotaktisia tekijöitä syöpä- ja endoteelisoluille (Mundy ja muut 1981; Palmieri ja muut 2000), voi $\alpha_2\beta_1$ -integriinin blokkaminen estää eturauhassyövän luumetastaasien muodostumista. $\alpha_2\beta_1$ -integriinin korkeaa ekspressiota on pidetty sekä normaalin eturauhaskudoksen että eturauhassyövän kantasolun merkinä (Collins ja muut 2001; Collins ja muut 2005). Erikoistyössä osoitettiin α_2 -integriinin säätelevän geeniekspressiota, joten se voi mahdollisesti osallistua myös eturauhassyövän kantasolujen geeniekspression säätelyyn ja auttaa soluja pysymään erilaistumattomina. $\alpha_2\beta_1$ -integriini saattaa olla markkeri eturauhassyöpäsoluista, joilla on sekä kyky aloittaa uusia kasvaimia että invasoitua ja kolonisoitua luuhun, ja siten muodostaa luumetastaaseja.

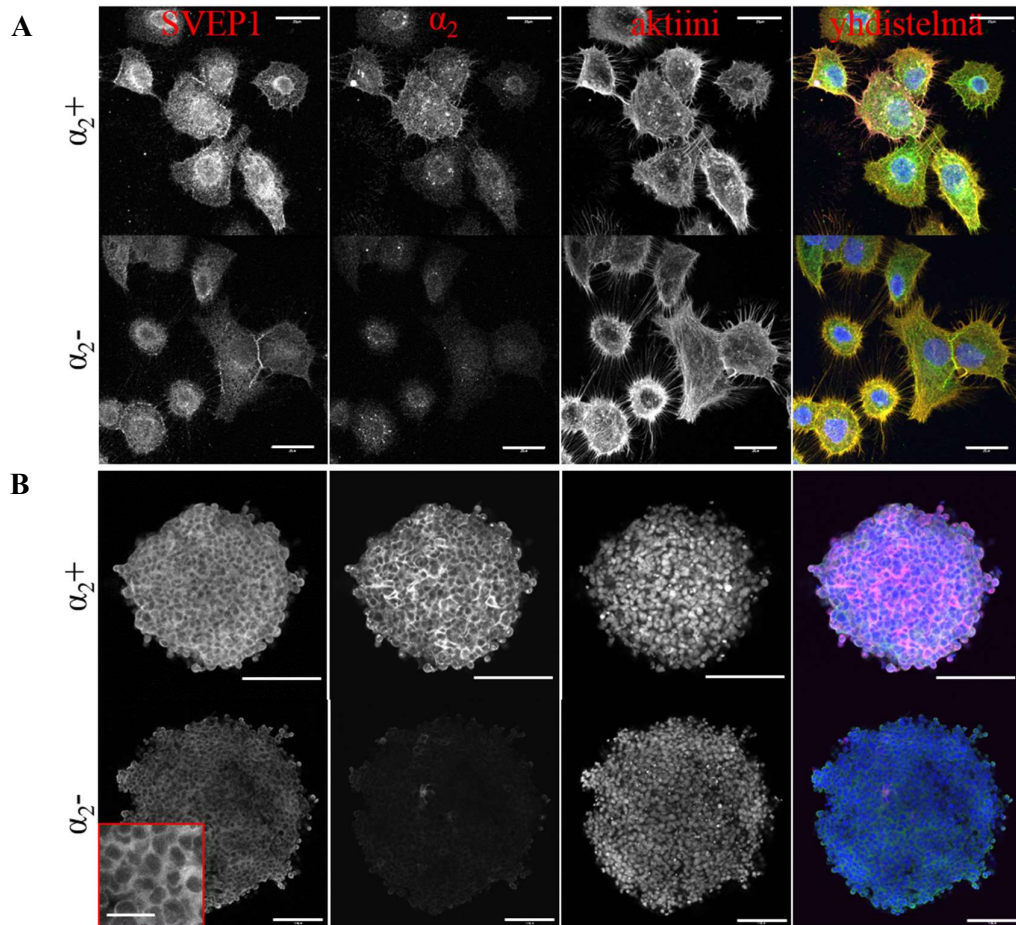
Myös syövän strooman solut vaikuttavat syöpäsolujen käyttäytymiseen. DU145-solutyyppejä voitaisiin kasvattaa yhdessä esimerkiksi erilaisten fibroblastien, makrofaagien tai endoteelisolujen kanssa ja tutkia, miten α_2 -integriini vaikuttaa solujen väliseen viestintään. Erilaisia soluja voitaisiin kasvattaa yhdessä 3D-mallissa ja tutkia sferoidien invaasiokykyä sekä niiden muodostaman matriksin rakennetta.

Suurimmassa osassa erikoistyön kokeista tehtiin 3 rinnakkaista toistoa. Biologisissa näytteissä on kuitenkin aina vaihtelevuutta ja toistomäärien kasvattaminen voisi olla tarpeen hajonnan pienentämiseksi. Lisäksi toistojen määrää kasvattamalla

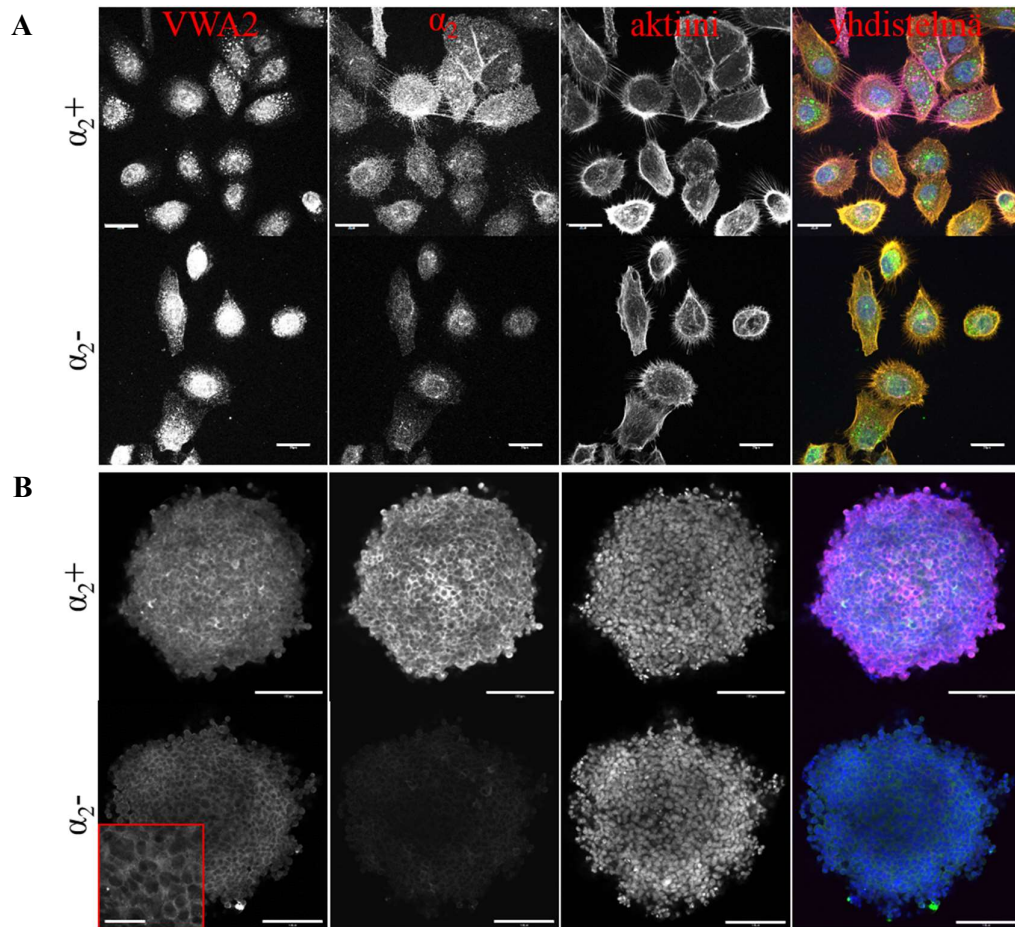
mahdollistettaisiin tehokkaampien tilastollisten menetelmien käyttäminen tulosten analysointiin. Kuitenkin jo käytetyillä toistomäärillä ja tilastollisilla menetelmillä saatiin osoitettua erikoistyössä saatujen tulosten tilastollinen merkitsevyys.

Yhteenvedona α_2 -integriinin havaittiin vaikuttavan DU145-eturauhassyöpäsolujen käyttäytymiseen ja säätelevän sekä solujen geeniekspressiota että invaasiota. Siten α_2 -integriini saattaa säädellä ihmisen eturauhassyövän invaasiota ja metastaasien muodostumista. Erikoistyön tulokset vahvistavat aiempien tutkimusten havaintoja α_2 -integriinin tärkeästä roolista eturauhassyövässä. Tulevaisuudessa eturauhassyövän hoito voitaisiin kohdistaa α_2 -integriiniä ilmentäviin soluihin, jolloin saataisiin tuhottua uusia kasvaimia aiheuttavat syöpäsolut ja mahdollisesti estettyä syövän uusiutuminen ja metastaasien muodostuminen luumun.

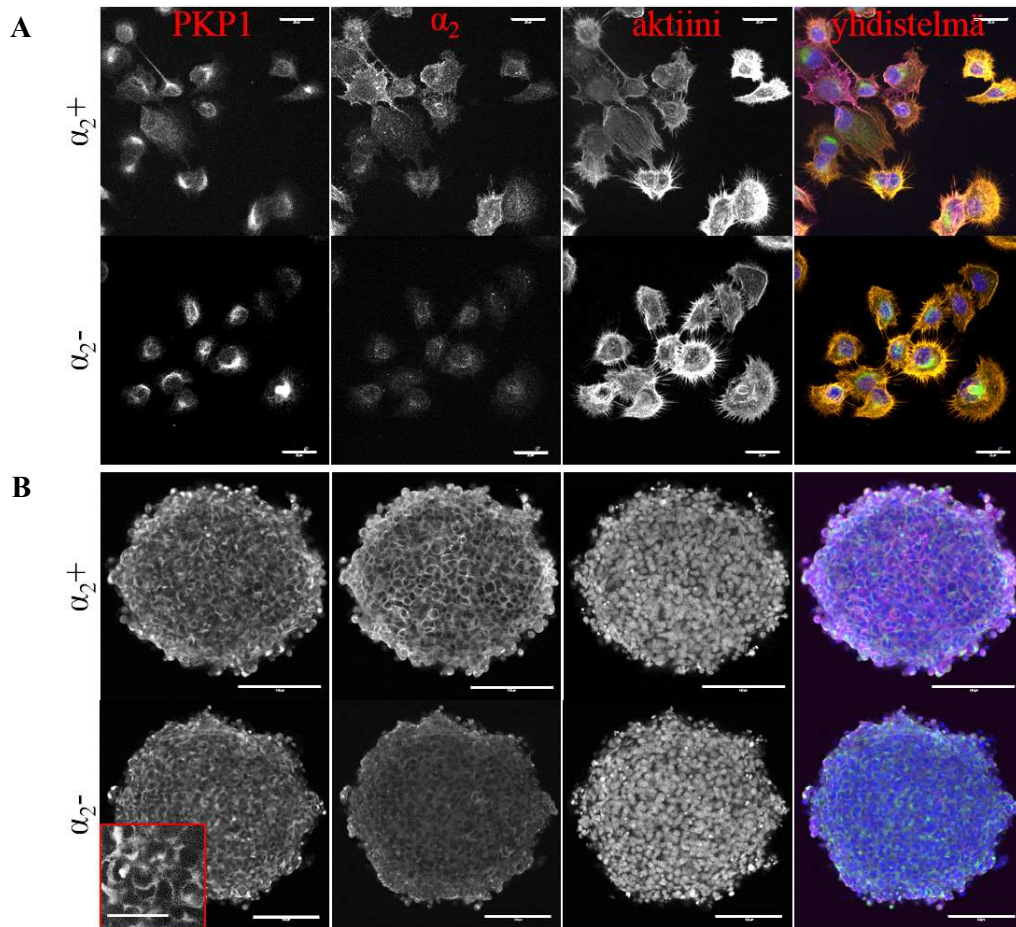
LIITTEET



Liitekuva 1. SVEP1-proteiinin lokalisaatiossa ei havaittu eroja DU145-solutyypin välillä. (A) 63-kertaisella suurennoksella otetut konfokaalimikroskooppikuvat fibronektiinillä kasvatetuista DU145WT (α_2^+) ja DU145KO (α_2^-) -soluista, mittakaava 25 μm , ja (B) vastaavat kuvat 20-kertaisella objektiivilla 3D-mallissa, mittakaava 100 μm . Yhdistelmäkuviissa SVEP1-proteiini on värjätty vihreällä, α_2 -integriini magentalla, DAPI sinisellä ja aktiini oranssilla.



Liitekuva 2. VWA2-proteiiniin ei lokalisoitu solussa eri tavoin DU145-solutyyppien välillä. (A) 63-kertaisella objektiivilla otetut konfokaalimikroskooppikuvat 2D-mallissa DU145WT (α_2^+) ja DU145KO (α_2^-) -soluista, mittakaava 25 μm , ja (B) vastaavat kuvat sferoideista 20-kertaisella objektiivilla, mittakaava 100 μm . Yhdistelmäkuviissa VWA2-proteiini on vihreällä, α_2 -integriini magentalla, DAPI sinisellä ja aktiini oranssilla.



Liitekuva 3. DU145-solutyypien välillä ei havaittu eroja PKP1-proteiinin lokalisaatiossa. (A) Konfokaalimikroskooppikuvat 63-kertaisella suurennoksella fibronektiinillä kasvatetuista DU145WT (α_2^+) ja DU145KO (α_2^-) -soluista, mittakaava 25 μm , ja (B) vastaavat kuvat sferoideista 20-kertaisella suurennoksella, mittakaava 100 μm . Yhdistelmäkuviissa PKP1-proteiini on värjätty vihreällä, α_2 -integriini magentalla, DAPI sinisellä ja aktiini oranssilla.

LÄHTEET

- Aguirre-Ghiso, J.A., Kovalski, K. & Ossowski, L. (1999) Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signalling. *J Cell Biol* **147**(1):89–104.
- Aguirre-Ghiso, J. (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* **7**(11):834–846.
- Albertson, D.G., Collins, C., McCormick, F. & Gray, J.W. (2003) Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* **34**(4):369–376.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(11):3983–3988.
- Al-Mehdi, A., Tozawa, K., Fisher, A.B., Shientag, L., Lee, A. & Muschel, R.J. (2000) Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* **6**(1):100–102.
- American Cancer Society (2016) Cancer facts and figures 2016. American Cancer Society, Atlanta
- Anastassiou, G., Duensing, S., Steinhoff, G., Kirchner, H., Ganser, A. & Atzpodien, J. (1995) In vivo distribution of integrins in renal cell carcinoma: integrin-phenotype alteration in different degrees of tumor differentiation and VLA-2 involvement in tumor metastasis. *Cancer Biother* **10**(4):287–292.
- Anderson, L.R., Owens, T.W. & Naylor, M.J. (2013) Integrins in development and cancer. *Biophys Rev* **6**(2):191–202.
- Aoudjit, F. & Vuori, K. (2001) Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **20**(36):4995–5004.
- Arihiro, K., Inai, K., Kurihara, K., Takeda, S., Kaneko, M., Kuroi, K. & Toge, T. (1993) Loss of VLA-2 collagen receptor in breast carcinoma, facilitating invasion and metastasis. *Jpn J Cancer Res* **84**(7):726–733.
- Au, S.H., Storey, B.D., Moore, J.C., Tang, Q., Chen, Y., Javaid, S., Sarioglu, A.F., Sullivan, R., Madden, M.W., O’Keefe, R., Haber, D.A., Maheswaran, S., Langenau, D.M., Stott, S.L. & Toner, M. (2016) Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(18):4947–4952.
- Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B. & Varnier, J.A. (2008) Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**(8):604–617.
- Ayala, G., Tuxhorn, J.A., Wheeler, T.M., Frolov, A., Scardino, P.T., Otori, M., Wheeler, M., Spitler, J. & Rowley, D.R. (2003) Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **9**(13):4792–4801.
- Bagchi, A., Papazoglu, C., Wu, Y., Capurso, D., Brodt, M., Francis, D., Bredel, M., Vogel, H. & Mills, A. (2007) CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell* **128**(3):459–475.
- Baker, B.M. & Chen, C.S. (2012) Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* **125**(13):3015–3024.

- Baluk, P., Hashizume, H. & McDonald, D.M. (2005) Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **15**(1):102–111.
- Barkan, D., Kleinman, H., Simmons, J.L., Asmussen, H., Kamaraju, A.K., Hoehorhoff, M.J., Liu, Z., Costes, S.V., Cho, E.H., Lockett, S., Khanna, C., Chambers, A.F. & Green, J.E. (2008) Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res* **68**(15):6241–6250.
- Barkan, D., El Touny, L.H., Michalowski, A.M., Smith, J.A., Chu, I., Davis, A.S., Webster, J.D., Hoover, S., Simpson, R.M., Gauldie, J. & Green, J.E. (2010) Metastatic growth from dormant cells induced by a col-I-enriched fibrotic environment. *Cancer Res* **70**(14):5706–5716.
- Baronas-Lowell, D., Lauer-Fields, J.L., Borgia, J.A., Sferrazza, G.F., Al-Ghoul, M., Minond, D. & Fields, G.B. (2004) Differential modulation of human melanoma cell metalloproteinase expression by $\alpha_2\beta_1$ integrin and CD44 triple-helical ligands derived from type IV collagen. *J Biol Chem* **279**(42):43503–43513.
- Bartolomé, R.A., Barderas, R., Torres, S., Fernandez-Acenero, M.J., Mendes, M., Garcia-Foncillas, J., Lopez-Lucendo, M. & Casal, J.I. (2014) Cadherin-17 interacts with alpha2beta1 integrin to regulate cell proliferation and adhesion in colorectal cancer cells causing liver metastasis. *Oncogene* **33**(13):1658–1669.
- Bayani, J., Selvarajah, S., Maire, G., Vukovic, B., Al-Romaih, K., Zielenska, M. & Squire, J.A. (2007) Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* **17**(1):5-18
- Baylink, D.J., Finkelman, R.D. & Mohan, S. (1993) Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* **8**(S2):S565–S572.
- Bergers, G. & Hanahan, D. (2008) Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* **8**(8):592–603.
- Berruti, A., Dogliotti, L., Bitossi, R., Fasolis, G., Gorzegno, G., Bellina, M., Torta, M., Porpiglia, F., Fontana, D. & Angeli, A. (2000) Incidence of skeletal complications in patients with bone metastatic prostate cancer and hormone refractory disease: predictive role of bone resorption and formation markers evaluated at baseline. *J Urol* **164**(4):1248–1253
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. & Moses, H.L. (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**(7015):332–337.
- Biegging, K.T., Mello, S.S. & Attardi, L.D. (2014) Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **14**(5):359–370.
- Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M. & Frodin, L. (1995) Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* **60**(2):183–189.
- Birnie, R., Bryce, S.D., Roome, C., Dussupt, V., Droop, A., Lang, S.H., Berry, P.A., Hyde, C.F., Lewis, J.L., Stower, M.J., Maitland, N.J. & Collins, A.T. (2008) Gene expression profiling of human prostate cancer stem cells reveals a pro-inflammatory phenotype and the importance of extracellular matrix interactions. *Genome Biol* **9**(5):R83.
- Blackburn, E.H., Greider, C.W. & Szostak, J.W. (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* **12**(10):1133–1138.

- Bos, J.L. (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**(17):4682–4689.
- Brabletz, T. (2012) To differentiate or not--routes towards metastasis. *Nat Rev Cancer* **12**(6):425–246.
- Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G.Y.C., Bliss, J., Vincent-Salomon, A. & Pantel, K. (2005) A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* **353**(8):793–802.
- Buckwalter, J., Glimcher, M., Cooper, R. & Recker, R. (1996) Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* **45**:371–386.
- Cagnet, S., Faraldo, M.M., Kreft, M., Sonnenberg, A., Raymond, K. & Glukhova, M.A. (2013) Signaling events mediated by $\alpha_3\beta_1$ integrin are essential for mammary tumorigenesis. *Oncogene* **33**(34):4286–4295.
- Campbell, P.J., Yachida, S., Mudie, L.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., Stebbings, L.A., Morsberger, L.A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M.L., McBride, D.J., Varela, I., Nik-Zainal, S.A., Leroy, C., Jia, M., Menzies, A., Butler, A.P., Teague, J.W., Griffin, C.A., Burton, J., Swerdlow, H., Quail, M.A., Stratton, M.R., Iacobuzio-Donahue, C. & Futreal, P.A. (2010) The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* **467**(7319):1109–1113.
- Chan, B.M., Matsuura, N., Takada, Y., Zetter, B.R. & Hemler, M.E. (1991) In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* **251**(5001):1600–1602.
- Charras, G. & Sahai, E. (2014) Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(12):813–824.
- Chen, J., Diacovo, T.G., Grenache, D.G., Santoro, S.A. & Zutter, M.M. (2002) The α_2 integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am J Pathol* **161**(1):337–344.
- Cheng, J.Q., Lindsley, C.W., Cheng, G.Z., Yang, H. & Nicosia, S.V. (2005) The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* **24**(50):7482–7492.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A. & Moses, H.L. (2008) Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res* **6**(10):1521–1533.
- Cheung, K., Gabrielson, E., Werb, Z. & Ewald, A. (2013) Collective invasion in breast cancer requires a conserved basal epithelial program. *Cell* **155**(7):1639–1651.
- Cheung, K.J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J.D., Fairchild, A.N., Gorin, M.A., Verdone, J.E., Pienta, K.J., Bader, J.S. & Ewald, A.J. (2016) Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(7): E854–E863.
- Chin, S.P., Marthick, J.R., West, A.C., Short, A.K., Chuckowree, J., Polanowski, A.M., Thomson, R.J., Holloway, A.F. & Dickinson, J.L. (2015) Regulation of the ITGA2 gene by epigenetic mechanisms in prostate cancer. *The Prostate* **75**(7):723–734.
- Chirgwin, J.M. & Guise, T.A. (2007) Skeletal metastases: decreasing tumor burden by targeting the bone microenvironment. *J Cell Biochem* **102**(6):1333–1342.

- Choi, S., Kim, Y., Park, H., Han, I., Chung, E., Lee, S., Kim, Y., Lee, J., Oh, E. & Yi, J. (2009) Syndecan-2 overexpression regulates adhesion and migration through cooperation with integrin α 2. *Biochem Biophys Res Commun* **384**(2):231–235.
- Ciccia, A. & Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **40**(2):179–204.
- Clevers, H. (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* **17**(3):313–319.
- Collins, A.T., Habib, F.K., Maitland, N.J. & Neal, D.E. (2001) Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on α 2 β 1-integrin expression. *J Cell Sci* **114**(21):3865–3872.
- Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J. & Maitland, N.J. (2005) Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* **65**(23):10946–10951.
- Colombel, M., Eaton, C.L., Hamdy, F., Ricci, E., van der Pluijm, G., Cecchini, M., Mege-Lechevallier, F., Clezardin, P. & Thalmann, G. (2012) Increased expression of putative cancer stem cell markers in primary prostate cancer is associated with progression of bone metastases. *The Prostate* **72**(7):713–720.
- Conti, L., Lanzardo, S., Ruiu, R., Cadenazzi, M., Cavallo, F., Aime, S. & Geninatti Crich, S. (2016) L-Ferritin targets breast cancer stem cells and delivers therapeutic and imaging agents. *Oncotarget* **7**(41):66713–66727.
- Cooper, C.R., Chay, C.H., Gendernalik, J.D., Lee, H.L., Bhatia, J., Taichman, R.S., McCauley, L.K., Keller, E.T. & Pienta, K.J. (2003) Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* **97**(3 Suppl):739–747.
- Cowell, J.K., Head, K., Kunapuli, P., Vaughan, M., Karasik, E. & Foster, B. (2010) Inactivation of LGI1 expression accompanies early stage hyperplasia of prostate epithelium in the TRAMP murine model of prostate cancer. *Exp Mol Pathol* **88**(1):77–81.
- Davis, G.E. (1992) Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: α v β 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochem Biophys Res Commun* **182**(3):1025–1031.
- de Clerck, Y.A. & Jones, P.A. (1980) The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen and elastin by rat smooth-muscle cells. *Biochem J* **186**(1):217–225.
- Demicheli, R., Retsky, M.W., Hrushesky, W.J.M., Baum, M. & Gukas, I.D. (2008) The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann Oncol* **19**(11):1821–1828.
- Denko, N.C., Giaccia, A.J., Stringer, J.R. & Stambrook, P.J. (1994) The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11):5124–5128.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garrè, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., Maestro, R., Pelicci, P.G. & d'Adda, d.F. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**(7119):638–642.
- Ding, L., Ellis, M.J., Li, S., Larson, D.E., Chen, K., Wallis, J.W., Harris, C.C., McLellan, M.D., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Abbott, R.M., Hoog, J., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Kalicki, J., Zhang, Q., Chen, L., Lin, L., Wendl, M.C., McMichael, J.F., Magrini, V.J., Cook, L., McGrath, S.D., Vickery, T.L., Appelbaum, E., Deschryver, K., Davies, S., Guintoli, T., Lin,

- L., Crowder, R., Tao, Y., Snider, J.E., Smith, S.M., Dukes, A.F., Sanderson, G.E., Pohl, C.S., Delehaunty, K.D., Fronick, C.C., Pape, K.A., Reed, J.S., Robinson, J.S., Hodges, J.S., Schierding, W., Dees, N.D., Shen, D., Locke, D.P., Wiechert, M.E., Eldred, J.M., Peck, J.B., Oberkfell, B.J., Lolofie, J.T., Du, F., Hawkins, A.E., O'Laughlin, M.D., Bernard, K.E., Cunningham, M., Elliott, G., Mason, M.D., Thompson, D.M., Jr, Ivanovich, J.L., Goodfellow, P.J., Perou, C.M., Weinstock, G.M., Aft, R., Watson, M., Ley, T.J., Wilson, R.K. & Mardis, E.R. (2010) Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* **464**(7291):999–1005.
- Ding, W., Fan, X.L., Xu, X., Huang, J.Z., Xu, S.H., Geng, Q., Li, R., Chen, D. & Yan, G.R. (2015) Epigenetic silencing of ITGA2 by MiR-373 promotes cell migration in breast cancer. *PLoS One* **10**(8):e0135128.
- Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J. & Schuh, J. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**(18):2412–2424.
- Dubrovskaya, A., Kim, S., Salamone, R.J., Walker, J.R., Maira, S.M., Garcia-Echeverria, C., Schultz, P.G. & Reddy, V.A. (2009) The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(1):268–273.
- DuFort, C.C., Paszek, M.J. & Weaver, V.M. (2011) Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**(5):308–319.
- Eaton, C.L., Colombel, M., van der Pluijm, G., Cecchini, M., Wetterwald, A., Lippitt, J., Rehman, I., Hamdy, F. & Thalman, G. (2010) Evaluation of the frequency of putative prostate cancer stem cells in primary and metastatic prostate cancer. *The Prostate* **70**(8):875–882.
- Eble, J.A. & Tuckwell, D.S. (2003) The $\alpha_2\beta_1$ -integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin α_2 subunit proximal to the collagen-binding site. *Biochem J* **376**(1):77–85.
- Egan, C., Nyman, U., Skotte, J., Streubel, G., Turner, S., O'Connell, D., Rrakli, V., Dolan, M., Chadderton, N., Hansen, K., Farrar, G., Helin, K., Holmberg, J. & Bracken, A. (2013) CHD5 is required for neurogenesis and has a dual role in facilitating gene expression and polycomb gene repression. *Dev Cell* **26**(3):223–236.
- Eke, I., Deuse, Y., Hehlhans, S., Gurtner, K., Krause, M., Baumann, M., Shevchenko, A., Sandfort, V. & Cordes, N. (2012) β_1 Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. *J Clin Invest* **122**(4):1529–1540.
- Erler, J.T. & Weaver, V.M. (2009) Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin Exp Metastasis* **26**(1):35–49.
- Farias, E., Ong, D., Ghyselinck, N., Nakajo, S., Kuppumbatti, Y. & Mira y Lopez, R. (2005) Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity. *J Natl Cancer Inst* **97**(1):21–29.
- Felsher, D.W. & Bishop, J.M. (1999) Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7):3940–3944.
- Fidler, I.J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**(6):453–458.

- Fishman, D.A., Kearns, A., Chilukuri, K., Bafetti, L.M., O'Toole, E.A., Georgacopoulos, J., Ravosa, M.J. & Stack, M.S. (1998) Metastatic dissemination of human ovarian epithelial carcinoma is promoted by $\alpha_2\beta_1$ -integrin-mediated interaction with type I collagen. *Invasion Metastasis*, **18**(1):15–26.
- Flaberg, E., Markasz, L., Petranyi, G., Stuber, G., Dicso, F., Alchihabi, N., Olah, E., Csizy, I., Jozsa, T., Andren, O., Johansson, J.E., Andersson, S.O., Klein, G. & Szekely, L. (2011) High-throughput live-cell imaging reveals differential inhibition of tumor cell proliferation by human fibroblasts. *Int J Cancer* **128**(12):2793–2802.
- Fujita, T., Igarashi, J., Okawa, E., Gotoh, T., Manne, J., Kolla, V., Kim, J., Zhao, H., Pawel, B., London, W., Maris, J., White, P. & Brodeur, G. (2008) CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* **100**(13):940–949.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K. & Sahai, E. (2007) Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* **9**(12):1392–1400.
- Gambhir, S.S. (2002) Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* **2**(9):683–693.
- Garraway, I.P., Sun, W., Tran, C.P., Perner, S., Zhang, B., Goldstein, A.S., Hahm, S.A., Haider, M., Head, C.S., Reiter, R.E., Rubin, M.A. & Witte, O.N. (2010) Human prostate sphere-forming cells represent a subset of basal epithelial cells capable of glandular regeneration in vivo. *The Prostate* **70**(5):491–501.
- Gay, L.J. & Felding-Habermann, B. (2011) Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* **11**(2):123–134.
- Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C.R., Nohadani, M., Eklund, A.C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P.A. & Swanton, C. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**(10):883–892.
- Germano, G., Allavena, P. & Mantovani, A. (2008) Cytokines as a key component of cancer-related inflammation. *Cytokine* **43**(3):374–379.
- Ghajar, C.M. (2015) Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nat Rev Cancer* **15**(4):238–247.
- Ghotra, V.P.S., He, S., van, d.H., Nijhoff, S., de Bont, H., Lekkerkerker, A., Janssen, R., Jenster, G., van Leenders, G.J.L.H., Hoogland, A.M., Verhoef, E.I., Baranski, Z., Xiong, J., van, d.W., van, d.P., Snaar-Jagalska, B. & Danen, E.H.J. (2015) SYK is a candidate kinase target for the treatment of advanced prostate cancer. *Cancer Res* **75**(1):230–240.
- Giancotti, F. (2013) Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell* **155**(4):750–764.
- Globocan (2012): Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. IARC <http://globocan.iarc.fr>. (Luettu 19.9.2017).
- Greider, C.W. & Blackburn, E.H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1):405–413.

- Grzesiak, J.J. & Bouvet, M. (2006) The alpha2beta1 integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines. *Br J Cancer* **94**(9):1311–1319.
- Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D.G. & Mukhtar, H. (2000) Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate* **42**(1):73–78.
- Gupta, P.B., Chaffer, C.L. & Weinberg, R.A. (2009) Cancer stem cells: mirage or reality?. *Nat Med* **15**(9):1010–1012.
- Guzman-Ramirez, N., Voller, M., Wetterwald, A., Germann, M., Cross, N.A., Rentsch, C.A., Schalken, J., Thalmann, G.N. & Cecchini, M.G. (2009) In vitro propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human prostate cancer tissue. *The Prostate* **69**(15):1683–1693.
- Hackett, J.A. & Greider, C.W. (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* **21**(4):619–626.
- Haidari, M., Zhang, W., Caivano, A., Chen, Z., Ganjehei, L., Mortazavi, A., Stroud, C., Woodside, D.G., Willerson, J.T. & Dixon, R.A.F. (2012) Integrin $\alpha_2\beta_1$ mediates tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin induced by invasive breast cancer cells. *J Biol Chem* **287**(39):32981–32992.
- Hall, C.L., Dai, J., van Golen, K.L., Keller, E.T. & Long, M.W. (2006) Type I collagen receptor ($\alpha_2\beta_1$) signaling promotes the growth of human prostate cancer cells within the bone. *Cancer Res* **66**(17):8648–8654.
- Hall, C.L., Dubyk, C.W., Riesenberger, T.A., Shein, D., Keller, E.T. & van Golen, K.,L. (2008) Type I collagen receptor ($\alpha_2\beta_1$) signaling promotes prostate cancer invasion through RhoC GTPase. *Neoplasia* **10**(8):797–803.
- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**(3):353–364.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1):57–70
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5):646–674.
- Hanahan, D. & Coussens, L. (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**(3):309–322
- Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Ohta, K., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Doki, Y. & Mori, M. (2013) CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol* **43**(2):425–430.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274):458–460.
- Hartmann, T.N., Burger, J.A., Glodek, A., Fujii, N. & Burger, M. (2005) CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* **24**(27):4462–4471.
- Hatzfeld, M., Kristjansson, G.I., Plessmann, U. & Weber, K. (1994) Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *J Cell Sci* **107**(8):2259–2270.

- Heino, J. (2000) The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol* **19**(4):319–323.
- Heino, J. (2014) Cellular signaling by collagen-binding integrins. *Adv Exp Med Biol* **819**:143–155.
- Heitzer, E., Auer, M., Gasch, C., Pichler, M., Ulz, P., Hoffmann, E.M., Lax, S., Waldispuehl-Geigl, J., Mauermann, O., Lackner, C., Höfler, G., Eisner, F., Sill, H., Samonigg, H., Pantel, K., Riethdorf, S., Bauernhofer, T., Geigl, J.B. & Speicher, M.R. (2013) Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res* **73**(10):2965–2975.
- Helfrich, I., Scheffrahn, I., Bartling, S., Weis, J., von Felbert, V., Middleton, M., Kato, M., Ergün, S., Augustin, H.G. & Schadendorf, D. (2010) Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. *J Exp Med* **207**(3):491–503.
- Henriet, P., Zhong, Z., Brooks, P.C., Weinberg, K.I. & DeClerck, Y.A. (2000) Contact with fibrillar collagen inhibits melanoma cell proliferation by up-regulating p27KIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18):10026–10031.
- Hensel, J.A., Flaig, T.W. & Theodorescu, D. (2013) Clinical opportunities and challenges in targeting tumour dormancy. *Nat Rev Clin Oncol* **10**(1):41–51.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J. & Heeschen, C. (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* **1**(3):313–323.
- Holtkötter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Müller, W., Hafner, M., Schulte, V., Krieg, T. & Eckes, B. (2002) Integrin α_2 -deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem* **277**(13):10789–10794.
- Honoré, S.t., Kovacic, H., Pichard, V.é., Briand, C. & Rognoni, J. (2003) $\alpha_2\beta_1$ -integrin signaling by itself controls G1/S transition in a human adenocarcinoma cell line (Caco-2): implication of NADPH oxidase-dependent production of ROS. *Exp Cell Res* **285**(1):59–71.
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A.E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J.M., Dumont-Cole, V., Kramer, K., Wexler, L.H., Narendran, A., Schwartz, G.K., Healey, J.H., Sandstrom, P., Järnigen Labori, K., Kure, E.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., de Sousa, M., Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Brady, M.S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A.J., Bissell, M.J., Garcia, B.A., Kang, Y., Rajasekhar, V.K., Ghajar, C.M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J. & Lyden, D. (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**(7578):329–335.
- Huang, D.C.S. & Strasser, A. (2000) BH3-only proteins—essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**(6):839–842.
- Huang, C., Park, C.C., Hilsenbeck, S.G., Ward, R., Rimawi, M.F., Wang, Y., Shou, J., Bissell, M.J., Osborne, C.K. & Schiff, R. (2011) β_1 -integrin mediates an alternative survival pathway in breast cancer cells resistant to lapatinib. *Breast Cancer Res* **13**(4):R84.
- Huang, J., Nguyen-McCarty, M., Hexner, E.O., Danet-Desnoyers, G. & Klein, P.S. (2012) Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. *Nat Med* **18**(12):1778–1785.

- Hwang, D., Byrne, J., Scollard, D. & Levine, E. (1998) Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **90**(6):455–460.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**(1):11–25.
- Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**(6):673–687.
- 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**(1):58–68.
- Ibaragi, S., Shimo, T., Hassan, N.M.M., Isowa, S., Kurio, N., Mandai, H., Kodama, S. & Sasaki, A. (2011) Induction of MMP-13 expression in bone-metastasizing cancer cells by type I collagen through integrin $\alpha_1\beta_1$ - and $\alpha_2\beta_1$ -p38 MAPK signalling. *Anticancer Res* **31**(4):1307–1313.
- Iida, J. & McCarthy, J.B. (2007) Expression of collagenase-1 (MMP-1) promotes melanoma growth through the generation of active transforming growth factor- β . *Melanoma Res* **17**(4):205–213.
- Ivaska, J., Reunanen, H., Westermarck, J., Koivisto, L., Kähäri, V. & Heino, J. (1999) Integrin $\alpha_2\beta_1$ mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the α_2 cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **147**(2):401–416.
- Ivaska, J. & Heino, J. (2000) Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **57**(1):16–24.
- Ivaska, J. & Heino, J. (2011) Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**:291–320.
- Jackson, S.P. & Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **461**(7267):1071–1078.
- Jones, P.H., Harper, S. & Watt, F.M. (1995) Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80**(1):83–93.
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J. & Ding, L. (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**(7471):333–339.
- Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A. & Massagué, J. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**(6):537–549.
- Kaukonen, R., Mai, A., Georgiadou, M., Saari, M., De Franceschi, N., Betz, T., Sihto, H., Ventelä, S., Elo, L., Jokitalo, E., Westermarck, J., Kellokumpu-Lehtinen, P., Joensuu, H., Grenman, R. & Ivaska, J. (2016) Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription. *Nature Commun* **7**:12237.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. & Shay, J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**(5193):2011–2015.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. & Arihiro, K. (2006) Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* **66**(11):5527–5536.

- Kim, J.K., Jung, Y., Wang, J., Joseph, J., Mishra, A., Hill, E.E., Krebsbach, P.H., Pienta, K.J., Shiozawa, Y. & Taichman, R.S. (2013) TBK1 regulates prostate cancer dormancy through mTOR inhibition. *Neoplasia* **15**(9):1064–1074.
- Kirkland, S.C. (2009) Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer* **101**(2):320–326.
- Kleffel, S. & Schatton, T. (2013) Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin?. *Adv Exp Med Biol* **734**:145–179.
- Knerr, K., Ackermann, K., Neidhart, T. & Pyerin, W. (2004) Bone metastasis: osteoblasts affect growth and adhesion regulons in prostate tumor cells and provoke osteomimicry. *Int J Cancer* **111**(1):152–159.
- Knights, A.J., Funnell, A.P.W., Crossley, M. & Pearson, R.C.M. (2012) Holding tight: cell junctions and cancer spread. *Trends Cancer Res* **8**:61–69.
- Kobayashi, A., Okuda, H., Xing, F., Pandey, P.R., Watabe, M., Hirota, S., Pai, S.K., Liu, W., Fukuda, K., Chambers, C., Wilber, A. & Watabe, K. (2011) Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med* **208**(13):2641–2655.
- Koenig, A., Mueller, C., Hasel, C., Adler, G. & Menke, A. (2006) Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* **66**(9):4662–4671.
- Kostenuik, P.J., Sanchez-Sweatman, O., Orr, F.W. & Singh, G. (1996) Bone cell matrix promotes the adhesion of human prostatic carcinoma cells via the $\alpha_2\beta_1$ integrin. *Clin Exp Metastasis* **14**(1):19–26.
- Kostenuik, P.J., Singh, G. & Orr, F.W. (1997) Transforming growth factor β upregulates the integrin-mediated adhesion of human prostatic carcinoma cells to type I collagen. *Clin Exp Metastasis* **15**(1):41–52.
- Koyama, H., Raines, E.W., Bornfeldt, K.E., Roberts, J.M. & Ross, R. (1996) Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* **87**(6):1069–1078.
- Kreso, A. & Dick, J. (2014) Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **14**(3):275–291.
- Kumar, S., Park, S.H., Cieply, B., Schupp, J., Killiam, E., Zhang, F., Rimm, D.L. & Frisch, S.M. (2011) A pathway for the control of anoikis sensitivity by E-cadherin and epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* **31**(19):4036–4051.
- Kunapuli, P., Kasyapa, C.S., Hawthorn, L. & Cowell, J.K. (2004) LGI1, a putative tumor metastasis suppressor gene, controls in vitro invasiveness and expression of matrix metalloproteinases in glioma cells through the ERK1/2 pathway. *J Biol Chem* **279**(22):23151–23157.
- Labelle, M., Schnittler, H.J., Aust, D.E., Friedrich, K., Baretton, G., Vestweber, D. & Breier, G. (2008) Vascular endothelial cadherin promotes breast cancer progression via transforming growth factor β signalling. *Cancer Res* **68**(5):1388–1397.
- Labelle, M., Begum, S. & Hynes, R. (2011) Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* **20**(5):576–590.

- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R. & Weinberg, R.A. (2017) Emerging biological principles of metastasis. *Cell* **168**(4):670–691.
- Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(3):178–196.
- Lang, S.H., Clarke, N.W., George, N.J. & Testa, N.G. (1997) Primary prostatic epithelial cell binding to human bone marrow stroma and the role of $\alpha_2\beta_1$ integrin. *Clin Exp Metastasis* **15**(3):218–227.
- Langley, R.R. & Fidler, I.J. (2011) The seed and soil hypothesis revisited—the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int J Cancer* **128**(11):2527–2535.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macswords, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B. & Rich, J.N. (2010) Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* **6**(5):421–432.
- LaTulippe, E., Satagopan, J., Smith, A., Scher, H., Scardino, P., Reuter, V. & Gerald, W.L. (2002) Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. *Cancer Res* **62**(15):4499–4506.
- Lawson, D.A., Bhakta, N.R., Kessenbrock, K., Prummel, K.D., Yu, Y., Takai, K., Zhou, A., Eyob, H., Balakrishnan, S., Wang, C., Yaswen, P., Goga, A. & Werb, Z. (2015) Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* **526**(7571):131–135.
- Leong, H.S., Robertson, A.E., Stoletov, K., Leith, S.J., Chin, C.A., Chien, A.E., Hague, M.N., Ablack, A., Carmine-Simmen, K., McPherson, V.A., Postenka, C.O., Turley, E.A., Courtneidge, S.A., Chambers, A.F. & Lewis, J.D. (2014) Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. *Cell Rep* **8**(5):1558–1570.
- Li, A., Simmons, P.J. & Kaur, P. (1998) Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7):3902–3907.
- Li, H., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Claypool, K. & Tang, D.G. (2008) PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res* **68**(6):1820–1825.
- Li, Y. & Littera, J. (2012) Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes?. *Cancer Res* **72**(3):576–580.
- Liu, H., Patel, M.R., Prescher, J.A., Patsialou, A., Qian, D., Lin, J., Wen, S., Chang, Y., Bachmann, M.H., Shimono, Y., Dalerba, P., Adorno, M., Lobo, N., Bueno, J., Dirbas, F.M., Goswami, S., Somlo, G., Condeelis, J., Contag, C.H., Gambhir, S.S. & Clarke, M.F. (2010) Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models. *Proc Natl Acad Sci* **107**(42):18115–18120.
- Liu, X., Liang, Z., Gao, K., Li, H., Zhao, G., Wang, S. & Fang, J. (2016) MicroRNA-128 inhibits EMT of human osteosarcoma cells by directly targeting integrin α_2 . *Tumour Biol* **37**(6):7951–7957.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**(4):402–408.

- Lochter, A., Navre, M., Werb, Z. & Bissell, M.J. (1999) α_1 and α_2 integrins mediate invasive activity of mouse mammary carcinoma cells through regulation of stromelysin-1 expression. *Mol Biol Cell* **10**(2):271–282.
- Logothetis, C.J. & Lin, S.H. (2005) Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* **5**(1):21–28.
- Longhurst, C.M. & Jennings, L.K. (1998) Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **54**(6):514–526.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z. & Hunter, T. (2003) Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of β -catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* **4**(6):499–515.
- Lunt, S.Y. & Vander Heiden, M.G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**:441–464.
- Luo, B.H., Carman, C.V. & Springer, T.A. (2007) Structural basis of integrin regulation and signalling. *Annu Rev Immunol* **25**:619–647.
- Luo, J., Ok Lee, S., Liang, L., Huang, C., Li, L., Wen, S. & Chang, C. (2014) Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene* **33**(21):2768–2778.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F. & Groom, A.C. (1998) Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* **153**(3):865–873.
- Macêdo, J., Kele Arruda, Fox, J.W. & Castro, M.d.S. (2015) Disintegrins from snake venoms and their applications in cancer research and therapy. *Curr Protein Pept Sci* **16**(6):532–548.
- Madamanchi, A., Santoro, S.A. & Zutter, M.M. (2014) $\alpha_2\beta_1$ integrin. *Adv Exp Med Biol* **819**:41–60.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J. & Weinberg, R.A. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**(4):704–715.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* **454**(7203):436–444.
- Mao, X., Xue, X., Wang, L., Zhang, X., Yan, M., Tu, Y., Lin, W., Jiang, X., Ren, H., Zhang, W. & Song, S. (2013) CDH5 is specifically activated in glioblastoma stemlike cells and contributes to vasculogenic mimicry induced by hypoxia. *Neuro Oncol* **15**(7):865–879.
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Settle, S.L., Woerner, B.M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J. & Seibert, K. (2000) Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* **60**(5):1306–1311.
- Massagué, J. (2008) TGF- β in Cancer. *Cell* **134**(2):215–230.

- Matsuoka, T., Yashiro, M., Nishimura, S., Inoue, T., Fujihara, T., Sawada, T., Kato, Y., Seki, S. & Hirakawa-Ys Chung, K. (2000) Increased expression of alpha2beta1-integrin in the peritoneal dissemination of human gastric carcinoma. *Int J Mol Med* **5**(1):21–25.
- Medina, R.A. & Owen, G.I. (2002) Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* **35**(1):9–26.
- Meyer, M.J., Fleming, J.M., Lin, A.F., Hussnain, S.A., Ginsburg, E. & Vonderhaar, B.K. (2010) CD44^{pos}CD49^{hi}CD133/2^{hi} defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res* **70**(11):4624–4633.
- Miranti, C.K. & Brugge, J.S. (2002) Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* **4**(4):E83–90.
- Mognetti, B., Montagna, G.L., Perrelli, M.G., Pagliaro, P. & Penna, C. (2013) Bone marrow mesenchymal stem cells increase motility of prostate cancer cells via production of stromal cell-derived factor-1 α . *J Cell Mol Med* **17**(2):287–292.
- Montgomery, A.M., Reisfeld, R.A. & Cheresch, D.A. (1994) Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19):8856–8860.
- Morath, C., Mueller, M., Goldschmidt, H., Schwenger, V., Opelz, G. & Zeier, M. (2004) Malignancy in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* **15**(6):1582–1588.
- Morgan, T.M., Lange, P.H., Porter, M.P., Lin, D.W., Ellis, W.J., Gallaher, I.S. & Vessella, R.L. (2009) Disseminated tumor cells in prostate cancer patients after radical prostatectomy and without evidence of disease predicts biochemical recurrence. *Clin Cancer Res* **15**(2):677–683.
- Mueller-Klieser, W. (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* **273**(4 Pt 1):C1109–1123.
- Muller, P.J. & Vousden, K. (2014) Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* **25**(3):304–317.
- Mundy, G.R., Demartino, S. & Rowe, D.W. (1981) Collagen and collagen-derived fragments are chemotactic for tumor cells. *J Clin Invest* **68**(4):1102–1105.
- Mundy, G.R. (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **2**(8):584–593.
- Naci, D., El Azreq, M.A., Chetoui, N., Laudén, L., Sigaux, F., Charron, D., Al-Daccak, R. & Aoudjit, F. (2012) alpha2beta1 integrin promotes chemoresistance against doxorubicin in cancer cells through extracellular signal-regulated kinase (ERK). *J Biol Chem* **287**(21):17065–17076.
- Nemeth, J.A., Cher, M.L., Zhou, Z., Mullins, C., Bhagat, S. & Trikha, M. (2003) Inhibition of $\alpha_v\beta_3$ integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* **20**(5):413–420.
- Nieto, M., Huang, R., Jackson, R. & Thiery, J. (2016) EMT: 2016. *Cell* **166**(1):21–45.
- Ochsenbein, A.F., Klenerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. (1999) Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5):2233–2238.

- Öhlund, D., Franklin, O., Lundberg, E., Lundin, C. & Sund, M. (2013) Type IV collagen stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration, and inhibits apoptosis through an autocrine loop. *BMC Cancer* **13**:154.
- Oskarsson, T., Batlle, E. & Massagué, J. (2014) Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* **14**(3):306–321.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M., Tartour, E., Sautès-Fridman, C. & Fridman, W. (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**(8):1093–1102.
- Paget, S. (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **133**(3421): 571–573.
- Palmieri, D., Camardella, L., Ulivi, V., Guasco, G. & Manduca, P. (2000) Trimer carboxyl propeptide of collagen I produced by mature osteoblasts is chemotactic for endothelial cells. *J Biol Chem* **275**(42):32658–32663.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G. & Stelzer, E.H.K. (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10):839–845.
- Park, C.C., Rembert, J., Chew, K., Moore, D. & Kerlikowske, K. (2009) High mammographic breast density is independent predictor of local but not distant recurrence after lumpectomy and radiotherapy for invasive breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**(1):75–79.
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J.G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., Coghlan, L. & Tang, D.G. (2006) Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* **25**(12):1696–1708.
- Perl, A., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. & Christofori, G. (1998) A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**(6672):190–193.
- Pham, S.M., Kormos, R.L., Landreneau, R.J., Kawai, A., Gonzalez-Cancel, I., Hardesty, R.L., Hattler, B.G. & Griffith, B.P. (1995) Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann Thorac Surg* **60**(6):1623–1626.
- Pickup, M.W., Mouw, J.K. & Weaver, V.M. (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep* **15**(12):1243–1253.
- Popovic, A., Demirovic, A., Spajic, B., Stimac, G., Kruslin, B. & Tomas, D. (2010) Expression and prognostic role of syndecan-2 in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **13**(1):78–82.
- Prall, F. (2007) Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* **50**(1):151–162.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Knittel, J.G., Yan, L., Rueden, C.T., White, J.G. & Keely, P.J. (2008) Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. *BMC Med* **6**:11.
- Pu, Y., Yi, Q., Zhao, F., Wang, H., Cai, W. & Cai, S. (2016) MiR-20a-5p represses multi-drug resistance in osteosarcoma by targeting the KIF26B gene. *Cancer Cell Int* **16**:64.
- Pulukuri, S.M.K. & Rao, J.S. (2008) Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J Oncol* **32**(4):757–765.

- Ramirez, N.E., Zhang, Z., Madamanchi, A., Boyd, K.L., O'Rear, L.D., Nashabi, A., Li, Z., Dupont, W.D., Zijlstra, A. & Zutter, M.M. (2011) The $\alpha(2)\beta(1)$ integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *J Clin Invest* **121**(1):226–237.
- Ranganathan, A.C., Adam, A.P. & Aguirre-Ghiso, J.A. (2006) Opposing roles of mitogenic and stress signaling pathways in the induction of cancer dormancy. *Cell Cycle* **5**(16):1799–1807.
- Reinmuth, N., Liu, W., Ahmad, S.A., Fan, F., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Bucana, C.D., Gallick, G.E., Nickols, M.A., Westlin, W.F. & Ellis, L.M. (2003) $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res* **63**(9):2079–2087.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**(6859):105–111.
- Ricci, E., Mattei, E., Dumontet, C., Eaton, C.L., Hamdy, F., van der Pluije, G., Cecchini, M., Thalmann, G., Clezardin, P. & Colombel, M. (2013) Increased expression of putative cancer stem cell markers in the bone marrow of prostate cancer patients is associated with bone metastasis progression. *Prostate* **73**(16):1738–1746.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. & Collins, A.T. (2004) CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* **117**(16):3539–3545.
- Riikonen, T., Westermarck, J., Koivisto, L., Broberg, A., Kähäri, V. & Heino, J. (1995a) Integrin $\alpha_2\beta_1$ is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen $\alpha_1(I)$ gene expression. *J Biol Chem* **270**(22):13548–13552.
- Riikonen, T., Koivisto, L., Vihinen, P. & Heino, J. (1995b) Transforming growth factor- β regulates collagen gel contraction by increasing α_2 integrin expression in osteogenic cells. *J Biol Chem* **270**(1):376–382.
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D. & Downward, J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**(6490):527–532.
- Roodman, G.D. (2004) Mechanisms of bone metastasis. *Discov Med* **4**(22):144–148.
- Ross, A.A., Cooper, B.W., Lazarus, H.M., Mackay, W., Moss, T.J., Ciobanu, N., Tallman, M.S., Kennedy, M.J., Davidson, N.E. & Sweet, D. (1993) Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* **82**(9):2605–2610.
- Ruoslahti, E. (1992) The Walter Herbert Lecture. Control of cell motility and tumour invasion by extracellular matrix interactions. *Br J Cancer* **66**(2):239–242.
- Ryu, A.H., Eckalbar, W.L., Kreimer, A., Yosef, N. & Ahituv, N. (2017) Use antibiotics in cell culture with caution: genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. *Sci Rep* **7**(1):7533.
- Sadlonova, A., Mukherjee, S., Bowe, D.B., Gault, S.R., Dumas, N.A., Van Tine, B.A., Frolova, N., Page, G.P., Welch, D.R., Novak, L. & Frost, A.R. (2007) Human breast fibroblasts inhibit growth of the MCF10AT xenograft model of proliferative breast disease. *Am J Pathol* **170**(3):1064–1076.

- Sahlgren, C., Gustafsson, M.V., Jin, S., Poellinger, L. & Lendahl, U. (2008) Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(17):6392–6397.
- San Antonio, J.D., Zoeller, J.J., Habursky, K., Turner, K., Pimtong, W., Burrows, M., Choi, S., Basra, S., Bennett, J.S., DeGrado, W.F. & Iozzo, R.V. (2009) A key role for the integrin $\alpha 2\beta 1$ in experimental and developmental angiogenesis. *Am J Pathol* **175**(3):1338–1347.
- Sariisik, E., Docheva, D., Padula, D., Popov, C., Opfer, J., Schieker, M., Clausen-Schaumann, H. & Benoit, M. (2013) Probing the interaction forces of prostate cancer cells with collagen I and bone marrow derived stem cells on the single cell level. *PLoS One* **8**(3):e57706.
- Sceneay, J., Smyth, M.J. & Moller, A. (2013) The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer Metastasis Rev* **32**(3-4):449–464.
- Schewe, D.M. & Aguirre-Ghiso, J.A. (2008) ATF6 α -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30):10519–10524.
- Schmidt, A., Langbein, L., Rode, M., Prätzel, S., Zimbelmann, R. & Franke, W.W. (1997) Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell Tissue Res* **290**(3):481–499.
- Schooley, A.M., Andrews, N.M., Zhao, H. & Addison, C.L. (2012) $\beta 1$ integrin is required for anchorage-independent growth and invasion of tumor cells in a context dependent manner. *Cancer Lett* **316**(2):157–167.
- Schornack, P.A. & Gillies, R.J. (2003) Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia* **5**(2):135–145.
- Schumacher, D., Strilic, B., Sivaraj, K., Wettschureck, N. & Offermanns, S. (2013) Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell* **24**(1):130–137.
- Schwitala, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Goktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., Rupec, R.A., Gerhard, M., Schmid, R., Barker, N., Clevers, H., Lang, R., Neumann, J., Kirchner, T., Taketo, M.M., van den Brink, G.R., Sansom, O.J., Arkan, M.C. & Greten, F.R. (2013) Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* **152**(1-2):25–38.
- Seguin, L., Kato, S., Franovic, A., Camargo, M.F., Lesperance, J., Elliott, K.C., Yebra, M., Mielgo, A., Lowy, A.M., Husain, H., Cascone, T., Diao, L., Wang, J., Wistuba, I.I., Heymach, J.V., Lippman, S.M., Desgrosellier, J.S., Anand, S., Weis, S.M. & Cheresch, D.A. (2014) An integrin $\beta 3$ -KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nat Cell Biol* **16**(5):457–468.
- Seguin, L., Desgrosellier, J.S., Weis, S.M. & Cheresch, D.A. (2015) Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends Cell Biol* **25**(4):234–240.
- Senger, D.R., Claffey, K.P., Benes, J.E., Perruzzi, C.A., Sergiou, A.P. & Detmar, M. (1997) Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: Regulation through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25):13612–13617.
- Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Streit, M., Koteliansky, V.E., de Fougères, A.R. & Detmar, M. (2002) The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins provide critical support for vascular endothelial growth

- factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* **160**(1):195–204.
- Sengle, G., Kobbe, B., Mörgelin, M., Paulsson, M. & Wagener, R. (2003) Identification and characterization of AMACO, a new member of the von Willebrand factor A-like domain protein superfamily with a regulated expression in the kidney. *J Biol Chem* **278**(50):50240–50249.
- Sethi, T., Rintoul, R.C., Moore, S.M., MacKinnon, A.C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E.R., Dransfield, I., Donnelly, S.C., Strieter, R. & Haslett, C. (1999) Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med* **5**(6):662–668.
- Shibue, T. & Weinberg, R.A. (2009) Integrin β_1 -focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(25):10290–10295.
- Shield, K., Riley, C., Quinn, M.A., Rice, G.E., Ackland, M.L. & Ahmed, N. (2007) Alpha2beta1 integrin affects metastatic potential of ovarian carcinoma spheroids by supporting disaggregation and proteolysis. *J Carcinog* **6**:11.
- Shin, D.H., Lee, H., Min, H., Choi, S.P., Lee, M., Lee, J.W., Johnson, F.M., Mehta, K., Lippman, S.M., Glisson, B.S. & Lee, H. (2013) Combating resistance to anti-IGFR antibody by targeting the integrin β_3 -Src pathway. *J Natl Cancer Inst* **105**(20):1558-70.
- Shintani, Y., Hollingsworth, M.A., Wheelock, M.J. & Johnson, K.R. (2006) Collagen I promotes metastasis in pancreatic cancer by activating c-Jun NH₂-terminal kinase 1 and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res* **66**(24):11745–11753.
- Shiozawa, Y., Pedersen, E.A., Havens, A.M., Jung, Y., Mishra, A., Joseph, J., Kim, J.K., Patel, L.R., Ying, C., Ziegler, A.M., Pienta, M.J., Song, J., Wang, J., Loberg, R.D., Krebsbach, P.H., Pienta, K.J. & Taichman, R.S. (2011) Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *J Clin Invest* **121**(4):1298–1312.
- Shiozawa, Y., Berry, J.E., Eber, M.R., Jung, Y., Yumoto, K., Cackowski, F.C., Yoon, H.J., Parsana, P., Mehra, R., Wang, J., McGee, S., Lee, E., Nagrath, S., Pienta, K.J. & Taichman, R.S. (2016) The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer. *Oncotarget* **7**(27):41217–41232.
- Shmelkov, S.V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D.K., Chadburn, A., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., D'Angelica, M., Kemeny, N., Lyden, D. & Rafii, S. (2008) CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133⁺ and CD133⁻ metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* **118**(6):2111–2120.
- Shur, I., Socher, R., Hameiri, M., Fried, A. & Benayahu, D. (2006) Molecular and cellular characterization of SEL-OB/SVEP1 in osteogenic cells in vivo and in vitro. *J Cell Physiol* **206**(2):420-427.
- Shur, I., Zemer-Tov, E., Socher, R. & Benayahu, D. (2007) SVEP1 expression is regulated in estrogen-dependent manner. *J Cell Physiol* **210**(3):732–739.
- Sims, N.A. & Martin, T.J. (2014) Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* **3**:481.

- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. & Dirks, P.B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**(7015):396–401.
- Singh, A. & Settleman, J. (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**(34):4741–4751.
- Sitohy, B., Nagy, J.A. & Dvorak, H.F. (2012) Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: Reassessing the target. *Cancer Res* **72**(8):1909–1914.
- Smallbone, K., Gavaghan, D.J., Gatenby, R.A. & Maini, P.K. (2005) The role of acidity in solid tumour growth and invasion. *J Theor Biol* **235**(4):476–484.
- Sosa, M.S., Bragado, P. & Aguirre-Ghiso, J.A. (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* **14**(9):611–622.
- Soucy, P.A., Werbin, J., Heinz, W., Hoh, J.H. & Romer, L.H. (2011) Microelastic properties of lung cell-derived extracellular matrix. *Acta Biomater* **7**(1):96–105.
- Spiegel, A., Brooks, M.W., Houshyar, S., Reinhardt, F., Ardolino, M., Fessler, E., Chen, M.B., Krall, J.A., DeCock, J., Zervantonakis, I.K., Iannello, A., Iwamoto, Y., Cortez-Retamozo, V., Kamm, R.D., Pittet, M.J., Raulet, D.H. & Weinberg, R.A. (2016) Neutrophils suppress intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. *Cancer Discov* **6**(6):630–649.
- Stokes, A., Joutsa, J., Ala-aho, R., Pitchers, M., Pennington, C.J., Martin, C., Premachandra, D.J., Okada, Y., Peltonen, J., Grénman, R., James, H.A., Edwards, D.R. & Kähäri, V. (2010) Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **16**(7):2022–2035.
- Strauss, D.C. & Thomas, J.M. (2010) Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncol* **11**(8):790–796.
- Strilic, B., Yang, L., Albarrán-Juárez, J., Wachsmuth, L., Han, K., Müller, U.C., Pasparakis, M. & Offermanns, S. (2016) Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* **536**(7615):215–218.
- Szablewski, L. (2013) Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta* **1835**(2):164–169.
- Tamura, K., Furihata, M., Tsunoda, T., Ashida, S., Takata, R., Obara, W., Yoshioka, H., Daigo, Y., Nasu, Y., Kumon, H., Konaka, H., Namiki, M., Tozawa, K., Kohri, K., Tanji, N., Yokoyama, M., Shimazui, T., Akaza, H., Mizutani, Y., Miki, T., Fujioka, T., Shuin, T., Nakamura, Y. & Nakagawa, H. (2007) Molecular features of hormone-refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles. *Cancer Res* **67**(11):5117–5125.
- Tanjore, H., Zeisberg, E.M., Gerami-Naini, B. & Kalluri, R. (2008) β_1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev Dyn* **237**(1):75–82.
- Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**(6):442–454.
- Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., Apuzzo, T., Sperduti, I., Volpe, S., Cocorullo, G., Gulotta, G., Dieli, F., De Maria, R. & Stassi, G. (2014)

- CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* **14**(3):342–356.
- Tran, T., Barlow, B., O'Rear, L., Jarvis, B., Li, Z., Dickeson, K., Dupont, W. & Zutter, M. (2011) Loss of the alpha2beta1 integrin alters human papilloma virus-induced squamous carcinoma progression in vivo and in vitro. *PLoS One* **6**(10):e26858.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H. & Weissman, I.L. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26):14720–14725.
- Uchiyama, Y., Sakaguchi, M., Terabayashi, T., Inenaga, T., Inoue, S., Kobayashi, C., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakagata, N., Sato, Y., Sekiguchi, K., Miki, H., Araki, E., Fujimura, S., Tanaka, S.S. & Nishinakamura, R. (2010) Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proc Natl Acad Sci* **107**(20):9240–9245.
- Ugolkov, A.V., Eisengart, L.J., Luan, C. & Yang, X.J. (2011) Expression analysis of putative stem cell markers in human benign and malignant prostate. *Prostate* **71**(1):18–25.
- van der Bij, G.J., Oosterling, S.J., Bögels, M., Bhoelan, F., Fluitsma, D.M., Beelen, R.H.J., Meijer, S. & van Egmond, M. (2008) Blocking α_2 integrins on rat CC531s colon carcinoma cells prevents operation-induced augmentation of liver metastases outgrowth. *Hepatology* **47**(2):532–43.
- van Duinen, C.M., van den Broek, L.J., Vermeer, B.J., Fleuren, G.J. & Bruijn, J.A. (1994) The distribution of cellular adhesion molecules in pigmented skin lesions. *Cancer* **73**(8):2131–2139.
- van Slambrouck, S., Jenkins, A.R., Romero, A.E. & Steelant, W.F. (2009) Reorganization of the integrin α_2 subunit controls cell adhesion and cancer cell invasion in prostate cancer. *Int J Oncol* **34**(6):1717–1726.
- Wanami, L.S., Chen, H., Peiró, S., García de Herreros, A. & Bachelder, R.E. (2008) Vascular endothelial growth factor-A stimulates Snail expression in breast tumor cells: Implications for tumor progression. *Exp Cell Res* **314**(13):2448-53.
- Wang, N., Docherty, F., Brown, H.K., Reeves, K., Fowles, A., Lawson, M., Ottewell, P.D., Holen, I., Croucher, P.I. & Eaton, C.L. (2015a) Mitotic quiescence, but not unique "stemness," marks the phenotype of bone metastasis-initiating cells in prostate cancer. *FASEB J* **29**(8):3141–3150.
- Wang, J., Cui, F., Wang, X., Xue, Y., Chen, J., Yu, Y., Lu, H., Zhang, M., Tang, H. & Peng, Z. (2015b) Elevated kinesin family member 26B is a prognostic biomarker and a potential therapeutic target for colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **34**(1):13.
- Weckermann, D., Polzer, B., Ragg, T., Blana, A., Schlimok, G., Arnholdt, H., Bertz, S., Harzmann, R. & Klein, C.A. (2009) Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* **27**(10):1549–1556.
- Wei, C., Guomin, W., Yujun, L. & Ruizhe, Q. (2007) Cancer stem-like cells in human prostate carcinoma cells DU145: the seeds of the cell line?. *Cancer Biol Ther* **6**(5):763–768.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**(3):323–330.
- White, D.J., Puranen, S., Johnson, M.S. & Heino, J. (2004) The collagen receptor subfamily of the integrins. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(8):1405–1410.

- Vihinen, P., Riikonen, T., Laine, A. & Heino, J. (1996) Integrin alpha2beta1 in tumorigenic human osteosarcoma cell lines regulates cell adhesion, migration, and invasion by interaction with type I collagen. *Cell Growth Differ* **7**(4):439–447.
- Visvader, J.E. & Lindeman, G.J. (2012) Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* **10**(6):717–728.
- Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H. & Ristimäki, A. (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* **58**(22):4997–5001.
- Woodall, B.P., Nyström, A., Iozzo, R.A., Eble, J.A., Niland, S., Krieg, T., Eckes, B., Pozzi, A. & Iozzo, R.V. (2008) Integrin $\alpha_2\beta_1$ is the required receptor for endorepellin angiostatic activity. *J Biol Chem* **283**(4):2335–2343.
- Wu, X., Northcott, P.A., Dubuc, A., Dupuy, A.J., Shih, D.J., Witt, H., Croul, S., Bouffet, E., Fults, D.W., Eberhart, C.G., Garzia, L., Van Meter, T., Zagzag, D., Jabado, N., Schwartzentruber, J., Majewski, J., Scheetz, T.E., Pfister, S.M., Korshunov, A., Li, X.N., Scherer, S.W., Cho, Y.J., Akagi, K., MacDonald, T.J., Koster, J., McCabe, M.G., Sarver, A.L., Collins, V.P., Weiss, W.A., Largaespada, D.A., Collier, L.S. & Taylor, M.D. (2012) Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature* **482**(7386):529–533.
- Vuoristo, M., Vihinen, P., Vlaykova, T., Nylund, C., Heino, J. & Pyrhonen, S. (2007) Increased gene expression levels of collagen receptor integrins are associated with decreased survival parameters in patients with advanced melanoma. *Melanoma Res* **17**(4):215–223.
- Xia, H., Nho, R., Kleidon, J., Kahm, J. & Henke, C.A. (2008) Polymerized collagen inhibits fibroblast proliferation via a mechanism involving the formation of a β_1 integrin-protein phosphatase 2A-tuberous sclerosis complex 2 complex that suppresses S6K1 activity. *J Biol Chem* **283**(29):20350–20360.
- Xin, B., Platzer, P., Fink, S., Reese, L., Nosrati, A., Willson, J.K.V., Wilson, K. & Markowitz, S. (2005) Colon cancer secreted protein-2 (CCSP-2), a novel candidate serological marker of colon neoplasia. *Oncogene* **24**(4):724–731.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. & Iacobuzio-Donahue, C.A. (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**(7319):1114–1117.
- Yamaguchi, K., Ura, H., Yasoshima, T., Shishido, T., Denno, R. & Hirata, K. (2000) Establishment and characterization of a human gastric carcinoma cell line that is highly metastatic to lymph nodes. *J Exp Clin Cancer Res* **19**(1):113–120.
- Yamamoto, H., Masters, J.R., Dasgupta, P., Chandra, A., Popert, R., Freeman, A. & Ahmed, A. (2012) CD49f is an efficient marker of monolayer- and spheroid colony-forming cells of the benign and malignant human prostate. *PLoS One* **7**(10):e46979.
- Yan, N., Zhang, S., Yang, Y., Cheng, L., Li, C., Dai, L., Zhang, X., Fan, P., Tian, H., Wang, R., Chen, X., Su, X., Li, Y., Zhang, J., Du, T., Wei, Y. & Deng, H. (2012) Therapeutic upregulation of Class A scavenger receptor member 5 inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Sci* **103**(9):1631–1639.
- Yang, A.D., Camp, E.R., Fan, F., Shen, L., Gray, M.J., Liu, W., Somcio, R., Bauer, T.W., Wu, Y., Hicklin, D.J. & Ellis, L.M. (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation

mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* **66**(1):46–51.

Yang, J. & Weinberg, R.A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* **14**(6):818–829.

Yang, C., Ströbel, P., Marx, A. & Hofmann, I. (2013) Plakophilin-associated RNA-binding proteins in prostate cancer and their implications in tumor progression and metastasis. *Virchows Arch* **463**(3):379–390.

Ye, C.J., Liu, G., Bremer, S.W. & Heng, H.H.Q. (2007) The dynamics of cancer chromosomes and genomes. *Cytogenet Genome Res* **118**(2-4):237–246.

Ye, X., Tam, W.L., Shibue, T., Kaygusuz, Y., Reinhardt, F., Ng Eaton, E. & Weinberg, R.A. (2015) Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* **525**(7568):256–260.

Yin, P., Ono, M., Moravek, M.B., Coon JS, 5., Navarro, A., Monsivais, D., Dyson, M.T., Druschitz, S.A., Malpani, S.S., Serna, V.A., Qiang, W., Chakravarti, D., Kim, J.J. & Bulun, S.E. (2015) Human uterine leiomyoma stem/progenitor cells expressing CD34 and CD49b initiate tumors in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* **100**(4):E601–606.

Yoshimura, K., Meckel, K.F., Laird, L.S., Chia, C.Y., Park, J.J., Olino, K.L., Tsunedomi, R., Harada, T., Iizuka, N., Hazama, S., Kato, Y., Keller, J.W., Thompson, J.M., Chang, F., Romer, L.H., Jain, A., Iacobuzio-Donahue, C., Oka, M., Pardoll, D.M. & Schlick, R.D. (2009) Integrin alpha2 mediates selective metastasis to the liver. *Cancer Res* **69**(18):7320–7328.

Yu, M., Bardia, A., Aceto, N., Bersani, F., Madden, M.W., Donaldson, M.C., Desai, R., Zhu, H., Comaills, V., Zheng, Z., Wittner, B.S., Stojanov, P., Brachtel, E., Sgroi, D., Kapur, R., Shioda, T., Ting, D.T., Ramaswamy, S., Getz, G., Iafrate, A.J., Benes, C., Toner, M., Maheswaran, S. & Haber, D.A. (2014) Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* **345**(6193):216–220.

Yuan, T.L. & Cantley, L.C. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**(41):5497–510.

Zheng, J. (2012) Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett* **4**(6):1151–1157.

Ziaee, S. & Chung, L.W. (2014) Induction of integrin α_2 in a highly bone metastatic human prostate cancer cell line: roles of RANKL and AR under three-dimensional suspension culture. *Mol Cancer* **13**:208

Zutter, M.M. & Santoro, S.A. (1990) Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell-surface collagen receptor. *Am J Pathol* **137**(1):113–120.