

Rab27A ja Rab35 -proteiinit munasarjasyöpäsolujen
eksosomierityksessä

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Biokemian laitos
Biokemian tutkinto-ohjelma (FM)
4/2019

Kirsi Toivanen

FT Laura Lehtinen

Prof. Olli Carpén

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

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

TOIVANEN, KIRSI: Rab27A ja Rab35 -proteiinit munasarjasyöpäsolujen
eksosomierityksessä

Pro gradu -tutkielma, 52 s., 2 liites.

Biokemia

Huhtikuu 2019

Eksosomit ovat pieniä solunulkoisia vesikkeleitä, jotka toimivat viestinvälittäjinä solujen välillä vaikuttaen vastaanottajasolun aineenvaihduntaan ja geenien ilmentymiseen. Eksosomien tuotannon on todettu muuttuneen monissa sairauksissa kuten syövässä, missä ne voivat muuttaa ympäristön syöväälle suotuisammaksi vaikuttaen taudin syntyyn, aggressiivisuuteen ja leviämiseen. Solunsisäisiin kalvokuljetuksiin osallistuvat Rab-proteiinit ovat keskeisessä osassa eksosomien biosynteesissä. Tässä erikoistyössä tutkittiin kahta Rab-proteiinia, Rab27A:ta ja Rab35:tä, sekä selvitettiin niiden toiminnan häirinnän vaikutuksia korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjasyövän (HGSOC) soluissa.

Erikoistyössä käytettiin solumalleina kaupallisia solulinjoja ja potilasperäisiä soluviljelmiä. Kattavien karakterisointien perusteella valituista soluista hiljennettiin *Rab27A* ja *Rab35* -geenit lentivirusvälitteisillä shRNA-molekyyleillä. Geenien transkriptio ja translaatio hiljentymisen onnistuminen varmistettiin Taqman qRT-PCR- ja Western Blot-menetelmillä. Lopuksi tutkittiin hiljennyksen mahdollisia vaikutuksia solujen ulkonäköön, liikkumiskykyyn ja eksosomien tuotantoon.

Työn tuloksena saatiin valmistettua kaksi solulinjaa, joista pystyttiin todentamaan kummankin kohdegeenin hiljentymisen. *Rab27A*:n hiljentäminen aiheutti muutoksia solujen ulkonäössä ja myös eksosomituotannon havaittiin vähentyneen. Tähän mennessä tehtyjen kokeiden perusteella *Rab35*:n hiljentämisellä ei ole havaittu samankaltaisia muutoksia soluissa. Koska eksosomien on ehdotettu olevan potentiaalisia kohteita syövän diagnoosissa ja hoidoissa, vähemmän eksosomeja tuottavia soluja voitaisiin käyttää solumalleina jatkotutkimuksissa eksosomien rooleista syövän mikroympäristössä.

Avainsanat: Eksosomi, HGSOC, Rab27A, Rab35

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Kirjallisuuskatsaus	3
2.1	Munasarjasyöpä.....	3
2.1.1	Munasarjat.....	3
2.1.2	Munasarjasyövän luokittelu	4
2.1.3	Korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjakarsinoma.....	5
2.2	Solujen väliset ja sisäiset kalvokuljetukset	5
2.3	Eksosomit	7
2.3.1	Eksosomit syövän mikroympäristössä	10
2.3.2	Eksosomien tuotto eli biosynteesi	10
2.3.3	Eksosomien käyttömahdollisuudet lääketieteessä.....	13
2.4	GTPaasi-superperheen Rab-proteiinit	13
2.4.1	Rab27A	15
2.4.2	Rab35	17
2.5	Geenin hiljentäminen shRNA-menetelmällä.....	17
3	Tutkimuksen tausta ja tavoitteet.....	20
4	Materiaalit ja menetelmät.....	21
4.1	Soluviljely	21
4.2	<i>Rab27A</i> ja <i>Rab35</i> -geenien hiljennys	22
4.3	<i>Rab27A</i> ja <i>Rab35</i> -geenien ilmentymisen määrittäminen.....	22
4.3.1	Geenien ilmentymisen määrittäminen lähetti-RNA-tasolla.....	22
4.3.2	Geenien ilmentymisen määrittäminen proteiinitasolla	24
4.4	Solujen liikkuminen	26
4.5	Eksosomien erityksen tutkiminen	26
5	Tulokset.....	28
5.1	Villityyppi-solujen karakterisaatio	28

5.1.1	Villityyppisolujen <i>Rab27A</i> ja <i>Rab35</i> -geenien mRNA-tasojen määrittäminen	29
5.1.2	<i>Rab27A</i> ja <i>Rab35</i> -geenien ilmentyminen proteiinitasolla	30
5.2	<i>Rab27A</i> ja <i>Rab35</i> -geenien hiljentäminen shRNA:lla OVCAR8- ja M022i-soluissa	32
5.2.1	OVCAR8-solut	32
5.2.2	Potilasperäiset M022i-solut	33
5.2.3	Hiljennysten toteaminen proteiinitasolla	35
5.3	Geenihiljennysten vaikutukset solujen ulkonäköön ja liikkumiseen	37
5.4	Eksosomierityksen tutkiminen	41
6	Tulosten tarkastelu	46
6.1	Villityyppi-solujen karakterisointi	46
6.2	Geenien hiljentäminen	47
6.2.1	Geenihiljennysten toteaminen	47
6.2.2	Geenihiljennettyjen solujen karakteristiset muutokset	49
6.3	Eksosomien tuoton vähentyminen	49
6.3.1	Vähentyneen eksosomierityksen vaikutus soluihin	51
7	Yhteenveto	52
8	Kiitokset	53
9	Lähdeluettelo	54
10	Liitteet	59
10.1	Liite 1. Transduktiossa käytetyt sekvenssit	59
10.2	Liite 2. Tutkimuksessa käytetyt vasta-aineet	60

Lyhenteet

EE:	early endosome eli varhainen endosomi, joka muodostuu endosytoosissa solun sisäpuolelle lähellä solukalvoa
EV:	extracellular vesicles eli solunulkoiset kalvorakkulat
HGPSC:	high grade pelvic serous carcinoma eli lantion seudun korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin epiteeliperäinen syöpä
HGSOC:	high grade serous ovarian carcinoma eli korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin munasarjasyöpä
ILV:	intraluminal vesicle eli luumeninsisäinen kalvorakkula, jotka eritettynä ulos solusta ovat eksosomeja
kDa:	kilodalton
LE:	late endosome eli myöhäinen endosomi, joka kehittyy varhaisesta endosomista
MVB:	multivesicular body eli monirakkulainen rakenne, joka muodostuu myöhäisestä endosomista eksosomin biogeneesissä
shRNA:	short hairpin RNA on RNA-interferenssi -tekniikka, joka perustuu kaksijuosteisen RNA:n hajotukseen solussa
WB:	western blot-menetelmä, millä detektoidaan solujen proteiinien ilmentymistä

1 Johdanto

Syöpä on joukko sairauksia, joissa mutaation seurauksena solu alkaa jakaantua hallitsemattomasti muodostaen lopulta kasvaimen. Tauti nimetään ja jaetaan eri tyyppeihin riippuen siitä, missä ruumiinosassa se saa alkunsa eli mihin se muodostaa primaarisen kasvaimen. Primaariselta paikalta pahanlaatuinen kasvain voi muodostaa etäpesäkkeitä eli metastaseja muualle kehoon mm. imusuoniston tai verenkierron kautta. (Weinberg 2007; Burstein ja Schwartz 2008; Testa ja muut 2018)

Munasarjasyöpä on nimensä mukaan lähtöisin munasarjoista. Vuonna 2018 kaikista maailman syöpätapauksista 3,6 % oli munasarjasyöpää. Munasarjasyöpä on toiseksi yleisin gynekologisista syövästä ja kymmenen yleisimmän naisten syövän joukossa sekä Suomessa että maailmanlaajuisesti. (GLOBOCAN 2018; Suomen Syöpärekisteri 2018.) Suomessa uusia tapauksia todettiin 437 vuonna 2016 (Syöpä 2016 -raportti).

Vaikka munasarjasyövän yleisyys ei ole kovin suuri verrattuna muihin syöpiin, taudin ennuste on huono. Syövän tappavuutta kuvataan viiden vuoden suhteellisella elossaololuvulla, joka munasarjasyövän kohdalla oli Suomessa vuosina 2014 – 2016 seuratuilla potilailla 41 % (Syöpä 2016 -raportti). Luku kertoo, että yli puolet munasarjasyöpäpotilaista kuoli viiden vuoden sisällä taudin toteamisesta. Munasarjasyövän tappavuus johtuu sen patogeneesin eli taudin synnyn huonosta tuntemuksesta (Kurman ja Shih 2010). Lisäksi taudin alkuvaiheen oireettomuuden takia 80 % tapauksista todetaan usein vasta myöhäisessä vaiheessa. Lopuilla 20 %:lla, jotka todetaan aikaisessa vaiheessa, viiden vuoden suhteellinen elossaololuku on 94 % eli ennuste on huomattavasti parempi. (American cancer society 2019.) Munasarjasyöpää seulotaan transvaginaalisella ultraäänitutkimuksella (TVU) sekä CA-125- ja HE4 -merkkiaineiden kohonneiden arvojen toteamisella verikokeessa. Seulontamenetelmät eivät kuitenkaan ole kovin spesifisiä eli tarkkoja, minkä takia parempia menetelmiä yritetään kehittää. (Kaikki syövästä 2019.)

Seulontamenetelmien ja syövän hoidon kehityksessä on tärkeä ymmärtää syövän biologiaa. Eräs tärkeä syövän syntyyn, etenemiseen ja hoitovasteeseen vaikuttava biologinen tekijä on syövän mikroympäristö. Syövän mikroympäristöksi määritellään

syöpäsoluja ympäröivät solut, rakenteet ja olosuhteet sekä soluväliaine ja sen sisältämät molekyylit. (Hirata ja Sahai 2017.) Syöpäsolut erittävät ympäristöönsä molekyylejä, esimerkiksi kasvutekijöitä, jotka muokkaavat ympäristöä syöpäsoluille suotuisammaksi ja joiden avulla ne kommunikoivat ympäröivien syöpä- ja normaalisolujen kanssa. Syöpäsolujen on todettu erittävän ympäristöönsä myös eksosomeiksi kutsuttuja pieniä kalvorakkuloita, jotka edelleen edesauttavat syövän etenemistä ja vastustuskykyä hoidoille. (Wang ja muut 2016.)

Tässä pro gradu -tutkimuksessa selvitettiin kahden proteiinin vaikutusta eksosomien eritykseen korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyypin munasarjasyövän (engl. *high grade serous ovarian carcinoma*, HGSOC) soluissa. Munasarjasyöpäsolujen eksosomieritystä häirittiin RNA-interferenssitekniikkaa käyttäen. Vertaamalla näin syntyneitä solulinjoja villityypin soluihin voitiin tutkia mahdollisia eksosomierityksestä riippuvaisia muutoksia.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Munasarjasyöpä

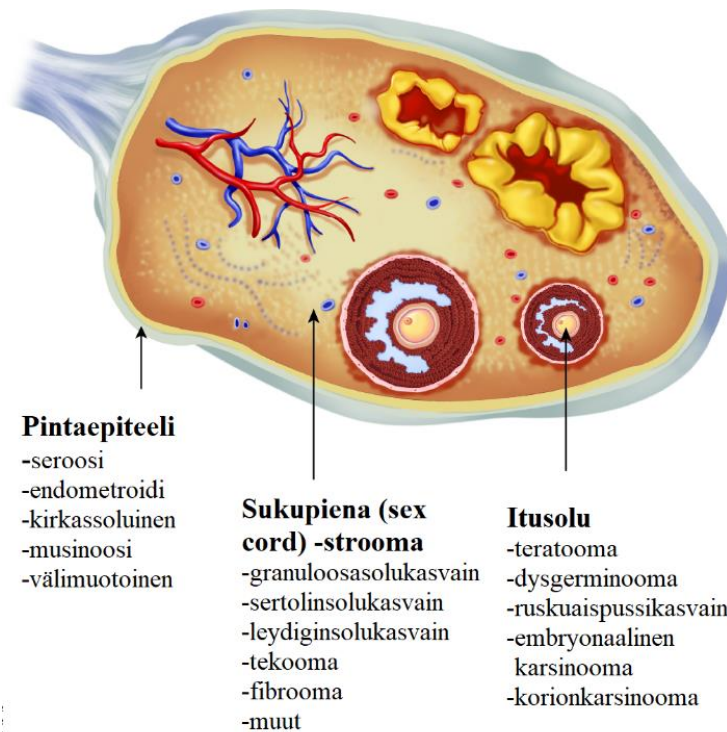
2.1.1 Munasarjat

Munasarjat (lat. *ovarium*) ovat naisen sukupuolielimiin kuuluvat parilliset rauhaset, jotka vaikuttavat hedelmällisyyteen ja kuukautiskiertoon erittämällä naissukupuolihormoneja ja tuottamalla munasoluja. Ne ovat litteätköt, noin sentin paksuiset ja muutaman sentin pituiset ja sijaitsevat lantio-ontelon (lat. *cavitas pelvis*) sivuilla kiinnittyen munasarjansiteiden (lat. *ligamentum ovarii proprium*) välityksellä kohtuun (lat. *uterus*). Munasarjan munarakkulassa kypsynyt munasolu irtoaa ovulaatiossa ja kulkeutuu munanjohdinta (lat. *tuba uterina*) pitkin kohtuun, missä se voi hedelmöittyä ja tarttua kohdun seinämään. Jos hedelmöitystä ei kuitenkaan tapahdu eikä munasolu näin kiinnity kohdun seinämään, kohdun limakalvo (lat. *endometrium*) hajoaa ja tulee ulos kuukautisvuotona. (Colvin ja Abdullatif 2013; Nienstedt ja muut 2004)

Munasarja voidaan jakaa kahteen osaan; ytimeen (lat. *medulla ovarii*) ja sitä ympäröivään kuorikerrokseen (lat. *cortex ovarii*). Munasarjassa on veri- ja imusuonistoa sekä hermosoluja, jotka tulevat munasarjan lieven (lat. *mesovarium*) kautta ytimeen, mistä ne sitten haarautuvat kuoreen. Kuorikerroksessa kypsyvät alkumunarakkulat eli primordiaalfollikkelit, jotka sisältävät varhaismunasolun. (Rutonen 1999; Bjälje ja muut 2008)

2.1.2 Munasarjasyövän luokittelu

Munasarjakasvaimet ovat erittäin heterogeeninen tautiryhmä ja ne jaetaan kolmeen eri luokkaan histologisen diagnoosin perusteella: epiteliaalisiin karsinomiin, itusolukasvaimiin ja sukupienen strooman kasvaimiin (Leminen ja muut 2007). Nämä munasarjan kolme solutyyppeä on esitetty kuvassa 1. Kaikista munasarjakasvaimista vain 5 – 10 % on peräisin munasarjan sukupienen stroomasta tai itusoluista. Itusolukasvaimet ovat yleisimpiä 15 – 19 vuotiailla naisilla, kun taas sukupienakasvaimet 50 – 54 vuotiailla. Nämä ei-epiteliaaliset kasvaimet ovat yleensä hyvänlaatuisia ja eloonjäämisennusteet ovat paremmat kuin epiteliaalisissa karsinomeissa. (Quirk ja muut 2005.)



Kuva 1. Munasarjan kasvainten kolme eri alkuperää. Tapauksista 90 – 95 % kuuluu epiteliaalisiin ja loput 5 – 10 % luokitellaan sukupienen strooman kasvaimiin ja itusolukasvaimiin. Kuva on otettu kirjasta *Williams gynecology* (Hoffman ja muut 2012) ja muokattu ottaen mallia katsauksesta (Bützow 2014).

Pahanlaatuiset epiteliaaliset karsinomat kattavat 90 – 95 % kaikista munasarjasyövistä (Desai ja muut 2014). Toisin kuin ei-epiteliaaliset kasvaimet, epiteliaalisten karsinomien ilmentyminen yleistyy iän myötä. Eiteliaaliset karsinomat luokitellaan edelleen histologisen diagnoosin mukaan seroosin tyyppin, endometrioidisiin, kirkassoluisiin, musinooseihin ja välimuotoisiin (engl. *borderline*) kasvaimiin (kuva 1). (Quirk ja muut

2005.) Yli 70 % epiteliaalisista karsinoomatapauksista on seroosin tyyppin kasvaimia (Prat 2012; Shih ja Kurman 2004).

2.1.3 Korkean pahanlaatuisuusasteen seroosin tyyppin munasarjakarsinooma

Seroosin tyyppin karsinoomat ovat tappavimpia epiteelisiä munasarjakarsinoomia, koska niissä on valkuaisainepitoista kudostenestettä erittävää pintakudosta ja ne leviävät nopeasti. HGSOC on kaikista munasarjasyövistä yleisin ja ennusteeltaan huonoin. (Bützow 2014.) Munasarjojen pinnalla on yksinkertainen kuutioepiteelikerros, josta epiteliaalisten munasarjakarsinoomien on aiemmin luultu olevan peräisin. Kuitenkin viimeisimpien tutkimusten mukaan HGSOC:n alkuperästä ei olla täysin varmoja ja syöpätyypin on ehdotettu alkavan myös mahdollisesti munanjohtimien tai vatsakalvon (lat. *peritoneum*) soluista. Näistä osista alkunsa saavia karsinoomia kutsutaankin yleisesti lantion serooseiksi karsinoomiksi (engl. *high grade pelvic serous carcinoma*, HGPSC). (Bützow 2014; Ahmed ja muut 2010)

HGPSC-tapauksista yli 95 %:ssa on todettu olevan patogeeninen *TP53*-kasvunrajoitegeenin mutaatio. Mutaatio johtaa hallitsemattomaan solujakautumiseen ja on yleisin kaikissa syövissä. (Ahmed ja muut 2010.) HGSOC:n alkuperän uudelleenmäärittäminen aloitettiin, kun tapausten *TP53*-mutaatioiden todettiin olevan samanlaisia kuin munanjohtimen epiteelinsisäisessä karsinoomassa (engl. *tubal intraepithelial carcinoma*, TIC) (Lee ja muut 2007). Lisäksi potilailta, joilta on löydetty usein rintasyöpään liitetty *BRCA*-geenin mutaatio, on todettu olevan suurempi riski sairastua HGSOC:ään. Näiden potilaiden ennaltaehkäisevästi poistetuista munanjohtimista on löytenyt TIC:n esiaste kun taas munasarjoista ei. (Bützow 2014; Piek ja muut 2001.)

2.2 Solujen väliset ja sisäiset kalvokuljetukset

Kudosten ja koko organismin toiminta on riippuvainen solujen sekä niiden ympäristön välisestä kommunikoinnista. Jotta solu voi kommunikoida ympäristönsä kanssa, tarvitaan myös solunsisäisten osien välistä tiedon siirtoa. Tämä tapahtuu muun muassa tiettyjen proteiinien avulla solun sisällä muodostuvien kalvorakkuloiden eli vesikkelien välityksellä. Vesikkelit varastoivat tiedon välittävät tekijät, kuten proteiinit tai nukleiinihapot, kalvonsa sisälle eli eristävät ne muusta ympäristöstä, jolloin ne voidaan

kuljettaa solun tukirankaa pitkin kohteeseensa. Kohdepaikassa tekijöiden vapautuminen saadaan aikaan vesikkelin sulautumisella eli fuusioitumisella kohdekalvonsa kanssa. Fuusioitumisessa keskeisessä roolissa ovat kalvojen SNARE-proteiinien (engl. *soluble NSF attachment protein receptor*) kompleksinmuodostus, mutta muitakin proteiineja tarvitaan spesifisyyden parantamiseksi. (Tokarev ja muut 2013; Hutagalung ja Novick 2011; Burgoyne ja Alan 2007)

Solunsisäinen kuljetus on kahdensuuntaista. Eksosytoosissa solu erittää aineita sisäpuolelta ulos esimerkiksi kun solu on tuottanut proteiinia, jonka tehtävä on toimia solukalvolla tai solun ulkopuolella. Endosytoosissa sen sijaan solu ottaa materiaalia ympäristöstään sisäänsä. Sisään otetut proteiinit ja membraanit pakataan endosomiksi kutsutun rakenteen sisälle, minkä jälkeen ne voidaan ohjata solussa joko eteenpäin kierrätettäväksi tai lysosomiin hajotettavaksi. (Tokarev ja muut 2013; Mellman 1996)

Kalvoliikenne on solun perusmekanismeja ja erittäin säädelty tapahtuma. Riippumatta solutyypistä ja organismin kehitymisasteesta, kaikkien solujen täytyy ylläpitää jatkuvaa ja välttämätöntä proteiinien ja kalvorakenteiden kuljetusta solun sisällä (engl. *essential permanent protein/membrane traffic routes*, EPT). Näihin kuljetuksiin lukeutuvat edellä mainitut eksosytoosi ja endosytoosi sekä liikenne endosomaalisen kalvoston ja Golgin laitteen välillä. Perusreittien lisäksi, solun erikoistuneisiin toimintoihin ja kehittymiseen tarvitaan tiettyjä lyhytaikaisia reittejä (engl. *dedicated transient traffic routes*, DTT), jotka aktivoituvat yleensä ulkoisen ärsykkeen vaikutuksesta. (Caviglia ja muut 2019)

Häiriintyneen kalvoliikenteen on todettu olevan yhteydessä moniin sairauksiin kuten syöpään. Syöpäsolujen aineenvaihdunta on muuttunut normaalisoluihin verrattuna, mikä edelleen johtaa poikkeaviin endosyyttisiin ja eksosyyttisiin reitteihin syöpäsoluissa. Poikkeavilla kalvokuljetuksillaan syöpäsolut voivat muuntua pahanlaatuisiksi ja vaikuttaa kommunikointiin ympäröivien solujen kanssa. Lisäksi endosyyttisten ja eksosyyttisten reittien tasapainon muuttuminen voi johtaa epiteliaalisen polaarisuuden menetykseen, joka edelleen vaikuttaa syövän patofysiologiaan. (Mosesson ja muut 2008)

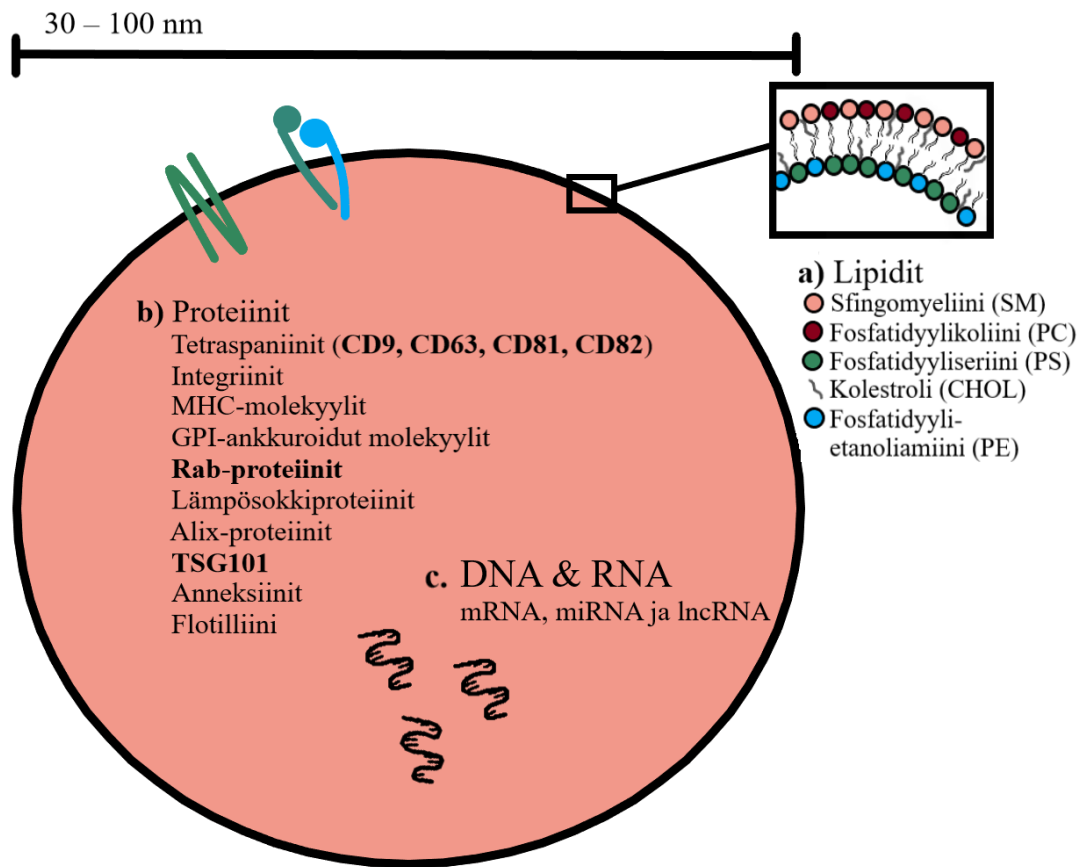
2.3 Eksosomit

Monisoluisen organismin solujen välinen kommunikaatio tapahtuu pitkälti solujen ulkopuolelle tuottamien välittäjäaineiden kautta. Viime aikoina kommunikaatiota on todettu tapahtuvan solujen välillä myös solunulkoisten vesikkelien (engl. *extracellular vesicles*, EV) avulla. EV:ihin kuuluvat apoptoottiset kappaleet (1 – 5 µm), solukalvolta kuroutuvat mikrovesikkelit (100 – 1000 nm) sekä näistä kolmesta pienimmät ja tässä tutkimuksessa keskeisessä osassa olevat eksosomit (30 – 100 nm). (György ja muut 2011.) Eksosomien ajateltiin ensin olevan vain solujen tapa päästä eroon solujätteestään, mutta myöhemmin niiden havaittiin toimivan tärkeässä roolissa solujen välisessä kommunikoinnissa (Guo ja muut 2017).

Eksosomit ovat pieniä vesikkeleitä, joita melkein kaikki solutyypit erittävät soluväliaineeseen. Eksosomeja on havaittu olevan veressä, virtsassa ja soluviljelyn kasvatusliuoksissa. (Denzer ja muut 2000; Théry ja muut 2002.) Ensimmäisen kerran eksosomi terminä on esitetty vuonna 1981, kun Trams tutkimusryhmineen (1981) löysi mikrovesikkeleitä soluviljelyn kasvatusliuoksista.

Eksosomit muodostuvat solukalvosta peräisin olevasta kaksoislipidikalvosta ja kalvon sisällä olevista proteiineista ja nukleiinihapoista (kuva 2). Eri solutyypin tuottamat eksosomit eroavat toisistaan, sillä rakenneosat ovat usein erittäjäsolulle tyypillisiä molekyylejä. Näiden eksosomien välisten poikkeavuuksien johdosta niiden alkuperä saatettaisiin pystyä paikantamaan. Tähän ajatukseen perustuu eksosomien soveltuvuus diagnostiikkaan ja uusien hoitomuotojen suunnitteluun (Qi ja muut 2016). Tyypillisiä eksosomeissa esiintyviä eli eksosomaalisia proteiineja ovat esimerkiksi eksosomien biosynteesissä toimivat proteiinit. (Théry ja muut 2009; Schorey ja Bhatnagar 2008)

Kalvoliikenteen säätelyssä tärkeää on kalvojen tunnistaminen, minkä jälkeen voidaan päättää mihin kalvo kuljetetaan. Tässä kalvojen tunnistamisessa lipidit ovat keskeisessä roolissa. (Tokarev ja muut 2013.) Lipidit ovat tärkeä rakenneosa myös eksosomeissa muodostaen ympäröivän kaksoiskalvon, joka on rakenteeltaan samantapainen kuin niitä erittävän solun solukalvon (kuva 2.a). Erona solun solukalvoon on, että tietyt lipidit ovat rikastuneet eksosomeissa, kuten fosfatidyyliiseriini (PS), glykosfingolipidi, sfingomyeliini (SM) ja kolesteroli (CHOL). Kaksoiskalvon asymmetria eli lipidien



Kuva 2. Eksosomin rakenne. Halkaisijaltaan 30 – 100 nm, eksosomi koostuu a) ympäröivästä kaksoiskalvosta, missä eri lipidit jakaantuvat asymmetrisesti ulko- ja sisäkalvolle, b) integraalisista ja liukoisista proteiineista, sekä c) nukleiinihappomolekyyleistä. Kuva on muokattu ottaen mallia artikkeleista Théry ja muut (2002) sekä Shorey ja Bhatnagar (2008).

jakautuminen ulko- ja sisäkalvon välillä on myös erilainen eksosomeissa kuin solukalvolla. (Stoorvogel ja muut 2002; Skotland ja muut 2017.) Kuvassa on esitetty PS:ä sijaitsevan ainoastaan eksosomin sisäkalvolla. Kuitenkin syöpäsolujen erittämässä eksosomeissa on todettu olevan PS:ä myös ulkokalvolla, johtuen erittävän solun häiriintyneestä solukalvon asymmetriasta. Tähän perustuen Lea tutkimusryhmineen (2017) havaitsi PS:n määriä munasarjasyöpäpotilaiden verestä. Tutkimuksessa tultiin lopputulokseen, että syöpäpotilailla oli suuremmat PS-arvot verrattuna terveeseen ryhmään ja tätä voitaisiinkin käyttää taudin diagnoosimenetelmänä.

Vaikka eksosomit muistuttavat molekyylikoostumukseltaan erittävää solua, niissä on myös kaikille eksosomeille tyypillisiä proteiineja, jotka ovat usein peräisin solun endosomaalisista osista sekä solukalvolta. Sen sijaan eksosomeissa ei ole lainkaan solun tumakalvolla, golgin laitteessa, mitokondrioissa tai endoplasmakalvostolla esiintyviä proteiineja. (Chatput ja Théry 2011; Stoorvogel ja muut 2002; Amigorena ja muut 2002)

Eksosomien pinnalla on integraalisia kalvoproteiineja (kuva 2.b). Näihin kuuluvat antigeneita esittelevät MHC-molekyylit ja PS:ihin kiinnittyneet MFG-E8 (engl. *milk fat globule-EGF factor 8 protein*) –proteiinit, jotka liittyvät apoptoottisiin soluihin. Lisäksi eksosomien kalvolla on integriinejä, GPI-ankkuroituja molekyylejä sekä tetraspaniineja, joista CD9, CD63, CD81 ja CD82 ovat eksosomeille tyypillisiä. Tetraspaniineja käytetään yleisesti markkereina eksosomien havaitsemiseen. Tetraspaniinit osallistuvat MVB:n muodostumiseen ja ovat usein yhteydessä integriineihin, kasvutekijäreseptoreihin ja MHC-molekyyleihin. (Chatput ja Théry 2011; Stoorvogel ja muut 2002)

Eksosomit sisältävät kalvoproteiinien lisäksi myös liukoisia proteiineja. Näitä ovat kaperoneihin kuuluvat ja stressiä vastaan toimivat lämpösokkiproteiinit hsc73 ja hsc90 sekä endosomaaliseen kuljetukseen ja MVB:n biogeneesiin osallistuvat Alix- ja TSG101-proteiinit. Tetraspaniinin tapaan myös TSG101 on erityisen rikastunut eksosomeissa ja sitä voidaan käyttää eksosomimarkkerina. Näiden lisäksi proteiini-analyysillä on voitu osoittaa ubiquitinoitujen proteiinien sekä eksosomien muodostumista säätelevän ESCRT-proteiinikompleksin (engl. *endosomal sorting complexes required for transport*) komponenttien rikastumista eksosomeissa. (Simons ja Raposo 2009)

Solunsisäisessä kalvoliikenteessä keskeisessä roolissa ovat pieniin G-proteiineihin kuuluvat Rab-proteiinit, joita on myös eksosomeissa. Muita eksosomeista löytyviä kalvokuljetuksiin osallistuvia proteiineja ovat anneksiini ja flotilliini, joka on mukana klatriiniriippuvaisessa endosytoosissa. (Otto ja Nichols 2011; Simons ja Raposo 2009)

Proteiinien lisäksi eksosomit kuljettavat myös nukleiinihappomolekyylejä DNA- sekä monissa eri RNA –muodossa (kuva 2.c). Lähetti-RNA:t voidaan transloida vastaanottajasolussa näin vaikuttaen sen aineenvaihduntaan ja mikro-RNA (*lyh.* miRNA) voi sen sijaan hiljentää vastaanottajasolun geenejä (Théry ja muut 2009). RNA:n tarkkaa pakkaamista eksosomeihin ei tunneta, mutta valikoitumista arvellaan tapahtuvan, sillä eksosomien nukleiinihappomolekyylit ovat vain osa kaikista erittäjäsolun nukleiinihapoista. ESCRT-kompleksin komponenttien on arveltu osallistuvan RNA:n valikoimiseen sen lähetti-RNA:ta sitovan kyvyn takia. (Valadi ja muut 2007; Simons ja Raposo 2009; Melo ja muut 2014)

2.3.1 Eksosomit syövän mikroympäristössä

Eksosomeja erittyy kaikista solutyypeistä, mutta syöpäsolut erittävät normaaleja soluja enemmän eksosomeja ympäristöönsä. Syöpäpotilaiden veren eksosomien pitoisuuden on todettu nousseen verrattuna terveiden henkilöiden veren eksosomien määrään. Niinpä eksosomit ovatkin tärkeä tutkimuksen kohde, sillä ne voisivat toimia syövän toteamisen biomarkkereina sekä hoitovasteen seurannassa. (Huang ja Deng 2019; Théry ja muut 2009; Alzahrani ja muut 2018; Qi ja muut 2016.) Alzahrani tutkimusryhmineen (2018) totesi maksasyövän kantasolujen erittämien eksosomien stimuloivan syövän kasvua ja metastoitumista. Lisäksi ryhmä huomasi syöpämarkkereiden nousua seerumissa, mikä vahvistaa eksosomien potentiaalisuutta toimia syövän biomarkkereina. Tarkempaa tutkimusta eksosomien käytöstä biomarkkereina ei ole kuitenkaan tehty.

Kun eksosomi sitoutuu kohdesolun solukalvolle, se voi jäädä siihen sitoutuneena tai se endosytoidaan solun sisälle (kuva 3.e). Koska eksosomit sisältävät proteiineja ja nukleiinihappoja, ne ovat tärkeässä roolissa solujen välisessä kommunikaatiossa. Vastaanottajasolu voi saada uusia ominaisuuksia eksosomien reseptoriproteiinien kautta, mikä tarkoittaa, että eksosomeja tuottavat solut muuttavat ympäröivien solujen käyttäytymistä. (Simons ja Raposo 2009; Stoorvogel ja muut 2002.) Syöpäsolujen erittämien eksosomien on myös todettu tuovan vastaanottajasoluun onkogeenisiä signaaleja sekä tiettyjä geenejä hiljentäviä tekijöitä (Tian ja muut 2014). Lisäksi syöpäeksosomien on todettu muuntavan ympäristöä syövälle suotuisammaksi vähähappisissa eli hypoksisissa olosuhteissa (Park ja muut 2010).

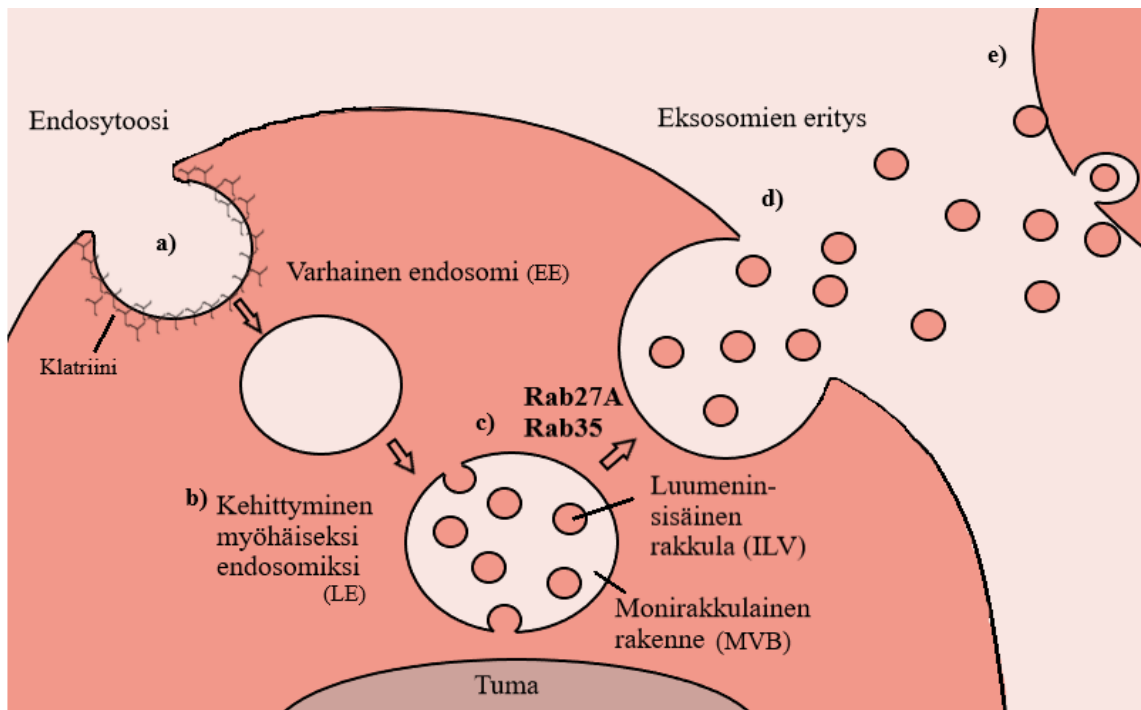
Kasvainten mikroympäristön tuntemisella voitaisiin kehittää parempia syövän hoitomuotoja sekä diagnostiikkaa, minkä takia lisää tietoa mikroympäristön komponenteista ja mekaniikoista tarvitaan.

2.3.2 Eksosomien tuotto eli biosynteesi

Eksosomien biosynteesi noudattelee solunsisäisen kalvokuljetuksen eri vaiheita; vesikkelin muodostuminen ja kuljetus sekä lastin vapautuminen kohdepaikassa. Eksosomien biosynteesi alkaa niitä erittävän solun solukalvolta sen endosytoidessa eli ottaessa materiaalia ulkopuolelta sisäänsä (kuva 3.a). Tätä teoriaa tukee eksosomien

kaksoislipidikalvon samankaltaisuus niitä erittävän solun solukalvon kanssa. Endosytoosi voi alkaa muutamien eri tavoin, mutta tämän tutkielman kirjallisuuskatsauksessa keskitytään klatriinivälitteiseen endosytoosiin, minkä on todettu johtavan eksosomien biosynteesiin. Toinen endosytoosin muoto on kaveolivälitteinen endosytoosi, ja sen häiritsemisen ei ole todettu vähentävän eksosomien tuotantoa (Tian ja muut 2014).

Klatriini on kolmesta raskaasta ja kolmesta kevyestä ketjusta muodostuva proteiini. Kun klatriinia alkaa kerääntyä solukalvon sisäpuolen pintaan, proteiinit alkavat polymerisoitua muodostaen peitteen ja edistävät edelleen muiden proteiinien toimintoja. Tämä johtaa kalvon kaareutumiseen solun sisälle. Kaareutuminen johtaa lopuksi vesikkelin muodostumiseen solun sisälle, minkä jälkeen klatriinipeite hajoaa. (Mosesson ja muut 2008)



Kuva 3. Eksosomien biosynteesi endosomaalisten reittien kautta. a) Solu endosytoi klatriiniproteiinien avustuksella muodostaen varhaisen endosomin. b) Varhainen endosomi kehittyy myöhäiseksi endosomiksi liikkuen lähemmäs tumaa. c) Myöhäisen endosomin sisälle alkaa kuroutua luumeninsisäisiä rakkuloita ja muodostuu monirakkulainen rakenne. Tähän on Rab35-proteiinin ehdotettu osallistuvan. d) Monirakkulainen rakenne kulkeutuu solukalvolle johtaen kalvojen fuusioitumiseen ja eksosomien vapautumiseen. Rab27A osallistuu luultavasti monirakkulaisen rakenteen ankkuroimiseen ja fuusioitumiseen solukalvon kanssa. e) Lähellä olevat solut voivat endosytoida eksosomit sisäänsä. Kuva muokattu ottaen mallia artikkeleista Simons ja Raposo (2009), Mellman (1996) sekä Théry ja muut (2002).

Kun varhaiseksi endosomiksi kutsuttu vesikkeli on muodostunut (kuva 3.b), biosynteesi jatkuu solun sisällä endosomaalisia reittejä pitkin. Varhaiset endosomit sijaitsevat lähellä solukalvoa ja ovat endosomaalisen reitin lajitteluosuus, missä siihen ohjatut molekyylit joutuvat joko kierrätetyksi takaisin solukalvolle kuljetusrakkuloissa tai edelleen myöhäisiin endosomeihin. Molekyylien valikoivaa ohjaamista ei kuitenkaan tarkkaan tunneta. (Simons ja Raposo 2009; Mellman 1996)

Varhainen endosomi kehittyy edelleen myöhäiseksi endosomiksi, kun se kulkeutuu kohti solun keskustaa (kuva 3.c). Samalla endosomin koko kasvaa (Stoorvogel ja muut 1991). Koon ja solunsisäisen sijainnin lisäksi varhaiset ja myöhäiset endosomit eroavat toisistaan fysikaalisilta ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan, morfologialtaan sekä proteiinikoostumukseltaan. pH on esimerkiksi pienempi myöhäisissä endosomeissa. Myöhäinen endosomi sisältää endosytoituja molekyylejä, jotka ohjataan tästä eteenpäin kierrätettäväksi tai lysosomiin hajotettavaksi, kun niihin on liitetty ubiquitiini. Kierrätyksen kautta molekyylit voivat joutua eritettäväksi ulos soluista eksosomien sisällä. Tässäkään tarkkaa ohjaamismekanismia ei tiedetä, kuten ei myöskään sitä, kehittyvätkö nämä eri kohteeseen määrätty rakenteet samasta alkuperästä vai alusta asti itsenäisesti. (Simons ja Raposo 2009; Mellman 1996)

Samalla kun myöhäinen endosomi kehittyy, sen kalvo alkaa kuroutua sisäänpäin muodostaen lopuksi pieniä rakkuloita sisäänsä, joita kutsutaan luumeninsisäisiksi kalvorakkuloiksi (engl. *intraluminal vesicles*, ILV) (kuva 3.c). Kuroutuminen muistuttaa tapahtuman alun endosytoosia. ILV:itä sisältävää myöhäistä endosomia kutsutaan edelleen monirakkulaiseksi rakenteeksi (engl. *multivesicular body*, MVB). (Piper ja Katzmann 2007.) ESCRT-kompleksin on arveltu osallistuvan ILV:iden muodostukseen (Simons ja Raposo 2009). Lopulta MVB kulkeutuu kohti solukalvoa, missä se ankkuroidaan monien proteiinien avulla kalvoon. Ankkuroituminen johtaa edelleen näiden kahden kalvon fuusioitumiseen ja ILV:iden erittymiseen ulos solusta (kuva 3.d). Erittymisen jälkeen ILV:itä kutsutaan termillä eksosomit. (Stoorvogel ja muut 2002.) Ca²⁺-pitoisuus solun sisällä on huomattu stimuloivan eksosomien eritystä (Hessvik ja Llorente 2018).

2.3.3 Eksosomien käyttömahdollisuudet lääketieteessä

Eksosomit ovat potentiaalisia biomarkkereita syövän toteamisessa. Koska syöpäpotilailla on todettu olevan kohonnut eksosomi- sekä eksosomiperäisten miRNA-molekyylien määrä veressä, kohonneiden arvojen toteamisella tauti voitaisiin havaita jo hyvin aikaisessa vaiheessa. Tällöin potilaalla voisi olla paremmat selviytymismahdollisuudet. Eksosomien eristäminen on kuitenkin haastavaa, koska biologisissa nesteissä on muitakin vesikkeleitä. Menetelmiä täytyy siis vielä kehittää. (Amiji ja Ramesh 2018)

Diagnostisten käyttötarkoitusten lisäksi, eksosomeja voitaisiin käyttää hoitomuotona. Eksosomien rakenteen tarkalla tuntemisella voitaisiin tehdä eksosomeja muistuttavia keinotekoisia liposomeja ja käyttää niitä lääkeaineiden kuljetuksessa. Eksosomeja on ehdotettu käytettäväksi myös immunoterapeuttisiin tarkoituksiin. (Amiji ja Ramesh 2018; Antimisiaris ja muut 2018)

2.4 GTPaasi-superperheen Rab-proteiinit

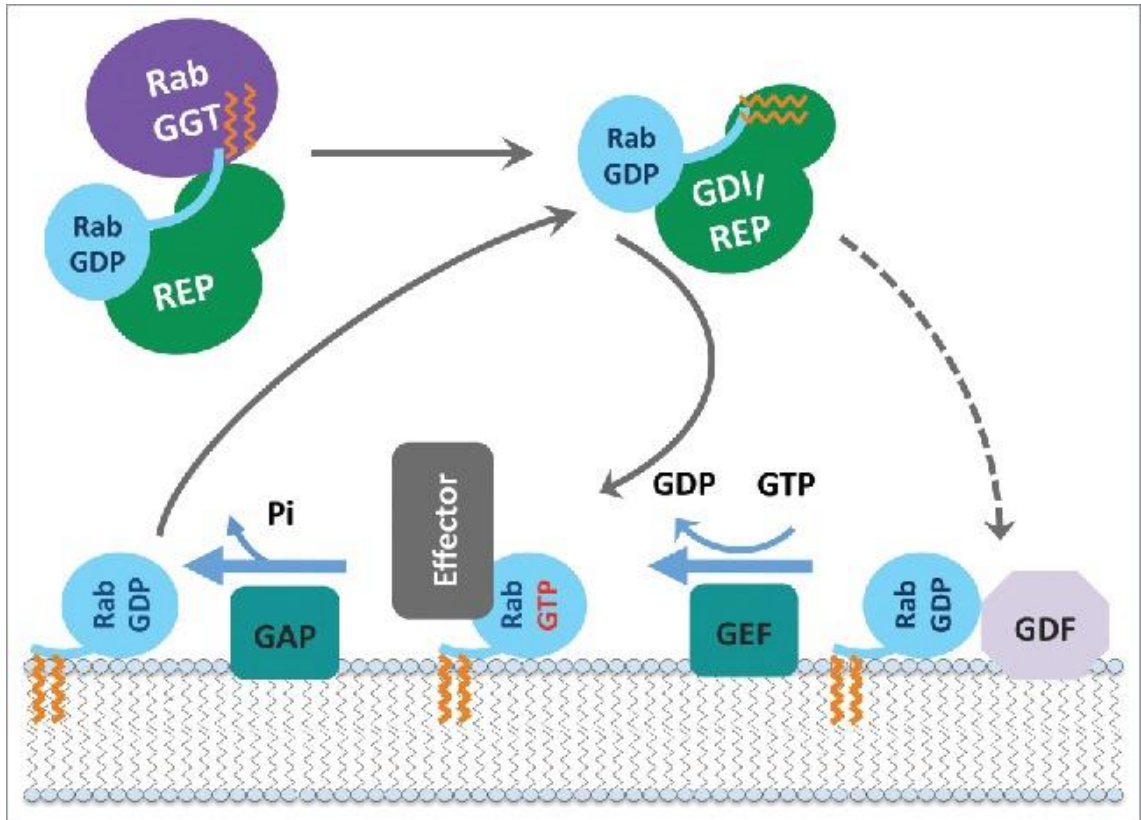
Kalvokuljetuksiin osallistuvien monien Rab-proteiinien on huomattu osallistuvan myös eksosomien biosynteesiin. Esimerkiksi Rab11 osallistuu MVB:n kiinnittymiseen ja yhdistymiseen solukalvoon (Savina ja muut 2005). Guanosiinitrifosfataasit eli GTPaasit ovat GTP:tä sitovia ja hydrolysoivia entsyymejä. GTPaasit ovat mukana monissa solun toiminnoissa, kuten solujen välisessä signaloinnissa ja kalvoliikenteessä. Suurin näihin entsyymeihin kuuluva ryhmä on Ras-superperhe. Ras-superperheen entsyymit ovat monomeerisiä G-proteiineja ja tähän ryhmään kuuluvat edelleen Rab-proteiinit (engl. *Ras-related protein in brain*), jotka ovat erittäin konservoituja eukaryoottisoluissa. (Stenmark ja Olkkonen 2001.) Rab-proteiinien määrän on huomattu kasvavan mentäessä niin sanotuista alemman tason eukaryoottisoluista aina nisäkässoluihin asti, mikä viittaa niiden suurempaan tarpeeseen monimutkaisemmissa soluissa (Fukuda 2013). Ihmisillä Rab-proteiiniperheessä on yli 60 jäsentä (Pereira-Leal ja Seabra 2001). Rab-proteiinit olivat ensimmäisten tunnistettujen kuljetuksia säätelevien tekijöiden joukossa. Yksittäisten Rab-proteiinien tarkkoja rooleja on kuitenkin ollut vaikea määrittää solussa. Joidenkin Rab-proteiinien on todettu löytyvän kaikista eukaryoottisoluista ja toimivan näin ylläpitogeneeninä, joita ilman solu ei selviä. Näihin lukeutuvat esimerkiksi Rab7 ja Rab8a, joiden poistogeeniset hiiret eivät selviydy. Joidenkin Rab-proteiinien epänormaali toiminta on liitetty tiettyihin sairauksiin. Esimerkiksi Rab25:n yliekspression on

huomattu olevan yhteydessä munasarja- sekä muiden syöpien huonoihin ennustuksiin. Munasarjasyöpöpotilailla on todettu itseasiassa yli puolessa tapauksissa Rab27A:n yliekspressiota. (Mosesson ja muut 2008.) Rab-proteiinit edelleen aktivoivat Rab-efektoriproteiineja säädelläkseen tapahtumia. (Fukuda 2013; Pylypenko ja muut 2018)

Rab-proteiinit ovat joko aktiivisia, kun ne ovat sitoneet GTP:n tai inaktiivisia, kun sitoutunut GTP-molekyyli on hydrolysoitu GDP:ksi. Aktiivisina ollessaan ne säätelevät kuljetuksia, fuusioitumisia, endosytoosia, kierrätyksiä ja proteiinien hajotuksia. Yleisesti ne toimivat yhdistävänä tekijänä kalvojen, moottoriproteiinien ja solun tukirangan välillä. Rab-proteiinien toiminnan säätelyä tarvitaan myös muita proteiineja. GEF-proteiinit (engl. *guanine nucleotide exchange factor*) aktivoivat Rab-proteiinit vaihtamalla nimensä mukaisesti GDP:n GTP:ksi. Myös Rab-proteiinin aktiivisuuden kesto säätelee inaktivoimalla se GAP-proteiinin (engl. *GTPase activating protein*) toimesta, joka aktivoi siis sitoutuneen GTP:n hydrolyysia. (Barr ja Lambright 2010; Stenmark ja Olkkonen 2001)

Rab-proteiinit ovat itsessään liukoisia molekyylejä, mutta proteiinin C-terminaaliossa hännässä olevien kahden kysteiniin prenylaatio johtaa proteiinin kiinnittymiseen solunsisäisiin lipidikalvoihin (Seabra ja Hume 2002). Solunsisäisiin kalvoihin kiinnittyneenä ne eivät jakaannu tasaisesti vaan ryhmittyvät tiettyihin funktionaalisiin alueisiin (Zerial & McBride, 2001). Prenylaatio on posttranslationalinen muokkaus, missä proteiiniin liitetään kovalenttisesti isoprenoidiryhmä ja tätä katalysoi RGGT-entsyymi (engl. *Rab geranylgeranyl transferase*). Rab-proteiinien prenylaation häiriintyminen voi johtaa erinäisiin sairauksiin. (Pereira-Leal ja muut 2001.) Rab:n siirtävä proteiini (engl. *rab escort protein*, REP) irrottaa Rab-proteiinin kalvosta sitoutumalla sen hydrofobisiin prenyyliryhmiin, jolloin se voidaan kuljettaa solulimassa vastaanottajakalvolle. Rab-REP-kompleksin on myös todettu olevan RGGT:n substraatti. Toinen Rab:n kalvosta irrottava proteiini on GDI (engl. *GDP dissociation inhibitor*), joka irrottaessaan Rab:n, pitää sen inaktiivisena solulimassa. Lopulta GDI kuitenkin palauttaa Rab:n vastaanottajakalvolle ja kierto voi alkaa uudestaan. Rab-proteiinit säätelevät kalvokuljetuksia värväämällä efektoriproteiineja ollessaan aktiivisia. Kun Rab-proteiini sitten inaktivoidaan, efektoriproteiinit voivat vapautua ja Rab-proteiini voidaan palauttaa luovuttajakalvolle GDI:n toimesta. (Seabra ja Hume 2002)

Rab-proteiinit ovat osallisena myös eksosomien biosynteesissä. Rab-proteiiniperheen jäseniä on sekä varhaisissa että myöhäisissä endosomeissa, mutta eri määriä ja eri kokoonpanoilla. (Gruenberg ja Maxfield 1995.) Seuraavissa kappaleissa tarkastellaan kahta tiettyä tämän tutkimuksen keskeisessä osassa olevaa Rab-proteiinia; Rab27A ja Rab35. Näiden kahden proteiinin mahdolliset sijainnit eksosomien biosynteesissä on esitetty kuvassa 3.

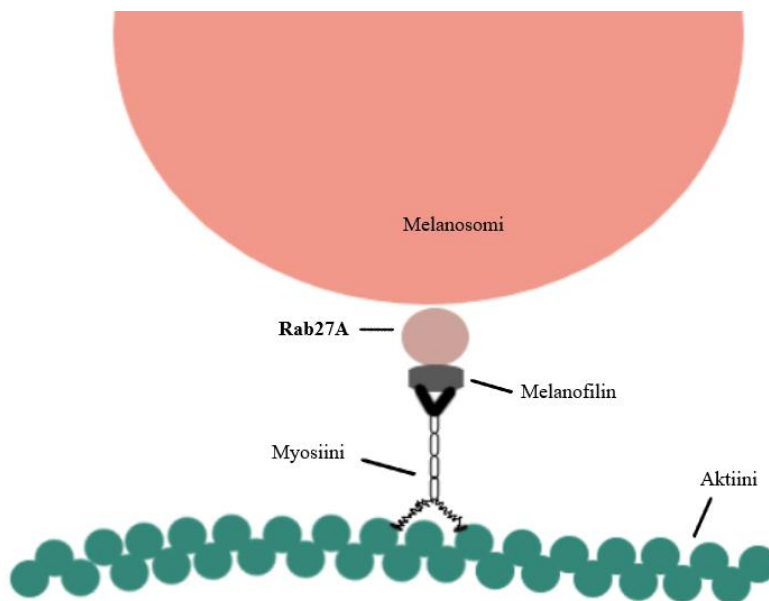


Kuva 4. Rab-proteiinit ja niiden efektorit. Rab-proteiinit eivät yksinään pysty säätelemään solun monia toimintoja vaan edelleen Rab-proteiinien toimintojen säätelyiksi tarvitaan efektoriproteiineja. GEF-proteiinit aktivoivat ja GAP-proteiinit inaktivoivat Rab-proteiinit. Rab-proteiinit kiinnittyvät lipidikalvoille niihin liitettyjen isoprenoidiryhmien avulla. Kuva on peräisin artikkelista Pylypenko ja muut 2018.

2.4.1 Rab27A

Rab27 on erittäin konservoitunut Rab-proteiini, jota tavataan kaikissa monisoluisissa eukaryoottisoluisissa kasvi- ja hiivasoluja lukuun ottamatta. Sillä on kaksi isoformia, Rab27A ja -B, joista Rab27A on tässä tutkimuksessa keskeisessä osassa. Rab27A on 221 aminohapon ja 24 kDa:n kokoinen. Se on ensimmäisiä Rab-proteiineja, jonka toiminnan häiriö liitettiin perinnölliseen sairauteen. (Fukuda 2013; UniProt 2019.a)

Rab27A:n roolia soluissa on tutkittu muutamissa eri solutyypeissä. Esimerkiksi melanosyyteissä Rab27A:n on todettu osallistuvan melanosomin kuljetukseen (kuva 5). Melanosomit ovat melaniinia sisältäviä soluelimiä, jotka solun altistuessa UV-valolle kulkeutuvat solun keskustasta kohti solukalvoa. Kulkeutuminen tapahtuu aktiiniverkostoa pitkin ja Rab27A osallistuu kahden muun proteiinin kanssa melanosomin ja verkoston väliseen sitoutumiseen. Rab27A:n toiminnan häiriön on todettu johtavan melanosomien kerääntymiseen melanosyytteihin aiheuttaen albinismin muotoa nimeltä tyypin kaksi Griscellin oireyhtymä. (Van Gele ja muut 2009)



Kuva 5. Melanosomi kuljetetaan aktiiniverkostoa pitkin melanosyytissä. Melanosomin kiinnitys aktiiniin tapahtuu Rab27A-, melanofilin- ja myosiiniproteiinien avulla. Kuva muokattu ottaen mallia artikkelista Van Gele ja muut 2009.

Rab27A:n roolia soluissa on tarkasteltu myös geenihiljennyksen kautta. Hiljennyksen on huomattu johtaneen vähentyneeseen eksosomien eritykseen adenokarsinomasoluilla, rintasyöpäsoluilla sekä HeLa-soluilla (Li ja muut 2014; Bobrie ja muut 2012; Ostrowski ja muut 2010). Osassa tutkimuksissa käytettiin samaa RNA-interferenssimenetelmää kuin tämän tutkielman tutkimusosiossa. Vähentyneen eksosomituotannon lisäksi Bobrie tutkimusryhmineen (2012) havaitsi primaarin kasvaimen kasvun hidastumista, mikä viittaa eksosomien rooliin syövän synnyssä ja etenemisessä. Ostrowski tutkimusryhmineen (2010) totesi Rab27A:n osallistuvan MVE:n ja solukalvon väliseen fuusioitumiseen, kun hiljennyksen seurauksena huomattiin, että MVE:iden koot

kasvoivat. Lisäksi on havaittu *RAB27A*-geenin hiljentämisen ja sen seurauksena vähentyneen eksosomituoton vaikuttavan miRNA-määriin syövän ympäristössä. Tässä todettiin eksosytoitujen kasvunrajoite-miRNA:iden määrän pienentyneen huomattavasti, ja vastaavasti määrä kasvoi solun sisällä johtaen soluinvaaasion vähentymiseen. Tulokset viittaavat siihen, että eksosomit olisivat syöpäsolujen tapa päästä eroon kasvunrajoite-miRNA:ista edesauttaen näin solun muuntautumista. (Ostenfeld ja muut 2014.)

2.4.2 Rab35

Rab35 on 201 aminohapon ja 23,025 kDa:n kokoinen proteiini (UniProt 2019.b). Rab27A:n tapaan se on hyvin konservoitu kaikissa monisoluisissa eliöissä. Rab35:tä on havaittu sijaitsevan soluissa kierrätettävissä endosomeissa ja solukalvolla, mistä on päätelty sen osallistuvan solun homeostaasin ylläpitoon ja reseptorien kierrätykseen. Solunsisäisten kalvokuljetusten lisäksi Rab35:n on todettu muokkaavan solun muotoa sekä osallistuvan solunjakautumisen sytokineesi-vaiheeseen. Rab35:n yhteys sytokineesiin huomattiin, kun geenin hiljentäminen johti kaksitumaisiin soluihin. Lisäksi tutkimuksessa huomattiin endosyyttisten markkereiden kerääntyminen soluliman vakuoleihin. Rab35-proteiinilla on todettu olevan myös onkogeenisia piirteitä. Geenin hiljentämisen on huomattu pysäyttävän PI3K/Akt-reaktioreitin ja vastaavasti aktiivisena pysyvän Rab35-proteiinin on huomattu johtavan reaktioreitin jatkuvaan aktivointiin. Tämän reaktioreitin on todettu olevan monissa syövässä aktiivisempi kuin normaalisoluisissa. (Kouranti ja muut 2006; Wheeler ja muut 2015.) Hsu tutkimusryhmineen (2010) huomasi *Rab35*-geenin hiljentämisen vähentävän eksosomituotantoa soluissa ja päinvastoin jatkuvasti aktiivisena olevan Rab35-proteiinin lisäävän eksosomien eritystä. Myös Rab35:n on arveltu osallistuvan MVB:n ankkuroimiseen ja fuusioitumiseen eksosomien biosynteesissä. (Hsu ja muut 2010)

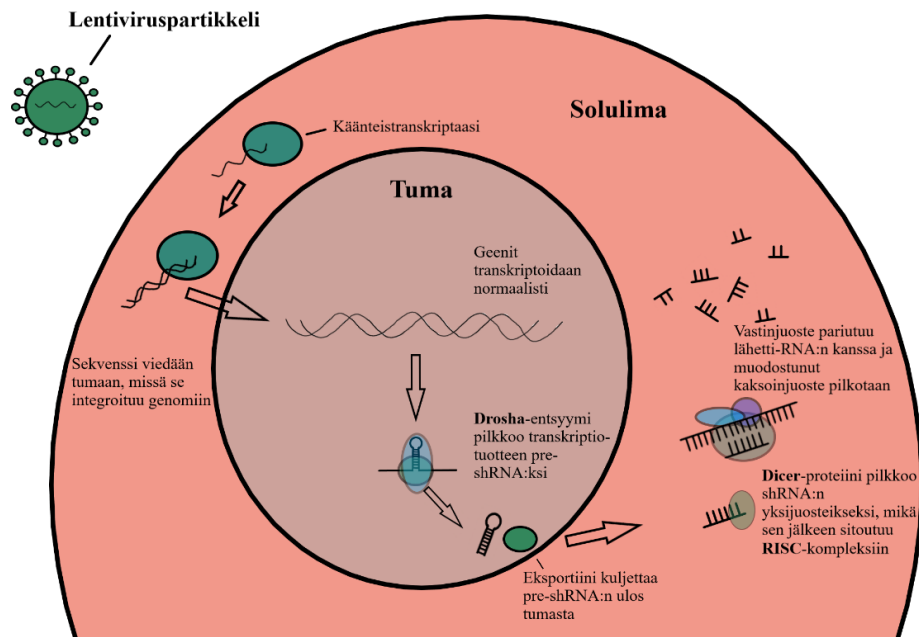
2.5 Geenin hiljentäminen shRNA-menetelmällä

Tämän tutkimuksen kohteena olevien proteiinien geenit hiljennettiin RNA-interferenssin avulla käyttäen shRNA-tekniikkaa (engl. *short hairpin RNA*). Vektoreina käytettiin lentiviruspartikkeleita, jotka infektoivat solun ja vievät RNA-molekyylin transduktoitavan solun sisälle (kuva 6). RNA-molekyylin sekvenssi on pätkä kohdegeenin sekvenssistä, jolloin saadaan aikaan kohdegeenille spesifi vaikutus. Solun sisään tuotu RNA-molekyyli käännetään sitten kaksijuosteiseksi DNA:ksi

käänteiskopioijaentsyymin avulla ja viedään tumaan. Tumassa tämä ekstrakromosomaalinen sekvenssi integroituu osaksi solun genomia, minkä jälkeen se voidaan transkriptoida normaalisti. Tästä genomiin integroitumisesta johtuen sekvenssi replikoituu edelleen tytärsoluihin ja kohdegeenin hiljentäminen on näin pitkävaikutteista. Sekvenssi ei integroidu kuitenkaan tiettyyn paikkaan genomia vaan paikka on satunnainen, jonka vuoksi hiljennyksen onnistuminen täytyy varmistaa. On esimerkiksi mahdollista, että sekvenssi joutuu heikon promoottorin alle, jolloin transkriptiota ei juurikaan tapahdu eikä hiljentävää shRNA-molekyyliä tuotu. Lisäksi epigeneettiset muokkaukset voivat vaikuttaa geenin ilmentymiseen. (Paddison ja muut 2002; Dharmacon Horizon Discovery 2019)

ShRNA-sekvenssin transkription jälkeen Drosha-niminen entsyymi pilkkoo syntyneen RNA-juosteen tuottaen 50 – 70 nukleotidia pitkän molekyylin. Tämä yksijuosteinen sekvenssi muodostaa nimensä mukaisesti hiuspinnää muistuttavan rakenteen. Rakenne pariutuu osittain itsensä, kun molekyylin molemmissa päissä on 19 – 29 nukleotidin mittaiset toisilleen komplementaariset sekvenssit. Kun nämä molekyylin osat pariutuvat keskenään, väliin jäävä yksijuosteinen sekvenssi toimii ikään kuin siltana näiden välissä. (Paddison ja muut 2002; Dharmacon Horizon Discovery 2019)

Tumassa muodostunut pre-shRNA kuljetetaan Eksportiini-5 –proteiinin avulla tumasta ulos solulimaan, missä Dicer-nukleaasi pilkkoo molekyylin kahdeksi yksijuosteiseksi RNA:ksi. Molemmat juosteet liitetään RISC (engl. *RNA-induced silencing complex*) -komplekseihin, joista toinen hajotetaan ja toinen ohjataan eteenpäin kohteessa olevan lähetti-RNA:n luo. Hajotukseen ohjautuvaan kompleksiin on sitoutunut kohdegeenin lähetti-RNA:n kanssa saman sekvenssin sisältävä juoste. Sen sijaan RISC-kompleksi, johon on liittynyt vastinjuoste, ohjataan kyseisen lähetti-RNA:n luokse, jolloin juosteet voivat pariutua keskenään. Muodostunut kaksoisjuoste-RNA pilkootaan, jolloin lähetti-RNA:ta ei siis transloida, eikä kohdeproteiinia näin ollen tuotu. (Paddison ja muut 2002; Dharmacon Horizon Discovery 2019)



Kuva 6. Lentivirusvälitteinen shRNA (engl *short hairpin RNA*) -menetelmä geenin hiljentämiseksi. Viruspartikkeli tuo hiljentävän sekvenssin solun sisään, missä se integroituu genomiin ja transkriptoituu. Transkription jälkeen RNA-molekyyliä pilkotaan ja kuljetetaan solulimaan, missä se lopulta pariutuu lähetti-RNA:n kanssa johtaen sen hajotukseen. Tekniikka on soluissa erittäin spesifi ja pitkävaikutteinen. Kuva on muokattu ottaen mallia WWW-sivulta <https://dharmacon.horizondiscovery.com/rnai/shrna/#all>. 4.3.2019

3 Tutkimuksen tausta ja tavoitteet

Työn tarkoituksena oli tutkia kahden eksosomien biosynteesiin osallistuvan Rab-proteiinin, Rab27A ja Rab35, rooleja munasarjasyöpäsolujen eksosomierityksessä. Molempia proteiineja esiintyy solunsisäisissä kalvorakenteissa ja molempien on ehdotettu osallistuvan MVB:n ja solukalvon ankkuroimiseen ja fuusioitumiseen, johtaen eksosomien vapautumiseen soluvälitilaan. Tutkimuksessa hiljennettiin näiden kahden proteiinin geenit, joko *Rab27A* tai *Rab35*, ja tarkasteltiin hiljennyksen vaikutuksia HGSOC-soluissa. HGSOC valikoitui tutkimuksen syöpämalliksi sen aggressiivisuuden ja pahanlaatuisuuden takia. Molempiin geeneihin liittyen on aiemmin tehty knockdown-solumalleja, mutta ei munasarjasyöpäsoluilla, jonka vuoksi tällä tutkimuksella voidaan saada uutta tietoa näistä proteiineista.

Geenien hiljentämisen menetelmäksi valikoitui lentivirusvälitteinen shRNA sen spesifisyyden takia. Lisäksi hiljennys on pitkäkestoinen, koska vaikutus replikoituu eteenpäin tytärsoluihin, mikä on tämän tutkimuksen kokeiden kannalta tarpeellinen ominaisuus. Ennen geenien hiljentämistä valitut solulinjat karakterisoitiin mahdollisten myöhempien muutosten toteamiseksi. RNA-interferenssimenetelmän jälkeen hiljennyksen onnistuminen todettiin sekä lähetti-RNA- että proteiinitasolla. Tähän valitut menetelmät olivat reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR-Taqman –menetelmä sekä Western blot.

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet molempien Rab-proteiinien hiljennysten johtaneen solujen eksosomien erityksen vähentymiseen. Tämän perusteella tässä tutkimuksessa hypoteesina oli, että Rab27A:n ja Rab35:n hiljentäminen HGSOC-soluissa johtaisi eksosomierityksen vähenemiseen ja aiheuttaisi muutoksia solujen aggressiivisessa ilmiössä.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Soluviljely

Tutkimuksessa käytettiin neljää eri solulinjaa; kaupallisia OVCAR8 (ATCC: The global bioresource center.) ja Kuramochi (JCRB Cell Bank, Cat no JCRB0098) -linjoja sekä primaareita M022i (Chen ja muut 2015) ja M019i (Nguyen ja muut 2017) -linjoja. Näitä viljeltiin adherentteina RPMI-1640-kasvatusliuoksessa (1X, 31870-025, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat), johon oltiin lisätty 1 % penisilliinistreptomysiiniä (15140-122 Gibco™, Thermo Fisher Scientific), 1% UltraGlutamiini™ I:tä (200 mM, BE17-605E/U1, Lonza, Sveitsi) ja 10 % naudan sikiön seerumia (*engl.* fetal bovine serum, FBS) (S181B-500, Biowest®, Ranska). Soluja viljeltiin myös sferoideina DMEM-F12-kasvatusliuoksessa (Dulbecco's Modified Eagle Medium:F12 (DMEM:F12, Tuotenumero #BE04-687F/U1, Lonza)), johon oltiin lisätty 1 % penisilliinistreptomysiiniä, 0,01 % kasvutekijöitä EGF (Gibco™ EGF Recombinant Human Protein, PHG0311L, Thermo Fisher Scientific) ja FGF (Gibco™ Recombinant Human FGF-Basic, PHG0026, Thermo Fisher Scientific) sekä 2 % B-27™ (50X, Tuotenumero 17504044, Gibco™, Thermo Fisher Scientific). Transduktoitujen solujen kohdalla kasvatusliuokset olivat samat, mutta mediuumeissa käytettiin lisäksi selektioantibioottina puromysiini dihydrokloridia (PMD, Tuotenumero P7255, Sigma-Aldrich®, Yhdysvallat) konsentraatiolla 2,5 µg/ml. Solut kasvatettiin inkubaatiokaapissa +37 celsiusasteessa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa.

Jakamista varten solut irrotettiin pohjasta trypsiini-EDTA:lla (1X Solution, 0,05 % trypsin, 0,02% EDTA, Tuotenumero 59417C, Sigma-Aldrich®, Yhdysvallat). Soluviljelyssä käytettiin taulukon 1 mukaisia tilavuuksia. Kaikki soluviljelyssä käytettävät astiat olivat merkkiä Greiner CELLSTAR® (Sigma-Aldrich®).

Taulukko 1. Soluviljelyssä käytetyt tilavuudet.

Astia	Pinta-ala (cm ²)	Trypsiini/EDTA (ml)	Kasvatusliuos (ml)
6-kuoppalevy	9	2	3
12- kuoppalevy	4	1	2
24- kuoppalevy	2	0,5	1
96- kuoppalevy	0,32	-	0,2
T25	25	2	5
T75	75	3	10
T175	175	5	20

Solut pakastettiin FBS:ään, johon oltiin lisätty 7,5 % dimetyylisulfoksidia (DMSO, Tuotenumero BP231-100, Fisher BioReagents™). Solujen siirtämisessä suspensiosta toiseen, solut lingottiin eli sentrifugoitiin pohjaan viiden minuutin ajan 150 x g huoneenlämmössä.

Solut kuvattiin Olympus CKX53 tai Primovert ZEISS –mikroskoopilla.

4.2 *Rab27A* ja *Rab35* -geenien hiljennys

Rab27A ja *Rab35* -geenit hiljennettiin shRNA-menetelmällä käyttäen kaupallisia lentiviruspartikkeleita (MISSION™ TRC shRNA, Sigma-Aldrich®) ja transduktio tehtiin valmistajan ohjeen mukaisesti. Transdukoituneet solut selekoitiin puromysiini-antibiootilla konsentraatiossa 2,5 µg/ml. OVCAR8-solujen transduktiossa käytettiin kahta eri lentiviruspartikkelikonsentraatiota: MOI 2 ja MOI 5 (engl. *multiplicity of infection*, MOI), ja transduktion tehostamiseksi kasvatusliuokseen lisättiin heksadimetriini bromidia (HMB, Tuotenumero H9268, Sigma-Aldrich®) 8 µg/ml ohjeen mukaisesti. Käytetyt sekvenssit liitteessä 1. Geenihiljennysten kontrolleina käytettiin solulinjojen villityyppejä ja niin sanotulla sekoitetulla (engl. *scrambled*) sekvenssillä transdukoituja solulinjoja.

4.3 *Rab27A* ja *Rab35* -geenien ilmentymisen määrittäminen

4.3.1 Geenien ilmentymisen määrittäminen lähetti-RNA-tasolla

RNA:n eristämiseksi soluja viljeltiin 12-kuoppalevyllä RPMI-kasvatusliuoksessa noin 70 % konfluenssiin asti, minkä jälkeen kasvatusliuokset poistettiin kuopista ja tilalle lisättiin

hajotuspuskuria (RNeasy® Mini Kit 250, Tuotenumero 74106, QIAGEN, Saksa) 300 µl/kuoppa. RNA:n eristys suoritettiin valmistajan ohjeen mukaan. RNA-näytteiden loppupitoisuudet mitattiin NanoDrop®-spektrofotometrillä (ND-1000, Thermo Fisher Scientific).

Näytteiden lähetti-RNA:t käännettiin cDNA:ksi SensiFAST® cDNA Synthesis Kit:llä (Tuotenumero BIO-65053, Biorline, Iso-Britannia). PCR-näytteet ajettiin Veriti (96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) PCR-laitteessa taulukon 2 ohjelman mukaisesti. Valmiit cDNA-tuotteet säilytettiin -20 celsiusasteessa.

Taulukko 2. PCR-laitteen ohjelma, jota käytettiin RNA:n syntetisoimiseen cDNA:ksi. Ohjelma on otettu SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit:n (Biorline) ohjeesta.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
Alukkeiden liittyminen	25	10
Käänteistranskriptio	42	15
Inaktivaatio	85	5
Säilytys	4	∞

Syntetisoidut cDNA:t laimennettiin nukleasivapaaseen veteen 1/10:een Taqman-reaktiota varten. Taqman-menetelmässä käytetyt alukkeet suunniteltiin Roche Universal ProbeLibrary Assay Design Center-sivustolla (Roche, Sveitsi). Kaikki reagenssit pidettiin jäällä ja juuri ennen käyttöä vorteksoitiin ja lingottiin alas. Reaktioseokset pipetoitiin 96-kuoppalevyille ja varsinaisen reaktioiden ajo tapahtui Turun Biotekniikan keskuksessa QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System -laitteella (Thermo Fisher Scientific). Lopulliset pitoisuudet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Taqman reaktiossa käytetyt pitoisuudet. DNA-näytteet oltiin laimennettu 1/10, minkä jälkeen reaktioseokset pipetoitiin 96-kuoppalevyille.

Reagenssi	Pitoisuus
2 x PCR universal master mix	5 µl
Fw aluke	300 nM
Rev aluke	300 nM
Koetin	100 nM
cDNA-tuote	2 µl
MQ H ₂ O	10 µl: aan asti

Tutkimuksessa käytettyjen koettimien sekvenssit on lueteltu liitteessä 2. Raakatulokset käsiteltiin QuantStudio 12 K Flex –ohjelmalla. Ekspressiotasojen arvot normalisoitiin GAPDH- ylläpitogeenin (engl. *housekeeping gene*) mukaan. Ylläpitogeenit ovat geenejä, joiden toiminnat ovat solulle välttämättömiä. Niiden ekspressiotasot ovat riippumattomia solulinjasta, minkä takia ne sopivat muiden geenien ekspressiotasojen normalisointiin.

4.3.2 Geenien ilmentymisen määrittäminen proteiinitasolla

Ennen solujen proteiiniekspression määrittämistä solut hajotettiin eli lyysattiin RIPA-lyysauspuskuriin (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 % NP-40; 0,5 % natriumdeoksikolaatti; 0,1 % natriumdodekyylisulfaatti (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS); pH 7,4), johon oltiin lisätty proteaasi-inhibiittorit (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Mini *EASYpack*, Tuotenumero 04 693 124 001, Roche) valmistajan ohjeen mukaan juuri ennen käyttöä. Kaikissa lyysauksen kohdissa, solut pidettiin jäällä ja saadut valmiit lysaatit säilytettiin -70 celsiusasteessa.

Hajotettavat adherentit solut viljeltiin kuoppalevyllä 3 – 7 vuorokautta. Noin 80 %:n konfluenssissa kuopista poistettiin ravinneliuokset ja tilalle lisättiin 20 – 50 µl/cm² RIPA-puskuria (sisältäen inhibiittorit). Solut raavittiin irti pohjasta, minkä jälkeen lysaatti siirrettiin inkuboitumaan +4 celsiusasteeseen tunniksi pyörivään liikkeeseen. Lysaatti sentrifugoitiin (12 600 x g, 30 min, +4 °C), ja supernatantti eli valmis lysaatti kerättiin talteen.

Sferoideina kasvavat solut erotettiin kasvatusliuoksestaan ennen lyysausta. Solut sentrifugoitiin pohjaan (10 000 x g, 10 min, +4 °C), ja pelletti resuspensoitiin RIPA-

puskuriin. Tämän jälkeen inkubointi ja sentrifugointi tehtiin samalla tavalla kuin adherenteilla soluilla.

Solujen tuottamien proteiinien ekspressiota tarkasteltiin Western blot-analyysin avulla. Geeliajoa varten lysaateista määritettiin proteiinipitoisuudet Bradford menetelmällä käyttämällä Protein Assay -värjäysreagenssia (Tuotenumero #5000006, Bio-Rad, Yhdysvallat). Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 600 nm Wallac VICTOR² 1420 MULTILABEL COUNTER (PerkinElmer®, Yhdysvallat) -lukulaitteella. Näytteet laimennettiin tarvittaessa PBS-puskurilla, jotta geelille saatiin ladattua noin 20 µg proteiinia/kaivo. Proteiinien denaturoimiseksi näytteisiin lisättiin 5 x Laemmli-puskuria (25 % glyseroli; 25 % β-merkaptoetanol; 0,2 M Tris-HCl pH 6,8; 10 % SDS; 0,1 % bromofenoli-sininen), keitettiin 95 asteessa 5 – 10 min ja sentrifugoitiin pikaisesti pohjalle.

Näytteiden proteiinit erotettiin toisistaan geelielektroforeettisesti ajamalla ne 12 %:lla polyakryyliamidigeelillä (engl. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) 100 – 120 V 1,5 – 2 tunnin ajan. Ajopuskurina käytettiin SDS-PAGE-ajopuskuria (250 mM Tris; 1,9 M glysiini; 1 % SDS). Geeliajon jälkeen proteiinivyöhykkeet siirrettiin geeliltä nitroselluloosakalvolle (PROTRAN™ 0,2 µm, NBA083C001EA, PerkinElmer®, Yhdysvallat) tunnin ajan 100 V siirtoajopuskurissa (25 mM Tris; 19,2 M glysiini, 20 % metanoli).

Membraani huuhdeltiin kylmällä vedellä ja proteiinien tasainen ajautuminen tarkistettiin kvalitatiivisesti Ponceau S-värjäyksellä (0,2 % Ponceau S (Sigma-Aldrich®); 5 % etikkahappo), minkä jälkeen värin poistamiseksi membraani huuhdeltiin taas vedellä. Epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi membraani blokattiin 5 %:lla maidolla (rasvaton maitojauhe, Valio) TBST-puskurissa (25 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20®; pH 7,6) tunnin ajan huoneenlämmössä keinuvassa liikkeessä. Membraani huuhdeltiin TBST-puskurilla ja laitettiin inkuboitumaan primaarivasta-aineeseen (vasta-aine laimennettiin 1:1000 TBST-puskuriin, missä 5 % naudan seerumin albumiini (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (A9647, Sigma-Aldrich®) ja 0,01 % natriumatsidi) yön yli +4 celsiusasteeseen.

Primaarivasta-aineen inkuboinnin jälkeen membraani pestiin 3 x 10 minuuttia TBST-puskurilla ja laitettiin sekundaarivasta-aineeseen (vasta-aine laimennettu 1:5000 TBST:hen, missä 5 % maito) tunniksi huoneenlämpöön keinuvaan liikkeeseen. Sekundaarivasta-aineen jälkeen membraani pestiin taas 3 x 10 minuuttia TBST:llä.

Proteiinien havainnoimiseksi membraania inkuboitiin ECL-liuoksessa (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Tuotenumero 34578, Thermo Fisher Scientific) muutaman minuutin ajan, minkä jälkeen membraani valotettiin röntgenfilmille (Tuotenumero RX1824, FUJIFILM Super RX-N) tai kuvattiin ChemiDoc™ (Bio-Rad) -kuvantamislaitteella. Valotusaika riippui signaalin vahvuudesta. Proteiinvyöhykkeiden voimakkuus (eli tutkittavan proteiinin ekspressiovoimakkuus) kvantifioitiin ImageJ-ohjelmalla (National Institutes of Health) ja latauskontrollina käytettiin α -aktiniinin ekspressiotasoja.

4.4 Solujen liikkuminen

Solujen liikkumista tutkittiin wound healing-menetelmän avulla. Solut kasvatettiin lähes 100 % konfluenssiin 96-kuoppalevyllä, minkä jälkeen kaivon pohjan solukerrokseen raapaistiin niin sanotut haavat. Haavojen tekemiseen käytettiin IncuCyte® WoundMaker (96-pin woundmaking tool, Essen BioScience, Yhdysvallat) -laitetta, ja niiden umpeutumista eli solujen liikkumista seurattiin IncuCyte ZOOM (Essen BioScience) -kuvantamislaitteella. Kuvantaminen tapahtui kahden tunnin välein ja laskettiin haavojen prosentuaalinen umpeutuminen.

4.5 Eksosomien erityksen tutkiminen

Kontrolleina käytettiin RPMI-kasvatusliuosta ilman FBS:ä, sekä kasvatusliuosta, johon lisätystä seerumista oltiin poistettu eksosomit. Eksosomit oltiin suodatettu pois sentrifugoimalla seerumi Vivaspin® Turbo 15 –putkissa (100 000 MWCO, Sartorius, Saksa).

Soluja laitettiin kasvuun 6-kuoppalevyille $3,0 \times 10^5$ solua/kuoppa 1,5 ml:aan kasvatusliuosta, johon normaalin seerumin sijaan oltiin laitettu eksosomi-vapaata seerumia. 72 tunnin jälkeen kasvatusliuokset kerättiin ja sentrifugoitiin $2000 \times g$ 30 min

+4 celsiusasteessa. Supernatanttiin lisättiin 50 V-% Total Exosome Isolation (Tuotenumero 4478362, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) -reagenssia valmistajan ohjeen mukaan, sekoitettiin hyvin ja inkuboitiin yön yli +4 celsiusasteessa. Näytteet sentrifugoitiin 10 000 x g, +4 celsiusasteessa tunnin ajan ja pelletti resuspensoitiin 20 µl:aan RIPA-puskuria (proteaasi-inhibiittorit lisätty). Inkubointi jäällä tunnin ajan, näytteiden vorteksointi ja sentrifugointi 12 000 x g, +4 celsiusasteessa 30 minuutin ajan. Näytteille tehtiin proteiinimääritys ja Western blot kuten aiemmin. Membraanilta detektoitiin eksosomimarkkerit CD9, CD63, CD81 ja TSG101.

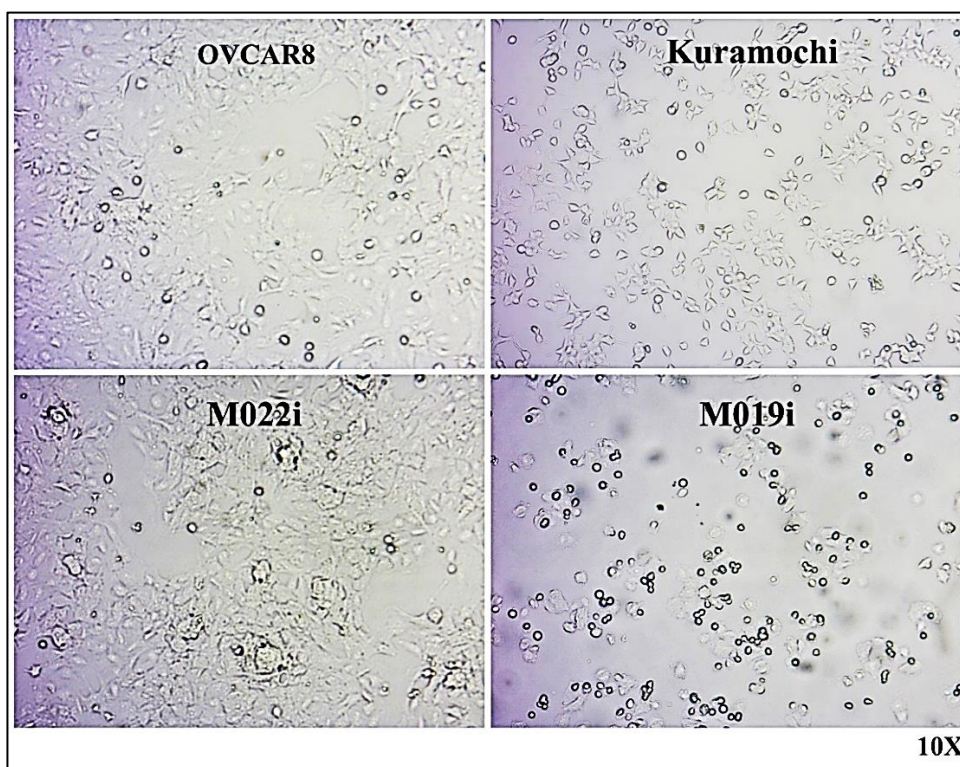
Kontrolliksi eksosomit eristettiin myös seerumi-vapaasta kasvatusliuoksesta, mihin oltiin lisätty penisilliinistreptomysiiniä ja ultraglutamiinia normaalisti, mutta ei seerumia (FBS). Toisena kontrollina eksosomit eristettiin eksosomi-vapaasta kasvatusliuoksesta.

5 Tulokset

5.1 Villityyppi-solujen karakterisaatio

Tutkimus aloitettiin neljän eri munasarjasyöpäsolulinjan villityyppien karakterisoinnilla. Työn solulinjoiksi valittiin kaksi kaupallista ja kaksi potilasperäistä primaarisolulinjaa. Kaupalliset HGSOC-solulinjat olivat OVCAR8 (ATCC) ja Kuramochi (JCRB Cell Bank), ja primaarisolulinjat olivat NACT-hoidon läpikäyneiden HGSOC-intervallipotilaiden (eli uusintaleikattujen tai -askitespunkteerattujen) askitesnesteestä eristetyt M022i (Chen ja muut 2015) ja M019i (Nguyen ja muut 2017).

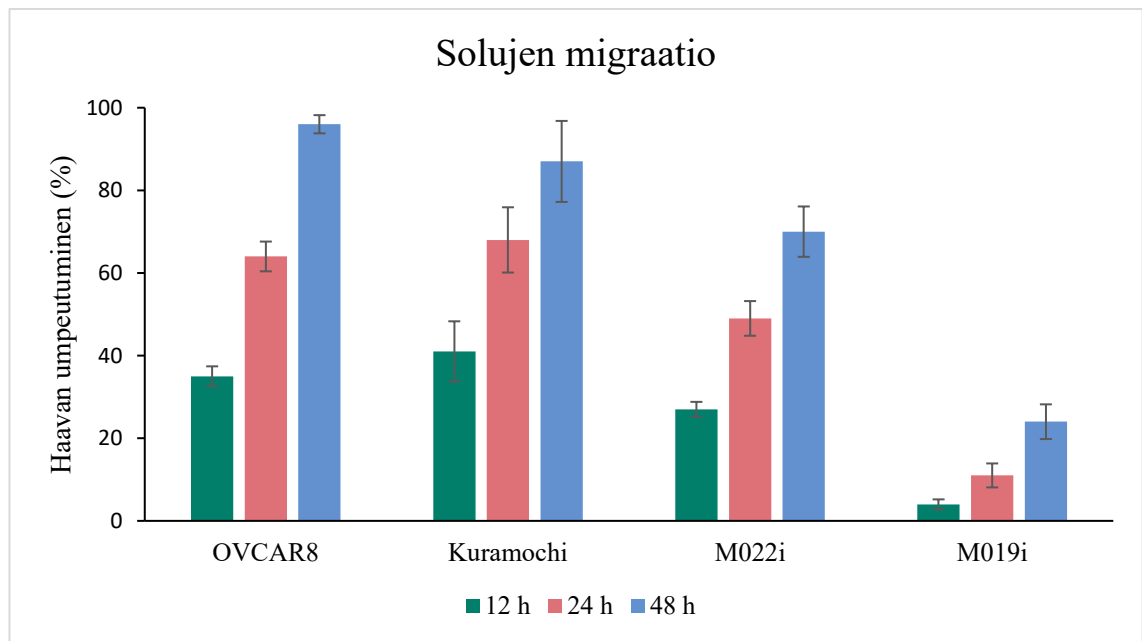
Linjojen karakterisoimiseksi soluja kasvatettiin adherentteina RPMI- ja sferoideina DMEM/F12 –kasvatusliuoksissa ja kuvattiin mikroskoopilla kymmenkertaisella suurennoksella. Kuvassa 7 näkyvät adherentteina kasvavat solut.



Kuva 7. Tutkimuksessa käytetyt RPMI-kasvatusliuoksessa adherentteina kasvavat villityyppi-solulinjat: OVCAR8, Kuramochi, M022i ja M019i. Kuvat otettu kymmenkertaisella suurennoksella Primover ZEISS –mikroskoopilla.

Neljästä solulinjasta OVCAR8 ja M022i -solulinjat näyttävät eniten samanlaisilta. Solut kasvavat todella adherentteina ja niin sanotusti ryhmäytyneinä. Sen sijaan Kuramochi-linjan solut näyttävät tähtimäisiltä ja kasvavat enemmän yksittäin. Samalla lailla irrallaan toisistaan kasvavat M019i-linjan solut, mutta ne ovat kaikista solulinjoista muodoltaan eniten pyöreitä.

Solujen ulkonäön lisäksi tutkittiin myös solujen liikkumista eli migraatiota, mikä tehtiin Wound healing -menetelmän avulla. Menetelmässä kuoppalevyn kaivojen pohjan solukerrokseen raapaistiin niin sanotut haavat, joiden umpeutumista seurattiin kuvaamalla soluja kahden tunnin välein. Neljän eri solulinjan migraatiokuvaajista (kuva 8) voidaan huomata OVCAR8:t olevan nopeimpia liikkumaan, kun taas selkeästi muita soluja hitaammin liikkuvat solut ovat M019i:t.

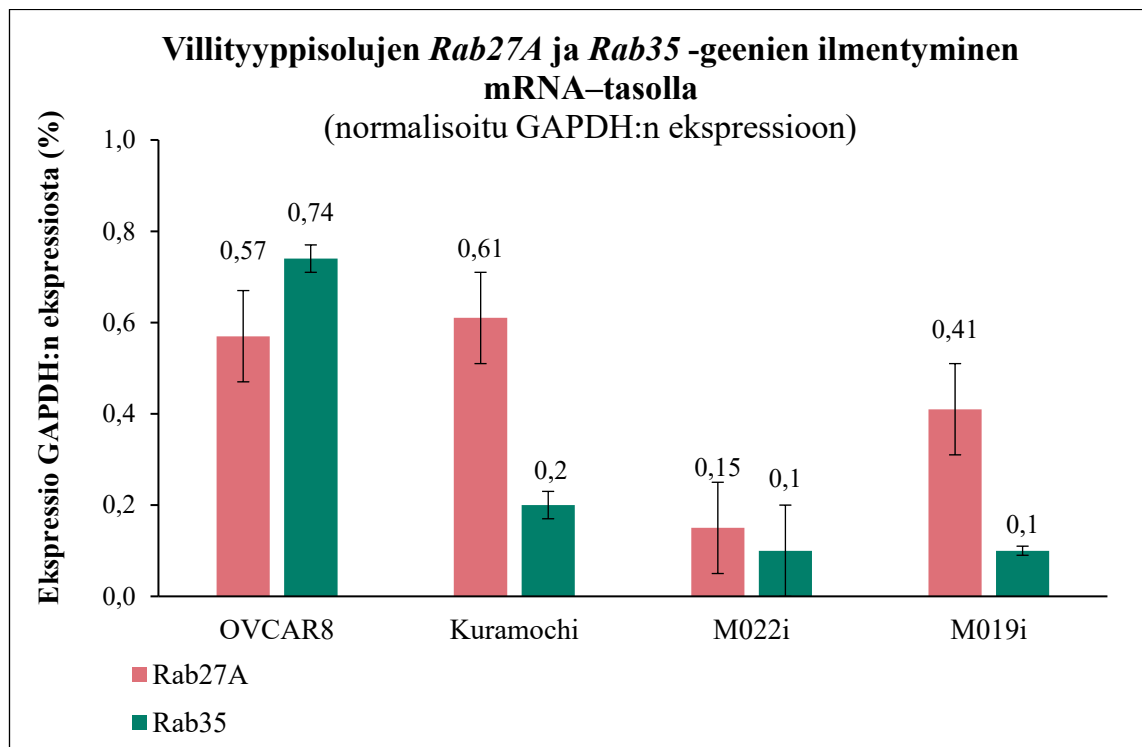


Kuva 8. Neljän eri villityyppi-solulinjan migraationopeudet. Migraatiota tutkittiin Wound healing -menetelmällä, missä seurattiin kaivojen pohjalle raapaistujen haavojen umpeutumista. Haavat tehtiin IncuCyte WoundMaker:lla (96 pin-woundmakingtool) ja kuoppalevy kuvattiin IncuCyte ZOOM-kuvantamislaitteella.

5.1.1 Villityyppisolujen *Rab27A* ja *Rab35* -geenien mRNA-tasojen määrittäminen

Ennen geenien hiljentämistä, villityyppisolujen *Rab27A* ja *Rab35* -geenien ilmentymistä tarkasteltiin lähetti-RNA-tasolla kvantitatiivisella käänteistranskriptio PCR Taqman-menetelmällä (qRT-PCR). Saadut ekspressiot normalisoitiin solujen GAPDH-ylläpitogeenin lähetti-RNA:n määrän mukaan ja saatiin kuvassa 9 esitetyt tulokset.

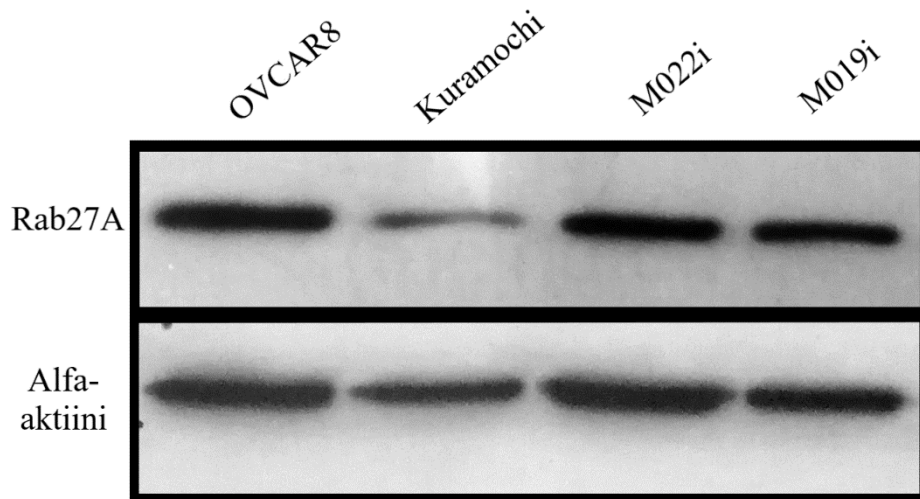
Tuloksista voidaan todeta geenien ilmentymisen olevan jonkin verran suurempaa kaupallisilla soluilla kuin potilasperäisissä linjoissa. Lisäksi kaikissa linjoissa solut tuottavat näiden kahden geenin transkriptio-tuotteita melko samoissa määrin. Poikkeuksena ovat Kuramochi-solut, joissa Rab27A:n lähetti-RNA:n määrä on lähes kolminkertainen Rab35:n lähetti-RNA:n määrästä.



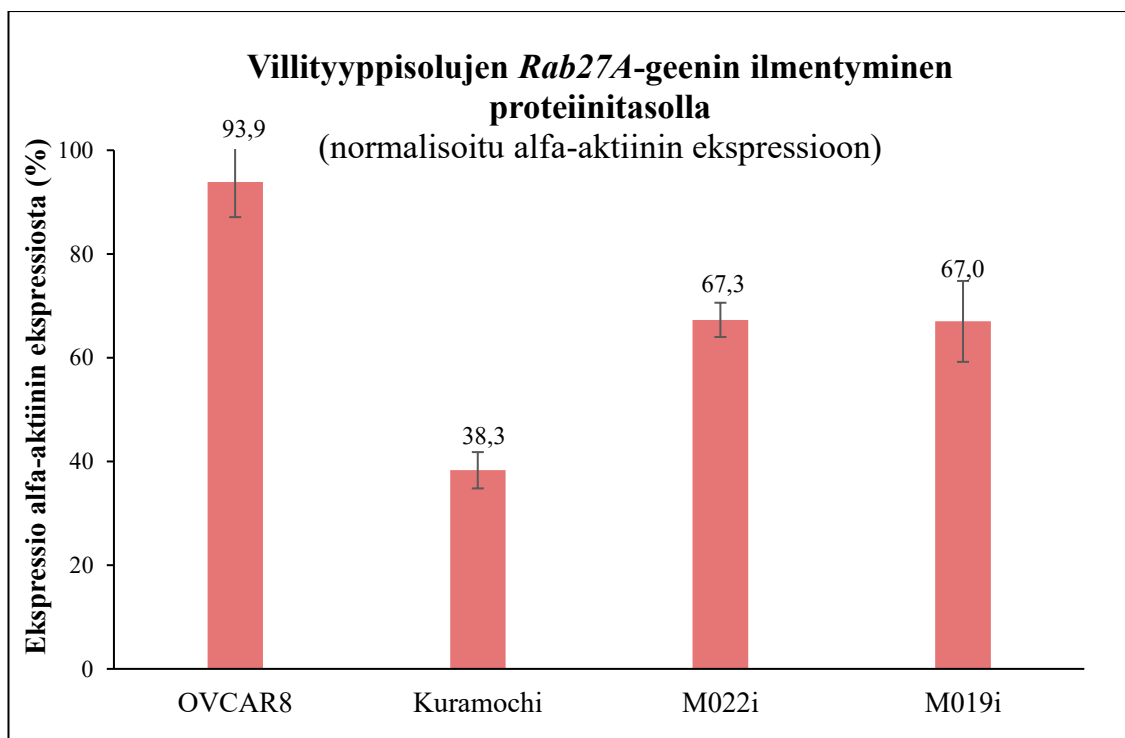
Kuva 9. HGSOc-villityyppisolujen *Rab27A* ja *Rab35* -geenien ilmentyminen mRNA-tasolla. Tulokset on saatu qRT-PCR Taqman-menetelmällä ja ne on normalisoitu kunkin näytteen GAPDH:n mRNA:n määrään.

5.1.2 *Rab27A* ja *Rab35* -geenien ilmentyminen proteiinitasolla

Soluista tehtiin lysaatteja, joista pystyttiin Western blot -menetelmän (WB) avulla detektoimaan villityyppisolujen *Rab27A* ja *Rab35* -ekspressioita kvantitatiivisesti. Kuvassa 10 on esitetty adherenttien solujen lysaateista tehty WB. *Rab27A*:n ekspressio kvantitoitiin kuvista ImageJ-ohjelmalla ja *Rab27A*:n ilmentyminen normalisoitiin alfa-aktiini-ylläpitogeenin ekspressioon. Tuloksista (kuva 11) voidaan nähdä kaikkien solulinjojen ilmentävän *Rab27A*:ta. Eniten proteiinia ekspressoivat OVCAR8-linja. *Rab35*-proteiinin hiljentymistä ei saatu todennettua WB:lla, sillä testattuja vasta-aineita ei saatu toimimaan. Tämän vuoksi jatkotutkimuksissa keskityttiin enemmän *Rab27A*-hiljennettyihin soluihin.



Kuva 10. Western blot neljän HGSOC-solulinjan Rab27A ja alfa-aktiini –geenien ilmentymisistä proteiinitasolla. Rab27A:n ilmentymistä tarkasteltiin myös kvantitatiivisesti analysoimalla raitojen intensiteetit ImageJ-ohjelmalla.



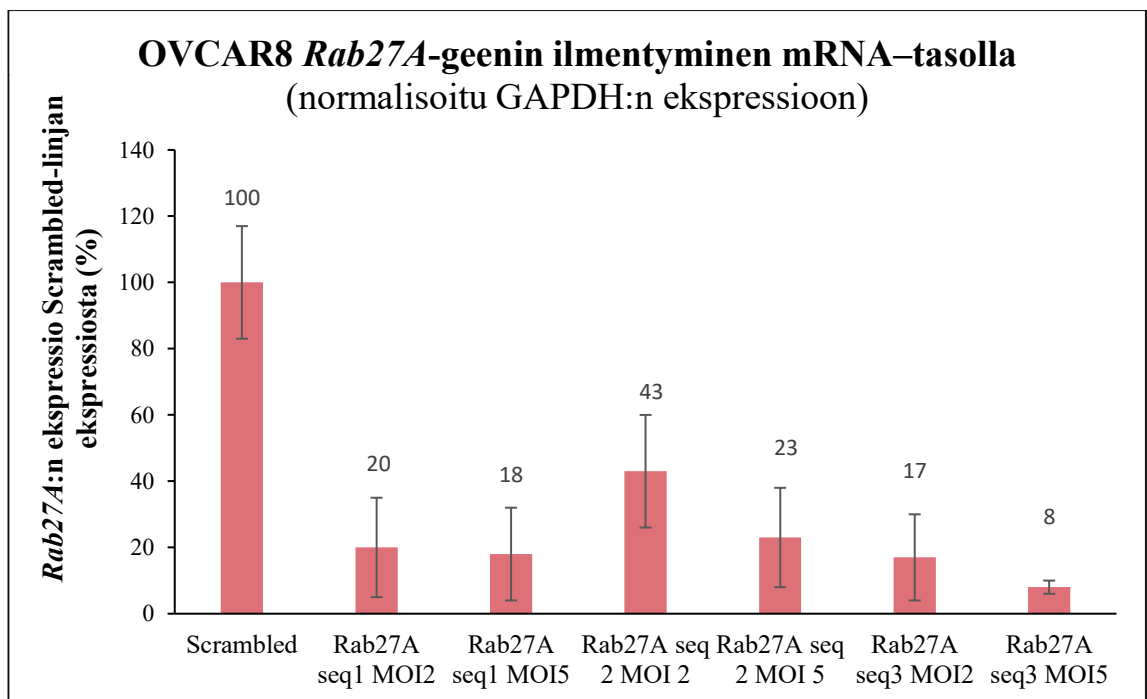
Kuva 11. Neljän eri munasarjasyöpäsolulinjan Rab27A-proteiinin ekspressiotasot. Ekspressiot saatiin kvantitatiivisella analyysillä ImageJ-ohjelman avulla lasketuista Western blot -raitojen intensiteeteistä. Rab27A-ekspressiot normalisoitu solulinjan alfa-aktiiniin.

5.2 *Rab27A* ja *Rab35* -geenien hiljentäminen shRNA:lla OVCAR8- ja M022i-soluissa

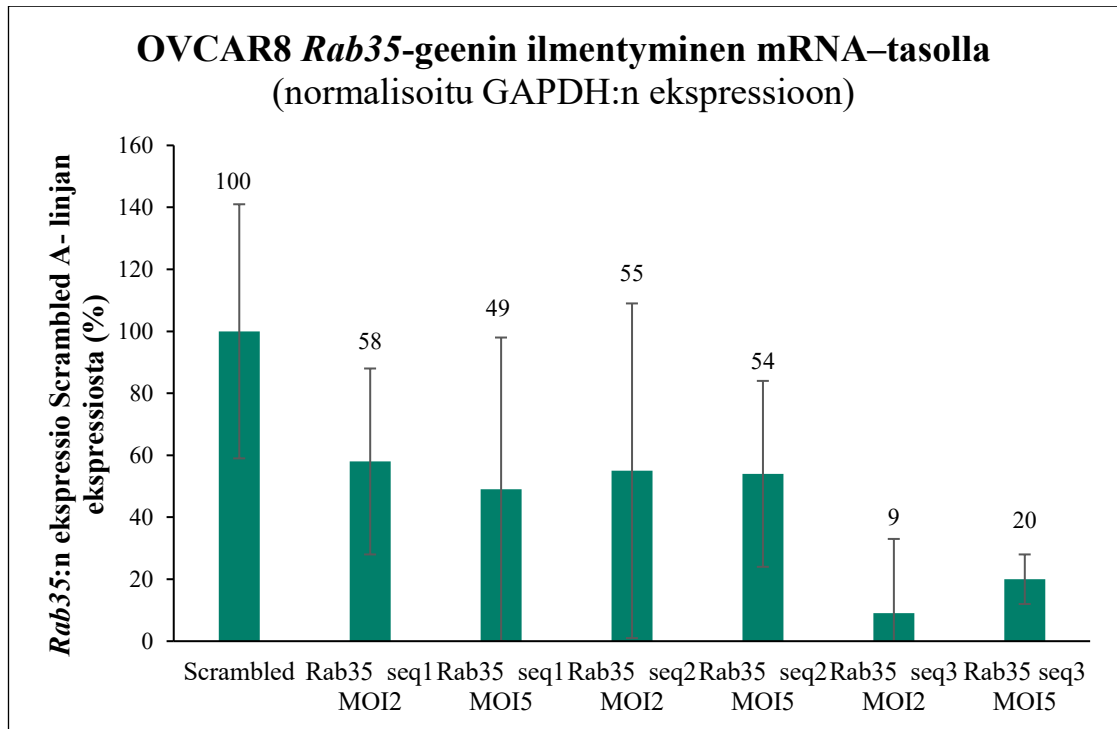
Karakterisointien perusteella shRNA-hiljennyksiin valittiin kaksi solulinjaa: kaupallinen OVCAR8 ja potilasperäinen M022i. Näistä solulinjoista hiljennettiin eksosomien biosynteesiin osallistuvien proteiinien, *Rab27A* ja *Rab35*, geenit. Hiljennyksen voimakkuus määritettiin qRT-PCR:llä kummankin geenin mRNA:n ilmentymistasoista. Hiljennettyjen solujen geenien ilmentymistasoja verrattiin scrambled-linjojen vastaaviin tasoihin.

5.2.1 OVCAR8-solut

Kuten villityyppisolujen karakterisoinnissa, *Rab27A* ja *Rab35* -geenien ilmentyminen mRNA-tasolla normalisoitiin solujen *GAPDH*-ylläpitogeenin ekspressiotasojen mukaan, minkä jälkeen villityyppi- ja transdukoitujen solujen tuloksia verrattiin scrambled-kontrolliin. OVCAR8-soluista määritettiin *Rab27A*:n lähetti-RNA:n ilmentymistaso villityyppi- ja transdukoituissa soluissa (kuva 12). Vastaavasti *Rab35*:n lähetti-RNA-tasot analysoitiin kontrolli-solulinjojen lisäksi *Rab35*-hiljennetyissä soluissa (kuva 13).



Kuva 12. *Rab27A*:n lähetti-RNA-määrät OVCAR8-soluissa. Tulokset saatu Taqman qRT-PCR-menetelmällä.

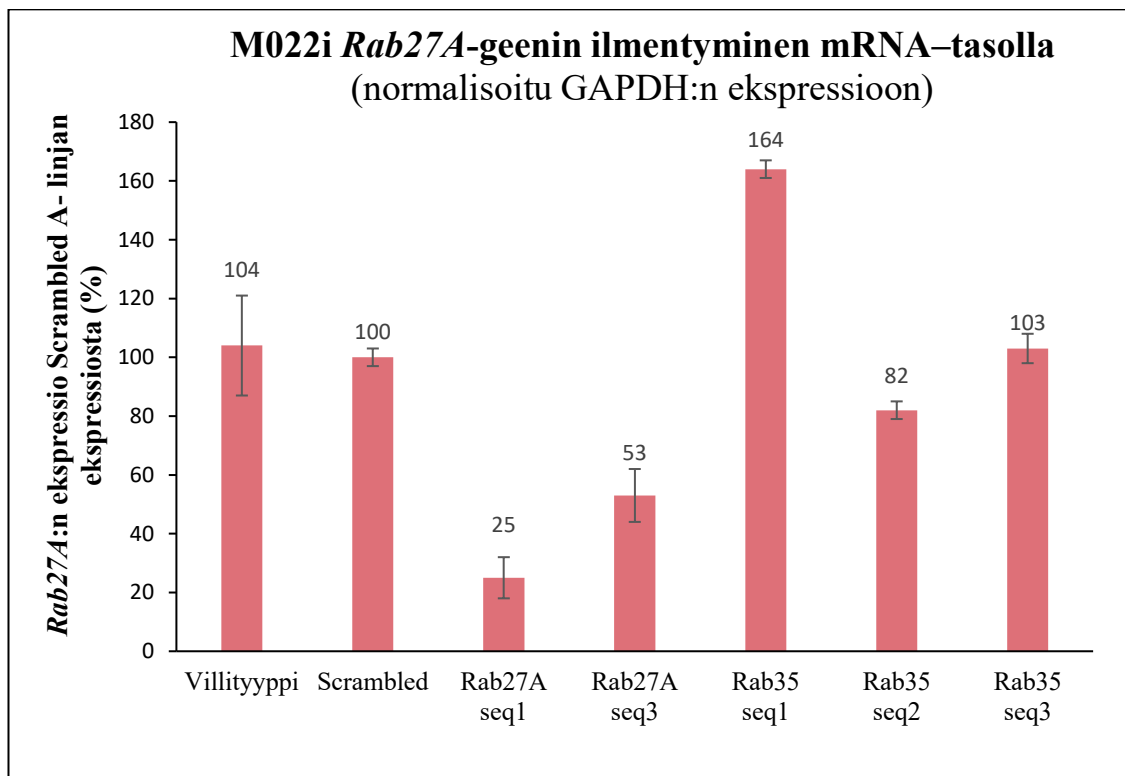


Kuva 13. *Rab35*:n lähetti-RNA-määrät OVCAR8-soluissa. Tulokset saatu Taqman qRT-PCR-menetelmällä.

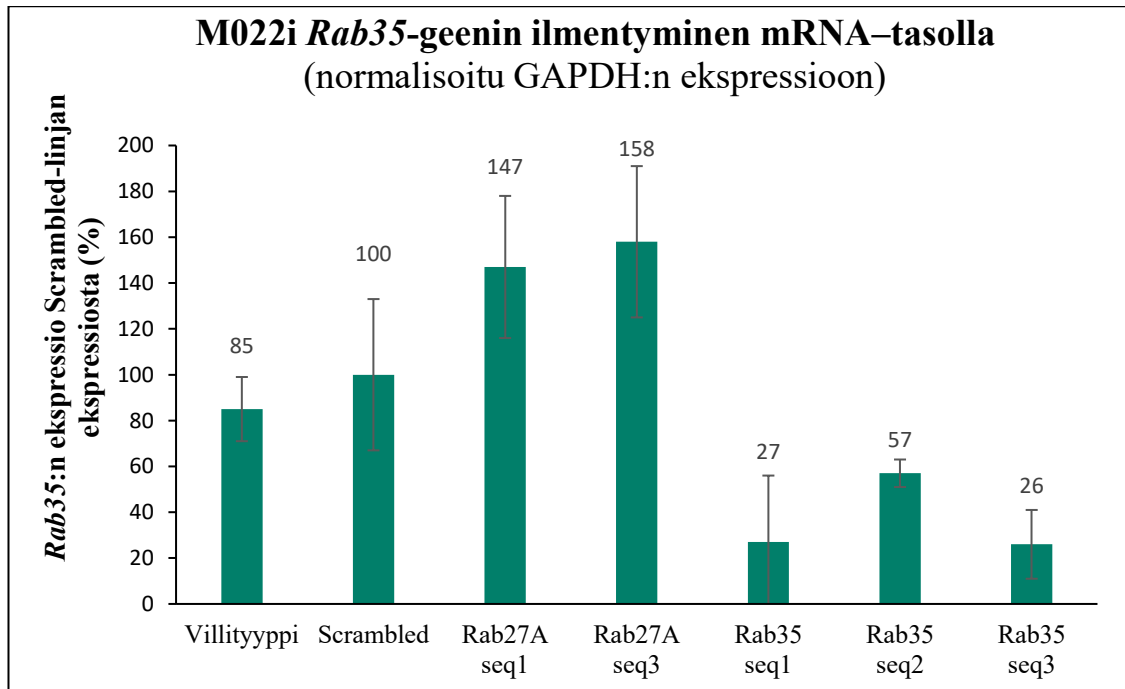
Tuloksista huomataan, että hiljennys onnistui paremmin suuremmilla viruspartikkelimäärillä eli MOI 5:ssä kuin MOI 2:ssa. Lisäksi *Rab27A*:n hiljennys toimii parhaiten, kun solut on transduktoitu sekvenssi kolmella. Sekvenssi kaksi ei sen sijaan hiljennä geeniä läheskään yhtä hyvin. Vastaavasti *Rab35*-geeni hiljentyy parhaiten sekvenssi kolmella, kun taas muiden sekvenssien kohdalla hiljennys ei ole toiminut yhtä tehokkaasti.

5.2.2 Potilasperäiset M022i-solut

OVCAR8-solujen Taqman-analyysien perusteella M022i-solut transduktoitiin vain yhdellä konsentraatiolla; MOI 5:llä. MOI-arvoja ei tästä syystä ilmoiteta kuvissa 14 ja 15. Lisäksi *Rab27A*-geenin hiljennys OVCAR8-soluilla huomattiin onnistuneen parhaiten sekvenssi yhdellä ja kolmella, minkä takia M022i-solut transduktoitiin vain niillä eikä lainkaan sekvenssi kahdella. Aikaisempien tulosten suurten hajontojen vuoksi transduktio *Rab35*:n hiljentämiseksi tehtiin edelleen kaikilla sekvensseillä. OVCAR8-solujen Taqman:sta poiketen, *Rab27A*:n transkriptiota tarkasteltiin sekä *Rab27A*- että *Rab35*-hiljennetyissä M022i-soluissa (kuva 14), ja *Rab35*:n transkriptiota samalla tavalla (kuva 15).



Kuva 14. *Rab27A*:n lähetti-RNA-määrät M022i-soluissa. Tulokset saatu Taqman qRT-PCR-menetelmällä.



Kuva 15. *Rab35*:n lähetti-RNA-määrät M022i-soluissa. Tulokset saatu Taqman qRT-PCR-menetelmällä.

Rab27A:n hiljentäminen onnistui hyvin myös M022i-soluilla. Toisin kuin OVCAR8-soluissa, hiljennys on tehokkainta sekvenssi yhdellä. *Rab35*:n ekspressioissa sen sijaan

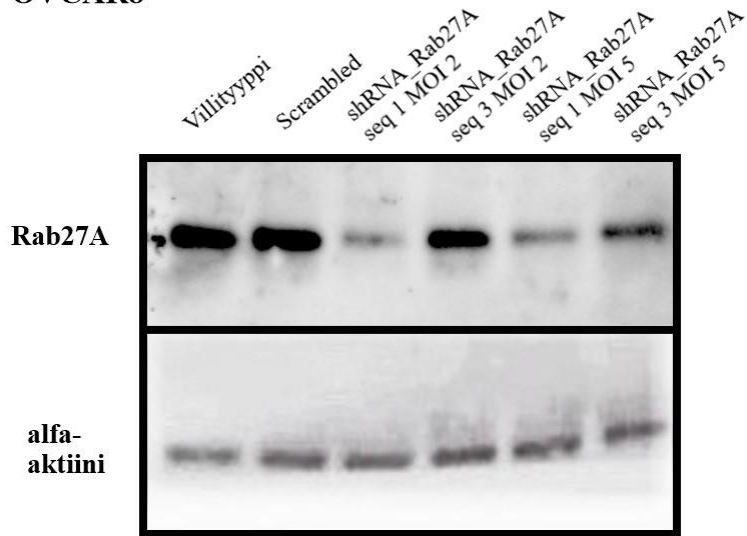
tulokset ovat yhtenevät OVCAR8-solujen tulosten kanssa ja paras hiljennys saadaan sekvenssi kolmella.

5.2.3 Hiljennysten toteaminen proteiinitasolla

Rab27A:n proteiinitason hiljennystä tutkittiin ja analysoitiin WB:llä kuten villityyppisolujen karakterisoinnissa. Transdukoitujen OVCAR8-solujen WB:t tehtiin yhteensä neljä kertaa, kun taas transduktoituille M022i-soluille menetelmä on tähän mennessä tehty kolme kertaa. Analyyseissa Rab27A:n proteiintuotto normalisoitiin ensin solujen alfa-aktiinin proteiinitasoihin. Tämän jälkeen saadut tulokset verrattiin vielä scrambled-solulinjojen ekspressioihin eli saatiin selville geenihiljennetyin solulinjan proteiintuoton prosentuaalinen osuus scrambled-linjan ekspressiosta. Lisäksi tällä tavalla kokeen toistokertojen tulokset ovat keskenään paremmin verrattavia. Molemmissa solulinjoissa huomattiin Rab27A:n ekspresion vähentyneen huomattavasti sekä sekvenssi yhdellä että kolmella. OVCAR8-soluilla erona Taqman-tuloksiin Rab27A:n sekvenssi yksi hiljentää geenin paremmin proteiinitasolla kuin sekvenssi kolme. Rab35-proteiinin tuottoa ei tässäkään voitu vielä tarkistaa.

OVCAR8 villityypin ja transdukoitujen solujen WB on esitetty kuvassa 16. Vaikka geenin hiljennys WB:ssä onkin melko selkeää, analyysien tuloksille haluttiin hypoteesin varmistamiseksi tehdä tilastollinen testi. Testiin valittiin neljän sijaan vain kolmen parhaiten onnistuneiden WB:iden tulokset. Poisjätetyn WB:n suuren taustasignaalin takia, raitojen intensiteettien kvantitatiivinen määrittäminen ei onnistunut luotettavasti. Kontrollina käytetyn scrambled-linjan lisäksi testiin otettiin vain yksi linja, missä Rab27A:n hiljennys onnistui parhaiten eli lentiviruspartikkelimäärällä MOI 5 sekvenssi yhdellä transduktoidut OVCAR8-solut. Pienen otoskoon takia testiksi valittiin epäparametrinen kahden riippumattoman otoksen Wilcoxonin järjestyssummatesti, minkä mukaan Rab27A-hiljennettyjen ja kontrollisolujen Rab27A-ekspressiot erosivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan (p -arvo $< 0,05$). Myös villityyppi- ja scrambled-solujen mahdollisia eroja haluttiin tarkastella. Kuten oletettua, scrambled- ja villityyppisolujen Rab27A:n ekspresioiden erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, kun testin p -arvoksi saatiin 0,827.

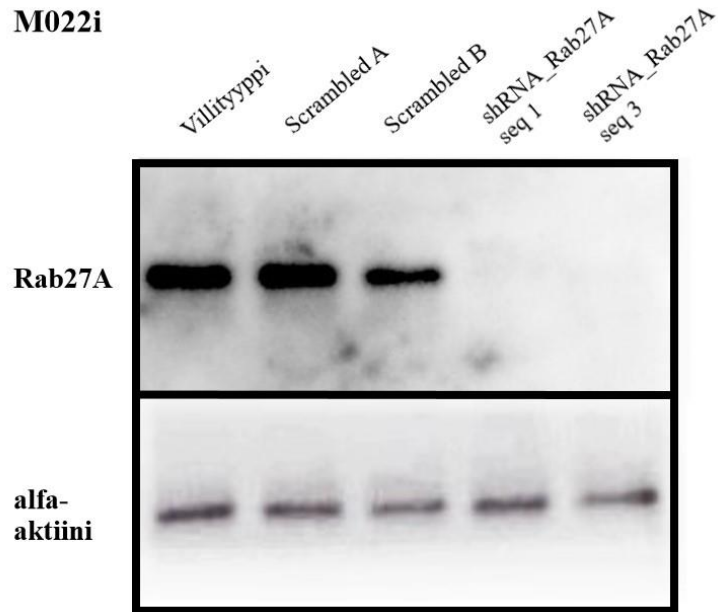
OVCAR8



Kuva 16. Western blot villityypin ja transdukoitujen OVCAR8-solujen Rab27A-proteiinintuoton detektoimiseksi. Kuvasta voidaan huomata sekvenssi yhden vähentävän Rab27A:n tuottoa parhaiten (p -arvo $< 0,05$).

Esimerkki M022i-solulinjoille tehdyistä WB:istä on esitetty kuvassa 17. Taqman-tulosten ja OVCAR8-solulinjojen WB:n tapaan analyysit osoittivat sekvenssi yhden geenihiljennyksen olevan parempi, mutta eroa kahden sekvenssin välillä ei M022i-soluilla ole niin paljon. Molemmat sekvenssit siis hiljensivät Rab27A-geenin hyvin.

Myös M022i-solujen ekspressioeroja haluttiin testata Wilcoxonin järjestyssummatestillä ja valitut linjat olivat samat kuin OVCAR8-soluilla. Testin p -arvoksi saatiin 0,05, eli hiljennys on tässäkin tilastollisesti merkitsevä. Lisäksi OVCAR8-solujen tapaan villityypin ja scrambled-linjojen Rab27A-proteiinin tuotoissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. P -arvoksi saatiin 0,513.



Kuva 17. Villityypin ja transduktoitujen M022i-solulinjojen Western blot, missä detektoitu Rab27A. Rab27A:n ekspressio normalisoitiin alfa-aktiini ekspressioon ja voitiin todeta shRNA-hiljennyksen onnistuneen hyvin molemmilla sekvensseillä. Hiljennys oli tehokkaampaa sekvenssi yhdellä (p -arvo = 0,05)

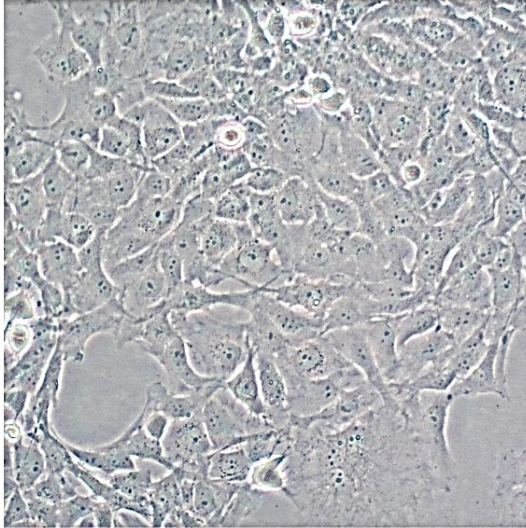
5.3 Geenihiljennysten vaikutukset solujen ulkonäköön ja liikkumiseen

Solujen ulkonäköä ja liikkumista tutkittiin mahdollisten geenihiljennyksistä johtuvien vaikutusten kannalta. Aikaisempien tutkimusten perusteella oletettiin, että geenihiljennyksen myötä solujen eksosomien erityis häiriintyisi. Mahdollisen eksosomierityksen häiriintymisen edelleen ajateltiin voivan vaikuttaa sekä solujen ulkonäköön että liikkumiseen.

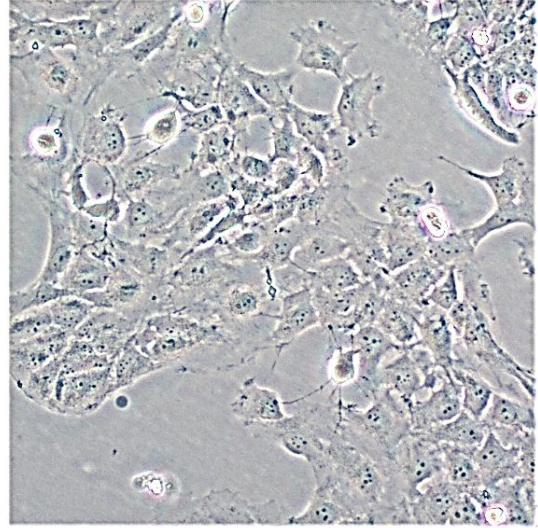
Solut kuvattiin Olympus CKX53-mikroskoopilla käyttäen 10x objektiivia. Kuvissa 18 ja 19 on esitettyä solulinjat, joissa geenihiljennykset aikaisempien tulosten perusteella onnistuivat parhaiten. Molemmassa, sekä OVCAR8- että M022i-soluissa, voitiin huomata Rab27A-hiljennettyjen solujen muodostavan kasaumia. Tämä solujen kerääntyminen on osoitettu kuvissa nuolilla. Rab35-hiljennetyissä soluissa ulkonäöllisiä muutoksia ei sen sijaan havaittu.

OVCAR8 10X

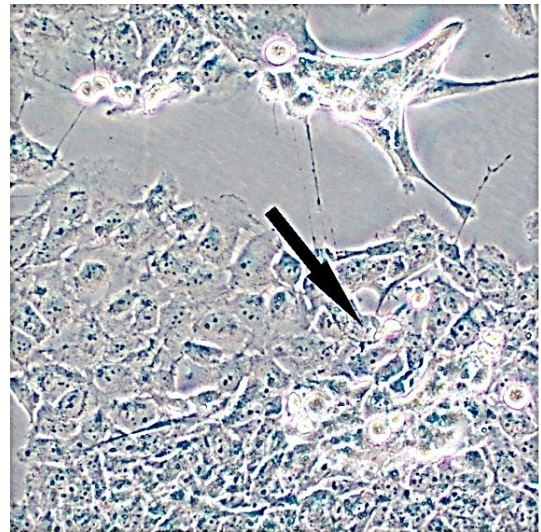
Villityyppi P68



Scrambled P25

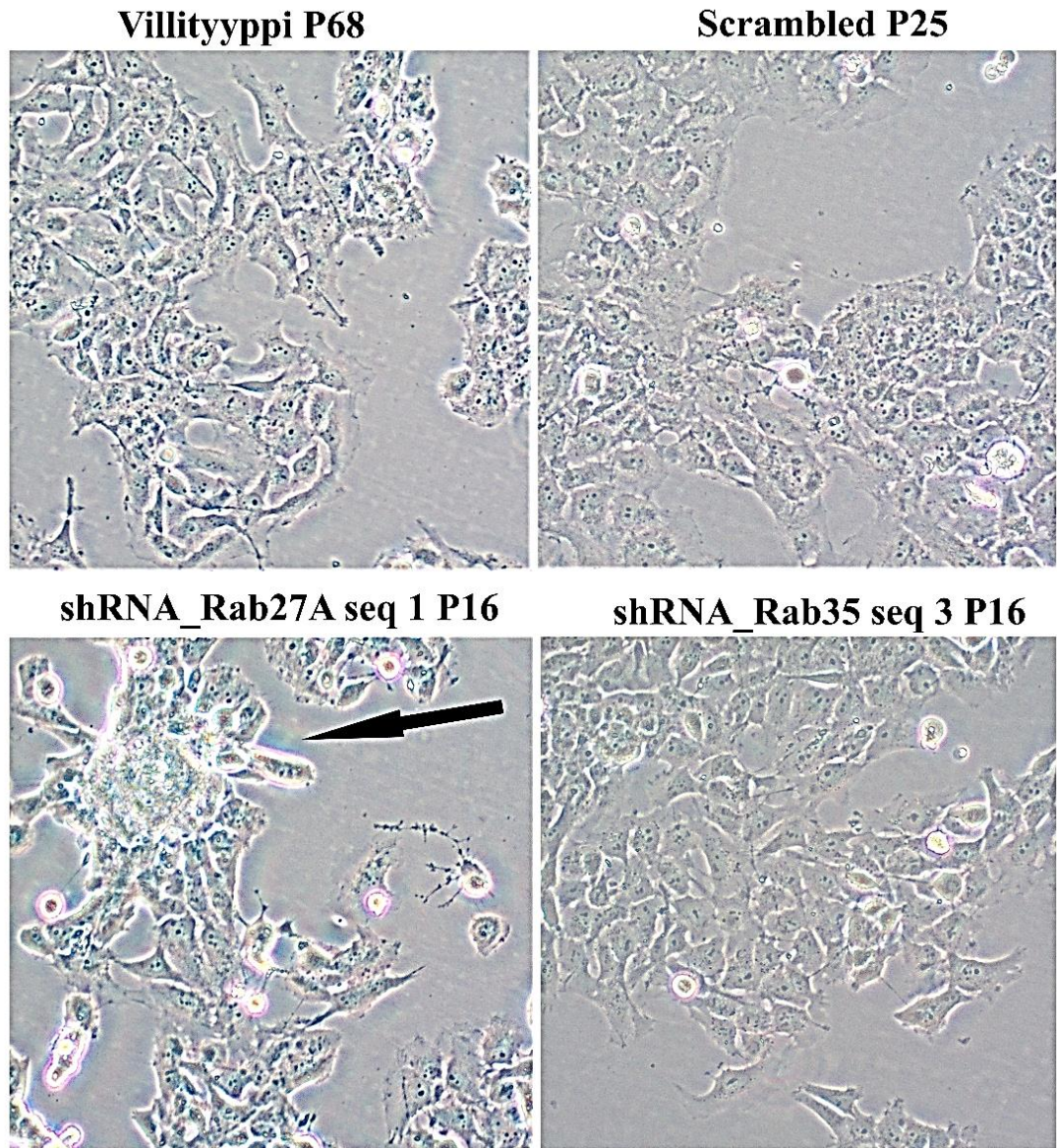


shRNA_Rab27A seq 1 MOI 5 P24



Kuva 18. Kymmenkertainen suurennos OVCAR8-soluista. Nuolella on näytetty Rab27A-hiljennettyjen solujen kerääntyminen, mitä kontrollisoluilla (villityyppi ja scrambled) ei havaita. Kuvat on otettu Olympus CKX53 -mikroskoopilla.

M022i 10X

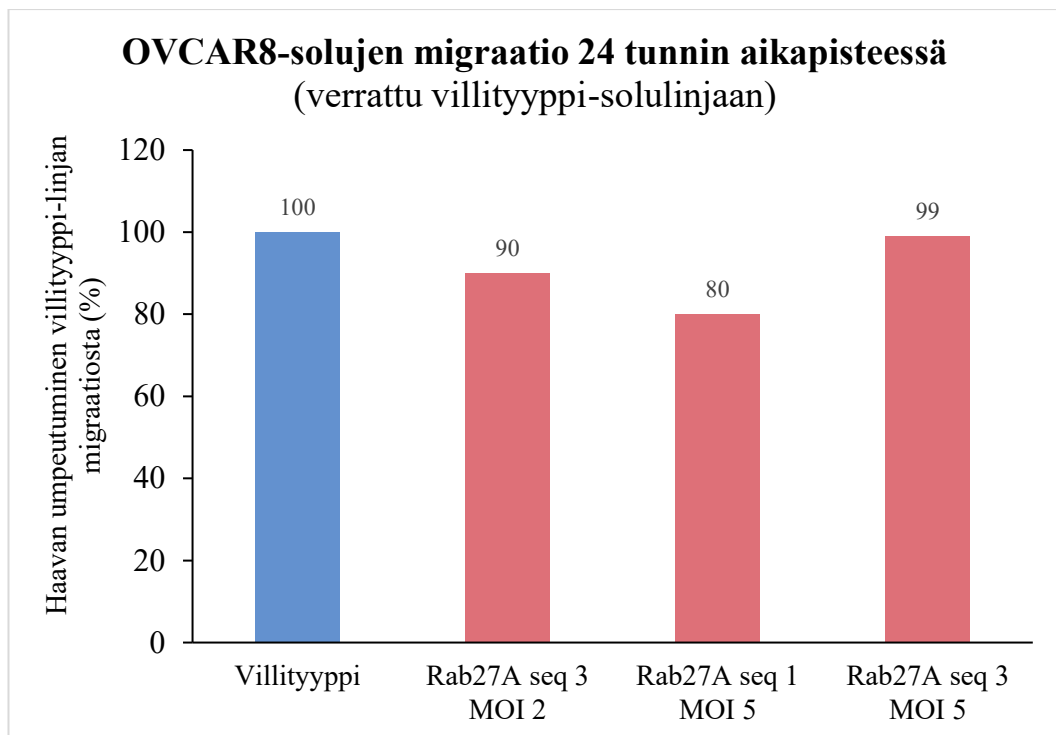


Kuva 19. Kymmenkertainen suurennos M022i-soluista. Nuolella on näytetty Rab27A-hiljennettyjen solujen kerääntyminen. Kuvat on otettu Olympus CKX53 -mikroskoopilla

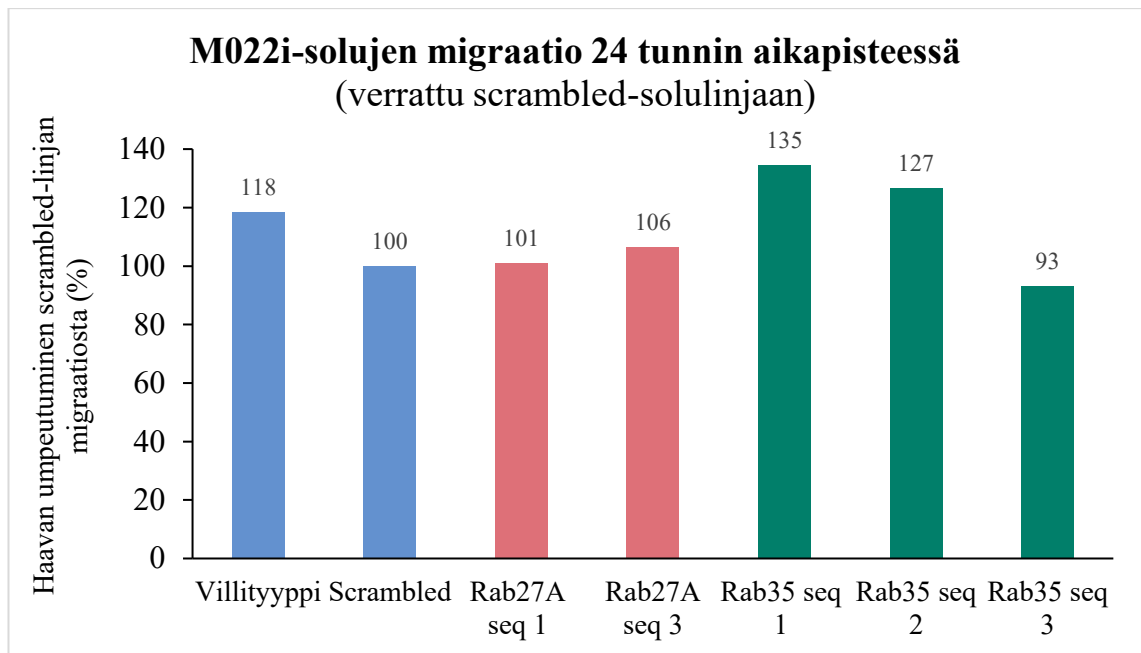
Transduktoitujen solujen liikkumista tutkittiin Wound healing -menetelmällä kuten villityyppi-solujen migraatiokokeissa. OVCAR8-solujen Taqman-tulosten suurten hajontojen vuoksi, Rab35-hiljennettyjä solulinjoja ei otettu kokeeseen mukaan.

Hypoteesina siis oli, että geenihiljennetyt solut erittäisivät vähemmän eksosomeja ympäristöönsä kuin kontrollisolut. Koska aikaisempien tutkimusten perusteella tiedetään,

että eksosomit edesauttavat syöpäsolujen etenemistä, migraatiokokeilla selvitettiin, liikkuvatko hiljennetyt solut kontrollisoluja hitaammin. Tulokset on esitetty kuvassa 20 (OVCAR8) ja kuvassa 21 (M022i). Kuoppien pohjan solukerrosten raapaisut eivät onnistuneet hyvin, minkä takia tulokset eivät myöskään ole kovin luotettavia. Kaikkien solulinjojen tuloksia ei tämän vuoksi ole myöskään esitetty kuvissa. Näytettyjen tulosten perusteella voidaan kuitenkin todeta, ettei solulinjojen migraatioissa ole merkittäviä eroja.



Kuva 20. Villityypin ja transdukoitujen OVCAR8-solujen migraatio Wound healing-menetelmässä. Haavan umpeutuminen kertoo solujen nopeutta pohjaan raapaistujen haavojen kiinni kuromisessa. Haavat tehtiin Incucyte WoundMaker:lla ja niiden umpeutumista tutkittiin Incucyte ZOOM –kuvantamislaitteella. Tutkimuksen hypotesina oli geenihiljennettyjen solujen hitaampi liikkuminen kontrollisoluihin verrattuna, mutta kokeessa ei ilmennyt merkittäviä eroja.



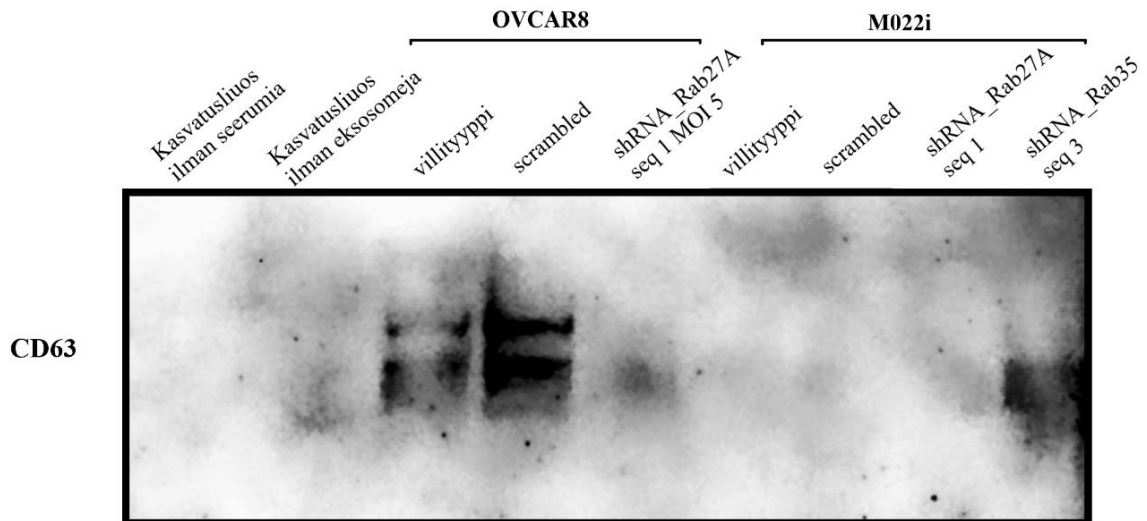
Kuva 21. Villityypin ja transdukoitujen M022i-solujen migraatio Wound healing-menetelmässä. Haavan umpeutuminen kertoo solujen nopeutta pohjaan raapaistujen haavojen kiinni kuromisessa. Haavat tehtiin Incucyte WoundMaker:lla ja niiden umpeutumista tutkittiin Incucyte ZOOM –kuvantamislaitteella. OVCAR8-solujen tapaan villityypin ja transdukoitujen solujen välillä ei näkynyt merkittäviä eroja.

5.4 Eksosomierityksen tutkiminen

Jatkotutkimuksiin valittiin kontrollilinjojen lisäksi solulinjat, joista *Rab27A*-geenin hiljentäminen onnistui parhaiten eli *Rab27A*:n sekvenssi yhdellä transdukoitunut OVCAR8 (MOI5) ja M022i-solut. Tarkasteluun otettiin myös yksi *Rab35*-hiljennetty solulinja, joksi valittiin M022i-solulinjoista Taqman-kokeen tulosten perusteella sekvenssi kolmella transdukoitunut solut. Nämä ovat samat solulinjat, jotka on esitetty kuvissa 18 ja 19.

Saaduista lysaateista tutkittiin eksosomimarkkeri CD63:n ilmentymistä, joka on verrattavissa kunkin näytteen sisältämien eksosomien määrään. Tulokset on esitetty kuvassa 22. OVCAR8-soluilla CD63-markkeria voidaan havaita olevan voimakkaasti kontrollisolulinjoista eristetyissä näytteissä, mutta ei *Rab27A*-hiljennetyistä soluista eristetyissä näytteissä. Tämä osoittaa, että *Rab27A*:n ekspresion häiritseminen vähentää eksosomien eritystä OVCAR8-soluilla.

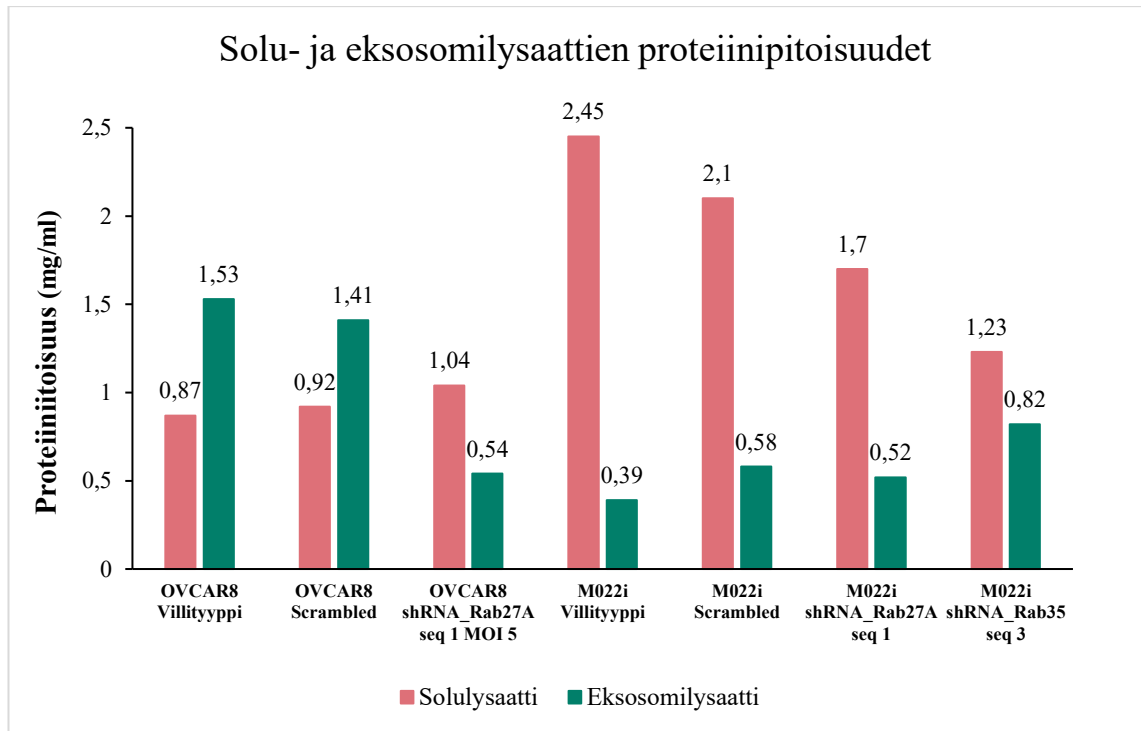
M022i-solulinjoissa CD63-markkeria ei sen sijaan paikannettu kontrollisoluista eikä Rab27A-hiljennetyistä soluista. Huomataan kuitenkin vastetta Rab35-hiljennetyissä soluissa.



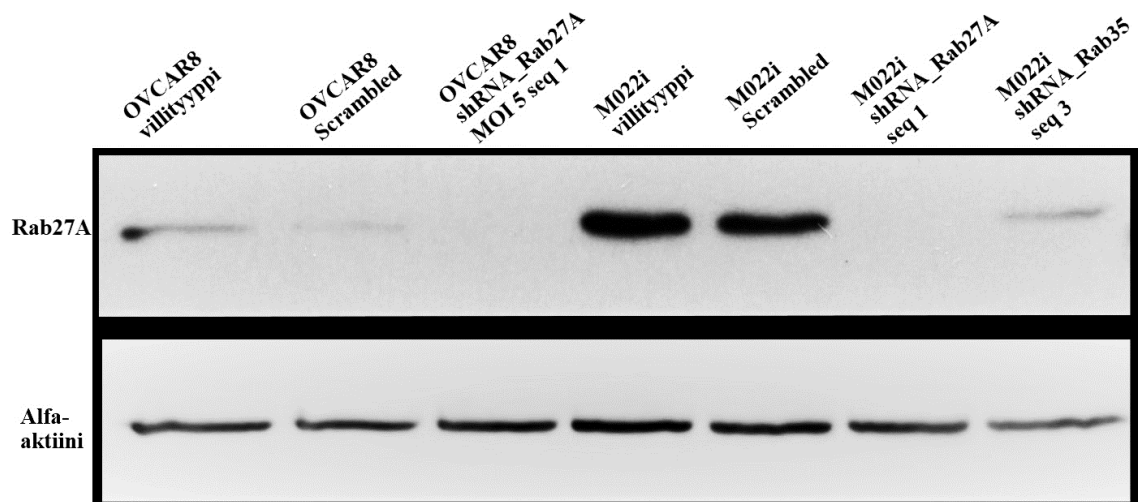
Kuva 22. CD63-eksosomimarkkerin määrä eri solulinjoilta kerätyistä RPMI-kasvatusliuoksista. Eksosomivapaan kasvatusliuoksen antama vaste on tarpeeksi pientä, jotta voidaan sanoa OVCAR8-kontrollisolujen antaman vasteen olevan merkittävä ja edelleen Rab27A-hiljennetyillä OVCAR8-soluilla pienempää. Rab35-hiljennetyt solut poissulkien, M022i-solujen kohdalla CD63-vastetta ei oikein voida tulkita edes kvalitatiivisesti suuren taustan takia.

Eksosomilysaateista saatu CD63-signaali (eritettyjen eksosomien määrä) suhteutettiin alkuperäiseen solumäärään lyysaamalla kuoppalevyllä olevat solut kasvatusliuosten keräämisen jälkeen ja tekemällä saaduista lysaateista proteiinimääritykset. Solulysaattien sekä kasvatusmedieista tehtyjen eksosomilysaattien proteiinipitoisuudet on esitetty kuvassa 23. Voimakkaan taustasignaalin vuoksi CD63-markkerin määristä ei tehty tarkempaa kvantitatiivista analyysia.

Solulysaateista tutkittiin samalla Rab27A:n ilmentymistä (kuva 24), jotta voitiin varmistaa, ettei linjojen välillä ole tapahtunut mahdollista ristikontaminaatiota. Tulokset varmistivat hiljennyksen säilyneen soluissa.



Kuva 23. Solu- ja eksosomilysaattien proteiinipitoisuudet. Tulosten avulla voidaan suunnilleen arvioida eksosomeja eittävien solujen määriä toisiinsa nähden sekä vastaavasti niiden kykyä tuottaa eksosomeja kasvatusliuokseen.

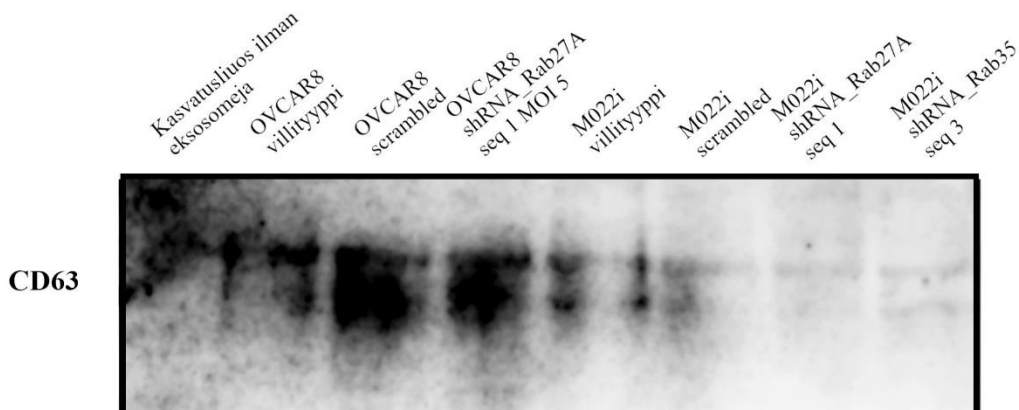


Kuva 24. Rab27A:n ilmentyminen soluilla, joilla tutkittiin eksosomien eritystä. Western blot:lta voidaan huomata geenihiljennyksen toimivan hyvin. Alfa-aktiini-ylläpitogeenin ilmentymisellä voidaan normalisoida detektoitavan proteiinin ekspresio.

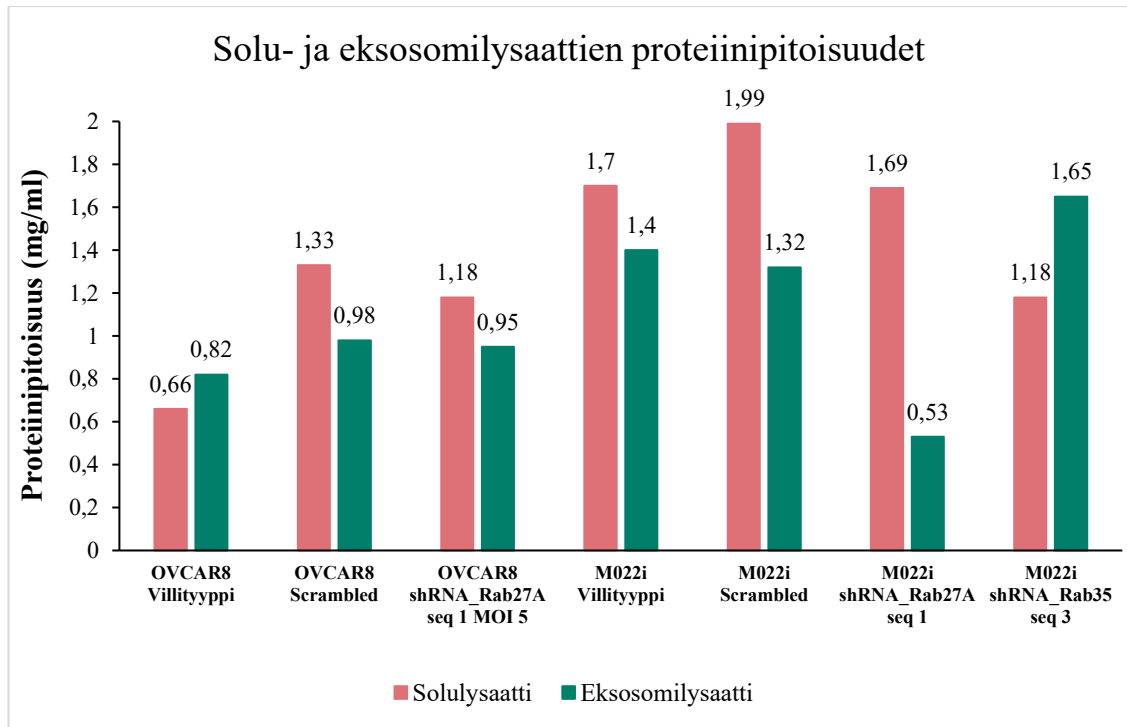
Koe toistettiin samalla tavalla muuten, mutta tällä kertaa eksosomit eristettiin suuremmasta kasvatusliuoksen tilavuudesta, jotta CD63-proteiinin detekointi saatiin vahvemmaksi (kuva 25). Myös solu- ja eksosomilysaattien proteiinipitoisuudet (kuva 26)

sekä solujen *Rab27A*:n ilmentymiset (kuva 27) määriteltiin samalla lailla kuin aiemmin. Mielenkiintoista on huomata, ettei CD63-markkerin määrä ole tällä kertaa laskenut *Rab27A*-hiljennetyissä OVCAR8-soluissa viitaten samantasoiseen eksosomituottoon kuin kontrollisoluissa, eikä *Rab27A*:n hiljennys vaikuta olevan enää tehokas soluissa. WB:n analysoinnissa *Rab27A*-hiljennettyjen OVCAR8-solujen *Rab27A*-proteiinin määräksi saatiin noin 36 % kontrollisolujen proteiinimäärästä, eli huomattavaan hiljennystehokkuuden laskuun verrattuna aiempaan

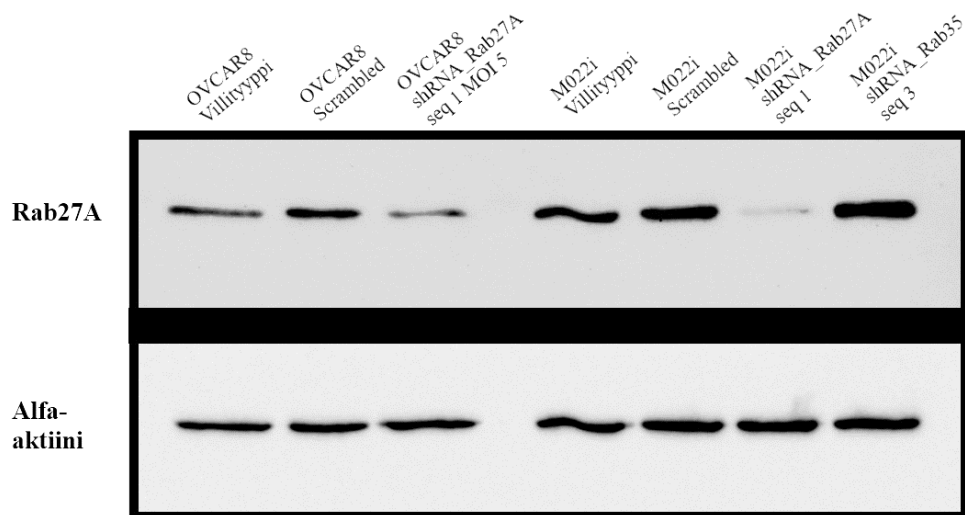
M022i-solujen kohdalla tämä koe onnistui paremmin kuin aikaisempi, missä M022i-solujen kohdalla ei pystytty detektoimaan mitään. Kuvasta 25 huomataan kontrollisoluissa hieman suurempi CD63:n pitoisuus kuin *Rab27A*-hiljennetyissä soluissa. Tosin tällä kertaa *Rab35*-hiljennetyissä soluissa ei ole nähtävissä markkerin pitoisuuden nousua niin kuin aiemmassa kokeessa.



Kuva 25. CD63-eksosomimarkkerin määrä solulinjojen kasvatusliuoksista eristetyissä eksosomilysaateissa. OVCAR8-solujen *Rab27A*:n hiljennyksen ei todettu olevan enää kovin tehokas, mikä luultavasti selittää, ettei CD63-markkerin määrässäkään ole todettavissa erilaisuuksia. M022i-soluilla hiljennys todettiin vielä tehokkaaksi ja kuvasta voidaan huomata eksosomimarkkeria olevan näillä soluilla vähemmän verrattuna kontrollisoluihin.



Kuva 26. Solu- ja eksosomilysaattien proteiinipitoisuudet. Pitoisuuksia voidaan vertailla ja tarkastella eksosomeja tuottavien solujen määriä keskenään. Lisäksi voidaan hieman päätellä, kuinka paljon eksosomeja ne tuottaisivat ympäristöönsä.



Kuva 27. Rab27A:n ilmentyminen proteiinitasolla. Raitojen intensiteeteistä nähdään, ettei Rab27A:n hiljennys ole kovin tehokas OVCAR8-soluissa. Sen sijaan Rab35-hiljennetyissä soluissa Rab27A-proteiinia tuotetaan hieman enemmän.

6 Tulosten tarkastelu

6.1 Villityyppi-solujen karakterisointi

Karakterisointi aloitettiin kuvaamalla adherentteina kasvavia soluja. Ulkonäöllisesti OVCAR8 ja M022i -solujen voidaan huomata hieman muistuttavan toisiaan, kun taas Kuramochi ja M019i -solut eroavat täysin. Lisäksi soluviljelyssä huomattiin Kuramochi ja M019i -solujen kasvavan hieman enemmän yksittäin eikä niin ryhmittyneenä kuin muut solut. Solujen liikkumista tutkivassa migraatiokokeessa kaupallisten solujen huomattiin kurovan kaivon pohjan naarmua primaarisolulinjoja nopeammin umpeen. Kaikkein nopeimmaksi todettiin OVCAR8-solut, vaikka eroa ei juurikaan voi todeta olevan paljon. Kuitenkin kaikista muista solulinjoista poikkesivat M019i-solut, jotka olivat selkeästi hitaimpia.

Koska koko tutkimus keskittyi kahden proteiinin rooleihin eksosomien tuotossa, näiden proteiinien ilmentymisten määriä tarkasteltiin villityyppi-solulinjojen välillä. Tuloksista voidaan huomata geenien lähetti-RNA-määrien olevan pienemmät primaarisolulinjoissa kuin kaupallisissa. Eroa kaupallisten ja potilasperäisten linjojen välillä on siis tässäkin. Proteiinitason analyyseissa tulokset hieman poikkeavat Taqman-menetelmän tuloksista. Selkeä poikkeus on varsinkin Kuramocheilla, joiden Taqman-tulosten mukaan *Rab27A*:n ekspressio olisi jopa hieman suurempaa kuin OVCAR8-soluilla ja *Rab35*:n ekspressio sen sijaan todella pientä. WB-menetelmällä saatujen proteiinitasojen mukaan Kuramochi-solujen *Rab27A*:n ekspressio on sen sijaan alle puolet OVCAR8-solujen ekspressiosta. Kokeet pitäisi luultavasti toistaa tulosten toteamiseksi luotettaviksi.

Voivatko eriävät tulokset lähetti-RNA- ja proteiinitasojen välillä selittyä normalisoinneista eri ylläpitogeeneihin? Taqmanissa ekspressiotasot normalisoitiin GAPDH-geenin ekspression mukaan kun taas WB-analyysissä normalisointi tehtiin alfa-aktiiniin. Toisaalta tämän ei pitäisi vaikuttaa, sillä ylläpitogeeneiden ekspressiot ovat nimensä mukaisesti solulle välttämättömiä ja tasot ovat samaa luokkaa solulinjasta riippumatta. Sekin täytyy ottaa huomioon, että siinä missä Taqman on erittäin herkkä kvantitatiivinen määrittäminen menetelmä, WB on vain semikvantitatiivinen.

6.2 Geenien hiljentäminen

6.2.1 Geenihiljennysten toteaminen

Geenien hiljennysten todettiin onnistuneen hyvin sekä lähetti-RNA- että proteiinitasolla. Tulokset molempien menetelmien välillä olivat melko samanlaiset pienenä poikkeuksena OVCAR8-solujen Rab27A-ekspressio, missä Taqman-tulokset näyttivät sekvenssi kolmen hiljentävän parhaiten, kun taas WB:ssä parhaimman hiljennyksen näytti sekvenssi yksi. Lopulta kaikki kokeet huomioon ottaen voidaan kuitenkin todeta, että *Rab27A*-geenin hiljensi parhaiten sekvenssi yksi. Myös solulinjojen välillä tämä oli yhtenevää, mistä voidaan päätellä juuri sekvenssin koodin vaikuttavan hiljennyksen voimakkuuteen.

Rab35-proteiinia ei voitu detektoida WB:ssä, joten geenin ekspressiota voi toistaiseksi tutkia vain lähetti-RNA-tasolla. Kuten aiemmin mainittiin, tämän geenin kohdalla taas sekvenssi kolme on hiljennystehokkuudeltaan paras. Tämäkin tulos oli yhtenevä kahden solulinjan välillä, vaikka OVCAR8-soluilla luultavasti pipetointitarkkuudesta johtuvat Rab35-taqman tulosten suuret hajonnat haittaavat tulosten analysointeja.

OVCAR8-solujen transduktiossa käytettyjen eri MOI-arvojen ei oletettu vaikuttavan hiljentymisen voimakkuuteen, mutta kuten Taqman ja Western blot-tuloksista huomattiin, hiljennys oli selkeästi voimakkaampaa korkeammassa MOI-arvossa. Tämän voisi selittää sillä, että suuremmissa lentiviruspartikkelikonsentraatioissa on todennäköisempää, että sama solu voitaisiin transduktoida useamman kerran. Tämä tarkoittaisi, että solun genomissa sekvenssi voi olla kaksi tai useammankin kerran, jolloin tietenkin myös shRNA-tuotetta transkriptoituu enemmän.

Villityypin ja transduktoitujen M022i-solujen Taqman-kokeessa käytettiin molempia scrambled-linjoja, jotka ovat siis toistensa replikaatit. Voidaan huomata, että scrambled A muistuttaa ekspressiotasoiltaan villityyppi-solulinjaa enemmän kuin scrambled B. Lisäksi Taqman-koe tehtiin molemmista geneista molemmille hiljennetyille solulinjoille. Tuloksista voidaan todeta mielenkiintoinen *Rab27A*:n ekspression nousu joillakin Rab35-hiljennetyissä soluissa ja toisin päin. Otetaan tarkkailuun esimerkiksi Rab35:n sekvenssi yhdellä transduktoituidut solut, joilla *Rab27A*:n ekspressio nousi

melkein kaksinkertaiseksi kontrollisolujen ekspressiosta (kuva 14). Sen sijaan Rab35 sekvenssi kolmella transdukoituilla soluilla *Rab27A*:n ekspressio on pysynyt hyvin samana kontrolleihin verrattaessa. Vastaavasti Rab27A sekvenssi yhdellä hiljennetyissä soluissa voidaan nähdä *Rab35*:n ekspression nousua jonkin verran, mutta ei kuitenkaan niin paljon kuin sekvenssi kolmen kohdalla (kuva 15). Voisivatko tulokset viitata solujen pyrkimisestä kompensoimaan yhden proteiinin toiminnan menetystä tuottamalla toista enemmän? Jos näin olisi, voisi myös ajatella näiden geenien ekspressioiden välillä olevan korrelaatiota, jolloin toisen ekspressio nousee sitä mukaan kun toinen laskee. Tätä ei kuitenkaan voida havaita tuloksista, sillä esimerkiksi *Rab35*-geeniä hiljentää parhaiten sekvenssi kolme, mutta sekvenssi yhdellä transdukoitunut solut ekspressoivat huomattavasti voimakkaimmin *Rab27A*:ta.

Näistä havainnoista johtuen jatkotutkimuksiin valittiin ne solulinjat, joissa hiljennys on toiminut parhaiten ilman, että toisen proteiinin ekspressio poikkeaa paljon kontrollisolujen ekspressiosta. Toisaalta voisi olla mielenkiintoista tutkia karakteristisia muutoksia myös niissä soluissa, joissa toista geeniä yliekspressoidaan. Tämä on hyvä pitää mielessä mahdollisia jatkotutkimuksia ajatellen.

6.2.2 Geenihiljennettyjen solujen karakteristiset muutokset

Ensimmäisenä havaintona RNA-interferenssistä seuraavista muutoksista oli Rab27A-hiljennettyjen solulinjojen kasvaminen ikään kuin kasaumissa (kuvat 18 ja 19). Solujen tarkastelulla mikroskoopilla silmämääräisesti voitiin nähdä solujen kerääntymistä yhteen. Syytä tähän ei vielä ole tutkittu tarkemmin, mutta mahdollisten eksosomien eritysten vähentymiset on hyvä pitää mielessä.

Työn hypoteesina oli aikaisemman kirjallisuuden perusteella geenihiljennettyjen solujen eksosomien tuoton häiriintyminen. Ja koska tiedetään, että eksosomit edesauttavat syöpäsolujen etenemistä, ajateltiin, että kontrollisolut saattaisivat liikkua geenihiljennettyjä soluja nopeammin. Tätä teoriaa ei kuitenkaan voi migraatiokokeiden tuloksista vahvistaa (kuvat 20 ja 21). Päinvastoin kolmessa OVCAR8-soluille tehdyissä migraatiokokeissa scrambled vaikutti olevan solulinjoista hitain. M022i-soluilla sen sijaan vastaavaa ei havaittu.

Pienten pitoisuuksien takia solumääriä ei laskettu, kun ne laitettiin kuoppalevyille kasvuun migraatiokoetta varten, vaan määrät olivat arviointeja. Koska määrä, minkä verran soluja laitetaan yhteen kuoppaan kasvuun vaikuttaa solutiheyteen eli konfluenssiin kokeen alussa, voitaisiin ajatella sen vaikuttavan edelleen myös solujen liikkumiseen. Jos solut ovat esimerkiksi hyvin tiheässä siinä vaiheessa, kun haavat tehdään, saattavat solut pikemminkin työntyä kaivon reunalta keskustaa kohti kuin varsinaisesti liikkua. Tämä on hyvä pitää mielessä tulosten tarkastelussa. Kokeen voisi myös toistaa niin, että solut laitettaisiin kasvuun harvemmin ja lasketaan samat määrät linjojen välillä, jolloin tulokset olisivat enemmän verrattavissa keskenään.

6.3 Eksosomien tuoton vähentyminen

Eksosomien tuoton vähentymisen tarkasteluun valittiin siis vain tietyt solulinjat aikaisempien kokeiden perusteella. Tulos-osiossa näytettiin kaksi tähän mennessä tehtyjen CD63-markkerin WB:t (kuvat 22 ja 25). Lisäksi molempien kokeiden kohdalla mitattiin proteiinipitoisuudet sekä hajotetuista soluista, että niiden tuottamista eksosomeista, jotta tuloksia voitaisiin kvalitatiivisesti normalisoida ja näin vertailla keskenään. Toisin kuin solulysaattien WB:issa, missä proteiinitasot voidaan normalisoida alfa-aktiini-yläpitogeenin mukaan, eksosomilysaateista tehdyissä WB:issä

normalisointia ei voida tehdä näin, koska membraanissa olevat proteiinit ovat lähtöisin solumediumista, jossa ei ole mukana soluja.

Membraanien suurten taustasignaalien takia raitojen intensiteettien ImageJ -analyysia ei voitu tehdä. Silmämääräisesti kuitenkin huomataan OVCAR8-soluilla ensimmäisessä kokeessa (kuva 22) ja M022i-soluilla toisessa kokeessa (kuva 25), että Rab27A-hiljennetyillä soluilla CD63-markkeria ei detektoida niin vahvasti kuin kontrollisoluilla.

Ensimmäisessä kokeessa CD63:a havaitaan olevan paljon enemmän OVCAR8-kontrollisolujen kohdalla kuin eksosomivapaassa RPMI-kasvatusliuoksessa ja Rab27A-hiljennetyissä soluissa. Rab27A-hiljennettyjen OVCAR8-solujen vaste näyttää aika lailla yhtä vahvalta kuin eksosomivapaan RPMI:n. Tästä voidaan päätellä eksosomien erityksen häiriintyneen voimakkaasti, kun *Rab27A*-geeni on hiljennetty. Tuloksen tukemiseksi voidaan myös ottaa huomioon kuvassa 23 esitetyt lyaattien proteiinipitoisuudet. Huomataan, että Rab27A-hiljennetyistä soluista tehdyn solulysaatin proteiinipitoisuus on hieman suurempi kuin OVCAR8-kontrollisoluilla, mutta eksosomilysaatin proteiinipitoisuus on sen sijaan huomattavasti alhaisempaa.

Toiseksi tehdyssä WB:ssä (kuva 25) OVCAR8-soluilla ei enää nähdä suurta muutosta CD63-markkerin määrässä linjojen välillä. Lisäksi, kun katsotaan solu- ja eksosomilysaattien proteiinipitoisuuksia (kuva 26) huomataan, että eksosomeja erittäviä soluja on vaikuttanut olevan suunnilleen saman verran samoin kuin niiden erittämiä eksosomeja. Mielenkiintoista on myös nähdä, että *Rab27A*:n hiljennys ei vaikuta olevan enää kovin tehokas soluissa kuin tutkimuksen alussa (kuva 27). Koetta ennen tehtiin myös huomio Rab27A-hiljennettyjen OVCAR8-solujen ulkonäöstä, joka ei näyttänyt enää poikkeavan niin paljon kontrollisoluista. Soluviljelyssä on mahdollisesti voinut tapahtua ristikontaminaatiota scrambled- ja Rab27A-hiljennettyjen solujen välillä. Nämä tulokset kuitenkin viittaavat vahvasti Rab27A-proteiinin rooliin sekä solujen ulkonäössä että eksosomien tuotossa.

M022i-solujen CD63-pitoisuuksia ei voida ensimmäisestä WB:stä havaita, minkä takia koe tehtiin uudestaan. Kuitenkin huomataan, Rab27A-hiljennetyistä OVCAR8-soluista täysin poiketen, että Rab35-hiljennettyjen M022i-solujen kasvatusliuos antaa CD63-markkerille melko paljonkin vastetta. Lisäksi ottaen taas huomioon solu- ja

eksosomilysaattien proteiinipitoisuudet, voidaan nähdä, että Rab35-hiljennetyillä solulysaateissa proteiinipitoisuus on alhaisinta muihin M022i-soluihin verrattuna, mutta eksosomilysaateissa proteiinipitoisuus on sen sijaan suurin. Tässä käytettyjen Rab35-hiljennettyjen solujen *Rab27A*:n ekspressio näytti Taqman-kokeen mukaan samantasoiselta kuin scrambled-soluilla (kuva 14), joten vastetta ei voida selittää sillä. Taqman-tuloksen tukemiseksi solulysaateille tehtiin myös WB, missä voitiin sulkea pois mahdollisuus *Rab27A*:n yliekspressiosta proteiinitasolla (kuva 24). Tässäkin Rab35-hiljennettyjen proteiinitason *Rab27A*-ilmentyminen on alfa-aktiiniin normalisoituna melko samanlaista kuin kontrollisoluisissa. Toisessa kokeessa vastaavanlaisia tuloksia ei nähdä, minkä takia toistoja kokeesta vaaditaan.

Yhteenvedon voidaan siis sanoa, että eksosomeja näyttäisi tuottuvan solujen ympäristöön vähemmän, kun *Rab27A*-geeni on hiljennetty. Vaikka tätä ei ole voitu osoittaa molemmissa solulinjoissa samanaikaisesti, viittäisivat nämä kaksi koetta yhdessä saatuun tulokseen. Rab35-hiljennetyillä soluilla vastaavaa ei toistaiseksi voida havaita. Koe on kuitenkin tarkoitus vielä toistaa tulosten vahvistamiseksi. Tämän lisäksi pyritään detektoimaan myös muita eksosomimarkkereita (CD9, CD81 ja TSG101).

6.3.1 Vähentyneen eksosomierityksen vaikutus soluihin

Eksosomien vähentyneen erityksen varmistamisen jälkeen tutkimusta on tarkoitus jatkaa tarkastelemalla solujen karakteristisia muutoksia tarkemmin, koska toistaiseksi karakteristisia eroja on havaittu vain Rab27A-hiljennettyjen solujen ulkonäössä. Suunnitelmissa on myös toistaa migraatiokokeen tapainen koejärjestely, missä solut olisivat hypoksisissa olosuhteissa. Tiedetään, että eksosomien on todettu edesauttavan syöpäsolujen selviytymistä vähähappisissa olosuhteissa, missä solut normaalisti siis ovat syöpäkudoksessa, joten tällä kokeella saataisiin tutkittua syöpäsolujen käyttäytymistä enemmän normaalitilannetta (kehossa) vastaavissa olosuhteissa.

7 Yhteenveto

Tässä pro gradu -tutkimuksessa tarkoituksena oli tutkia kahden Rab-proteiinin, Rab27A ja Rab35, tarkempia rooleja HGSOC-syöpäsolujen eksosomien biosynteesissä ja erityksessä. Molemmat proteiinit kuuluvat pieniin GTPaaseihin ja ne osallistuvat soluissa monenlaisiin solunsisäisiin kalvokuljetuksiin, minkä takia niiden osallisuutta eksosomien biosynteesissä on monesti esitetty. Aikaisempien tutkimusten perusteella näiden geenien hiljentämiset ovat johtaneet vähentyneeseen eksosomien eritykseen, siispä tässäkin tutkimuksessa pyrkimyksenä oli hiljentää nämä geenit ja tarkastella hiljennysten vaikutuksia. Erona aikaisempiin tutkimuksiin, näiden geenien hiljennyksiä ei ole ennen tehty HGSOC-soluissa.

Geenien ilmentämiset estettiin RNA-interferenssi-menetelmällä ja hiljennykset pystyttiin todistamaan onnistuneiksi sekä lähetti-RNA- että proteiinitasoilla ($P < 0,05$). Geenihiljennysten jälkeen ulkonäöllisiä muutoksia pystyttiin heti jonkin verran havaitsemaan Rab27A-hiljennetyissä soluissa. Lisäksi alustavien kokeiden tulokset viittaavat Rab27A-hiljennettyjen solujen erittävän kontrollisoluja vähemmän eksosomeja ympäristöönsä. Koetta täytyy vielä toistaa, jotta tuloksista voidaan varmistua. Tutkimuksen alku näyttää lupaavalta ja mahdollisuuksia jatkotutkimuksille on paljon. Tämän tutkimuksen tulokset ovat luultavimmin vain pintaraapaisu siitä, mitä kaikkea ei vielä tiedetä Rab-proteiinien rooleista eksosomien biosynteesissä ja edelleen eksosomien vaikutuksista syövässä.

Jos eksosomien erityksen määrän vähentyminen voidaan todistaa, tarkoituksena on myös tutkia tästä johtuvia solulinjojen karakterisia muutoksia. Edelleen, jos mielenkiintoisia muutoksia voidaan havaita, olisi tarkoitus tehdä jatkotutkimuksia solujen selviytymisestä, koska eksosomien tiedetään osallistuvan syöpäsoluille suotuisamman ympäristön luomisessa. Jos saamme tehtyä solulinjoja, joiden eksosomien erityks on vähentynyt, olisi mielenkiintoista nähdä, selviytyvätkö ne kontrollisoluja huonommin esimerkiksi hypoksisissa olosuhteissa. Mahdollisia jatkotutkimuksia on paljon ja niitä on tarkoitus suunnitella paremmin sen jälkeen, jos solujen todetaan tuottavan vähemmän eksosomeja.

8 Kiitokset

Iso kiitos ohjaajilleni Laura Lehtiselle erinomaisesta ohjauksesta, kannustuksesta ja etenkin kärsivällisyydestä, sekä Olli Carpénille.

Lisäksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni saamastani tuesta, sekä koko Carpén/Huhtinen -lab:n työporukkaa avusta ja mukavan työilmapiirin luomisesta.

9 Lähdeluettelo

- ATCC: The global bioresource center. WWW-sivusto: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>. (Luettu 27.2.2019)
- Dharmacon Horizon Discoveryn WWW-sivusto:
<https://dharmacon.horizondiscovery.com/rnai/shrna/#all>. (Luettu 4.3.2019)
- JCRB Cell Bank. WWW-sivusto: <https://cellbank.nibiohn.go.jp/english/>. (Luettu 27.2.2019)
- Kaikki syövästä. WWW-sivusto: https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/munasarjasyopa/?gclid=EAIaIQobChMIkZHQt_fA4QIVVMayCh0piQNAEAAAYASAAEgJv2PD_BwE. (Luettu 8.4.2019)
- Suomen Syöpärekisteri. (2018). *Syöpä 2016 -raportti*. WWW-sivusto: https://syoparekisteri.fi/assets/files/2018/11/vuosiraportti_2016.pdf. (Luettu 13.12.2018)
- UniProt. (a). WWW-sivusto: <https://www.uniprot.org/uniprot/P51159>. (Luettu 8.3.2019)
- UniProt. (b). WWW-sivusto: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q15286>. (Luettu 8.3.2019)
- Ahmed, A. A., Etemadmoghadam, D., Temple, J., Lynch, A. G., Riad, M., Sharma, R., Steward C., Fereday, S., Caldas, C., Defazio, A., Bowtell, D., & Brenton, J. D. (2010). Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *The Journal of Pathology*, 221(1), 49-56. doi:10.1002/path.2696
- Alzahrani, F. A., El-Magd, M. A., Abdelfattah-Hassan, A., Saleh, A. A., Saadeldin, I. M., El-Shetry, E. S., . . . Alkarim, S. (2018). Potential effect of exosomes derived from cancer stem cells and MSCs on progression of DEN-induced HCC in rats. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/8058979/>
- Amigorena, S., Zitvogel, L., & Théry, C. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(8), 569-579. doi:10.1038/nri855
- Amiji, M., & Ramesh, R. (2018). Diagnostic and therapeutic applications of exosomes in cancer. Academic Press.
- Antimisiaris, S. G., Mourtas, S., & Marazioti, A. (2018). Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. *Pharmaceutics*, 10(4), doi:10.3390/pharmaceutics10040218
- Barr, F. & Lambright, D. G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(4): 461-70. doi:10.1016/j.ceb.2010.04.007

- Bjålie, J. G., Haug, E., Sand, O., Sjaastad, O. V., & Toverund, K. C. (2008). *IHMİNEN fysiologia ja anatomia* (5th ed.) Sanoma Pro Oy.
- Bobrie, A., Krumeich, S., Reyat, F., Recchi, C., Moita, L. F., Seabra, M. C., . . . Théry, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Research*, *72*(19), 4920-4930.
- Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2007). Membrane trafficking: Three steps to fusion. *Current Biology*, *17*(7), 255-258. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.006>
- Burstein, H. J., & Schwartz, R. S., (2008). Molecular Origins of Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *358*(5), pp. 527
- Bützow, R. (2014). Onko munasarjalähtöistä karsinoomaa olemassakaan? *Duodecim-Lehti*, *130*(1), 29-37.
- Caviglia, S., Flores-Benitez, D., Lattner, J., Luschnig, S., & Brankatschk, M. (2019). Rabs on the fly: Functions of rab GTPases during development. *Small GTPases*, *10*(2), 89-98. doi:10.1080/21541248.2017.1279725
- Chatput, N., & Théry, C. (2011). Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, *33*(5), 419-440. doi:10.1007/s00281-010-0233-9
- Chen, P., Huhtinen, K., Kaipio, K., Mikkonen, P., Aittomäki, V., Lindell, R., . . . Hautaniemi, S. (2015). *Identification of prognostic groups in high-grade serous ovarian cancer treated with platinum-taxane chemotherapy*. United States: doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3242
- Colvin, C. W., & Abdullatif, H. (2013). Anatomy of female puberty: The clinical relevance of developmental changes in the reproductive system. *Clinical Anatomy*, *26*(1), 115-129. doi:10.1002/ca.22164
- Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F. G., Stoorvogel, W., & Geuze, H. J. (2000). Exosome: From internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Jcs*, *113*(19), 3365-3374.
- Desai, A., Xu, J., Aysola, K., Qin, Y., Okoli, C., Hariprasad, R., . . . Rao, V. N. (2014). *Epithelial ovarian cancer: An overview*. United States: doi:10.5528/wjtm.v3.i1.1
- Fukuda, M. (2013). Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic*, *14*(9), 949-963. doi:10.1111/tra.12083
- Gruenberg, J., & Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, *7*(4), 552-563.
- Guo, W., Gao, Y., Li, N., . . . & He, J. (2017). Exosomes: New players in cancer. *Oncology Reports*, *38*(2), 665-675. doi:10.3892/or.2017.5714

- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., . . . Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *68*(16), 2667-2688. doi:10.1007/s00018-011-0689-3
- Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(2): 193-208. doi:10.1007/s00018-017-2595-9
- Hirata, E., & Sahai, E. (2017). Tumor microenvironment and differential responses to therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(7). doi:10.1101/cshperspect.a026781
- Hoffman, B. L., Schorge, J. O., Bradshaw, K. D., Halvorson, L. M., Schaffer, J. I., & Corton, M. M. (2012). *Williams gynecology*. New York: McGraw-Hill Medical.
- Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-hoyos, N., Jung, S., . . . & Simons, M. (2010). Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of Cell Biology*, *189*(2), 223-232. doi:10.1083/jcb.200911018.
- Huang, T., & Deng, C. (2019). Current progresses of exosomes as cancer diagnostic and prognostic biomarkers. *International Journal of Biological Sciences*, *15*(1), 1-11. doi:10.7150/ijbs.27796
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, *91*(1), 119-149. doi:10.1152/physrev.00059.2009
- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., & Echard, A. (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Current Biology*, *16*(17), 1719-1725. doi:10.1016/j.cub.2006.07.020
- Kowal, J., Tkach, M., & Théry, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, *29*, 116-25 doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004
- Kurman, R. J., & Shih, I. (2010). The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: A proposed unifying theory. United States: doi:10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79
- Lea, J., Sharma, R., Yang, F., Zhu, H., Wards, E. S., & Schroit, A. J. (2017). Detection of phosphatidylseine-positive exosomes as a diagnostic marker for ovarian malignancies: a proof of concept study. *Oncotarget*, *8*(9), 14395-14407. doi:10.18632/oncotarget.14795
- Lee, Y., Miron, A., Drapkin, R., Nucci, M., Medeiros, F., Saleemuddin, A., . . . Crum, C. (2007). A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *The Journal of Pathology*, *211*(1), 26-35. doi:10.1002/path.2091

- Leminen, A., Bützow, R., Grénman, S., Kuoppala, T., Mervaala, E., Mäenpää, J., . . . Vuento ja Merja Yliskoski, Maarit. (2007). Munasarjasyöpä. *Duodecim; Lääketieteellinen Aikakauskirja*, 123(19), 2339.
- Li, W., Hu, Y., Jiang, T., Han, Y., Han, G., Chen, J., & Li, X. (2014). Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: Involvement of EPI64. *Apmis*, 122(11), 1080-1087. doi:10.1111/apm.12261
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), 575-625. doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.575
- Melo, S., Sugimoto, H., O'Connell, J., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., . . . Kalluri, R. (2014). Cancer exosomes perform cell-independent MicroRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell*, 26(5), 707-721. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.005
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., & Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450(7168), 435-439. doi:10.1038/nature06307
- Mosesson, Y., Mills, G. B., Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: An emerging feature of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(11), 835-850. doi: 10.1038/nrc2521
- Nienstedt, W., Hänninen, O., Arstila, A., & Björkqvist, S. (2004). *Ihmisen fysiologia ja anatomia* (15th ed.) WSOY.
- Nguyen, E. V., Huhtinen, K., Goo, Y. A., Kaipio, K., Andersson, N., Rantanen, V., Hynninen, J., Lahesmaa, R., Carpén, O., Goodlett, D. R. (2017). Hyperphosphorylation of sequestosome-1 distinguishes resistance to cisplatin in patient derived high grade serous ovarian cancer cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 16(7), 1377-1392. doi:10.1074/mcp.M116.058321
- Otto, G. P., & Nichols, B. J. (2005). The roles of flotillin microdomains-endocytosis and beyond. *Journal of Cell Science* 124, 3933-3940. doi: 10.1242/jcs.092015
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., & Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes & Development*, 16(8), 948-958. doi:10.1101/gad.981002
- Park, J. E., Tan, H. S., Datta, A., Lai, R. C., Zhang, H., Meng, W., Lim, S. K., & Sze, S. K. (2010). Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and *Molecular & Cellular proteomics*, 9(6), 1085-1099. doi:10.1074/mcp.M900381-MCP200
- Pereira-Leal, J. B., & Seabra, M. C. (2001). Evolution of the rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 889-901. doi:10.1006/jmbi.2001.5072
- Piek, J. M., van Diest, P. J., Zweemer, R. P., Jansen, J. W., Poort-Keesom, R. J., Menko, F. H., . . . Verheijen, R. H. (2001). Dysplastic changes in prophylactically removed

- fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of Pathology*, 195(4), 451-456. doi:10.1002/path.1000
- Piper, R. C., & Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 519-547. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319
- Prat, J. (2012). Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Archiv*, 460(3), 237-249. doi:10.1007/s00428-012-1203-5
- Pylypenko, O., Hammich, H., Yu, I., & Houdusse, A. (2018). Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into rab functional diversity. *Small GTPases*, 9(1-2), 22-48. doi:10.1080/21541248.2017.1336191
- Quirk, J. T., Natarajan, N., & Mettlin, C. J. (2005). Age-specific ovarian cancer incidence rate patterns in the united states. *Elsevier*, 99(1), 248-250.
- Rutonen, E. (1999). Munasarja-alati muuttuva elin. *Duodecim*, 115(19), 2091-2101.
- Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., & Colombo, M. I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a Calcium-Dependent manner. *Traffic*, 6(2), 131-143. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x
- Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), 871-881. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x
- Shih, I., & Kurman, R. J. (2004). Ovarian tumorigenesis: A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *American Journal of Pathology*, 164(5), 1511-1518. Retrieved from <http://ajp.amjpathol.org/cgi/content/abstract/164/5/1511>
- Simons, M., & Raposo, G. (2009). *Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication* doi://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007
- Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, 30-41. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782716300492>
- Stenmark, H., & Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biology*, 2(5), reviews3007.1-reviews3007.7
- Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J., & Raposo, G. (2002). *The biogenesis and functions of exosomes*. England: doi:10.1034/j.1600-0854.2002.30502.x
- Stoorvogel, W., Strous, G. J., Geuze, H. J., Oorschot, V., & Schwartz, A. L. (1991). Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*, 65(3), 417-427. doi:10.1016/0092-8674(91)90459-C

- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, 9(8), 581-593. doi:10.1038/nri2567
- Testa, U., Petrucci, E., Paquini, L., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018). Ovarian Cancers: Genetic abnormalities, tumor heterogeneity and progression, clonal evolution and cancer stem cells. *Medicines* 5(1), 16
- Tian, T., Zhu, Y-L., Zhou, Y-Y., Liang, G-F., Wang, Y-Y, Hu, F-H., Xiao, Z-D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22258-22267. doi:10.1074/jbc.M114.588046
- Tokarev, A. A., Alfonso, A., & Segev, N. (2009). Overview of intracellular compartments and trafficking pathways. *Trafficking Inside Cells*. Molecular Biology Intelligence Unit. Springer, New York. doi:10.1007/978-0-387-93877-6_1
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, J., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *BBA - Biomembranes*, 645(1), 63-70. doi:10.1016/0005-2736(81)90512-5
- Tzeng, H., & Wang, Y. (2016). Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *Journal of biomedical science*, 23(1), pp. 70 doi:10.1186/s12929-016-0287-7
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654-659. doi:10.1038/ncb1596
- Van Gele, M., Dynoodt, P., & Lambert, J. (2009). Griscelli syndrome: A model system to study vesicular trafficking. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(3), 268-282. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00558.x
- Wang, Z., Chen, J-Q., Liu, J-I., & Tian, L. (2016). Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *The Journal of Translational Medicine*, 14, 297. doi:10.1186/s12967-016-1056-9
- Weinberg, R. A., (2007). *The biology of cancer*. UNITED STATES: Garland Science, Taylor & Francis
- Wheeler, D. B., Zoncu, R., Root, D. E., Sabatini, D. M., Sawyers, C. L., (2015). Identification of an oncogenic RAB protein. *Science*, 350(6257), pp. 211-217.
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), 107-117. doi:10.1038/35052055

10 Liitteet

10.1 Liite 1. Transduktiossa käytetyt sekvenssit

Geeni	Numero	Tiitteri (TU/ml)	Sekvenssi
shScr	002V	92000000	Ei julkaistu
shRab27A_1	5295	7600000	CCGGCCAGTGTACTTTACCAATATACTCGAGTATATTGGT AAAGTACACTGGTTTTT
shRab27A_2	5296	2900000	CCGGCGGATCAGTTAAGTGAAGAACTCGAGTTTCTTCA CTTAACTGATCCGTTTTT
shRab27A_3	5297	7400000	CCGGGCTGCCAATGGGACAAACATACTCGAGTATGTTTG TCCCATTGGCAGCTTTTT
shRab35_1	380003	8100000	GTACCGGGGAGAATGTCAACGTGGAAGACTCGAGTCTTC CACGTTGACATTCTCCTTTTTTG
shRab35_2	380080	19000000	GTACCGGTTACGAAATCAACCAGAACTCTCGAGAGTTC TGGTTGATTTCGTGAATTTTTTG
shRab35_3	380335	12000000	GTACCGGTGATGATGTGTGCCGAATATTCTCGAGAATAT TCGGCACACATCATCATTTTTTG

10.2 Liite 2. Tutkimuksessa käytetyt vasta-aineet

Kohde-proteiini	Tuottoeläin	Tuotenumero	Valmistaja
anti-mouse	rabbit pAb	P0161	Dako
anti-rabbit	swine pAb	P0217	Dako
CD9	mouse mAb	MCA469G	Bio-Rad
CD63	mouse mAb	10628D	Invitrogen, Life Technologies
CD81	mouse mAb	MCA1847EL	Bio-Rad
Rab27A	rabbit mAb	D7Z9Q	Cell Signaling TECHNOLOGY®
Rab35	rabbit	SAB270146	Sigma-Aldrich®
TSG101	mouse mAb	MCA3515Z	Bio-Rad