

# Fibroblastien vaikutus eturauhassyöpäsolujen migraatioon ja invaasioon 3D-kasvatuksissa

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Biokemia

Maaliskuu 2019

Noora Virtanen

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

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

VIRTANEN, NOORA: Fibroblastien vaikutus eturauhassyöpäsolujen migraatioon ja invaasioon 3D-kasvatuksissa

Pro gradu -tutkielma, 63 s., 3 liites.

Biokemia

Maaliskuu 2019

---

Eturauhassyövän kantasolut ovat kantasolujen kaltaisia erilaistumattomia syöpäsoluja. Nämä solut ilmentävät paljon  $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä, joka välittää solun sitoutumista soluväliaineeseen erityisesti kollageeni I:n kautta ja joka on tärkeä luumetastaasissa. Soluväliainetta kudoksissa tuottavat muun muassa fibroblastit. Syöpäkasvaimissa esiintyvät fibroblastit vaikuttavat kasvaimen kasvuun, tuottavat soluväliaineen proteiineja, kuten kollageeni I:tä, ja vaikuttavat näin myös syöpäsolujen liikkumiseen.

Erikoistyössä tarkasteltiin fibroblastien vaikutusta syöpäsolujen invaasioon ja migraatioon 3D-kasvatuksissa eli sferoideissa. Kokeissa käytettiin kahta eri eturauhassyöpäsolulinjaa, joita olivat DU145 (kohtalaisesti metastoiva solulinja) ja PC3 (korkeasti metastoiva solulinja). Molemmat linjat ilmentävät lähes yhtä paljon  $\alpha_2$ -integriiniä. Fibroblasteina käytettiin ihmisen eturauhasen syöpäkasvaimesta eristettyjä primaarifibroblasteja. Solujen invaasiota ja migraatiota tutkittiin kollageeni I:n avulla. Fibroblastien ja syöpäsolujen sijoittumista sferoideissa toisiinsa nähden tarkasteltiin fluoresoivien CellTracker-värien avulla. Massaspektrometrialla ja Western Blot -menetelmällä selvitettiin fibroblastien vaikutusta sferoidien mikroympäristöön.

Invaasion huomattiin lisääntyvän, kun DU145-soluja kasvatettiin yhdessä fibroblastien kanssa. Migraatiokokeissa eroa ei havaittu. PC3-solut eivät muodostaneet sferoideja ilman fibroblasteja, joten fibroblastien vaikutusta PC3-solujen invaasioon ja migraatioon ei voitu määrittää. Verrattaessa yhteisviljelmiä keskenään voitiin havaita, että DU145+fibroblastit -sferoidien solut invasoivat ja migroivat yllättäen enemmän kuin PC3+fibroblastit -sferoidien solut. Lisäksi fibroblastien havaittiin sijoittuvan yhteisviljelmissä eri tavalla. DU145-solujen kanssa fibroblastit sijoittuivat sferoidin reuna-alueille ja PC3-solujen kanssa sferoidin keskiosaan. Massaspektrometritulokset osoittivat useiden proteiinien, esimerkiksi kollageeni XVIII:n fragmentin endostatiinin, ilmentyvän enemmän yhteisviljelmissä. Erot endostatiinin ilmentymisessä osoitettiin myös Western Blot -menetelmällä.

Asiasanat:  $\alpha_2$ -integriini, kollageeni I, invaasio, migraatio, eturauhassyöpä

Ensin haluan kiittää professori Jyrki Heinoa, joka antoi minulle mahdollisuuden suorittaa erikoistyöni Integriini-ryhmässä mielenkiintoisen projektin parissa. Lisäksi haluaisin osoittaa suuret kiitokset ohjaajilleni Marjaana Ojalillille sekä Elina Siljamäelle kaikesta ohjauksesta sekä henkisestä tuesta projektin aikana, sekä Pekka Rapulle avusta sferoidianalyysien ja massaspektrometrian kanssa. Iso kiitos myös kaikille muille Integriini-ryhmän nykyisille ja entisille jäsenille, sekä muille samaan aikaan labrassa työskennelleille hyvistä neuvoista ja vertaistuesta.

# SISÄLTÖ

LYHENTEET .....	4
OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS .....	8
JOHDANTO .....	8
1. SYÖVÄN TUNNUSMERKIT JA MIKROYMPÄRISTÖ.....	9
1.1 Syöpäsolut ovat omavaraisia kasvutekijöiden suhteen ja välttelevät kasvua hidastavia signaaleja .....	9
1.2 Syöpäsolut välttävät apoptoosin ja voivat jakaantua loputtomasti .....	9
1.3 Syöpäsolut kykenevät indusoimaan angiogeneesiin .....	10
1.4 Syöpäsolut pystyvät aktivoimaan invaasion ja metastaasin .....	11
1.5 Syöpäsolujen energiametaboli suosii glykolyysiä .....	11
1.6 Syöpäsolun genomi on epävaka ja käy läpi useita mutaatioita .....	12
1.7 Syöpäsolut piiloutuvat immuunipuolustukselta .....	12
1.8 Kasvain edistää tulehdusta .....	12
2. SOLUVÄLIAINE JA SYÖPÄ.....	13
2.1 Soluväliaineen komponentit ja toiminta.....	13
2.2 Syöpä muokkaa soluväliainetta .....	15
2.3 Tyvikalvo metastaasissa .....	16
2.4 Fokaaliadheesio .....	18
2.5 Epiteeli-mesenkyymi -transitio .....	18
3. STROOMASOLUT SYÖVÄSSÄ .....	19
3.1 Aktivoidut fibroblastit muokkaavat soluväliainetta ja edistävät kasvaimen kehittymistä	20
3.2 Solujen migraatio ja invaasio .....	22
3.3 Aktivoidut fibroblastit edistävät migraatiota ja invaasiota.....	22
3.4 Soluväliaine metastaasissa.....	23
3.5 3D-kasvatukset vs. 2D-kasvatukset syöpätutkimuksessa .....	24
4. INTEGRIINIT .....	25
4.1 Integriinien rakenne ja toiminta .....	25
4.2 Integriinien aktivoituminen .....	25
4.3 Integriinin signalointi .....	26
4.4 Integriinit syövässä.....	26
4.5 $\alpha 2\beta 1$ -integriini angiogeneesissä .....	27
4.6 $\alpha 2\beta 1$ -integriini metastaasissa .....	28

5. ENDOSTATIINI .....	29
5.1 Endostatiinin rakenne .....	29
5.2 Endostatiini angiogeenissä .....	31
5.3 Endostatiini migraatiossa ja metastaasissa.....	32
5.4 Endostatiini ja integriinit.....	33
6. ETURAUHASSYÖPÄ.....	34
6.1 $\alpha_2\beta_1$ -integroini eturauhassyövän kantasoluissa .....	34
6.2 Eturauhassyövän tutkiminen 3D-kasvatuksissa .....	35
6.3 Aktivoidut fibroblastit eturauhassyövässä.....	36
6.4 Kasvaimen mikroympäristö vaikuttaa metastaasiin eturauhassyövässä.....	36
6.5 Eturauhassyövän diagnosointi .....	37
6.6 Eturauhassyövän hoito .....	37
OSA II: KOKEELLINEN OSUUS .....	38
JOHDANTO .....	38
7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	39
7.1 Solulinjat .....	39
7.1.1 Solulinjojen ylläpito.....	39
7.1.2 $\alpha_2$ -integroinin ja CD44:n ilmentyminen tarkastettiin virtausytometrillä .....	39
7.1.3 Mikroskooppinäytteiden valmistus fibroblasteista .....	40
7.2 Migraatio ja invaasio .....	41
7.2.1 Solujen värjäys .....	41
7.2.2 Sferoidien valmistus.....	41
7.2.3 Kuoppalevykokeet.....	41
7.3 Mikroskooppinäytteiden valmistus sferoideista.....	42
7.4 Massaspektrometrinäytteiden valmistus .....	43
7.4.1 Sferoidien valmistus ja hypotoninen hajoitus.....	43
7.4.2 Peptidien valmistelu.....	43
7.4.3 Suolan poisto näytteistä .....	44
7.5 Kollageeni XVIII:n ilmeneminen tarkastettiin Western Blot-menetelmällä.....	44
8 TULOKSET .....	46
8.1 Syöpäkasvaimen fibroblastit ilmentävät $\alpha$ SMA:ta.....	46
8.2 PC3-solut ilmentävät DU145-soluja enemmän $\alpha_2$ -integroiniä .....	47
8.3 Aktivoidut fibroblastit lisäsivät DU145-solujen liikkumista kollageeni I:ssä .....	49

8.4 Fibroblastien sijoittuminen sferoideissa erosi, kun niitä kasvatettiin yhdessä eri syöpäsolujen kanssa.....	53
8.5 Endostatiinin ilmentäminen oli kohonnut yhteisviljelmäsferoideissa.....	55
9 TULOSTEN TARKASTELU.....	58
9.1 Kudosnäytteistä eristetyt solut olivat aktivoituja fibroblasteja.....	58
9.2 Fibroblastit lisäsivät DU145-solujen invaasiota .....	58
9.3 Solujen lokalisaatio yhteisviljelmäsferoideissa poikkesi kahden käytetyn syöpäsolulinjan välillä .....	59
9.4 DU145+fibroblasti-sferoideissa endostatiinin ilmentäminen oli kohonnut verrattuna yksöisviljelmiin .....	59
10 YHTEENVETO JA POHDINTAA.....	61
LIITTEET .....	64
LÄHTEET .....	68

## LYHENTEET

$\alpha$ SMA	alpha sileälihas aktiini, <i>engl.</i> $\alpha$ smooth muscle actin
AA	askorbiinihappo
Abl	Abelson-hiiren leukemia virusonkogeenihomologi 1 <i>engl.</i> Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AD-MSC	rasvakudosperäinen mesenkymaalinen kantasolu, <i>engl.</i> adipose tissue-derived mesenchymal stem cell
ALT	vaihtoehtoinen telomeerien pidentäminen, <i>engl.</i> alternative lengthning
AN	astetonitriili
APS	ammoniumpersulfaatti
AR	androgeenireseptori
ATPaasi	adenosiinitrifosfataasi, <i>engl.</i> adenosinetriphosphatase
BSA	naudan seerumin albumiini, <i>engl.</i> bovine serum albumin
CCL	C-C -motiivi -luokkaan kuuluvan kemokiinin ligandi <i>engl.</i> chemokine (C-C motif) ligand
CXCL	C-X-C -motiivi -luokkaan kuuluvan kemokiinin ligandi <i>engl.</i> chemokine (C-X-C motif) ligand
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylyli-indoli, <i>engl.</i> 4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DTT	ditiotreitoli, <i>engl.</i> dithiothreitoli
DU145(KO- $\alpha_2$ )	DU145-solut, joista on poistettu $\alpha_2$ -integroini geeni



DU145( $\alpha_2+$ )	villityypin DU145-solut, jotka ilmentävät $\alpha_2\beta_1$ -integriiniä
EDA	lisädomeeni a, <i>engl.</i> extra domain a
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo, <i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermaalinen kasvutekijä, <i>engl.</i> epidermal growth factor
EMT	epiteeli-mesenkyyymi -transitio
FA	fokaaliadheesio
FAK	fokaaliadheesio kinaasi
FCS	vasikan sikiön seerumi, <i>engl.</i> fetal calf serum
FGF	fibroblastikasvutekijä, <i>engl.</i> fibroblast growth factor
FITC	fluoresiini-5-isotiosyanaatti, <i>engl.</i> fluorescein isothiocyanate
GAG	glykosaminoglykaani
GR	glukokortikoidireseptori
HU	hydroksiurea
IL	interleukiinin
ILK	integriiniin liittynyt kinaasi, <i>engl.</i> integrin-linked kinase
KSFM	seerumiton keratinosyyttikasvatusliuos, <i>engl.</i> keratinocyte serum free -medium
LLC	Lewisin keuhkokarsinooma, <i>engl.</i> Lewis lung carcinoma
MAP	mitogeenin aktivoima proteiini
MMP	metalloproteinaasi, <i>engl.</i> matrix metalloproteinase

PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos, <i>engl.</i> phosphate buffered saline
PBST	0,1 % Triton-X-100:aa sisältävä PBS
PDL-1	ohjelmoitu kuolema ligandi-1, <i>engl.</i> programmed death ligand-1
PFA	paraformaldehydi
PDGF	verihituleesta peräisin oleva kasvutekijä, <i>engl.</i> platelet-derived growth factor
PLGF	Istukan kasvutekijä, <i>engl.</i> placental growth factor
PSA	eturauhaselle spesifinen antigeeni, <i>engl.</i> prostate specific antigen
RGD	arginiinista, glysiinistä ja aspartaatista muodostuva motiivi
RT	huoneenlämpö, <i>engl.</i> room temperature
SDF1	stroomasolu-tekijä 1 <i>engl.</i> stromal cell-derived factor 1
SDS	natriumdodekyylisulfaatti, <i>engl.</i> sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi, <i>engl.</i> SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SPARC	eritetty hapan ja kysteiini -rikas proteiini, <i>engl.</i> secreted protein acidic and rich in cystein
TBST	0,05 % Tween-20 sisältävä Tris-puskuroitu suolaliuos <i>engl.</i> 0,05 % Tween-20 in Tris-buffered saline
TEMED	tetrametyyli-etyleenidiamiini, <i>engl.</i> tetramethylethylenediamidne
TFA	trifluorietikkahappoa <i>engl.</i> trifluoroacetic acid

TGF- $\beta$	transformoiva kasvutekijä $\beta$ , <i>engl.</i> transforming growth factor $\beta$
UCA1	uroteelisyöpään liittyvä 1, <i>engl.</i> urothelial cancer associated 1
VEGF	verisuonen endoteeli kasvutekijä, <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor
VEGFR	verisuonten endoteelisolujen kasvutekijäreseptori, <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor receptor

# OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS

## JOHDANTO

Syövän kehittyminen on monimutkainen prosessi, jossa solut ja solujen mikroympäristö kehittyvät ja muokkaantuvat yhdessä taudin edetessä. Kasvain käsittää syöpäsolujen lisäksi suuren määrän stroomasoluja sekä soluväliaineen ja siihen eritetyt signaalimolekyylit, kuten kasvutekijät. Yhdessä nämä kaikki ovat luomassa syövän mikroympäristöä. Etäpesäkkeiden muodostumisessa mikroympäristöllä on suuri rooli, sillä aluksi sen on mahdollistettava solujen liikkuminen alkuperäisessä kudoksessa ja sieltä pois. Lisäksi, jotta etäpesäke voisi muodostua, mikroympäristön on oltava sekundaarikudoksessa syöpäsolulle sopiva, jotta syöpäsolu pystyisi kiinnittymään siihen. Vain harva alkuperäisestä kasvaimesta liikkeelle lähtenyt syöpäsolu pystyy aloittamaan uuden kasvaimen toisessa kudoksessa. (Lorusso G ja Ruegg C 2008)

Eturauhassyöpä on toiseksi yleisin syöpä maailmassa ja yleisin syöpä miehillä, ja se muodostaa usein etäpesäkkeitä luumun (Park SH ja muut 2018). Jotta eturauhassyöpäsolu voisi kiinnittyä, kasvaa ja jakautua luukudoksessa, sen on ilmentävä pinnallaan  $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä (Hall CL ja muut 2006). Integroinit ovat solun pinnan reseptoriproteiineja, jotka välittävät solun solutukirangan sitoutumista soluväliaineen komponentteihin.  $\alpha 2\beta 1$ -integroini on kollageeni I:n reseptori ja sitä pidetään merkkiproteiinina eturauhassyövän kantasoluille (Collins AT 2001).

Syöpätutkimuksessa on pitkään käytetty perinteistä 2D-maljakasvatusta kokeita suoritettaessa, mutta koska tämä kasvatusmalli ei luo soluille samoja olosuhteita kuin missä ne kudoksessa ollessaan ovat, sen tilalla on alettu käyttämään 3D-kasvatusmallia. 3D-kasvatuksissa solut ovat enemmän kosketuksissa toistensa ja tuottamansa soluväliaineen kanssa kuin 2D-kasvatuksissa, ja siksi sen uskotaan matkivan paremmin tilannetta kudoksissa. Syöpätutkimuksessa 3D-kasvatuksilla saatujen tulosten uskotaan antavan todenmukaisemman kuvan siitä, mitä syöpäkasvaimessa oikeasti tapahtuu kuin 2D-kasvatusten (Fennema E ja muut 2013). Erikoistyöni tarkoituksena oli tutkia eturauhassyöpäsoluilla, miten fibroblastien lisääminen 3D-kasvatukseen muuttaa solujen käyttäytymistä eri olosuhteissa. Lisäksi 3D-kasvatuksista tarkasteltiin fibroblastien vaikutusta solujen mikroympäristön.

# 1. SYÖVÄN TUNNUSMERKIT JA MIKROYMPÄRISTÖ

Vuonna 2000 Hanahan D ja Weinberg RA julkaisivat artikkelin syövän tunnusmerkeistä. He esittivät, että syöpä voitaisiin tunnistaa kuuden syöpäsolulle ominaisen piirteen perusteella: omavaraisuus kasvutekijöiden suhteen, kasvua hidastavien signaaleiden ja apoptoosin välttely, kyky indusoida angiogeneesiä, invaasion ja metastaasin aktivoiminen sekä kyky jakaantua loputtomasti. Myöhemmin he lisäsivät tunnusmerkkeihin muuttuneen energiametabolian, immuunipuolustukselta pakenemisen, kasvaimen edistämisen tulehdusreaktion ja genomin epävakaisuuden ja mutaatioiden kertymisen. Lisäksi he painottivat syövän mikroympäristön roolia syövän kehityksessä. (Hanahan D ja Weinberg R A 2000; Hanahan D ja Weinberg R A 2011)

## 1.1 Syöpäsolut ovat omavaraisia kasvutekijöiden suhteen ja välttelevät kasvua hidastavia signaaleja

Syöpäsolut pystyvät lisäämään kasvuaan ja jakaantumistaan tuottamalla itse tarvitsemiaan kasvutekijöitä, sekä ilmentämällä kasvua edistäviä reseptoreja pinnallaan. Tavallisesti solut tarvitsevat kasvua edistäviä signaaleja ympäristöstään eli muiden solujen tuottamista kasvutekijöistä ja/tai kiinnittymällä naapurisoluihin ja soluväliaineeseen. Kasvu ja jakaantuminen käynnistyvät vain silloin kun se on kudoksen tasapainon kannalta välttämätöntä. (Hanahan D ja Weinberg R A 2000)

Kudoksen tasapainon ylläpitämiseksi on tärkeää, että solut kasvavat ja jakaantuvat vain tarvittaessa. Solut vastaanottavatkin suuren määrän kasvua inhiboivia signaaleja, joita muut solut ympäristöön tuottavat. Syöpäsolut ovat menettäneet kyvyn vastata näihin inhiboiviin signaaleihin ja ne jatkavat kasvua niistä huolimatta. (Hanahan D ja Weinberg R A 2000)

## 1.2 Syöpäsolut välttävät apoptoosin ja voivat jakaantua loputtomasti

Solut tarkkailevat jatkuvasti hyvinvointiaan, ja ongelman havaittuaan ne käyvät läpi ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin. Apoptoosin voi laukaista myös jokin solun ulkopuolinen signaali, kuten solun irtoaminen ympäristöstään. Normaalit solut käyvät läpi apoptoosin, kun ne havaitsevat sen tarpeelliseksi, mutta syöpäsolut ovat omaksuneet kyvyn välttää apoptoosin indusoivia signaaleja. (Hanahan D ja Weinberg R A 2000) Esimerkki tilanteesta, jossa normaali solu kävisi läpi ohjelmoidun solukuoleman,

on syöpäsolun invaasio tyvikalvon läpi verenkiertoon. Tällöin solu menettää kosketuksen muihin soluihin ja soluväliaineeseen, mikä normaalisti aikaansaisi solun anoikiksen. Anoikis on yksi ohjelmoidun solukuoleman muoto, jonka syöpäsolut kykenevät välttämään esimerkiksi endosomeissa aktiivisesti signaloivien integriinien avulla. (Alanko J ja muut 2015; Paoli P ja muut 2013) Anoikiksen tehtävänä on estää tavallisesti adheesiosta riippuvaisia soluja kasvamasta ja kiinnittymästä sopimattomassa ympäristössä. Solut, jotka ovat omaksuneet kyvyn välttää anoikiksen pystyvät selviytymään ja jakaantumaan paikassa, jossa soluväliaine eroaa solun alkuperäisen paikan soluväliaineesta. (Paoli P ja muut 2013)

Terveellä solulla on tietty määrä jakaantumiskertoja. Tämä johtuu jokaisella jakautumiskerralla lyhenevistä telomeereista. Telomeerit ovat DNA:n päissä olevat eikoodaavat alueet, jotka telomeraasit lisäävät DNA:han. Tavalliset solut eivät ilmennä telomeraaseja erilaistuttuaan, ja telomeerit lyhenevät joka jakautumiskerralla. Soluilla on siis vain tietty määrä jakaantumiskertoja, jonka jälkeen telomeerit eivät enää suojaa DNA:ta ja solu tulkitsee tämän DNA-vaurioksi ja kuolee apoptoosin kautta. Osalla syöpäsoluista telomeraasiaktiivisuus on palautunut ja solut voivat jakaantua loputtomasti. (Hanahan D ja Weinberg R A 2000) Eturauhassyövässä primaarikasvaimen soluissa telomeraasi-aktiivisuuden on todettu olevan vastuussa telomeerien pidentymisestä. Syöpäsolut voivat kuitenkin käyttää myös toista tapaa telomeerien pidentämiseen nimeltään vaihtoehtoinen telomeerien pidentäminen (ALT, *engl.* alternative lengthening), jonka on todettu toimivan samoin kuin homologisen rekombinaation. Eturauhassyövän muodostamisessa etäpesäkkeissä solujen on todettu käyttävän ALT:tä telomeerien pidentymiseen, mutta primaarikasvaimissa samaa ei ole havaittu. (Graham MK ja Meeker A 2017)

### 1.3 Syöpäsolut kykenevät indusoimaan angiogeneesiin

Angiogeneesi on tärkeä prosessi kasvaimen kasvaessa. Uusien verisuonten muodostuminen on välttämätöntä, jotta kasvaimen keskellä olevat solut saisivat tarvitsemansa hapen ja ravintoaineet. Kasvainten keskiosissa olevat solut kärsivät usein hapen puutteesta ja kuolevat nekroosin kautta aiheuttaen tulehdusreaktion kasvaimessa. Paikalle saapuvat tulehdussolut sekä nekroosin kautta kuolleiden solujen vapauttamat säätelytekijät kuten IL-1 $\alpha$  edistävät angiogeneesiä ja kasvaimen kasvu.

(Hanahan D ja Weinberg R A 2000) Tulehdusreaktion lisäksi angiogeneesiä lisäävät geenimutaatiot sekä metabolinen- ja mekaaninen stressi (Li T ja muut 2018)

Angiogeneesin estäminen on osoittautunut helpommaksi kohteeksi syövän hoidossa kuin suoraan syöpäsoluihin kohdistuvat hoitomuodot. Lääkkeet kulkeutuvat verenkierron mukana kasvaimen verisuonistoon, jossa ne estävät uusien verisuonten kasvun inhiboimalla verisuonten endoteelisolujen jakautumista, migraatiota sekä apoptoosia. (Li T ja muut 2018)

#### 1.4 Syöpäsolut pystyvät aktivoimaan invaasion ja metastaasin

Yksi haitallisimmista ja vaarallisimmista syövän tunnusmerkeistä on syöpäsolujen kyky invasoida ympäristöönsä, liikkua verenkierron ja imusuonten välityksellä muualle kehoon ja muodostaa etäpesäkkeitä (Hanahan D ja Weinberg R A 2011). Syöpäsolut pystyvät aktivoimaan ympärillään olevat fibroblastit tuottamaan tiheämpää ja erilaistunutta soluväliainetta, joka edesauttaa solujen invaasiota (Erdogan B ja Webb DJ 2017). Syöpäsolut tuottavat lisäksi paljon soluväliaineen metalloproteinaaseja (MMP, *engl.* matrix metalloproteinase), jotka pilkkovat soluväliaineen proteiineja ja osallistuvat näin soluväliaineen muokkaamiseen. MMP:t osallistuvat soluväliaineen muokkauksen lisäksi koko kasvaimen mikroympäristön muokkaamiseen vapauttamalla makromolekyyleistä solujen toimintaan vaikuttavia fragmentteja. Angiostatiini ja endostatiini ovat esimerkkejä fragmenteista, joita MMP:t soluväliainetta pilkkoessaan vapauttavat. Niiden on todettu toimivan kudoksissa angiogeneesiä inhiboivina tekijöinä ja näin hidastavan kasvaimen kehitystä. (Heljasvaara R ja muut 2005)

#### 1.5 Syöpäsolujen energiametaboli suosii glykolyysiä

Vuonna 2011 Hanahan D ja Weinberg R A tekivät lisäyksiä aikaisemmin julkaisemaansa syövän tunnusmerkistöön. Yksi lisäyksistä oli solujen muuttunut energiametabolia. Kun soluille on saatavilla happea, ne tavallisesti muuttavat glukoosin pyruvaatiksi solun sytosolissa, ja tämän jälkeen pyruvaatti muutetaan hiilidioksidiksi oksidatiivisen fosforylaation kautta solun mitokondriossa. Prosessin aikana solu tuottaa ATP:ta tarpeisiinsa. Anaerobisissa olosuhteissa pyruvaattia ei kuljeteta mitokondrioon vaan solun energian tuotto rajoittuu glykolyysiin ja lopputuotteena syntyy laktaattia. Syöpäsoluilla glukoosin sisäänotto on lisääntynyt, ja ATP:ta tuotetaan pääasiassa

glykolyysin kautta, kuten tavalliset solut tekevät anaerobisissa olosuhteissa. (Hanahan D ja Weinberg R A 2011)

### 1.6 Syöpäsolun genomi on epävakaa ja käy läpi useita mutaatioita

Syöpäsolut käyvät läpi useita mutaatioita ja ne ovat alttiimpia mutageenisille tekijöille, kuin normaalit solut. Lisääntyneet mutaatiot solujen genomissa mahdollistavat sellaisten solujen synnyn, joilla on jokin selviytymistä ja kasvua edistävä ominaisuus. (Negrini S ja muut 2010; Hanahan D ja Weinberg R A 2011) Mutaatioiden lisäksi epigeneettiset muutokset, kuten DNA:n metylointi ja histoni-modifikaatiot, voivat edistää solujen muuttumista syöpäsoluiksi (Berdasco M ja Esteller M 2010).

### 1.7 Syöpäsolut piiloutuvat immuunipuolustukselta

Useat solut käyvät organismin elämän aikana läpi syöpää edistäviä mutaatioita, mutta immuunipuolustus tuhoaa ne ennen kuin syöpä pääsee kehittymään. Immuunipuolustus tarkkailee soluissa ja kudoksissa tapahtuvia muutoksia ja tuhoaa alkuvaiheessa olevat syöpäsolut ja alussa olevat kasvaimet. Syöpä kehittyy soluista, jotka ovat onnistuneet välttelemään tätä valvontaa. (Hanahan D ja Weinberg R A 2011)

Kasvaimen sisältämät lymfosyytit voisivat toimiessaan osallistua syövän estämiseen, mutta kasvaimen mikroympäristössä ne ovat tehottomia. Kasvain pakenee immuunipuolustukselta tekemällä antigeenien prosessoinnin ja esittelykoneiston tehottomiksi, värväämällä immuunipuolustusta vaimentavia soluja kuten säätelijä T-soluja, tuottamalla immuunipuolustusta heikentäviä liukoisia tekijöitä ja lisäämällä lymfosyyttien aktiivisuutta inhiboivien reseptorien ligandien, kuten ohjelmoitu kuolema ligandi-1:n (PDL-1, *engl.* programmed death ligand-1), tuottoa. (Yang Y 2015)

### 1.8 Kasvain edistää tulehdusta

Kaikissa kasvaimissa on todettu olevan käynnissä tulehdusreaktio, jonka on ajateltu olevan organismin tapa puolustautua syöpäsoluja vastaan. Tulehdusreaktio voi tosin toimia myös kasvaimen kehittymistä edistävänä. (Yang Y 2015) Tulehdusreaktio edistää kasvaimen kehittymistä tuomalla solujen mikroympäristöön muun muassa kasvutekijöitä ja selviytymistä edistäviä tekijöitä. Tulehduksen seurauksena solujen mikroympäristö muuttuu mahdollistaen angiogeneesin, invaasion ja etäpesäkkeiden



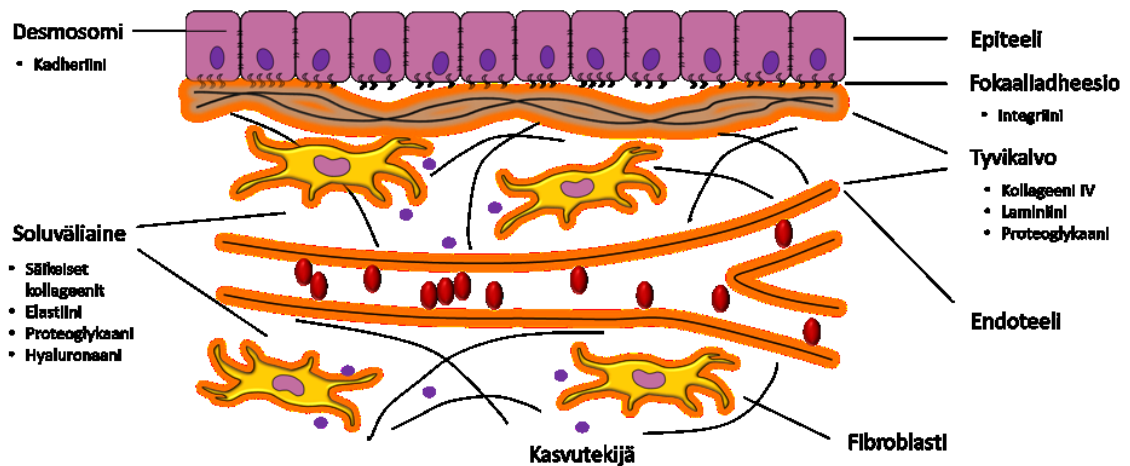
synnyn, sekä epiteeli-mesenkyyymi -transition (EMT) aktivoitumisen ja muiden syövän tunnusmerkkien kehittymisen. (Hanahan D ja Weinberg R A 2011)

Kasvaimessa tapahtuvan tulehdusreaktion syntyyn on ajateltu vaikuttavan kaksi tapahtumaa. Ensinnäkin nopean solujen jakaantumisen seurauksena kasvaimen sisäosien solut muodostavat nekroottisen keskuksen liian vähäisen hapen saannin takia, ja kuolevien solujen vapauttamat vauriosta signaloivat molekyylit houkuttelevat immuunisoluja kasvaimeen. Toiseksi nopeasti jakaantuvat kasvaimen solut lisäävät sytokiinien ja kemokiinien tuotantoa, mikä houkuttelee immuunisoluja kasvaimeen ja johtaa solujen kuolemaan nekroosin kautta. (Diakos C I ja muut 2014)

## 2. SOLUVÄLIAINE JA SYÖPÄ

### 2.1 Soluväliaineen komponentit ja toiminta

Soluväliaine on solujen ympärilleen tuottamien proteiinien ja polysakkaridien muodostama verkko. Sen on todettu koostuvan pääasiassa kollageenisäikeistä, glykosaminoglykaaneista (GAG) sekä glykoproteiineista. Nämä soluväliaineen komponentit kiinnittyvät toisiinsa ja muodostavat kolmiulotteisen rakenteen, johon solut voivat kiinnittyä. Soluväliaineen on todettu välittävän soluille jakautumista, kasvua ja selviytymistä edistäviä signaaleja, sekä säätelevän solujen erilaistumista ja liikkumista. Solut aistivat soluväliaineessa tapahtuvia muutoksia, ja solutukiranka välittää tietoa eteenpäin solun sisässä. (Theocharis A D ja muut 2016) Soluväliaineen perusrakenne on esitetty kuvassa 1.



**Kuva 1** Solväliaine koostuu useista solujen tuottamista makromolekyyleistä ja on jokaisella kudoksella omanlaisensa. Tyvikalvo on pitkälle erilaistunut solväliaineen muoto, johon epiteelisolut ovat kiinnittyneet, ja joka ympäröi kudoksia.

Solväliaine on hyvin dynaaminen ja siihen kuuluvia proteiineja pilkkotaan ja rakennetaan taukoamatta (Bonnans C ja muut 2014). Solut kiinnittyvät solväliaineeseen integriinien välityksellä ja aistivat näin ympäristössään tapahtuvia muutoksia. Lisäksi solujen tuottamat kasvutekijät kuten fibroblastikasvutekijät (FGF, engl. fibroblast growth factor) ja verisuonen endoteelin kasvutekijät (VEGF, engl. vascular endothelial growth factor) sitoutuvat useisiin solväliaineen komponentteihin ja signaloivat soluihin, joko kiinnittyneenä solväliaineeseen tai liukoisina ligandeina. Solväliainetta pilkkovat entsyymit vapauttavat solväliaineesta kasvutekijöiden lisäksi myös muita solujen toimintoja sääteleviä fragmentteja kuten angiogeneesi-inhibiittori endostatiinia. Syövän on todettu muokkaavan solväliaineen järjestäytymistä ja koostumusta niin, että se tukee muun muassa syöpäsolujen selviytymistä sekä proliferaatiota. (Hynes R O, 2009)

## 2.2 Syöpä muokkaa soluväliainetta

Syöpäsolujen muokkaaman soluväliaineen on todettu osallistuvan syövän kehitykseen monin tavoin. Muokattu soluväliaine voi toimia muurina syöpäsolujen ja syöpäsolujen välillä sekä muodostaa solujen migraation mahdollistavia väyliä. Tiiviimmäksi muuttunut soluväliaine voi stimuloida solujen integriinien signalointia tuottamaan lisää soluväliainetta ja se voi edistää solujen invaasiota sekä proliferaatiota. Muuttunut soluväliaine myös aktivoi solujen solu-soluväliaine -reseptoreja ja lisää solujen MMP:en tuottoa sekä EMT-merkkiproteiinien ilmentämistä. (Bonnans C ja muut 2014)

Soluväliainetta pilkkovien MMP:en ilmentymisen on huomattu olevan koholla useissa syövissä ja korreloivan syövän uusiutumisen kanssa. Soluväliaineen pilkkominen vapauttaa kasvutekijöitä sekä esimerkiksi angiogeneesiin vaikuttavia fragmentteja soluväliaineesta. Kollageenisäikeitä yhdistelevän LOX-proteiinin ilmentymisen on todettu olevan koholla useissa syövissä. Sen toiminnan seurauksena soluväliaine muuttuu tiiviimmäksi,  $\beta$ 1-integriinit klusteroituvat solun solukalvolla, PI3K-signalointi ja fokaaliadheesioiden muodostuminen aktivoituu, mikä taas edistää solujen invaasiota ja kasvaimen kehittymistä. (Bonnans C ja muut 2014)

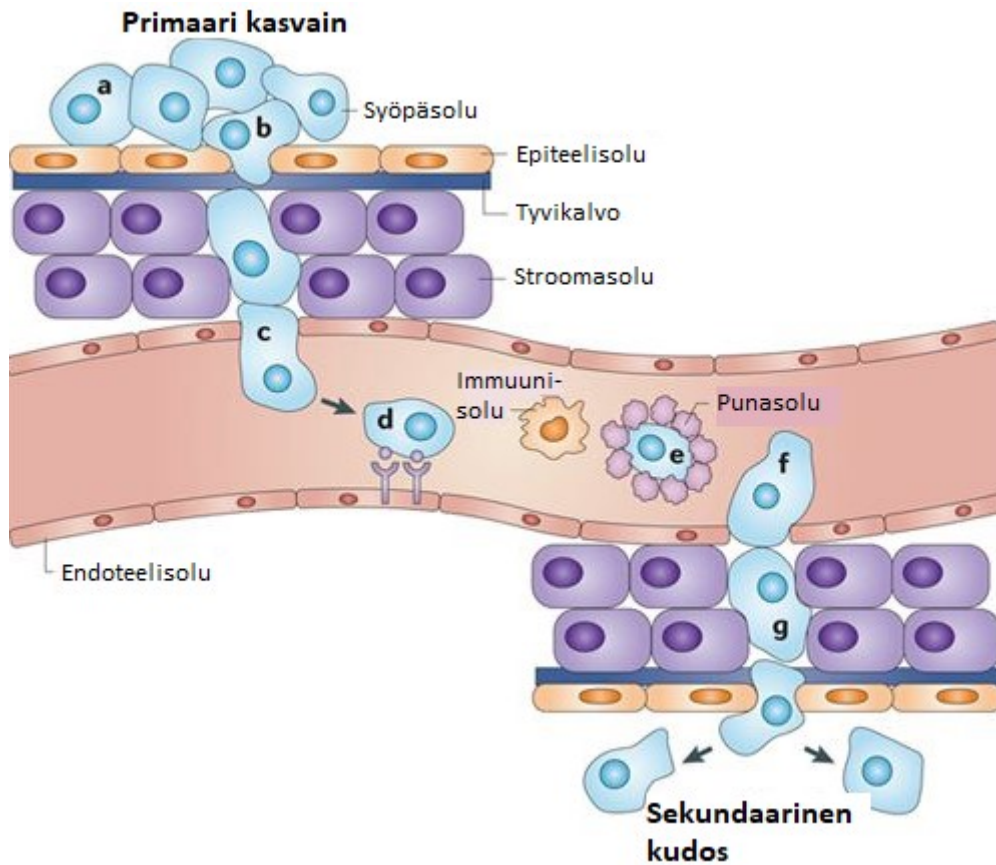
Syöpäsolut pystyvät aktivoimaan kudoksen fibroblasteja tuottamallaan kasvutekijöillä. Näiden aktivoitujen fibroblastien on todettu muokkaavan kasvaimen soluväliainetta muun muassa muokkaamalla tuottamiensa soluväliaineen komponenttien määriä ja tuottamalla yhdessä syöpäsolujen kanssa MMP:a. Aktivoidut fibroblastit osallistuvat syöpäsolujen migraatiota edistämiseen muokkaamalla kasvutekijöillä tapahtuvaa signalointia, sekä soluväliaineen rakennetta. Aktivoidut fibroblastit tuottavat, muokkaavat ja organisoivat soluväliaineen proteiineja niin, että syöpäsolujen on helppo liikkua niitä pitkin. (Erdogan B ja Webb D J 2017) Esimerkki soluväliaineen komponenteista, joiden muokkaamiseen aktivoidut fibroblastit osallistuvat ovat kollageeni I ja fibronektiinin (Kakkad SM ja muut 2012; Erdogan B ja muut 2017). Näiden proteiinien tuotto on lisääntynyt useissa syövissä. Syöpäsoluja ja aktivoituja fibroblasteja sisältävien yhteisviljelmien on todettu tuottavan eri tavalla organisoitunutta fibronektiinia verrattuna yhteisviljelmiin, jotka sisälsivät syöpäsoluja ja ei-aktivoituja fibroblasteja (Erdogan B ja muut 2017). Rintasyöpäkasvaimilla tehdyssä

tutkimuksessa kollageeni I:n järjestäytymisen todettiin eroavan kasvainten välillä riippuen siitä, olivatko ne muodostaneet etäpesäkkeitä imusolmukkeisiin vai eivät. Kollageeni I kuitujen huomattiin muodostavan tiiviimpiä rakenteita niissä kasvaimessa, jotka olivat metastoineet imusolmukkeisiin. (Kakkad S M ja muut 2012)

### 2.3 Tyvikalvo metastaasissa

Tyvikalvo on pitkälle järjestäytynyt soluväliaineen muoto, joka ympäröi kudoksia ja johon epiteelisolut ovat kiinnittyneet. Se on rakenteeltaan pääasiassa laminiinista, kollageeni IV:stä ja heparaani-sulfaatti-proteoglygaaneista muodostuva tiivis <100 nm paksuinen verkko, joka paksuuntuu iän myötä. Tyvikalvo muodostuu kahdesta erilaisesta puolesta, joista epiteelipuoli on se, johon solut pystyvät sitoutumaan. Strooman puoleinen osa kiinnittää tyvikalvon muuhun soluväliaineeseen sitomalla muun muassa kollageeni II:tä ja tenasiini-C:tä. (Halfter W ja muut 2015)

Tyvikalvon tehtävänä on tukea kudoksia ja erottaa eri kudokset toisistaan sekä säädellä solujen käyttäytymistä. Tyvikalvon komponentit ovat välttämättömiä angiogeneesin kannalta ja edistävät näin myös kasvaimen kehitystä. (Kalluri R 2003) Kuvassa 2 on esitetty tyvikalvon merkitys metastaasissa. Solujen on läpäistävä tyvikalvo päästäkseen kulkeutumaan verenkiertoon ja sen mukana muualle kehoon. Jotta solut pystyisivät aloittamaan etäpesäkkeen uudessa paikassa, niiden on läpäistävä tyvikalvo vielä toistamiseen.



**Kuva 2** Syöpäsolun on kyettävä tunkeutumaan tyvikalvon läpi pystyäkseen muodostamaan etäpesäkkeen. **a)** Syöpäsolu, joka ei vastaa kasvua rajoittaviin signaaleihin ja jonka adheesio viereisiin soluihin on heikentynyt. **b)** Syöpäsolun on tunkeuduttava tyvikalvon läpi pystyäkseen poistumaan primaarikudoksesta. **c)** Intravasaatioksi kutsutussa tapahtumassa syöpäsolu tunkeutuu verisuonen endoteelisolujen välistä päästäkseen verenkiertoon. Syöpäsolun kulkuun verisuonistossa vaikuttavat verenkierron suunta, vuorovaikutukset suonen **(d)** endoteelisolujen, immuunisolujen ja **(e)** punasolujen kanssa. **f)** Ekstravasaatioksi kutsutussa tapahtumassa syöpäsolu poistuu verenkierrosta endoteelisolujen läpi sekundaariseen kudokseen, ja **g)** invasoii stroomasolujen ja tyvikalvon läpi aloittaakseen uuden kasvaimen. Muokattu artikkelista: Treating metastatic cancer with nanotechnology; Schroeder A ja muut 2011; Nature Reviews Cancer.

## 2.4 Fokaaliadheesio

Fokaaliadheesiossa (FA) integriinit muodostavat suuren kompleksin, joka kiinnittää solun solutukirangan aktiinisäikeet soluväliaineeseen. Solujen adheesio soluväliaineeseen säätelee useita solun toimintoja kuten migraatiota kudoksessa. FA:t ovat pitkäikäisiä ja pysyviä rakenteita, joita kuitenkin yksittäiset integriinit jatkuvasti muokkaavat vuorotellessaan aktiivisen ja inaktiivisen muodon välillä, ja siten muodostaessaan lyhytikäisiä adheesioita. (Ivaska J 2012)

Integriinien solun ulkopuolinen osa sitoutuu ligandiinsa soluväliaineessa ja integriinin solun sisäinen osa linkittyy solutukirangan aktiiniin muun muassa  $\alpha$ -aktiinin, taliinin, tensiinin ja filamiinin avulla. Integriinien solun sisäiseen osaan kiinnittyy myös useita muita integriinien -liittyviä molekyylejä, kuten fokaaliadheesio kinaasi (FAK), paksilliini, ja kaveoliini. Solutukirangan aktiinisäikeisiin sitoutuu myös suuri joukko eri proteiineja. FA:t muodostuvatkin suuresta määrästä eri proteiineja, jotka kaikki osallistuvat FA:den säätelyyn. (Geiger B, Bershadsky A, Pankov R ja Yamada KM 2001)

YAP:n on todettu olevan yksi fokaaliadheesioiden muodostumiselle tärkeiden proteiinien ilmentymistä säätelevä tekijä. Rasvakudoksesta eristetyillä mesenkymaalisilla kantasoluilla (AD-MSC, *engl.* adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) tehdyssä tutkimuksessa solut, jotka ilmensivät mutatoitua YAP:ia, eivät kyenneet muodostamaan FA:ta yhtä tehokkaasti tai ne olivat heikompia kuin kontrollisolulla. YAP:n todettiin säätelevän useiden integriini-alayksiköiden ilmentymistä sekä myös vinkuliinin, taliinin ja zyksiinin ilmentymistä. (Nardone G. ja muut 2017) Myös rintasyöpäsoluilla YAP:n on raportoitu osallistuvan fokaaliadheesioiden säätelyyn FAK:n fosforylaation kautta (Shen J ja muut 2018).

## 2.5 Epiteeli-mesenkyyymi -transitio

Solun muuttuminen epiteelisolusta liikkuviksi mesenkyyimisoluksi on prosessi, jonka solu käy läpi yksilönkehityksessä, kudonsaurion korjauksen aikana ja syövässä. Prosessin aikana solu alkaa ilmentämään mesenkyyimisoluille ominaisia piirteitä ja epiteelisolun piirteet katoavat. Solut menettävät apikaali-basaali polarisuutensa ja omaksuvat päähäntä polaarisuuden, sekä muuttavat muotoaan solutukirangan järjestäytyessä uudelleen. Epiteelisoluille ominaisten geenien ilmentyminen vähenee ja

mesenkyymisoluille ominaisten lisääntyä, jolloin solujen liikkuminen sekä soluväliainetta pilkkovien entsyymien tuotto lisääntyy. Syövässä epiteelisolut, jotka ovat käyneet läpi EMT:n, muodostavat todennäköisemmin etäpesäkkeitä, sillä uusien ominaisuuksien avulla ne voivat liikkua soluväliaineessa. (Lamouille S ja muut 2014)

Transformoiva kasvutekijä  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) perheeseen kuuluvan TGF- $\beta$ 1:n on todettu indusoivan EMT:tä rintasyöpäsoluissa. Solujen kasvatusliuoksessa olleen TGF- $\beta$ 1:n todettiin aktivoivan TGF- $\beta$ /Smad -signalointireitin, ja saavan aikaan muutoksen useissa eri rintasyöpäsolulinjoissa. (Yu Y ja muut 2014) Zhang T H ja muut (2019) tekemässä tutkimuksessa kielisyöpäsoluilla TGF- $\beta$ 1:n todettiin indusoivan EMT:n pitkän aikavälin koodaavan RNA:n UCA1:n kautta (*engl.* urothelial cancer associated 1). TGF- $\beta$ 1 vähensi E-kadheriinin ja lisäsi vimentiniin ilmentymistä syöpäsoluissa. UCA1:n poisto soluista aiheutti päinvastoin E-kadheriinin lisääntymisen ja vimentiniin vähentymisen. Samassa tutkimuksessa huomattiin microRNA-124:n (miR-124) osallistuvan UCA1:n kanssa EMT:n säätelyyn. UCA1/miR-124 suhteen todettiin säätelevän TGF- $\beta$ :n indusoimaa EMT:tä JAG1/Notch 1 -signalointireitin kautta.

### 3. STROOMASOLUT SYÖVÄSSÄ

Syövän on todettu olevan paljon monimutkaisempi sairaus, kuin vain kasvaimen sisältämät syöpäsolut. Aiemmin mainitut syövän tunnusmerkit kuvaavat syöpäsolujen toimintaa, mutta kasvaimessa ovat mukana syöpäsolujen lisäksi myös useat muut tavalliset solut, joita yhdessä syöpäsolujen kanssa kutsutaan kasvaimen stroomasoluiksi, sekä solujen muu mikroympäristö. Stroomasolut, jotka eivät täytä syövän tunnusmerkkejä, voivat syöpäsolujen lailla osallistua syövän kehittymiseen. (Hanahan D ja Weinberg R A 2011) Esimerkiksi tavallisten fibroblastien on todettu aktivoituvan syöpäsolujen vaikutuksesta, ja tämän jälkeen niiden on todettu kykenevän muokkaamaan kasvaimen mikroympäristöä (Erdogan B ja Webb D J 2017). Syöpäsolut, stroomasolut sekä solujen muu mikroympäristö ovat jatkuvasti vuorovaikutuksessa keskenään ja yhdessä muodostavat kasvaimen. Yhdessä ne määrittävät sen, miten syöpä kehittyy ensin paikallisena kasvaimena ja lopulta etäpesäkkeitä muodostavana sairautena. (Zhan H X ja muut 2017)

### 3.1 Aktivoidut fibroblastit muokkaavat soluväliainetta ja edistävät kasvaimen kehittymistä

Kasvaimen strooma muodostuu useista eri soluista ja soluväliaineesta. Stroomasoluihin lukeutuvat muun muassa aktivoidut fibroblastit, immuunisolut, makrofagit ja syöpäsolut. Kasvaimen mikroympäristö muodostuu syöpäsolujen ja strooman välisestä vuorovaikutuksesta, johon liittyvät myös solujen tuottamat entsyymit ja kasvutekijät (Zhan H X ja muut 2017).

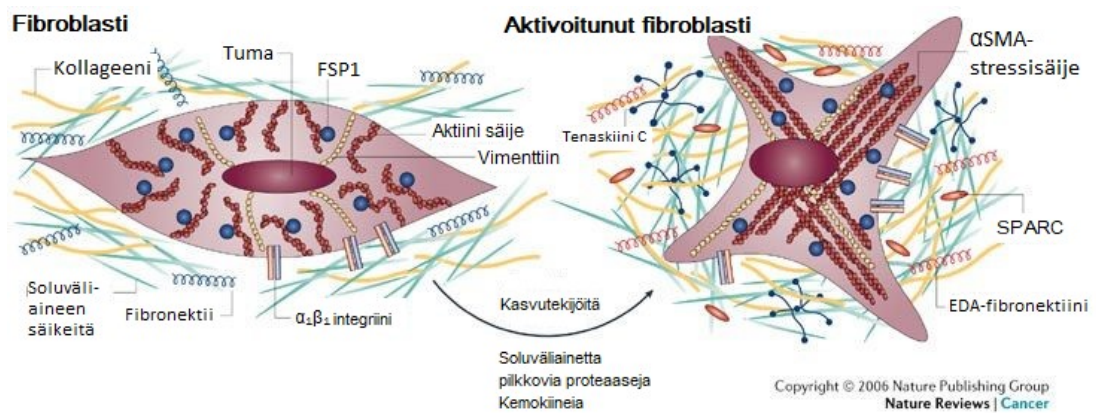
Soluväliainetta kudoksissa on todettu tuottavan lähinnä fibroblastit. Terveessä kudoksessa ne ylläpitävät kudoksen tasapainoa ja edistävät kudოსvaurioiden paranemista liikkumalla kudოსvauriota kohti ja tuottamalla soluväliainetta. (Kalluri R ja muut 2006) Fibroblastit ovat erittäin heterogeeninen joukko soluja, ja eri paikoista kehoa eristetyt fibroblastit eroavat toisistaan huomattavasti. Kun ihmisestä eristettyjä 50:tä eri fibroblasti-linjaa verrattiin geenien ilmentymistasojen perusteella toisiinsa, ne erosivat toisistaan yhtä paljon kuin eri valkosolulinjat. (Chang H Y ja muut 2002) Syöpäsolut muokkaavat kasvaimessa olevia fibroblasteja ja niiden käytöstä tuottamalla kasvutekijöitä (Erdogan B ja Webb D J 2017).

Normaalien fibroblastien tuottaman soluväliaineen on todettu estävän syöpäsolujen jakaantumista JMJDa1:stä riippuvaisten geenien säätelyn kautta. JMJDa1 on histonidemetylaasi, jonka ilmentymistä normaalien fibroblastien tuottama soluväliaine vähentää, ja joka on mukana säätelössä esimerkiksi solujen jakaantumista. Kasvaimesta peräisin olevien aktivoitujen fibroblastien tuottaman soluväliaineen on todettu lisäävän JMJDa1:n ilmentämistä tuottamalla jäykempää soluväliainetta, kuin mitä normaalit fibroblastit tuottavat. Lisääntyneen JMJDa1 ilmenemisen taas on todettu lisäävän transkription säätelijöiden YAP:n ja TAZ:n määriä ja indusoivat tätä kautta solujen jakaantumista ja syövän kehittymistä. (Kaukonen R ja muut 2016)

Suuri osa kasvaimen soluista on aktivoituja fibroblasteja. (Kalluri R ja muut 2006) Fibroblastien aktivaatio lisää solujen jakautumisen lisäksi soluväliaineen tuottoa kasvaimessa. Kollageeni I, tenasiini C ja EDA-fibronektiini (lisädomeeni a, *engl.* extra domain a -fibronectin) ovat esimerkkejä proteiineista, joiden ilmentymisen on todettu lisääntyvän, kun fibroblasteja on kasvatettu yhdessä syöpäsolujen kanssa. (Kalluri R ja



muut 2006) Aktivoitujen fibroblastien on todettu muokkaavan myös kasvutekijöillä tapahtuvaa signalointia kasvaimessa, ja tämän muuttuneen signaloinnin sekä muuttuneen soluväliaineen on todettu yhdessä edistävän etäpesäkkeiden syntyä. (Erdogan B ja muut 2017) Tämän lisäksi eturauhassyöpäsoluilla tehdyssä tutkimuksessa fibroblastien todettiin lisäävän syöpäsolujen vastustuskykyä syöpälääkkeitä vastaan, ja auttavan soluja selviämään lääkkeiden aiheuttamasta oksidatiivisesta stressistä (Cheteh E H ja muut 2017). Kuvassa 3 on esitetty, minkälaisia muutoksia fibroblastit käyvät läpi aktivoituessaan.



**Kuva 3** Fibroblastien aktivoituminen lisää solujen jakautumista ja soluväliaineen komponenttien kuten kollageeni I:n, tenasiini C:n ja EDA domeenin sisältävän fibronectiinin sekä SPARC:n tuottoa (eritetty hapan ja kysteiini-rikas proteiini, *engl.* secreted protein acidic and rich in cysteine). Muokattu artikkelista: Fibroblasts in cancer; Kalluri R ja Ziesberg M 2006, Nature Reviews.

### 3.2 Solujen migraatio ja invaasio

Solujen liikkuminen eli migraatio ja invaasio, ja erityisesti kyky liikkua kudoksesta toiseen, ovat välttämätön askel syövän kehittäessä etäpesäkkeitä. Syövässä invasoivien ja metastaattisten solujen solu-solu- ja solu-soluväliaine-liitoksiin osallistuvien proteiinien ilmentäminen on muuttunut verrattuna ei-metastaattisiin soluihin. E-kadheriini on tärkeä proteiini solu-solu-liitoksissa ja sen ilmentyminen on usein vähentynyt invasoivissa ja metastoivissa soluissa. (Hanahan D ja Weinberg RA 2011) E-kadheriinit muodostavat adheesio-liitoksia vierekkäisten epiteelisolujen välille ja estää niitä liikkumasta paikaltaan. Kun soluja paikallaan pitävien proteiinien ilmentyminen on vähentynyt syöpäsoluissa, proteiinien, jotka osallistuvat solujen liikkumiseen alkionkehityksen ja tulehduksen aikana, ilmentäminen lisääntyy. N-kadheriini on yksi näistä proteiineista ja sen ilmentymisen on todettu lisääntyvän invasoivissa soluissa. N-kadheriinia esiintyy normaalisti migroivissa neuroneissa ja mesenkyymisoluuissa yksilönkehityksen aikana. (Cavallaro U ja Christofori G 2004)

Migraation ja invaasion aikana solun on muodostettava uusia FA:ta ja purettava vanhoja, jotta se pystyisi liikkumaan. Cary LA ja muut (1998) tutkivat p130<sup>Cas</sup>:n vaikutusta solujen FAK-välitteiseen migraatioon kiinan hamsterin munasarjasoluilla (CHO, *engl.* chinese hamster ovary) ja totesivat p130<sup>Cas</sup>:n säätelevän FAK-välitteistä (fokaaliadheesio kinaasi) migraatiota muodostamalla kompleksin FAK:n kanssa. Turecková J ja muiden (2009) tekemässä peräsuoli-syöpä-tutkimuksessa selvitettiin, miten Akt-kinaasi, FAK sekä Src-kinaasi yhdessä säätelevät solujen liikkumista. Akt:n todettiin lisäävän FAK:n fosforyointia ja tätä kautta sen aktiivisuutta, kun taas Src-kinaasi -inhibiittorin todettiin vähentävän Akt:n vaikutusta.

### 3.3 Aktivoitujen fibroblastien edistävät migraatiota ja invaasiota

Aktivoitujen fibroblastien on todettu muokkaavat syövän mikroympäristöä ja soluväliainetta muun muassa tuottamalla kasvutekijöitä sekä sytokiineja kuten TGF- $\beta$ , TGF ja FGF, SDF1, CCL2, CCL5, CCL7, CXCL16 ja IL-6. (Erdogan B ja Webb DJ 2017) Rintasyöpäsoluilla tehdyssä tutkimuksessa aktivoitujen fibroblastien tuottaman TGF- $\beta$ 1:n todettiin edistävän rintasyöpäsolujen migraatiota ja invaasiota lisäämällä Smad2 fosforylaatiota (Yu Y ja muut 2014). Samankaltaisia tuloksia on saatu eturauhassyöpäsoluilla tehdyssä tutkimuksessa, jossa osoitettiin aktivoitujen

fibroblastien tuottaman TGF- $\beta$ :n lisäävän syöpäsolujen liikkumista. TGF- $\beta$ :n poistaminen mediumista taas hidasti eturauhassyöpäsolujen liikkumista haavakokeissa. (Ao M ja muut 2007) Hiirillä tehdyssä tutkimuksessa aktivoitujen fibroblastien on todettu lisäävän syövän metastaasia luuhun, aivoihin ja keuhkoihin, ja tämän todettiin olevan seurausta kohonneista CCL2-, CCL5-, CCL7- ja CXCL16-pitoisuuksista. CCL2:n ja CCL5:n todettiin lisäävän solujen migraatiota aktivoimalla Hedgehog-signaalintireitin. (Liu J ja muut 2016)

### 3.4 Soluväliaine metastaasissa

Soluväliaineen komponenttien ilmentymisellä ja järjestäytymisellä on todettu olevan vaikutus syövän metastaasissa. Muun muassa kollageeni I- ja fibronektiini-säikeiden on huomattu järjestäytyvän tietyllä tavalla metastoivissa kasvaimissa ja luovan syöpäsoluille paremman ympäristön liikkua. (Erdogan B ja Webb DJ 2017)

Fibronektiinin on todettu järjestäytyvän tiettyyn suuntaan kasvatettaessa eturauhassyöpäsoluja aktivoitujen fibroblastien kanssa. Fibronektiinin järjestäytymisen on todettu määrittävän sen, mihin suuntaan syöpäsolut pystyvät liikkumaan soluväliaineessa, mutta sen ei huomattu vaikuttavan solujen migraationopeuteen. Fibronektiinin huomattiin järjestäytyvän yhdensuuntaisiksi säikeiksi, joita pitkin syöpäsolut pystyvät liikkumaan. (Erdogan B ja muut 2017)

Myös kollageenin järjestäytymisen ja ilmentymisen on todettu eroavan terveen ja syöpäkudoksen välillä, sekä myös eri kasvainten välillä. Eturauhassyöpäkasvaimilla tehdyssä tutkimuksessa kollageenin I -säikeiden järjestäytyminen erosi kasvainten välillä, riippuen siitä, olivatko kasvaimet muodostaneet etäpesäkkeitä vai eivät. Metastaasin muodostaneissa kasvaimissa kollageeni I -säikeet olivat järjestäytyneet samansuuntaisiksi, kun taas ei-metastoinneissa kasvaimissa säikeet eivät olleet yhtä järjestäytyneitä. (Penet M-F ja muut 2017). Rintasyöpäkudoksilla tehdyssä tutkimuksessa kollageeni I -säikeiden todettiin muodostavan tiiviimpiä rakenteita syöpäkudoksissa, jotka olivat metastoinneet imusolmukkeisiin verrattuna kasvaimiin, jotka eivät olleet muodostaneet etäpesäkkeitä imusolmukkeisiin (Kakkad M S ja muut 2012).

Kollageeni I:n ilmentymisen on todettu olevan korkeampi karsinoomissa kuin terveessä kudoksessa. Erityisesti kollageeni I:n homotrimeerisen muodon, jota ei terveessä

kudoksessa esiinny, on huomattu olevan yleinen syövissä. Useiden kollageeniä pilkkovien MMP:den on todettu olevan kykenemättömiä pilkkomaan kollageeni I:n homotrimeeristä muotoa. Tämän takia kollageeni I:n homotrimeerisen muodon on ajateltu luovan polun invasoiville soluille, vaikuttavan migraation suuntaan ja tukevan solujen proliferaatiota. (Makareeva E ja muut 2010)

### 3.5 3D-kasvatukset vs. 2D-kasvatukset syöpätutkimuksessa

2D-kasvatusmallia on käytetty jo pitkään tutkittaessa solujen reagointia erilaisiin ärsykkeisiin. Yhdessä kerroksessa kasvavien solujen kasvuolosuhteet on helppo vakioida, sillä kaikilla kasvatuksen soluilla on yhtä paljon ravintoaineita sekä kasvutekijöitä saatavilla kasvatusliuoksessa. Tämän ansiosta solut kasvavat ja jakaantuvat samaan tahtiin ja ovat hyvin homogeenisiä. (Duval K ja muut 2017) 2D-kasvatusmallin huono puoli on se, että se eroaa solujen normaalista kasvuympäristöstä, ja esimerkiksi hepatosyyttisolujen fenotyyppi muuttuu nopeasti sen jälkeen, kun solut on siirretty kudoksesta 2D-maljakasvatukseen. (Fennema E ja muut 2013)

Suurin ero 2D- ja 3D-kasvatusmalleissa on se, että 3D-kasvatusmallissa soluilla on mahdollisuus muodostaa erilaisia solu-solu- ja solu-soluväliaine-liitoksia (Fennema E ja muut 2013). Lisäksi 3D-kasvatusmallissa sferoideiksi kutsuttujen kasvatusten sisäosissa olevilla soluilla on ravintoaineita heikommin saatavilla kuin sferoidissa uloimpana olevilla soluilla, mikä johtaa siihen, että uloimpana olevat solut jakaantuvat useammin kuin sferoidin sisäosassa olevat solut. Sisimpänä olevat solut taas jakaantuvat hitaammin ja kuolevat useammin nekroosin kautta. 3D-kasvatusmallissa solujen kasvuympäristö on lähempänä sitä ympäristöä, missä solut normaalisti kudoksessa tai kasvaimessa ollessaan ovat. Syöpätutkimuksessa 3D-kasvatusmalli on osoittautunut hyväksi tavaksi tutkia esimerkiksi lääkkeiden vaikutusta soluihin. 3D-kasvatusmallin on esimerkiksi todettu estävän apoptoosia, kun solut on altistettu syöpälääke paklitakselille. Lisäksi solujen migraatiota ja invaasiota mittaavissa kokeissa solujen on todettu liikkuvan eri tavalla 3D- kuin 2D-kasvatuksissa. Tämä ero kasvatusmallien välillä on tärkeä huomioida syöpätutkimuksessa, sillä solujen liikkuminen on tärkeässä osassa syövän muodostaessa etäpesäkkeitä. (Duval K ja muut 2017)

## 4. INTEGRIINIT

### 4.1 Integriinien rakenne ja toiminta

Integriinit ovat heterodimeerisiä solukalvon läpäiseviä reseptoriproteiineja, jotka sitovat solun solutukirangan soluväliaineeseen, ja muodostuvat yhdestä  $\alpha$ - ja yhdestä  $\beta$ -alaysiköistä. Ihmisellä näitä heterodimeerejä ilmentyy 24 erilaista ja rakentuvat 18:sta  $\alpha$ -alaysikön ja kahdeksan  $\beta$ -alaysikön muodostamista pareista. Jokaisella heterodimeerillä on omat ominaisuutensa ja ligandinsa, ja alaysiköt pariutuvat sen mukaan minkälaisia ominaisuuksia integriiniltä vaaditaan.

Integriinit voidaan jakaa neljään ryhmään ligandiensa perusteella: leukosyytti-spesifiset reseptorit, kollageeni-reseptorit, laminiini-reseptorit ja RGD-sekvenssin tunnistavat reseptorit. Solun ulkopuolelle jäävä osa koostuu useasta domeenista ja ligandin tunnistava osa on aivan reseptorin kärjessä. Solun sisäpuolinen osa, joka on vuorovaikutuksessa useiden solutukirangan proteiinien ja signaaliproteiinien kanssa, on vain alle 75 aminohapon mittainen. (Takada Y, Ye X ja Simon S 2007)

### 4.2 Integriinien aktivoituminen

Useissa tutkimuksissa integriinin konformaatiolla on todettu olevan merkitystä integriinin aktiivisuuteen. Niillä tiedetään olevan kolme eri muotoa: taittunut muoto, pidentynyt muoto ja pidentynyt muoto, jossa alaysiköt ovat erkaantuneet toisistaan aminopäiden alapuolelta. Taittunutta muotoa pidetään inaktiivisena muotona, sille sen affiniteetti ligandiin on heikko. Integriinillä on suurin affiniteetti ligandiinsa, kun se on pidentyneessä muodossa ja sen alaysiköt ovat erillään. (Askari JA ja muut 2009)

Integriinin aktivoituminen voi tapahtua joko ligandin sitoutuessa siihen, jolloin integriinin rakenne stabiloituu, tai taliinin sitouduttua integriinin solunsisäiseen osaan aiheuttaen muutoksen integriinin rakenteessa. Taliinin on todettu olevan tärkeässä osassa integriinien aktivoitumisessa, ja sen kiinnittyminen integriinin  $\beta$ -alaysikön solunsisäiseen osaan aktivoi integriinin samalla sitoen sen solun aktiinisäikeisiin. Myös integriinien klusteroitumisen on todettu lisäävän integriinien sitoutumista multivalentteihin ligandeihin. Kindliinin on todettu olevan keskeisessä osassa integriinien klusteroitumisessa. (Ginsberg MH 2014)

### 4.3 Integriinin signalointi

Aktivoituneet integriinit aktivoivat useita tyrosiinikinaaseja kuten FAK:a, Src-perheen kinaaseja ja Abelson-hiiren leukemia virusonkogeeni-homologi 1:tä (Abl, *engl.* Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) sekä seriini-treoniini-kinaaseja ja integriineihin -kiinnittyneitä kinaaseja (ILK, *engl.* Integrin-linked kinase). Näistä FAK:t ja Src-perheen kinaasit ovat tutkituimpia integriinien aktivoimien signalointireittien komponentteja. (Giancotti FG ja Ruoslahti E 1999) Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että FAK edistää solujen liikkumista ja invaasiota kontrolloimalla fokaaliadheesioita ja MMP:en ilmentymistä (Schlaepfer DD ja Mitra SK 2004). Integriinit eivät toimi ainoastaan yksin vaan myös yhdessä muiden solun pinnan reseptorien, kuten kasvutekijäreseptorien kanssa (Giancotti FG ja Ruoslahti E 1999). FAK:n on todettu olevan tärkeä tekijä, joka sitoo integriinien toiminnan kasvutekijäreseptorien toimintaan. FAK:n on huomattu muodostavan kompleksin aktiivisten PDGF (verihituleesta peräisin oleva kasvutekijä, *engl.* platelet-derived growth factor) - ja EGF (epidermaalinen kasvutekijä, *engl.* epidermal growth factor) -reseptorien kanssa, ja PDGF:n ja EGF:n edistämisen solujen migraation olevan riippuvainen FAK:n toiminnasta. (Sieg DJ ja muut 2000)

Integriinin sitoutuminen soluväliaineen komponentteihin saa integriinit klusteroitumaan solukalvolla ja kiinnittymään soluväliaineeseen. Useiden integriinien on todettu toimivan yhdessä kaveoliini-1 nimisen solunpinnan proteiinin kanssa ja aktivoivan tällöin FYN kinaasin. FYN:n aktivoituminen johtaa Ras-ERK signalointireitin aktivoitumiseen ja tätä kautta muun muassa solusyklin etenemiseen. (Giancotti FG ja Ruoslahti E 1999)

### 4.4 Integriinit syövässä

Integriinien uskotaan osallistuvan syövän kehityksen kaikkiin vaiheisiin kuten solujen jakaantumiseen ja paikalliseen invaasioon. Tärkeitä prosesseja etäpesäkkeiden synnyssä ovat syöpäsolujen pääsy verenkiertoon ja niiden selviytyminen siellä. Solujen on kyettävä poistumaan verenkierrosta verisuonten seinämien läpi, ja aloittamaan uuden kasvaimen vieraassa kudoksessa. Integriinien tai integriineihin liittyvien prosessien on todettu olevan mukana kaikissa näissä prosesseissa. (Hamidi H ja Ivaska J 2018)

Kriittisin vaihe etäpesäkkeiden synnyssä on solujen selviäminen verenkierossa, jossa ne eivät voi muodostaa adheesioita soluväliaineen kanssa. Useille soluille on välttämätöntä kiinnittyä soluväliaineeseen, sillä se välittää solulle selviämistä edistäviä signaaleja. Kun adheesiot katoavat, nämä solut käyvät läpi ohjelmoidun solukuoleman eli anoiksen, josta kerrottiin kohdassa 1.2. (Frisch SM ja muut 1996) Alanko J ja muut 2015 tutkivat endosytoitujen aktiivisten integriinien signalointia ja huomasivat endosomeissa olevien ligandeihinsa sitoutuneiden integriinien edelleen aktivoivan FAK:ta. Tutkimus osoitti, että integriinit kykenevät aktivoimaan samoja signalointireittejä riippumatta siitä olivatko ne solun pinnalla fokaaliadheesiossa vai solun sisällä endosomissa. Tämän lisäksi tutkimuksessa havaittiin integriinien endosomaalisen signaloinnin vähentävän solujen anoikista.

#### 4.5 $\alpha 2\beta 1$ -integriini angiogeneesissä

$\alpha 2\beta 1$ -integriinin on todettu osallistuvan verisuonten muodostumiseen ja angiogeneesin säätelyyn yhdessä muun muassa  $\alpha 1\beta 1$ -integriinin kanssa. Zweers MC ja muut (2007) tutkivat angiogeneesiä hiirillä, joiden solut eivät ilmentäneet  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä, ja huomasivat  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin puuttumisen nopeuttavan angiogeneesiä haavan parantumisen yhteydessä. Kun Ghatak S ja muut (2016) hiljensivät sekä  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin että  $\alpha 1\beta 1$ -integriinin hiiristä, verisuonten muodostumisen havaittiin heikentyvän verrattuna kontrollihiiriin, joilla molemmat integriinit toimivat normaalisti.  $\alpha 2\beta 1$ -integriini pystyi siis lisäämään angiogeneesiä, mutta vain jos  $\alpha 1\beta 1$ -integriini toimii normaalisti.

Verisuonten endoteelisolujen kasvutekijäreseptori 1:n (VEGFR, *engl.* vascular endothelial growth factor receptor) on todettu olevan yksi verisuonten kehittymistä edistävä tekijä  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin puuttuessa. VEGFR-1 on tyrosiinikinaasi reseptori, joka osallistuu verisuonten kehittymiseen ja angiogeneesiin sitomalla VEGF:ää solun mikroympäristöstä. Kun hiiriin, jotka eivät ilmentäneet soluissaan  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä, oli istutettu melanoomasoluja, hiirten endoteelisolujen tuottama VEGFR-1 lisääntyi. Näillä hiirillä myös kasvaimen kasvu ja angiogeneesi olivat lisääntyneet. Samaa lopputulosta ei kuitenkaan havaittu käytettäessä eri syöpäsoluja. Lewisin keuhkokarsinoma solujen (LLC, *engl.* Lewis lung carcinoma) käyttö kokeissa melanoomasolujen sijaan ei lisännyt kasvaimen kasvua ja angiogeneesiä. Istukan kasvutekijän (PLGF, *engl.* placental growth

factor) todettiin olevan syynä eroihin syöpäsolujen välillä, ja kun vähän PLGF:ää ilmentäville LLC-soluille annettiin lisää PGLF:ää,  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin puuttuminen lisäsi angiogeneesiä myös LLC soluilla. (Zhang Z ja muut 2008)

$\alpha 2\beta 1$ -integriini säätelee angiogeneesiä todennäköisesti säätelemällä VEGFR-1:n ilmentymistä. PLGF:n läsnäolo on välttämätöntä, jotta  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin puuttumisesta johtuva VEGFR-1:n ilmentymisen lisääntyminen johtaisi lisääntyneeseen angiogeneesiin ja kasvaimen kasvuun. Lisäksi  $\alpha 1\beta 1$ -integriinin osallistuu angiogeneesin säätelyyn yhdessä  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa. Angiogeneesin säätelyyn  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kautta vaikuttavat monet tekijät, ja sen toiminta todennäköisesti riippuu pitkälti syöpäsolujen ja mikroympäristön välisestä vuorovaikutuksesta. (Zhang Z ja muut 2008; Ghatak S ja muut 2016)

#### 4.6 $\alpha 2\beta 1$ -integriini metastaasissa

Luu on yleisin paikka, jonne eturauhassyöpä muodostaa etäpesäkkeitä, ja yli 80 %:lta eturauhassyöpään kuolleista miehistä löytyy etäpesäkkeitä luusta. (Bubendorf L ja muut 2000) Luu muodostuu suureksi osaksi soluväliaineen kollageeni I -proteiinista, jonka reseptorina useat integriinit kuten,  $\alpha 2\beta 1$ -integriini, toimivat.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin on todettu olevan välttämätön, jotta eturauhassyöpä pystyy muodostamaan etäpesäkkeitä luuhun. (Hall CJ ja muut 2006)

Hall CL ja muiden (2006) tekemässä tutkimuksessa selvisi, että kollageeni I lisää suuria määriä  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ilmentävien eturauhassyöpäsolujen migraatiota *in vitro*, mutta ei vaikuta solujen proliferaatioon. He loivat tutkimuksensa aikana LNCaP<sub>col</sub>-solulinjan, jonka avulla he tutkivat solujen kykyä muodostaa kasvaimia luuhun hiirillä. Tämä uusi solulinja ilmensi  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä enemmän kuin tavalliset LNCaP-solut. Ne myös kykenivät aloittamaan kasvaimen luussa toisin kuin tavalliset LNCaP-solut.



## 5. ENDOSTATIINI

### 5.1 Endostatiinin rakenne

Endostatiini on kollageeni XVIII:n C-terminaaliseesta päästä proteolyttisesti katkaistu noin 20 kDa:n kokoinen osa. Se sitoo sinkkimolekyylin lähelle sen N-terminaalista päätä, ja tämän sinkin on todettu olevan tärkeä endostatiinin laskostumisen kannalta, mutta endostatiinin toimintaan sen ei ole todettu vaikuttavan. (Ding YH ja muut 1998; Han Q ja muut 2007) Kuvassa 4 on esitetty endostatiinin rakenne.

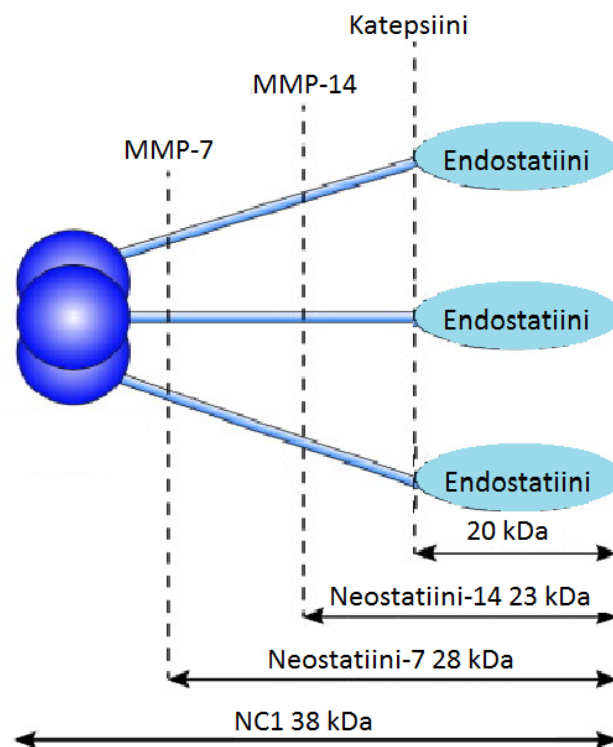


**Kuva 4** Endostatiini on 20 kDa:n kokoinen osa kollageeni XVIII:n N-terminaalista päästä.

Kollageeni XVIII on  $\alpha$ 1-ketjuista muodostuva homotrimeeri, jota esiintyy epiteelin ja verisuonten tyvikalvoissa (Walia A ja muut 2015). Sen karboksyyli-pään on todettu jakaantuvan kolmeen globuraaliseen osaan, joita kutsutaan endostatiineiksi. Nämä 180 aminohapon mittaiset globuraaliset osat kiinnittyvät monia katkaisukohtia sisältävän saranadomeenin avulla 50 aminohapon mittaisen assosiaatio-domeeniin. Kollageeni XVIII:n karboksyyli-päätä, joka sisältää assosiaatio-domeenin, saranadomeenin ja globulaarisen osan, kutsutaan NC1-domeeniksi. (Sasaki T ja muut 1998)

Useiden eri katepsiinien sekä MMP:den on todettu pilkkovan kollageeni XVIII:ta. Katepsiinit L, B ja K pilkkovat endostatiinia tehokkaimmin. Katepsiini D sekä MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-20 sekä haiman elastaasi

osallistuvat endostatiinin tai muiden NC1-fragmenttien pilkkomiseen kollageeni XVIII:stä. (Ferrerias M ja muut 2000; Wen W ja muut 1999; Lin HC ja muut 2001) Muita NC1—päästä pilkottuja fragmentteja endostatiinin lisäksi ovat MMP-7 ja MMP-14 tuottamat fragmentit neostatiini-7 (28 kDa) ja neostatiini-14 (23 kDa). Myös näillä fragmenteilla on todettu samankaltaisia kasvaimen kasvua inhiboivia ominaisuuksia, kuin endostatiinilla. (Chang JH ja muut 2005; Lin HC ja muut 2001; Heljasvaara R ja muut 2005) Kuvassa 5 on esitettyä kollageeni XVIII:n NC1—domeenin rakenne ja yleisimpiä sitä pilkkovia proteaaseja.



**Kuva 5** Kollageeni XVIII:tä pilkkovat useat eri proteinaasit. Katepsiinit pilkkovat kollageeni XVIII:n N-terminaalista päästä 20 kDa:n kokoisen osan, endostatiinin. MMP-14:n pilkkomaa osaa kutsutaan neostatiini-14:ta ja MMP-7:n pilkkomaa osaa neostatiini-7:si. Muokattu artikkelista: Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. Walia A. ja muut 2015, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)

## 5.2 Endostatiini angiogeneesissä

Hiirillä tehtyjen tutkimusten perusteella kollageeni XVIII on tärkeä komponentti angiogeneesissä. Sen puuttumisen on todettu heikentävän angiogeneesiä vastasyntyneiden hiirten verkkokalvoissa ja saavan aikaan epämuodostuneen verisuoniverkoston. (Hurskainen M ja muut 2005) Samanlaisia tuloksia on saatu hiirten lihaksia tutkittaessa. Kollageeni XVIII:n puuttumisen on todettu vaikuttavan lihasten verisuonistoon ja verisuonten kapillaareihin, jotka olivat monin tavoin epämuodostuneita kollageeni XVIII:n puuttuessa. Tämän lisäksi verisuonten endoteeli sekä tyvikalvo muodostuivat normaalia paksummiksi ja luumen normaalia kapeammaksi. (Rygh CB ja muut 2014)

Kollageeni XVIII:ta pilkotun osan endostatiinin on useissa tutkimuksissa raportoitu toimivan angiogeneesissä ja erityisesti sitä inhiboivana tekijänä. Ensimmäisenä endostatiinin anti-angiogeneettiset ominaisuudet huomasivat O'Reilly MS ja muut (1997). Heidän kananmunissa suoritetuissa tutkimuksissaan endostatiinin todettiin inhiboivan verisuonten muodostumista. Ennen endostatiinin löytymistä O'Reilly MS ja muut (1994) olivat eristäneet toisen angiogeneesiä inhiboivan 38 kDa kokoisen proteiinin angiostatiinin LLC-soluista. Endostatiinin he löysivät käyttämällä samaa menetelmää, jolla angiostatiini oli aiemmin löydetty. Eturauhassyöpäsoluilla tehdyssä tutkimuksessa seriiniproteaasin on todettu tuottavan angiostatiinia pilkkomalla sitä plasminogeenistä (Gately ja muut 1996). Myös toisen kollageeni XVIII:stä pilkotun osan, neostatiini-7:n, on todettu inhiboivan angiogeneesiä sekä imusuonten kehittymistä. Neostatiini-7 on endostatiinia suurempi kollageeni XVIII:n fragmentti, joka sisältää endostatiinin, ja sen on todettu vähentävän rekombinantti-FGF:lla indusoidun imusuonten kehittymistä hiirillä sekä kiinnittyvän VEGFR-3:een, joka myös on tärkeä imusuonten kehittymiseen vaikuttava tekijä. (Kojima T, Azar DT ja Zhang JH 2008)

Mekanismi, jolla endostatiini inhiboi angiogeneesiä, ei ole vielä täysin tiedossa, mutta VEGF:n ilmentymiseen sen ei ole todettu vaikuttavan. (Hurskainen M ja muut 2005) Toisaalta Kim YM ja muut 2002 raportoivat, että endostatiini mahdollisesti estäisi VEGF:n signaloinnin vuorovaikuttamalla tyrosiinikinaasi KDR/Flk:n kanssa. KDR/Flk:n on todettu olevan keskeisessä osassa VEGF:n indusoidessa kasvaimen kasvua ja angiogeneesiä maksasyöpäsoluissa (Yoshiji H ja muut 1999). Endostatiinin on myös

raportoitu toimivan adensiinitrifosfataasina (ATPaasi, *engl.* adenosinetriphosphatase), ja tämän ATPaasi-aktiivisuuden on todettu olevan tärkeä endostatiinin anti-angiogeneettisten ominaisuuksien kannalta (Wang S ja muut 2015).

Vuonna 2005 Li C ja muut esittivät, että solujen endostatiinille altistumisen pituudella olisi merkitystä angiogeneesissä, ja että lyhyt altistuminen toimisi angiogeneesiä edistävänä, kun taas pitempi altistus toimisi angiogeneesiä inhiboivana. Myös Morbidelli L ja muut 2003 havaitsivat endostatiinin mahdollisesti toimivan angiogeneesiä edistävänä. He jakoivat endostatiinin neljään fragmenttiin, joista ensimmäinen fragmentti sisälsi aminohapot 1-39 alkaen NC1 domeenin aminohaposta histidiini132. Fragmentti, joka sisälsi aminohapot 90-134, näytti edistävän angiogeneesiä hiiren sarveiskalvossa, kun taas loput fragmentit joko inhiboivat tai eivät vaikuttaneet angiogeneesiin.

### 5.3 Endostatiini migraatiossa ja metastaasissa

Endostatiinin tiedetään inhiboivan useita syövän kehityksen kannalta tärkeitä prosesseja, ja solujen migraatio on yksi näistä angiogeneesin ohella. Sudhakar A ja muut 2003 tekemässä tutkimuksessa endostatiinin todettiin säätelevän endoteelisolujen migraatiota inhiboimalla FAK:ta. FAK:n on todettu säätelevän endoteelisolujen migraatiota mitogeenin aktivoiman proteiini (MAP) -kinaasi- ja ERK—signalointireitin kautta. (Clark EA ja Brugge JS 1995; Cary LA ja muut 1998). VEGF:n indusoimassa endoteelisolujen migraatiossa ERK1 säätelee solutukirangan uudelleen järjestäytymistä ja MAP-kinaasi homologi p38:n puolestaan integriinien ja proteinaasien ilmentymistä (Becker BM ja muut 2001). Sudhakar ja muut (2003) huomasivat endostatiinin kiinnittymisen fibronektiinireseptorina toimivaan  $\alpha 5\beta 1$ -integriiniin inhiboivan FAK:n lisäksi Raf:n, ERK1/2:n, MEK1/2:n ja p38:n fosforyloitumista. Kun endoteelisolujen annettiin kiinnittyä fibronektiiniin  $\alpha 5\beta 1$ -integriiniin kautta ilman endostatiinin läsnäoloa, FAK/cRaf/MEK/ERK-signalointireitti aktivoitui.

Wang S ja muut 2015 raportoivat endostatiinin ATPaasi-aktiivisuudesta ja testasivat luomiensa eri endostatiini—mutanttien vaikutusta ihmisen napanuoran solujen migraatioon. Mutantit, joiden ATPaasi—aktiivisuudet olivat heikommat, inhiboivat solujen migraatiota vähemmän kuin villityypin endostatiini. Mutantti, jonka ATPaasi-

aktiivisuus oli suurin verrattuna muihin mutantteihin ja villityypin endostatiiniin, inhiboi migraatiota eniten.

Rotan sydänfibroblasteilla tehdyssä tutkimuksessa endostatiinin todettiin inhibition sijaan lisäävän solujen migraatiota. Tutkimuksessa PI3K/Akt-signaalintireitin inhibointi esti solujen migraation, ja endostatiini lisäsi Akt:n fosforylointia. (Okada M ja muut 2015) Sudhakar ja muut olivat jo vuonna 2003 tutkineet endostatiinin vaikutusta Akt:n fosforylointiin käyttäen ihmisen napanuoran soluja ja ihmisen rekombinantti (rh, *engl.* recombinant human) -endostatiinia. Tuolloin he totesivat, että endostatiini ei inhiboi Akt:n fosforylointia, mutta tutkimuksessa ei testattu endostatiinin kykyä aktivoida Akt:ta.

#### 5.4 Endostatiini ja integriinit

Vuonna 2001 Rehn M ja muut testasivat usean eri integriinin kykyä sitoutua endostatiiniin. RGD-sekvenssin tunnistavien  $\alpha 5$ -,  $\alpha v$ - ja  $\beta 1$ -integriinien todettiin välittävän ihmisen napanuoran solujen adheesiota endostatiinilla päällystetyllä maljalla.  $\beta 1$ -alaysikön sisältämät ei-RGD-sekvenssiä tunnistavat integriinit taas eivät kiinnittyneet endostatiiniin. Solujen kiinnittymisen endostatiiniin todettiin tapahtuvan pääasiassa  $\alpha 5\beta 1$ -integriinin välityksellä, mutta myös  $\alpha v\beta 3$ -integriinin ja  $\alpha v\beta 5$ -integriinin osallistuvan kiinnittymiseen jossain määrin.

Samana vuonna Wickström SA ja muiden (2001) tekemässä tutkimuksessa selvitettiin endostatiinin vaikutusta FA:hin, mutta tutkimuksissa käytettiin liukoista endostatiinia immobilisoidun sijaan. Liukoisen endostatiinin käyttö adheesiokokeissa ihmisen ihon mikrovaskulaarisilla endoteelisoluilla todettiin häiritsevän solujen muodostamia FA:ta. Endostatiinin läsnä ollessa solujen FA:t alkoivat purkaantumaan ja solutukirangan aktiivistressisäikeet katosivat, mikä myös viittasi siihen, että endostatiini oli vuorovaikutuksessa integriinien kanssa. (Wickström SA ja muut 2001) Vuonna 2009 Faye C ja muut saivat selville endostatiinin aminohappojen arginiini<sup>27</sup> ja arginiini<sup>139</sup> olevan tärkeitä endostatiinin sitoutuessa integriineihin ja heparaanisulfaattiin.

Kuten Rehn M ja muut (2001) totesivat endostatiinin sitoutuvan  $\alpha 5\beta 1$ -integriiniin, Wickström SA ja muut (2002) tekivät saman huomion vuotta myöhemmin. Lisäksi he havaitsivat endostatiinin indusoivan aktiivisäikeisiin kiinnittyneiden  $\alpha 5\beta 1$ -integriinin

klusteroitumisen, ja niiden sijoittumisen solun pinnalla samoihin osiin kuin solukalvon adapteriproteiini kaveoliini-1. Kaveoliini-1:n on todettu osallistuvan integriinivälitteiseen signalointiin kiinnittymällä Fyn-kinaasiin, joka puolestaan on mukana aktivoimassa Shc-Ras-ERK signalointia (Wary KK ja muut 1998). Endostatiinin todettiin lisäävän Src-perheen kinaasien aktiivisuutta ja muokkaavan myös sitä, miten solut tuottavat fibronektiinia ympärilleen (Wickström SA ja muut 2002).

## 6. ETURAUHASSYÖPÄ

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä ja vuonna 2010 se aiheutti noin 250 000 kuolemaa maailmanlaajuisesti (Lozano R ja muut 2010). Eturauhassyöpä on usein mahdollistaa hoitaa leikkauksella ja säteilyhoidolla, mutta noin 30 % syöivistä uusiutuu ja näistä tapauksista noin 10 % johtaa kuolemaan (Buyyounouski MK ja muut 2012). Eturauhassyövän kehittyessä syöpäsolut lisäävät androgeeni-reseptorin (AR) ilmentämistä, sekä autokriinisesti ja parakriinisesti signaloivan androgeenin tuotantoa. Lopulta solut omaksuvat tapoja kasvaa ja jakaantua AR:n toiminnasta riippumattomalla tavalla. Eturauhassyöpä voi muodostaa etäpesäkkeitä useisiin eri kudoksiin, joista luu on yleinen paikka metastaasille. Luumetastaasi onkin yleisin syy eturauhassyövästä aiheutuneisiin kuolemiin. (Jin JK, Dayyani F ja Gallick GE 2011) Tulehdus ja sen muokkaama mikroympäristö ovat eturauhassyövän riskitekijöitä vaikuttavat syövän kehittymiseen. (Sfanos KS ja muut 2018)

### 6.1 $\alpha 2\beta 1$ -integriini eturauhassyövän kantasoluissa

Syövän kantasoluiksi luokitellaan sellaiset syöpäsolut, jotka muistuttavat ominaisuuksiltaan kantasoluja. Niiden aineenvaihdunta on hitaampaa kuin tavallisilla nopeasti kasvavilla ja jakautuvilla syöpäsoluilla, ja ne pystyvät aloittamaan uuden kasvaimen riippumatta siitä, ovatko ne kiinnittyneenä soluväliaineeseen vai eivät. Lisäksi syövän kantasolujen kyky käydä läpi apoptoosi on heikentynyt. Syöpähoidot on tavallisesti kohdennettu nopean aineenvaihdunnan soluihin, ja siksi syövän kantasolut usein selviävätkin hoidoista. (Castillo V ja muut 2014) Eturauhassyövän kantasolujen tunnistamiseen on käytetty useita eri biomarkkereita, joita on listattuna taulukkoon 1. (Zhang K ja muut 2016)

**Taulukko 1. Eturauhassyövän kantasolujen biomarkkereita**

Biomarkkeri	Transmembraaninen roteiini	Glyko-proteiini	Entsyymi	Transkriptio-tekijä	Solun ulkopuolinen proteiini	mRNA
Integriinit	Kyllä	-	-	-	-	-
CD44	Kyllä	-	-	-	-	-
CD133	Kyllä	Kyllä	-	-	-	-
CD166	Kyllä	-	-	-	-	-
Trop2	Kyllä	Kyllä	-	-	-	-
CD117	Kyllä	-	Kyllä	-	-	-
ALDH1	-	-	-	Kyllä	-	-
ABCG2	Kyllä	-	-	-	-	-
SOX2	-	-	-	Kyllä	-	-
EZH2	-	-	Kyllä	-	-	-
cPacP	-	-	Kyllä	-	-	-
AR splice variants	-	-	-	-	-	Kyllä
HGF	-	-	-	-	Kyllä	-
TGM2	-	-	Kyllä	-	-	-

**Taulukko 1** Lista eturauhassyövän kantasolujen tunnistuksessa käytetyistä biomarkkereista, sekä niiden sijoittuminen ja toiminta kudoksessa. Muokattu katsausartikkelista: Current Stem Cell Biomarkers and Their Functional Mechanisms in Prostate Cancer; Zhang K ja muut 2016, International Journal of Moleculas Sciences.

Eturauhassyövän kantasolujen yhtenä merkkiproteiinina pidetään  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä. Collins AT ja muut (2001) käyttivät  $\alpha 2\beta 1$  -integriiniä apuna eristäessä eturauhassyövän kantasoluja kudoksesta. He näyttivät, että eturauhasen epiteelisoluista ne solut, jotka ilmensivät  $\alpha 2\beta 1$  -integriiniä eniten, pystyivät muodostamaan eturauhasen epiteelin ja erilaistumaan kaikiksi sen tarvitsemiksi soluiksi. Kantasolujen kaltaiset solut kyettiin eristämään muista soluista kollageeni I:n avulla, sillä  $\alpha 2\beta 1$  -integriiniä paljon ilmentävät solut kiinnittyivät siihen nopeasti, toisin kuin muut solut. Integriiniä paljon ilmentäneet solut sijoittuivat eturauhasen epiteelin basaalille puolelle ja ne kasvoivat hitaammin verrattuina muihin epiteelin basaalin puolen soluihin.

## 6.2 Eturauhassyövän tutkiminen 3D-kasvatuksissa

M. Ojalill ja muut (2018) tekivät analyysin eturauhasesta eristettyjen fibroblastien *in vitro* tuottaman soluväliaineen sisältämistä proteiineista massaspektometriaa käyttäen. He vertasivat tutkimuksessa miten perinteisesti käytetyssä 2D-maljakasvatuksessa ja

uudemmassa 3D-kasvatusmallissa solujen mikroympäristöt erosivat toisistaan, ja vertasivat tuloksia kudoksenäytteisiin. 3D-kasvatusmallin on ajateltu toimivan parempana mallina kudoksille kuin perinteisten maljakasvatusten, ja olevan siksi parempi malli syöpätutkimuksessa (Fennema E ja muut 2013). 2D- ja 3D-kasvatusten välinen ero osoittautui kuitenkin pieneksi, eikä kumpikaan tekniikoista luonut soluväliainetta, joka olisi ollut lähempänä kudosta (Ojalill M ja muut 2018 a).

Peräsuolisyövästä eristetyillä primaarisoluilla tehdyssä tutkimuksessa taas 3D-kasvatusmallin todettiin olevan hyvä malli edustamaan alkuperäisen kasvaimen tilaa. 3D-kasvatukset onnistuvat säilyttämään alkuperäisen kudoksenäytteen histologian ja proteiinien ilmentymiskuvion. (Jeppesen M ja muut 2017)

### 6.3 Aktivoidut fibroblastit eturauhassyövässä

Aktivoitujen fibroblastien on todettu olevan tärkeässä osassa eturauhassyöpäkasvaimen kehittäessä vastustuskyvyn eri syöpälääkkeitä vastaan. Kemoterapeuttisten aineiden doksirubisiinin, paklitaxelin ja mitomysiini C:n kyky indusoida solukuolema eturauhassyöpäsoluissa on todettu alentuvan merkittävästi aktivoitujen fibroblastien ollessa läsnä solukasvatuksissa. Aktivoitujen fibroblastien todettiin vaimentavan p53:n toimintaa, ja doksirubisiinilla käsitellyissä soluissa ne vähensivät DNA-vaurioita sekä lääkkeen kertymistä syöpäsoluihin. Lisäksi aktivoidut fibroblastit vähensivät vapaiden happiradikaalien tuottamista doksirubisiinilla sekä paklitaxelilla käsitellyissä soluissa. (Cheteh EH ja muut 2017)

### 6.4 Kasvaimen mikroympäristö vaikuttaa metastaasiin eturauhassyövässä

Hiirillä tehdyssä tutkimuksessa selvitettiin miten eturauhassyöpä metastoi, kun eturauhassyöpäkasvain istutettiin erilaisen mikroympäristön omaaviin kudoksiin. Kasvaimet istutettiin joko ihon alle tai eturauhaseen. Hiiret, joilla kasvain oli istutettu eturauhaseen, muodostivat herkemmin etäpesäkkeitä. Lisäksi kollageenin ilmentymistä tarkasteltiin istutetuissa kasvaimissa ja selvisi, että kollageeni I:tä ilmentyi enemmän eturauhaseen istutetuissa kasvaimissa kuin ihonalaisissa kasvaimissa. Eturauhaseen istutetuissa kasvaimista havaittiin myös suurempi määrä aktivoituneita fibroblasteja sekä kollageenin tuottoa indusoivaa kasvutekijää TGF- $\beta$ :aa, kuin ihonalaisissa kasvaimissa. (Penet M-F. ja muut 2017)



## 6.5 Eturauhassyövän diagnosointi

Eturauhaselle spesifinen antigeeni (PSA, *engl.* Prostate specific antigen) on ainoastaan eturauhasen solujen tuottama proteiini, jonka pitoisuutta verenkierrossa käytetään eturauhassyöpädiagnostiikassa. Wang MC ja muut 1981 saivat eristettyä PSA:ta ihmisen seerumista ja ehdottivat sen käyttöä, eturauhassyövän diagnosoinnissa ja hoidon seurannassa. Catalona WJ ja muut (1991) vertasivat PSA-arvon luotettavuutta muihin eturauhassyövän diagnosoinnissa käytettyihin menetelmiin, ja totesivat sen luotettavammaksi kuin ultraäänitutkimus tai peräaukon kautta tehtävä tutkimus. PSA:n rajoituksena diagnostiikassa on sen pitoisuuksien suuri vaihtelu eri henkilöiden välillä. PSA onkin käytössä diagnosoinnin alkuvaiheessa ja lopullinen diagnoosi saadaan vasta eturauhasesta otetuista koepaloista. (Iremashvili V ja muut 2016)

## 6.6 Eturauhassyövän hoito

Eturauhassyövän hoito aloitetaan nykyisin potilaan kastreasiolla, joko leikkaamalla tai lääkehoidolla androgeenien tuotannon vähentämiseksi. Tällä pyritään estämään eturauhassyöpäsolujen AR:n toiminta, jonka tiedetään olevan tärkeä syövän etenemisen kannalta. AR:n kohdistuva hoito heikentää tautia, mutta syöpä voi myöhemmin kehittyä kastreasiolle resistentiksi, jolloin taudin ennuste huononee ja taudin hoito muuttuu haastavammaksi. (Yap TA ja muut 2016) Eturauhassyöpäsolut, jotka eivät ilmennä AR:ää ovat kastreasiolle resistenttejä, eivätkä AR:n toimintaan vaikuttavat lääkkeet tehoa niihin. Pitkälle edenneessä sairaudessa AR:n ilmentymisen on todettu vaihtelevan solujen välillä (Shah RB ja muut 2004).

Eturauhassyövän hoitoa vaikeuttaa syövän heterogeenisyys. Samassa kasvaimessa olevien syöpäsolujen genomit poikkeavat toisistaan, mikä aiheuttaa suuren vaihtelun eri syöpäsolujen transkriptomien ja proteomien välillä. Useita lääkkeitä on kuitenkin onnistuttu kehittämään ja kehitetään edelleen. Esimerkkejä jo olemassa olevien ja kehitteillä olevien lääkkeiden kohteista ovat AR:n toiminta, PI3K-Akt -signalointireitti, WNT-signalointi sekä DNA:n korjauksessa tapahtuneet virheet. (Yap TA ja muut 2016)

# OSA II: KOKEELLINEN OSUUS

## JOHDANTO

Työn tarkoituksena oli selvittää miten eturauhassyöpäsolut käyttäytyvät, kun niitä kasvatetaan yhdessä syövän aktivoimien fibroblastien kanssa 3D-kasvatuksissa eli sferoideissa. Kasvaimet koostuvat useista eri solulajeista, ja kasvaimen kehittyminen ei ole yksistään kiinni syöpäsoluista, vaan syöpäsolujen ja muiden ympärillä olevien solujen keskinäisistä vuorovaikutuksista. Kasvaimessa solut voivat olla kosketuksissa toistensa kanssa muodostaen solu-soluliitoksia, sekä tuottavat soluväliaineen proteiineja ja ohjailevat toistensa käyttäytymistä tuottamalla kasvutekijöitä. Kasvaimet kehittyvät näin yhdessä mikroympäristönsä kanssa ja ovat kehityksessään riippuvaisia siitä. 3D-kasvatuksilla, jotka sisälsivät myös fibroblasteja, pyrittiin pääsemään lähemmäksi tilaa, jossa kasvaimen solut luonnollisesti ovat, ja jota 2D-kasvatusmallilla ei pystytä saavuttamaan.

Työssä käytettiin kahta eri kaupallista eturauhassyöpäsolulinjaa, joista toinen oli peräisin aivometastaasista (DU145) ja toinen luumetastaasista (PC3), sekä syöpäpotilaan kasvaimesta eristettyjä fibroblasteja. Sferoideista tutkittiin, miten solut migroivat kollageeni I alustalla ja invasoivat kollageeni I -geeliin, kun niitä kasvatettiin yksin tai yhteisviljelmissä fibroblastien kanssa eri olosuhteissa. Sferoideissa kasvaneiden solujen tuottamaa soluväliainetta tutkittiin proteomiikan ja massaspektrometrian avulla, ja tuloksia vertailtiin eri kasvatusten välillä. Massaspektrometriasta saatuja tuloksia tarkasteltiin lähemmin Western blot -menetelmällä. Lisäksi yhteisviljelmäsferoideista tutkittiin syöpäsolujen ja fibroblastien sijoittumista sferoidissa toisiinsa nähden.

## 7 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 7.1 Solulinjat

#### 7.1.1 Solulinjojen ylläpito

Eturauhassyöpäsolulinjoina käytettiin kaupallisia DU145- ja PC3-soluja (ATCC, *engl.* American type culture collection). Fibroblasteina käytössä olivat eturauhassyöpäpotilaan kasvaimesta eristetyt primaarifibroblastit. Soluja ylläpidettiin Ø 10 cm maljoilla ja kasvatusliuoksena käytettiin RPMI 1640:tä (Lonza), joka sisälsi 10 % (v/v) vasikan sikiön seerumia (*engl.* fetal calf serum, FCS, Biowest), penisilliini-streptomysiini -antibioottia 100 yksikköä/ml ja glutamiinia (Cibco) 2 mM. Solut jaettiin kun maljojen konfluenssi lähenteli 90 %. Solujen irrotuksessa käytettiin trypsiini-EDTA:ta (etyleenidiamiinitetraetikkahappo, Lonza).

#### 7.1.2 $\alpha_2$ -integriinin ja CD44:n ilmentyminen tarkastettiin virtaussytometrillä

DU145- ja PC3-soluja kasvatettiin Ø 10 cm maljoilla 80 % konfluenssiin, pestiin fosfaattipuskiuroidulla suolaliuoksella (PBS, *engl.* phosphate buffer saline Lonza) ja irrotettiin maljoilta. Trypsiini inhiboitiin solujen irrottua lisäämällä trypsiini-inhibiittoria (T9128, Sigma Aldrich) 1mg/ml 1:1 tilavuussuhteessa maljalle, jonka jälkeen solut sentrifugoitiin 500 x g, 4min huoneenlämmössä (RT). Solut suspentoitiin PBS:ään ja laskettiin solulaskurilla (BIO-RAD, TC10) ennen näytteiden valmistamista.

Näytteet valmistettiin niin, että ne sisälsivät 700 000 solua. Oikea määrä soluja lisättiin 1,5 ml eppendorf-putkeen ja pestiin suspensoimalla ne PBS:ään. Soluja sentrifugoitiin 4 min, 500 x g, RT, jonka jälkeen soluille lisättiin blokkauksliuos 1 %(v/v) FCS-PBS. Soluja blokattiin jäillä 30 min epäspesifisten sitoutumisten estämiseksi, jonka jälkeen solut pestiin PBS:llä kuten edellä. Tämän jälkeen soluille lisättiin ihmisen  $\alpha_2$ -integriinin tunnistava hiiren monoklonaalinen primaarivasta-aine (12F1, #555668, BD Pharmingen) 7,5 ng/ml. Näytteitä inkuboitiin 1 h, +4 C, pyörittäjässä. Näytteet pestiin kaksi kertaa PBS:llä kuten edellä ennen aasissa tuotetun hiiren IgG:n tunnistavan polyklonaalisen sekundaarivasta-aine Alexa fluor 647:n (A-31571, Invitrogen) 1,6 ng/ml sekä rotassa tuotettu monoklonaalisen FITC (Fluoresiini-5-isotiosyanaatti)-suorakonjugoidun CD44:n tunnistavan vasta-aineen (ab19622, Abcam) 10 ng/ml lisäystä. Näytteitä inkuboitiin sekundaarivasta-aineen kanssa 40 min, +4 C, pyörytyksessä. Vatsa-aineen epäspesifinen

sitoutuminen määriteltiin värjäämällä kontrollisolut Alexa Fluor 647 sekundaarivasta-aineella 1,6 ng/ml sekä aasissa tuotetulla rotan IgG:n tunnistavalla FITC-konjugoidulla sekundaarivasta-aineella 6 ng/ml. Kaikissa vasta-ainelaimennoksissa käytettiin blokkauksuskuria. Solut pestiin kaksi kertaa kuten aiemmin ja näytteet suspensoitiin PBS:ään mittausta varten. Laitteen kalibrointia varten valmistettiin kummastakin solulinjasta näytteet, joka sisälsivät 600 000 värjäämätöntä solua. Mittaus suoritettiin LSR II (BD Biosciences; FITC:n eksitaatio 488 nm:ssä) virtausytometrillä ja tulokset analysoitiin FlowJo-ohjelmalla (FlowJo, LLC).

### 7.1.3 Mikroskooppinäytteiden valmistus fibroblasteista

Fibroblasteille suoritettiin immunofluoresenssi-värjäys (IF) ennen migraatio- ja invaasiokokeiden aloittamista, jotta voitiin varmistua, että ne todella olivat aktivoituja fibroblasteja. Soluja kasvatettiin peitinlasien päällä Ø 6 cm maljoilla yön yli 400 000 solua/malja. Solut fixattiin peitinlaseille 4 % PFA-PBS:llä (paraformaldehydi) 20 min ja solukalvo tehtiin läpäiseväksi PBST:llä (0,1 % Triton-X-100, PBS) 5 min huoneenlämmössä. Solut huuhdeltiin PBS:llä ja blokattiin 3 % BSA-PBS:llä 1 h RT. Tämän jälkeen soluille lisättiin primaarivasta-aineet: kanin monoklonaalinen alpha sileälihas aktiini ( $\alpha$ SMA, *engl.* alpha smooth muscle actin, ab32575, Abcam) laimennettuna 1:100 3 % BSA-PBS:ssä sekä hiiren monoklonaalinen pan-sytokeratiini (cytokeratin C2562, Sigma) laimennettuna 1:100 3 % BSA-PBS:ssä ja inkuboitiin 1 h RT. Solut pestiin kolme kertaa PBS:llä ja niille lisättiin kanin IgG:n tunnistava polyklonaalinen sekundaarivasta-aine Alexa fluor 555 10ng/ml laimennettuna 3 % BSA-PBS:ssä sekä hiiren IgG:n tunnistava polyklonaalinen sekundaarivasta-aine Alexa fluor 488 10 ng/ml laimennoksena 3 % BSA-PBS:ssä. Solut pestiin kolme kertaa kuten edellä ja niille lisättiin 1:500 laimennettu DAPI (4',6-diamidino-2-fenyylindole, *engl.* 4',6-diamidino-2-fenyylindole) 3 % BSA-PBS:ssä. Soluja inkuboitiin DAPI:n kanssa 10 min RT. Peitinlasit kiinnitettiin objektilaseille solupuoli alaspäin Mowiol-DABCO-peitinaineella (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]).

## 7.2 Migraatio ja invaasio

### 7.2.1 Solujen värjäys

Soluja kasvatettiin Ø 10 cm 80 % konfluenssiin, jonka jälkeen solut värjättiin CellTracker-väriaineilla: fibroblastit oranssilla väriaineella (CMTMR, ret C34551, Invitrogen) ja syöpäsolut vihreällä väriaineella (CMFDA, ret C7025, Invitrogen). Solut värjättiin lisäämällä niille väriaineen sisältävä kasvatusliuos (RPMI 1640; 10 % FCS; 5 µM CellTracker, 14,1 mM DMSO(dimetyylisulfoksidi)). Solujen annettiin värjäytyä inkubaattorissa 1 h. Värjäyksen jälkeen solut huuhdeltiin PBS:llä, ja niiden annettiin palautua 30 min inkubaattorissa väriainetta sisältämättömässä kasvatusliuoksessa (RPMI 1640, 10 % FCS) ennen sferoidien valmistusta.

### 7.2.2 Sferoidien valmistus

Sferoidien valmistusta varten valmistettiin agarosimuotit (2 % [w/v] agarosi; 0,9 % [w/v] NaCl) käyttäen kaupallisia muotteja (MicroTissues 3D Petri Dish micro mold spheroids, Sigma) valmistajan ohjeen mukaan. Agarosimuotteja tasapainotettiin yön yli seerumittomassa kasvatusliuoksessa inkubaattorissa. Seuraavana päivänä kasvatusliuos vaihdettiin muottien ympäriltä ja muotteja tasapainotettiin uudessa kasvatusliuoksessa 30 min inkubaattorissa.

Värjätyt solut irrotettiin maljoilta ja trypsiini inhiboitiin trypsiini-inhibiittorilla. Soluja sentrifugoitiin 4 min, 450 x g, RT. Solut laskettiin solulaskurilla (BIO-RAD, TC10). Soluja lisättiin tasapainotettuihin muotteihin 140 000 kpl/muotti. Yhteisviljelmissä, joissa oli sekä syöpäsolujen että fibroblasteja, soluja lisättiin 280 000 kpl/ muotti, niin että kumpaakin solulinjaa oli 140 000 solua/muotti. Solujen annettiin laskeutua muottien pohjalle 10 min inkubaattorissa ennen kuin muotin ympärille lisättiin seerumitonta kasvatusliuosta. Sferoideja kasvatettiin 72 h inkubaattorissa.

### 7.2.3 Kuoppalevykokeet

96-kuoppalevyn (nunclon delta surface, Thermo Scientific) kuopat päällystettiin kollageeni I:llä (C4243,SIGMA) 5 ng/cm<sup>2</sup> laimennettuna PBS:ään ja levyä inkuboitiin yönyli +4 asteessa. Seuraavana päivänä kuopat pestiin kaksi kertaa PBS:llä ja blokattiin 1 % (w/v) BSA-PBS:llä 1h inkubaattorissa. Blokkauksen jälkeen kuopat pestiin kaksi kertaa PBS:llä. Viimeisen pesun PBS jätettiin kuoppiin ja poistettiin vasta juuri ennen sferoidien

lisäämistä. Valmiit sferoidit siirrettiin kuoppiin niin, että jokaisen kuopan keskellä oli yksi sferoidi.

Migraatiokokeissa kuoppiin asetettujen sferoidien päälle lisättiin varovasti 100 µl seerumitonta keratinosyyttikasvatusliuosta (KSFM, *engl.* keratinocyte serum free - medium). Sferoideja kuvattiin päivittäin 96 h ajan IncuCyte ZOOM:illa, ja solujen migraatio määritettiin laskemalla sferoidien pinta-alan kasvu. Pinta-alat laskettiin kuvista ImageJ-ohjelman avulla.

Invaasio kokeissa kuoppiin sferoidien päälle lisättiin 40 µl kollageeni I -geeliä (2,0 mg/ml naudan ihon kollageeni I (Nutragen, Advanced Biomatrix); 4 mM Tris-HCL pH 7,3; 20 mM NaOH). Geelin annettiin jähmettyä 30 min inkubaattorissa ja 100 µl KSFM:a lisättiin muodostuneen geelin päälle. Sferoidit kuvattiin ja analysoitiin kuten migraatiokokeissa.

Sekä migraatio- että invaasiokokeet suoritettiin kolmella eri tavalla. Askorbiinihapon vaikutusta solujen liikkumisen testattiin lisäämällä sferoidien valmistuksen aikana agarosimuottien ympärille askorbiinihappoa 50 µg/ml sisältävää seerumitonta kasvatusliuosta. Ensimmäinen askorbiinihaponlisäys tehtiin 24 h sferoidien valmistuksesta. Koska askorbiinihappo on epästabiili, kasvatusliuos vaihdettiin päivittäin uuteen askorbiinihappoa sisältävään kasvatusliuokseen. Toisessa koeasetelmassa solut käsiteltiin hydroksiurealla solujen jakautumisen estämiseksi. Soluille annettiin ennen sferoidien valmistusta kasvatusliuosta, joka sisälsi 1 % FCS ja 1mM hydroksiureaa. Soluja inkuboitii 5 h inkubaattorissa ennen solujen värjäystä ja sferoidien valmistusta. Sferoidien valmistuksen jälkeen muottien ympärille lisättiin 0,5 mM hydroksiureaa sisältävää seerumitonta kasvatusliuosta. Kun sferoidit oli siirretty 96-kuoppalevyn kuoppiin, niiden päälle lisättiin KSFM, joka sisälsi 0,5 mM hydroksiureaa. Kontrollikokeissa soluille ei annettu askorbiinihappoa eikä niitä käsitelty hydroksiurealla.

### 7.3 Mikroskooppinäytteiden valmistus sferoideista

Yhteisviljelmäsferoideista, joissa solut oli värjätty kuten, kohdassa 7.2.1 on kuvailtu, valmistettiin mikroskooppinäytteet. Näistä sferoideista määritettiin syöpäsolujen ja fibroblastien sijoittuminen toisiinsa nähden. Agarosimuotit siirrettiin puhtaalle 24-kuoppalevylle ja niiden ympärille lisättiin PBS:ää. Muotit käännettiin ja sferoidit sentrifugoitiin ulos muoteista 30 s, 400 x g. Sferoideja pestiin PBS:llä ja fiksattiin 4 % PFA-

PBS:llä 3h, +4 C. Sferoidit pestiin kaksi kertaa 5 min PBS:llä, siirrettiin objektilaseille ja kiinnitettiin glyserolialla. Näytteet kuvattiin ZEISS LSM780 konfokaalimikroskoopilla.

## 7.4 Massaspektrometrinäytteiden valmistus

### 7.4.1 Sferoidien valmistus ja hypotoninen hajoitus

Sferoidit valmistettiin kuten kohdassa 7.2.2 on kuvattu ja kerättiin 6. päivänä. Sferoideille vaihdettiin uusi askorbiinihappoa sisältävä seerumiton kasvatusliuos päivittäin kuten aiemmin. Jokaista 3D-kasvatusta valmistettiin kolme muottia. Sferoidit kerättiin 24-kuoppalevyyn PBS:ään kuten kohdassa 7.3 ja siirrettiin 1,5 ml *low binding* eppendorf- putkiin. Sferoidit sentrifugoitiin putkien pohjaan 2 min, 12600 x g, jonka jälkeen solukalvon proteiinien liukoiset osat erotettiin solukalvosta lisäämällä jokaiseen näytteeseen 150 µl hypotonista hajoitus -puskuria [10 mM Tris, 1 mM EDTA (etyleenidiamiinitetraetikkahappo), 10µg/ml DNAasi]. Näytteitä inkuboitin yönyli pyörittäjässä +4 C. Sferoidit sentrifugoitiin pohjaan kuten edellä ja pestiin lisäämällä 150 µl hypotonista lyysis puskuria/näyte ja sentrifugoimalla 2 min, 12600 x g. Pesu toistettiin ja pelletti, joka sisälsi liukenemattomat soluväliaineen ja solukalvon proteiinit, otettiin talteen.

### 7.4.2 Peptidien valmistelu

Hypotonisen lyysisen jälkeen sferoideista muodostuneiden pellettien päälle lisättiin liuosta, joka sisälsi 8 M ureaa ja 100 mM ammoniumbikarbonaattia, ja tämän jälkeen liuosta, joka sisälsi 100 mM DTT:tä (ditiotreitoli, *engl.* dithiothreitoli), 100 mM ammoniumbikarbonaattia, pH 8.0. Lopullinen DTT-konsentraatio näytteissä oli 10 mM. Näytteitä inkuboitin 2h, +37 C, pyörittäjässä ja proteiinikonsentraatiot tarkistettiin Bradford-testillä (BIO-RAD) valmistajan ohjeen mukaan. Rikkisiltojen muodostuminen estettiin lisäämällä jodiasetamidia näytteisiin niin, että sen loppupitoisuus oli 40 mM. Näytteitä inkuboitin 30 min huoneenlämmössä valolta suojattuna. Jodiasetamidi inhiboitiin nostamalla näytteiden DTT-pitoisuus 30 mM:iin.

Näytteisiin lisättiin Trypsiini/Lys C -proteaasia (Promega) niin, että entsyymin pitoisuus näytteessä oli 1/25 näytteen proteiinipitoisuudesta. Aluksi entsyymiä lisättiin puolet tästä määrästä ja näytteitä inkuboitin 4h, +37 C, pyörittäksessä. Näytteen ureapitoisuus laskettiin 0,6 M:iin ja trypsiini uudelleen-aktivoitiin lisäämällä näytteisiin 100 mM:sta

ammoniumbikarbonaattia niin, että sen loppu pitoisuus näytteissä oli 80 mM. Toinen puoli Trypsiini/Lys C -entsyymiä lisättiin näytteisiin ja inkuboitiin yön yli, +37 C, pyöryksessä. Peptidit konsentroitiin 10K Microcon suodattimilla (MERK) valmistajan ohjeen mukaan. Näytteet sentrifugoitiin suodattimien läpi 40 min, 14000 x g.

#### 7.4.3 Suolan poisto näytteistä

Peptidien konsentroidin jälkeen aloitettiin suolan poisto näytteistä lisäämällä niihin trifluoretikkahappoa (TFA, *engl.* trifluoroacetic acid) niin, että sen pitoisuus näytteissä oli 1 % ja pH alle 3. Suolan poistossa käytettiin itse tehtyjä stop-and-go -poisto-kärkiä (StageTip), jotka valmistettiin 200 µl pipetinkärjistä. Kärkiin lisättiin 3 kappaletta Empore C18 3M kiekkoja, jotka leikattiin sopivan kokoisiksi isommasta kiekosta. Valmistetut StageTipsit asetettiin 1,5 ml eppendorf-putkiin, joiden kanteen oli tehty reikä (halkaisija 4,5 mm). StageTipsit aktivoitiin asetonitriilillä (AN) ja tasapainotettiin puskuri 1:llä (0,1 %[v/v] TFA, 2 %[v/v] AN). StageTipsejä sentrifugoitiin 1 min 1700 x g ennen näytteen lisäämistä. Näytteet lisättiin 200 µl erissä ja sentrifugoitiin 3 min 1700 x g. Kun koko näyte oli ajettu StageTipsin läpi, C18 kiekot pestiin puskurilla 1 ja peptidit eluointiin puskurilla, joka sisälsi 65 %(v/v) AN ja 0,2 %(v/v) muurahaishappoa. Pesu ja eluointi suoritettiin ruiskun avulla, jotta C18-kasettien kuivuminen pystyttiin välttämään.

Suolan poiston jälkeen näytteet kuivattiin Speed-vacuum -laitteella ja liuotettiin 1 %(v/v) muurahaishappoon. Proteiinipitoisuus näytteissä pyrittiin saamaan lähelle 200 ng/µl ja pitoisuudet tarkistettiin NanoDrop-laitteella. Lopuksi ennen massaspektrometrilaitteella ajoa, näytteet tehtiin happamiksi lisäämällä niihin TFA:ta niin, että sen lopullinen pitoisuus näytteissä oli noin 0,5 % ja pH alle 3.

#### 7.5 Kollageeni XVIII:n ilmeneminen tarkastettiin Western Blot-menetelmällä

Näytteitä varten valmistettiin sferoidit kuten kohdassa 7.2.2 kolme muuttia/näyte. Sferoideille vaihdettiin uusi askorbiinihappokasvatusliuos päivittäin. Kun sferoidit olivat kasvaneet kuusi päivää, muotit siirrettiin puhtaaseen 24-kuoppalevyn kuoppiin ja sferoidit sentrifugoitiin ulos muoteista kuten kohdassa 1.3. Sferoidit siirrettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin 2 min, 12600 x g. Sferoidit suspentoitiin hypotoniseen hajoitus-puskuriin ja näytteiden valmistamista jatkettiin kuten kohdassa 7.4.1.



Hypotonisen hajoituksen jälkeen sferoidit sentrifugoitiin 2 min, 12600 x g. Saatu pelletti suspentoitiin 40 µl RIPA-puskuriin (Pierce RIPA Buffer, Thermo Scientific). Näytteisiin lisättiin 20 µl SDS-näytepuskuriä (30 % [v/v] glyseroli; 10 % [w/v] natriumdodekyylisulfaatti [SDS]; 9,3 % [w/v] DTT; bromofenolisininen; 0,35 M Tris-HCl pH 6,8). Näytteitä keitettiin 5 min 95 C ja sentrifugoitiin kevyesti. Näytteet ladattiin 12 %:n SDS-PAGE-geelille (ylägeeli: 4 % [w/v] akryyliamidibisakryyliamidi [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 alägeeli: 12 % [w/v] akryyliamidi bisakryyliamidi; 0,4 M Tris-HCl pH 8,8; 0,033 % [w/v] APS; 0,067 % [w/v] TEMED) 25 µl näytettä/kaivo. Proteiinien koon määrittämiseksi yhteen kaivoista lisättiin molekyylipainostandardi (Bluestar Prestained Protein Marker Plus, Nippon Genetics). Näytteitä ajettiin ensin 30 min 75 V:lla ja sitten 2,5 h 115 V:lla ajopuskurissa (25 mM Tris(hydroksimetyyli)aminometaani(Tris); 12,5 mM glysiini; 3,5 mM SDS).

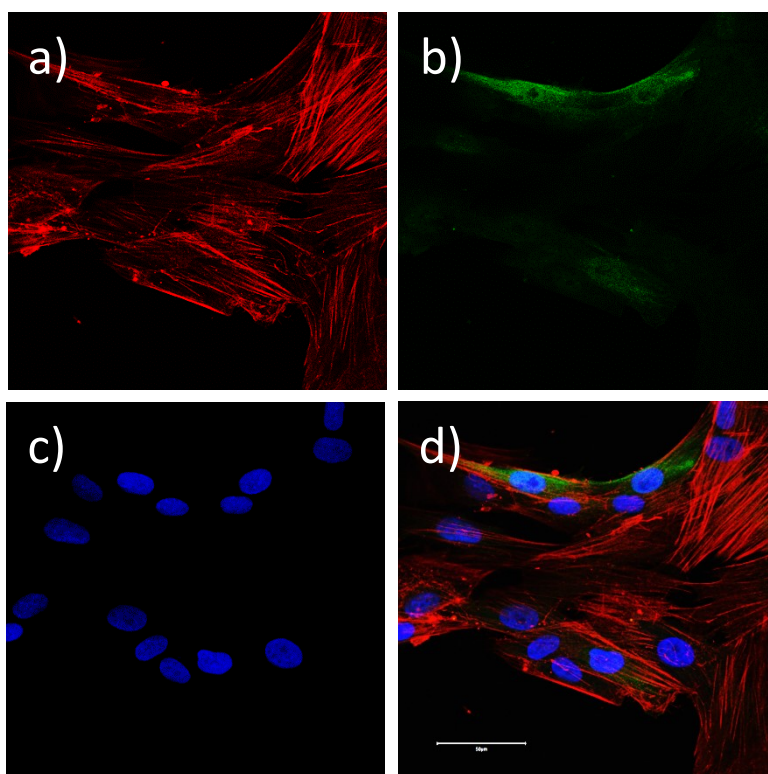
Proteiinit siirrettiin nitroselluloosamembraanille (NitroBind, Cast, Pure Nitrocellulose, 0,22 Micron, GVS North America) märkäsiirrostuksena 100 min, 350 mA siirrostuspuskurissa (25 mM Tris; 12,5 mM glysiini; 20 % [v/v] metanoli). Membraani pestiin TBST-puskurilla (150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20; 10 mM Tris, pH 7,5) ja blokattiin blokkauspuskurilla (5 % [w/v] milk-TBST) 1 h, RT. Membraania pestiin 3 x 15 min TBST:llä tasoravistelijassa ennen primaarivasta-aineen lisäämistä. Vasta-aineena käytettiin ihmisen ja hiiren endostatiinin tunnistavaa vasta-ainetta (Pierce Endostatin PA1-601, Thermo Fisher Scientific) laimennettuna 1:1000 5 % (w/v) BSA-TBST:hen. Membraania inkuboitiin yön yli, +4 C, pyörityksessä. Pesut toistettiin kuten edellä ja lisättiin sekundaarivasta-aine (926-32212, LI-COR) laimennettuna 1:8000 5 % (w/v) BSA-TBST:hen. Membraani pestiin kuten aiemmin ja kuvattiin Odyssey LCx -kuvauslaitteella (LI-COR). Näytteiden lataus tarkistettiin värjäämällä membraanilta β-aktiini (A1978, MERK). Membraani siirrettiin 1:80 000 laimennettuun primaarivasta-aineeseen ja inkuboitiin 1h, RT. Membraani pestiin kuten aiemmin, siirrettiin sekundaarivasta-aineeseen (926-68072, LI-COR) ja kuvattiin kuten aiemmin. Tulokset analysoitiin Image studio -ohjelmistolla (LI-COR).

## 8 TULOKSET

### 8.1 Syöpäkasvaimen fibroblastit ilmentävät $\alpha$ SMA:ta

Ennen sferoidikokeiden aloitusta kudoksenäytteistä eristetyistä soluista värjättiin  $\alpha$ SMA ja pan-sytokeratiini, jotta saatiin varmuus siitä, että solut todella olivat aktivoituja fibroblasteja.  $\alpha$ SMA:ta on yleisesti käytetty aktivoitujen fibroblastien, sekä myofibroblastien tunnistamisessa. Pan-sytokeratiinia käytettiin värjäyksessä negatiivisena kontrollina, sillä fibroblasteissa sen ilmeneminen on heikkoa (Shiga K ja muut 2015).

$\alpha$ SMA-värjäys paljasti kaikista soluista hyvin erottuvat proteiinisäikeet, jotka muodostivat selkeän verkon solun sisälle. Pan-sytokeratiini -värjäys soluissa oli heikkoa ja värjäys näkyi vain muutamissa soluissa suttuisena ja harsomaisena tuman ympärillä sytosolissa. Selvää sytokeratiiniverkkoa, joka yleensä muodostuu sytokeratiinia tuottavien solujen sisälle tuman ympärille, ei havaittu (Kuva 6).



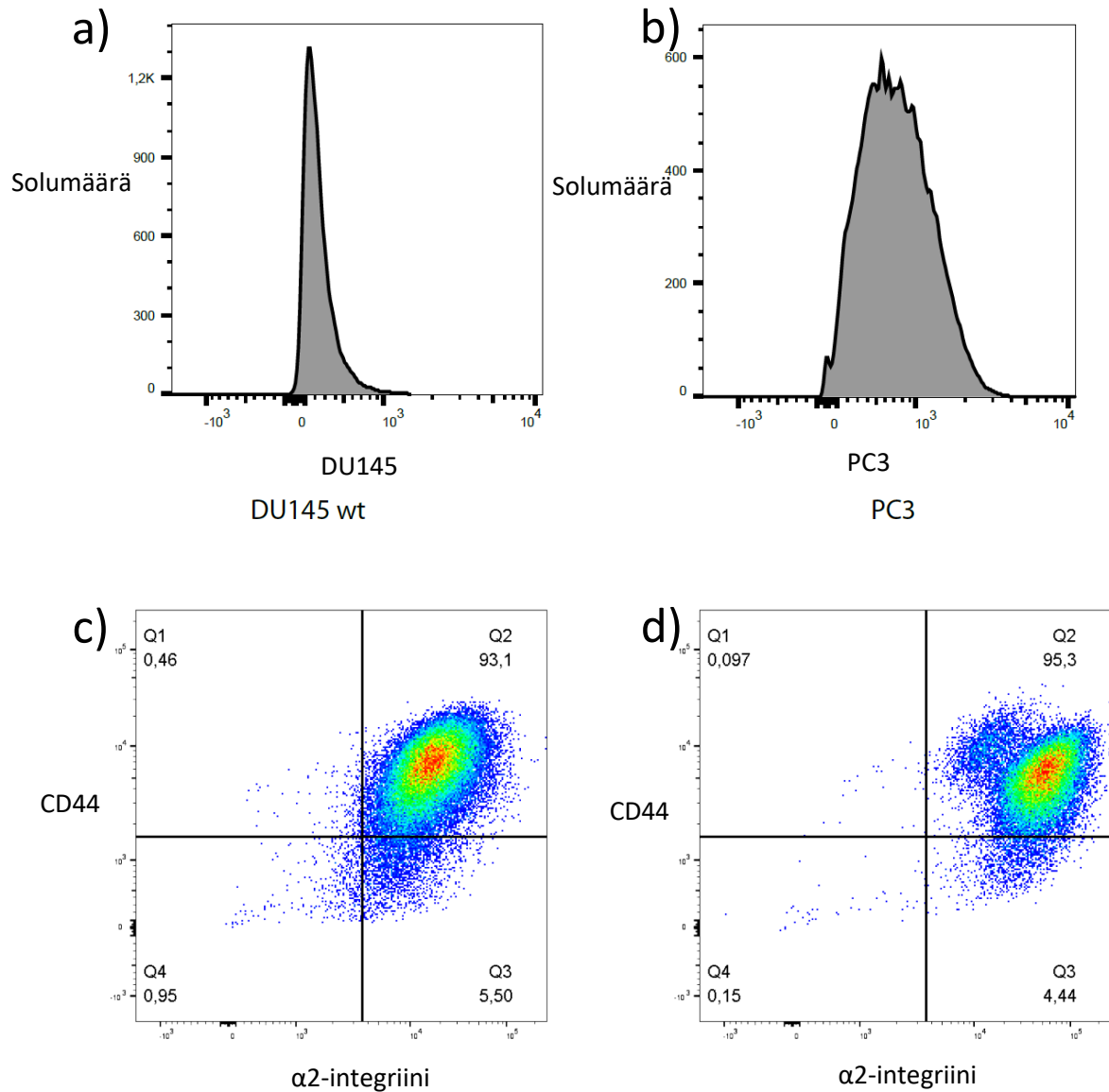
**Kuva 6** a) Alpha SMA ja b) pan-sytokeratiini värjättiin eturauhassyöpäkudoksesta eristetyistä fibroblasteista ennen kokeiden aloittamista. c) Soluista värjättiin myös tumat (DAPI=sininen). d) Kaikki värit yhdistettynä. Kuvan mittakaava 50  $\mu$ m.

## 8.2 PC3-solut ilmentävät DU145-soluja enemmän $\alpha 2$ -integriiniä

Kahdesta käytetystä kaupallisesta eturauhassyöpäsolulinjasta PC3-solujen oletettiin olevan metastaattisempi solulinja. Koska eturauhassyöpäsolujen pinnallaan ilmentämä  $\alpha 2\beta 1$ -integriini on välttämätön, jotta syöpäsolujen olisi mahdollista muodostaa etäpesäke luuhun, tarkastettiin  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin esiintyminen kummastakin solulinjasta virtaussytometrialla.

$\alpha 2$ -integriini esiintyy dimeerinä ainoastaan  $\beta 1$ -integriinin kanssa, joten solujen  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien ilmentymistä tarkasteltiin värjäämällä soluista  $\alpha 2$ -integriini. Soluista tarkastettiin myös adheesioreseptori CD44:n ilmentyminen. CD44:n on todettu säätelevän syövän kehitystä sekä metastaasia, ja syöpäsolut usein ilmentävät sitä suuria määriä (Senbanjo LT ja Chellaiah MA 2017).

Tulosten perusteella PC3-solut olivat heterogeenisempiä  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ilmenemisen suhteen, kuin DU145-solut. CD44:n ilmentymisen ei todettu olevan riippuvainen  $\alpha 2$ -integriinin ilmentymisestä, vaan molemmat solulinjat ilmensivät CD44:ä yhtä paljon, vaikka  $\alpha 2$ -integriinin ilmeneminen erosi solulinjojen välillä. Kuvassa 7 on esitettyinä virtaussytometrialla saadut tulokset  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja CD44 ilmentymisestä DU145- ja PC3-soluissa.



**Kuva 7** Solujen  $\alpha 2$ -integriniin ilmentyminen tarkistettiin DU145- ja PC3-soluista virtausytometrillä. **a)** DU145-solut ilmensivät  $\alpha 2$ -integriniä tasaisemmin kuin **b)** PC3-solut. CD44 värjättiin soluista samanaikaisesti  $\alpha 2$ -integriniin kanssa, jotta proteiinien ilmenemistasoja voitaisiin vertailla keskenään. **c)** DU145-solujen CD44 ilmentäminen ei eronnut **d)** PC3-soluista, joten CD44:n ja  $\alpha 2$ -integriniin ilmentymisen ei todettu olevan riippuvaisia toisistaan.

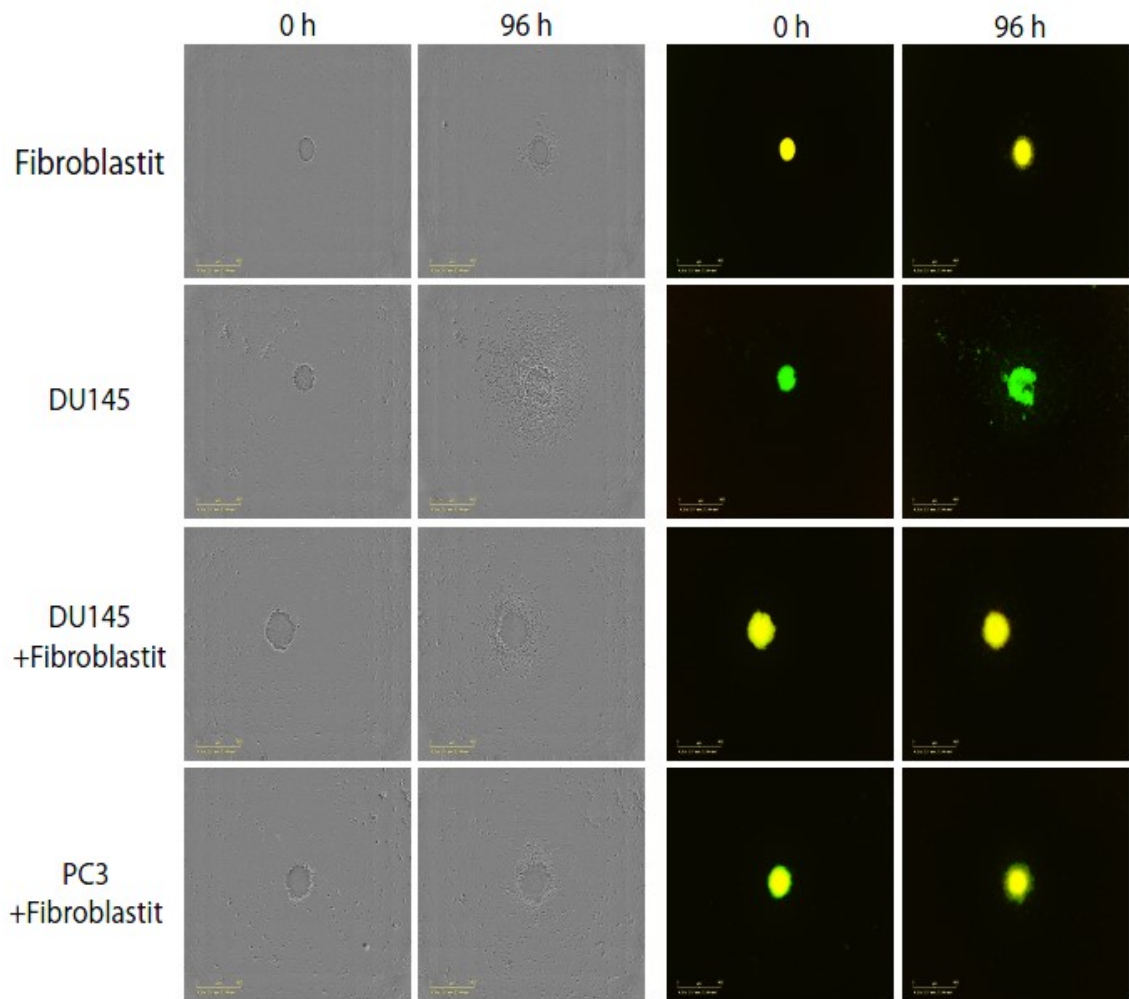
### 8.3 Aktivoidut fibroblastit lisäsivät DU145-solujen liikkumista kollageeni I:ssä

Solujen liikkumista eli migraatiota ja invaasiota tarkasteltiin asettamalla valmistetut sferoidit kollageeni I:llä päällystettyihin 96-kuoppalevyn kuoppiin. Migraatiota mittaavissa kokeissa sferoidin päälle kuoppaan lisättiin KFSM:ta, kun taas invaasiokokeissa sferoidin päälle lisättiin kollageeni I -geeli, jonka päälle kasvatusliuos lisättiin. Solujen liikkumista sferoideista seurattiin päivittäin kuvaamalla sferoideja viiden päivän ajan ja analysoimalla sferoidien pinta-alan kasvu tänä aikana. Kokeet suoritettiin kolmella eri tavalla. Joko sferoideille ei annettu mitään, niille annettiin askorbiinihappoa lisäämään solujen omaa kollageenin tuotantoa tai solut käsiteltiin hydroksiurealla solunjakautumisen estämiseksi.

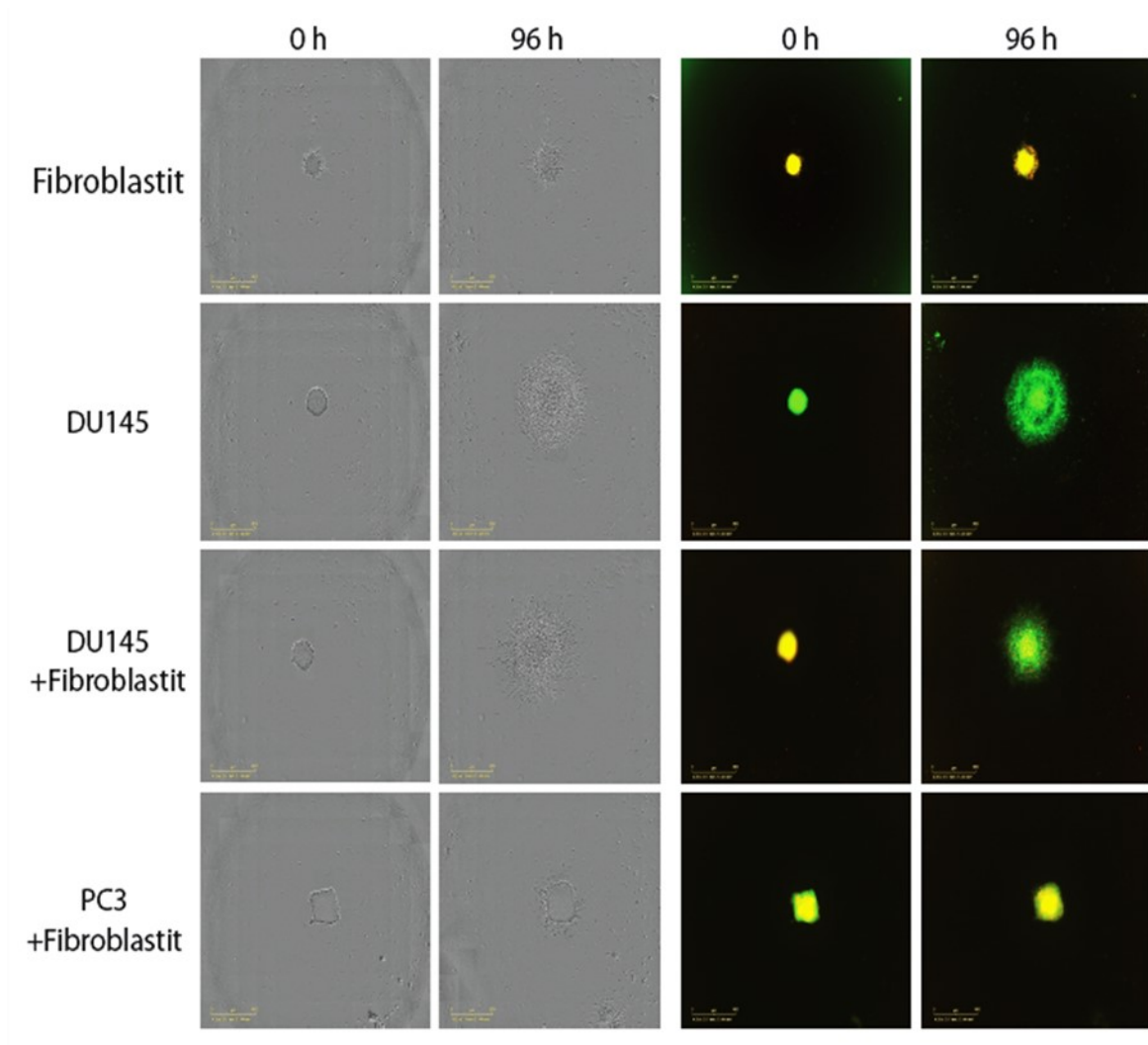
Migraatiokokeissa DU145-soluja sisältävien sferoidien pinta-ala kasvoi huomattavasti enemmän kollageeni I:llä, kuin DU145+fibroblastit -sferoidien pinta-ala, kun soluille ei annettu askorbiinihappoa eikä niitä käsitelty hydroksiurealla. Askorbiinihapon kanssa suoritettussa kokeessa ero oli pienempi. Kun solut käsiteltiin hydroksiurealla, DU145+fibroblastit -sferoidien solut liikkuivat enemmän kuin DU145-solut yksinään. Kuvassa 8 on esitettyinä esimerkkikuvat kokeesta, jossa soluja ei käsitelty mitenkään. Esimerkkikuvat migraatiokokeista, joissa soluille annettiin askorbiinihappoa tai hydroksiureaa ovat esitettyinä liitekuviissa 1 ja 2.

Invaasiokokeissa DU145+fibroblastit -sferoidien pinta-ala kasvoi toistuvasti enemmän, kuin sferoidien, jotka sisälsivät ainoastaan DU145-soluja tai ainoastaan fibroblasteja. Askorbiinihapolla ja hydroksiurealla oli invaasiokokeissa samanlainen vaikutus, kuin niillä oli ollut migraatiokokeissa. Askorbiinihapon ja hydroksiurean antaminen sferoidille lisäsi eroa DU145+fibroblastit- ja DU145-sferoidien välillä. Esimerkkikuvat invaasiokokeesta, jossa ei käytetty askorbiinihappoa tai hydroksiureaa on esitettyvä kuvassa 9. Esimerkkikuvat askorbiinihapo- ja hydroksiureakokeista on esitettyinä liitekuviissa 3 ja 4.

PC3-soluilla fibroblastien vaikutusta solujen liikkumiseen sferoideista ei pystytty suorittamaan, sillä PC3-solut eivät muodostaneet sferoideja ilman fibroblasteja.

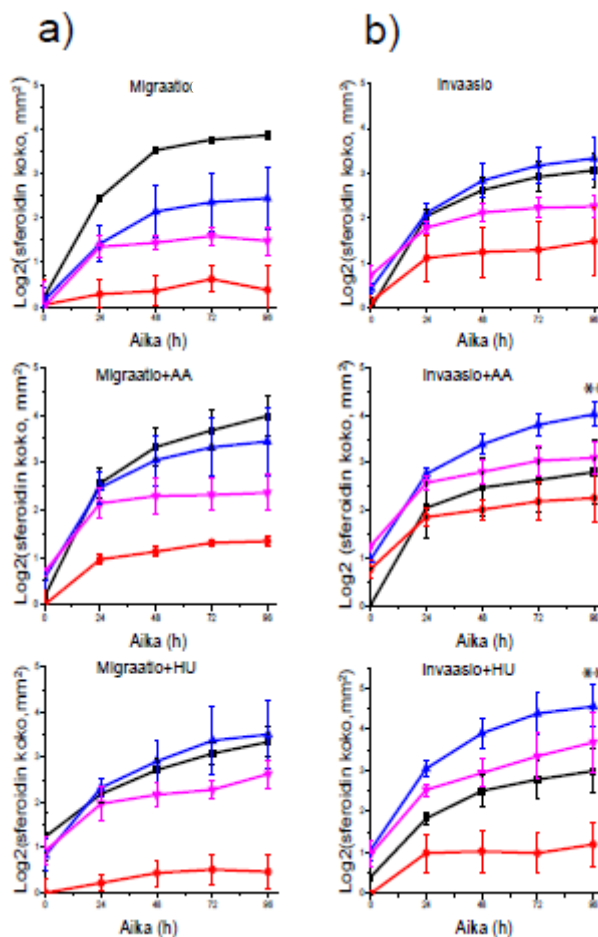


**Kuva 8** Migraatiokoe, jossa soluille ei annettu askorbiinihappoa eikä hydroksiureaa. Vasemmalla puolella faasikontrastikuvat kaikista näytteistä aikapisteissä 0 h ja 96 h. Oikealla puolella kuvat värien kanssa: syöpäsolut vihreällä ja fibroblastit keltaisella. Solut liikkuivat eniten sferoideista, jotka sisälsivät ainoastaan DU145-soluja. Vähiten solut liikkuivat sferoideista, jotka sisälsivät ainoastaan fibroblasteja. Solujen sijoittuminen yhteisviljelmäsferoideissa on nähtävissä jo näissä kuvissa, mutta varmistettiin myöhemmin vielä konfokaalimikroskoopilla. PC3+Fibroblastit -sferoideissa syöpäsolut asettuivat selkeästi enemmän sferoidin ulkoreunalle. Mittakaava 800 µm.

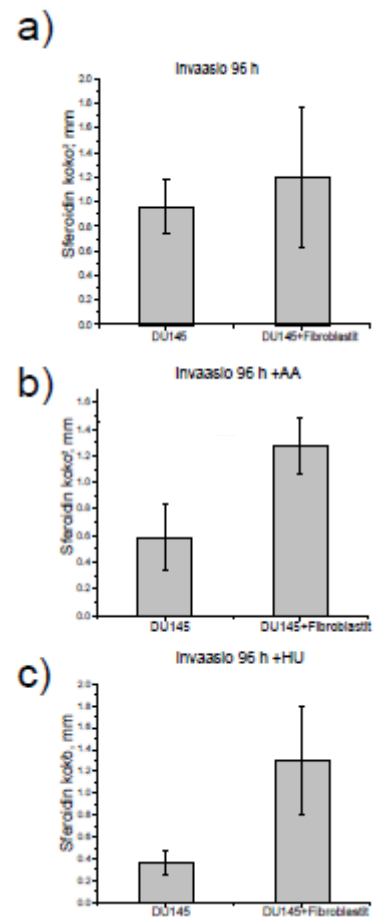


**Kuva 9** Invaasiokoe, jossa soluille ei annettu askorbiinihappoa eikä niitä käsitelty hydroksiurealla. Vasemmalla puolella faasikontrastikuvat kaikista näytteistä aikapisteissä 0 h ja 96 h. Oikealla puolella kuvat värien kanssa, kuten migraatiokuvissa. Kun kaikkien toistojen rinnakkaisten sferoidien pinta-alojen kasvusta otettiin keskiarvo, DU145+Fibroblastit -yhteisviljelmien solut liikkuvat enemmän kuin DU145-sferoidien solut. Kun soluille annettiin askorbiinihappoa tai ne käsiteltiin hydroksiurealla, ero muuttui merkitseväksi (Liitekuvat 3 ja 4). Pelkkiä fibroblasteja sisältävien sferoidien solut invasoivat heikosti kollageeni I -geeliin 96 h aikana. Mittakaava 800 µm.

Kuvassa 10 on esitettyä kuvaajat migraatio- ja invaasiokokeiden kaikkien toistojen rinnakkaisten näytteiden keskiarvoista normalisoituna Log2:lla. Jokaisesta aikapisteestä on laskettu lisäksi keskivirhe. DU145-sferoidien ja DU145+fibroblastit -sferoidien pinta-alojen keskiarvot invaasiokokeiden kaikista rinnakkaisista aikapisteissä 96 h on esitettyä kuvassa 11.



**Kuva 10 a)** Migraatio- ja invaasiokokeiden tulokset kaikissa koeasetelmissä. Musta = DU145, sininen = DU145+fibroblastit, magenta = PC3+fibroblastit ja punainen = Fibroblastit. Ylimpänä kontrollikokeen kuvaaja, keskellä askorbiinihapolla suoritettu koe ja alimpana hydroksiurealla suoritettu koe. **b)** invaasiokokeiden tulokset samassa järjestyksessä. Invasio +askorbiinihappo (AA) ja +hydroksiurea (HU) kokeissa DU145- ja DU145+fibroblastit -sferoidien pinta-alojen kasvun välillä ero oli merkitsevä 96 h aikapisteessä. ANOVA p=0,004 ja p=0,002.



**Kuva 11** DU145- ja DU145+fibroblastit sferoidien koon välinen ero invaasio kokeiden 96 h aikapisteessä. **a)** käsittelemättömät solut, **b)** +AA ja **c)** +HU.



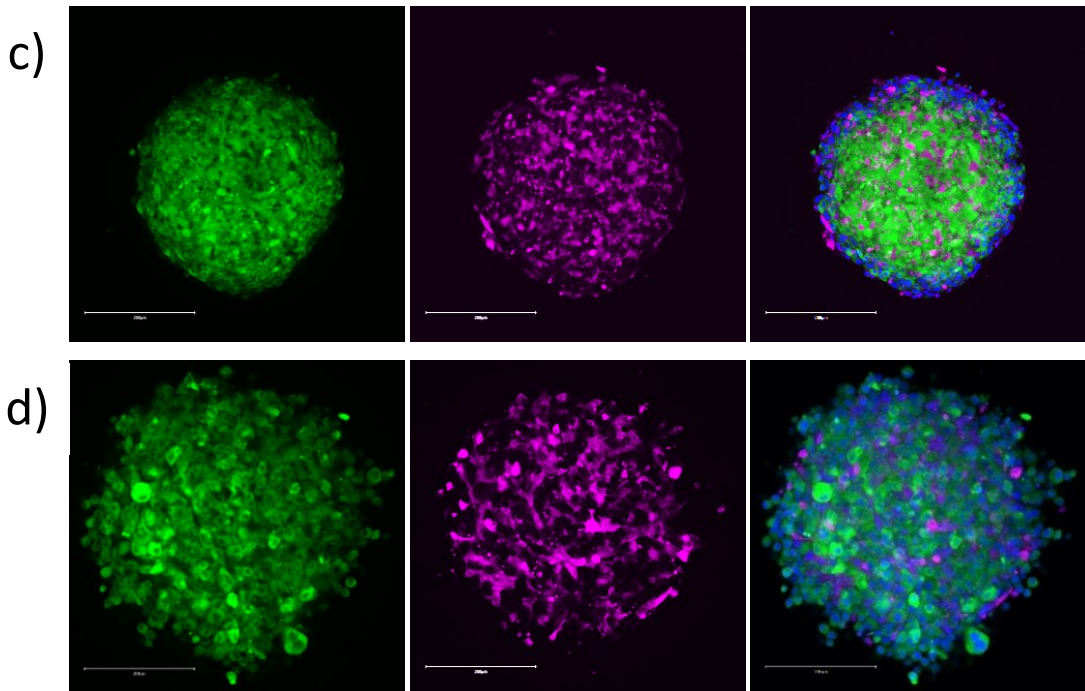
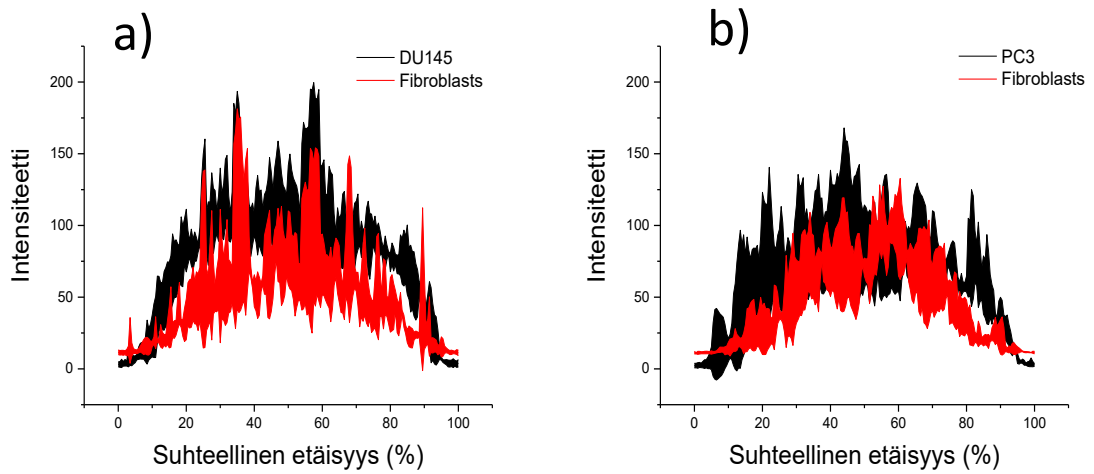
Sferoidit, jotka sisälsivät ainoastaan fibroblasteja, liikkuivat vähiten verrattuna kaikkiin muihin sferoideihin kaikissa koeasetelmissa. Migraatiokokeissa fibroblastisferoidit eivät liikkuneet lähes lainkaan ja invaasiokokeissa vain vähän enemmän.

#### 8.4 Fibroblastien sijoittuminen sferoideissa erosi, kun niitä kasvatettiin yhdessä eri syöpäsolujen kanssa

Syöpäsolujen ja fibroblastien sijoittumista yhteisviljelmäsferoideissa tutkittiin vertailemalla DU145+fibroblastit -sferoideja PC3+fibroblastit -sferoideihin. Solut oli värjätty CellTrackereilla niin, että yhteisviljelmistä oli mahdollista erottaa kummankin solulinjan yksilöt toisistaan, ja missä kohdassa sferoidia ne sijaitivat. Syöpäsolujen värjäyksessä oli käytetty vihreää merkkiainetta ja fibroblastien värjäyksessä oranssia merkkiainetta. Sferoideja analysoitiin kolmesta eri kokeesta.

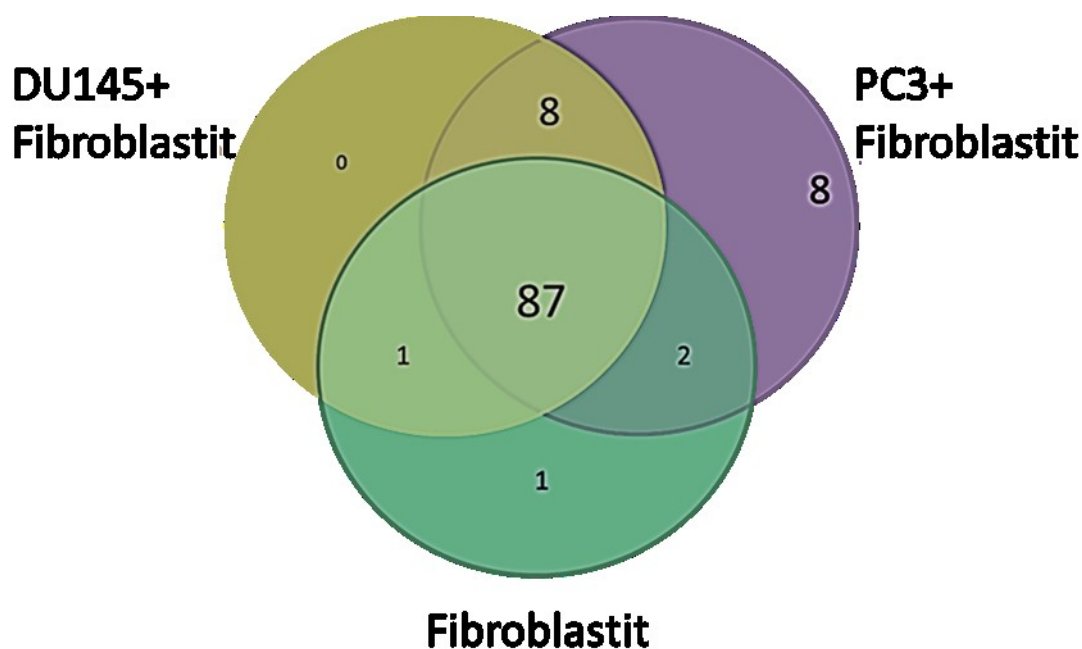
Jo migraatio- ja invaasiokokeissa kuvatuista yhteisviljelmäsferoideista huomattiin fibroblastien sijoittumisen sferoideissa eroavan, kun niitä kasvatettiin yhdessä eri syöpäsolulinjojen kanssa. DU145-solujen kanssa fibroblastit sijoittuivat enemmän sferoidin reunaosiin ja ympäröivät sferoidia muodostaen kapselimaisen rakenteen sferoidin ympärille. DU145-solut olivat keskittyneet tasaisesti sferoidin sisälle yhdessä fibroblastien kanssa. Sferoidien solut olivat pakkautuneet tiiviiksi palloksi.

PC3-solujen kanssa fibroblastit sijoittuivat enemmän sferoidin keskiosaan ja PC3-solut olivat sferoidissa uloimpana. Sferoidit vaikuttivat myös löyhemmiltä kuin DU145+fibroblastit -sferoidit. Kuvatut sferoidit normalisoitiin koon ja värjättyjen solujen antamien intensiteettien mukaan, ja niistä analysoitiin solujen sijoittumista sferoideissa osoittavat kuvaajat, jotka on esitetty kuvassa 12.



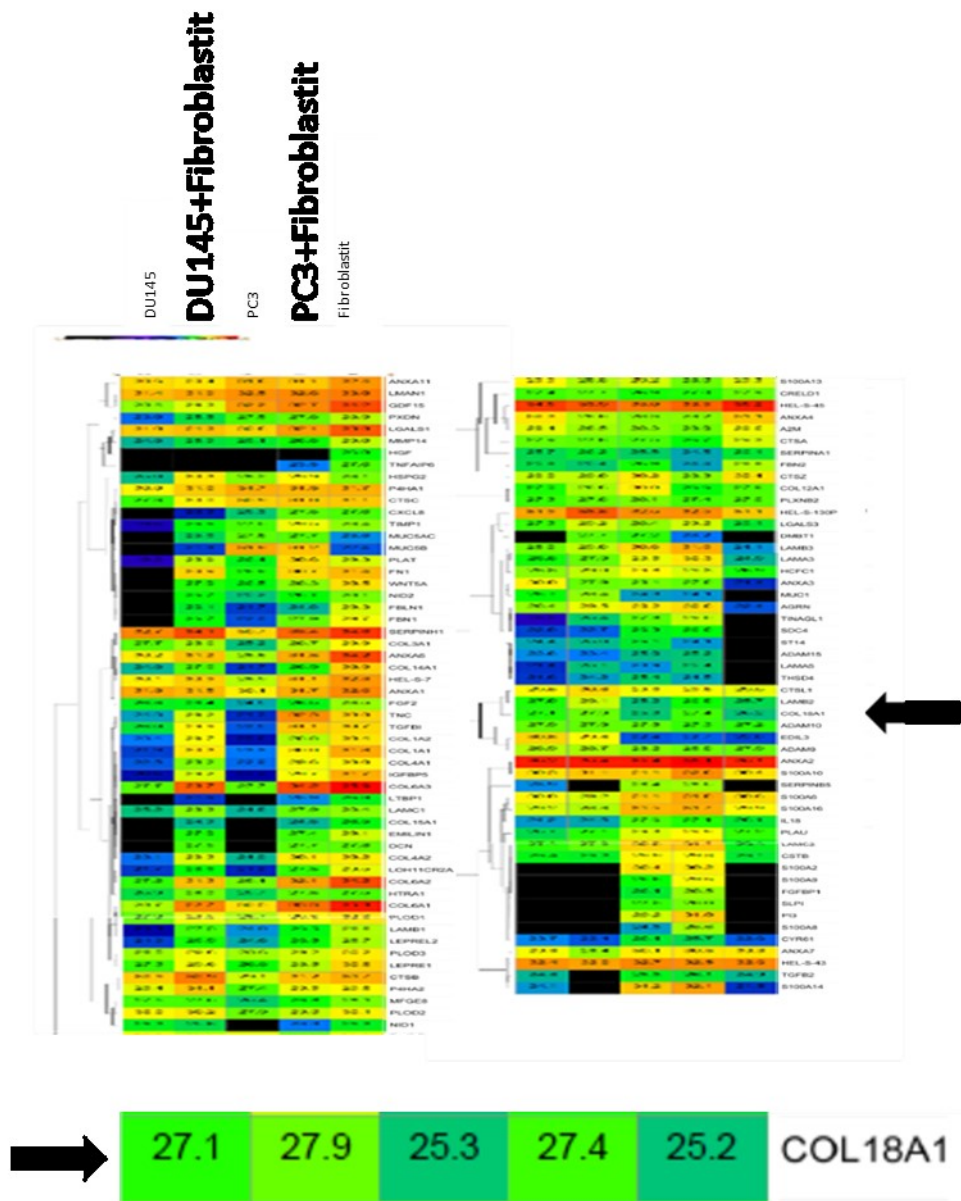
**Kuva 12** Yhteisviljelmä-sferoidien **a)** DU145+Fibroblastit ja **b)** PC3+Fibroblastit, solujen sijoittumista sferoideissa kuvaavat profiilit. Profiileissa sferoidit on normalisoitu solujen antamien intensiteettien ja sferoidien koon mukaan. N=15. Alla esimerkkikuvat analysoiduista sferoideista. Vihreä=syöpäsolut (DU145 tai PC3) ja magenta=fibroblastit. Vasemmalla värityksessä tumat värjättyinä (DAPI=sininen). **c)** DU145 yhdessä fibroblastien kanssa ja **d)** PC3-solut yhdessä fibroblastien kanssa. Mittakaava on 100  $\mu\text{m}$ .

8.5 Endostatiinin ilmentäminen oli kohonnut yhteisviljelmäsferoideissa Sferoidien soluväliaineen proteiinien ja niiden erojen tarkastelu yksöis- ja yhteisviljelmien välillä aloitettiin valmistamalla sferoideista näytteet massaspektrometriaa varten. Näytteistä löytyi yhteensä 107 soluväliaineen proteiinia. Eroihin, joita havaittiin yhteisviljelmäsferoidien välillä migraatio- ja invaasiokokeissa, pyrittiin ensin löytämään selitys vertailemalla yhteisviljelmäsferoidien ilmentämiä proteiineja toisiinsa sekä fibroblastisferoidien ilmentämiin proteiineihin. Vertailun tulokset on esitetty kuvassa 13.



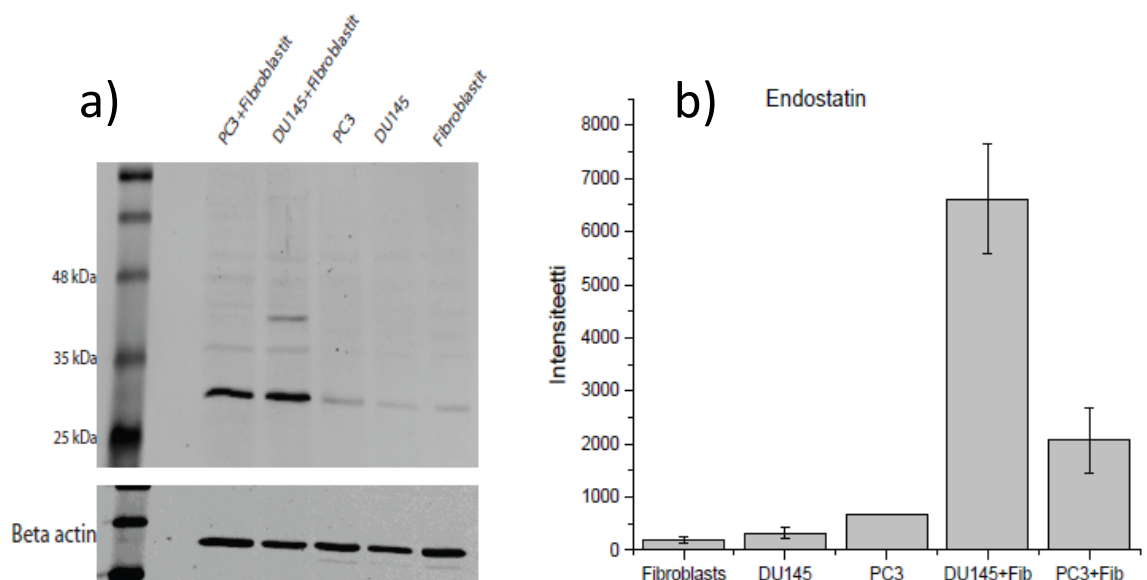
**Kuva 13** Venn-diagrammissa on esitetty, miten paljon samoja proteiineja yhteisviljelmäsferoidit (DU145+fibroblastit ja PC3+fibroblastit) sekä fibroblasti-yksöisviljelmäsferoidit ilmentävät, ja kuinka moni proteiini on spesifinen ainoastaan tietyille sferoideille. **PC3-solut:** SERPINB5, SLPI, PI3, S100A9, S100A2, S100A8, FGFBP1 ja S100A14; **Fibroblastit:** HGF; **DU145+fibroblastit ja PC3+fibroblastit:** LAMA5, THSD4, TINAGL1, DMBT1, ST14, ADAM15, MUC1 ja SDC4; **DU145+fibroblastit ja Fibroblastit:** A2M; **PC3+fibroblastit ja Fibroblastit:** TNFAIP6 ja TGFB2.

Migraatio- ja invaasiokokeiden tuloksiin haettaessa selitystä, tarkasteltiin myös niitä proteiineja, joita massaspektrometrituloksien perusteella tuottivat kaikki sferoidit. Näistä proteiineista kollageeni XVIII valittiin lähempään tarkasteluun, sillä sen pitoisuus oli massaspektrometritulosten perusteella kasvanut molemmissa yhteisviljelmissä verrattuna yksöisviljelmiin (Kuva 14).



**Kuva 14** Kollageeni XVIII valittiin lähempään tarkasteluun, sillä sen ilmenemisen todettiin lisääntyvän yhteisviljelmissä verrattuna yksöisviljelmiin. Kuvassa on yläpuolella esitetty kaikki massaspektrometrin antamat proteiinit kaikille näytteille. Alapuolella on suurennettuna kollageeni XVIII:n tulokset. Yhden numeron ero kahden näytteen välillä tarkoittaa kaksinkertaista eroa näytteiden välillä.

Kollageeni XVIII ilmenemistä tarkasteltiin lähemmin Western-blot -menetelmällä (WB) ja vasta-aineena käytettiin kollageeni XVIII:n proteolyttisesti katkaistun osan, endostatiinin tunnistavaa vasta-ainetta (Kuva 15). Vasta-aine tunnisti membraanilta noin 30 kDa kokoisen proteiinin, jonka oletettiin olevan joko endostatiini, neostatiini-7 tai neostatiini-14. Yhteisviljelmäsferoideissa väräyksen intensiteetti oli suurempi kuin yksöisviljelmäsferoideissa, kuten massaspektrometritulosten perusteella oli odotettavissa. Erityisen suuren eron antoi DU145+fibroblastit -sferoidit kun niitä verrattiin DU145- tai fibroblastisferoideihin. Myös PC3+fibroblastit -sferoideissa endostatiini vasta-aineen tunnistaman proteiinin ilmentyminen oli korkeampi kuin PC3- tai fibroblastisferoideissa.



**Kuva 15** Western blot -analyysi kollageeni XVIII:n proteolyttisesti katkaistusta fragmentista endostatiinista. **a)** Endostatiini vasta-aine tunnisti membraanilta noin 30 kDa kokoisen proteiinin, joka näkyi kaikissa näytteissä. Yhteisviljelmissä muodostuneet proteiini-vyöhykkeet olivat voimakkaampia kuin yksöisviljelmissä ja DU145+fibroblastit -näytteessä noin 40 kDa kohdalle muodostui vyöhyke, jota ei muissa näytteissä ollut. Näytteen lataus tarkistettiin beta-aktiinin avulla. **b)** Western blot -analyysi toistettiin kolme kertaa ja näistä kolmesta toistosta analysoitiin proteiinin suhteelliset määrät vyöhykkeiden intensiteeteistä. Näytteiden endostatiini vyöhykkeet suhteutettiin saman näytteen  $\beta$ -aktiini vyöhykkeiden intensiteettiin ja näytteille laskettiin keskiarvo.

## 9 TULOSTEN TARKASTELU

### 9.1 Kudosnäytteistä eristetyt solut olivat aktivoituja fibroblasteja

$\alpha$ SMA sekä pan-sytokeratiini ovat säikeitä muodostavia proteiineja, jotka osallistuvat solujen solutukirangan rakentumiseen tietyissä soluissa.  $\alpha$ SMA:n ilmentyminen on korkealla myofibroblasteissa sekä aktivoiduissa fibroblasteissa. Pan-sytokeratiini taas on epiteeli- ja endoteelisoluille tyypillinen proteiini, jota fibroblastit eivät ilmennä, ja siksi sitä käytetään usein negatiivisena markkeriproteiinina aktivoiduille fibroblasteille yhdessä jonkin positiivisen merkkiproteiinin kanssa. Aktivoiduiksi fibroblasteiksi kutsutaan kasvaimen fibroblasteja, jotka syöpäsolujen tuottamat kasvutekijät ovat aktivoineet muistuttamaan kudsvaurion aikana aktivoituneita fibroblasteja ja myofibroblasteja (Shiga K ja muut 2015)

Kudosnäytteistä eristetyistä soluista värjättiin sekä  $\alpha$ SMA että pan-sytokeratiini, ja varmistettiin että kudosnäytteistä eristetyt solut olivat aktivoituja fibroblasteja. Kaikki värjäytyt solut ilmensivät  $\alpha$ SMA:ta, joka muodosti selkeät säikeet soluihin. Pan-sytokeratiinia oli soluissa heikosti, kuten kuvasta 1 on nähtävissä. Värjäyksen tuloksen perusteella voitiin olettaa, että eristetyt solut olivat aktivoituja fibroblasteja, ja soluja päätettiin käyttää migraatio- ja invaasiokokeissa.

### 9.2 Fibroblastit lisäsivät DU145-solujen invaasiota

Migraatiokokeissa fibroblastien ei todettu lisäävän solujen liikkumista sferoideista kollageeni I:llä. Tosin hydroksiureakäsittelyn jälkeen DU145+fibroblastit -sferoidien pinta-ala kasvoi hieman enemmän kuin pelkästään DU145-soluja sisältävien sferoidien pinta-ala. Sen sijaan invaasiokokeissa fibroblasteilla oli selvä vaikutus solujen liikkumiseen. Kaikissa koeasetelmissä DU145+fibroblastit -sferoidien solut liikkuivat enemmän, kuin niiden sferoidien solut, joissa oli vain toista näistä solulinjoista. Askorbiinihapon antaminen soluille tai solujen käsittely hydroksiurealla korosti fibroblastien vaikutusta ja teki DU145+fibroblastit -sferoidien ja DU145-sferoidien välisestä erosta merkittävän. Tästä voitiin päätellä, että fibroblastit vaikuttavat sferoidien mikroympäristöön tavalla, joka lisää solujen liikkumista 3D-ympäristössä, kollageeni I -geelissä.

PC3-soluilla sferoidien valmistus ei onnistunut, jos sferoideihin ei lisätty fibroblasteja. Sferoidien valmistuksessa testattiin solumäärän kasvatusta 4000 solusta/sferoidi 8000 soluun/sferoidi, mutta solut eivät tästä huolimatta muodostaneet solu-solu -liitoksia. Myöskään askorbiinihappo ei lisännyt PC3-solujen sferoidin muodostusta. Tästä syystä fibroblastien vaikutusta PC3-solujen liikkumiseen kollageeni I:llä ja kollageeni I -geelissä ei pystytty määrittämään. Sen sijaan tarkastelu käännettiin yhteisviljelmäsferoideihin.

Yhteisviljelmäsferoideja valmistettiin niin, että ne sisälsivät puolet syöpäsoluja eli DU145- tai PC3-soluja ja puolet fibroblasteja. Kaikissa liikkumista mittaavissa kokeissa DU145+fibroblasti-sferoidien pinta-alat kasvoivat enemmän kuin PC3+fibroblasti -sferoidien pinta-alat. Tämä oli yllättävää, sillä PC3-soluja on yleisesti pidetty metastaattisempina syöpäsolulinjana kuin DU145-soluja. Myös se, että PC3-solut eivät muodostaneet sferoideja, viittasi siihen, että kyseiset solut eivät ole riippuvaisia solu-solu -kontakteista, ja pystyisivät helposti irrottautumaan alkuperäisestä paikastaan liikkuaan ympäristössään.

### 9.3 Solujen lokalisaatio yhteisviljelmäsferoideissa poikkesi kahden käytetyn syöpäsolulinjan välillä

Yhteisviljelmäsferoideista tarkasteltiin fibroblastien ja syöpäsolujen sijoittumista toisiinsa nähden. Sferoideista valmistettiin mikroskooppinäytteet, joita kuvattiin LSM ZEISS 780 konfokaalimikroskoopilla. Kuvassa 7 on huomattavissa, kuinka DU145-solut sijoittuvan yhteisviljelmäsferoidin keskelle ja fibroblastien muodostavan kuorimaisen rakenteen sferoidin ympärille. PC3-solut puolestaan sijoittuivat yhteisviljelmäsferoideissa reuna alueille ja fibroblastit taas sferoidin sisäosiin. Myös tämä havainto puolsi ajatusta, jonka mukaan PC3-solut olisivat DU145-soluja metastaattisempi solulinja.

### 9.4 DU145+fibroblasti -sferoideissa endostatiinin ilmentäminen oli kohonnut verrattuna yksöisviljelmiin

Invaasio-kokeissa DU145+fibroblasti -sferoidien solut liikkuivat merkittävästi enemmän kollageeni I -geeliin verrattuna sferoideihin, jotka sisälsivät vain toista näistä solulinjoista. Massaspektrometrianalyysillä selvitettiin, että soluväliaineen proteiinin kollageeni XVIII oli koholla yhteisviljelmäsferoideissa verrattuna

yksösviljelmäsferoideihin sekä DU145- että PC3-soluilla. Tästä pääteltiin, että kollageeni XVIII:ta saattaisi olla mukana edistämässä solujen liikkumista kollageeni I -geelissä.

Massaspektrometrianalyysin kvalitatiivisen luonteen takia kollageeni XVIII:n pitoisuudet tarkistettiin Western blot -menetelmällä käyttäen kollageeni XVIII:n endostatiini-fragmentin tunnistavaa vasta-ainetta. Vasta-aine tunnistikin membraanilta proteiinin, joka oli kooltaan samaa luokkaa kuin endostatiini (Kuva 10). Tuloksen mukaan kollageeni XVIII/endostatiini oli huomattavasti korkeammalla yhteisviljelmäsferoideissa verrattuna yksösviljelmäsferoideihin, kuin mitä massaspektrometri-tulokset antoivat olettaa ja tulos toistui kolme kertaa. Kollageeni XVIII on kooltaan 180 kDa, mutta useista yrityksistä huolimatta endostatiini vasta-aineella ei pystytty tunnistamaan tämän kokoluokan proteiineja membraanilta. Koska endostatiini on kollageeni XVIII:stä proteolyttisesti katkaistu osa, ei sen pitoisuuden uskottu korreloivan suoraan kollageeni XVIII:n pitoisuuden kanssa. Kuitenkin WB:n antamat pitoisuudet endostatiinille olivat samansuuntaiset, kuin massaspektrometrin antamat tulokset kollageeni XVIII:ta. Massaspektrometrin tunnistamat kollageeni XVIII:n fragmentit päätettiin tarkistaa, ja kävi ilmi että yhtä peptidiä lukuun ottamatta kaikki kollageeni XVIII:n tunnistetut fragmentit olivat peräisin endostatiinista.

Endostatiinilla on useissa tutkimuksissa todettu olevan inhiboiva vaikutus kasvaimen kasvuun. Eturauhassyöpäsoluilla sen on todettu toimivan androgeenireseptori-positiivisilla (AR) soluilla angiogeneesiä inhiboivana tekijänä. Endostatiini estää näillä soluilla glukokortikoidi-reseptorin (GR) aiheuttaman androgeenistä riippumattoman AR:n aktivoitumisen ja estää näin kasvaimen kasvua. (Lee JH ja muut 2017) Migraatio- ja invaasiokokeissa käytetyt DU145- ja PC3 -solut ovat AR-negatiivisia soluja, mikä voi olla yksi syy siihen, miksi enemmän endostatiinia sisältävien sferoidien solut eivät liikkuneet enemmän, kuin vähemmän edostatiinia sisältävien sferoidien solut.



## 10 YHTEENVETO JA POHDINTAA

Erikoistyö keskittyi eturauhassyöpäsolujen käytöksen tutkimiseen 3D-kasvatusmalleissa, jotka jäljittelevät kudoksen sekä kasvaimen olosuhteita paremmin kuin tavalliset 2D-kasvatusmallit (Duval K ja muut 2017). Erityisenä mielenkiinnon kohteena oli selvittää, miten syöpäsolut käyttäytyvät eri olosuhteissa kun 3D-kasvatukseen lisättiin fibroblasteja. Koska kasvaimet koostuvat useista eri soluista, eivätkä pelkästään syöpäsoluista, ja koska kasvain ja solut sen sisällä kehittyvät aina yhdessä mikroympäristönsä kanssa, 3D-kasvatusmalli, jossa eri soluja kasvatetaan yhdessä, voisi toimia parempana mallina tutkittaessa syöpää, kuin perinteinen 2D-kasvatusmalli. Erityisesti kasvaimessa esiintyvien aktivoitujen fibroblastien vaikutusta syöpäsolujen käyttäytymiseen on tutkittu paljon, ja niiden on todettu vaikuttavan syöpäsoluihin ja edistävän syövän kehittymistä muun muassa muokkaamalla soluväliainetta kasvaimessa (Tuxhorn JA ja muut 2002; Erdogan B ja muut 2017; Erdogan B ja Webb DJ 2017).

Koska  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin on todettu olevan välttämätön eturauhassyöpäsoluille, jotta ne pystyisivät muodostamaan etäpesäkkeitä luuhun, ja koska luun tiedetään sisältävän paljon  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ligandia kollageeni I:tä, liikkumista mittaavissa kokeissa päädyttiin käyttämään tätä proteiinia. (Hall CL ja muut 2006) Aiemmin tehdyissä kokeissa on selvitetty  $\alpha 2$ -integriiniä ilmentämättömien DU145(KO- $\alpha 2$ ) -solujen migroivan kollageeni I:llä ja invasoivan kollageeni I -geeliin huomattavasti huonommin kuin  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ilmentävien DU145( $\alpha 2+$ ) -solujen (Ojalill M ja muut 2018 b). Lisäksi  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ilmenemisen tiedettiin katoavan eturauhassyöpäsoluista taudin edetessä ja olevan myös biomarkkeri eturauhassyövän kantasolunkaltaisille syöpäsoluille (Collins AT ja muut 2001). Koeasetelmassa 3D-kasvatusmallilla pyrittiin luomaan tilanne, jossa eturauhassyövän kantasolujen kaltaiset solut olisivat mahdollisimman lähellä sitä tilaa, jossa ne kudoksessa ollessaan ovat, ja tutkimaan miten fibroblastien läsnäolo vaikuttaa solujen toimintaan ja geenien ilmentämiseen näissä kasvatuksissa.

DU145-solujen rinnalle kokeisiin valittiin PC3-solut. Niiden alkuperä on luuhun muodostuneesta eturauhassyövän etäpesäkkeestä, kun taas DU145-solut ovat peräisin eturauhassyövän aivometastaasista. Molemmat kokeisiin valituista

eturauhassyöpösoluista (DU145 ja PC3) ilmentävät paljon  $\alpha 2$ -integriiniä, ja sen perusteella niiden odotettiin liikkuvan samankaltaisesti kollageeni I:llä ja kollageeni I -geelissä. Lokalisaatio-profiilin luominen yhteisviljelmäsferoideista tuki ajatusta, että valituista solulinjoista PC3-solut olisivat metastaattisempi solulinja. PC3-solut sijoittuivat lokalisaatio-profiilissa sferoidin reunaosille yhteisviljelmissä, kun taas DU145-solut sijaitsivat sferoidin keskiosassa ja fibroblastit sferoidin reunoilla muodostaen kapselimaisen ohuen reunan sferoidin ympärille.

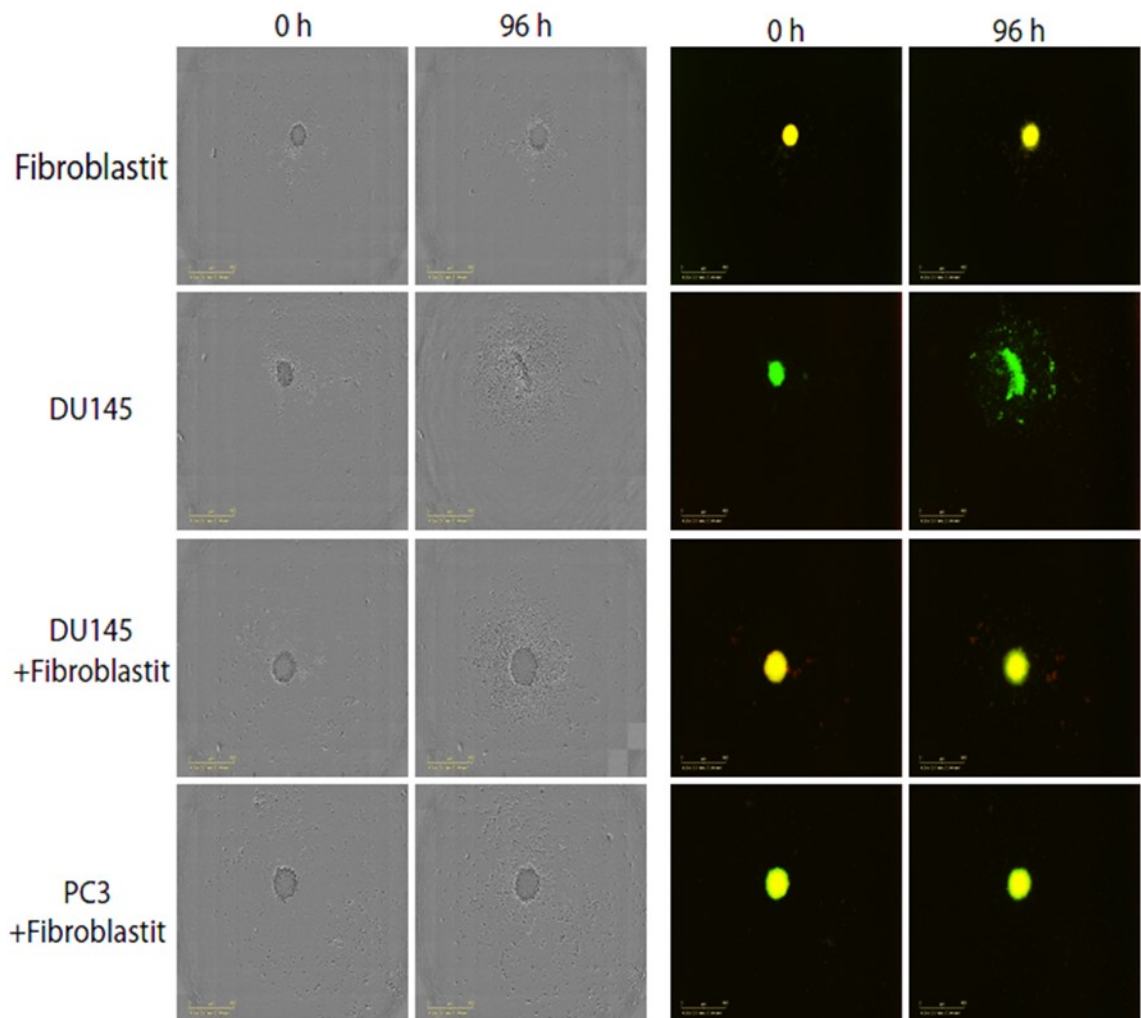
DU145-solut osoittautuivat liikkuvimmiksi soluiksi sekä migraatio- että invaasiokokeissa. PC3-solut eivät muodostaneet sferoidia käytetyllä aggregoitumista vaativalla menetelmällä, joten PC3-sferoideissa olevien solujen liikkumista ei pystytty mittaamaan. Tästä syystä huomio keskitettiin enemmän DU145-soluihin migraatio ja invaasiokokeissa. Askorbiinihapon lisäys sekä hydroksiurealla käsittely lisäsivät solujen liikkumista DU145+fibroblastit -sferoideista verrattuna DU145- sferoidien soluihin. Erityisesti invaasio-kokeissa käsittelyillä huomattiin olevan vaikutus siihen miten solut liikkuvat. Ero DU145+fibroblastit -sferoidien ja DU145-sferoidien välillä oli merkitsevä kummassakin koeasetelmassa. Myös koeasetelmassa DU145+fibroblastit -sferoidien pinta-ala kasvoi enemmän kuin DU145-sferoidien, mutta ero ei ollut merkitsevä, mikä saattoi johtua osittain solujen jakaantumisesta aiheutuneesta sferoidien pinta-alojen kasvusta.

Massaspektrometri-tulokset ja Western blot -analyysit osoittivat kollageeni XVII:n fragmentin, endostatiinin, olevan koholla molemmissa yhteisviljelmäsferoideissa verrattuna yksöisviljemä-sferoideihin. Invaasiokokeiden, massaspektrometri- sekä WB-tulosten perusteella näyttäisi siltä, että kohonnut endostatiini-pitoisuus korreloi AR-negatiivisia DU145-soluja sisältävien yhteisviljelmäsferoidien solujen lisääntyneen invaasion kanssa. Se, lisääkö endostatiini solujen liikkumista, vai onko se vain sivutuote, jostain muusta toiminnasta, minkä fibroblastien tuonti sferoideihin aiheuttaa, ei pystytä sanomaan. Epävarmuutta lisää se, ettei samaa koetta pystytty toistamaan PC3-soluilla, ja tämän takia fibroblastien ja endostatiinin vaikutuksien tarkastelu on tehty ainoastaan yhdellä syöpösolulinjalla. Lisää kokeita endostatiinin vaikutuksesta sferoideissa tulisi tehdä, jotta saataisiin varmuus siitä, mikä sen osuus todellisuudessa on solujen migraatioon ja invaasioon 3D-kasvatuksissa. Lisäksi fibroblastien vaikutusta

syöpäsoluihin sferoideissa tulisi tarkastella useammilla syöpäsolulinjoilla, jotta saataisiin paremmin käsitys siitä, miten fibroblastit vaikuttavat syöpäsolujen käyttäytymiseen ja proteiinien ilmentämiseen. Tieto olisi tärkeää valittaessa oikeanlaisia olosuhteita esimerkiksi syöpälääkkeitä ja syövänhoitomenetelmiä kehitettäessä.

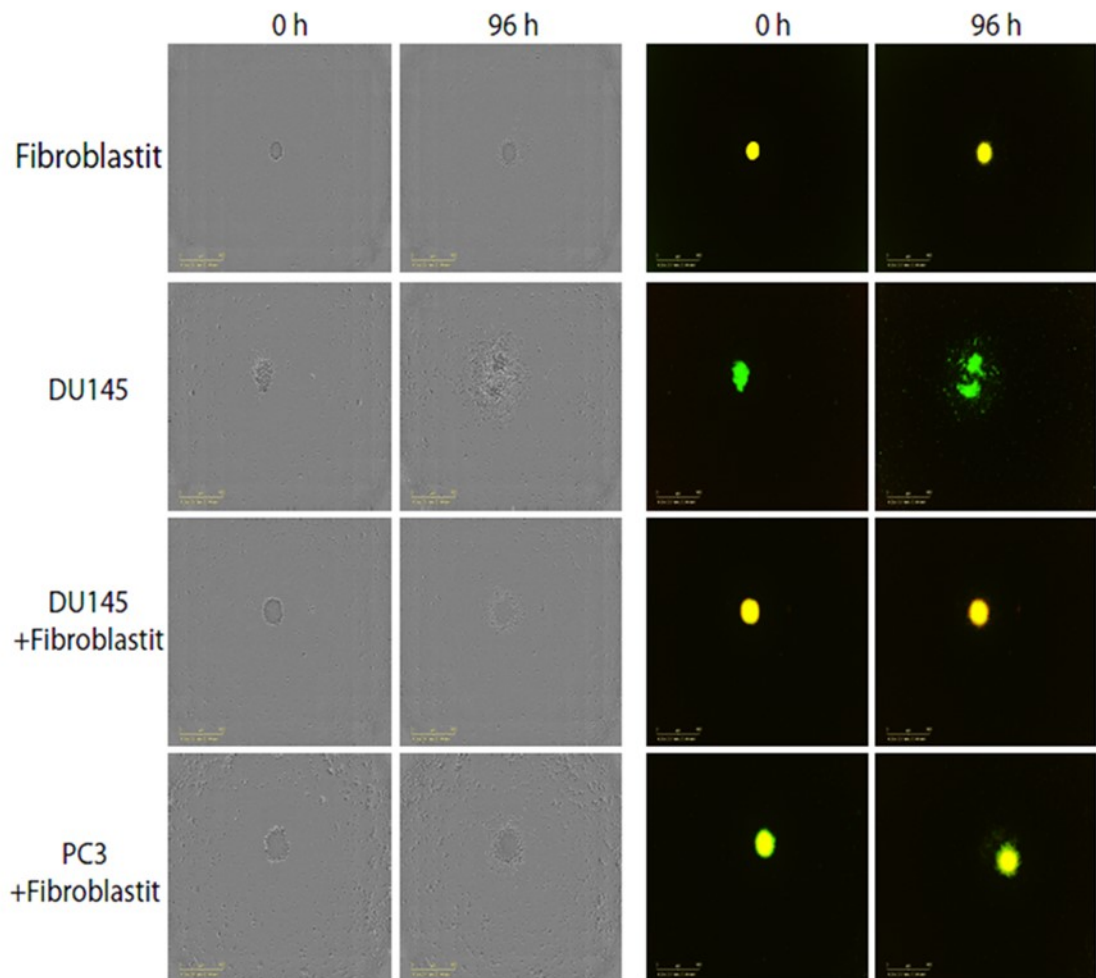
# LIITTEET

## +Askorbiinihappo



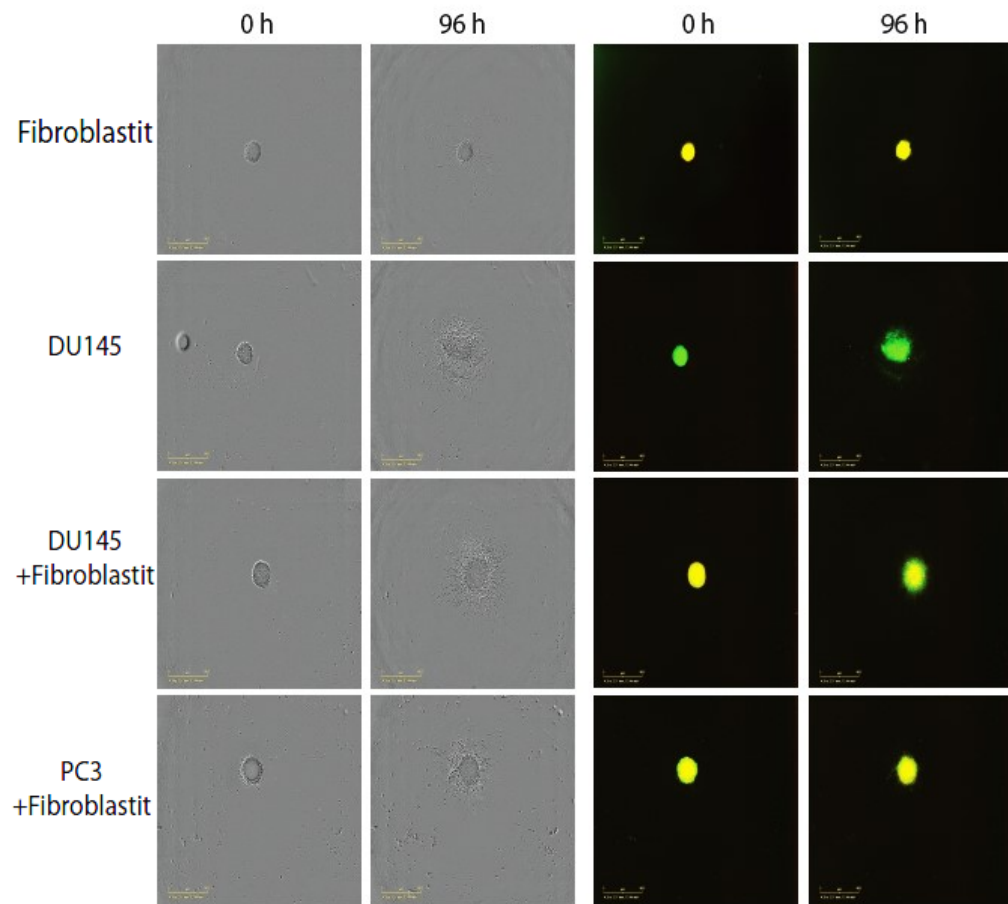
**Liitekuva 1** Migraatiokokeesta, jossa soluille annettiin askorbiinihappoa. Vasemmalla faasikontrastikuvat ja oikealla samat kuvat värien kanssa aikapisteissä 0h ja 96h. Mittakaava 800 µm.

## +Hydroksiurea



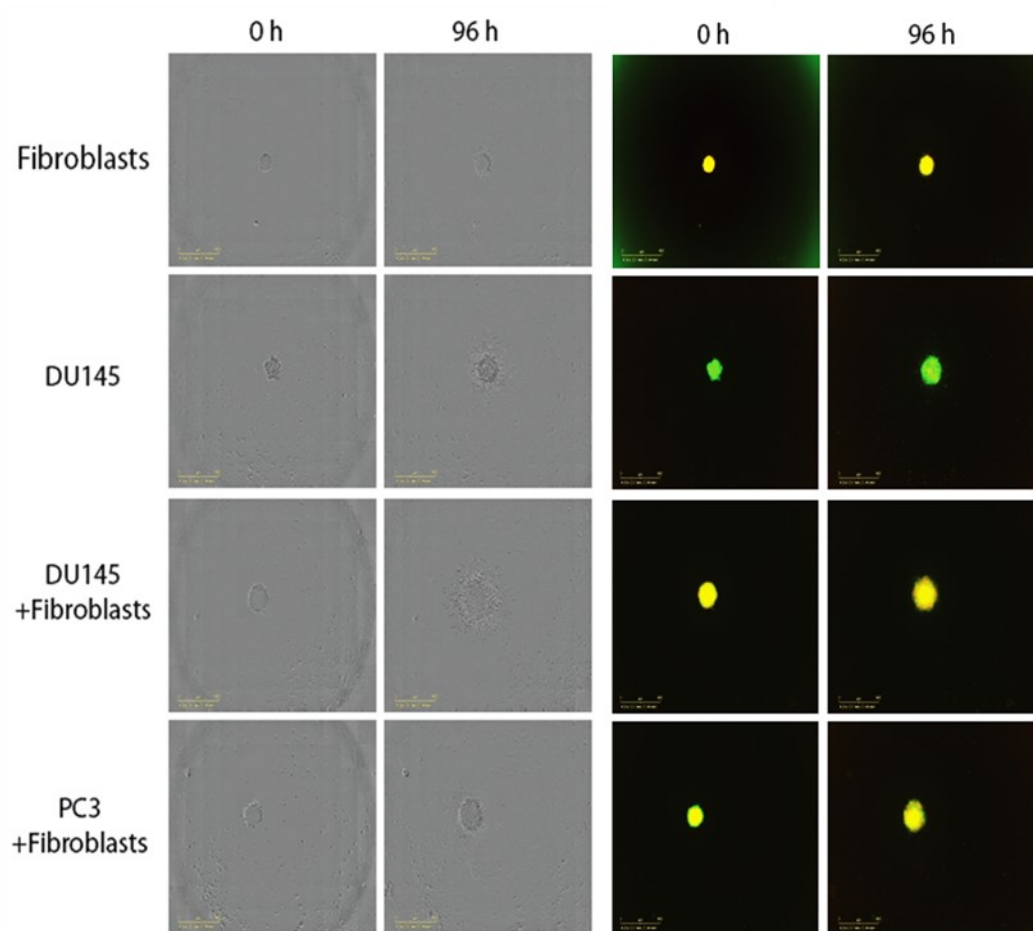
**Liitekuva 2** Esimerkkikuvat migraatiokokeesta, jossa solujen jakaantuminen estettiin hydroksiurealla. Vasemmalla faasikontrastikuvat ja oikealla kuvat värien kanssa aikapisteissä 0 h ja 96 h. Mittakaava 800  $\mu\text{m}$ .

## +Askorbiinihappo



**Liitekuva 3** Invaasiokoe, jossa soluille annettiin askorbiinihappoa. Vasemmalla faasikontrastikuvat ja oikealla samat kuvat värien kanssa aikapisteissä 0h ja 96h. Mittakaava 800 µm.

## +Hydroksiurea



**Liitekuva 4** Invaasiokoe, jossa solujen jakaantuminen estettiin hydroksiurealla. Vasemmalla faasikontrastikuvat ja oikealla kuvat värien kanssa aikapisteissä 0 h ja 96 h. Mittakaava 800  $\mu\text{m}$ .

## LÄHTEET

- Alanko, J., Mai, A., Jacquemet, G., Schauer, K., Kaukonen, R., Saari, M., Goud, B. & Ivaska, J. (2015) Integrin endosomal signalling suppresses anoikis. *Nat Cell Biol* **17**:1412-1421.
- Ao, M., Franco, O.E., Park, D., Raman, D., Williams, K. & Hayward, S.W. (2007) Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res* **67**:4244-4253.
- Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P. & Humphries, M.J. (2009) Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* **122**:165-170.
- Becker, P.M., Verin, A.D., Booth, M.A., Liu, F., Birukova, A. & Garcia, J.G. (2001) Differential regulation of diverse physiological responses to VEGF in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**:1500.
- Berdasco, M. & Esteller, M. (2010) Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* **19**:698-711.
- Bonnans, C., Chou, J. & Werb, Z. (2014) Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**:786-801.
- Bubendorf, L., Schopfer, A., Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T.C. & Mihatsch, M.J. (2000) Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum Pathol* **31**:578-583.
- Buyyounouski, M.K., Pickles, T., Kestin, L.L., Allison, R. & Williams, S.G. (2012) Validating the interval to biochemical failure for the identification of potentially lethal prostate cancer. *J Clin Oncol* **30**:1857-1863.
- Cary, L.A., Han, D.C., Polte, T.R., Hanks, S.K. & Guan, J.L. (1998) Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Cell Biol* **140**:211-221.
- Castillo, V., Valenzuela, R., Huidobro, C., Contreras, H.R. & Castellon, E.A. (2014) Functional characteristics of cancer stem cells and their role in drug resistance of prostate cancer. *Int J Oncol* **45**:985-994.
- Catalona, W.J., Smith, D.S., Ratliff, T.L., Dodds, K.M., Coplen, D.E., Yuan, J.J., Petros, J.A. & Andriole, G.L. (1991) Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* **324**:1156-1161.
- Cavallaro, U. & Christofori, G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**:118-132.



Chang, H.Y., Chi, J.T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D. & Brown, P.O. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12877-12882.

Cheteh, E.H., Augsten, M., Rundqvist, H., Bianchi, J., Sarne, V., Egevad, L., Bykov, V.J., Ostman, A. & Wiman, K.G. (2017) Human cancer-associated fibroblasts enhance glutathione levels and antagonize drug-induced prostate cancer cell death. *Cell Death Dis* **8**:e2848.

Clark, E.A. & Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**:233-239.

Collins, A.T., Habib, F.K., Maitland, N.J. & Neal, D.E. (2001a) Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci* **114**:3865-3872.

Collins, A.T., Habib, F.K., Maitland, N.J. & Neal, D.E. (2001b) Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci* **114**:3865-3872.

Diakos, C.I., Charles, K.A., McMillan, D.C. & Clarke, S.J. (2014) Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol* **15**:493.

Ding, Y.H., Javaherian, K., Lo, K.M., Chopra, R., Boehm, T., Lanciotti, J., Harris, B.A., Li, Y., Shapiro, R., Hohenester, E., Timpl, R., Folkman, J. & Wiley, D.C. (1998) Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:10443-10448.

Duval, K., Grover, H., Han, L.H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J. & Chen, Z. (2017) Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* **32**:266-277.

Erdogan, B., Ao, M., White, L.M., Means, A.L., Brewer, B.M., Yang, L., Washington, M.K., Shi, C., Franco, O.E., Weaver, A.M., Hayward, S.W., Li, D. & Webb, D.J. (2017) Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J Cell Biol* **216**:3799-3816.

Erdogan, B. & Webb, D.J. (2017) Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis. *Biochem Soc Trans* **45**:229-236.

Faye, C., Moreau, C., Chautard, E., Jetne, R., Fukai, N., Ruggiero, F., Humphries, M.J., Olsen, B.R. & Ricard-Blum, S. (2009) Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. *J Biol Chem* **284**:22029-22040.

- Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & de Boer, J. (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol* **31**:108-115.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R. & Delaisse, J. (2000) Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett* **486**:247-251.
- Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E. & Chan-Hui, P.Y. (1996) Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* **134**:793-799.
- Gately, S., Twardowski, P., Stack, M.S., Patrick, M., Boggio, L., Cundiff, D.L., Schnaper, H.W., Madison, L., Volpert, O., Bouck, N., Enghild, J., Kwaan, H.C. & Soff, G.A. (1996) Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* **56**:4887-4890.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. & Yamada, K.M. (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:793-805.
- Ghatak, S., Niland, S., Schulz, J.N., Wang, F., Eble, J.A., Leitges, M., Mauch, C., Krieg, T., Zigrino, P. & Eckes, B. (2016) Role of Integrins alpha1beta1 and alpha2beta1 in Wound and Tumor Angiogenesis in Mice. *Am J Pathol* **186**:3011-3027.
- Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* **285**:1028-1032.
- Ginsberg, M.H. (2014) Integrin activation. *BMB Rep* **47**:655-659.
- Graham, M.K. & Meeker, A. (2017) Telomeres and telomerase in prostate cancer development and therapy. *Nat Rev Urol* **14**:607-619.
- Halfter, W., Oertle, P., Monnier, C.A., Camenzind, L., Reyes-Lua, M., Hu, H., Candiello, J., Labilloy, A., Balasubramani, M., Henrich, P.B. & Plodinec, M. (2015) New concepts in basement membrane biology. *FEBS J* **282**:4466-4479.
- 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**:8648-8654.
- Hamidi, H. & Ivaska, J. (2018) Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* **18**:533-548.
- Han, Q., Fu, Y., Zhou, H., He, Y. & Luo, Y. (2007) Contributions of Zn(II)-binding to the structural stability of endostatin. *FEBS Lett* **581**:3027-3032.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.

- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**:646-674.
- Heljasvaara, R., Nyberg, P., Luostarinen, J., Parikka, M., Heikkila, P., Rehn, M., Sorsa, T., Salo, T. & Pihlajaniemi, T. (2005) Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. *Exp Cell Res* **307**:292-304.
- Hurskainen, M., Eklund, L., Hagg, P.O., Fruttiger, M., Sormunen, R., Ilves, M. & Pihlajaniemi, T. (2005) Abnormal maturation of the retinal vasculature in type XVIII collagen/endostatin deficient mice and changes in retinal glial cells due to lack of collagen types XV and XVIII. *FASEB J* **19**:1564-1566.
- Hynes, R.O. (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**:1216-1219.
- Iremashvili, V., Barney, S.L., Manoharan, M., Kava, B.R., Parekh, D.J. & Punnen, S. (2016) Prediagnostic prostate-specific antigen kinetics and the risk of biopsy progression in active surveillance patients. *Int J Urol* **23**:313-317.
- Ivaska, J. (2012) Unanchoring integrins in focal adhesions. *Nat Cell Biol* **14**:981-983.
- Jeppesen, M., Hagel, G., Glenthoj, A., Vainer, B., Ibsen, P., Harling, H., Thastrup, O., Jorgensen, L.N. & Thastrup, J. (2017) Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PLoS One* **12**:e0183074.
- Jin, J.K., Dayyani, F. & Gallick, G.E. (2011) Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int J Cancer* **128**:2545-2561.
- Kakkad, S.M., Solaiyappan, M., Argani, P., Sukumar, S., Jacobs, L.K., Leibfritz, D., Bhujwala, Z.M. & Glunde, K. (2012) Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. *J Biomed Opt* **17**:116017.
- Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**:422-433.
- Kalluri, R. & Zeisberg, M. (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**:392-401.
- Kaukonen, R., Mai, A., Georgiadou, M., Saari, M., De Franceschi, N., Betz, T., Sihto, H., Ventela, S., Elo, L., Jokitalo, E., Westermarck, J., Kellokumpu-Lehtinen, P.L., Joensuu, H., Grenman, R. & Ivaska, J. (2016) Normal stroma suppresses cancer cell proliferation via mechanosensitive regulation of JMJD1a-mediated transcription. *Nat Commun* **7**:12237.
- Kojima, T., Azar, D.T. & Chang, J.H. (2008) Neostatin-7 regulates bFGF-induced corneal lymphangiogenesis. *FEBS Lett* **582**:2515-2520.

Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**:178-196.

Lee, J.H., Kang, M., Wang, H., Naik, G., Mobley, J.A., Sonpavde, G., Garvey, W.T., Darley-Usmar, V.M. & Ponnazhagan, S. (2017) Endostatin inhibits androgen-independent prostate cancer growth by suppressing nuclear receptor-mediated oxidative stress. *FASEB J* **31**:1608-1619.

Li, C., Harris, M.B., Venema, V.J. & Venema, R.C. (2005) Endostatin induces acute endothelial nitric oxide and prostacyclin release. *Biochem Biophys Res Commun* **329**:873-878.

Li, T., Kang, G., Wang, T. & Huang, H. (2018) Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncol Lett* **16**:687-702.

Lin, H.C., Chang, J.H., Jain, S., Gabison, E.E., Kure, T., Kato, T., Fukai, N. & Azar, D.T. (2001) Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28-kDa fragment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**:2517-2524.

Liu, J., Chen, S., Wang, W., Ning, B.F., Chen, F., Shen, W., Ding, J., Chen, W., Xie, W.F. & Zhang, X. (2016) Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF-beta pathways. *Cancer Lett* **379**:49-59.

Lorusso, G. & Ruegg, C. (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochem Cell Biol* **130**:1091-1103.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S.Y., Alvarado, M., Anderson, H.R., Anderson, L.M., Andrews, K.G., Atkinson, C., Baddour, L.M., Barker-Collo, S., Bartels, D.H., Bell, M.L., Benjamin, E.J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S.S., Coffeng, L.E., Colan, S.D., Colquhoun, S., Colson, K.E., Condon, J., Connor, M.D., Cooper, L.T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K.C., Couser, W., Cowie, B.C., Criqui, M.H., Cross, M., Dabhadkar, K.C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D.C., Dharmaratne, S.D., Dorsey, E.R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P.J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A.D., Forouzanfar, M.H., Fowkes, F.G., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M.K., Gabriel, S.E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R.F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y.A., Haring, D., Harrison, J.E., Havmoeller, R., Hay, R.J., Hoen, B., Hotez, P.J., Hoy, D., Jacobsen, K.H., James, S.L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J.P., Knowlton, L.M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S.E., Ohno, S.L., Mabweijano, J., MacIntyre, M.F., Mallinger, L., March, L., Marks, G.B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B.M.,

McAnulty, J.H., McDermott, M.M., McGrath, J., Mensah, G.A., Merriman, T.R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T.R., Mock, C., Mocumbi, A.O., Mokdad, A.A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M.N., Naldi, L., Narayan, K.M., Nasser, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S.B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J.D., Rivero, A.P., Padilla, R.P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C.A., Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J.T., Rein, D.B., Remuzzi, G., Rivara, F.P., Roberts, T., De Leon, F.R., Rosenfeld, L.C., Rushton, L., Sacco, R.L., Salomon, J.A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D.C., Segui-Gomez, M., Shepard, D.S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J.A., Thomas, B., Tleyjeh, I.M., Towbin, J.A., Truelsen, T., Undurraga, E.A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G.R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M.A., Weintraub, R., Wilkinson, J.D., Woolf, A.D., Wulf, S., Yeh, P.H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z.J., Lopez, A.D., Murray, C.J., AlMazroa, M.A. & Memish, Z.A. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**:2095-2128.

Makareeva, E., Han, S., Vera, J.C., Sackett, D.L., Holmbeck, K., Phillips, C.L., Visse, R., Nagase, H. & Leikin, S. (2010) Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion. *Cancer Res* **70**:4366-4374.

Morbidelli, L., Donnini, S., Chillemi, F., Giachetti, A. & Ziche, M. (2003) Angiosuppressive and angiostimulatory effects exerted by synthetic partial sequences of endostatin. *Clin Cancer Res* **9**:5358-5369.

Nardone, G., Oliver-De La Cruz, J., Vrbsky, J., Martini, C., Pribyl, J., Skladal, P., Pesl, M., Caluori, G., Pagliari, S., Martino, F., Maceckova, Z., Hajduch, M., Sanz-Garcia, A., Pugno, N.M., Stokin, G.B. & Forte, G. (2017) YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nat Commun* **8**:15321.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G. & Halazonetis, T.D. (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:220-228.

Ojalil, M., Parikainen, M., Rappu, P., Aalto, E., Jokinen, J., Virtanen, N., Siljamaki, E. & Heino, J. (2018) Integrin alpha2beta1 decelerates proliferation, but promotes survival and invasion of prostate cancer cells. *Oncotarget* **9**:32435-32447.

Ojalil, M., Rappu, P., Siljamaki, E., Taimen, P., Bostrom, P. & Heino, J. (2018) The composition of prostate core matrisome in vivo and in vitro unveiled by mass spectrometric analysis. *Prostate* **78**:583-594.

Okada, M., Oba, Y. & Yamawaki, H. (2015) Endostatin stimulates proliferation and migration of adult rat cardiac fibroblasts through PI3K/Akt pathway. *Eur J Pharmacol* **750**:20-26.

- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. & Folkman, J. (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**:315-328.
- O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. & Folkman, J. (1997) Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* **88**:277-285.
- Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. (2013) Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* **1833**:3481-3498.
- Park, S.H., Keller, E.T. & Shiozawa, Y. (2018) Bone Marrow Microenvironment as a Regulator and Therapeutic Target for Prostate Cancer Bone Metastasis. *Calcif Tissue Int* **102**:152-162.
- Penet, M.F., Kakkad, S., Pathak, A.P., Krishnamachary, B., Mironchik, Y., Raman, V., Solaiyappan, M. & Bhujwala, Z.M. (2017) Structure and Function of a Prostate Cancer Dissemination-Permissive Extracellular Matrix. *Clin Cancer Res* **23**:2245-2254.
- Rehn, M. & Pihlajaniemi, T. (1995) Identification of three N-terminal ends of type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. The longest form contains a novel motif homologous to rat and Drosophila frizzled proteins. *J Biol Chem* **270**:4705-4711.
- Rygh, C.B., Lokka, G., Heljasvaara, R., Taxt, T., Pavlin, T., Sormunen, R., Pihlajaniemi, T., Curry, F.R., Tenstad, O. & Reed, R.K. (2014) Image-based assessment of microvascular function and structure in collagen XV- and XVIII-deficient mice. *J Physiol* **592**:325-336.
- Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Gohring, W., Olsen, B.R. & Timpl, R. (1998) Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* **17**:4249-4256.
- Schlaepfer, D.D. & Mitra, S.K. (2004) Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* **14**:92-101.
- Schroeder, A., Heller, D.A., Winslow, M.M., Dahlman, J.E., Pratt, G.W., Langer, R., Jacks, T. & Anderson, D.G. (2011) Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer* **12**:39-50.
- Senbanjo, L.T. & Chellaiah, M.A. (2017) CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol* **5**:18.
- Sfanos, K.S., Yegnasubramanian, S., Nelson, W.G. & De Marzo, A.M. (2018) The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nat Rev Urol* **15**:11-24.

Shah, R.B., Mehra, R., Chinnaiyan, A.M., Shen, R., Ghosh, D., Zhou, M., Macvicar, G.R., Varambally, S., Harwood, J., Bismar, T.A., Kim, R., Rubin, M.A. & Pienta, K.J. (2004) Androgen-independent prostate cancer is a heterogeneous group of diseases: lessons from a rapid autopsy program. *Cancer Res* **64**:9209-9216.

Shen, J., Cao, B., Wang, Y., Ma, C., Zeng, Z., Liu, L., Li, X., Tao, D., Gong, J. & Xie, D. (2018) Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **37**:z.

Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H. & Takeyama, H. (2015) Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)* **7**:2443-2458.

Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H. & Schlaepfer, D.D. (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* **2**:249-256.

Sudhakar, A., Sugimoto, H., Yang, C., Lively, J., Zeisberg, M. & Kalluri, R. (2003) Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4766-4771.

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

Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C. & Karamanos, N.K. (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* **97**:4-27.

Tureckova, J., Vojtechova, M., Krausova, M., Sloncova, E. & Korinek, V. (2009) Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells. *Transl Oncol* **2**:281-290.

Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., Smith, M.J., Smith, V.C., Dang, T.D. & Rowley, D.R. (2002) Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* **8**:2912-2923.

Walia, A., Yang, J.F., Huang, Y.H., Rosenblatt, M.I., Chang, J.H. & Azar, D.T. (2015) Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochim Biophys Acta* **1850**:2422-2438.

Wang, M.C., Papsidero, L.D., Kuriyama, M., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P. & Chu, T.M. (1981) Prostate antigen: a new potential marker for prostatic cancer. *Prostate* **2**:89-96.

Wang, S., Lu, X.A., Liu, P., Fu, Y., Jia, L., Zhan, S. & Luo, Y. (2015) Endostatin has ATPase activity, which mediates its antiangiogenic and antitumor activities. *Mol Cancer Ther* **14**:1192-1201.

- Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C. & Giancotti, F.G. (1998) A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* **94**:625-634.
- Wen, W., Moses, M.A., Wiederschain, D., Arbiser, J.L. & Folkman, J. (1999) The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res* **59**:6052-6056.
- Wickstrom, S.A., Alitalo, K. & Keski-Oja, J. (2002) Endostatin associates with integrin alpha5beta1 and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res* **62**:5580-5589.
- Wickstrom, S.A., Veikkola, T., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K. & Keski-Oja, J. (2001) Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res* **61**:6511-6516.
- Yang, Y. (2015) Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *J Clin Invest* **125**:3335-3337.
- Yap, T.A., Smith, A.D., Ferraldeschi, R., Al-Lazikani, B., Workman, P. & de Bono, J.S. (2016) Drug discovery in advanced prostate cancer: translating biology into therapy. *Nat Rev Drug Discov* **15**:699-718.
- Yoshiji, H., Kuriyama, S., Hicklin, D.J., Huber, J., Yoshii, J., Miyamoto, Y., Kawata, M., Ikenaka, Y., Nakatani, T., Tsujinoue, H. & Fukui, H. (1999) KDR/Flk-1 is a major regulator of vascular endothelial growth factor-induced tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* **30**:1179-1186.
- Yu, Y., Xiao, C.H., Tan, L.D., Wang, Q.S., Li, X.Q. & Feng, Y.M. (2014) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling. *Br J Cancer* **110**:724-732.
- Zhan, H.X., Zhou, B., Cheng, Y.G., Xu, J.W., Wang, L., Zhang, G.Y. & Hu, S.Y. (2017) Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Lett* **392**:83-93.
- Zhang, K., Zhou, S., Wang, L., Wang, J., Zou, Q., Zhao, W., Fu, Q. & Fang, X. (2016) Current Stem Cell Biomarkers and Their Functional Mechanisms in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* **17**:10.3390/ijms17071163.
- Zhang, T.H., Liang, L.Z., Liu, X.L., Wu, J.N., Su, K., Chen, J.Y. & Zheng, Q.Y. (2019) LncRNA UCA1/miR-124 axis modulates TGFbeta1-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of tongue cancer cells through JAG1/Notch signaling. *J Cell Biochem*.



Zhang, Z., Ramirez, N.E., Yankeelov, T.E., Li, Z., Ford, L.E., Qi, Y., Pozzi, A. & Zutter, M.M. (2008) Alpha2beta1 Integrin Expression in the Tumor Microenvironment Enhances Tumor Angiogenesis in a Tumor Cell-Specific Manner. *Blood* **111**:1980-1988.

Zweers, M.C., Davidson, J.M., Pozzi, A., Hallinger, R., Janz, K., Quondamatteo, F., Leutgeb, B., Krieg, T. & Eckes, B. (2007) Integrin alpha2beta1 is required for regulation of murine wound angiogenesis but is dispensable for reepithelialization. *J Invest Dermatol* **127**:467-478.