



**Metioniini 1-sidotun ubikitinaation rooli kolorektaalisyövän
kehityksessä 3D-syöpäsolumalleissa**

Pro Gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemian tutkinto-ohjelma

Joulukuu 2022

Emmi Virtanen

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

TURUN YLIOPISTO
Bioteknologian laitos

VIRTANEN EMMI: Metioniini 1-sidotun ubikitinaation rooli kolorektaalisyövän kehityksessä 3D-syöpäsolumalleissa

Pro gradu -tutkielma, 56 s.
Solubiologia
Joulukuu 2022

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

Kolorektaalisyövällä viitataan ruuansulatuskanavan loppuosassa eli umpisuolella, koolonissa tai peräsuolen alueella esiintyvään syöpään. Kolorektaalisyövän kehityksessä perinnöllisyys on suuri riskitekijä, mutta esimerkiksi elintavat ja tulehdukselliset sairaudet, kuten tulehduksellinen suolistosairaus (*engl. inflammatory bowel disease*) voivat lisätä riskiä kolorektaalisyövän kehitykselle.

NF- κ B-transkriptiotekijäperheellä (*engl. Nuclear factor-kappaB*) on tärkeä rooli tulehdusvasteen aikana tapahtuvassa tulehdusviestinnässä, esimerkiksi tulehdusta edeltävien sytokiinien tuottamisessa ja näin ollen tulehduksellisten syöpien kehityksessä. Tulehdusviestintää säädellään tiukasti transkription jälkeisen modifikaation, ubikitinaation, avulla ja erityisesti metioniini 1-sidottu ubikitinaatio (Met1-ubikitinaatio) on tärkeässä roolissa tulehdusviestinnän oikeanlaisessa toiminnassa.

Tässä tutkimuksessa oletamme, että Met1-ubikitinaation määrä lisääntyy syövän kehittyessä 3D-kolorektaalisyöpäsolumalleissa, mikä johtaa epänormaaliin NF- κ B-viestintään. Työssä käytetään Caco2 (*engl. human colorectal adenocarcinoma*) soluista valmistettuja 3D-syöpäsolumalleja eli organoideja, koska niissä syöpäsolujen kasvuolosuhteet jäljittelevät niiden luonnollista kasvuympäristöä. Toisena oletuksemme on, että estämällä Met1-ubikitinaation kokoamiskoneiston toimintaa voidaan estää tai vähentää epänormaalien NF- κ B-viestinnän aktivoitumista. Työssä käytetään HOIPIN-1-inhibiittoria estämään Met1-ubikitinaatiosidoksen muodostumista. Kerätyt näytteet analysoidaan Western Blot-menetelmällä ja lisäksi työssä tutkitaan NF- κ B-viestinnän tuottamien geenien ilmenemistä reaaliaikaisen PCR-menetelmän avulla. Syövän kehityksen vaiheita seurataan myös mikroskopian avulla.

Tutkimuksessa havaittiin, että Met1-ubikitinaatitasot lisääntyvät kolorektaalisyövän kehittyessä ja HOIPIN-1-inhibiittori osoittautui tehokkaaksi Met1-ubikitinaation muodostumisen estäjäksi 3D-malleissa. Tulosten perusteella organoidit ovat riippuvaisia Met1-ubikitiniinisidoksesta ja sen puuttuminen aiheuttaa organoidien kasvun pysähtymisen sekä solujen kuoleman. Uskomme Met1-ubikitinaation olevan tärkeässä roolissa NF- κ B-viestinnän aktivoitumisessa ja näin ollen kolorektaalisyövän kehityksessä 3D-syöpäsolumalleissa.

Avainsanat: 3D-malli, HOIPIN-1, Met1-ubikitinaatio, kolorektaalisyöpä

Aluksi haluan kiittää Annika Meinanderia, joka antoi minulle mahdollisuuden tehdä pro gradu -työni tutkimusryhmässään mielenkiintoisen projektin parissa. Iso kiitos Gabriela Martínez Chacónille kaikesta ohjauksesta, avusta ja tuesta työn aikana. Kanssasi on ollut ilo työskennellä ja olen oppinut valtavasti tämän projektin aikana. Kiitos Anna A. avusta ja tsempeistä työn loppuun saattamisessa. Lisäksi iso kiitos koko ryhmälle niin nykyisille kuin entisillekin jäsenille hyvästä yhteishengestä, keskusteluista ja illanvietoista.

Sisällys	
Lyhenteet	3
1. Johdanto.....	5
2. Kirjallisuuskatsaus	7
2.1 Syövän kehittyminen ja tulehdus.....	7
2.1.1 Syövän kehitys on monimutkainen prosessi.....	7
2.1.2 Tulehdus syövän kehityksessä	7
2.2. Kolorektaalisyöpä.....	8
2.2.1 Kolorektaalisyövän epidemiologia	8
2.2.2 Kolorektaalisyövän riskitekijät	9
2.3 NF- κ B-välitteinen immuunivaste	10
2.3.1 Synnynnäinen immuunivaste ja NF- κ B.....	10
2.3.2 NF- κ B-välitteisen immuunivasteen säätely.....	11
2.4 Ubikitinaatio.....	12
2.4.1 Ubikitinaatio on translaation jälkeinen modifikaatio	12
2.4.2 Ubikitiinin liittäminen kohdeproteiiniin.....	13
2.4.3 Erilaiset ubikitiiniketjut	13
2.4.4 Met1-ubikitinaatio eli lineaarinen ubikitinaatio	16
2.4.5 Met1-ubikitinaation kokoamiskoneisto LUBAC	16
2.4.6 HOIP-alayksikön domeenirakenne.....	16
2.4.7 DUB-entsyymit säätelevät Met1-Ub-tasoa.....	17
2.4.8 Met1-Ub-ketjut ovat tärkeitä elimistön fysiologiselle toiminnalle.....	18
2.5. Met1-Ub synnynnäisessä immuuniviestinnässä	18
2.5.1 Kanoninen NF- κ B-viestintää aktivoi NF- κ B-kohdegeenien tuotannon	18
2.5.2 Met1-Ub säätelee tiukasti solukuolemaa	19
2.6. Met1-Ub kokoamiskoneiston muokkaaminen tutkimuksen keinoin.....	20
2.6.1 Met1-Ub poistaminen kohdeproteiineista on elintärkeää elimistön tasapainon kannalta.....	20
2.6.2 HOIP-inhibiittori HOIPIN-1 estää Met1-Ub-ketjun muodostumisen	21
2.7. Syövän tutkiminen laboratoriossa	21
2.7.1 2D- ja 3D-soluviljely syöpätutkimuksessa	21
2.7.2 Matrigeelin käyttö syöpätutkimuksessa	23
2.7.3 Haluttu kasvukehitys sekä -nopeus 3D-syöpäsolumalleissa	23
3. Tutkimuksen tavoite ja tarkoitus	25
4. Materiaalit ja menetelmät	26
4.1 Solulinja, kasvatusolosuhteet ja 3D-syöpäsolumallit.....	26

4.1.1 Solulinja ja kasvatusolosuhteet.....	26
4.1.2 3D-syöpäsolumallien kasvatus.....	26
4.1.3 Näytteiden kerääminen	27
4.2 HOIPIN-1-käsittelyt 3D-syöpäsolumalleille	27
4.2.1 HOIPIN-1-inhibiittorin optimointi	27
4.2.2 HOIPIN-1-käsittelyt Caco2 3D-malleille	28
4.3 Proteiininäytteiden valmistus, Western Blot ja reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR	29
4.3.1 Met1-Ub-rikastusnäytteiden ja proteiiniuutenäytteiden valmistus rikastusmenetelmällä.....	29
4.3.2 Proteiinipitoisuuden määrittäminen.....	30
4.3.3 Met1-ubikitinaation ilmenemisen tarkastelu Western Blot-menetelmällä.....	30
4.3.4 RNA eristys ja geenien ilmenemisen tarkastelu reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR).....	32
5. Tulokset.....	33
5.1 3D-syöpäsolumallien solumäärän optimointi.....	33
5.2 Met1-Ub-tasojen huomattiin nousevan 3D-syöpäsolumalleissa.....	34
5.3 Käytettävän HOIPIN-1 konsentraation optimointi.....	35
5.4 HOIPIN-1-inhibiittorilla nähdään muutoksia proteiini koostumuksessa	36
5.5 HOIPIN-1 vaikuttaa sytokiini tuotantoon syövän kehityksen eri vaiheissa	40
5.6 Met1-Ub-sidoksen inhibiittori HOIPIN-1 tappaa kolorektaalisyöpäsolut 3D-kasvatuksissa	42
6. Tulosten tarkastelu ja pohdinta	45
6.1 Optimaalinen 3D-syöpäsolumalli mahdollistaa Met1-Ub-ketjujen tutkimuksen laboratoriossa	45
6.2 Met1-ubikitinaatiotasot nousevat kolorektaalisyövän kehityksen aikana	46
6.3 HOIPIN-1-käsittely vaikuttaa Met1-Ub-tasoihin sekä NF-κB-viestintään	48
7. Yhteenveto ja tulevaisuuden näkymät	50
Kirjallisuus	52

Lyhenteet

APS	ammoniumipersulfaatti, engl. <i>ammonium persulfate</i>
Bcl-2	B-solulymfooma 2, engl. <i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	naudan seerumin albumiini, engl. <i>bovine serum albumin</i>
CACO	koolonin adenokarsinooma, engl. <i>colon adenocarcinoma</i>
CAM	kananmunan korioallantoinen kalvo engl. <i>chicken egg chorioallantoic membrane</i>
c-FLIP	engl. <i>cellular FLICE-like inhibitory protein</i>
CYLD	deubikitinaatio entsyymi, engl. <i>cylindromatosis</i>
DMSO	dimetyylisulfoksidi, engl. <i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	deoksiribonukleiinihappo, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	ditiotreitoli, engl. <i>dithiothreitol</i>
DUB	deubikitinaatio entsyymi, engl. <i>deubiquitinating enzyme</i>
E1	ubikitiinin aktivoiva entsyymi
E2	ubikitiinin konjugoiva entsyymi
E3	ubikitiiniligaasi
ECM	soluväliaines, engl. <i>extracellularmatrix</i>
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo, engl. <i>engl. ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FADD	engl. <i>Fas-associated death domain</i>
FBS	naudan sikiön seerumi, engl. <i>fetal bovine serum</i>
GST	glutathioni S-transferaasi, engl. <i>glutathione S-transferase</i>
HOIL-1	LUBAC-kompleksin osa, engl. <i>heme-oxidized IRP2 ligase 1L</i>
HOIP	LUBAC-kompleksin katalyyttinen alayksikkö, engl. <i>HOIL-1L interacting protein</i>
HOIPIN-1	HOIP-inhibiittori
IKK	kinaasikompleksi
IL6	ihmisen interleukiini-6
K	lysiini, kolmikirjaiminen lyhenne Lys, engl. <i>lysine</i>
kDA	kilodaltoni, engl. <i>kilodalton</i>
LUBAC	Lineaarisen ubikitinaation kokoamiskoneisto, engl. <i>linear ubiquitin chain assembly complex</i>

LUBEL	Lineaarisen ubikitinaation E3-ligaasi, engl. <i>linear ubiquitin E3 ligase</i>
M	metioniini, kolmikirjaiminen lyhenne Met, engl. <i>methionine</i>
Met1-Ub	metioniini 1-sidottu ubikitinaatio, engl. <i>methionine 1 linked ubiquitination</i>
NEM	N-etyylimaleimidi, engl. <i>N-ethylmaleimide</i>
NEMO	IKK-kompleksin säätelevä alayksikö, engl. <i>NF-κB essential modulator</i>
NF- κ B	NF- κ B-proteiinikompleksi, engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
OTULIN	Met-1-Ub spesifinen deubikitinaatioentsyymi, engl. <i>ovarian tumor (OTU) deubiquitinase</i>
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos, engl. <i>phosphate buffered</i>
PBST	0,1 % Tween-20, joka sisältää fosfaattipuskuroitua suolaliuosta
PCR	polymeraasiketjureaktio, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR, engl. <i>real-time quantitative PCR</i>
RBR	engl. <i>RING-in between-RING</i>
RING	engl. <i>really interesting new gene</i>
RNA	ribonukleiinihappo, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RT	huoneenlämpö, engl. <i>room temperature</i>
SDS	natriumdodekyylisulfaatti, engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi, engl. <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SHARPIN	LUBAC-kompleksin osa, engl. <i>SHANK-associated RH domain-interacting protein</i>
TAK1	engl. <i>TGF-β-activated kinase 1</i>
TBST	0,05 % Tween-20, joka sisältää Tris-puskuroitua suolaliuosta
TEMED	tetrametyyli-etyleenidiamiini, engl. <i>Tetramethylethylenediamide</i>
TNFR	TNF-reseptori, engl. <i>TNF receptor</i>
TNF- α	tuumorinekroositekijä- α , engl. <i>tumour necrosis factor alpha</i>
TRADD	engl. <i>TNFR1-associated death domain</i>
TUBE	tandemiubikitiinisitojaproteiini, engl. <i>tandem ubiquitin binding entity</i>
UBA	ubikitiinin liittyvä, engl. <i>ubiquitin-associated</i>
UBD	ubikitiinisitoja-alue, engl. <i>ubiquitin binding domain</i>

1. Johdanto

Kolorektaalisyöpää esiintyy ruuansulatuskanavan loppuosassa, johon kuuluu umpisuoli, kooloni ja paksusuolen alue (Atlas of Anatomy, toinen painos; s. 162–163). Se on Suomessa sekä maailmalla yleinen ja jatkuvasti lisääntyvä syöpätyyppi yhä nuoremmillakin ihmisillä. Kolorektaalisyövän jatkuvan yleistymisen vuoksi on tärkeä ymmärtää paremmin, miten se kehittyy ja miksi se kehittyy. Saadaksemme lisää tietoa, kolorektaalisyövän tutkimiseen käytetään jatkuvasti enemmän ja enemmän resursseja. (Mármol ja muut 2017.)

Syövän kehittyminen on hyvin monimutkainen prosessi, johon kuuluu erilaisia vaiheita (Hanahan ja Weinberg 2011). Perinnöllisyyden ja elintapojen lisäksi kroonisella tulehduksella on tutkittu olevan suuri rooli kolorektaalisyövän kehityksessä. Tulehdukselliset sairaudet, joissa krooninen tulehdus on osa taudinkuvaa ovat riskitekijöitä, jotka lisäävät riskiä kolorektaalisyövän kehitykselle. Tällaisia sairauksia ovat esimerkiksi tulehduksellinen suolistosairaus, haavainen paksusuolen tulehdus ja Chronin tauti. (Pahwa ja muut 2022; Singh ja muut 2019.)

NF- κ B-transkriptiotekijäperheellä on keskeinen tehtävä tulehduksen aikana tapahtuvassa tulehdusviestinnässä. NF- κ B aktivoi sytokiinien ja kemokiinien tuotantoa, joilla on keskeinen rooli tulehdustilan synnyssä ja sen muuttumisessa krooniseksi tulehdukseksi. NF- κ B on kehon tasapainon kannalta hyvin tärkeä tekijä, joka säätelee niin tulehdusta kuin solujen menoa apoptoosiin. Kuitenkin vääränlainen NF- κ B viestinnän säätely voi johtaa kehossa esimerkiksi liialliseen sytokiinien tuotantoon ja näin ollen edesauttaa tulehduksellisen syövän kehittymistä. (Liu ja muut 2017.)

Kuten muutakin viestintää, tulehdusvastetta säädellään translaationjälkeisten modifikaatioiden avulla. Ubikitinaation tiedetään olevan yksi tärkeä modifikaatio, jolla tulehdusviestintää voidaan säädellä. Ubikitiini on pieni säätelyproteiini, jota esiintyy kaikissa eukaryoottien soluissa. Ubikitinaatiolla tarkoitetaan ubikitiinin liittämistä kohdeproteiiniin. Ubikitiini voidaan lisätä ja ottaa pois kohdeproteiinista ja se on hyvin tiukasti säädelty reaktio. (Komander ja Rape 2012.) Ubikitinaation kokoamiskoneisto on tärkeässä osassa ubikitinaatiota, koska se vastaa ubikitiinin liittämistä kohdeproteiiniin. Lisäksi tärkeitä ovat ubikitiinisitoja-alueita sisältävät proteiinit, jotka lukevat ubikitiiniketjun sisältämän viestin. Myös ubikitinaation purkamiseen osallistuvat

proteiineilla on tärkeä tehtävä soluviestinnän säätelyssä. (Jahan ja muut 2021.) Tiedetään, että varsinkin metioniini 1-sidottu ubikitinaatio (Met1-ubikitinaatio) on erittäin tärkeässä roolissa NF- κ B-viestinnän säätelyssä sekä solujen kuolemisessa apoptoosin kautta (Rittinger ja Ikeda 2017).

Tämän pro gradu -työn tarkoituksena on selvittää Met1-ubikitinaation rooli kolorektaalisyövän kehityksen eri vaiheissa. Haluamme lisäksi selvittää, onko Met1-ubikitinaation muodostumista mahdollistaa estää kaupallisella HOIPIN-1-inhibiittorilla, jonka toiminta perustuu Met1-ubikitinaatiosidoksen muodostumiskoneiston toiminnan estämiseen. Työssä hyödynnetään 3D-kasvatuksia perinteisten 2D-kasvatusten sijasta, koska 3D-kasvatuksessa solut ovat enemmän kontaktissa toisiinsa ja malli antaa realistisemmän kuvan siitä, mitä oikean syövän kehittämisessä todella tapahtuu. Kirjallisuuskatsauksessa tutustutaan lisäksi myös syövän kehityksen vaiheisiin, tulehdusviestintään ja ubikitinaation mekanismiin.

2. Kirjallisuuskatsaus

2.1 Syövän kehittyminen ja tulehdus

2.1.1 Syövän kehitys on monimutkainen prosessi

Syövän kehittyminen on monimutkainen ja monivaiheinen prosessi, joka vaatii erilaisia tekijöitä kehityksen eri vaiheissa. Vuonna 2000 Hanahan ja Weinberg julkaisivat artikkelin syövän kuudesta tunnusmerkistä, jotka ovat: syövän kehitystä ja syövän kyky vältellä kasvua hidastavia viestejä ja apoptoosia, syövän omavaraisuus kasvutekijöiden suhteen, sen kyky aktivoida verisuontenmuodostusta, kyky aktivoida invaasiota ja etäpesäkkeiden muodostumista sekä kyky jakaantua loputtomasti. Myöhemmin vuonna 2011 he lisäsivät vielä neljä tunnusmerkkiä: syövän kyky paeta immuunipuolustusta, syövän muuttunut energia-aineenvaihdunta, genomin epävakaisuus ja mutaatioiden kertyminen sekä kasvaimen edistämä tulehdusreaktio. (Hanahan ja Weinberg 2000, 2011)

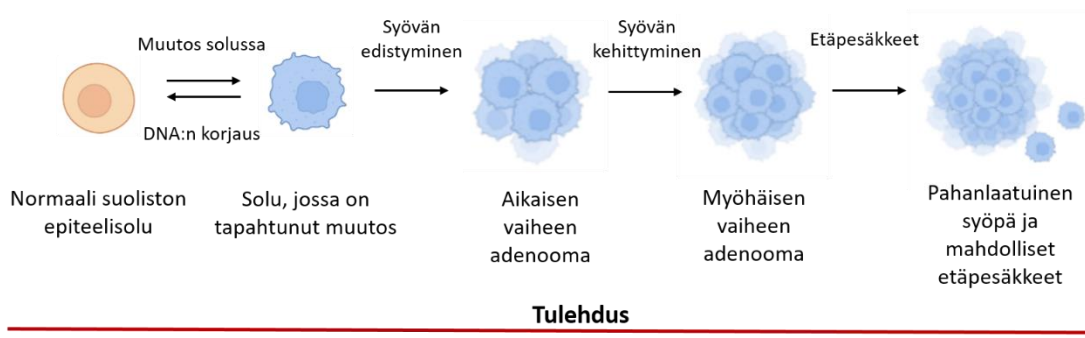
Genomin epävakaus aiheuttaa geneettistä monimuotoisuutta, joka nopeuttaa muita syövän tunnusmerkkien aktivoitumista. Hanahan ja Weinberg myös totesivat tulehdustilan edistävän syövän kehitystä monessa tilanteessa. (Hanahan ja Weinberg 2000, 2011). Linkki tulehduksen ja syövän välillä on kuitenkin havaittu jo vuosikymmeniä sitten. Tutkimuksissa on huomattu, että kasvaimet ilmenevät kroonisen tulehduksen alueilla, joten tulehdus lisää riskiä syövän kehitykselle. Kasvaimissa ilmenee lisäksi tulehdusvasteen soluja, kemokiineja ja sytokiineja. Näiden tekijöiden ylituotanto indusoi syövän kehitystä. (Mantovani ja muut 2008).

2.1.2 Tulehdus syövän kehityksessä

Tulehdus on kehon puolustusmekanismi. Se on reaktio, jossa kehon immuunipuolustus havaitsee uhan ja aloittaa puolustautumisen uhkaa vastaan. Akuutti tulehdus syntyy trauman tai patogeenin seurauksena. Se tarkoittaa lyhytkestoista tulehdusta, jonka aikana kehossa tapahtuu solutason muutoksia, joiden tehtävänä on parantaa tulehtunut kudos. Krooninen tulehdus tarkoittaa tulehdusta, joka on jatkunut kuukausia tai jopa vuosia. Se on tulehduksen muoto, joka etenee hitaasti, mutta voi vahingoittaa kudoksia ja huonontaa kudosten kykyä korjata syntyviä vahinkoja. Kroonisessa tulehduksessa keho ei ymmärrä ajaa tulehdusvastetta alas, mikä altistaa kroonisten sairauksien sekä autoimmuunisairauksien synnylle. Tällainen sairaus on esimerkiksi tulehduksellinen

suolistosairaus, johon kuuluu haavainen paksusuolentulehdus sekä Chronin tauti. (Pahwa ja muut 2022.)

Syövän kehityksessä krooninen tulehdus voi olla osatekijänä terveen solun, esimerkiksi suoliston epiteelisolun, muuttumisessa syöpää aiheuttavaksi. Krooninen tulehdus lisäksi edesauttaa syövän kehitystä esimerkiksi estämällä solukuolemaa ja lisäämällä verisuonten muodostumista. DNA-korjausmekanismi pyrkii korjaamaan solussa tapahtuvia muutoksia, mutta kaikissa tapauksissa niin ei tapahdu. Kasvaimen mikroympäristö ja sen tuottamat sytokiinit edistävät syövän kehitystä, jolloin muodostuu ensin hyvälaatuinen aikaisein vaiheen adenooma ja myöhemmin myöhäisen vaiheen adenooma. Syövän kehityksen edetessä mutaatiot ja muutokset syövän mikroympäristössä voivat saada aikaan pahanlaatuisen syövän kehityksen, sekä mahdollisten etäpesäkkeiden muodostumisen. (Sarkar ja muut 2013; Singh ja muut 2019.) Tämä prosessi kestää usein vuosia ja tulehdusentsyymit, tulehdusta edeltävät sytokiinit ja kemokiinit, ahdeesiomolekyylit sekä koko muu solun mikroympäristö ovat tärkeässä roolissa syövän kehityksessä (kuva 1). (Pahwa ja muut 2022; Singh ja muut 2019.)



Kuva 1, Tulehduksen ajan kolorektaalisyövän kehitys. Alussa suoliston normaalissa epiteelisolun DNA:ssa tapahtuu mutaatio, jota DNA:n korjausmekanismi ei pysty korjaamaan. Muodostuu aikaisen vaiheen adenooma ja myöhemmässä kehityksen vaiheessa myöhäisen vaiheen adenooma. Lopulta syövän mikroympäristö, kasvutekijät ja mutaatioiden kertyminen voivat aiheuttaa pahanlaatuisen syövän ja jopa etäpesäkkeiden muodostumisen. Tulehdus on koko syövän kehityskaaren ajan tärkeässä roolissa sen kehittämisessä. Kuva muokattu: Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview; (Sarkar ja muut 2013.)

2.2. Kolorektaalisyöpä

2.2.1 Kolorektaalisyövän epidemiologia

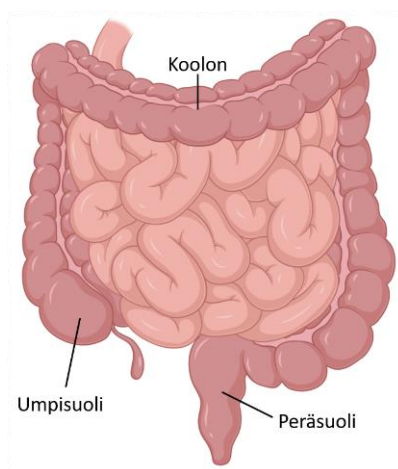
Suolisto koostuu ohut- ja paksusuolesta. Paksusuoli on suoliston taaempänä oleva osa, joka koostuu umpisuolesta, koolonista ja peräsuolesta (Atlas of Anatomy) (kuva 2).

Kolorektaalisyövällä tarkoitetaan näillä alueilla esiintyvää syöpää. Paksusuolen ja peräsuolen syöpä on miehillä sekä naisilla toiseksi yleisin syöpätyyppi Suomessa (Suomen syöpärekisteri, 2019 raportti) sekä myös muualla maailmassa. Vuosittain maailmalla todetaan noin 1.9 miljoona uutta kolorektaalisyöpätapausta. Kolorektaalisyöpä on vuosia ollut länsimaiden ja kehittyneiden maiden ongelma, mutta kehitysmaiden nopean kehityksen vuoksi se on leviämässä koko maailman ongelmaksi. (WHO, colorectal-cancer-awareness-month-2022.)

2.2.2 Kolorektaalisyövän riskitekijät

Riski sairastua kolorektaalisyöpään kasvaa iän myötä. Lisäksi elintavat kuten, tupakointi, ruokavalio, ylipaino, ja fyysisen aktiivisuuden puute voivat edesauttaa syövän kehittymistä. Perinnöllisyys ja genomin vakauden heikkeneminen altistavat kolorektaalisyövän kehittymiselle, kuin myös kroonistunut tulehdustila ja tulehdukselliset sairaudet, kuten tulehduksellinen suolistosairaus. (Mármol ja muut 2017.)

Tyypillisesti mutaatiot niin onkogeneisissä kuin kasvainsupressorigeneisissä voivat aiheuttaa kolorektaalisyövän kehityksen, mutta tiedetään, että muun muassa NF- κ B on tunnettu transkriptiotekijäperhe, jonka koodaamat tekijät edesauttavat tulehduksen sekä tulehduksen aiheuttaman syövän kehittymistä. (Kraus ja Arber 2009; Mantovani ja muut 2008.)



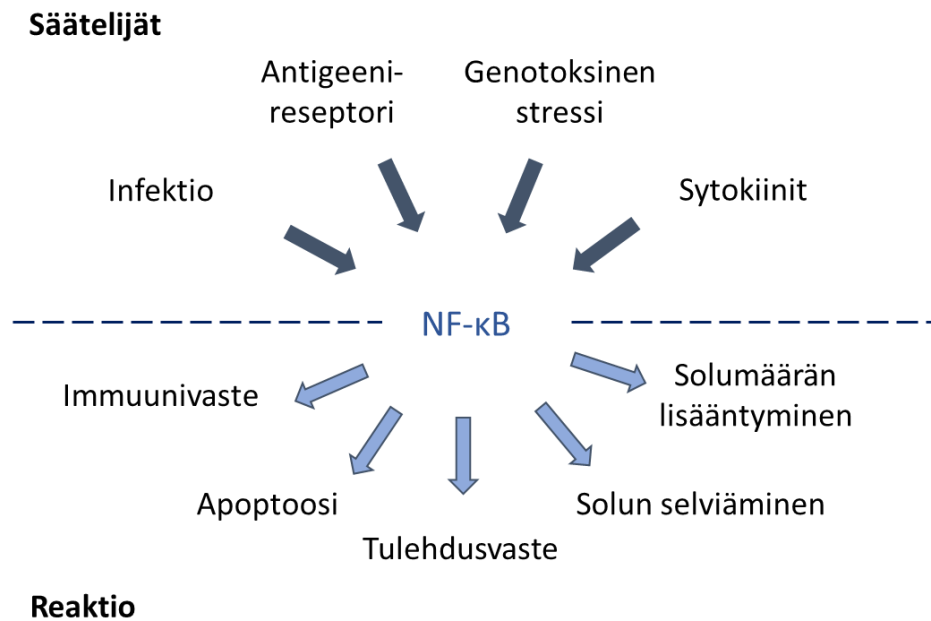
Kuva 2, Ihmisen ohut- ja paksusuoli. Kolorektaalisyöpä esiintyy suoliston taaemmassa osassa eli paksusuolella, joka on kuvattu kuvassa tummemmalla punaisella. Kolorektaalisyöpä voi esiintyä umpisuolella, koolonissa tai peräsuolen alueella. Kuva tehty BioRenderillä.

2.3 NF-κB-välitteinen immuunivaste

2.3.1 Synnynnäinen immuunivaste ja NF-κB

Synnynnäisen immuunivasteen tehtävänä on tunnistaa soluille vaarallisia signaaleja sekä erilaisia patogeenejä, jolloin organismilla on mahdollisuus puolustautua uhkia vastaan. Synnynnäinen immuunivaste vastaa välittömästi immuunivasteesta erinäisiä uhkia vastaan. Immuunivasteen solut, kuten makrofagit ja dendriittisolut, reagoivat uhkiin ja käynnistävät tulehdusviestintäreitit eli aktivoivat tulehdusvasteen säätelien erilaisten sytokiinien ja kemokiinien tuotannon. (Liu ja muut 2017.)

NF-κB (*engl. Nuclear Factor-Kappa B*) on transkriptiotekijä perhe, joka säätelee monia biologisia reaktioita. Esimerkiksi bakteeri- ja virusinfektiot, tulehdussytokiinit ja genotoksinen stressi, kuten oksidatiivinen stressi voivat aktivoida NF-κB-viestintäketjun, mikä johtaa NF-κB-viestinnän aktivoitumiseen. NF-κB-perheen koodaamilla geeneillä on tärkeä rooli muun muassa synnynnäisen ja hankitun immuunivasteen reaktioissa, tulehdusvasteessa, solujen erilaistumisessa ja solukuolemassa sekä solujen eloonjäämisessä (kuva 3). (Oeckinghaus ja Ghosh 2009.) Sen toiminta on elintärkeä osa ihmisten terveyttä ja kehon tasapainoa, mutta hallitsematon NF-κB-viestintä voi johtaa erinäisten autoimmuunisairauksien ja jopa tulehduksellisten syöpien kehittymiseen (Courtois ja Gilmore 2006). Tämä ominaisuus tekeekin NF-κB-viestintä reitistä mielenkiintoisen kohteen tulehdusta- ja syöpää hillitsevien lääkeaineiden kehitykselle (Yu ja muut 2020).



Kuva 3, NF-κB-viestinnän säätelijät ja niiden aktivoivat reaktiot soluissa. Kuvassa esitettynä tekijöitä, jotka säätelevät ja aktivoivat NF-κB-viestintää. Kuva muokattu kohteesta (Oeckinghaus ja Ghosh 2009).

2.3.2 NF-κB-välitteisen immuunivasteen säätely

NF-κB-transkriptioperhe koostuu nisäkkäillä viidestä proteiinista: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105/p50) ja NF-κB2 (p100/p52). Nämä proteiinit vuorovaikuttavat toistensa kanssa saaden aikaan erilaisten viestintäkompleksien muodostumisen. Proteiinit muodostavat erilaisia dimeerejä keskenään, joista kukin aiheuttaa erilaisen viestintä-ärsyksen soluissa. Esimerkiksi kanonisen NF-κB-viestintäreitien aktivaatiosta vastaavat RelA- sekä p50 -proteiinit (ks. 2.5.1). (Liu ja muut 2017.) NF-κB-proteiinit sisältävät Rel-homologi domeenin (engl. *Rel homology domain*, RHD), joka säätelee muun muassa DNA:han sitoutumista sekä dimeerien muodostumista. Yleensä NF-κB-proteiinit ovat soluissa epäaktiivisina dimeereinä, jotka eivät ole vielä kohdanneet aktivoivaa ärsykettä. Tällöin ne vuorovaikuttavat inhiboivien IκB-proteiinin kanssa. (Oeckinghaus ja Ghosh 2009.)

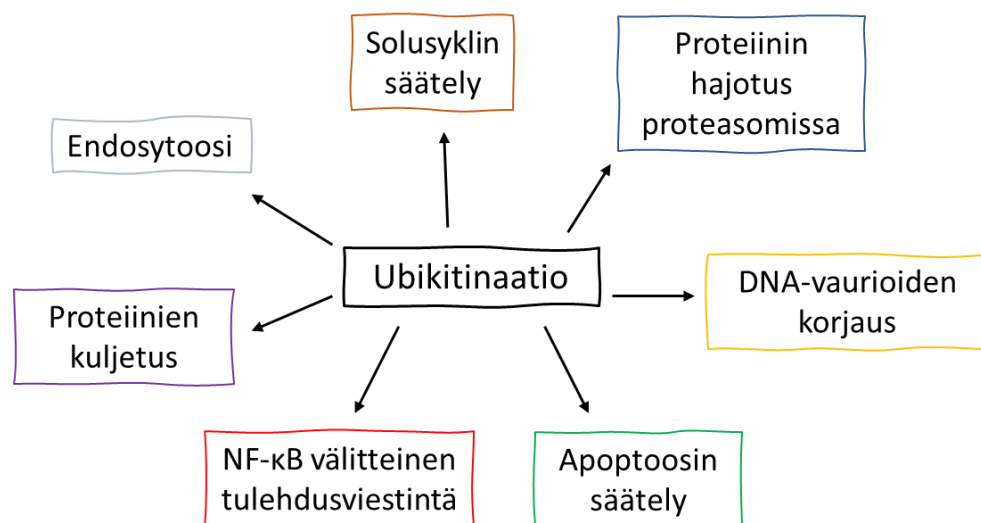
NF-κB-välitteistä immuunivastetta säädellään monilla tasoilla, koska se on tärkeä tekijä monien geenien tuotannossa. Ensisijainen keino säädellä tätä vastetta on inhiboivien IκB-proteiinien kautta. IκB-proteiinin tehtävänä on inhiboida NF-κB-viestinnän aktivaatiota. IκB-proteiinit aktivoidaan kovalenttisen modifikaation fosforylaation (engl. *phosphorylation*) avulla, jolloin IκB-proteiini kuljetetaan hajotettavaksi proteasomille. Tällöin NF-κB vapautuu ja siirtyy tumaan ja sen koodaamien geenien transkriptio

käynnistyy. Soluissa usein esiintyvät I κ B-proteiinit ovat I κ B α ja I κ B β . I κ B-proteiinien fosforylaatiosta vastaa IKK-kinaasikompleksi. Se koostuu kahdesta katalyyttisestä alayksiköstä, jotka ovat IKK α ja IKK β sekä säätelevästä alayksiköstä, joka on nimeltään NEMO (IKK γ). Fosforylaation lisäksi NF- κ B-viestintää säädellään translaation jälkeisen modifikaation, ubikitinaation, avulla. (Häcker ja Karin 2006; Schuster ja muut 2013.)

2.4 Ubikitinaatio

2.4.1 Ubikitinaatio on translaation jälkeinen modifikaatio

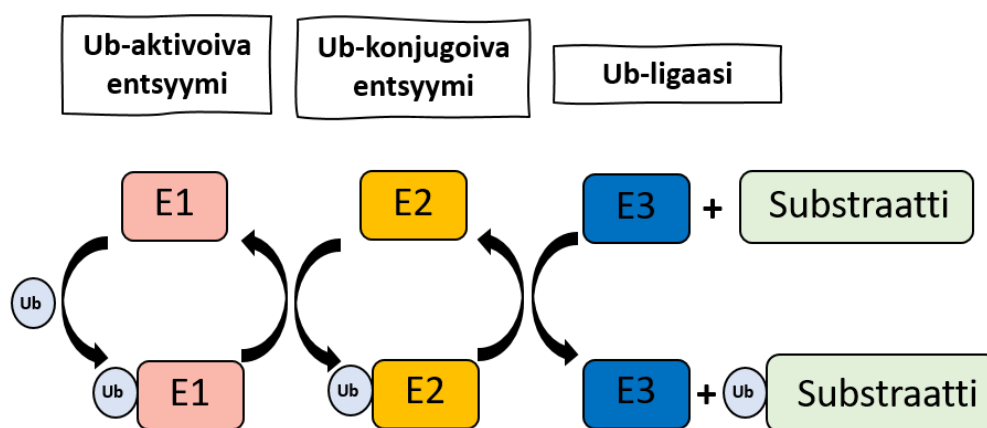
Ubikitiini on pieni (8,6 kDa) 76 aminohappoa pitkä ja samankaltaisena evoluution aikana säilynyt säätelyproteiini, jota löytyy eukaryooteilta kaikista kudoksista. Ubikitinaatiolla tarkoitetaan translaation jälkeistä modifikaatiota, jolla on rooli monissa biologisissa reaktioissa. Ubikitinaatiossa ubikitiiniproteiini liitetään kohdeproteiiniin. Yksi tunnetuimpia ja tutkituimpia ubikitinaation tehtäviä on proteiinien merkitseminen hajotettavaksi proteasomeissa. (Goldstein ja muut 1975.) Myöhemmin on havaittu, että ubikitinaatiolla on rooli monissa muissakin prosesseissa kuten esimerkiksi solusyklin säätelyssä, endosytoosissa, apoptoosin säätelyssä, proteiinien kuljetuksessa, DNA vaurioiden korjauksessa sekä NF- κ B-välitteisen tulehdusvasteen säätelyssä (kuva 4). Nykyään ubikitinaation tiedetään olevan palautuva translaation jälkeinen modifikaatio, joka ohjaa solujen toiminta hyvin tarkasti. (French ja muut 2021; Swatek ja Komander 2016.)



Kuva 4, Ubikitinaation yleisiä tehtäviä solussa. Ubikitinaatio on translaation jälkeinen modifikaatio, jolla on tunnettu rooli monissa biologisissa prosesseissa. Kuva on koottu julkaisun pohjalta: (Komander ja Rape 2012.)

2.4.2 Ubikitiinin liittäminen kohdeproteiiniin

Ubikitinaatio sekä ubikitiinin poistaminen (*engl. deubiquitination*) kohdeproteiinista ovat entsyymaattisia prosesseja. Ubikitiinin liittäminen kohdeproteiiniin on kolmivaiheinen tapahtuma, jossa hyödynnetään kolmea entsyymiä: E1, E2 ja E3. E1 on ubikitiinin aktivoiva entsyymi, jonka tehtävänä on yhdessä ATP:n kanssa aktivoida ubikitiinin C-terminaalinen osa. E2 on ubikitiinin konjugoiva entsyymi, johon ubikitiiniproteiini kovalenttisesti sitoutuu ja tämä entsyymi siirtää ubikitiinin E3-entsyymille. Viimeisessä vaiheessa E3 eli ubikitiiniligaasi liittää ubikitiinin kohdeproteiinin aminohapporyhmän lysiiniin (Kuva 5). (Hershko ja muut 2000.)



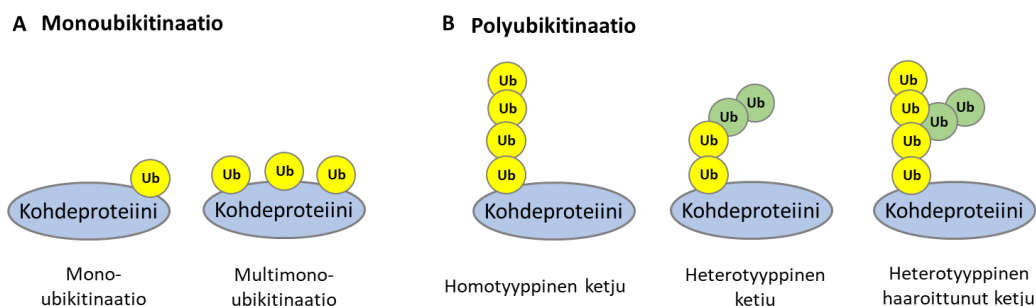
Kuva 5, Ubikitiinin liittäminen kohdeproteiiniin. Ubikitinaatio on prosessi, jossa ubikitiini liitetään kohdeproteiiniin. Prosessissa tarvitaan kolmea entsyymiä E1, E2 ja E3. Kuva muokattu kohteesta: (Swatek ja Komander 2016.)

2.4.3 Erilaiset ubikitiiniketjut

Ubikitiini sisältää seitsemän lysiini (Lys) aminohappotähdettä (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63) ja N-terminaalisen metioniini-aminohappotähteen (Met1). Ubikitiiniproteiinit muodostavat ketjun liittyessään toinen toisiinsa ja useissa tapauksessa isopeptidisidos muodostuu ubikitiinin sisäisen ϵ -aminoryhmän lysiinin ja vastaanottavan ubikitiinin välille. Se voi myös muodostua N-terminaalisen α -aminoryhmän metioniinin ja vastaanottavan ubikitiinin välille, jolloin kyseessä on metioniini 1-sidottu ubikitinaatio (Met1-ubikitinaatio). (Komander ja muut 2009; Komander ja Rape 2012; Swatek ja Komander 2016; Tenno ja muut 2004.)

Ubikitiiniproteiini voi liittyä kohdeproteiinin monin eri tavoin. Jos vain yksi ubikitiini liittyy kohdeproteiiniin, puhutaan monoubikitinaatiosta (*engl. mono ubiquitination*). Joskus kohdeproteiiniin voidaan lisätä monta yksittäistä ubikitiiniproteiinia, jolloin kyseessä on multimonoubikitinaatio (*engl. multimonoubiquitination*) (kuva 6, A). Jos ubikitiiniproteiinit liittyvät toinen toisiinsa muodostaen ketjun, eli ubikitiiniproteiini ubikitinoidaan, puhutaan polyubikitinaatiosta (*engl. polyubiquitination*). Ubikitiiniketjun koostuessa ainoastaan yhdestä erilaisesta ubikitinaatiotyypistä, sitä kutsutaan homotyyppiseksi ketjuksi. Joskus ketju voi kuitenkin koostua myös erilaisista ubikitiinityypeistä, jolloin ketju on heterotyyppinen. Ketjut eivät myöskään aina ole lineaarisia, vaan myös haaroittuvia ubikitiiniketjuja havaitaan soluissa (Kuva 6, B). (French ja muut 2021; Komander ja Rape 2012; Swatek ja Komander 2016)

Aminohappotähde, johon ubikitiini on kiinnittynyt, määrittelee ketjun rakenteen ja sen tehtävän soluissa. Erilaisilla ubikitiiniketjuilla (Ub-ketju) on soluissa erilaisia tehtäviä (kuva 6, C). Esimerkiksi Lys48-, Lys29- ja Lys11-Ub-ketjujen rooli on viedä proteiini hajotukseen proteasomiin. Lys63-Ub-ketjun tehtävä taas on toimia DNA-korjauksessa ja soluviestinnässä, mutta sillä ei ole proteiinien hajotukseen johtavaa aktiivisuutta. Sillä on myös tärkeä tehtävä immuunivasteen säätelyssä. Lys6-Ub toimii osana DNA-korjausmekanismia ja Lys27-Ub osana synnynnäisen vastustuskyvyn toimintaa. Solujen kyky tunnistaa erilaiset ubikitiiniketjun rakenteet mahdollistavat erilaisten monimutkaisten viestintäkompleksien muodostamisen, mikä johtaa solun homeostaasin ylläpitämiseen ja solun kohtalon määrittymiseen. Met1-Ub-ketjujen tiedetään osallistuvan NF- κ B-välitteisen immuunivasteen säätelyyn sekä solukuoleman säätelyyn. (French ja muut 2021; Hershko ja muut 2000; Komander ja Rape 2012.)



C Erilaisten ubikitiiniketjujen tehtävät soluissa

Lys6	Lys11	Lys27	Lys29	Lys33	Lys48	Lys63	Met1
DNA-korjausmekanismi	Proteiinien hajotus proteasomissa	Synnynnäisen immuunivasteen reaktiot	Solusyklin säätely, proteiinien hajotus proteasomissa	Proteiinien kuljetus	Proteiinien hajotus proteasomissa	Immuunivasteen viestintä, NF-κB-välitteinen tulehdusviestintä	NF-κB-välitteinen tulehdusviestintä, solukuolema

Kuva 6, Erilaiset ubikitiiniketjut ja erilaisten ubikitiiniketjujen tehtäviä soluissa. A) Monoubikitinaation erilaiset tyypit. B) Polyubikitinaation erilaiset tyypit. C) Eri aminohappotähteeseen kiinnittyneen ubikitiiniketjun tehtävät soluissa. Kuva on koottu julkaisujen pohjalta: (French ja muut 2021; Hershko ja muut 2000; Komander ja Rape 2012).

Ubikitiiniketjut tunnustetaan proteiinien avulla, jotka sisältävät ubikitiinisitoja-alueita (*engl. ubiquitin-binding-domains, UBDs*). Tämän kohdeproteiinin ja ubikitiinin välisen kosketuspinnan avulla pystytään tunnistamaan kyseinen ubikitinaatiotyyppi sekä lukemaan ubikitiiniketjun viesti, mikä johtaa solussa viestin mukaiseen vasteeseen ja signaali välitetään eteenpäin viestintäreitillä. (Komander ja Rape 2012.) Yksi tärkeimmistä ja karakterisoiduista ubikitiinisitoja-alueen sisältävästä proteiineista on IKK-kompleksin NEMO-alayksikkö (Jahan ja muut 2021). Ubikitiinin-sitoja-alueilla on tärkeä tehtävä muun muassa ubikitiinisidoksen muodostumisen säätelyssä sekä ubikitiini-alayksikön poistamisesta kohdeproteiinista. Ubikitinaatio on palautuva reaktio, jolloin se voidaan myös poistaa kohdeproteiinista (*engl. deubiquitination*) deubikitinaatioentsyymien eli DUB-entsyymien avulla (*engl. deubiquitinating enzymes*). DUB:sit ovat hydrolaasientsyymejä ja ne ovat tehokkaita poistamaan ubikitiiniketjut kohdeproteiineista. Niiden tehtävä on E3-ligaasien tavoin säädellä proteiinien ubikitinaatiota ja tällä tavoin välittää soluissa erilaisia viestejä. (Komander ja Rape 2012.)

2.4.4 Met1-ubikitinaatio eli lineaarinen ubikitinaatio

Met1-Ub-sidos eroaa muista ubikitinaatiotyypeistä, siten ettei se liity kohdeubikitiinin lysiini-aminohappotähteeseen. Peptidisidos muodostuu ubikitiinin C-terminaalisen lysiinin ja kohdeubikitiinin N-terminaalisen metioniinin välille. Met1-ubikitinaatiota kutsutaan myös lineaariseksi ubikitinaatioksi, koska sen muodostuessa ubikitiiniproteiinit liittyvät toisiinsa muodostaen lineaarisen ketjun. Met1-Ub-sidos on erittäin tärkeä synnynnäiselle immuunivasteelle ja varsinkin NF- κ B-viestinnälle. Se säätelee esimerkiksi tulehdusvastetta edeltävien sytokiinien, kuten IL-6 ja Bcl-2, tuotantoa immuunivasteen soluissa, jotka ovat tärkeitä tulehdusvasteen käynnistymiselle. Met1-Ub-ketju toimii niin sanottuna tikapuuproteiinina soluviestinnässä edesauttaen viestintäreitin aktivoitumisen signaalin kulkeutumisen eteenpäin (Rittinger ja Ikeda 2017; Sasaki ja Iwai 2015)

2.4.5 Met1-ubikitinaation kokoamiskoneisto LUBAC

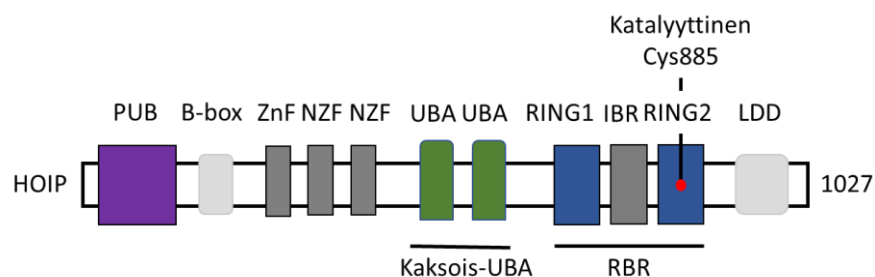
Met1-Ub-sidoksen muodostaa spesifinen lineaarisen ubikitiini sidoksen kokoamiskoneisto. Kokoamiskoneistoa kutsutaan LUBAC-kompleksiksi (*engl. linear ubiquitin chain assembly complex*). Tällä hetkellä LUBAC on ainut tunnettu E3-ligaasi selkärankaisilla, joka pystyy kokoamaan Met1-Ub-sidoksen. (Gerlach ja muut 2011; Ikeda ja muut 2011; Kirisako ja muut 2006; Tokunaga ja muut 2011.) LUBAC koostuu kolmesta komponentista, jotka ovat HOIP (*engl. HOIL-1L interacting protein*), HOIL-1 (*engl. heme-oxidized IRP2 ligase 1L*) ja SHARPIN (*engl. SHANK-associated RH domain-interacting protein*) (Fujita ja muut 2018; Rodriguez Carvajal ja muut 2021). Banaanikärpäsellä eli *Drosophila melanogaster*illa vastaava lineaarinen ubikitiiniligaasi on LUBEL (Aalto ja muut, 2018). LUBAC-kompleksin alayksikkö HOIP ja LUBEL sisältävät alueen, joka vastaa Met1-Ub-sidoksen muodostumisesta (A. L. Aalto ja muut 2019; Kirisako ja muut 2006; Yamanaka ja muut 2003).

2.4.6 HOIP-alayksikön domeenirakenne

HOIP ja HOIL-1 kuuluvat RBR-ubikitiiniligaasiperheeseen (*engl. RING-in-between-RING*), koska niillä on RBR-domeenirakenne. RBR-domeenirakenne koostuu RING1- ja RING2-domeenista (*engl. really interesting new gene*, RING1 ja RING2) sekä niiden väliin jäävästä IBR-alueesta. HOIP-alayksikön RING2-domeenissa sijaitsee HOIP-alayksikön

katalyyttinen kysteini (Cys885). Kuitenkin ainoastaan HOIP-proteiinilla on kyky katalysoida Met1-Ub-sidoksen liittämistä kohdeproteiiniin, mutta se vaatii vuorovaikutuksen HOIL-1 ja SHARPIN-alayksiköiden kanssa. HOIP-alayksikön kyky katalysoida reaktiota perustuu sen katalyyttiseen kysteiniin sekä geenin C-terminaaliossa olevaan LDD-domeeniin (engl. *linear ubiquitin chain determining domain*, LDD) väliseen vuorovaikutukseen. (kuva 7) (Kirisako ja muut 2006; Smit ja muut 2012.)

RBR-alueen ja LDD-domeenin lisäksi HOIP-alayksikössä on PUB-domeeni, sinkkisormidomeenit (engl. *zinc finger*, ZnF ja NZF) ja kaksois-UBA-alue (engl. *ubiquitin-associated*). PUB-domeeni toimii HOIP-alayksikön katalyyttisen aktiivisuuden inhibitiivissa. Kaksois-UBA alueen tehtävänä on vuorovaikuttaa HOIL-1 ja SHARPIN-alayksiköiden kanssa. HOIL-1 ja SHARPIN sitoutuvat HOIP-alayksikön UBA-alueeseen, mikä mahdollistaa konformaatiomuutoksen ja HOIP-alayksikön aktivoitumisen. Reaktio mahdollistaa HOIP-proteiinin kyvyn katalysoida Met1-Ub-ketjun liittämisen kohdeproteiiniin. (Fiil ja Gyrd-Hansen 2021; Fujita ja muut 2018; Gerlach ja muut 2011; Liu ja muut 2017; Smit ja muut 2012.)



Kuva 7, LUBAC-kompleksin katalyyttisen HOIP-alayksikön domeenirakenne. HOIP sisältää PUB-domeenin, B-box alueen, ja sinkkisormialueen, kaksi UBA-domeenia, RBR-alueen ja LDD-domeenin. RBR-alue koostuu RING1- ja RING2-domeeneista sekä IBR-alueesta. RING2-domeenissa sijaitsee HOIP-proteiinin katalyyttinen kysteini-aminohappo. Kuva muokattu kohteesta: (Fiil ja Gyrd-Hansen 2021.)

2.4.7 DUB-entsyymit säätelevät Met1-Ub-tasoa soluissa

LUBAC-kompleksin aikaansaama Met1-Ub-taso soluissa on tiukasti säädelty DUB-entsyymeillä ja niillä on tärkeä tehtävä ubikitiinisidoksen muodostumisen säätelyssä ja ubikitiiniketjun poistamisesta kohdeproteiinista. CYLD ja OTULIN ovat DUB-entsyymejä, jotka pystyvät poistamaan Met1-Ub-sidoksen kohdeproteiinista. OTULIN on Met1-Ub

spesifinen DUB-entsyymi ja se poistaa ainoastaan Met1-Ub-ketjuja soluissa. CYLD puolestaan pystyy poistamaan sekä Met1-Ub-sidoksia kuin myös Lys63-Ub-sidoksia kohdeproteiineista. Molemmat DUB-entsyymit muodostavat kompleksin LUBAC-kompleksin kanssa. Ne ovat vuorovaikutuksessa HOIP-alayksikön kanssa muodostaen LUBAC–DUB-kompleksin. HOIP-alayksikön PUB-domeeni vastaa vuorovaikutuksesta, joka johtaa ubikitiiniketjun poistamiseen kohdeproteiinista (Damgaard ja muut 2016; Fiil ja Gyrd-Hansen 2021.)

2.4.8 Met1-Ub-ketjut ovat tärkeitä elimistön fysiologiselle toiminnalle

Met1-Ub-kokoamiskoneistoa ja sen tehtäviä soluissa on tutkittu paljon sen jälkeen, kun LUBAC-kompleksin komponentit on tunnistettu. Tutkimuksessa on käytetty apuna lukuisia hiirimalleja. Ihmisen ituradan mutaatioita, jotka vaikuttavat Met1-Ub kokoamiskoneistoon on pyritty tunnistamaan ja se on tuottanut paljon tärkeää tietoa siitä, miten Met1-Ub vaikuttaa fysiologiseen kehitykseen. (Fiil ja Gyrd-Hansen 2021.) Esimerkiksi ituradan mutaatiot OTULIN:ia koodaavissa geneissä aiheuttaa jo aikaisessa vaiheessa tilan, jossa tulehdus on muuttunut itseään ruokkivaksi. Se aiheuttaa muun muassa toistuvaa kuumetta, ripulia ja niveltulehduksia. (Damgaard ja muut 2016.) Lisäksi on huomattu, että hiirimalleissa puute HOIP, HOIL-1 tai OTULIN:ssa johtaa alkion kuolemaan jo ennen syntymää, koska hiiren elimistön tasapaino tulehdusvasteen säätelyn ja solukuoleman välillä ei ole tasapainossa (Courtois ja Gilmore 2006; Peltzer ja muut 2018).

2.5. Met1-Ub synnynnäisessä immuuniviestinnässä

2.5.1 Kanoninen NF-κB-viestintää aktivoi NF-κB-kohdegeenien tuotannon

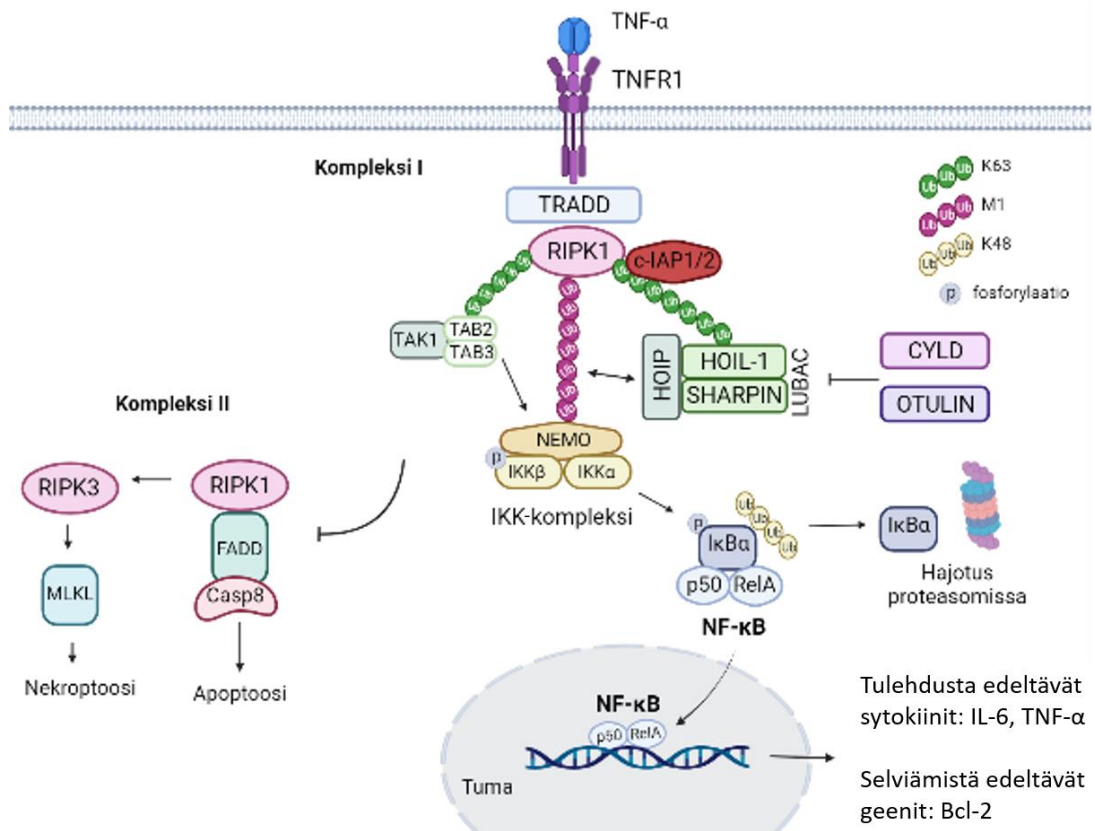
Kanoninen NF-κB-viestintäreitti on yksi reiteistä, joka aktivoi NF-κB-kohdegeenien aktivaatiota. Kanonisessa reitissä sytokiini, tuumorinekroositekijä-alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF-α), sitoutuu TNF-reseptori 1:een (TNFR1) saaden aikaan kaksi mahdollista lopputulemaa: kompleksin I tai kompleksin II muodostumisen. Kompleksi I johtaa NF-κB-aktivaatioon ja tulehdusta edeltävien sytokiinien tuotantoon ja kompleksi II saa aikaan solujen kuoleman apoptoosin tai nekroptoosin kautta. Viestintäreitin kumpikin lopputulema on soluille erittäin tärkeä, koska kumpikin ylläpitää kehossa tasapainoa. Tasapainon horjuminen voi johtaa moniin ongelmiin, esimerkiksi

tulehduksen aiheuttaman syövän kehittymiseen. Lisäksi kumpikin lopputulema on tiukasti säädelty Met1-ubikitinaation avulla. (Wertz ja Dixit 2010; Yu ja muut 2020.)

Kompleksin I muodostuminen alkaa, kun TNF- α sitoutuu TNFR1-reseptoriin, joka saa aikaan viestintäkompleksin muodostumisen. Kompleksi muodostuu, kun adapteriproteiini TRADD (engl. *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain*) ja RIP1-kinaasi (engl. *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*, RIPK1) vuorovaikuttavat keskenään. Kompleksiin kuuluu lisäksi Ub-ligaasit cIAP1 ja cIAP2 (engl. *cellular inhibitor of apoptosis proteins*, cIAP1/2). Tämän kompleksin muodostuminen saa aikaan Lys63-Ub-ketjujen muodostumisen, mikä johtaa LUBAC-kompleksin liittymisen kompleksiin. LUBAC kokoaa sille spesifiset Met1-Ub-ketjut, joka yhdessä Lys63-Ub-ketjujen kanssa aktivoi ja värvää TAB2/3-kinaasikompleksin sekä IKK-kompleksin. IKK-kompleksi koostuu säätelevästä NEMO-alayksiköstä sekä IKK α ja IKK β -katalyyttisistä alayksiköistä. TAK1-kinaasin Ub-kiinnittymisproteiinit ovat TAB2 ja TAB3 ja IKK-kompleksilla se on NEMO. Kun TAK1 ja IKK β tuodaan yhteen Lys63- ja Met1-Ub-ketjujen avulla, TAK1 fosforyloi IKK β -alayksikön. Tämä johtaa I κ B α :n fosforylaatioon sekä Lys48-Ub-ketjujen värväämiseen, jolloin I κ B α kuljetetaan proteasomille hajotettavaksi. Tällöin NF- κ B aktivoituu ja se kuljetetaan tumaan, jossa kohdegeenien transkriptio alkaa. Kohdegeenejä ovat muun muassa tulehdusta edistävät sytokiinit IL-6, TNF- α ja IL-1, solun selviytymistä edistävät geenit, kuten Bcl-2 ja c-FLIP ja NF- κ B-viestintää inhiboivat proteiinit, kuten I κ B α (kuva 8, kompleksi I). (Yu ja muut 2020.)

2.5.2 Met1-Ub säätelee tiukasti solukuolemaa

NF- κ B-aktivaation lisäksi Met1-Ub-ketjujen tiedetään säätelevän solukuolemaa. Kanoninen NF- κ B-viestintä johtaa kompleksin II muodostumiseen, jos LUBAC ei rakenna Met1-Ub-ketjua, joka sitoutuisi RIP1-kinaasiin. Tällöin solukuolema aktivoituu joko apoptoosin tai nekroptoosin kautta. Apoptoosi aktivoituu, jos RIPK1 värvää FADD:in (engl. *Fas-associated protein with death domain*). Tällöin ne yhdessä värväävät proteolyyttisen entsyymin, jonka nimi on kaspasi 8 (engl. *caspase8*). Nekroptoosi taas aktivoituu, jos RIP1-kinaasi aktivoi RIP3-kinaasin (RIPK3), joka vuorostaan värvää pseudokinaasi MLKL:n (engl. *mixed lineage kinase domain-like*) (kuva 8, kompleksi II). (Chen ja muut 2019; Peltzer ja muut 2018.)



Kuva 8, Kanoninen NF-κB-viestintä. Kanoninen NF-κB-viestintä aktivoi kompleksin I tai kompleksin II muodostumisen. TNF-α sitoutuu TNFR1-reseptoriin, mikä saa aikaan TRADD, RIPK1 ja c-IAP1/2 värväämisen. Tällöin LUBAC rakentaa Met1-Ub-ketjun, mikä yhdessä Lys63-Ub-ketjun kanssa aktivoi TAB2/3-kinaasikompleksin ja IKK-kompleksin. IKKβ fosforyloi IκBα:n, jolloin NF-κB vapautuu ja siirtyy tumaan. Siellä NF-κB aktivoi kohdegeenien tuotannon. Jos LUBAC-kompleksia ei värvätä kompleksi II aktivoi joko apoptoosin tai nekroptoosin. Kuva on tehty Biorenderillä ja se on muokattu kohteesta: (Fiil ja Gyrd-Hansen 2021).

2.6. Met1-Ub kokoamiskoneiston muokkaaminen tutkimuksen keinoin

2.6.1 Met1-Ub poistaminen kohdeproteiineista on elintärkeää elimistön tasapainon kannalta

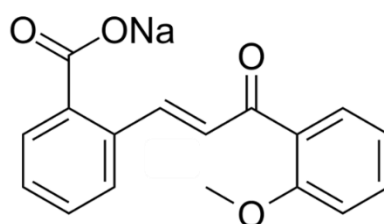
Soluissa deubikitinaatio-entsyymit toimivat tärkeässä tehtävässä purkaessaan ubikitiniiketjuja proteiineista. Niiden toiminta on kehon tasapainon kannalta elintärkeää, sillä ne estävät alituisen NF-κB-kohdegeenien transkription ja näin ollen NF-κB-aktivaation, joka voisi johtaa esimerkiksi syövän kehittymiseen. (Harhaj ja Dixit 2011.)

Tulehduksen aiheuttaman syövän tutkimisen kannalta on tärkeä tutkia, sitä miten ubikitiniiketju voidaan poistaa proteiineista ja näin ollen keinotekoisesti keskeyttää viestintäreitin eteneminen. (Damgaard ja muut 2016; Harhaj ja Dixit 2011.)

Tutkimuksessa voidaan käyttää esimerkiksi UbiCRest-menetelmää. Tässä menetelmässä kohdeproteiineja voidaan käsitellä erilaisilla ubikitiniiketjulle spesifisillä DUB-entsyymeillä. Menetelmän avulla voidaan tutkia esimerkiksi millä ubikitinaatiotyypillä kohdeproteiini on ubikitinoitu. UbiCRest-menetelmä perustuu listaan kaupallisista DUB-

entsyymeistä ja sen avulla voidaan helposti ja nopeasti tutkia kohdeproteiinin ubiquitinaatiota. (Hospenthal ja muut 2015.)

2.6.2 HOIP-inhibiittori HOIPIN-1 estää Met1-Ub-ketjun muodostumisen LUBAC-inhibiittorien avulla on mahdollista tutkia LUBAC-kompleksin toimintaa sekä NF- κ B-viestinnän aktivoitumista. HOIPIN-1 on HOIP-inhibiittori, joka konjugoituu HOIP-alayksikön RING2-domaanin aktiivisen osan (Cys885) kanssa ja häiritsee RING-HECT-hybridireaktiota (kuva 9). Tämä johtaa siihen, ettei LUBAC-kompleksi pysty liittämään Met1-Ub-ketjua kohdeproteiiniin (Oikawa ja muut 2020). HOIPIN-1 vaikuttaa ainoastaan LUBAC-kompleksin (E3 ligaasi) toimintaan ja sen ei ole huomattu vähentävän E1 ja E2 entsyymien toimintaa tai muun tyyppisten E3 ubiquitiiniligaasien toimintaa. HOIPIN-inhibiittorien tiedetään pystyvän solutasolla vähentämään kanonisen NF- κ B-viestintäreitien toimintaa, mutta niillä ei ole vähentävää vaikutusta esimerkiksi B-reseptori välitteiseen NF- κ B-viestintään. (Oikawa ja muut 2020).



Kuva 9, HOIPIN-1-inhibiittorin rakennekaava

2.7. Syövän tutkiminen laboratoriossa

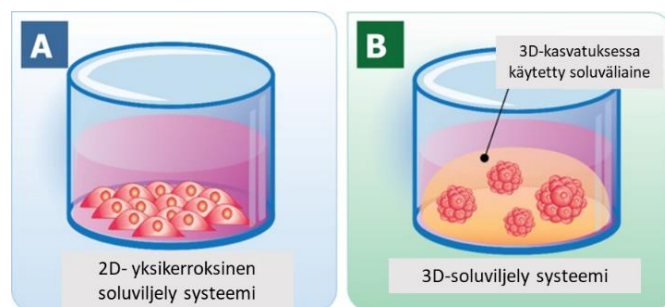
2.7.1 2D- ja 3D-soluviljely syöpätutkimuksessa

Syöpätutkimuksessa on jo pitkään käytetty *in-vitro*-menetelmiä syöpäsolujen kasvattamiseen. 2D-mallinnoksia käytetään tutkimuksessa edelleen laajasti, koska kasvatusten ylläpitäminen on edullista ja koeasetelmat ovat yksinkertaisia. Solut kasvavat 2D-malleissa yhdessä kerroksessa vierekkäin, jolloin kasvatusolosuhteet ovat kaikille soluille samankaltaiset (kuva 10, A). Solut kasvavat ja kehittyvät saman tahtisesti sekä ne ovat keskenään samankaltaisia. 2D-mallien huonona puolena pidetään syöpäsolujen kasvuympäristön eroa niiden luonnolliseen kasvuympäristöön. Solujen välinen tai solujen ulkopuolisen väliaineen (*engl. extra cellular matrix, ECM*) välinen

viestintä ei ole samanlaista kuin se olisi niiden luonnollisessa ympäristössä. (Duval ja muut 2017; Nunes ja muut 2019.)

2D-mallien rinnalle on pyritty kehittämään 3D-malleja, jotka muistuttavat enemmän syöpäsolujen *in-vivo*-kasvu ympäristöä. 3D-malleissa syöpäsolut kasvavat solujen ulkopuolisessa väliaineessa, esimerkiksi matrigeelissä (Shin ja muut 2013), jolloin niiden lisääntyminen, erilaistuminen, selviäminen ja geenien ilmeneminen jäljittelee *in-vivo* syöpäsolujen kasvua. 3D-malleissa syöpäsolut pystyvät kehittämään mikroympäristön, jolloin solujen välinen vuorovaikutus sekä solujen ja ympäröivän soluväliaineen välinen vuorovaikutus jäljittelee kasvua esimerkiksi ihmisen kehossa. 3D-malliessa solut muodostavat organoideja eli monista soluista muodostuvia rykelmiä (kuva 10, B). Rykelmät muodostuvat erilaistuneista soluista, joilla on omat tehtävänsä, niin kuin aidossakin kasvaimessa on erilaistuneita soluja. Esimerkiksi organoidien sisäosissa solut saavat vähemmän ravintoaineita ympäröivästä soluväliaineesta, kuin ulkopinnalla olevat solut, jolloin ne jakaantuvat vähemmän. (Nunes ja muut 2019.)

3D-mallit antavat totuudenmukaisemman vasteen lääkeaineille kuin 2D-mallit. Prekliiniset syövän tutkimusmallit ovat tärkeitä syövän perusbiologian ymmärtämiseksi, kuten myös lääkekehitykselle. 3D-mallit ovat osoittautuneet edistyksellisiksi *in-vitro*-alustoiksi esimerkiksi lääketutkimukselle eri lääkekohteiden tunnistamisessa ja sairauksien mallintamisessa sekä myös kantasolujen tutkimukselle. (Duval ja muut 2017.)



Kuva 10, Kaavakuva 2D- ja 3D-soluviljelmästä. A) 2D-soluviljely systeemi, jossa solut kasvavat yhdessä kerroksessa vieretysten. B) 3D-soluviljely systeemi, jossa solut kasvavat soluväliaineessa organoideina eli moni soluista koostuvina rykelminä. Kuva muokattu kohteesta: (Nunes ja muut 2019.)

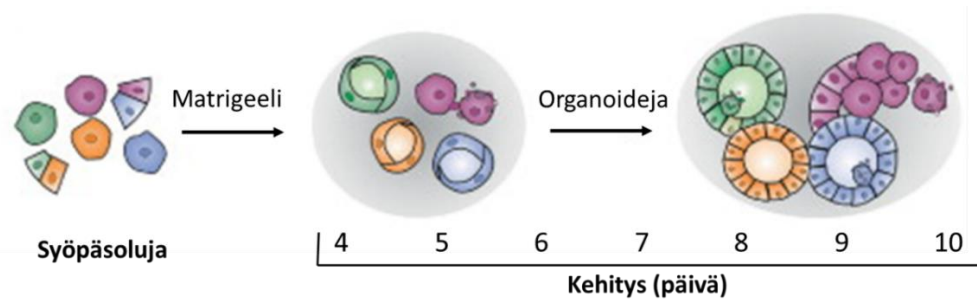
2.7.2 Matrigeelin käyttö syöpätutkimuksessa

Matrigeeli on soluista ja kudoksista peräisin oleva kasvupohja, jonka tehtävänä on 3D-syöpäsolumalliessa toimia solujen ulkopuolisena väliaineena (ECM). Se on peräisin hiiren Engelbreth-HOLM-Swarm (EHS) -sarkooma soluista, joissa esiintyy hyvin paljon laminiiniä, kollageeniä sekä muita ECM:n proteiineja. Matrigeelin tehtävänä on jäljitellä tyvimembraania. (Nunes ja muut 2019.)

Niin sanotussa matrigeeli ”sandwich”-tekniikassa solut kasvatetaan kahden matrigeelistä muodostuvan kerroksen väliin, jotka vastaavat soluväliainetta oikeassa kasvaimessa. Solut saavat kasvuun elintärkeitä aineita sekä matrigeelistä että mediumista, jota lisätään soluille matrigeelikerrosten päälle. Matrigeeli sisältää jo itsessään monia soluille tarpeellisia kasvutekijöitä, jolloin se on oivallinen kasvualusta soluille. Kuitenkin sen käyttöön liittyy myös ongelmia, esimerkiksi eri matrigeeli erien välillä esiintyy jonkin verran vaihtelua kasvutekijöiden määrissä, koska matrigeeli on eläinperäinen tuote. Tämän vuoksi tehdyissä kokeissa tulisi käyttää samasta erästä peräisin olevaa matrigeeliä, jotta voidaan varmistua kaikkien solujen saavan saman verran samoja kasvutekijöitä. (Corning, matrigel-matrix.)

2.7.3 Haluttu kasvukehitys sekä -nopeus 3D-syöpäsolumalleissa

3D-syöpäsolumallilla pyritään havainnollistamaan syövän kehittyminen laboratoriossa, kuten se tapahtuisi oikeastikin esimerkiksi ihmisen elimistössä (kuva 11). Kohdassa 2.1 kerrottiin syövän kehityksen eri vaiheista ihmisen suolistossa. 3D-mallilla pyritään matkimaan tilannetta, jossa yksittäisestä solusta, joissa on tapahtunut geneettinen muutos (syöpäsolu), muodostuu monisolainen syöpäkasvain, joka pahimmassa tapauksessa voi muodostaa pitkän elimistöä leviäviä etäpesäkeitä. (Nunes ja muut 2019.) Keräämällä laboratoriossa kasvatetut 3D-organoidit, on mahdollista tutkia syövän kehityksen vaiheita ja esimerkiksi tulehdusviestintää organoideissa. Saatua tietoa voidaan myöhemmin käyttää esimerkiksi lääkekehitykseen ja muihin käyttötarkoituksiin. (Sato ja Clevers 2013.)



Kuva 11, Laboratoriossa käytettävän 3D-syöpäsolumallin kehitys vaiheittain. Laboratoriossa voidaan jäljitellä syövän kehitystä 3D-syöpäsolumalleilla. 10 päivän aikana yksittäisistä syöpäsolusta kasvaa monisoluisia syöpäorganoideja. Kuva muokattu kohteesta: (Sachs ja Clevers 2014).

3. Tutkimuksen tavoite ja tarkoitus

Aikaisemmissa alustavissa tutkimuksissa on nähty, että Met1-Ub-tasot nousevat ihmisen eturauhasensyöpäsoluista (PC3) koostuvista organoideissa syövän kehityksen aikana. Pro gradu -tutkimuksessani haluttiin selvittää käyttäytyvätkö kolorektaalisyöpäsolut samalla tavalla 3D-syöpäsolumalleissa, kuin eturauhasensyöpäsolut. Lisäksi haluttiin tutkia Met1-ubikitinaation roolia kolorektaalisyövän kehittämisessä.

Projektissani valmistin ihmisen paksusuolen adenokarsinoomasoluista (Caco2) 3D-syöpäsolumalleissa organoideja eli monista soluista koostuvia organoideja. Työssäni oli kaksi hypoteesia. Ensimmäisen hypoteesin mukaan Met1-Ub-tasot nousevat 3D-syöpäsolumalleissa kolorektaalisyövän kehityksen aikana, mikä johtaisi epänormaalien NF- κ B-viestintään, tulehdustilan lisääntymiseen sekä tulehduksen vahvistaman syövän muodostumiseen. Toisen hypoteesin mukaan estämällä Met1-ubikitinaation kokoamiskoneiston, LUBAC-kompleksin, toimintaa voisimme vähentää Met1-Ub-tasoa ja näin ollen estää tai vähentää NF- κ B-viestinnän käynnistymistä sekä kolorektaalisyövän kehittymistä 3D-syöpäsolumalleissa.

Ensimmäisen hypoteesin vahvistamiseksi työni tavoitteena oli optimoida 3D-syöpäsolumalleissa käytetty solumäärä, jotta saavutettaisiin tarpeeksi hidas ja hallittu organoidien muodostuminen. Lisäksi haluttiin määrittää Met1-Ub-tasoa soluissa ja havaita mahdolliset muutokset kolorektaalisyövän kehityksen eri vaiheissa. Toisen hypoteesin vahvistamiseksi optimoitiin Met1-ubikitinaation kokoamiskoneistolle spesifisen inhibiittorin toimintaa. Tavoitteena oli testata inhibiittorin kykyä vähentää tai estää Met1-Ub-sidoksen muodostuminen. Löytäkseni parhaiten toimivan tavan vaikuttaa kolorektaalisyövän kehittämiseen kokeilin jatkuvaa sekä lyhyempää HOIPIN-1-käsittelyä. Näiden tavoitteiden tutkimiseen käytin Western Blot- ja reaaliaikaista kvantitatiivista PCR-menetelmää. Lisäksi seurasin 3D-syöpäsoluorganoidien kehittymistä faasikontrastikuvien avulla.

4. Materiaalit ja menetelmät

4.1 Solulinja, kasvatusolosuhteet ja 3D-syöpäsolumallit

4.1.1 Solulinja ja kasvatusolosuhteet

Ihmisen paksusuolen adenokarsinooma soluja, Caco2, (169, DSMZ, Leipzig, Germany, ATCC) kasvatettiin + 37 °C:ssa ja 5 % CO₂ konsentraatiossa. Trypsiini-EDTA-liuosta (0,25 %) (Biowest) käytettiin irrottamaan solut ja solujen pesuun käytettiin fosfaattipuskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS tabletti, Medicago, engl. *phosphate buffered saline*, PBS). Caco2-soluja kasvatettiin DMEM/F-12 mediumissa (Thermo Fisher Scientific, engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12*, Gibco). Medium sisälsi 10 % naudan sikiön seerumia (Gibco, Thermo Fisher Scientific, engl. *fetal bovine serum*, FBS), 5 % penisiliini-streptomysiiniä (Sigma) ja 5 % L-glutamiinia (Sigma). Solut kasvatettiin T-150 soluviljelypulloissa noin 90 % konfluenssiin.

4.1.2 3D-syöpäsolumallien kasvatus

3D-syöpäsolumallit valmistettiin matrigelistä. Solut istutetaan matrigelikerrosten väliin yksittäisinä soluina. (Shin ja muut 2013). Yksittäisistä soluista kasvoi syövän kehityksen päivien 4–6 aikana monisoluisia organoideja. Kehityksen päivinä 7–9 organoidit erilaistuivat ja muodostivat luumenrakenteita, jotka muistuttavat kananmunan muotoa. (Sachs ja Clevers 2014; Sato ja Clevers 2013.)

3D-kasvatukseen käytettiin Caco2-soluja, joiden konfluenssi oli 90 %. Syöpäsolumalleja kasvatettiin 12-kuoppalevyllä ja jokaiseen kuoppaan lisättiin 20 000 Caco2-solua. Syöpäsolumäärän optimoinnissa lisättiin 5 000 solua/48-kuoppalevyn kuoppa. 12-kuoppalevyn kuopat pinnoitettiin 150 µl:lla 50 % matrigeliä (8 mg/ml) (Corning), joka laimennettiin kylmään DMEM/F-12 mediumiin. Optimoinnissa saatujen tulosten pohjalta alemmasta matrigeli kerroksesta jätettiin lisätty FBS pois. Matrigelin annettiin polymerisoitua kolmen tunnin ajan. Solut irrotettiin trypsiini-EDTA liuoksella ja laskettiin hemosytometrillä matrigeli-solususpension valmistamista varten.

Valmistettiin 25 % matrigeli-solususpensio, jonka annettiin levätä jäällä 20 minuuttia. 600 µl suspensiota lisättiin jokaiseen kaivoon, ja matrigelin annettiin polymerisoitua yön yli + 37 °C, 5 % CO₂ pitoisuudessa. Seuraavana päivänä kuoppiin lisätään 2 ml mediumia

pisara kerrallaan ja varottiin rikkomasta matrigeelin pintaa. Joka toinen päivä vanha medium poistettiin ja uusi + 37 °C medium lisättiin kuoppiin pisara kerrallaan. 3D-mallien kasvua seurattiin mikroskoopilla (Zeiss Axio Vert A1). Päivien 2–9 aikana otettiin faasikontrastikuvia mikroskoopin objektiiveilla 10x ja 40x ja arvioitiin silmämäärisesti kehityksen kulkua. Faasikontrastimikroskooppikuvat perustuvat optiseen mikroskooppitekniikkaan, jossa muunnetaan läpinäkyvän näytteen läpi menevän valon faasikontrastin muutokset kuvan kirkkauden muutoksiksi. Tekniikan avulla on mahdollista kuvata eläviä soluja niiden kasvun aikana, eikä soluja tarvitse tappa tai värjätä ennen kuvausta. (Nikon microscopy).

4.1.3 Näytteiden kerääminen

Näytteiden kerääminen aloitettiin poistamalla vanha medium kasvatuksen päältä ja solut pestiin kylmällä PBS:llä pisara kerrallaan varoen matrigeelin pintaa. PBS poistettiin ja kuoppiin lisättiin kylmää PBS–5 mM EDTA-liuosta. Matrigeelikerrokset ja puskuri sekoitettiin hyvin keskenään ja siirrettiin liuos 15 ml putkeen, joka täytettiin PBS–5 mM EDTA-liuoksella. Putket asetettiin + 4 °C kylmähuoneeseen ravistelijaan vähintään 45 minuutiksi. Organoidit sentrifugoitiin putken pohjaan 1000 x g, 5 min ajan ja pellettiä pestiin PBS:llä kahdesti. Kerätyt organoidit hajotettiin hajotuspuskurilla Met1-TUBE rikastusta tai qPCR-menetelmää varten.

4.2 HOIPIN-1-käsittelyt 3D-syöpäsolumalleille

4.2.1 HOIPIN-1-inhibiittorin optimointi

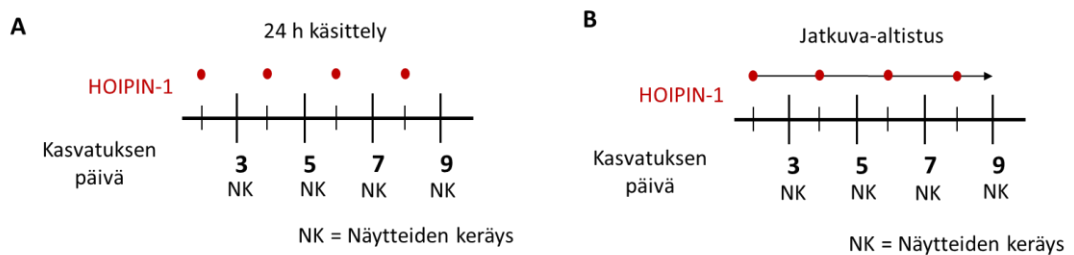
HOIPIN-1 on selektiivinen HOIP-inhibiittori (inhiboi LUBAC-kompleksin toimintaa), jonka tehtävä on vaimentaa HOIP-proteiinin aktivaatio *in-vitro*. HOIPIN-1-inhibiittorin IC₅₀ arvo on 2,8 µM. (Katsuya ja muut 2018, 2019). Caco2-solut kasvatettiin 2D-kasvatuksia varten Ø 10 cm maljoilla 90 % konfluenssiin. HOIPIN-1 (Axon Medchem BV, Groningen, Alankomaat, JTP 0819958) inhibiittorin kykyä inhiboida Met1-Ub-sidosta kokeiltiin kolmena eri konsentraationa: 10 µM, 50 µM ja 100 µM. Kontrollina käytettiin DMSO:ta (Sigma, engl. *Dimethyl sulfoxide*, DMSO), koska inhibiittori laimennettiin siihen valmistajan ohjeen mukaisesti. Käsittelyt lisättiin soluille mediumin mukana ja inkuboitiin + 37 °C inkubaattorissa neljä tuntia. Soluille tehtiin 25 ng/ml TNF-α-käsittely

(Thermo Fisher), jonka annettiin vaikuttaa 15 min. Näytteet kerättiin ja tulokset tulkittiin Western Blot-menetelmällä.

4.2.2 HOIPIN-1-käsittelyt Caco2 3D-malleille

3D-kasvatus kesti yhdeksän päivää ja näytteet kerättiin kasvatuksen päivinä kolme, viisi, seitsemän ja yhdeksän. Western Blot -menetelmää varten kerättiin päivinä kolme ja viisi kolme 12-kuoppalevyn kaivoa ja päivinä seitsemän ja yhdeksän kaksi 12-kuoppalevyn kaivoa. Reaaliaikaista PCR-menetelmää varten kerättiin päivinä kolme ja viisi kaksi kaivoa ja päivinä seitsemän ja yhdeksän yksi kaivo.

Tehtiin kahdenlaiset koeasettelut. Asetelmassa A syöpäsolumallit käsiteltiin HOIPIN-1-inhibiittorilla 24 h ennen näytteiden keräämistä (kuva 12, A) ja asetelmassa B käsittely tehtiin jatkuvana käsittelynä kaikkiin kuoppalevyn kuoppiin (kuva 12, B). Asetelmassa A vain seuraavana päivänä kerättävät kaivot käsiteltiin 50 μ M HOIPIN-1-inhibiittorilla ja kontrollikaivot käsiteltiin DMSO:lla. Muihin kaivoihin vaihdettiin ainoastaan medium. Asetelmassa B HOIPIN-1-inhibiittoria sisältävä medium lisättiin ensimmäisen kerran kaikille kasvatuksille päivänä kaksi ja tämän jälkeen uusi 50 μ M HOIPIN-1-mediumliuos vaihdettiin kasvatuksille päivinä neljä, kuusi ja kahdeksan. (Kuva 12, kohta A ja B).



Kuva 12, HOIPIN-1 koeasettelut 3D-syöpäsolumalleille. A) Näytteiden käsittely 24 h ennen näytteiden keräystä eli päivinä kaksi, neljä, kuusi ja kahdeksan. Kontrollinäytteet käsiteltiin DMSO:lla samalla tavalla kuin HOIPIN-1 näytteet käsiteltiin. B) Jatkuvassa käsittelyssä näytteet käsiteltiin DMSO:lla tai HOIPIN-1-inhibiittorilla ensimmäisen kerran päivänä kaksi ja uudelleen aina päivinä neljä, kuusi ja kahdeksan. Tällöin 3D-kasvatukset olivat altistuneena käsittelylle koko kasvatuksen ajan. Punaiset pallot kuvaavat HOIPIN-1-käsittelyä. NK tarkoittaa näytteiden keräystä.

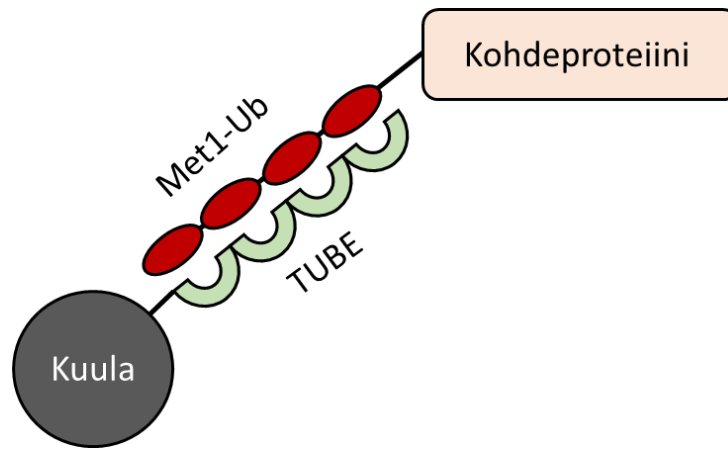
4.3 Proteiininäytteiden valmistus, Western Blot ja reaaliaikainen kvantitatiivinen PCR

4.3.1 Met1-Ub-rikastusnäytteiden ja proteiiniuutenäytteiden valmistus rikastusmenetelmällä

Näytteiden keräyksen jälkeen 3D-organoidit sisältävä pelletti hajotettiin hajotuspuskuriin denaturoivissa olosuhteissa (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X, 10 % glyseroli, johon lisättiin 1 x PierceTM proteaasi ja fosfataasi inhibiittori, 5 mM 2-klooriasetamidi, 1 mM ditionitrioli (DTT), 5 mM N-etyylimaleimidi (NEM) ja 1 % natriumdodekyylisulfaatti (SDS)).

Solususpensiota pidettiin jäällä 10 min ja näytteet sonikoitiin kaksi kertaa 5 min (Finn Sonic) ja näytteiden sisältämä SDS laimennettiin 0,1 %:n hajotuspuskurin avulla (ei-denaturoiva hajotuspuskuri eli ilman SDS). Otettiin 10 µl:n proteiiniuutenäytteet proteiinipitoisuuden määrittämistä varten. Otettiin 100 µl proteiiniuutetta ja niihin lisättiin 4 x Laemmli-näytepuskuri (0,25 M TrisHCl, pH 6.8; 40 % glyseroli, 4 % SDS; 0,02 % bromofenolisininen, 3 % β-mercaptoetanol) proteiinipitoisuuden määrittämisessä saadun tuloksen verran, niin että kukin näyte sisälsi saman verran proteiinia.

Lopuista näytteistä valmistettiin Met1-Ub-rikastusnäytteet. Näytteisiin lisättiin proteiinipitoisuuden määrittämisessä saatu määrä ei-denaturoivaa hajotuspuskuria niin, että SDS pitoisuus laimeni 0,01 %. Näytteitä inkuboitiin glutationi sepharoseTM 4B (GE Healthcare) kuulilla ja Met1-TUBE (10–20 mg/ml, LifeSensors) rekombinanttiproteiinissa yön yli + 4 °C rotaatioissa. Met1-Ub-ketjut havaittiin ja eristettiin proteiiniuutenäytteistä glutationi-S-transferaasi-leimatulla (engl. *glutathione S-transferase*) tandemiubikitinisitojadomeenin avulla (engl. *Tandem ubiquitin binding entity, TUBE*), joka on spesifinen Met1-ubikitinaatiolle (Met1-TUBE). TUBE tarttuu glutationi-leimattuihin kuuliin ja tunnistaa korkealla affiniteetillä Met1-Ub-ketjut ja kohdeproteiinit proteiiniuutteesta (kuva 13). Kuulien avulla voitiin rikastaa Met1-Ub-ketjut näytteistä. Kuulat pestiin 2 kertaa jääkylmällä pesupuskurilla (10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % TritonX, 5 % glyseroli). Näytteisiin lisättiin 4 x laemmli-näytepuskuri ja kaikki näytteet keitettiin 5 min 97 °C:ssa ja säilöttiin – 20 °C:een.



Kuva 13, Met1-Ub-rikastusnäytteiden valmistus TUBE-tekniikalla. TUBE-tekniikalla voidaan havaita, eristää ja mitata polyubikitiinoinneita proteiineja. TUBE pystyy tarttumaan kuuliin, joissa on glutationi-leima. TUBE sitoutuu korkealla affiniteetillä Met1-Ub-ketjuihin ja kohdeproteiineihin, jolloin ne voidaan rikastaa proteiiniuutenäyttesitä ja saada rikastusnäytteitä, joissa on ainoastaan Met1-ubikitiinoinnuttuja kohdeproteiineja. Kuva muokattu: M1 Linear Ubiquitin TUBE - Detect Polyubiquitin Proteins - LifeSensors

4.3.2 Proteiinipitoisuuden määrittäminen

Näytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin PierceTM BCA Protein Assay Kitin (Thermo Scientific) avulla valmistajan ohjeen mukaisesti. Määrittämisessä käytettiin *microplate* -protokollaa ja standardisuora valmistettiin käyttämällä naudan seerumin albumiinia (engl. *bovine serum albumine*, BSA).

4.3.3 Met1-ubikitiinoinnin ilmenemisen tarkastelu Western Blot-menettelyllä

Valmistettiin 10 % SDS-geelit (alageeli: 0,38 M Tris-HCl, pH 8.8; 9,9 % akryliamidi; 0,1 % SDS; 0,05 % ammoniumpersulfaatti [engl. *Ammonium Persulfate*, APS]; 0,05 % tertametyylietyyliamidi [engl. *Tetramethylethylenediamine*, TEMED]; ylägeeli: 0,06 M Tris-HCl, pH. 6.8; 3,75 % akryliamidi; 0,1 % SDS; 0,04 % APS; 0,2 % TEMED).

Näytteet keitettiin 97 °C, 5 min ajan ja sentrifugoitiin nopeasti. Met1-Ub-rikastusnäytteitä ladattiin 15 µl ja proteiiniuutenäytteitä 25 µl geelille. Proteiinien koon määrittämiseksi lisättiin 10 µl Precision Plus ProteinTM proteiinistandardia (BIO-RAD). Geelijä ajettiin aluksi 15 min 80 v ja sen jälkeen noin 1 h 120 V ajopuskurissa, jotta proteiinit erottuivat näytteistä koon mukaan (25 mM Tris; 192 mM glysiini; 0,1 % (v/v) SDS).

Geelijän jälkeen proteiinit siirrettiin nitroselluloosamembraanille (AmershamTM ProtranTM 0,45 µm NC, Cytiva) märkäsiirrostuksessa 30 V, 2 h, + 4 °C siirrostuspuskurissa

(25 mM Tris; 192 mM glysiini; 0,02 % (v/v) SDS; 20 % (v/v) metanoli). Met1-Ub-rikastusnäytteitä sisältävät membraanit keitettiin 100 °C:ssa 10 min. Membraani blokattiin 5 % maito-0,2 % PBS–Tween-20 liuoksessa (PBST) tai 0,1 % Tris-puskuroidulla suolaliuoksella, johon lisättiin Tween-20 reagenssia (*engl. tris-buffered saline Tween-20, TBST*) 1 h ajan. Käytetty blokkauspuskuri riippui käytetystä vasta-aineesta (ks. taulukko 1). Membraani pestin kolme kertaa 10 min PBST- tai TBST-puskurissa ja inkuboitiin vasta-aineella taulukon ohjeen mukaisesti (taulukko 1). Membraaneista kehitettiin filmit ECL™ Western Blotting Detection (Cytiva) -reagensseja apuna käyttäen pimiössä. Met1-Ub-rikastusnäytteistä saadut Western Blot-tulokset analysoitiin ImageJ-kuvankäsittelyohjelmalla. ImageJ-ohjelmalla määritettiin latauskontrolli aktiinin avulla tuloksista, minä syövän kehityksen päivänä näytteissä oli eniten Met1-Ub-ketjuja.

Taulukko 1, Käytetyt primaari- ja sekundaarivasta-aineet. Western Blot-analyseissa käytetyt vasta-aineet ja niiden valmistajat, käyttöläimennokset sekä kunkin vasta-aineen kanssa käytetty blokkauspuskuri.

Primaarivasta-aine (valmistaja)	Alkuperä	Käyttö-laimennos	Blokkaus-puskuri	Sekundaari-vasta-aine (valmistaja)	Käyttö-laimennos
Anti-Met1 (UBIQ: 8349, Genentech)	Ihminen, monoklonaalinen	1:1000	PBST	Anti-ihminen IgG (Thermo Fisher Scientific)	1:5000
Anti-NFκB p65 (D14E12) (8242, Cell Signaling)	Kaniini, monoklonaalinen	1:1000	PBST	Anti-kaniini (Santa Cruz)	1:5000
Anti-Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (93H1) (3033, Cell Signaling)	Kaniini, monoklonaalinen	1:1000	TBST	Anti-kaniini (Santa Cruz)	1:5000
c-FLIP (7F10) (ALX-804-961-0100, Enzo)	Hiiri, monoklonaalinen	1:1000	PBST	Anti-hiiri IgG1 (Southern Biotech.)	1:20000
Anti-aktiini (C-11) (sc-1615, Santa Cruz Biotechnology)	Vuohi, polyklonaalinen	1:1000	PBST	Anti-vuohi (Santa Cruz)	1:5000

4.3.4 RNA eristys ja geenien ilmenemisen tarkastelu reaaliaikaisella kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR)

Näytteiden keräämisen jälkeen 3D-organoideille lisättiin 100 µl RLT-puskuria (Qiagen, 1:100 2-merkaptotetanolili) ja näytteet pakastettiin – 80 °C:een. Näytteistä eristettiin RNA käyttämällä RNeasy Mini Kittä (Qiagen) valmistajan ohjeen mukaisesti, jotta saatiin valmistettua komplementaarista DNA:ta (engl. *Complementary DNA*, cDNA). cDNA:n valmistamista varten käytettiin SensiFAST cDNA Syntesis Kittä (Bioline) valmistajan ohjeenmukaisesti. Ainoa poikkeuksena valmistajan ohjeisiin käytettiin 0,5 µg RNA:ta cDNA:n valmistamiseen 1 µg sijaan.

qPCR toteutettiin SensiFAST SYBR HI-ROX q-PCR Kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti (Bioline), jotta nähtiin reaaliaikaisesti kohde-DNA:n tuottaminen. Kokeissa käytettiin taulukon 2 mukaisia ohjelmia eri kohdegeeneille. β-aktiinia ja GAPDH:ta käytettiin kontrolligeeneinä ΔΔCt laskuihin. Käytettiin kahta kontrolligeeniä, koska laskuihin käytettiin kontrolligeenien keskiarvoa. cDNA:n ilmenemisen mittaamiseen käytettyjen alukkeiden sekvenssit ovat taulukoituna taulukossa 3.

Taulukko 2, qPCR-ohjelmat eri kohdegeeneille. Reaaliaikaisen kvantitatiivisen PCR:n ohjelmat taulukoituna.

Kohdegeeni	Lämpötila (°C) ja aika (min)
ihmisen β-aktiini	95°C 10 min, 95 °C 0,05 min; 60 °C 0,20 min; 72 °C 0,15 min; 95 °C 0,15 min
ihmisen GAPDH	95°C 10 min, 95 °C 0,05 min; 60 °C 0,20 min; 72 °C 0,15 min; 95 °C 0,15 min
ihmisen IL-6	95°C 10 min, 95 °C 0,15 min; 60 °C 0,20 min; 72 °C 0,15 min; 95 °C 0,15 min
ihmisen Bcl-2	95°C 10 min, 95 °C 0,05 min; 60 °C 0,20 min; 72 °C 0,15 min; 95 °C 0,15 min

Taulukko 3, Alukkeet eri kohdegeeneille. Reaaliaikaisessa kvantitatiivisessa PCR:ssä käytetyt alukkeet.

Kohdegeeni	Etummainen aluke (5' → 3')	Jälkimmäinen aluke (5' → 3')
ihmisen β-aktiini	TGCGTGACATTAAGGAGAAG	GCTCGTAGCTCTTCTCCA
ihmisen GAPDH	TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC	ATGCCAGTGAGCCCGTTCAGC
ihmisen IL-6	GCA GAA TGAGAT GAG TTG TC	GCC TTC GGT CCA GTT GCC TT
ihmisen Bcl-2	TCGCCCTGTGGATGACTGA	CAGAGACAGCCAGGAGAAATCA

5. Tulokset

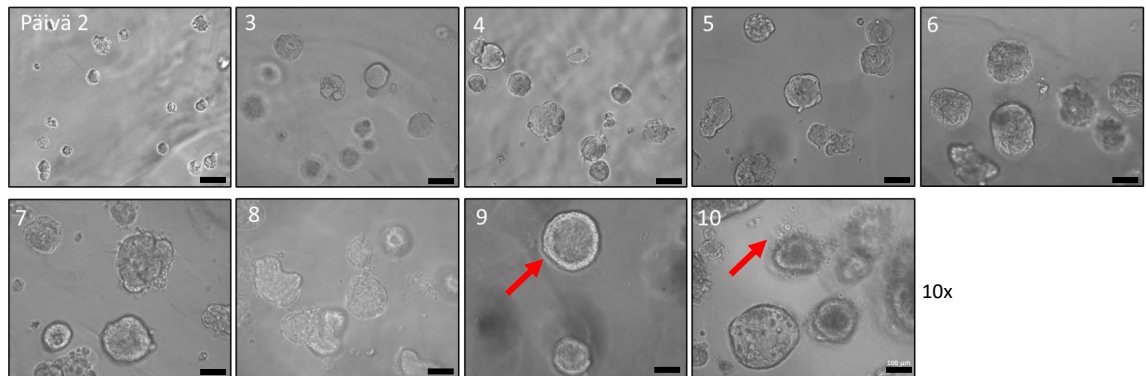
5.1 3D-syöpäsolumallien solumäärän optimointi

Ennen 3D-organoidien kasvattamisen aloitusta tarkoituksena oli löytää optimaalinen Caco2-solumäärä, jonka avulla 3D-syöpäsolumallien kehittymisen kasvunopeus on hallittua ja malleissa kehittyy Caco2-soluille tyypilliset luumenrakenteet (Sachs ja Clevers 2014). Työssä käytettiin kolmea eri solumäärää: 12 500, 8 000 tai 5 000 solua/48-kuoppalevyn kuoppa. Testatuista solukonsentraatioista valittiin se, jossa kehitys ei ollut liian nopeaa eli konsentraatio, joka ei täyttänyt kuoppalevyn kuoppaa liian nopeasti, mutta kuitenkin muodostui organoideja ja haluttuja rakenteita.

3D-kasvatusten ideana on, että päivänä yksi Caco2-syöpäsolut istutetaan 3D-syöpäsolu malleihin matrigeeli kerrosten väliin, jolloin ne ovat päivinä 1–3 matrigeelillä yksittäisinä soluina (kuva 14, päivä 2 ja 3). Päivien 4–7 aikana yksittäisistä soluista optimaalisissa olosuhteissa muodostuu monisoluisia organoideja (kuva 14, päivät 4–7). Päivien 8–10 aikana nähdään, että kolorektaalisyöpäorganoidit muodostavat Caco2-soluille tyypillisiä luumenrakenteita (kuva 14, päivä 9). Silmämääräisen analyysin perusteella todettiin, että 5 000 Caco2-solua/48-kuoppalevyn kuoppa toimi halutun kasvunopeuden ja haluttujen luumenrakenteiden saantiin (kuva 14). Suurempien solumäärien kanssa kasvu ei ollut hallittua ja soluja alkoi kasvaa matrigeelikerrosten lisäksi kuoppalevyn muovipinnoilla. Tuloksista huomattiin, että mitä vähemmän soluja 3D-malleihin lisättiin, sen paremmin nähtiin kehityksen aikana muodostuvat rakenteet. 5 000 solulla/48-kuoppalevyn kuoppa yksittäisistä soluista muodostui kehityksen seitsemän ensimmäisen päivän aikana monisoluisia organoideja ja päivien 8–10 aikana nähtiin Caco2-soluille tyypillisiä luumenrakenteita (kuva 14, päivä 9). Päivänä 10 kuitenkin nähtiin silmämääräisesti, että organoidit näyttivät huonovointisilta ja huomattiin vesikelimäisiä rakenteita (kuva 14, päivä 10).

Varsinaisissa 3D-kasvatuksissa päätettiin käyttää 12-kuoppalevyä ja 20 000 Caco2-solua/kuoppa, mikä tarkoittaa soluja samassa suhteessa kuin 5 000 solua/48-kuoppalevyn kuoppa. Lisäksi varsinaisiin 3D-kasvatuksiin matrigeelin alimmasta kerroksesta päätettiin jättää lisätty FBS pois, jotta pystyttiin paremmin kontrolloimaan solujen kasvua ainoastaan matrigeelillä. Organoidien kasvu muovipinnoilla oli hallitsematonta ja kasvatusten seuraaminen mikroskoopilla oli vaikeaa. Valitussa

konsentraatiossa havaittiin kuitenkin vielä ongelmia, koska kasvun viimeisinä päivinä kuvista nähtiin kärsivän ja kuolevan näköisiä organoideja.

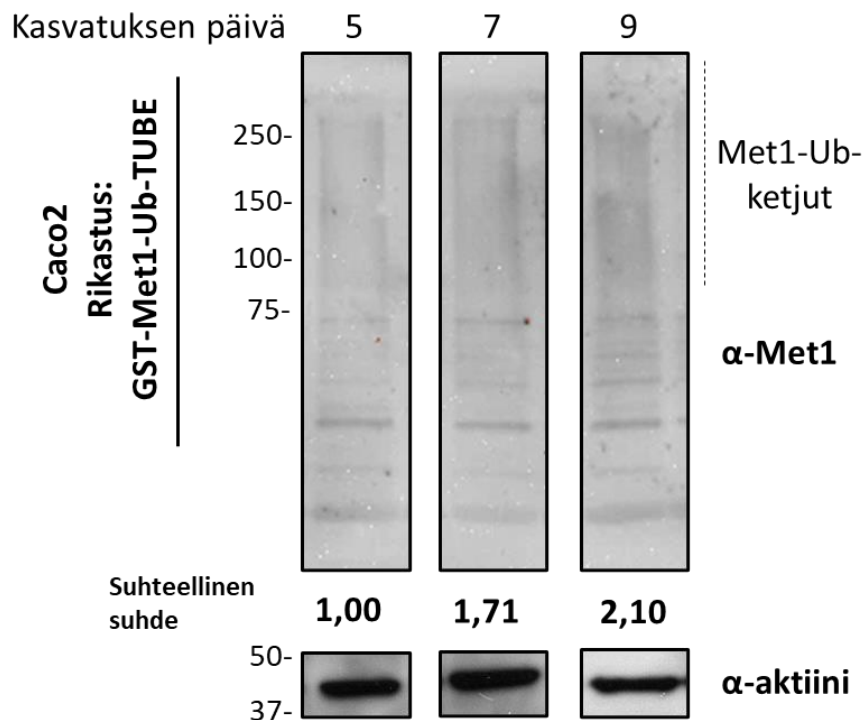


Kuva 14, Caco2-solujen kehitys yksittäisistä soluista monisoluisiksi organoideiksi 3D-syöpäsolumalleissa. Caco2-soluista valmistettuja 3D-kasvatuksia seurattiin faasikontrastikuvien avulla kasvatuksen päivinä 2–10. Päivän yhdeksän kuvassa punaisella nuolella merkitty haluttu Caco2-soluille tyypillinen luumenrakenne. Päivänä kymmenen punaisella nuolella osoitettu vesikelimäinen rakenne. Kuvat otettiin 10x objektiivilla ja mittasuhte palkki on 100 µm.

5.2 Met1-Ub-tasojen huomattiin nousevan 3D-syöpäsolumalleissa Western Blot-menetelmän avulla tarkasteltiin Met1-Ub-tasojen muutoksia kolorektaalisyövän kehityksen aikana eri aikapisteissä. 3D-kasvatuksista kerättiin näytteitä päivinä kolme, viisi, seitsemän ja yhdeksän. Näytteistä valmistettiin rikastuksen avulla näytteet, joista voitiin tunnistaa spesifisellä Met1-vasta-aineella Met1-Ub-ketjut. Met1-Ub-ketjut näkyvät kuvan 15 yläosassa usvana, koska Met1-Ub-TUBE-kuulat rikastavat näytteistä kaikki Met1-ubikitinoidut proteiinit, ja nämä proteiinit voivat olla eri kokoisia. Kokeessa käytettiin aktiinia latauskontrollina, jotta voitiin varmistua proteiineja olevan saman veran kaikissa näytteissä.

Näytettä päivältä kolme ei voitu käyttää, koska näytteen sisältämä proteiinipitoisuus oli riittämätön tulosten saamiseen. Tuloksista nähdään, että Met1-Ub-ketjuja esiintyy kolorektaalisyövän kehityksessä eri aikapisteissä ja lisäksi ketjujen määrä nousee kehityksen aikana. Ero päivien viisi ja yhdeksän välillä voidaan havaita silmämääräisesti, mutta lisäksi tuloksesta tehtiin ImageJ-kuvankäsittelyohjelman avulla määrittely, jossa huomattiin tasojen nousu myös laskennallisesti. Päivänä viisi saatu Met1-Ub-ketjujen määrä asetettiin luvuksi 1 ja muiden päivien tasot suhteutettiin päivään viisi sekä

latauskontrolli aktiinin määrään. Päivän 7 suhteelliseksi suhteeksi saatiin 1,71 ($\pm 0,4$) ja päivän yhdeksän 2,10 ($\pm 0,6$) (kuva 15). Laskennallinen määrittys tehtiin onnistuneesti kolme kertaa.



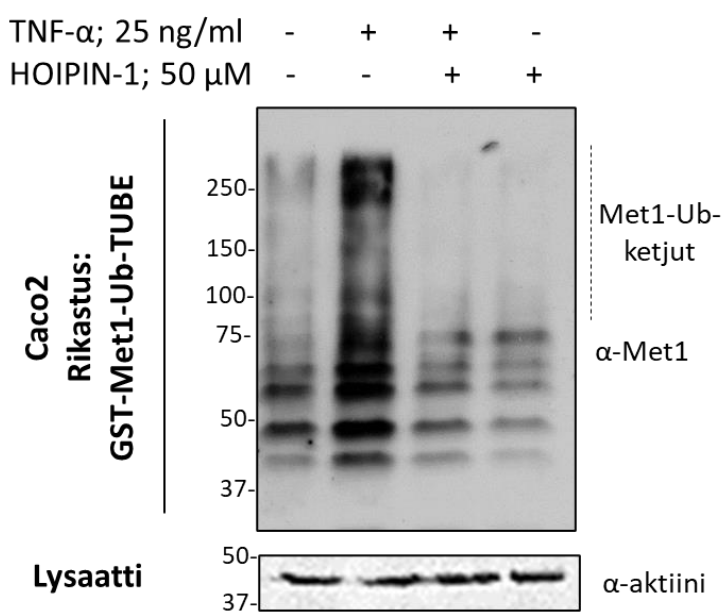
Kuva 15, Western Blot-analyysin tulokset Met1-Ub-ketjuista 3D-kasvatuksista Caco2-soluista. Kuvassa nähdään Caco2-soluista valmistetut rikastusnäytteet, joista on spesifisellä Met1-vasta-aineella tunnistettu Met1-Ub-ketjut, jotka näkyvät blotin yläosassa noin 250–75 kDa välillä usvana. Ensimmäisessä sarakkeessa nähdään rikastusnäyte päivältä viisi, toisessa sarakkeessa rikastusnäyte päivältä seitsemän ja viimeisessä sarakkeessa rikastusnäyte päivältä yhdeksän. Latauksen onnistuminen tarkastettiin aktiinin avulla, joka saatiin näkyviin spesifisellä vasta-aineella ja se näkyy noin 42 kDa:n kohdalla. Eri päivien Met1-Ub-ketjujen määrät määritettiin ImageJ:n avulla ja saatiin kullekin päivälle kerroin, joka kuvastaa Met1-Ub-ketjujen määrää näytteessä. Päivän viisi taso asetettiin luvuksi 1. Koe on toistettu kolme kertaa.

5.3 Käytettävän HOIPIN-1 konsentraation optimointi

Käytettävän solumäärän lisäksi haluttiin optimoida 3D-kasvatuksissa käytettävän HOIPIN-1-inhibiittorin konsentraatio. Inhibiittorin aiemmin käytettyjä konsentraatioita olivat muun muassa 10 μ M, 50 μ M ja 100 μ M (Oikawa ja muut 2020), joten näitä konsentraatioita testattiin 2D-syöpäsolukasvatuksissa. Koe tehtiin 2D-viljelynä, koska tällöin on vähemmän huomioitavia asioita kuin 3D-viljelyssä, mutta nähdään kuitenkin, miten solut käsittelyyn reagoivat. 2D-viljelyssä soluille tehtiin myös TNF- α käsittely, jotta saataisiin aktivoitua kanoninen NF- κ B-viestintäreitti käytetyissä Caco2-soluissa ja lisätä

Met1-Ub-ketjujen määrää näytteissä. Reitti haluttiin aktivoida, jotta saataisiin selville HOIPIN-1-inhibiittorin kyky estää Met1-Ub-ketjun muodostuminen.

Met1-Ub-tasoja tarkasteltiin proteiinitasolla Western Blot-menetelmän avulla. Kokeessa käytettiin aktiinia latauskontrollina, jotta voitiin varmistua proteiineja olevan saman veran kaikissa näytteissä. Kokeessa huomattiin, että 25 ng/ml TNF- α lisää Met1-Ub-ketjujen määrää Caco2-soluissa. Koe paljasti 50 μ M HOIPIN-1 konsentraation toimivan Met1-Ub-sidoksen muodostumisen estämiseen. HOIPIN-1-käsittely esti Met1-Ub-ketjujen muodostumista sekä TNF- α aktivoituissa näytteissä sekä ainoastaan HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä (kuva 16). Varsinaisiin kasvatuksiin päätettiin jättää TNF- α -käsittely pois, koska tuloksista huomataan, että soluissa nähdään ilman käsittelyäkin riittävästi Met1-Ub-ketjuja.

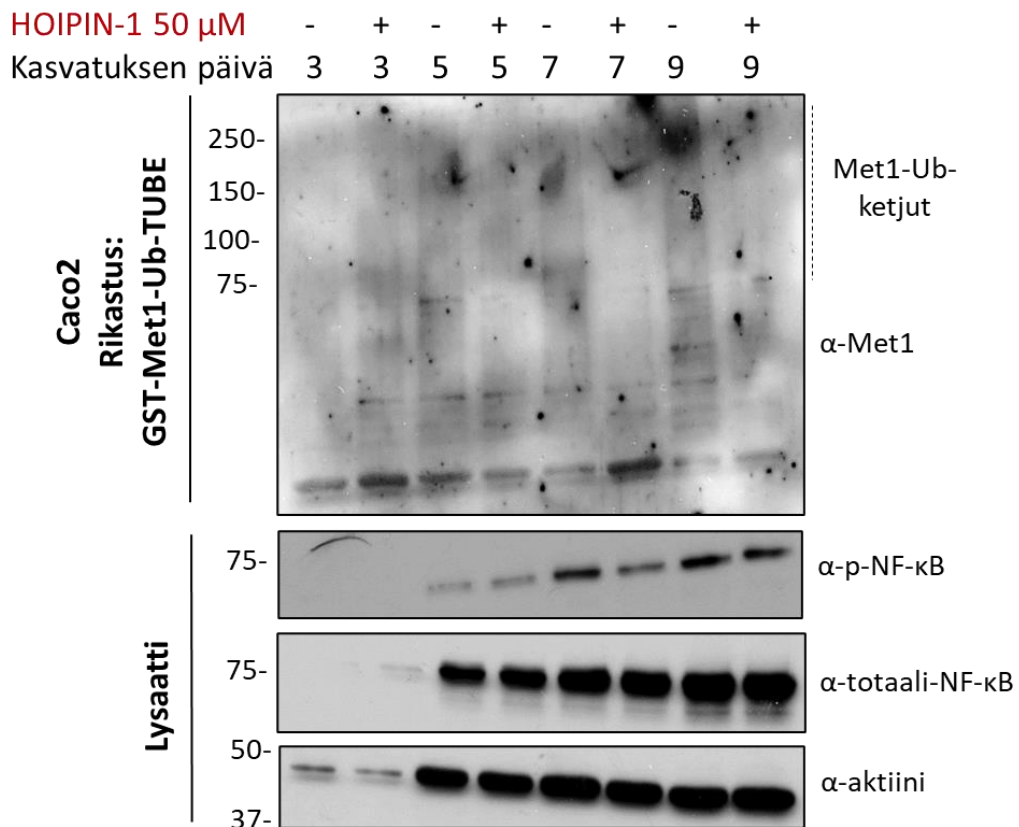


Kuva 16, Western Blot-analyysin tulokset Met1-Ub-ketjuista 2D-kasvatetuista Caco2-soluista. Kuvassa nähdään Caco2-soluista kerätyt 2D-näytteet, joista on rikastusmenetelmällä rikastettu Met1-Ub-ketjut. Ensimmäisessä sarakkeessa on kontrollinäyte, toisessa sarakkeessa nähdään 25 ng/ml TNF- α -käsitelty näyte, kolmannessa sarakkeessa nähdään TNF- α sekä 50 μ M HOIPIN-1-käsitelty näyte ja viimeisessä sarakkeessa ainoastaan 50 μ M HOIPIN-1-käsitelty näyte. Met1-vasta-aine tunnisti membraanilta Met1-Ub-ketjut. Aktiini tunnistettiin spesifisellä vasta-aineella. Näytteiden onnistunut lataus tarkistettiin aktiini-proteiinin avulla.

5.4 HOIPIN-1-inhibiittorilla nähdään muutoksia proteiinkoostumuksessa 3D-malleista otettiin näytteitä kahteen tarkoitukseen: Western Blot-menetelmää sekä qPCR-menetelmää varten. Aluksi tehtiin 24 tuntia kestävä HOIPIN-1-käsittely 3D-kasvatuksille. Met1-Ub-ketjujen muodostumisen lisäksi ollaan kiinnostuneita NF- κ B-

viestinnän proteiineista. Niitä tutkitaan totaali-NF- κ B-vasta-aineella, joka tunnistaa NF- κ B-proteiinin p65/RelA määrän näytteissä (Cell Signaling, NF- κ B D14E12) ja p65-vasta-aineella, joka tunnistaa fosforyloituneen eli aktivoituneen proteiinin (Cell Signaling, Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (93H1)). Totaali-NF- κ B mittaa NF- κ B:n kokonaismäärää näytteissä ja fosforyloitunut NF- κ B taas aktivoitunutta NF- κ B:tä, joka siirtyy tumaan aktivoimaan geenien tuotannon (ks. kuva 8, kanoninen NF- κ B-viestintä). Totaali-NF- κ B toimii kokeessa kontrollina, johon verrataan p-NF- κ B-tasoa. Näin saadaan tietoa syövän eri vaiheessa tapahtuvasta NF- κ B-aktivaatiosta.

Latauskontrolli aktiinista nähdään, että päivänä kolme proteiinia on huomattavasti vähemmän kuin muina päivinä, eikä päivän tuloksia voida verrata muihin päiviin. Totaali-NF- κ B:n määrä kasvaa tasaisesti syövän kehityksen aikana kontroleissa sekä HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä. Fosforyloitunut NF- κ B (p-NF- κ B) määrä kontrollinäytteissä nousee syövän kehityksen aikana. Päivän seitsemän HOIPIN-1-käsitellyssä näytteessä kuitenkin huomataan, että p-NF- κ B:n määrä on pienempi kuin kontrollinäytteessä eli aktivaatiota on vähemmän. Kontrollinäytteissä nähdään päivinä viisi, seitsemän ja yhdeksän Met1-Ub-ketjut ja huomataan, että Met1-Ub-tasot nousevat syövän kehityksen aikana. Kuitenkin jo päivänä viisi HOIPIN-1-käsitellyssä näytteessä on vähemmän Met1-Ub-ketjuja verrattuna saman päivän kontrollinäytteeseen. Päivänä seitsemän ja yhdeksän kontrollinäytteen ja HOIPIN-1-käsitellyn näytteen välillä on selkeä ja suuri ero (kuva 17).

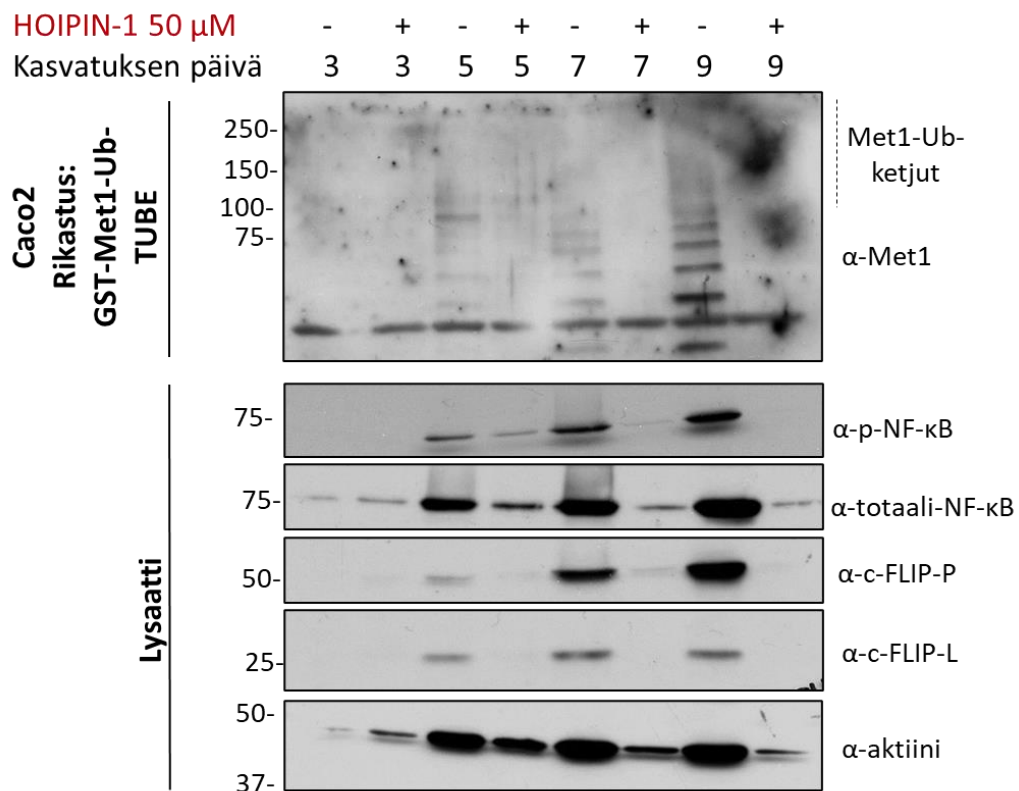


Kuva 17, Western Blot-analyysin tulokset 24 tunnin käsitellyistä 3D-kasvatuksista Caco2-soluista. Kuvassa nähdään Caco2-soluista valmistetut rikastusnäytteet, joista on spesifisellä Met1-vasta-aineella tunnistettu Met1-Ub-ketjut. Kuvassa nähdään syövän kehityksen päivät kolme, viisi, seitsemän ja yhdeksän. Jokaisesta päivästä nähdään ensin kontrollinäyte ja sen jälkeen 50 μ M HOIPIN-1-käsittely näyte. Latauksen onnistuminen tarkastettiin aktiinin avulla. Proteiiniuutenäytteiden eri proteiinit saatiin näkyviin spesifisillä vasta-aineilla. p-NF- κ B:n sekä totaali-NF- κ B:n koko noin 65 kDa. Koe on toistettu kolme kertaa.

24 tuntia kestävä käsittely aiheutti vain vähän muutoksia proteiinikoostumuksissa. Sen vuoksi päätettiin tehdä toinen koeasettelu, jossa HOIPIN-1-käsittely aloitettiin päivänä kaksi ja jatkettiin jatkuvana päivään yhdeksän asti. Lisäksi tässä koeasettelussa katsottiin c-FLIP (engl. *Cellular FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme) -inhibitory protein, c-FLIP*) proteiinin ilmenemistä näytteissä. Se ilmenee ihmisen soluissa pitkänä (c-FLIP-P) ja lyhyenä varianttina (c-FLIP-L). Se muodostaa soluissa kompleksin, jonka tehtävänä on estää solujen meno apoptoosiin. Molemmilla varianteilla on tutkitusti rooli apoptoosin säätelyssä, mutta c-FLIP-L on rakenteellisesti todettu olevan aktiivisempi kuin c-FLIP-P, joten lyhyen muodon ajatellaan pystyvän sitoutumaan kaspasi-kompleksiin paremmin. (Safa 2012.)

Latauskontrolli aktiinista nähdään, että päivänä kolme proteiinia on erittäin vähän näytteissä. Päivien viisi, seitsemän ja yhdeksän kontrollinäytteissä on silmämääräisesti samansuuruinen määrä proteiinia. HOIPIN-1-käsitellyistä näytteissä on päivinä viisi ja

seitsemän saman verran proteiinia, mutta päivänä yhdeksän määrä on noin puolet pienempi. Kontrollinäytteisiin verrattuna kaikissa HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä on selvästi vähemmän proteiinia. p-NF-κB:n määrä nousee kontrollinäytteissä tasaisesti syövän kehityksen aikana. HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä huomataan, että päivänä viisi nähdään vähän aktivaatiota, mutta se katoaa päivien seitsemän ja yhdeksän aikana. Totaali-NF-κB-tasot ovat päivinä viisi, seitsemän ja yhdeksän hyvin tasaiset kontrollinäytteissä. HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä päivänä viisi nähdään vielä proteiinia näytteessä, mutta päivään yhdeksään mennessä sitä nähdään enää hyvin vähän. c-FLIP-proteiinin molemmissa varianteissa nähdään proteiinia kontrollinäytteissä päivinä viisi, seitsemän ja yhdeksän. Syövän kehityksen aikana molemmissa varianteissa nähdyt palkit tummenevat mutta erityisesti c-FLIP-P taso kasvaa kehityksen aikana. Vastaavasti HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä kumpaakaan c-FLIP varianttia ei havaita (kuva 18).



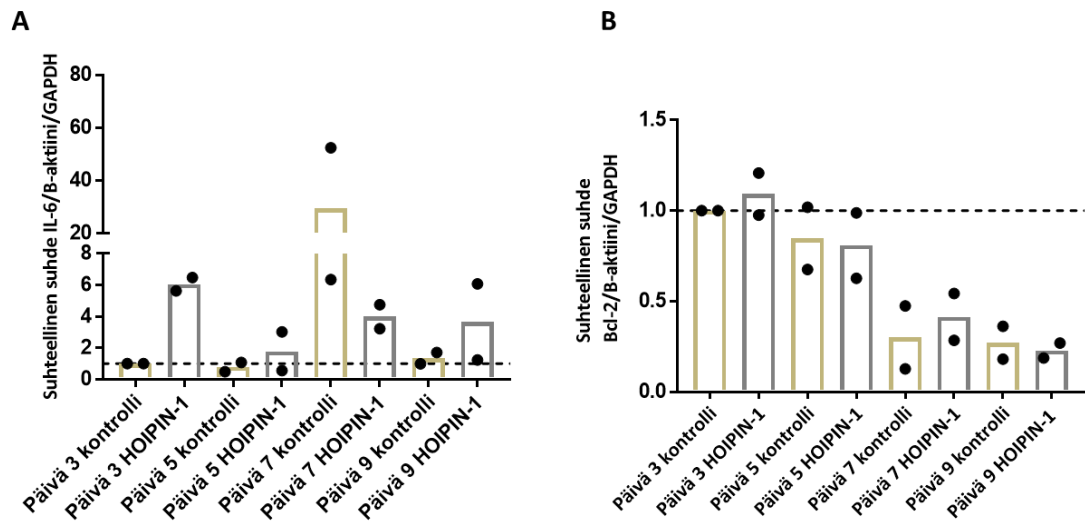
Kuva 18, Western Blot-analyysin tulokset jatkuvasta käsittelystä 3D-kasvatuksista Caco2-soluista. Kuvassa nähdään Caco2-soluista valmistetut rikastusnäytteet, joista on spesifisellä Met1-vasta-aineella tunnistettu Met1-Ub-ketjut. Kuvassa nähdään syövän kehityksen päivät kolme, viisi, seitsemän ja yhdeksän. Jokaisesta päivästä nähdään ensin kontrollinäyte ja sen jälkeen 50 μM HOIPIN-1-käsiteltynäyte. Latauksen onnistuminen tarkastettiin aktiinin avulla. Proteiiniuutenäytteiden eri proteiinit saatiin näkyviin spesifisillä vasta-aineilla. C-FLIP-P koko on noin 50 kDa ja c-FLIP-L koko on noin 25 kDa. Koe on toistettu kaksi kertaa.

5.5 HOIPIN-1 vaikuttaa sytokiinituotantoon syövän kehityksen eri vaiheissa qPCR-menetelmällä haluttiin selvittää eri kohdegeenien tuotantoa kolorektaalisyövän kehityksen aikana. Näytteistä nähdään, miten paljon spesifistä lähetti RNA-molekyyliä (*engl. Messenger RNA, mRNA*) näytteissä esiintyy kyseisenä ajankohtana. Pieni osa tästä mRNA:sta pyrittiin tulostamaan spesifisten DNA-alkukkeiden avulla SybrGreen-menetelmää käyttäen. qPCR-menetelmää varten näytteistä eristettiin RNA ja siitä valmistettiin cDNA. Tutkitut aikapisteet ovat samat kuin Western Blot-menetelmässä eli päivät kolme, viisi, seitsemän ja yhdeksän. Näytteistä tutkittiin NF- κ B-viestinnän tuottamia tulehdustilaan liittyviä sytokiineja IL-6 ja Bcl-2. IL-6 eli ihmisen interleukiini-6 on tulehdusta edeltävä sytokiini (*engl. pro-inflammatory cytokine*), jota tuotetaan muun muassa tulehdustilassa ja kroonisessa tulehduksessa (Tanaka ja muut 2014). Bcl-2 taas toimii solukuoleman eli apoptoosin merkkigeeninä ja sen tehtävä soluissa on säädellä apoptoosia. Se hillitsee apoptoosia soluissa, jolloin se toimii solujen selviytymistä edistävänä tekijänä (*engl. pro-survival factor*). (Hardwick ja Soane 2013.) Lisäksi näytteistä tutkittiin kontrolligeeneinä käytetyt β -aktiini-tasot sekä GAPDH-tasot.

Kuvasta 19 nähdään 24 h DMSO tai HOIPIN-1-käsiteltyjen näytteiden sisältämät cDNA-tasot. Kuvista nähdään cDNA:n suhteellinen suhde verrattuna kontrolligeeneihin β -aktiiniin ja GAPDH:n. Kontrollina käytettiin kahta eri geeniä, joiden tulosten keskiarvo käytettiin apuna $\Delta\Delta$ Ct laskuissa, joissa määritettiin kohde geenin tasot. Kohdassa A nähdään IL-6-geenin tuotanto eri aikapisteissä. Tuloksista nähdään, että DMSO käsittelyissä kontrollinäytteissä päivinä kolme, viisi ja yhdeksän IL-6-tasot ovat hyvin tasaiset. Päivän seitsemän toisessa kontrollinäytteessä IL-6-taso nousee noin 50-kertaiseksi, mutta tämä on yksittäinen havainto. HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä päivänä 3 tasot ovat noin kuusi kertaa korkeammalla kuin kontrollinäytteessä. Päivänä viisi, seitsemän ja yhdeksän IL-6-tasot laskevat (kuva 19, A).

Kuvan 19, kohdasta B nähdään Bcl-2-geenin ilmenemisen suhteellinen suhde β -aktiiniin ja GAPDH:n suhteutettuna. Kontrollinäytteissä Bcl-2 tasot laskevat syövän kehityksen aikana. Myös HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä tasot laskevat syövän kehityksen aikana. Tulosten mukaan kontrollinäytteiden ja HOIPIN-1-käsiteltyjen näytteiden tasot ovat hyvin samankaltaiset syövän kehityksen aikana (kuva 19, B). Valituissa aikapisteissä ei

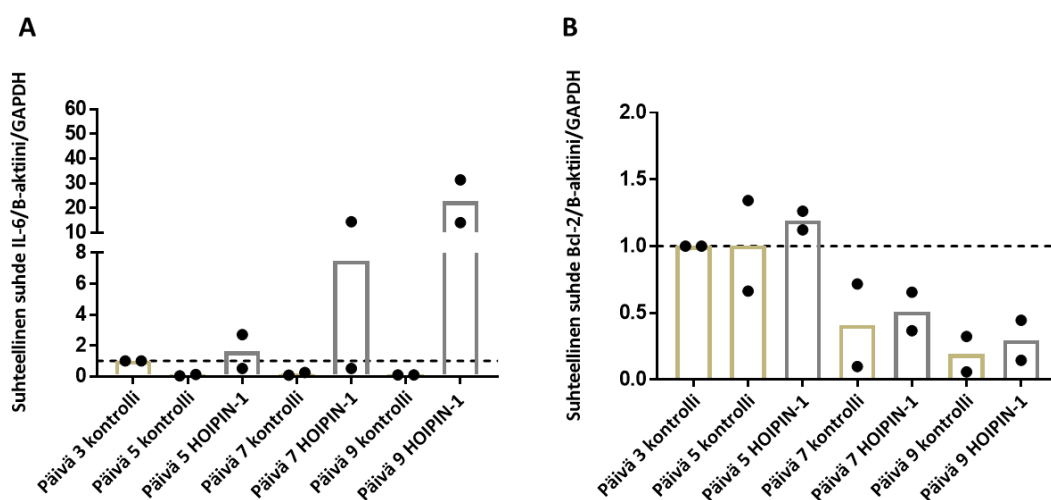
nähty merkittäviä eroja geenien tuotannossa, joten koe toistettiin ainoastaan kaksi kertaa.



Kuva 19, IL-6 ja Bcl-2-geenien tuotanto kolorektaalisyövän kehityksen aikana eri aikapisteissä. Kuvassa A nähdään IL-6-geenin tuotannon suhteellinen suhde verrattuna kontrolligeeneihin, jotka ovat β -aktiini sekä GAPDH. Kuvassa B nähdään Bcl-2-geenin suhteellisen ilmentymisen suhde verrattuna kontrolligeeneihin. Mustat pallot kuvaavat molemmissa kuvissa kokeesta tehtyjä toistoja. Toistoja on ainoastaan kaksi, joten tilastollista analyysiä ei ole voitu tehdä. Kuvissa näkyvä katkoviiva kuvaa kontrollinäytteen tasoa, joka on asetettu näyttämään arvoa yksi. Katkoviivan yläpuolella olevat tasot ovat korkeampia ja alapuolella olevat tasot ovat matalampia kuin päivän kolme kontrollinäytteessä. Kontrollinäytteet näkyvät kuvissa kultaisina palkkeina ja HOIPIN-1-käsitellyt näytteet näkyvät harmaina palkkeina. Koe on toistettu kaksi kertaa.

Kuten Western Blot-menetelmässä myös q-PCR-menetelmällä tehtiin jatkuva HOIPIN-1-käsittely 3D-kasvatuksille. HOIPIN-1-käsiteltyä näytettä päivältä kolme ei ole kummassakaan kohdegeenissä kuvattuna, koska näytteiden sisältämät cDNA-tasot olivat hyvin matalat ja riittämättömät tulosten saantiin. Päivinä kolme näytettä saatiin kuitenkin käytettyä kontrollina ja sen taso on laskuissa asetettu suhteellisen suhteen tasoksi yksi. Kohdassa A nähdään IL-6-geenin tuotanto eri aikapisteissä. Tuloksista nähdään, että DMSO käsittelyissä kontrollinäytteissä IL-6-tasot ovat hyvin tasaiset ja matalat kaikkina päivinä. HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä tasot nousevat syövän kehittyessä, mutta varsinkin päivän yhdeksän taso on korkea, noin 20-kertainen kontrolliin verrattuna (kuva 20, A). 24 h käsittelyn kontrollinäytteissä tasot ovat kuitenkin hyvin matalat, mutta päivänä seitsemän nähdään yhdessä näytteessä korkea piikki. Tätä piikkiä ei nähdä jatkuvan käsittelyn kontrollinäytteissä, mikä viittaa siihen, ettei kuvan 19 A seitsemännen päivän kontrollinäytteen nousu ole varteenotettava.

Kuvan 20, kohdasta B nähdään Bcl-2-geenin ilmenemisen suhteellinen suhde β -aktiiniin ja GAPDH:n suhteutettuna. Kontrollinäytteissä Bcl-2 tasot ovat päivinä kolme ja viisi tasaiset, mutta laskevat sitten päivinä seitsemän ja edelleen päivänä yhdeksän. Myös HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä tasot laskevat syövän kehityksen aikana eli tasoissa ei nähdä muutoksia syövän kehityksen aikana (kuva 20, B). Näiden tulosten pohjalta voidaan päätellä, että HOIPIN-1-käsittely aktivoi sytokiinituotantoa, vaikka se ei vaikuta anti-apoptoottisten Bcl-2-proteiinien tuotantoon syövän kehityksen aikana. Tuloksen varmistamiseksi se pitäisi toistaa ainakin kolmannen kerran.



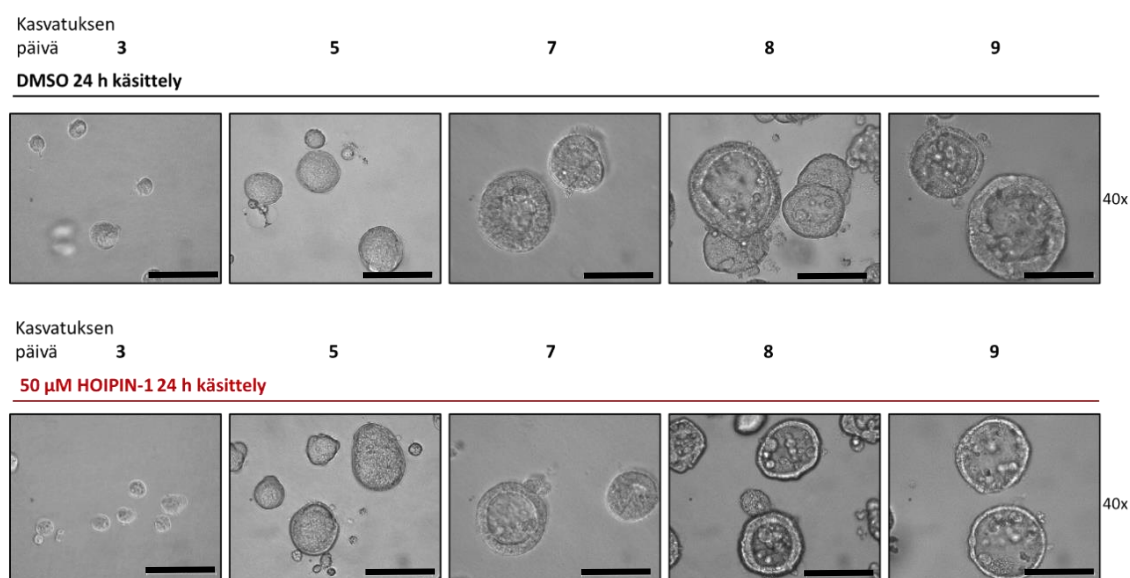
Kuva 20, IL-6 ja Bcl-2-geenien tuotanto kolorektaalisyövän kehityksen aikana eri aikapisteissä jatkuvassa käsittelyssä. Kuvaissa nähdään IL-6 ja Bcl-2-geenin tuotannon suhteellinen suhde verrattuna kontrolligeeneihin, jotka ovat β -aktiini sekä GAPDH. Kohdassa A nähdään IL-6-tasot syövänkehityksen aikana. Kuvassa B nähdään Bcl-2-geenin suhteellisen ilmentymisen suhde verrattuna kontroligeeneihin. Mustat pallot kuvaavat molemmissa kuvissa kokeesta tehtyjä toistoja. Toistoja on ainoastaan kaksi, joten tilastollista analyysiä ei ole voitu tehdä. Kuvissa näkyvä katkoviiva kuvaa kontrollinäytteen tasoa, joka on asetettu näyttämään arvoa 1. Katkoviivan yläpuolella olevat tasot ovat korkeampia ja alapuolella olevat tasot ovat matalampia kuin päivän kolme kontrollinäyte. Kontrollinäytteet näkyvät kuvissa kultaisina palkkeina ja HOIPIN-1-käsitellyt näytteet näkyvät harmaina palkkeina. Koe on toistettu kaksi kertaa.

5.6 Met1-Ub-sidoksen inhibiittori HOIPIN-1 tappaa kolorektaalisyöpäsolut 3D-kasvatuksissa

Ensimmäisessä käsittelyssä 3D-syöpäsolumallit käsiteltiin HOIPIN-1-inhibiittorilla 24 h ennen näytteiden kuvaamista ja niiden keräämistä. Faasikontrastikuvia otettiin päivinä 1–9, mutta kuvassa 21 on näytetty syövän kehityksen kannalta mielenkiintoisimmat päivät eli päivät kolme, viisi, seitsemän, kahdeksan ja yhdeksän. Kuvan 21 yläosassa nähdään faasikontrastikuvat kontrollinäytteistä. Kontrollinäytteet pyrkivät

jäljittelemään haluttua kolorektaalisyövän kehitystä ja ne kasvatettiin, jotta HOIPIN-1-käsitellyt näytteitä voitaisiin verrata kontrollinäytteisiin ja näin ollen nähdä mahdolliset eroavaisuudet syövän kehityksessä.

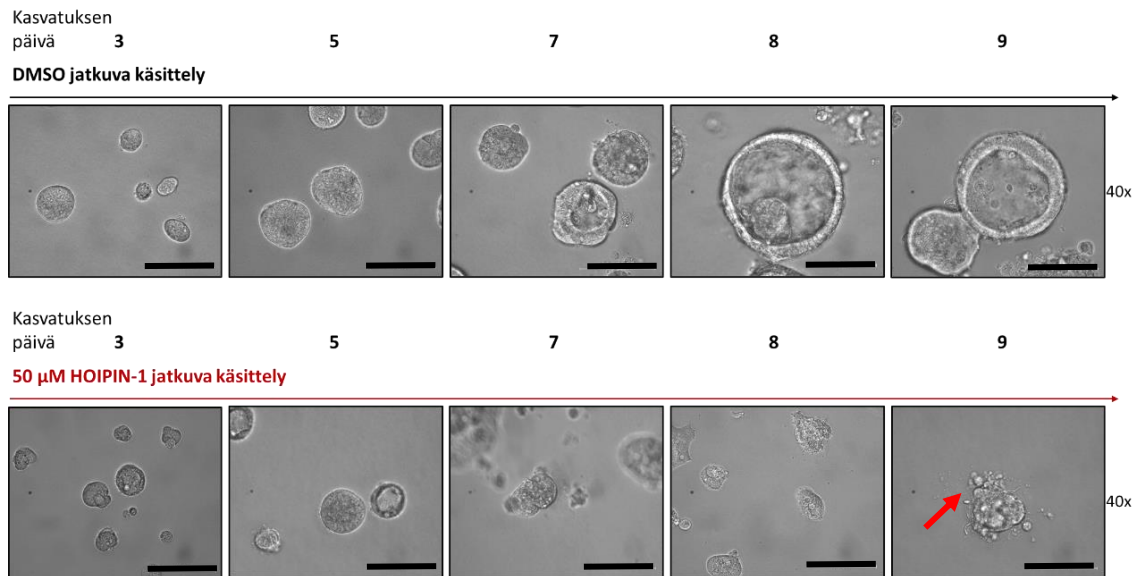
Kuvan 21 alaosassa on kuvattuna kasvatukset, jotka käsiteltiin 50 μ M HOIPIN-1-inhibiittorilla 24 h ennen kuvien ottoa. Kehitys on silmämääräisesti hyvin samankaltainen kuin kontrollinäytteissäkin. Kuvia analysoidessa nähdään myös, että HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä muodostuu lumenrakenteita päivinä seitsemän, kahdeksan ja yhdeksän, mutta ne ovat silmämääräisesti pienemmän kokoisia kuin kontrollinäytteissä. Kuvanottopäivinä kuvat on otettu satunnaisesta paikasta, eikä kasvatuksen kehitystä ole voitu seurata samasta paikasta kaikkina päivinä. Tämän vuoksi kuvat antavat ainoastaan alustavaa viitettä siitä, miten syöpä kehittyy.



Kuva 21, 24 h käsitellyt 3D-syöpäsolumallien faasikontrastikuvat. Faasikontrastikuvapaneelin yläosassa nähdään kontrollinäytteet päivinä kolme, viisi, seitsemän, kahdeksan ja yhdeksän. Paneelin alaosassa nähdään 50 μ M HOIPIN-1-käsitellyt näytteet samoina päivinä kuvattuna kuin kontrollinäytteet. Kuvat on otettu 40x objektiivilla ja mittasuhte palkki on 100 μ m.

Jatkuvan käsittelyn faasikontrastikuvia otettiin samoina päivinä kuin 24 h käsittelyn kuvat. Kuvan 22 yläosassa nähdään kontrollinäytteet ja kuvan alaosassa nähdään 50 μ M HOIPIN-1-käsitellyt näytteet. Kuvissa nähdään silmämääräisesti suuria muutoksia kolorektaalisyöpä organoidien kehityksen aikana päivien 3–9 aikana verrattuna kontrollinäytteisiin. Päivinä kolme solut näyttävät samankaltaisilta kuin saman päivän

kontrollisolut. Päivänä viisi muodostuvat monisoluiusten organoidien esiasteet ovat hieman pienempiä kuin kontrollinäytteessä, mutta päivänä seitsemän nähdään, ettei organoideja pääse muodostumaan kunnolla ja muodostuneet organoidit ovat hyvin pieniä ja huonovointisen näköisiä. Päivinä kahdeksan ja yhdeksän HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä ei nähdä lumenrakenteita, vaan ainoastaan epämääräisiä solukasoja. Päivän yhdeksän kuvasta nähdään solukuolemaan viittavia rakenteita HOIPIN-1-käsitellyissä näytteissä (kuva 22, alarivi päivä 9).



Kuva 22, Jatkuvalla käsitellyllä käsiteltyjen 3D-syöpäsolumallien faasikontrastikuvat. Kuvan yläosassa faasikontrastikuvat kontrollinäytteistä päiviltä kolme, viisi, seitsemän, kahdeksan ja yhdeksän. Kuvan alaosassa nähdään faasikontrastikuvat 50 μ M HOIPIN-1-käsitellyistä näytteistä samoilta päiviltä. Päivän 10 kuvaan on merkattu punaisella nuolella vesikelimäinen solukuolemaan viittaava rakenne. Kaikki kuvat on otettu 40x objektiivilla ja kuvien mittasuhte palkki on 100 μ m.

6. Tulosten tarkastelu ja pohdinta

6.1 Optimaalinen 3D-syöpäsolumalli mahdollistaa Met1-Ub-ketjujen tutkimuksen laboratoriossa

3D-syöpäsolumallit haluttiin optimoida, jotta saavutettaisiin samankaltainen kolorektaalisyövän kehitys, kuin elävässä organismissa todellisuudessa tapahtuu. Kasvu haluttiin saada alkamaan yksittäisistä soluista, jotka kehityksen kuluessa muodostaisivat monisoluisia organoideja ja lopulta kolorektaalisyövälle tyypillisiä rakenteita.

Tutkimusryhmässä ei ennen tätä pro gradu -työtä ollut käytetty HOIPIN-1-inhibiittoria, joten aloitimme konsentraation optimoinnin täysin aiemmin julkaistujen tulosten (Katsuya ja muut 2018) sekä omien arvaustemme perusteella. Havaitsimme, että HOIPIN-1-käsittely johtaa solukuolemaan, inhibiittorin myrkyllisyyttä käytetyille soluille pitäisi tutkia paremmin tulevaisuudessa. Seuraavaksi voitaisiin mahdollisesti tutkia paremmin pienempiä inhibiittorikonsentraatioita, jotta saisimme aikaan Met1-Ub-ketjujen inhibition, mutta se ei vaikuttaisi käytettyjen solujen elinkelpoisuuteen. Olisi mielenkiintoista saada inhiboitua vain osa Met1-Ub-ketjuista ja tutkia, miten se vaikuttaa soluihin ja soluviestintään. Myös eri mittaisia HOIPIN-1-käsittelyjä voitaisiin kokeilla tulevaisuudessa, jotta saataisiin tietää, miten ne vaikuttavat Met1-Ub-tasoihin sekä NF- κ B-viestinnän muihin proteiineihin.

2D-optimointikokeissa käytetty TNF- α käsittely päätettiin jättää pois varsinaisista 3D-kasvatuksista. Huomattiin, että Caco2-solut tuottavat Met1-Ub-ketjuja ilmankin käsittelyä, mikä viittaa kanonisen NF- κ B-viestintäreitien olevan aktiivinen soluissa niiden ollessa normaalissa tilassa. Tämä voisi johtua siitä, että Caco2-solut jollakin tapaa tarvitsevat toimintoihinsa kanonisen reitin tuottamia proteiineja tai Met1-Ub-ketjuja ja siksi Met1-Ub-perustasot ilmenevät soluissa. Kuitenkin tulos voi kertoa myös siitä, että käytetyt Caco2-solut olivat liian vanhoja tai stressaantuneita. Jatkossa tulisi kiinnittää enemmän huomiota siihen, kuinka monesti käytettäviä soluja on jaettu ja mahdollisesti voitaisiin kokeilla käyttää mahdollisimman nuoria soluja. Huomio kuitenkin helpotti tehtyä työtä, koska TNF- α -käsittely monimutkaistaa organoidien keräämisprosessia ja näin ollen lisää mahdollisten virheiden syntymisen mahdollisuutta.

Caco2-solujen kasvattaminen yksittäisistä soluista monisoluisiksi organoideiksi onnistui hyvin matrigeeliä hyväksikäyttäen 3D-kasvatuksissa. Työn aikana 3D-kasvatuksia toistettiin useita kertoja ja sopivan solukonsentraation löydyttyä luumenrakenteita muodostui kehityksen aikana jokaisella kerralla, kun kasvatukset aloitettiin. Matrigeelin käytössä ilmeni kuitenkin myös ongelmia. 3D-kasvatusten aloittaminen vaatii tarkkuutta, koska työskentelyn tulee tapahtua jäällä, jotta matrigeelin polymerisoituminen tapahtuu halutulla tavalla ja lisäksi työskentely piti tapahtua steriilisti, jotta kontaminaatioilta vältyttiin. Kaksikerroksinen matrigeeli ”sandwich” huomattiin toimivaksi tavaksi kasvattaa organoideja, mutta kerrosten luominen vaatii aikaa ja reilusti matrigeeliä.

Matrigeelin saatavuus aiheutti ongelmia työtä tehdessä, joten jouduimme varmuuden vuoksi tutustumaan matrigeelin korvaaviin tekniikoihin ja materiaaleihin. Tulevaisuudessa esimerkiksi suomalainen GrowDex voisi tarjota tutkimusryhmän tarpeille sopivan 3D-kasvatusmatriksin. Se ei ole eläinperäinen tuote, jolloin sen käyttäminen 3D-kasvatuksissa olisi helpompaa, yksinkertaisempaa eikä tuote-erien välillä ilmene eroavaisuuksia. (Niklander ja Paasonen ei pvm.) Kuitenkin kokonaan uuden 3D-matriksin käyttöönotto vaatii tutkimusryhmältä paljon perehtymistä sekä uuden materiaalin tarkkaa optimointia.

Työssä käytettiin sekundäärisiä ihmisten adenokarsinomasoluja eli sellaisia soluja, jotka on kerätty ihmisen kudoksista ja pakastettu tulevaa tutkimuskäyttöä varten. Solut ovat nimenomaan tarkoitettu tutkimuksen välineeksi, jolloin ne eivät toimi aivan kuten solut ihmisen elimistössä toimisivat, vaan ne toimivat malleina syövän kehitykselle. Tämän vuoksi tulevaisuudessa kliinisten näytteiden käyttö voisi olla tärkeä askel eteenpäin tutkimuksessa. Olisi mielenkiintoista kasvattaa kliinisistä näytteistä saatuja soluja 3D-kasvatuksissa ja nähdä, miten Met1-Ub-ketjut toimivat näissä näytteissä. Se antaisi syövän kehittymisestä luultavasti vielä yhtä askelta todellisemman kuvan.

6.2 Met1-ubikitinaatitasot nousevat kolorektaalisyövän kehityksen aikana
Työn yksi tärkeimmistä hypoteeseista oli, että Met1-Ub-tasot nousevat kolorektaalisyövän kehityksen aikana 3D-syöpäsolumalliessa. Tiedettiin, että banaanikärpäsän immuunipuolustuksessa ja NF- κ B-välitteisessä tulehdusviestinnässä

Met1-ubikitinaatio on todella tärkeä ubikitinaation alatyyppejä, joka säätelee tulehdusviestintää kärkeänsä soluissa (A. Aalto ja muut 2022; A. L. Aalto ja muut 2019). Lisäksi myös hiirikokeissa on tutkittu paljon NF- κ B-viestintää ja huomattu sen säätelevän tulehdusvastetta (Westbrook ja muut 2010).

Saatu tulos vahvistaa työn ensimmäisen hypoteesin eli Met1-Ub-tasot tosiaan nousevat syövän kehityksen aikana. Havaittu tulos on ymmärrettävä, koska syövän kehityksen edetessä ja organoidien kasvaessa isommiksi, ne tarvitsevat enemmän ja enemmän esimerkiksi tulehdusta edistäviä tekijöitä ja näiden tekijöiden aktivaatio vaatii enemmän Met1-Ub-ketjuja. Lisäksi laskennallisessa määrittämisessä havaittiin tasojen nouseminen. Kuitenkin laskennallisessa määrittämisessä saatujen tulosten keskihajonnat olivat suuria. Se luultavasti selittyy määrittämisessä käytetyn menetelmän ongelmilla. Määrittäminen on hankala tehdä ubikitiniketjuista, koska ubikitinoidut proteiinit ovat eri kokoisia, joten ne esiintyvät usvana Western Blot-kuvassa. Yksittäistä palkkia Western Blot-kuvasta on paljon helpompi määrittää ImageJ-työkalun avulla, koska tällöin työkalu havaitsee ainoastaan yhden signaalin. Toinen menetelmää hankaloittava puoli on saadun Western Blot-kuvan mahdollinen likaisuus. Pienetkin mustat täplät ja varjot kuvassa aiheuttavat määrittämisessä virhettä. Työn aikana huomattiin 3D-kasvatuksista kerättyjen näytteiden aiheuttavan huomattavasti likaisempia kuvia kuin 2D-kasvatuksesta kerätyt näytteet. Syynä uskotaan olevan Met1-Ub-vasta-aineen herkkyys havaita pienetkin epäpuhtaudet ja jäämät esimerkiksi matrigelistä. Tulevaisuudessa olisi hyödyllistä kehittää tarkempi ja luotettavampi keino määrittää Ub-ketjuja laskennallisesti, jolloin esimerkiksi tilastollisten analyysien tekeminen olisi järkevämpää. Nykyisellä menetelmällä tilastolliseen analyysiin ei voitaisi luottaa menetelmän ongelmien vuoksi.

Toisena ongelmana tehdyissä kokeissa oli se, ettei päivän kolme tulosta voitu käyttää, koska näytteet sisälsivät hyvin vähän proteiinia. Tämä havainto selittyy luultavasti sillä, että päivänä kolme Caco2-solut ovat 3D-malleissa vielä yksittäisinä soluina ja ne eivät vielä ole ehtineet kasvaa tarpeeksi, jotta proteiineja olisi saatu kerättyä riittävästi kokeeseen. On myös mahdollista, etteivät Met1-Ub-ketjut ole vielä päivänä kolme kovin tärkeitä syövän kehityksen kannalta. Tulevaisuudessa voitaisiin kerätä myös enemmän näytettä, jotta saataisiin enemmän proteiineja, mutta matrigelin saannin hankaluuden sekä matrigelin hinnan vuoksi se ei luultavasti olisi kannattavaa. Päivän kolme näytteistä saatujen alustavien tulosten mukaan syövän kehitys ei ole vielä kovin

kiinnostavassa vaiheessa, jolloinärkevin tapa on jatkossa keskittyä syövän kehityksen myöhäisempiin vaiheisiin.

6.3 HOIPIN-1-käsittely vaikuttaa Met1-Ub-tasoihin sekä NF-κB-viestintään
Tuloksista nähtiin, että 24 h HOIPIN-1-käsittelyllä ei saatu aikaan faasikontrastikuvissa eikä Western Blot-menetelmällä merkittävää eroa kontrollinäytteisiin. Tulosten mukaan näyttää siltä, että HOIPIN-1-käsittely vaikuttaa 24 h aikana hieman organoidien kokoon sekä vähentää Met1-Ub-tasoja organoideissa, mutta se ei estä organoidien kehittymistä.

Tulosten pohjalta pohdittiin, miksei HOIPIN-1-käsittely saanut aikaan näkyviä tuloksia. Tultiin tulokseen, että 24 h kerta-annos HOIPIN-1-inhibiittoria ei ollut tarpeeksi tehokas vaikuttaakseen organoidien kehitykseen. Tämän vuoksi päätettiin kokeilla kasvatusta, jossa käsittelyä toistettiin jatkuvana koko organoidien kehityksen ajan. Faasikontrastikuvista näimme selkeästi, että organoidien muodostuminen häiriintyy ja lopulta estyy kokonaan jatkuvalla HOIPIN-1-käsittelyllä. Käsittely vaikuttaa toimivan hypoteesin mukaisesti estäen LUBAC-kompleksin toiminnan, mutta emme voi sulkea pois vaihtoehtoa, että 50 μM HOIPIN-1 on niin myrkyllinen soluille, että ne kuolevat sen vuoksi. Kuitenkin solujen kuolema voi johtua myös siitä, että solut tarvitsevat Met1-Ub-ketjuja selvitäkseen ja muodostaakseen organoideja.

Western Blot-tuloksista nähdään, että proteiinipitoisuuden määrittämisestä huolimatta päivän kolme näytteisiin ei saatu saman verran proteiinia kuin muiden päivien näytteisiin. Uskomme, että tulos selittyy syöpäsolujen olevan yksittäisinä soluina kehityksen aikaisissa vaiheissa, jolloin ei pystytä keräämään tarpeeksi materiaalia näytteeseen. Myöhemmissä 24 h käsittelyssä saatiin proteiinipitoisuuden määrittämisellä ladattua geelille saman verran proteiineja, mikä viittaa kasvatusten tarvitsevan aikaa, jotta ne alkavat tuottaa tarvitsemiaan proteiineja. Kuitenkin jatkuvassa HOIPIN-1-käsitellyistä näytteistä huomattiin, etteivät HOIPIN-1-käsitellyiden näytteiden proteiinimäärät vastanneet kontrollinäytteitä. Tämäkin tulos viittaa HOIPIN-1-käsittelyn tappavan solut niin, ettei aktiinin proteiinimäärä pysy samana. Jatkuvalla käsitellyllä Met1-Ub-tasot inhiboituvat kokonaan, mikä viittaa LUBAC-kompleksin kykenemättömyyteen rakentaa Met1-Ub-ketjuja. Tällöin on mahdollista, että

muodostuu kanonisen NF- κ B-viestinnän kompleksi II ja solut alkavat kuolemaan joko apoptoosin tai nekroptoosin kautta.

c-FLIP-P ja c-FLIP-L-proteiineista saadut tulokset ovat hypoteesin mukaisia eli kontrollinäytteissä c-FLIP on aktiivinen. Tämä tarkoittaa sitä, että se inhiboi apoptoosia ja näin ollen solut selviävät ja jatkavat kasvua. Kuitenkin nähdään, että HOIPIN-1-käsittelyn vaikutuksesta c-FLIP-proteiinien määrä vähenee syövän kehityksen aikana. Tämä viittaa siihen, että solut altistuvat apoptoosille. Faasikontrastikuvat tukevat päätelmää, koska myös niissä nähdään apoptoosiin viittavia vesikkelimäisiä rakenteita kehityksen loppuvaiheissa. Tarkemman solukuoleman tutkimisen kannalta jatkossa olisi tärkeä tehdä solujen elinkelpoisuusmittauksia. Näiden avulla voitaisiin määrittää esimerkiksi, kuinka nopeasti HOIPIN-1-käsittelyn jälkeen solut alkavat kuolla ja lisäksi olisi tärkeä kokeilla, mikä konsentraatio HOIPIN-1-inhibiittoria riittää tappamaan solut. Myös erilaisten apoptoosia ja nekroptoosia inhiboivien inhibiittoreiden käyttö voisi jatkossa tuottaa tietoa, miten solut todella kuolevat. Nämä tiedot voivat olla hyvin tärkeitä, kun kehitetään mahdollisia lääkkeitä kolorektaalisyövän kehittymistä vastaan.

qPCR-menetelmää varten optimoitiin alukkeita eri kohdegeeneille. IL-6- ja Bcl-2-geeneille saatiin optimoitua alukkeet, mutta tulokset eivät vaikuta vakuuttavilta. Kohdegeenien määrän luulisi nousevan syövän edetessä kontrollinäytteissä, koska ne ovat NF- κ B-viestinnän kohdegeenejä ja Western Blot-tuloksissa nähdään NF- κ B-aktivaation lisääntyvän. Tulos voi selittyä sillä, että aikapisteet ovat väärät ja proteiinit tuotetaan ennen tai jälkeen kerättyjen aikapisteiden. Erikoinen tulos voi johtua kuitenkin myös siitä, että alukkeet eivät ole spesifiset kohdegeeneille tai ongelmista RNA:n puhtauden kanssa. Lisäksi toistojen välillä on tuloksissa reilusti hajontaa, mikä viittaa myös siihen, että alukkeiden sitoutuminen on epäspesifistä. Tämä tarkoittaa, että oikeiden alukkeiden löytäminen vaatii lisää optimointityötä ja esimerkiksi uusien alukkeiden tilauksen, jotta voidaan varmistua, etteivät alukkeet ole esimerkiksi kontaminoituneet tai hajonneet kokeiden suorittamisen aikana. Lisäksi qPCR on menetelmänä herkkä virheille esimerkiksi pipetoinneissa, jolloin pienikin muutos pipetointilavuudessa voi vaikuttaa tulokseen. Työskentelyn aikana tehdyt virheet voivat hyvin todennäköisesti selittää tulosten epäloogisuutta.

7. Yhteenveto ja tulevaisuuden näkymät

Tämä pro gradu-työ keskittyi kolorektaalisyövän tutkimiseen 3D-syöpäsolumalleissa 2D-mallien sijasta, jotta voitaisiin paremmin kopioida syövän kehitystä sen luonnollisessa kasvuympäristössä (Duval ja muut 2017). Aiempia tutkimuksia Met1-ubikitinaatiosta ja kolorektaalisyövän kehityksestä on tehty muun muassa käyttämällä banaanikärpystä, *Drosophila melanogasteria*, malliorganismina (A. L. Aalto ja muut 2019) sekä hiirimalleja (Wirtz ja Neurath 2007). On havaittu, että Met1-Ub säätelee NF-κB-viestintää ja vaikuttaa kärpästen selviytymiseen (A. L. Aalto ja muut 2019). Eriyisenä mielenkiinnon kohteena tässä pro gradu -työssä oli selvittää Met1-Ub-tasot kolorektaalisyövän kehityksen eri vaiheiden aikana, kun käytetään ihmisen adenokarsinoomasoluja. Toisena tavoitteena oli selvittää, voisimmeko spesifisellä LUBAC-inhibiittorilla vaikuttaa syövän kehitykseen hidastavasti tai jopa estää sen kokonaan.

Alustavissa tutkimuksissa on saatu tietoa Met1-ubikitinaation roolista ihmisen eturauhasensyöpäsoluissa (PC3). Haluttiin selvittää Caco2-soluilla Met1-Ub-sidoksen merkitystä kolorektaalisyövän kehityksen aikana. 3D-syöpäsolumallilla kasvatettiin Caco2-soluista organoideja, joista pystyttiin määrittämään Met1-Ub ilmeneminen proteiinitasolla sekä käsittelemään organoideja kaupallisella HOIPIN-1-inhibiittorilla. Tutkimuksessa saatua tietoa voitaisiin käyttää lääkeaineiden suunnitteluun, joilla voitaisiin hoitaa tulehduksen vahvistamaa kolorektaalisyöpää ja tulehduksellisia suolistosairauksia.

Kaikista 24 h käsittelyn tuloksista voidaan päätellä, ettei 24 h HOIPIN-1-käsittely riitä pysäyttämään kolorektaalisyövän kehitystä 3D-syöpäsolumalliessa. Tulokset näyttävät kyllä lupaavilta, koska faasikontrastikuvista nähdään, että syöpä organoidit pienenevät HOIPIN-1-käsittelyn vaikutuksesta. Lisäksi Western Blot-tuloksista nähdään Met1-Ub-tasojen lasku. Kuitenkin jatkuvalla HOIPIN-1-käsittelyllä pystyttiin inhihoimaan Met1-ubikitinaation kokoamiskoneiston aktivaatiota, mikä vaikutti Met1-Ub-tasoihin. Nähtiin, että Met1-Ub-ketjujen puutuminen lopetti organoidien kehityksen.

Tulevaisuudessa olisi kiinnostavaa tutkia, missä vaiheessa syövän kehitystä Met1-Ub-ketjut ovat kaikkein tärkeimmässä roolissa syövän kehityksen kannalta. Tällöin voisimme mahdollisesti kohdentaa HOIPIN-1-inhibiittorin käyttöä tarkemmin kaikkein

optimaalisimpaan ajankohtaan. HOIPIN-1-inhibiittorin kokeilu myös muissa syöpämalleissa voisi antaa tärkeää tietoa syövän kehityksestä. Esimerkiksi hiirimallit ovat paljon käytetty tapa tutkia erilaisten lääkeaineiden vaikutusta, mutta ne ovat lisäksi kallis, aikaa vievä ja paljon koulutusta vaativa malliorganismi. Kuitenkin esimerkiksi CAM-mallit (*engl. chick-embryo chorioallantoic membrane*) ovat oivallisia malleja tutkittaessa lääkeaineiden vaikutusta. Niiden kasvattaminen ei vaadi erikseen lupia sekä se on huomattavasti edullisempaa kuin hiirimallien kasvattaminen. (DeBord ja muut 2018.) CAM-malleista saadut tulokset voisivat tuoda lisää tietoa inhibiittorin toiminnasta ja mahdollisuudesta käyttää sitä hillitsemään kolorektaalisyövän kehittymistä. CAM-malleista voisimme saada arvokasta tietoa myös siitä, miten inhibiittori vaikuttaa syövän kehittymiseen, kun kasvain käyttää kasvuunsa elävää organismia.

Lisäksi tieto HOIPIN-1 vaikutuksesta organismin elintoimintoihin olisi tutkimuksen jatkumisen kannalta hyvin arvokasta. Inhibiittoria voitaisiin kokeilla esimerkiksi 3D-kasvatuksissa, joissa on käytetty useampaa kuin yhtä solutyyppeä. Olisi mielenkiintoista käsitellä HOIPIN-1-inhibiittorilla syöpäsoluista ja fibroblasteista muodostuvia organoideja ja katsoa miten se toimii syöpäsoluihin ja normaaleihin soluihin. Tällä hetkellä epävarmuus HOIPIN-1-inhibiittorin toiminnasta hillitsemään ainoastaan syöpäsolujen kasvua on vielä olemassa, vaikka hypoteesina onkin sen olevan spesifinen inhibiittori ainoastaan Met1-Ub-ketjuille ja syöpäsoluille. Normaaleissa soluissa, joissa tulehdusta ei esiinny ei pitäisi esiintyä myöskään Met1-Ub-sidoksia. Tällöin inhibiittorin ei hypoteesin mukaan pitäisi vaikuttaa normaaleihin soluihin lainkaan.

Myös alhaisempien HOIPIN-1 konsentraatioiden tutkiminen toisi arvokasta tietoa inhibiittorin toiminnasta ja sen mahdollisista käyttötarkoituksista. Markkinoille on myös tuotu HOIPIN-8 inhibiittori ja saatujen tulosten pohjalta, sen on huomattu olevan spesifisempi ja tehokkaampi kuin HOIPIN-1-inhibiittorin. Se voisi olla parempi inhibiittori tämän kaltaiseen tutkimukseen ja sen kokeilu olisi myös jatkossa hyödyllistä. Lisätieto inhibiittorista ja sen toiminnasta voisi tulevaisuudessa luoda mahdollisuuden hoitaa kolorektaalisyöpää sekä valmistaa erilaisia spesifisiä syöpälääkkeitä. (Katsuya ja muut 2019.)

Kirjallisuus

- Aalto, A. L., Mohan, A. K., Schwintzer, L., Kupka, S., Kietz, C., Walczak, H., ... Meinander, A. (2019) M1-linked ubiquitination by LUBEL is required for inflammatory responses to oral infection in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **26**:860–876.
- Aalto, A., Martínez-Chacón, G., Kietz, C., Tsyganova, N., Kreutzer, J., Kallio, P., ... Meinander, A. (2022) M1-linked ubiquitination facilitates NF- κ B activation and survival during sterile inflammation. *FEBS J*.
- Chen, J., Kos, R., Garssen, J. & Redegeld, F. (2019) Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome as a Potential Therapeutic Target. *Cells* **8**:1486.
- Courtois, G. & Gilmore, T. D. (2006) Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: Implications for human disease. *Oncogene* **25**:6831–6843.
- Damgaard, R. B., Walker, J. A., Marco-Casanova, P., Morgan, N. V., Titheradge, H. L., Elliott, P. R., ... Komander, D. (2016) The Deubiquitinase OTULIN Is an Essential Negative Regulator of Inflammation and Autoimmunity. *Cell* **166**:1215-1230.e20.
- DeBord, L. C., Pathak, R. R., Villaneuva, M., Liu, H.-C., Harrington, D. A., Yu, W., ... Sikora, A. G. (2018) The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res* **8**:1642–1660.
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J. & Chen, Z. (2017) Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* **32**:266–277.
- Fiil, B. K. & Gyrd-Hansen, M. (2021) The Met1-linked ubiquitin machinery in inflammation and infection. *Cell Death Differ* **28**:557–569.
- French, M. E., Koehler, C. F. & Hunter, T. (2021) Emerging functions of branched ubiquitin chains. *Cell Discov* **7**:6.
- Fujita, H., Tokunaga, A., Shimizu, S., Whiting, A. L., Aguilar-Alonso, F., Takagi, K., ... Iwai, K. (2018) Cooperative Domain Formation by Homologous Motifs in HOIL-1L and SHARPIN Plays A Crucial Role in LUBAC Stabilization. *Cell Rep* **23**:1192–1204.
- Gerlach, B., Cordier, S. M., Schmukle, A. C., Emmerich, C. H., Rieser, E., Haas, T. L., ... Walczak, H. (2011) Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* **471**:591–596.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D. & Boyse, E. A. (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**:11–15.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**:57–70.

- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**:646–674.
- Hardwick, J. M. & Soane, L. (2013) Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**:a008722.
- Harhaj, E. W. & Dixit, V. M. (2011) Deubiquitinases in the regulation of NF- κ B signaling. *Cell Res* **21**:22–39.
- Hershko, A., Ciechanover, A. & Varshavsky, A. (2000) The ubiquitin system. *Nat Med* **6**:1073–1081.
- Hospenthal, M. K., Mevissen, T. E. T. & Komander, D. (2015) Deubiquitinase-based analysis of ubiquitin chain architecture using Ubiquitin Chain Restriction (UbiCRest). *Nat Protoc* **10**:349–361.
- Häcker, H. & Karin, M. (2006) Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* **2006**:re13.
- Ikeda, F., Deribe, Y. L., Skånland, S. S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., ... Dikic, I. (2011) SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- κ B activity and apoptosis. *Nature* **471**:637–641.
- Jahan, A. S., Elbæk, C. R. & Damgaard, R. B. (2021) Met1-linked ubiquitin signalling in health and disease: Inflammation, immunity, cancer, and beyond. *Cell Death Differ* **28**:473–492.
- Katsuya, K., Hori, Y., Oikawa, D., Yamamoto, T., Umetani, K., Urashima, T., ... Tamaru, M. (2018) High-Throughput Screening for Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC) Selective Inhibitors Using Homogenous Time-Resolved Fluorescence (HTRF)-Based Assay System. *SLAS Discov Adv Sci Drug Discov* **23**:1018–1029.
- Katsuya, K., Oikawa, D., Iio, K., Obika, S., Hori, Y., Urashima, T., ... Tokunaga, F. (2019) Small-molecule inhibitors of linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC), HOIPINs, suppress NF- κ B signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **509**:700–706.
- Kirisako, T., Kamei, K., Murata, S., Kato, M., Fukumoto, H., Kanie, M., ... Iwai, K. (2006) A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J* **25**:4877–4887.
- Komander, D. & Rape, M. (2012) The Ubiquitin Code. *Annu Rev Biochem* **81**:203–229.
- Komander, D., Reyes-Turcu, F., Licchesi, J. D. F., Odenwaelde, P., Wilkinson, K. D. & Barford, D. (2009) Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO Rep* **10**:466–473.
- Kraus, S. & Arber, N. (2009) Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol* **9**:405–410.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* **2**:1–9.

- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* **454**:436–444.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. & Rodríguez Yoldi, M. J. (2017) Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **18**:197.
- Niklander, J. & Paasonen, L. Breast Cancer Cell Line MCF7 3D Culture Demonstrated in GrowDex® and Matrigel. 4.
- Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F. & Correia, I. J. (2019) 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. *Biotechnol Bioeng* **116**:206–226.
- Oeckinghaus, A. & Ghosh, S. (2009) The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**:a000034.
- Oikawa, D., Sato, Y., Ohtake, F., Komakura, K., Hanada, K., Sugawara, K., ... Tokunaga, F. (2020) Molecular bases for HOIPINs-mediated inhibition of LUBAC and innate immune responses. *Commun Biol* **3**:163.
- Pahwa, R., Goyal, A. & Jialal, I. (2022) Chronic Inflammation. Teoksessa *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Noudettu osoitteesta <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>
- Peltzer, N., Darding, M., Montinaro, A., Draber, P., Draberova, H., Kupka, S., ... Walczak, H. (2018) LUBAC is essential for embryogenesis by preventing cell death and enabling haematopoiesis. *Nature* **557**:112–117.
- Rittinger, K. & Ikeda, F. (2017) Linear ubiquitin chains: Enzymes, mechanisms and biology. *Open Biol* **7**:170026.
- Rodríguez Carvajal, A., Grishkovskaya, I., Gomez Diaz, C., Vogel, A., Sonn-Segev, A., Kushwah, M. S., ... Ikeda, F. (2021) The linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC) generates heterotypic ubiquitin chains. *eLife* **10**:e60660.
- Sachs, N. & Clevers, H. (2014) Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev* **24**:68–73.
- Safa, A. R. (2012) C-FLIP, A MASTER ANTI-APOPTOTIC REGULATOR. *Exp Oncol* **34**:176–184.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S. & Longacre, M. (2013) Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci* **14**:21087–21113.
- Sasaki, K. & Iwai, K. (2015) Roles of linear ubiquitylation, a crucial regulator of NF- κ B and cell death, in the immune system. *Immunol Rev* **266**:175–189.
- Sato, T. & Clevers, H. (2013) Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science* **340**:1190–1194.

Schuster, M., Annemann, M., Plaza-Sirvent, C. & Schmitz, I. (2013) Atypical I κ B proteins – nuclear modulators of NF- κ B signaling. *Cell Commun Signal* **11**:23.

Shin, C. S., Kwak, B., Han, B., Park, K. & Panitch, A. (2013) 3D cancer tumor models for evaluating chemotherapeutic efficacy. *Teoksessa Biomaterials for Cancer Therapeutics* (ss. 445–460). Elsevier.

Singh, N., Baby, D., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Thakkannavar, S. S. & Pujari, V. B. (2019) Inflammation and Cancer. *Ann Afr Med* **18**:121–126.

Smit, J. J., Monteferrario, D., Noordermeer, S. M., van Dijk, W. J., van der Reijden, B. A. & Sixma, T. K. (2012) The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension. *EMBO J* **31**:3833–3844.

Swatek, K. N. & Komander, D. (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Res* **26**:399–422.

Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**:a016295.

Tenno, T., Fujiwara, K., Tochio, H., Iwai, K., Morita, E. H., Hayashi, H., ... Shirakawa, M. (2004) Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains. *Genes Cells* **9**:865–875.

Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., ... Iwai, K. (2011) SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* **471**:633–636.

Wertz, I. E. & Dixit, V. M. (2010) Signaling to NF- κ B: Regulation by ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a003350.

Westbrook, A. M., Szakmary, A. & Schiestl, R. H. (2010) Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: Lessons learned from mouse models. *Mutat Res Mutat Res* **705**:40–59.

Wirtz, S. & Neurath, M. (2007) Mouse models of inflammatory bowel disease ☆. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:1073–1083.

Yamanaka, K., Ishikawa, H., Megumi, Y., Tokunaga, F., Kanie, M., Rouault, T. A., ... Iwai, K. (2003) Identification of the ubiquitin–protein ligase that recognizes oxidized IRP2. *Nat Cell Biol* **5**:336–340.

Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H. & Hu, H. (2020) Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: Mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther* **5**:1–23.

Atlas of Anatomy, Latin Nomenclature, Anne M Gilroy, Brian R MacPherson, Jamie Wikenheiser, Michael Schuenke, Erik Schulte, Udo Schumacher, luettu 20.4.2022.

World Health Organization, WHO: colorectal cancer statistics

(<https://www.iarc.who.int/featured-news/colorectal-cancer-awareness-month-2022/>: viitattu 20.4.2022)

Suomen syöpä rekisteri, 2019 raportti

(https://syoparekisteri.fi/assets/files/2021/07/Syopa_2019_Tilastoraportti_0107.pdf: viitattu 20.4.2022)

Nikon Microscopy; The source for microscopy education, Introduction to Phase Contrast Microscopy

(<https://www.microscopyu.com/techniques/phase-contrast/introduction-to-phase-contrast-microscopy>: viitattu 1.6.2022)

Life Sensors; M1 Linear Ubiquitin TUBE (M1 Linear Ubiquitin TUBE - Detect Polyubiquitin Proteins – LifeSensors, viitattu 15.8.2022)

Corning; matrigel-matrix

(<https://www.corning.com/in/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html>: viitattu 16.9.2022)

Cell Signaling, NF- κ B D14E12

(<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/nf-kb-p65-d14e12-xp-rabbit-mab/8242>: viitattu 17.11.2022)

Cell Signaling, Phospho-NF- κ B p65 (Ser536) (93H1)

(<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/phospho-nf-kb-p65-ser536-93h1-rabbit-mab/3033>: viitattu 17.11.2022)