

Pro gradu -tutkielma

**C8161-melanoomasolulinjan erittämien tekijöiden
vaikutus fibroblastien hyaluronaanituotantoon**

Piia Takabe



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

01.11.2011

KIITOKSET

Haluan kiittää suuresti ohjaajaani Sanna Pasonen-Seppästä opinnäytetyöni ohjauksesta ja etenkin sen kirjoitusvaiheessa saaduista kannusteista jaksaa kirjoittaa ja saada työni loppuun. Opinnäytetyön laboratorio-osuuden tekeminen oli mielenkiintoista ja monipuolista sekä saadut hyvät tulokset kannustivat jatkamaan laboratoriotöitä eteenpäin.

Haluan kiittää myös prof. Raija Tammea hänen ohjauksestaan ja professoreja Markku ja Raija Tammea heidän innostavasta asenteestaan tieteeseen sekä heidän tutkimusryhmänsä kannustavasta tutkimusilmapiiristä.

Haluan ilmaista myös suuren kiitoksen koko anatomian yksikön henkilökunnalle. Erityisesti haluan kiittää Riikka Kärnäa hänen kaikista käytännönneuvoistaan ja tietämyksestään ja osaamisestaan laboratoriotöissä. Haluan myös antaa kiitoksen Kirsi Rillalle konfokaalimikroskooppiopetuksesta, Kari Törröselle kaikesta ATK-avusta, Eija Kettuselle ELSA-menetelmän opetuksesta ja Tuula Venäläiselle hyaluronaaninäytteiden kromatografisesta määrittämisestä sekä kaikille muille anatomian yksikön henkilökuntaan kuuluville, jotka otitte minut lämpimästi vastaan noviisina opiskelijana ja autoitte minua töidenne lomassa.

Haluan myös kiittää koko sydämestäni miestäni, Juha Takabea, olet tukenut minua koko opiskeluni ajan kaikkina näinä vuosina ja muistanut aina palauttaa minut maanpinnalle suurten paineiden alla yhteensopivalla huumorintajullamme. Haluan myös kiittää perhettäni tuesta sekä taloudellisesta että käytännön avusta ja rakkaudesta kaikkien näiden vuosien aikana.

Tämän opinnäytetyön tekemisen on rahoittanut Paavo Koistisen säätiö.

Kuopiossa 1.11.2011



Piia Takabe

Tekijä:	Piia Takabe	
Tutkielman nimi:	C8161-melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutus fibroblastien hyaluroaanituotantoon.	
English title:	C8161 melanoma cell line secreting factors that affect on fibroblast hyaluronan synthesis.	
Päivämäärä:	01.11.2011	Sivumäärä: 56 + 10
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Molekyylibiologia	
Tutkielman ohjaajat:	FT Sanna Pasonen-Seppänen ja Professori Raija Tammi	
Tutkielman tarkastajat:	Professori Markku Tammi ja Professori Jaana Bamford	

Tiivistelmä:

Hyaluroonaani on suurikokoinen soluväliaineen sokerirakenne. Se koostuu toistuvista sokerimolekyyleistä N-asetyyli-glukosaminista ja glukuronihaposta. Hyaluroonaani syntetisoidaan solukalvolla hyaluroonaanisyntaasin (HAS) toimesta, joita nisäkkäillä on kolme isomuotoa (HAS1-3). Hyaluroonaanin hajotus tapahtuu hyaluronidaasientsyymien (Hyal) toimesta. Hyaluroonaanin pääasiallinen solukalvoreseptori on CD44, jonka avulla hyaluroonaaniketjut ovat sitoutuneet solukalvoon. Hyaluroonaania esiintyy runsaasti etenkin sidekudoksessa ja kerrostuneessa epiteelissä kuten ihossa. Hyaluroonaanin määrän on havaittu lisääntyneen syövässä ja tämä korreloi useasti potilaan huonon ennusteen kanssa. Hyaluroonaanin lisääntyneen määrän kasvainten stroomassa on havaittu tarjoavan hyvän ympäristön solujen jakaantumiselle ja migraatiolle. Usein tämä strooman hyaluroonaani on kasvainta ympäröivien solujen tuottamaa, jotka ovat aktivoituneen kasvainsolujen erittämien tekijöiden vaikutuksesta.

Melanosyytit ovat ihon epidermaalisen kerroksen soluja, jotka tuottavat melaniini-pigmenttiä. Melaniini suojaaa ihon epidermaalisesta kerroksen keratinosyytejä UV-valon haitallisilta vaikutuksilta. Melanooman kehityksessä melanosyytit alkavat jakaantua yliaktiivisesti ja muodostavat hyvänlaatuisen kasvaimen, joka myöhemmin muuntuu pahanlaatuiseksi melanoomaksi. Kasvainsolut toimivat vuorovaikutuksessa toistensa ja ympäröivien solujen kanssa. Melanoomassa fibroblastit muokkaavat kasvaimen stroomaa ja säätelevät tulehdusvastetta. Melanooman invaasiolle paikallisen sidekudoksen hajotus on välttämätön prosessi. Fibroblastit tuottavat pääasiassa näitä solunulkoisen välitilan hajottavia proteiineja, matriksin metalloproteiinaaseja, jotka ovat tärkeässä roolissa kasvainsolujen invaasiossa ympäröiviin kudoksiin.

Melanoomasolut erittävät erilaisia kasvutekijöitä, jotka säätelevät fibroblastien aktivaatiota melanooman kehityksessä. Etenkin kasvainsolujen erittämä TGF- β toimii kasvaimen kehittymisen alkuvaiheessa sitä hillitsevä tekijänä ja sen loppuvaiheessa aktivoivana tekijänä. Myös PDGF ja VEGF ovat tärkeitä kasvutekijöitä kasvaimen invasiivisen kasvun aikana, mikä aktivoi angiogeneesin kehitystä. Syöpäsolujen erittämien tekijöiden vaikutuksesta erilaiset signaalintireitit kuten PI3K-AKT ja EGFR-MAPK aktivoituvat niissä itsessään ja ympärillä olevissa fibroblasteissa ja keratinosyyteissä.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia metastoivan C8161-melanoomasolulinjan erittämien tekijöiden vaikutusta ihon fibroblastien hyaluroaanisynteesiin ja solujen morfologiaan. Tarkoituksena oli selvittää hyaluroaanimetaboliaan liittyvien geenien ilmentymistä qPCR-menetelmällä, proteiinitason muutoksia Western blot -menetelmällä sekä tutkia solujen morfologisia muutoksia immunohistokemiallisilla värjäyksillä. Tehdyt kokeet osoittavat C8161-melanoomasolujen erittävän kasvuliukseensa tekijöitä, jotka aktivoivat fibroblasteissa hyaluroaanisynteesiä. Etenkin seerumin sisältävä kasvatusliuoskäsittely lisäsi huomattavasti fibroblastien Has2:n mRNA:n ilmentymistä, mikä vahvistettiin myös proteiinitasolla. Käsittelyllä ei havaittu olevan vaikutusta CD44:n ja Hyal2:n mRNA tasoihin. Kasvatusliuoskäsittelyn johdosta fibroblastien morfologia muuttui, ja tämä ilmeni solun muodostamina pitkinä ulokkein viereisiin soluihin. Tämän opinnäytetyön tuloksista voidaan päätellä melanoomasolujen erittävän tekijöitä, jotka lisäävät fibroblastien hyaluroaanisynteesiä HAS2-välitteisesti ja käsittelyllä on vaikutusta solujen morfologiaan.

Avainsanat: melanooma, fibroblasti, solujenvälinen vuorovaikutus, hyaluroonaani, hyaluroonaani syntaasi, hyaluronidaasi

Author: Piia Takabe
Title of thesis: C8161 melanoma cell line secreting factors that affect on fibroblast hyaluronan synthesis.
Finnish title: C8161-melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutus fibroblastien hyaluroonituotantoon.
Date: 01.11.2011 **Pages:** 56 + 10
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular Biology
Supervisors: PhD Sanna Pasonen-Seppänen and Professor Raija Tammi
Inspectors: Professor Markku Tammi and Professor Jaana Bamford

Abstract:

Hyaluronan is a high molecular weight carbohydrate. It is synthesized by hyaluronan synthases (HAS) from glukuronic acid and N-acetylglucosamine. There are three isoforms (1–3) of hyaluronan synthases among mammals. Hyaluronan has few specific cell membrane receptors. The main hyaluronan receptor is CD44. CD44 links hyaluronan chains to the plasma membrane. Hyaluronan is an extracellular component of connective tissue and stratified epithelium. Increased amount of hyaluronan has been characterized among many cancer types and this often correlates with poor patient prognosis.

Cutaneous melanoma develops from skin epithelium where pigment producing cells, melanocytes, become malignant. Melanocytes produce melanin pigment which protects keratinocytes from damaging agents of UV-light. In melanoma progression, melanocytes start to divide hyperactively and at first form dysplastic nevi that later can become malignant. Tumor cells interact with each other and the surrounding cells in the surrounding tumor environment called tumor-stroma. Connective tissue fibroblasts act as a tumor stroma modifiers. They also act in the inflammation process and secrete many growth factors and other signaling molecules, as well as extracellular matrix degrading molecules (MMPs). These help the tumor cells to invade in to adjacent tissues and also promote angiogenesis.

Tumor cells secrete several growth factors and other signaling molecules that activate fibroblasts. Especially malignant cells secrete TGF- β , which acts in pre-malignant phase as a growth inhibiting factor and later in the opposite way, as a growth activator. There are also studies showing that PDGF and VEGF have an important role in tumor invasion and development of angiogenesis. Tumor cells secrete growth factors by autocrine and paracrine fashion and activate several signaling cascades like PI3K-AKT and EGFR-MAPK. These signaling cascades often lead to cancer cell proliferation and development in to the metastatic phase of the tumor.

In this Master thesis work we studied how C8161-melanoma cell line conditioned medium affects hyaluronan synthesis and morphology of dermal fibroblasts. We wanted to find out how this conditioned medium influences fibroblasts hyaluronan biosynthesis in mRNA and protein level. These results show that C8161-melanoma cells secrete factors that activate hyaluronan synthesis in dermal fibroblasts. We determined alterations in hyaluronan biosynthesis with qPCR and Western blot methods and found out that conditioned medium increased especially Has2-gene upregulation which was verified also in protein level. We also found out that this treatment produced morphological changes in fibroblasts. These fibroblasts formed long protrusions to adjacent cells. To conclude this Master thesis studies, melanoma cells secrete factors that increase dermal fibroblast hyaluronan synthesis by upregulating HAS2 and activating morphological changes in fibroblasts.

Keywords: melanoma, fibroblast, cell-cell interaction, hyaluronan, hyaluronan synthase, hyaluronidase

Sisällysluettelo

Kiitokset.....	2
Lyhenteet	7
1. JOHDANTO.....	8
1.1 Melanooma.....	8
1.1.1 Ihon rakenne ja melanosyytit	8
1.1.2 Melanooman kehittyminen.....	9
1.1.3 Melanooman riskitekijät ja mutaatiot.....	11
1.2 Hyaluronaani	12
1.2.1 Hyaluronaanin rakenne.....	12
1.2.2 Hyaluronaanisyntaasit	14
1.2.3 Hyaluronaanisyntaasien säätely	14
1.2.4 Hyaluronaanin reseptorit	15
1.2.5 Hyaluronaanin hajotus.....	16
1.3 Kasvaimen ympäristö.....	17
1.3.1 Fibroblastit ja kasvaimen strooma.....	17
1.3.2 Hyaluronaani ja syöpä	18
1.4 Matriksin metalloproteiinaasit.....	19
1.5 Signaaliointi	20
1.5.1 Transformoiva kasvutekijä beeta.....	20
1.5.2 Vaskulaarinen endoteliaalinen kasvutekijä	21
1.5.3 Verihiutalekasvutekijä ja fibroblastikasvutekijä	22
1.5.4 PI3K-AKT signaaliointireitti.....	23
1.5.5 EGFR-MAPK signaaliointireitti	24
2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS.....	26
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	27
3.1 Kasvatusliuoksen kerääminen	27
3.2 Solujen käsittely	27
3.3 Hyaluronaanin määrittäminen ELISA-tyyppisellä menetelmällä (HA-ELSA).....	28
3.4 Proteiininäytteiden keräys ja Western blot	29
3.4.1 Proteiininäytteiden eristys	29
3.4.2 Western blot	29
3.4.3 HAS2 vasta-ainevärväys	30
3.4.4 CD44 ja alfa-SMA vasta-ainevärväys.....	30
3.5. RNA-näytteet ja qPCR.....	31
3.5.1 RNA-eristys.....	31
3.5.2 cDNA synteesi.....	31
3.5.3. Kvantitatiivinen PCR	32
3.5.4. Kvantitatiivisen PCR ajon analysointi	32
3.6. Arrayt	32
3.6.1. Sytokiini- ja angiogeneesiarrayt.....	32
3.6.2 Fosfokinaasi Array	33
3.6.3 Array-filmien tulkinta.....	33
3.7 Konfokaali- ja valomikroskooppinäytteet.....	34
3.7.1 Hyaluronaanivärväys.....	34
3.7.2 Punasolukoe.....	34

3.7.3 Hyaluronaani- ja CD44-värjäys konfokaalimikroskopiaan.....	34
3.8 Tilastollinen analyysi	35
4. TULOKSET	36
4.1 HA-ELSA tulokset.....	37
4.2 qPCR-tulokset	40
4.3 Western blot -tulokset	41
4.4 Konfokaali- ja valomikroskooppivärjäykset	43
4.5 Array-tulokset	48
5. TULOSTEN TARKASTELU	51
LÄHDELUETTELO	57

LYHENTEET

α -SMA	Alfa-sileälihas aktiini (alfa smooth muscle actin)
AP-2 α	Aktivaattoriproteiini 2 alfa
BMP	Luun morfogeneettinen proteiini
CAF	Aktivoituneet fibroblastisolut (cancer associated fibroblasts)
CD44	Solukalvon proteiini, hyaluronaanireseptori
ECM	Solun ulkoinen väliaine (extracellular matrix)
EGF	Epidermaalinen kasvutekijä
EGFR	Epidermaalinen kasvutekijäreseptori
FGF	Fibroblastikasvutekijä
FGFR	Fibroblastikasvutekijäreseptori
GlcNAc	N-asetyyli-glukosamiini
GlcUA	Glukuronihappo
HA-ELSA	Hyaluronaanin biokemiallinen määrittäminen
HABR	Hyaluronaania sitova alue
HAS	Hyaluronaania syntetisoiva entsyymi, hyaluronaanisyntaasi
Hyal	Hyaluronaania pilkkova entsyymi, hyaluronidaasi
ICAM-1	Solujen välinen adheesiomolekyyli 1 (inter cellular adhesion molecule 1)
IL	Interleukiini
MAPK	Mitogeeniaktivoitu proteiinkinaasi (signalointireitti)
MMP	Matriksin metalloproteinaasi
PAR-1	Proteaasiaktivoitu reseptori 1
PB	Fosfaattipuskuri
PBS	Fosfaattipuskuri (suolainen)
PDGF	Verihiutalekasvutekijä
PDGFR- α	Verihiutalekasvutekijäreseptori alfa
PI3K	Fosfatidyli-inositoli 3 kinaasi (signalointireitti)
RHAMM	Hyaluronaanireseptori
TIMP	Kudoksen matriksin metalloproteinaasien inhibiittori
TGF- α	Transformoiva kasvutekijä alfa
TGF- β	Transformoiva kasvutekijä beeta
TNF- α	Kasvaimen nekroositekijä alfa
VEGF	Vaskulaarinen endotelialinen kasvutekijä
VEGFR	Vaskulaarinen endoteelikasvutekijäreseptori
qPCR	Kvantitatiivinen PCR (polymeraasi ketjureaktio)

1. JOHDANTO

1.1 Melanooma

Ihosta peräisin oleva melanooma kehittyy ihon epidermaalisen kerroksen soluista, melanosyyteistä (Slominski ym., 2001). Melanoomakasvaimet ovat yleistyneet viime vuosien aikana ja melanooma kuuluukin nykypäivänä yleisimpien syöpien joukkoon (Jemal ym., 2005). Suomessa todetaan vuosittain yli 900 uutta melanoomaa (cancer.fi) ja kuolleisuus melanoomaan on yli kaksinkertaistunut Suomessa vuodesta 1969 vuoteen 2009 (Tilastokeskuksen PX-Web-tietokannat) ja noin yksi viidestä diagnosoidusta potilaasta kuolee pahanlaatuisen kasvaimen (Weeraratra ym., 2002). Kuolleisuus melanoomaan käsittää vuositasolla noin 1,6 % kaikista syövästä, molempien sukupuolten yhteenlasketuissa tilastoissa (Tilastokeskuksen PX-Web-tietokannat). Melanoomaa esiintyy etenkin valkoihoisessa (kaukasialainen) väestössä. Suurimpina riskitekijöinä melanooman kehittymisessä ovat vaalea ihonväri, vaaleat tai punapigmenttiset hiukset, pisamat sekä taipumus palaa helposti auringossa. Jopa 65 % melanoomakasvaimista on kehittynyt auringon ultraviolettivalon (UV) aiheuttamista muutoksista (ks. katsausartikkeli Bandarchi ym., 2010).

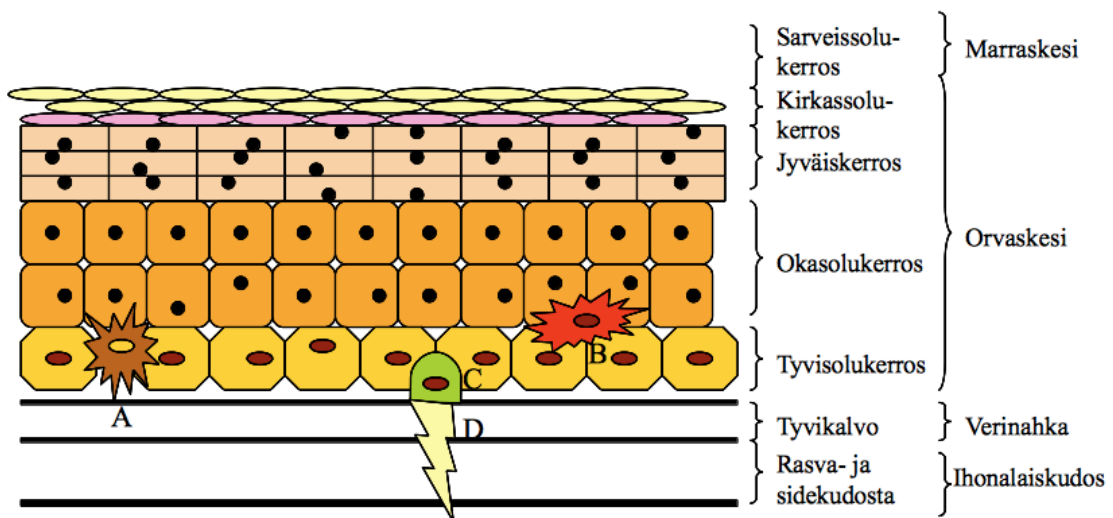
Melanosyyttien kasvuhäiriö (dysplasia) johtaa yleensä hyvänlaatuisen kasvaimen, joka voi myöhemmin muuntua pahanlaatuiseksi (ks. katsausartikkeli Gaggioli ja Sahai, 2007). Melanooman kehitys alkaa muutamasta melanosyyttisolusta, jotka muuntuvat pahanlaatuiseksi melanosyyttisoluiksi ja myöhemmin melanoomasoluiksi. Hyvänlaatuisen kasvaimen kehittyminen melanoomaksi voi viedä jopa useita vuosia (Slominski ym., 2001). Melanooman diagnosoinnissa tärkeitä vaiheita ovat mm. epätyypillisten melanosyyttien ilmenemisen havaitseminen (Slominski ym., 2001) sekä näiden aikainen diagnosointi, koska silloin melanooma voidaan vielä kirurgisesti poistaa. Melanoomakasvaimen paksuus on myös yksi tärkeimmistä eloonjäämisennusteista, jonka perusteella voidaan ennustaa kasvaimen kehitystä ja invasiivisuutta metastoivaksi kasvaimeksi (Tejera-Vaquerizo ym., 2010). Metastaasivaiheeseen edennyt melanooma on parantumaton ja kuolleisuus potilaiden keskuudessa on suuri. Metastaasivaiheessa oleva melanooma on usein resistentti kemoterapialle ja radioterapialle (ks. katsausartikkeli Bandarchi ym., 2010). Kuitenkin potilaat ovat yksilöllisiä ja kasvaimen kehitystä on usein vaikea ennustaa, mutta useimmissa tapauksissa kuitenkin kasvaimen tiheys, haavautuminen sekä solujen nopea jakaantuminen (proliferaatio) ovat merkkejä aggressiivisemmasta ja nopeammin kehittyvästä kasvaimesta (Tejera-Vaquerizo ym., 2010).

1.1.1 Ihon rakenne ja melanosyytit

Iho (Kuva 1) koostuu kolmesta kerroksesta: orvaskedestä (epidermis), verinahasta (dermis) sekä ihonalaisesta kudoksesta (ks. katsausartikkeli Fuchs, 2007). Valtaosa epidermiksen soluista on keratinosyyttejä, mutta melanosyytit, Langerhansin solut ja Merkelin solut kuuluvat myös epidermikseen (ks. katsausartikkeli Bandarchi ym., 2010). Iho toimii elimistön suojaavana kerroksena ulkoisia haittoja kuten mikrobeja, UV-säteilyä ja vaurioita vastaan (ks. katsausartikkeli Fuchs, 2007). Ihon dermaalinen kerros eli verinahka koostuu sidekudoksesta, joka sisältää paljon hermopäätteitä ja verisuonia. Dermiksen tyypillisimpiä soluja ovat fibroblastit. Dermaalisen kerroksen alapuolella on

ihonalaiskudos, joka koostuu löyhästä sidekudoksesta, rasvakudoksesta ja muutamista sileistä lihassoluista (ks. katsausartikkeli Gurtner ym., 2007).

Melanosyytit ovat ihon epidermaalisen kerroksen pigmenttiä tuottavia soluja, mitkä muodostuvat jo alkionkehityksen aikana hermostopienen soluista ja vaeltavat ihon epidermaaliseen kerrokseen (ks. katsausartikkeli Bandarchi ym., 2010). Melanosyytit toimivat vuorovaikutuksessa ihon eri kerrosten solujen kanssa, kuten keratinosyyttien, fibroblastien, endoteelisolujen sekä immuunipuolustuksen solujen (Lee ja Herlyn, 2007). Melanosyyttien tärkein tehtävä ihossa on tuottaa melaniinipigmenttiä, joka kuljetetaan melanosomivesikkeleissä melanosyyttien ympärillä oleville keratinosyyteille. Keratinosyyteissä melaniini kuljetetaan tuman ympärille suojaamaan soluja UV-valon haitallisilta vaikutuksilta (ks. katsausartikkeli Bandarchi ym., 2010).



A = Melanosyytti, B = Langerhansin solu, C = Merkelin solu, D = Hermopääte, muut solut = Keratinosyytit

Kuva 1. Ihon eri kerrokset. Iho koostuu useista kerroksista, jotka puolestaan koostuvat erityyppisistä soluista. Melanosyytit kuuluvat orvaskeden eli epidermaalisen kerroksen tyvikerrokseen. Pääasiallisin orvaskeden solutyyppi on keratinosyytit, jotka erilaistuvat tyvikerroksesta kohti sarveissolukerrosta. Fibroblastit puolestaan kuuluvat ihossa verinahkkerrokseen. Kuva on muokattu www.solunetti.fi -sivustolta, histologian osasta.

1.1.2 Melanooman kehittyminen

Melanoomakasvaimet luokitellaan kasvaimen tyyppin mukaan eri vaiheisiin. Aluksi dysplastinen luomi alkaa levitä ihon epidermaalisessa kerroksessa ja siihen alkaa kehittyä melanoomasoluja. Tätä vaihetta kutsutaan kasvaimen säteittäiseksi kasvuvaiheeksi (RGP, radial growth phase). Säteittäisesti kasvava melanoomakasvain saadaan poistettua vielä kirurgisesti ja elinennuste tässä vaiheessa on vielä hyvä (ks. katsausartikkeli Bandarchi ym., 2010). Säteittäisen kasvuvaiheen aikana melanoomasolut alkavat vähitellen kehittyä pahanlaatuisemmiksi syöpäsoluiksi ja kasvava solurykelmä alkaa tunkeutua (invaasio) alla olevaan ihonalaiskudokseen. Tämä johtaa melanoomakasvaimen vertikaaliseen kasvuvaiheeseen (VGP, vertical growth phase), jossa kasvaimen alkaa muodostua verisuonia ympäröivistä kudoksista. Kun melanoomakasvain saavuttaa metastaasivaiheen, siitä irtoaa yksittäisiä soluja, jotka kulkeutuvat muodostuneita verisuonia pitkin etäpesäkkeiksi muualle kehoon (metastaasi). Kasvaimen saavuttaessa metastaasivaiheen,

se useimmiten muuntuu hyvin aggressiivisesti kasvavaksi (ks. katsausartikkeli Gaggioli ja Sahai, 2007).

Melanoomasolujen invaasiovaiheessa muutokset solutukirangassa sekä solunulkoisessa väliaineessa edesauttavat kasvainsolujen liikkumista (migraatio) (ks. katsausartikkeli Gaggioli ja Sahai, 2007). Metastaasivaihe ja kasvaimen invasoituminen muihin kudoksiin vaatii ensin primaarikasvaimen ympärillä olevan kudoksen hajottamisen. Tämä proteolyttinen hajotus tapahtuu matriksin metalloproteiinaasien (MMP) toimesta ja metastaasivaiheen melanoomakasvainten kohdalla onkin havaittu kollageenaasi-1:n (MMP-1) ja tyypin IV-kollageenaasien (MMP-2 ja MMP-9) ilmenemistason kasvaneen huomattavasti (Yamazoe ym., 2009).

Melanosyyttien vuorovaikutus viereisiin soluihin välittyy pääasiallisesti kadheriiniproteiinien kautta. Nämä ovat solukalvon läpäiseviä kalsiumista riippuvia proteiineja, jotka sitoutuvat viereisten solujen kadheriineihin. Kadheriiniproteiinit ovat mukana monissa solun toiminnoissa kuten muokkaavat solun polaarisuutta, välittävät solu-solu-liitoksia, muokkaavat aktiinitukirankaa sekä välittävät solujen välistä signalointia. E-kadheriinin liittämolekyylinä aktiinisolutukirankaan toimii β -kateniini. Näiden välinen sidos toimii samalla E-kadheriinisignaloinnin säätelijänä (Lee ja Herlyn, 2007). Primaarikasvaimen vaiheissa E-kadheriinia ilmenee solujen välissä, mutta kasvaimen metastaasivaiheen aikana E-kadheriinin tuotanto on huomattavasti vähentynyt ja tämä osaltaan mahdollistaa kasvaimen etenemisen metastaasivaiheeseen (Torres ym., 2007). E-kadheriini toimii soluissa kasvaimen kasvua rajoittavana tekijänä, jonka geenin ilmentymistaso vaikuttaa solun rakenteellisiin (morfologisiin) muutoksiin (Qian ym., 2004).

E-kadheriini liittyy epiteelisolujen basolateraalilla alueilla reseptorityrosiinikinaasiproteiineihin (RTK), kuten epidermaaliseen kasvutekijäreseptoriin (EGFR) ja c-Met:iin (Hoschuetzky ym., 1994). E-kadheriini säätelee negatiivisesti RTK:ien toimintaa, mikä vaikuttaa solujen β -kateniinien määrään. Solunsisäisen E-kadheriinitason väheneminen johtaa lisääntyneeseen β -kateniini-signalointiin, joka vähentää solujen tarvetta kiinnittyä kasvualustaansa, mikä on tyypillistä syöpäsoluille (Qian ym., 2004). E-kadheriinilla uskotaankin olevan soluissa rooli yhtenä kasvaimenmuodostumisen estäjämolekyylinä (tuumorisupressori), koska on havaittu että lisäämällä kasvainsolujen E-kadheriinin ilmentymistä, niiden invasiivinen kehitys on saatu pysähtymään ja palautumaan takaisin ei-invasiiviseksi (Perl ym., 1998).

Pahanlaatuiset melanoomakasvaimet sisältävät sekä kasvaimen kantasoluja, joilla on jakautumispotentiaalia että erilaistuneita syöpäsoluja, joiden jakautumispotentiaali on heikentynyt (Reya ym., 2001). Viime aikoina on löydetty muutamia kasvaimen kantasolutekijöitä, joiden avulla on voitu päätellä melanoomakasvaimen laatua ja elinennustetta. Tällaisia tekijöitä ovat mm. aktivoitu leukosyyttiadheesiomolekyylä (CD166) (van Kempen ym., 2000), hematopoieettisissa soluissa ilmentyvä prominin-1/AC133 (CD133) (Belicchi ym., 2004) sekä välikokoisiin filamentteihin kuuluva nestiini (Lendahl ym., 1990). Näiden kasvaimen kantasolumarkkerien uskotaan olevan melanooman etenemisen kannalta erittäin tärkeässä roolissa. Etenkin CD166 edesauttaa kasvainsolujen muuntumista invasiiviseksi, mutta myös nestiinin ilmeneminen melanoomasoluissa korreloi kasvainsolujen proliferaatio- ja migraatioaktiivisuuden kanssa (Klein ym., 2007).

1.1.3 Melanooman riskitekijät ja mutaatiot

Melanooman kehitymisessä suurimpia riskitekijöitä ovat geneettiset tekijät sekä ympäristön altisteet, joista tärkein vaikutus on UV-säteilyllä. Arvioidaan, että jopa 65 % pahanlaatuisista melanoomakasvaimista on kehittynyt UV-valoaltistumisen seurauksena. UV-valo aiheuttaa ihosolujen DNA:ssa geneettisiä muutoksia kuten DNA:n rakenteen hajoamisen, mikä edesauttaa syklobutaanipyrimidiinidimeerien muodostumista (Muramatsu ym., 1992). UV-säteily edesauttaa myös hydroksyyliiradikaalien ja vetyperoksidituotteiden muodostumista, jotka vaikuttavat solujen aineenvaihduntaan (Wei ym., 1997). Geneettiset muutokset, joita on löydetty useimmilta melanoomaa sairastavilta potilailta, ovat lokusten CDKN2A kromosomissa 9p21 sekä CDK4 kromosomin 12 kokonainen häviäminen (ks. katsausartikkeli Bandarchi ym., 2010). CDKN2A-locuksen geenituotteet, INK4a ja ARF, toimivat tuumorisupressorigeeninä ja osallistuvat solusyklin säätelyyn. INK4a geenin inaktivaatio vaikuttaa mm. solusykliä säätelevien sykliinien (sykliiniD/cdk4) toimintaan, kun taas muutokset ARF-geenissä vaikuttavat tuumorisupressorigeenin p53 toimintaan (ks. katsausartikkeli Uong ja Zon, 2010). Melanoomakasvaimissa on havaittu myös geneettisiä muutoksia solun signaalintimolekyylien kuten NRAS, BRAF, PTEN, AKT3 geneeissä (ks. katsausartikkeli Gaggioli ja Sahai, 2007). BRAF on yksi RAF-proteiineista ja kuuluu seriini treoniinikinaaseihin. RAS-perheen proteiinit aktivoivat RAF-proteiinit signaalintipoluilla ja RAF:ien yleisin isomuoto on BRAF. Jopa 70 % geneettisiä mutaatioita melanoomassa on havaittu juuri BRAF-proteiineissa. Tämä BRAF-proteiinin mutaatio johtaa melanooman aikaisessa kehitysvaiheessa melanosyyttien muuntumiseen pahanlaatuisiksi ja kasvaimen myöhäisemmässä kehitysvaiheessa solujen aggressiiviseen fenotyyppiin, invaasioon sekä angiogeneesiin (ks. katsausartikkeli Lin ym., 2010). INK4a/ARF lokuksen inaktivaatio melanoomassa johtaa useimmissa tapauksissa tuumorisupressorigeenien pRB- ja p53-ilmentymisen heikkenemiseen (Sharpless ym., 2002), kun taas mutaatiot solun NRAS ja BRAF geneeissä vaikuttavat puolestaan solun mitogeneeniaktivoidun tyrosiinikinaasisignaalintipolun (MAPK) toimintaan. Etenkin mutaatiot NRAS ja BRAF geenien toiminnassa ja näiden yliaktivoituminen yhdessä INK4a-locuksen inaktivoituminen kanssa johtavat melanosyyttien kasvuhäiriöihin ja melanoomasolujen muodostumiseen (Ackermann ym., 2005). Signaalintimolekyyli PTEN:in aktiivisuuden häviäminen johtaa AKT-signaloinnin yliaktivaatioon, joka lisää solujen elinkykyä muuttuneessa ympäristössä (Slipicevic ym., 2005).

Mutaatiot RAS-RAF-signaalipolun geneeissä lisäävät solujen proliferaatiota ja etenkin solusyklin säätelyyn vaikuttavan sykliini D1:n (CCND1) geenin monistuminen on liitetty RAS-RAF-signaalintipolun yliaktivoitumiseen (Satyamoorthy ym., 2003). Geneettiset muutokset aktivaattori proteiini 2 alfan (AP-2 α) toiminnassa vaikuttavat melanooman metastaasivaiheen kehitykseen (Melnikova ym., 2010). Proteiini AP-2 α vaikuttaa solusykliin, solujen jakaantumiseen (HER2), apoptoosiin (c-KIT), solujen kiinnittymiseen (E-kadheriini) sekä verisuonten muodostumiseen (angiogeneesi) (MMP-2 ja VEGF) (Leslie ja Bar-Eli, 2005). Transkriptiosäätelijät CREB ja E2F-1 vaikuttavat negatiivisesti AP-2 α :n geenin toimintaan. Hiljennetty AP-2 α -geeni kiihdyttää melanoomasolujen pahanlaatuista kehittymistä lisäten etenkin MCAM/MUC18 ilmentymistä (Melnikova ym., 2010). Lisääntyneen MUC18 ilmentymisen on havaittu aktivoivan solujen MMP-2 tuotantoa, joka vaikuttaa kasvaimen metastaasivaiheen kehittymiseen (Xie ym., 1997). CREB-transkriptiosäätelijän ilmentymistaso vaikuttaa myös MUC18 promoottorin säätelyyn Sp1:n kautta. Proteaasiaktivoitu reseptori 1 (PAR1)

lisää fosforylaation kautta CREB-transkriptiosäätelijän aktiivisuutta, jonka tason lisääntyminen vaikuttaa MUC18 tasoihin. Tämän PAR1-CREB-MUC18-signaalintireitin aktiivisuuden lisääntyminen aktivoi melanoomasolujen kiinnittymistä endoteelisoluihin sekä lisää solujen migraatiota läheisiin kudoksiin (ks. katsausartikkeli Melnikova ja Bar-Eli, 2008).

Useat solun prosessit ovat mukana kasvaimen metastaasivaiheen muodostumisessa. Solujen erilaistuminen primaarikasvaimen ympärillä, kasvaimen ympärillä olevan kudoksen (strooman) hajoaminen, invaasio imukudoksiin sekä asettuminen uuteen ympäristöön sekundaarikasvaimeksi, vaikuttavat kaikki melanooman kehittymiseen (Chambers ym., 2002). Kasvainsolujen invaasio ja metastaasivaiheen kehittyminen vaatii ihon tyvikalvon sekä solunulkoisen välitilan (ECM) proteolyyttisen hajottamisen matriksin metalloproteiinaasi (MMP) proteiinien toimesta. Terveessä kudoksessa näiden proteiinien tasot ovat yleisesti hyvin matalia, mutta syöpäsoluissa MMP-molekyylejä eritetään huomattavasti enemmän (Nikkola ym., 2002). Matriksin metalloproteiinaasien ilmentymistasoa säätelevät useat signaalintireitit, kuten mitogeneeniaktivoitu proteiinikinaasireitti MAPK/ERK, Fosfoinositidi-3-kinaasi/proteiinikinaasi B (PI3/PKB tai PI3K/Akt) ja NF- κ B transkriptioaktivaatiosignaalintipolut (Takada ym., 2004). Primaariset melanoomakasvaimet invasoituvat ensin dermikseen, karvafollikkelien epiteeliin ja myöhemmin ne ilmenevät etäpesäkkeinä imusolmukkeissa, keuhkoissa tai maksassa (Ackermann ym., 2005). Näissä eri vaiheissa, kuten solu-solu vuorovaikutuksissa ja solumatriksi vuorovaikutuksissa, hyaluronaani toimii verkostona, jonka avulla kasvainsolut kykenevät liikkumaan metastaasivaiheen etäpesäkkeiksi (Monz ym., 2008). Hyaluronaanin vaikutusta kasvaimissa ja niiden invaasiossa on tutkittu jo pitkään ja useissa tutkimuksissa onkin osoitettu hyaluronaanituotannon lisääntyneen joko kasvainsolujen ympärillä tai kasvaimen stroomassa. Kasvainten ympärillä olevan hyaluronaanitasojen avulla voidaan monissa syövässä ennustaa kasvaimen tilaa ja sen etenemistä (Karjalainen ym., 2000; ks. katsausartikkeli Tammi ym., 2008; ks. katsausartikkeli Toole, 2004).

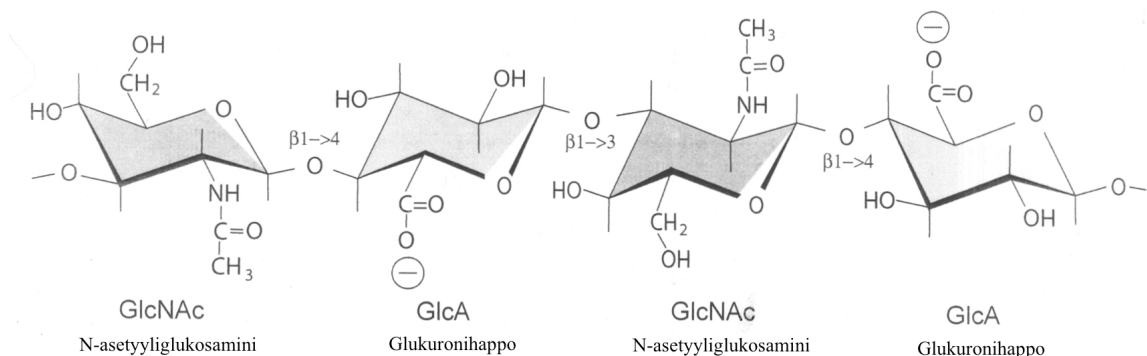
1.2 Hyaluronaani

1.2.1 Hyaluronaanin rakenne

Vuonna 1934 julkaistussa artikkelissa, tutkijat Meyer ja Palmer olivat tutkineet lehmän lasiaista ja havainneet sen sisältävän korkean molekyylipainon yhdisteen, hyaluronaanin (Meyer ja Palmer, 1934). Tämän tutkimuksen jälkeen hyaluronaania ja sen vaikutusta kudoksissa ja eri syövässä on tutkittu paljon (ks. katsausartikkeli Tammi ym., 2008). Myöhempien tutkimusten myötä hyaluronaania on löydetty kaikista nisäkkäiden kudoksista (ks. katsausartikkeli Weigel ym., 1997) ja erityisen runsaasti sitä esiintyy sidekudoksessa, nivelnesteessä, lasiaisessa ja kerrostuneessa epiteelissä kuten ihon epidermiksessä (Tammi ym., 1988). Hyaluronaanilla on rakenteellinen rooli mm. ruston aggregaanin sitojana kollageeniverkostossa (ks. katsausartikkeli Laurent ja Fraser, 1992). Solun ulkoisessa tilassa hyaluronaani muodostaa proteoglykaanien kanssa sidoksia, jotka ovat tärkeitä solunulkoisen väliaineen muodostumiselle. Hyaluronaani on tärkeä molekyyli alkion kehityksessä sekä useiden solujen ja kudosten erilaistumisessa (ks. katsausartikkeli Toole, 2004) sekä hyaluronaaniverkosto toimii kudoksissa plasman proteiinien kuljettajana (ks. katsausartikkeli Laurent ja Fraser, 1992). Hyaluronaani vaikuttaa kudoksissa solujen migraatioon sekä solunulkoisen väliaineen järjestäytymiseen. Hyaluronaanilla on tärkeä rooli myös haavan paranemisessa, tulehduksissa ja kasvainten metastaasivaiheessa (ks. katsausartikkeli Weigel ym., 1997).

Hyaluronaaniliuos on erittäin viskoosi sillä se sitoo tehokkaasti vesimolekyylejä (Meyer ja Palmer, 1934). Hyaluronaanin viskoosisuuteen ja vedensitominaisuuksiin vaikuttaa suuresti hyaluronaaniketjun pituus, koska pidempiketjuinen hyaluronaani kykenee sitomaan itseensä suurempia määriä vesimolekyylejä kuin lyhyemmät hyaluronaaniketjut (Itano ym., 1999). Yleensä hyaluronaani yhdistetäänkin liikkuvien nivelten tai sidekudoksen yhdistäväksi täytemateriaaliksi, juuri hygroskooppisuutensa ansiosta. Näiden ominaisuuksiensa ansiosta hyaluronaani on erittäin tärkeä materiaali solujen biomekaanisessa tukemisessa ja homeostaasin ylläpitämisessä (ks. katsausartikkeli Toole, 2004).

Hyaluronaani (Kuva 2) koostuu toistuvista disakkaridisokereista, N-asetyyliyglukosaminista (GlcNAc) ja glukuronihaposta (GlcUA) (Weismann ym., 1954). Nämä sokerit voivat muodostaa 2 000–25 000 disakkaridia pitkän ketjun, joka voi saavuttaa jopa 25 µm:n pituuden. Hyaluronaani kuuluu glykosaminoglukaaniperheeseen yhdessä heparaanisulfaatin ja kondroitiinisulfaatin kanssa (ks. katsausartikkeli Toole, 2004). Hyaluronaanisynteesi tapahtuu solukalvolla, jossa hyaluronaania syntetisoivat entsyymit, hyaluronaanisyntaasit (HAS) lisäävät UDP-sokerimolekyylejä, UDP-GlcNAc:ia ja UDP-GlcUA:ta, kasvavan ketjun solun sisäpuoliseen päähän ja samalla synteesinsä aikana hyaluronaani kuljetetaan solun ulkoiseen välitilaan (ks. katsausartikkeli Toole, 2004).



Kuva 2. Hyaluronaanin rakennekaava. Hyaluronaani rakentuu toistuvista disakkaridiyksiköistä, glukuronihaposta ja N-asetyyliylglukosaminista, jotka ovat kiinnittyneet glykosidisilla sidoksilla toisiinsa. Toistuvat sakkariidisyksiköt voivat muodostaa jopa 25 000 molekyyliä pitkän sokeriketjun.

Hyaluronaanisynteesin säätelyyn soluissa osallistuvat hyaluronaanin esiastesokerien UDP-GlcNAc:n ja UDP-GlcUA:n tasot (Jokela ym., 2008 ja Chen ym., 2009). Hyaluronaaniketju pysyy osittain sitoutuneena entsyymiinsä juuri UDP-sokerin välityksellä ennen seuraavan molekyylin lisäämistä (ks. katsausartikkeli Weigel ym., 1997). Muutokset solun UDP-sokerien tasoissa vaikuttavat suuresti syntetisoitavan hyaluronaanin määrään. Estämällä UDP-GlcNAc ja UDP-GlcUA sokerien määrää soluissa mm. 4-metyyliumbelliferonilla (Kultti ym., 2009) tai mannoosilla (Jokela ym., 2008) saadaan vaikutettua solun ulkopuolelle muodostuvan hyaluronaanivaipan kokoon. 4-metyyliumbelliferoni vaikuttaa myös Has2- ja Has3-geenien mRNA tasoihin estäen itse entsyymien tuoton soluissa (Kultti ym., 2009), kuitenkin mannoosi ei laskenut Has-geenien (1-3) mRNA tasoa vaan syntetisoitavan hyaluronaanin määrään vaikutti ennen

kaikkea solun sisäinen UDP-GlcNAc:n pitoisuus, jonka tasoon mannoosi vaikuttaa (Jokela ym., 2008).

1.2.2 Hyaluronaanisyntaasit

Hyaluronaania syntetisoivat entsyymit, hyaluronaanisyntaasit, ovat solukalvon läpäiseviä entsyymejä, joiden synteettisesti aktiivinen puoli sijaitsee solukalvon sisäpinnalla (ks. katsausartikkeli Toole, 2004). Eukaryoottien hyaluronaanisyntaasien oletetaan olevan kehittynyt yhdessä kitiini- ja selluloosasyntaasien kanssa yhteisestä β -glykosaminyylitransferaasi kantamuodosta (Spicer ym., 1998). Hyaluronaania syntetisoivan entsyymin isomuotoja ihmisellä on kolme: HAS1, HAS2 sekä HAS3. Nämä on paikannettu kromosomeihin 19 (HAS1), 8 (HAS2) sekä 16 (HAS3) (ks. katsausartikkeli Weigel ym., 1997). Kaikki HAS-isomuodot voivat aloittaa hyaluronaansynteesin *de novo* ilman aloitusjaksoa (ks. katsausartikkeli Weigel ja DeAngelis, 2007). Eri HAS-entsyymit eroavat toisistaan entsyymaattisessa stabiilisuudessaan ja kaikilla HAS-isomuodoilla on kolme rakenteellista domeenia: N-terminaalinen alue, perifeerinen solunsisäinen alue sekä hydrofobinen C-terminaalinen alue. Perifeerinen solunsisäinen alue on erittäin konservoitunut eri HAS-isomuotojen kesken (Itano ym., 1999). Tämä konservoitunut alue koostuu noin 307–328 aminohapon pituisesta ketjusta, jonka oletetaan toimivan entsyymin katalyyttisenä alueena (ks. katsausartikkeli Weigel ym., 1997).

Alkionkehityksessä HAS2-entsyymin toiminta on välttämätön etenkin sydämen kehittymiselle. Hyaluronaanisyntaasi 2 poistogeenisten hiiren alkioilla havaittiin huomattavia sydämen ja verisuonten epämuodostumia ja hiirialkiot kuolivat alkionkehityksen keskivaiheilla. Näin ollen etenkin HAS2-entsyymin oikeanlainen toiminta on välttämätön alkionkehityksessä (Camenisch ym., 2000). Hyaluronaanin ylituotannon kasvainten ympärillä epäillään vaikuttavan solujen pahanlaatuisuuteen muuntumiseen (Kosaki ym., 1999). Erityisesti hyaluronaanisyntaasien aktiivisuustasot vaikuttavat kasvainten kehityksessä. Kokeellisesti heikentämällä HAS-entsyymien toimintaa on kasvaimen kehitys saatu hidastumaan, mutta toisaalta on myös havaittu kasvainten ympärillä erittäin suuren hyaluronaanivaipan estävän kasvaimen kehittymistä (ks. katsausartikkeli Toole, 2004). Myös Has-geenien yli-ilmentämisellä on vaikutusta kasvainten kehittymiseen. Tutkimuksissa Has2-geenin yli-ilmentäminen johti siihen, että kasvainsolut eivät olleet enää riippuvaisia kasvualustaansa kiinnittymisestä ja solut muuttuivat fenotyypiltään pahanlaatuisiksi (Kosaki ym., 1999).

1.2.3 Hyaluronaanisyntaasien säätely

Solut säätelevät hyaluronaansynteesiä vaikuttamalla eri HAS-isomuotojen aktiivisuuteen (Itano ym., 1999) ja HAS-isomuotojen aktiivisuus vaihtelee huomattavasti alkionkehityksen aikana verrattuna aikuiseen yksilöön (Spicer ym., 1998). Erilasten sytokiinit vaikuttavat suoraan Has-geenien mRNA-tasojen ilmentymiseen ja samalla hyaluronaansynteesiin. Sytokiinit kuten TNF- α , IL-1 β sekä IFN- γ nostavat Has-geenien mRNA tasoja. Nämä sytokiinit aktivoivat Has3:n mRNA tasoa kun taas havaittava mRNA tason nousu oli pienin Has1:llä (Campo ym., 2006). Myös erilaisten kasvutekijöiden on todettu lisäävän hyaluronaanin tuotantoa kudoksissa ja niiden vaikutus hyaluronaansynteesiin on solutyypistä riippuvaista. Esimerkiksi keratinosyyteissä EGF-kasvutekijä lisää tehokkaasti hyaluronaansynteesiä aktivoimalla Has2:n ja Has3:n mRNA:n ilmentymistä (Pasonen-Seppänen ym., 2003; Pienimäki ym., 2001) kun taas TGF- β ja PDGF aktivoivat fibroblasteissa hyaluronaansynteesiä (Li ym., 2007). Eri HAS-

isomuodot syntetisoivat hyaluronaania eripituisina ketjuina. Tutkimuksissa on havaittu HAS2:n ja HAS3:n muodostavan solun ulkoiseen tilaan paljon suuremman hyaluronaanivaipan kuin HAS1. Hyaluronaanisyntaasi 1 on myös entsyymaattiselta aktiivisuudeltaan heikompi kuin HAS2 tai HAS3 (Itano ym., 1999). Hyaluronaanisyntaasi 2:n entsyymaattiseen aktiivisuuteen vaikuttaa myös ubikitinylaatio. Hyaluronaanisyntaasi 2:n oletetaan olevan lisäksi dimeeri- tai jopa oligomeeriproteiini, joka toimii sekä entsyyminä että solukalvon läpäisevänä kanavana, josta hyaluronaani työntyy ulos synteessin aikana (Karousou ym., 2010). Hyaluronaanisyntaasit syntetisoidaan solulimakalvostolla, josta ne kuljetetaan Golgin laitteen kautta solukalvolle. Hyaluronaanisyntaasit eivät käy läpi normaalia proteiinien muokkausta Golgissa, vaan se toimii lähinnä kuljetusväylänä HAS-entsyymeille, etenkin HAS2:lle ja HAS3:lle. Hyaluronaanisyntaasit saavuttavat aktiivisen muotonsa vasta solukalvolla, jonka jälkeen ne kykenevät aktiiviseen hyaluronaanisynteesiin (Rilla ym., 2005).

1.2.4 Hyaluronaanin reseptorit

Hyaluronaani voi olla sitoutuneena solukalvolla HAS-entsyymeihin tai spesifisiin reseptoreihin CD44:een ja RHAMM:iin (ks. katsausartikkeli Toole, 2004), joista CD44 on hyaluronaanin pääasiallinen solukalvoreseptori (ks. katsausartikkeli Isacke ja Yarwood, 2002). CD44 on solukalvon glykoproteiini, joka on osallisena mm. solun aktivaatiossa, solu-solu liitoksissa (adheesio), sekä muissa solun vuorovaikutuksissa (ks. katsausartikkeli Bourguignon, 2008). CD44-reseptorilla on useita isomuotoja, joiden molekyylipaino vaihtelee 80–200 kDa välillä (Jalkanen ym., 1988). Isomuotojen erot muodostuvat mRNA:n esiasteiden erilaisesta pilkkomisesta eri soluissa (ks. katsausartikkeli Bourguignon, 2008). Kaikissa CD44-reseptorin isomuodoissa on noin 100 aminohapon pituinen alue, joka on homologinen muiden hyaluronaania sitovien reseptorien kanssa ja toimii hyaluronaanin sitoutumiskohtana (Lesley ym., 2000). Yleisimmin tavattu CD44:n isomuoto on 85 kDa kokoinen glykoproteiini (Bajorath ym., 1998). CD44-reseptorin solunsisäinen osa säätelee erilaisia signaalintimolekyylejä ja on vuorovaikutuksessa solutukirangan proteiinien kuten ankyriinin, ezriinin ja moiesiinin kanssa (Turley ym., 2002). Hyaluronaanireseptori CD44:n ilmentymisellä soluissa on havaittu olevan vaikutusta lääkehoidoissa. CD44 sitoutumisen P-glykoproteiiniin, etenkin metastoivissa kasvaimissa, on havaittu lisäävän kasvainten moniresistenttiyttä lääkehoidoille (Miletti-González ym., 2005).

Hyaluronaani voi sitoutua myös toiseen reseptoriin, RHAMM:iin, josta löytyy soluissa useita isomuotoja. Näiden koko vaihtelee 70 ja 95 kDa välillä, riippuen mRNA pilkkomisesta (Assmann ym., 1999). RHAMM:ia ilmenee mm. solun pinnalla, solutukirangassa, mitokondrioissa sekä solun tumassa. RHAMM voi toimia myös aktiinin kanssa vuorovaikutuksessa solutukirangassa. Hyaluronaanin sitoutuminen RHAMM:iin aiheuttaa monien solunsisäisten signaalireittien aktivoitumisen. Ne vaikuttavat solun proliferaatioon, migraatioon sekä eloonjäämiseen (Turley ym., 2002). RHAMM-proteiinin on havaittu myös toimivan solusyklin G2/M-vaiheen säätelyssä. Solunsisäisen RHAMM-proteiinin tason havaittiin vaikuttavan solusyklin etenemiseen G2 vaiheesta mitosiin, missä se säätelee mitoottisen sukkulan toimintaa (Maxwell ym., 2003). Hyaluronaania sitovien proteiinien on havaittu toimivan myös yhteisvaikutuksessa kasvainten kehityksessä. Solukalvon RHAMM- ja CD44-reseptorit yhdessä välittävät CD44-reseptorin aikaansaamia solunsisäisiä signaali- ja ERK1 ja ERK2 (ERK1/2) signaalintireitillä, mikä kiihdyttää kasvaimen kehitystä (Maxwell ym., 2008).

Muitakin hyaluronaania sitovia proteiineja on löydetty kudoksista. Näitä ovat esimerkiksi versikaani, TSG-6 ja HARE (ks. katsausartikkeli Wight, 2002). Hyaluronaanin endosytoosireseptori (HARE) on 190–315 kDa kokoinen molekyyli, riippuen sen isomuodosta (Zhou ym., 1999). HARE välittää hyaluronaanin sitomista ja sisäänottoa klatriinivälitteisten vesikkelien välityksellä mm. imusolmukkeissa, pernassa ja maksassa. Näissä HARE vastaa hyaluronaanin sisäänottamisesta soluihin verenkierrosta (Harris ym., 2004). Versikaani on suurikokoinen soluväliaineen molekyyli, joka kuuluu proteoglykaaniperheeseen. Soluvälitilassa versikaani sitoo hyaluronaania N-terminaalilla domeenillaan (ks. katsausartikkeli Wight, 2002). Versikaanin vuorovaikutus hyaluronaanin kanssa edesauttaa kasvaimissa angiogeneesin muodostumista (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). TSG-6 (kasvaimen nekroositekijä stimuloitu geeni 6) sitoo hyaluronaania Link-domeeniosan (Link-TSG-6) välityksellä pH alueella 5.5–6, menettäen hyaluronaanin sitomiskyvyn pH 6:n ylittävissä ympäristöissä (Blundell ym., 2007). TSG-6:n välittämä hyaluronaanin sitominen on osallinen monissa fysiologisissa ja patologisissa tiloissa, joissa se osaltaan vaikuttaa hyaluronaanin ominaisuuksiin (ks. katsausartikkeli Milner ym., 2007). Näiden kolmen reseptorin lisäksi hyaluronaanille on löydetty muutamia muita solun sisäisiä hyaluronaanireseptoreita: CDC37, P32 sekä viimeisimpänä IHABP4. Näiden toiminta solun sisäinen hyaluronaanin sitojana on vielä tutkimuksen alla, mutta näiden oletetaan olevan osallisena solunsisäisen hyaluronaanin sitomisessa solun jakaantumisvaiheessa (Huang ym., 2000).

1.2.5 Hyaluronaanin hajotus

Hyaluronaanin hajotus voi tapahtua paikallisesti kudoksissa tai se voidaan kuljettaa perifeeraalisista kudoksista imuneste- ja verenkiertoon ja sitä kautta imukudoksiin ja maksaan hajotettavaksi (Fraser ym., 1981). Hyaluronaanin hajotuksesta vastaavat hyaluronidaasientsyymit (HYAL), joita ihmisellä on kuusi eri geeniä. Nämä eri HYAL-muodot ovat toiminnoiltaan erilaisia ja kukin näistä vastaa hyaluronaanin hajotuksesta eri solun osissa (ks. katsausartikkeli Toole, 2004).

Hyaluronidaasi 1 on lysosomaalinen entsyymi, jota erityisen paljon ilmenee kasvaimissa ja joka on aktiivinen alhaisessa pH:ssa 4.0–4.3 (Lokeshwar ja Selzer, 2000). Hyaluronidaasit 1 ja 2 tekevät soluissa yhteistyötä hyaluronaanin hajotuksessa. Hyaluronidaasi 2 pilkkoo korkean molekyylipainon hyaluronaanin 20 kDa kokoisiksi paloiksi, jotka kuljetetaan sisälle soluun, jossa HYAL1 pilkkoo ne vielä pienemmiksi hyaluronaaniketjuiksi (Rai ym., 2001). Nämä lyhytketjuiset hyaluronaanipalat aktivoivat endoteelisolujen jakaantumista sekä lisäävät solun tarttumista alustaansa ja migraatiota aktivoimalla MAPK-signaalintipolun (Lokeshwar ja Selzer, 2000). Hyaluronidaasien pilkkomat erikokoiset hyaluronaaniketjun palat toimivat myös paikallisina angiogeneesin ja tulehdusvasteen aktivaattoreina aktivoimalla sytokiinejä kuten IL-6:ta ja IL-8:aa (McKee ym., 1996) sekä ne lisäävät endoteelisolujen ja sileän lihaskudoksen solujen jakaantumista ja migraatiota, mutta myös näiden solujen tuottamia angiogeneesiä lisääviä kasvutekijöitä (de la Motte ym., 2009).

Hyaluronidaasi 2:n uskotaan olevan solukalvolla tai endosomeissa/lysosomeissa oleva entsyymi, joka kulkee vielä tuntemattoman kanavan kautta solun sisä- ja ulkopuolen välillä. Hyaluronidaasin alentuneen tason on havaittu korreloivan myös syövän ja lisääntyneen hyaluronaanisynteesin kanssa. Hyaluronaanin kertyminen solujen perisellulaariseen tilaan vaikuttaa etenkin HYAL2:een, joka heikentää hyaluronaanin ja CD44:n välistä sidosta (Duterme ym., 2009). Kasvaimissa, jotka sisältävät paljon

hyaluronaania, on havaittu HYAL1:n ja HYAL2:n tasojen huomattavasti alentuneen kuten kohdun limakalvon endometriosisissa (Nykopp ym., 2010). Myös *in vivo* kokeissa on havaittu geenivektorilla vietyjen HYAL1:n ja HYAL2:n ilmentymistasojen lisääntymisen estävän kasvainten kehittymistä hiirillä, joiden kasvaimissa on näiden geenien tasojen havaittu olevan hyvin alhaiset ennen geenisiirtoa. Tätä samaa vaikutusta ei ole kuitenkaan ole saatu aikaiseksi lisäämällä Hyal-geenien synteesiä *in vitro* soluviljelmissä (Wang ym., 2008).

1.3 Kasvaimen ympäristö

Kasvaimen kehitys on riippuvaista kasvainsolujen yhteydestä kasvaimen ympäristöön ja sen soluihin. Tämä kasvaimen ympäristön, strooman, muokkautuminen solujenvälisen signaloinnin aiheuttamana ohjaa kasvaimen kehittymistä ja syövän etenemistä (Ishii ym., 2003). Solujen välinen kommunikointi erilaisten kasvutekijöiden ja sytokiinien välityksellä aiheuttaa monenlaisia muutoksia sekä kasvaimen ympäristön soluihin että itse kasvainsoluihin, jotka vaikuttavat solujen jakaantumiseen, migraatioon, invaasioon sekä metastaasivaiheen kehittymiseen (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). Melanoomakasvaimen strooma koostuu ympärillä olevista kollageeni I:stä ja III:sta sekä soluista kuten fibroblasteista, verisuonia muodostavista soluista kuten endoteelisoluista, immuunipuolustuksen soluista kuten monosyyteistä ja magrofaageista sekä kaikkien näiden erittämistä sytokiineista kuten IL-1, kasvutekijöistä kuten VEGF ja TGF- β sekä MMP-molekyyleistä. Kasvaimen strooman muutokset johtavat kasvaimen metastaasivaiheen kehittymiseen (Ishii ym., 2003). Kasvaimen metastaasivaiheen kehittyminen on riippuvaista angiogeneesin kehittymisestä sekä immuunipuolustuksen soluista, jotka vaikuttavat siihen joko hillitsevästi tai kiihdyttävästi (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006). Kasvainsolujen invaasio ympäristön kudoksiin, vaatii suuria solunsisäisiä ja -ulkoisia muutoksia, kuten paikallisen sidekudoksen ja solunulkoisen väliaineen hajotus sekä uudelleen muodostaminen ovat avaintekijöitä invaasioprosessin alussa (Ishii ym., 2003).

1.3.1 Fibroblastit ja kasvaimen strooma

Fibroblastien rooli syövän etenemisessä on erittäin tärkeä syöpäsolujen kasvulle. Fibroblastit toimivat kasvaimen stroomassa solunulkoisen väliaineen muokkaajina sekä tulehdusvasteen ja epiteelisolujen erilaistumisen säätelijöinä. Fibroblastit syntetisoivat mm. kollageenin eri tyyppejä (I, III, V) ja fibronektiiniä sekä erittävät erilaisia kasvutekijöitä, jotka vaikuttavat mesenkymaalisten ja epiteelisolujen vuorovaikutukseen (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006).

Aktivoituneet fibroblastit (cancer associated fibroblasts, CAF) ovat fibroblastisolupopulaatio, joka toimii kasvaimen kasvun ja kehittymisen edesauttajana. Normaaliin fibroblastien muutosta aktivoituneiksi fibroblasteiksi ei ole vielä täysin selvitetty. Aktivoituneet fibroblastit ilmentävät α -sileälihas aktiinia (α -SMA, smooth muscle actin) (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006) ja nämä α -SMA-positiiviset fibroblastit nk. myofibroblastit tuottavat solunulkoisen väliaineen molekyylejä kuten kollageeneja I ja III, fibronektiiniä, CD45RO-, CD13- ja CD34-proteiineja (Chesney ym., 1998). Fibroblasteille on saatu aiheutettua CAF:ien kaltaisia fenotyyppejä *in vitro* TGF- β :n avulla (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006) ja fibroblastien erilaistuminen myofibroblasteiksi on liitetty lisääntyneeseen hyaluronaanisynteesiin sekä

suuremman hyaluronaanivaipan muodostumiseen solujen ulkopuolelle (Meran ym., 2007; Meran ym., 2011).

Fibroblastit tuottavat monia solunulkoisen välitilan hajottavia proteiineja kuten matriksin metalloproteinaaseja (MMP). Näiden avulla fibroblastit ylläpitävät solunulkoisen välitilan homeostaasia ja muokkaavat soluväliainetta. Fibroblastit myös säätelevät ympäristön epiteelisolujen homeostaasia erittämällä kasvutekijöitä (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006). Metastaasivaiheen melanoomassa, melanoomasolujen erittämät IL-1 α ja FGF-2 aktivoivat kasvaimen strooman fibroblasteja tuottamaan MMP-1:n esimuotoa (Löffek ym., 2005). Myös solujen välisen adheesiomolekyyli 1:n (ICAM-1) tuotannon on havaittu lisääntyneen kasvaimen ympärillä olevissa fibroblasteissa. Kasvaimen strooman fibroblastien erittämän ICAM-1 molekyylin uskotaan vaikuttavan kasvainsolujen aiheuttamassa tulehdusvasteessa (Wandel ym., 2000). Melanoomasolujen erittämät MMP-molekyylit, kuten MMP-2 ja MMP-9 hajottavat tyvikalvon tyyppin IV kollageenia, joka edesauttaa solujen invaasiota (Hofmann ym., 1999). Metastaasivaiheen melanoomassa usein MMP-1-molekyylin yli-ilmentyminen fibroblasteissa lisää dermiksen kollageeni I:n hajotusta, joka puolestaan edesauttaa kasvainsolujen invaasiota tyvikalvon läpi (Blackburn ym., 2009).

1.3.2 Hyaluronaani ja syöpä

Hyaluronaanin roolia kasvainten yhteydessä on tutkittu monia vuosikymmeniä. Sen lisääntynyt määrä kasvaimissa ja niiden ympärillä on havaittu vaikuttavan kasvainsolujen invaasioon ja potilaiden elinennusteeseen eri syövissä kuten rinta-, haima- ja paksusuolensyövässä. Syövissä, jotka ovat muodostuneet yhdestä solukerroksesta koostuvasta epiteelistä, kuten paksusuolensyöpä, lisääntynyt hyaluronaanin määrä kasvaimen ympärillä korreloi huonon ennusteen kanssa kun taas kerrostuneesta epiteelistä muodostuneessa syövässä, kuten metastaasivaiheen melanoomassa hyaluronaanitaso on laskenut primaarikasvaimeen verrattuna (ks. katsausartikkeli Tammi ym., 2008). Useimmissa syövissä kasvainsolut eivät itse tuota paljon hyaluronaania, vaan ne aktivoivat ympärillään olevia muita soluja tuottamaan hyaluronaania erilaisten signaalintimolekyylien kuten kasvutekijöiden välityksellä (ks. katsausartikkeli Laurent ja Fraser, 1992). Muutokset strooman hyaluronaanitasoissa korreloivat mm. rintasyövän ja eturauhassyövän lyhyeen elinennusteeseen (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). Kasvaimen ympärillä oleva hyaluronaani sekä muutokset hyaluronaanimetaboliassa edesauttavat pahanlaatuisen kasvaimen kehittymistä (Auvinen ym., 2000) etenkin rintasyövässä, jossa lisääntynyt hyaluronaanin määrä kasvainsolujen ympärillä sekä sen stroomassa on merkki syövän edenneestä asteesta (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008).

Melanoomakasvaimen kehityksessä merkittävää on epiteeli-mesenkyyymi muutos (EMT), jossa epiteelisolut saavat mesenkymaalisten solujen piirteitä. Melanoomassa suurin vaikutus tähän on solujen E-kadheriinitason aleneminen ja siitä johtuvat muutokset solujen välisissä tarttumisissa sekä solun rakenteelliset muutokset apikaali-basaali suunnassa (ks. katsausartikkeli Nakamura ja Tokura, 2011). Epiteelisolujen homeostaasin ylläpito on erittäin tärkeää ja muutokset homeostaasissa saavat aikaan mesenkymaalisten proteiinien kuten vimentiniin sekä MMP:ien ilmentymisen epiteelisoluissa. Nämä proteiinit uudelleenmuokkaavat solun aktiinitukirankaa, mikä edesauttaa epiteeli-mesenkyyymi muutosta (Morneo-Bueno ym., 2009) ja joka lisää solujen migraatiota, invaasiota ja erilaistumista, mikä puolestaan vaikuttaa melanoomasolujen elinkykyyn ympäristössään (ks. katsausartikkeli Lin ym., 2010). Lisääntyneen hyaluronaanin määrä epiteelisolujen

ympärillä on havaittu edesauttavan tätä epiteeli-mesenkyymi muutosta. Epiteeli-mesenkyymi muutos on riippuvainen hyaluronaanin ja solujen välisistä vuorovaikutuksista, jotka vaikuttavat etenkin solun β -kateniiniproteiiniin ja aktivoivat solussa PI3-kinaasi-Akt-signaalointipolun, joka lisää solun eloonjäämistä (Zoltan-Jones ym., 2003).

Kasvaimen ympärillä olevan hyaluronaanirikkaan alueen uskotaan edesauttavan kasvaimen kasvua, solujen proliferaatiota ja invaasiota sekä angiogeneesin kehittymistä (Ichikawa ym., 1999). Solunulkoiseen välitilaan kertyvä hyaluronaani voikin toimia alustana kasvainsolujen ympäristössä, jolloin ne kykenevät paremmin invasoitumaan ympäröivään kudokseen (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). Erityyppisissä *in vitro* kokeissa on havaittu hyaluronaanin lisääntyneen määrän melanoomasolujen ympäristössä kasvattavan solujen migraatiokykyä (Ichikawa ym., 1999). Tämän hyaluronaanin uskotaan olevan peräisin fibroblasteista, jotka ovat aktivoituneet kasvainsolujen lähettämien signaalointitekijöiden vaikutuksesta (Godden ym., 1999). Kasvaimen stroomaa ympäröivän hyaluronaanin määrän onkin osoitettu korreloituvan melanoomasolujen aggressiivisuuteen sekä invasiivisuuteen (Ichikawa ym., 1999). Estämällä hyaluronaanisynthesei kasvaimen ympäristössä, voidaan vaikuttaa syöpäsolujen jakaantumiseen ja migraatioon (Jokela ym., 2008) esim. paksusuolensyövässä, jossa pienemmän hyaluronaanivaipan omaavien solujen proliferaatio ja migraatio olivat huomattavasti alentuneet (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008).

Melanoomasolujen ilmentämän CD44-reseptorin sekä hyaluronaanitason on havaittu vähenevän melanooman muuttuessa aggressiivisemmaksi. Jo itsessään CD44-reseptorin vähentynyt ilmentymistaso melanoomasoluissa on merkki huonosta ennusteesta. Hyaluronaanin ja CD44-reseptorin välisen tasapainon uskotaan ylläpitävän solu ympäristöä normaaliin epidermaalisten solujen välillä sekä toimivan kasvaimen kasvua hillitsevänä tekijänä primaarikasvaimissa (Karjalainen ym., 2000). Melanoomasoluissa itsessään olevat CD44-reseptorit sitovat kasvainsolujen ympärillä olevaa fibroblastisolujen tuottamaa hyaluronaania ja samalla nämä melanoomasolut aktivoivat fibroblastisoluja tuottamaan vielä enemmän hyaluronaania, joka edesauttaa melanoomasolujen invaasiota (Edward ym., 2005). Etenkin CD44:n sytoplasmisen domeenin vuorovaikutus Rho-proteiinin kanssa on havaittu olevan tärkeässä roolissa kasvainsolujen migraatiossa hyaluronaanin välityksellä (Bourguignon ym., 2003). Hyaluronaanin sitoutuminen CD44-reseptoriin aiheuttaa aktivaation Rho-perheen proteiineissa, kuten Rac:ssa ja tämän aktivaation seurauksena CD44-reseptorin isomuoto, CD44_{v3}, liittyy RhoA:han, mikä lisää metastoivien kasvainsolujen migraatiota (Oliferenko ym., 2000). Hyaluronaanin suuri määrä solunulkoisessa välitilassa tarjoaakin hyvän ympäristön solujen jakaantumisellem sekä migraatiolle (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). Tämän hyaluronaanin ja CD44-reseptorin tarjoaman ympäristön onkin havaittu edesauttavan melanoomasolujen kasvua ja kasvaimen metastaasivaiheen kehittymistä *in vitro*-kokeissa (Zhang ym., 1995).

1.4 Matriksin metalloproteinaasit

Kasvainsolut erittävät ympärilleen paljon erilaisia molekyyliä, jotka muokkaavat kasvaimen ympärillä olevaa stroomaa mm. lisäämällä hyaluronaanin tuotantoa, solujen proliferaatiota, invaasiokykyä ja angiogeneesiä (ks. katsausartikkeli Toole, 2004). Kasvaimen stroomaa muokkaavia molekyyliä ovat mm. matriksin metalloproteinaasit (MMP), joista useimmat eritetään esiastemuodoissa ja proteolyyttisen pilkkomisen jälkeen ne saavuttavat aktiivisen muotonsa (Basbaum ja Werb, 1996). Matriksin

metalloproteinaasien katalyyttinen aktiivisuus on tärkeä kasvaimen invaasioissa ja metastaasivaiheen kehittymisessä (Iida ja McCarthy, 2007).

Matriksin metalloproteinaasien aktiivisuuden kudoksissa määrittelee niiden tuotannon ja aktiivisuuden sekä niiden hajotuksen suhde kudosten metalloproteinaasi-inhibiittoreiden (TIMP) toimesta. Kasvutekijät ja solunulkoisen välitilan molekyylit säätelevät MMP:ien eritystä, jotka puolestaan muokkaavat solunulkoista ympäristöä vapauttamalla kasvutekijöitä ja biomolekyylejä välitilasta (Barbaum ja Werb, 1996). Fibroblastien erittämät MMP:t, kuten MMP-1, vaikuttavat melanoomakasvaimen ympärillä olevan kudoksen hajotukseen (Wandel ym., 2000). Kudosten metalloproteinaasien inhibiittori (TIMP) -molekyylit, etenkin TIMP-2, säätelevät MMP-molekyylien toimintaa soluissa (ks. katsausartikkeli Stetler-Stevenson, 2008). Näiden TIMP-proteiinien on havaittu vaikuttavan NF- κ B-signalointipolulla. Tämä signalointi vaikuttaa solun jakaantumiseen, solukuolemaan ja kasvaimen kehitykseen. NF- κ B-signalointipolun säätely TIMP2-molekyylien toimesta voi estää kasvaimen alkuvaiheen kehitystä, mutta mutaatiot NF- κ B-signalointipolulla johtavat päinvastaiseen vaikutukseen kasvaimen kehittymisessä (Sun ja Stetler-Stevenson, 2009).

Matriksin metalloproteinaasi 1:n aktivoituminen vaikuttaa mm. proteaasiaktivoidun reseptori-1:n (PAR-1) aktivoitumiseen. Proteaasiaktivoitu reseptori-1 toimii soluissa onkogeneeninä ja sen yli-ilmentyminen vaikuttaa kasvaimen metastaasiin, angiogeneesiin, erilaisten kasvutekijöiden (FGFR2 ja IGF1) ja geenien (SERPINB5 ja S100A4) toimintaan muuttamalla näiden ilmentymistä (Blackburn ym., 2009). Proteaasiaktivoitu reseptori 1 toimii myös erilaisten signalointipolkujen aktivaattorina kuten fosfolipaasi C/proteiinikinaasi C, mitogeneeniaktivoitu proteiinikinaasi C sekä NF- κ B -poluilla. Myös erilaiset tulehdusvasteen molekyylit erittyvät PAR-1-signaloinnin vaikutuksesta kuten kemokiiniligandi 2, interleukiinit (IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-8), integriinit sekä vaskulaarinen endoteliaalinen kasvutekijä (VEGF) (ks. katsausartikkeli Melnikova ja Bar-Eli, 2008).

1.5 Signalointi

Melanoomasolut itsessään erittävät useita sytokiinejä ja kasvutekijöitä, jotka vaikuttavat niiden omaan kasvuun sekä kasvaimen ympärillä oleviin soluihin. Primaariset melanoomakasvaimet erittävät pieniä määriä mm. TNF- α :aa, TGF- β :aa, IL-8:aa ja c-Kit:iä sekä suurempia määriä IL-1 α :aa, IL-1 β :aa, IL-6:a, kantasolutekijää (SCF) sekä granulosityttimakrofaagikolonioita aktivoivaa tekijää (GM-CSF) (Moretti ym., 1999). Invasiivisten melanoomasolujen on havaittu erittävän IL-1 α ja FGF-2, joiden avulla melanoomasolut aktivoivat fibroblastien MMP-1:n eritystä (Löffek ym., 2005). Melanoomakasvaimen metastaasivaiheessa SCF:n ilmentymistasot ovat hävinneet ja IL-1 α :n, TGF- β :n ja GM-CSF:n tasot taas ovat huomattavasti nousseet primaarikasvaimen verrattuna (Moretti ym., 1999). Melanoomasolut erittävät myös VEGF-A:ta ja VEGF-C:tä, jotka säätelevät endoteelisolujen kasvua ja verisuonten kehittymistä kasvaimen (ks. katsausartikkeli Gaggioli ja Sahai, 2007). Solun ulkoisen MMP-induktorin, EMMPRIN:in, on havaittu vaikuttavan myös melanoomasolujen omien VEGF-reseptorien (VEGFR) toimintaan (Bougetef ym., 2010).

1.5.1 Transformoiva kasvutekijä beeta

Transformoiva kasvutekijä β eritetään soluissa inaktiivisessa muodossa ja sitä esiintyy MMP:hin liittyneenä, jotka leikkaavat solukalvolta inaktiivisen TGF- β :n

aktiiviseksi (Yu ja Stamenkovic, 2000). Matriksin metalloproteinaasien, etenkin MMP-2:n ja MMP-9:n, tuotannon estäminen vähentää huomattavasti melanoomasolujen invaasiokykyä eri solukerroksiin (Javelaud ym., 2007). Aktiivisen TGF- β -molekyylin tuotannon on havaittu lisääntyneen primaarisissa melanoomasoluissa, jotka ilmentävät katalyyttisesti aktiivista MMP-1-molekyyliä ja näissä melanoomasoluissa lisääntynyt TGF- β :n erityis lisää solujen kasvua ja invaasiota (Iida ja McCarthy, 2007). Metastaasivaiheen melanoomasoluissa TGF- β :n tuotolla on käänteinen vaikutus MMP-1:n syntetisointiin. Niissä lisääntynyt TGF- β :n syntetisointi estää strooman fibroblastien tuottaman MMP-1:n esiasteen syntetisoimista (Löffec ym., 2005).

Transformoivan kasvutekijän beetan vaikutus välittyy pääasiassa Smad-signaalintipolun kautta (ks. katsausartikkeli Padua ja Massague, 2009). Liukoiset TGF- β -molekyylit sitoutuvat TGF- β -reseptori II:een (TGF β RII) ja aktivoivat solukalvon seriini treoninikinaasireseptorin, joka on TGF- β -reseptori I:n (TGF β RI). Aktivoitunut TGF β RI puolestaan vie aktivaatiosignaalin eteenpäin fosforyloimalla solunsisäisiä Smad2 ja Smad3 proteiineja, jotka muodostavat kompleksin Smad4:n kanssa ja toimivat transkriptioaktivaattoreina kohdegeeneillensä (Zhang ym., 1998). Smad-signaloinnin inhibiittorimolekyyli, Smad7, estää TGF- β :n aktivoiman signaalin etenemisen (Javelaud ym., 2007).

Kasvutekijä TGF- β :lla on soluissa kaksinainen vaikutus. Osaltaan se toimii soluissa kasvainten estäjänä vaikuttaen mm. solusykliin ja melanosyyttisoluissa TGF- β :n on havaittu hidastavan solujen kasvua, minkä ajatellaan olevan osa kasvaimen kehittymisen estomekanismia (Rodeck ym., 1994). Syöpäsolut kuten melanoomasolut erittävät paljon TGF- β -molekyylejä ympäristöönsä, jolloin TGF- β :n aiheuttama kasvua hillitsevä vaikutus ei enää toimi. Tämän kasvua hillitsevän mekanismin toiminta perustuu transkription säätelijäproteiiniin SKI. SKI:n sitoutuessa Smad3 ja -4 molekyyleihin TGF- β :n aktivoima signalointi estyy jolloin SKI-signalointi korvaa TGF- β :n Smad-signalointireitillä ja TGF- β :n kasvua hillitsevä vaikutus ei näissä soluissa enää vaikuta (Xu ym., 2000).

1.5.2 Vaskulaarinen endoteliaalinen kasvutekijä

Vaskulaarinen endoteliaalinen kasvutekijä (VEGF) on tärkeä säätelijämolekyyli kasvaimen angiogeneesin aikana. Vaskulaarisesta endoteliaalisesta kasvutekijästä on viisi muotoa: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ja VEGF-E (ks. katsausartikkeli Hofmeister ym., 2008), joista etenkin keratinosyytit, fibroblastit ja endoteelisolut erittävät paljon VEGF-A:ta (ks. katsausartikkeli Barrientos ym., 2008). Vaskulaariselle endoteliaaliselle kasvutekijälle on soluissa kolmea reseptoria, VEGFR-1, -2 ja -3. Kasvainsolut ilmentävät erityisen paljon VEGF-muotoja hypoksiassa, alhaisessa pH:ssa ja hypoglykemiassa ja kasvanut VEGF-signalointi lisää kasvaimen kasvua, invaasiota sekä metastaasivaiheen kehittymistä (ks. katsausartikkeli Hofmeister ym., 2008). Vaskulaarinen endoteliaalinen kasvutekijä on erittäin tärkeä molekyylit kasvaimen angiogeneesin aloittajana ja ohjaajana. Etenkin VEGF-A lisää endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota ja edesauttaa angiogeneesin alkuvaiheen tapahtumia (ks. katsausartikkeli Barrientos ym., 2008). Melanoomasolut ilmentävät yleisimmin kahta VEGF-reseptoria (VEGFR-1 ja -2) (ks. katsausartikkeli Hofmeister ym., 2008). Angiogeneesin alkuvaiheissa VEGF-signalointi lisää kasvaimen läheisyydessä olevien paikallisten verisuonten läpäisykykyä ja plasman proteiineja kuten fibrinogeeniä kiinnittyy alueille mihin uudet verisuonet alkavat muodostua. Tyvikalvon hajotus MMP-molekyylien toimesta edesauttaa endoteelisolujen jakaantumista ja VEGF lisää niiden migraatiota muodostuvan verisuonen alueelle (Ferrara

ja Davis-Smyth, 1997). Lisääntynyt VEGF:n tuotto kudoksissa lisää huomattavasti myös kasvaimen uusiutumismahdollisuutta (ks. katsausartikkeli Hofmeister ym., 2008).

Eritetyn VEGF:n määrä melanoomakasvaimen ympäristössä, etenkin VEGF-A, toimii parakriinisella tavalla ja aktivoi ympärillä olevia endoteelisoluja muodostamaan kasvaimen verisuonia (Lacal ym., 2005). Angiogeneesi voi tapahtua kahdella tavalla kasvaimissa, joko perinteisellä tavalla, jossa endoteelisolut lopulta muodostavat uusia verisuonia melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutuksen seurauksena (Ferrera ja Davis-Smyth, 1997) tai vaskulogeenisen mallintamisen (vasculogenic mimicry) avulla, jossa kasvainsolut itsessään pystyvät muodostamaan mikro-suonistoa kasvaimen (Folberg ym., 2000). Angiogeneesiprosessissa melanoomasolut erittävät mm. luun morfogeneettisiä proteiineja (BMP), jotka lisäävät epiteelisolujen migraatiota kasvaimen läheisyyteen ja jossa ne aloittavat muodostamaan verisuonia (Rothhammer ym., 2007). Melanoomasoluissa kohonneet BMP-proteiinien (4/7) tasojen on havaittu edesauttavan kasvainsolujen metastaasivaiheessa mm. solujen migraatiota ja invaasiota (Rothhammer ym., 2005). Etenkin BMP4:n on havaittu kiihdyttävän verisuonten muodostumista *in vitro*-kokeissa, joissa BMP4 aktivoi endoteelisoluja (Rothhammer ym., 2007). Nämä eri BMP-molekyylit säätelevät VEGF-kasvutekijän ilmentymistä haavan paranemisen aikana ja edesauttavat angiogeneesin kehittymistä ei-kasvainsoluissa (Peng ym., 2005).

Hyaluronaanioligosakkaridien on havaittu toimivan yhdessä VEGF:n kanssa ja aktivoivan endoteelisolujen proliferaatiota, migraatiota ja angiogeneesiä. Hyaluronaanioligosakkaridien oletetaan pääasiallisesti vaikuttavan kasvaimesta lähtöisin olevaan angiogeneesin kehitykseen (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). Matriksin metalloproteiinaasien aktiivisuuteen on havaittu vaikuttavan kalvoglykoproteiini EMMPRIN (CD147), jota ilmenee runsaasti mm. kasvainsolujen pinnalla. EMMPRIN lisää fibroblasteissa ja endoteelisoluissa MMP-molekyylien tuotantoa (Nabeshima ym., 2006) ja edesauttaa myös melanoomasolujen proliferaatiota ja migraatiota lisäämällä VEGF-reseptorin 2 (VEGFR-2) määrää melanoomasoluissa HIF-2 α reitin kautta (Bougatef ym., 2010). Transkriptioaktivaattori AP-2 α vaikuttaa mm. MMP-2 sekä VEGF proteiinien säätelyyn. Transkriptioaktivaattori AP-2 α :n ilmentymistason lasku johtaa VEGF-tason ilmentymisen lisääntymiseen sekä angiogeneeseesiin (ks. katsausartikkeli Melnikova ja Bar-Eli, 2008) ja transkriptioaktivaattori AP-2 α :n ilmentymisen häviäminen puolestaan MMP-2:n yli-ilmentämiseen. Tämä signaalointi vaikuttaa solujenulkoisen ympäristön muutoksiin, jolloin kasvainsolujen on helpompi invasoitua kudosten läpi (Melnikova ym., 2010).

1.5.3 Verihiutalekasvutekijä ja fibroblastikasvutekijä

Verihiutalekasvutekijää (PDGF) tuottavat verihiutaleet, magrofaagit, vaskulaariset endoteelisolut, keratinosyytit sekä fibroblastit (ks. katsausartikkeli Barrientos ym., 2008). Verihiutalekasvutekijä toimii kemoattraktanttina etenkin mesenkyymisoluille sekä mitogeeninä fibroblasteille (ks. katsausartikkeli Elenbaas ja Weinberg, 2001). Solut voivat muodostaa PDGF:stä joko homo- tai heterodimeerejä (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC ja PDGF-DD). Epiteelisolujen erittämät PDGF-molekyylit lisäävät muiden solujen, kuten fibroblastien aktivaatiota ja siten edesauttavat kasvaimen kehittymistä (ks. katsausartikkeli Barrientos ym., 2008). Verihiutalekasvutekijä vaikuttaa kasvaimen strooman muodostumiseen sekä CAF:ien aktivaatioon kasvaimen stroomassa. Etenkin kasvainsolujen erittämät PDGF-CC-molekyylit lisäävät kasvaimen strooman CAF:eja hiirimalleissa. Kasvainsolujen lisääntynyt PDGF erityys vaikuttaa suoraan kasvaimen

kasvuun, kuten eritetty PDGF-CC ja sen sitoutuminen PDGF-reseptori α :aan kiihdyttää kasvaimen kasvua ja angiogeneesiä (Anderberg ym., 2009).

Fibroblastikasvutekijöitä (FGF) on useita isomuotoja (23) (ks. katsausartikkeli Barrientos ym., 2008) ja ne vaikuttavat yleisesti solujen proliferaatioon, migraatioon sekä erilaistumiseen (Lazar-Molnar ym., 2000). Ihossa FGF:iä erittävät keratinosyytit, fibroblastit, endoteelisolut, sileät lihassolut sekä syöttösolut. Fibroblastikasvutekijäreseptoreita on neljä (FGFR1-4) ja nämä kuuluvat reseptorityrosiini-kinaasiproteiineihin (ks. katsausartikkeli Barrientos ym., 2008). Yleisin syövän yhteydessä ilmentyvä reseptori on FGF2 (bFGF), joka voi toimia angiogeneesin sekä solujen proliferaation aktivaattorina (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006). Melanoomasolut erittävät huomattavan paljon FGF2:ta, joka lisää melanoomasolujen erittämien MMP:ien ilmentymistä (Ribatti ym., 2003). Kasvainsolut ilmentävät useita solukalvorseptoreita FGF-2:lle (Rodeck ym., 1991), jotka edesauttavat melanoomassa epiteeli-mesenkyymi muutosta sekä myofibroblastien muodostumista (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006). Fibroblastikasvutekijä säätelee melanoomassa myös kasvainsolujen migraatiota (Chalkiadaki ym., 2009) ja melanoomasolujen erittämä FGF-2 vaikuttaa solujen erilaistumiseen (Lazar-Molnar ym., 2000).

Fibroblastikasvutekijä 2:n on tutkittu vaikuttavan eri glykosaminoglykaanien ja proteoglykaanien sekä fibronektiinin toimintaan. Fibronektiinin ja FGF-2:n ilmentyminen soluissa lisää kasvainsolujen migraatiota ja vähentää niiden adheesiota heparaanisulfaattiproteoglykaanin kanssa. Heparaanisulfaatti on liittynyt syndekaani-4 proteiiniin, jonka tason aleneminen yhdessä FGF-2:n ilmentymisen noustessa, vähentää solujen adheesiota ja lisää niiden migraatiota (Chalkiadaki ym., 2009). Kasvainsolujen erittämän FGF-2:sta johdetun peptidin, FREG:n, on havaittu estävän melanoomasolujen kasvua. Tämä FREG-peptidi kykenee sitoutumaan PDGF-reseptori α :aan ja sen aiheuttama solunsisäinen signaalointi estää melanoomasolujen proliferaatiota ja migraatiota (Aguzzi ym., 2010).

1.5.4 PI3K-AKT signalointireitti

Fosfoinositidi-3-kinaasi (PI3K) signalointireitti välittyy fosfatidyli-inositoli-3,4-difosfaatin (PtdIns(3,4)P₂) ja fosfatidyli-inositoli-3,4,5-trifosfaatin (PtdIns(3,4,5)P₃) kautta AKT:lle. Aktivoituneet PtdIns(3,4,5)P₃ eli PIP₃ ja PtdIns(4,5)P₂ PIP₂ toimivat PI3-kinaasireitillä AKT:n pääasiallisina aktivaattoreina (ks. katsausartikkeli Lin ym., 2010). Fosforyloitu AKT kuljetetaan tumaan, jossa se aktivoi transkriptiotekijöitä kuten mTOR, NF- κ B ja sykliini D1 (ks. katsausartikkeli Castaneda ym., 2010). AKT-aktivaatioon johtava signaalointi säätelee yleisesti soluissa solusyklin vaiheita, solujen migraatiota sekä eloonjäämistä (ks. katsausartikkeli Lin ym., 2010). Ligandin sitoutuminen solukalvon tyrosiinikinaasireseptoriin aktivoi ensin PI3-kinaasin alayksikön p85, joka välittää aktivaation p110 alayksikölle (ks. katsausartikkeli Castaneda ym., 2010) GAB1 proteiinin välityksellä. Tämä sitoutuminen aktivoi PI3K-signaalipolun (Bourguignon ym., 2003) ja PI3-kinaasin aktivoitunut p110 alayksikkö siirtää aktivaation PIP₂:lle, joka vuorostaan fosforyloituu PIP₃:ksi. PIP₃ toimii toisilähetinä ja aktivoi AKT:n (ks. katsausartikkeli Castaneda ym., 2010). AKT-aktivaatioon johtavan PI3K-signaalointireitin tärkein säätelijä on PTEN, joka toimii AKT aktivaation estäjänä. PTEN:in tasot ovat usein melanoomassa alentuneet ja metastaasivaiheessa hävinneet kokonaan. PTEN-signaalointi hajottaa PI3-kinaasin välittämän aktivaation välittäjä-molekyylejä PIP₃:a ja PIP₂:ta estäen AKT:in aktivaation. (ks. katsausartikkeli Lin ym., 2010).

Hyaluronaanin on havaittu lisäävän kasvainsolujen alustaan kiinnittymisestä riippumatonta kasvua. Näiden kasvainsolujen kasvua edistävien tapahtumien on osoitettu olevan hyaluronaanin ja tämän reseptorin CD44:n vuorovaikutuksesta johtuvaa. Näissä tutkimuksissa on myös havaittu hyaluronaanin aktivoivan PI3-kinaasi (PI3K)-AKT-signaalintipolun, joka edesauttaa solujen migraatiota ja eloonjäämistä (ks. katsausartikkeli Toole, 2004). Hyaluronaani edesauttaa CD44:n sytoplasmisen domeenin sitoutumisissa solukalvoreseptorin PI3-kinaasin p110-alayksikköön GAB1-proteiinin välityksellä. Syövässä GAB1 ja PI3K ovat tärkeitä säätelijöitä kasvaimen kehityksessä (ks. katsausartikkeli Bourguignon, 2008). Hyaluronaanin ja CD44:n vuorovaikutus aktivoi myös RhoA-proteiinin, joka fosforyloi RhoA/Rho-kinaasin (ROK) aktiiviseksi. Tämä ROK-kinaasi toimii GAB1:n liitosmolekyylinä ja ROK:n aiheuttama GAB1:n aktivoituminen johtaa solukalvolla PI3K:n isomuotojen PIP2:n fosforylaatioon ja PIP3:n muodostumiseen. Nämä PI3K:n aktivoimat isomuodot johtavat AKT:in aktivoitumiseen ja kasvainsolujen lisääntyneeseen proliferaatioon ja invaasioon (Bourguignon ym., 2003).

1.5.5 EGFR-MAPK signalointireitti

Mitogeeniaktivoitu proteiinikinaasi (MAPK) eli Ras/Raf/MEK/ERK-signaalintipolku siirtää aktivoituneen solukalvoreseptorin signaalikaskaadin erilaisten fosforyloitujen kinaasien välityksellä tumaan. MAPK-reitin aktivaatio välittyy solukalvolla Ras:n aktivaatiolla, joka johtaa Raf:in aktivaatioon. Raf aktivoi MAP-kinaaseja MEK1 ja MEK2, jotka fosforyloivat ERK1 ja ERK2 transkriptioaktivaattoreita. Nämä ERK1 ja ERK2 sitoutuvat tumassa oleviin promoottoreihin, mitkä aktivoivat transkriptiotekijöitä tuottamaan proteiineja, jotka vaikuttavat solujen kasvuun ja proliferaatioon (ks. katsausartikkeli Lin ym., 2010). Melanoomassa mutaatiot BRAF ja RAS geneeissä johtavat yleensä MAPK-signaloinnin häiriöihin (Davies ym., 2002). Mutaatiot RAS-geenissä johtavat solun RAS-GTP-tason nousuun ja MAPK-signaloinnin toistuvaan aktivaatioon (ks. katsausartikkeli Inamdar ym., 2010), joka kiihdyttää kasvainsolujen proliferaatiota ja invaasiota sekä angiogeneesin ja metastaasivaiheen kehittymistä (Sharma ym., 2005).

Epidermaalisen kasvutekijän reseptoreita tunnetaan neljä: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) ja ErbB4 (HER4). Nämä EGF-reseptorit muodostavat heterodimeerin ligandin sitoutuessa solukalvoreseptoriin, joka aktivoi solunsisäisen signaalikaskaadin (Graus-Porta ym., 1997). Epidermaaliset kasvutekijäreseptorit aktivoituvat mm. solun ulkoiseen tilaan tuotetun transformoivan kasvutekijän alfan (TGF- α) vaikutuksesta. Ihon keratinosyyttien solujen välitilaan tuottama TGF- α aktivoi EGF-reseptorin välityksellä solun sisäisen signaloinnin (ks. katsausartikkeli Barrientos ym., 2008), joka johtaa yleensä MAPK-, PI3K-AKT- tai STAT-signaalintipolun aktivoitumiseen ja vaikuttaa siten solujen proliferaatioon ja eloonjäämiseen (Sibilia ym., 2000). Epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR) aktivoituminen TGF- α :n vaikutuksesta on raportoitu vaikuttavan melanoomasolujen kasvuun. Melanosyytit ilmentävät epidermaalisia kasvutekijäreseptoreita kuten ErbB2, ErbB3 sekä ErbB4 kun taas melanoomasolujen on havaittu ilmentävän kahta EGF-reseptoria: ErbB2 ja ErbB3 (Gordon-Thomson ym., 2005). Melanoomasoluissa EGF-reseptorit ovat yleensä yli-ilmenneittäjä, jonka on havaittu korreloivan kasvaimen edenneen vaiheen kanssa (de Wit ym., 1992).

Epidermaalisen kasvutekijäreseptorin välittämä signalointi vaikuttaa soluissa VEGFR-2 aktivaatioon ja tämä vaikutus näkyy kasvaimen ympärillä olevien verisuonia

muodostavien endoteelisolujen lisääntyneenä VEGFR-2 aktiivisuutena. Näissä endoteelisoluissa EGF-reseptorin toimimattomuus lisää VEGFR-2:n aktiivisuutta ja solujen eloonjäämistä (Amin ym., 2008). Estämällä EGF-reseptoria on tämän havaittu estävän solun PI3K-AKT-signalointipolkua, mutta ei MAPK-signaloinnin MEK-ERK aktivaatiota. Melanooman kehityksessä myös muiden kasvutekijäreseptoreiden uskotaan aktivoivan MAPK-signalointipolun esimerkiksi FGFR1:n, IGF-1R tai c-Met reseptoreiden kautta (Ivanov ja Hei, 2005). Kasvaimen ja sen ympäristön solujen, etenkin endoteelisolujen, uskotaan käyttävän mahdollisesti myös muita kasvutekijäreseptoreita kasvu- ja eloonjäämissignaloinnissa, jos primaarinen signalointireseptori on estetty. Tämä tuo haasteita melanooman ja muidenkin syöpien lääkekehitykseen, joka on kohdennettu suoraan tiettyyn kasvutekijäreseptoriin. Näissä lääkekehityksissä on otettava huomioon myös muiden kasvutekijäreseptoreiden mahdollinen aktivoituminen tietyn kasvutekijän vaikutuksesta, jotta voidaan vaikuttaa suoraan kasvainsolujen proliferaatioon ja kasvaimen kehittymiseen (Amin ym., 2008).

2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Hyaluronaani on solunulkoisen väliaineen molekyyli, joka toimii kudosten rakenteen ja homeostaasin ylläpitäjänä. Kohonneen hyaluronaanitason on raportoitu useissa tutkimuksissa korreloivan syövän huonon ennusteen kanssa (Auvinen ym., 2000; Tammi ym., 2008). Kasvainta ympäröivän strooman hyaluronaani edesauttaa syöpäsoluja liikkumaan (migraatio) ja tunkeutumaan (invaasio) alla olevaan kudokseen. Melanoomassa kasvainta ympäröivän strooman hyaluronaanin tuottavat dermaaliset fibroblastit, jotka ovat aktivoituneet melanoomasolujen erittämistä molekyyleistä (Edward ym., 2005; Godden ym., 1999).

Michael Edward ym. ovat raportoineet tutkimuksissaan melanoomasoluilta kerätyn kasvatusliuoksen vaikutuksista fibroblastien syntetisoiman hyaluronaanin määrään (Edward ym., 2005; Godden ym., 1999). Melanoomasoluilta kerätty kasvatusliuos oli konsentroitunut pylväillä, jotka päästivät kaikki alle 30 kDa proteiinit suodattimen läpi. Käsittelemällä fibroblasteja tällä konsentroidulla liuoksella, niiden hyaluronaanisynteesi kasvoi huomattavasti. Myös tässä tutkimuksessa havaittiin hyaluronaanisynteesiin vaikuttavien, melanoomasolujen erittämien tekijöiden olevan yli 30 kDa kokoisia proteiineja.

Tässä opinnäytetyössä halusimme selvittää kuinka melanoomasolujen erittämät tekijät vaikuttavat fibroblastien hyaluronaanisynteesiin ja mikä hyaluronaanisyntaasi (HAS) on vastuussa tästä kohonneesta hyaluronaanitasosta. Halusimme myös selvittää kuinka melanoomasolujen erittämät tekijät vaikuttavat mm. solujen morfologiaan. Kaupallisilla sytokiini- ja angiogeneesiarrayllä halusimme selvittää melanoomasolujen erittämiä liukoisia tekijöitä, jotka mahdollisesti aktivoivat fibroblasteissa hyaluronaanisynteesiä. Kaupallisella fosfokinaasiarrayllä halusimme selvittää minkälaisia signalointireittejä kasvatusliuoskäsittely aktivoi fibroblasteissa.

Tutkimuksessa käytimme aluksi kahta eri konsentraatiopylvästä, 3 kDa ja 30 kDa, joilla konsentroimme melanoomasoluilta kerätyn kasvatusliuoksen. Havaitimme ainoastaan yli 30 kDa kokoisten proteiinien aktivoivan fibroblastisolujen hyaluronaanisynteesiä. Tutkimme tämän konsentroidun kasvatusliuoksen (30K CM) vaikutusta fibroblastien mRNA tasoihin (Has1–3, CD44, Hyal2) kvantitatiivisellä PCR:llä, proteiinitasojen muutoksia (HAS2, CD44, α -SMA) tutkittiin Western blot -menetelmällä ja solujen morfologiaa tutkittiin valo- ja konfokaalimikroskoopilla immunohistokemiallisista värjäyksistä.

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Tässä opinnäytetyössä käytettiin C8161-melanoomasolulinjaa sekä ihon dermiksen fibroblasteja jakonumeroilla p4–24. Molemmat solulinjat on saatu lahjoituksena tri Michael Edwardilta Glasgown yliopistosta. Molempia solulinjoja ylläpidettiin Dubelcco's modified Eagle Eye's (DMEM, EuroClone®, Pero, Italia) korkean glukoosipitoisuuden kasvatusliuoksessa, johon oli lisätty 10 % seerumia (Fetal bovine serum, HyClone® Cramlington, UK), 2 mM L-glutamiinia (EuroClone®, Pero Italia), 50 µg/ml streptomysiinisulfaattia (EuroClone®, Pero Italy) ja 50 U/ml penisilliiniä (EuroClone®, Pero, Italia). C8161-melanoomasolut jaettiin kolmesti viikossa suhteessa joko 1:6 tai 1:7 ja fibroblastit kahdesti viikossa 1:2 tai 1:3 riippuen jakoa edeltävästä kasvatuspullojen konfluenssista. Molempien solulinjojen jaon yhteydessä T25-solupullot käsiteltiin 500 µl:lla trypsiiniä +37 °C:ssa 5 % CO₂ kunnes solut irtosivat pullon pohjasta ja irronneet solut sekoitettiin ylläpitoliuokseen ja jaettiin uusiin T25-pulloihin.

3.1 Kasvatusliuoksen kerääminen

C8161-melanoomasoluja kasvatettiin T75 pulloissa (Greiner bio-one, Cellstar®) 20 ml:ssä ylläpitokasvatusliuosta. Kun solupullot olivat noin 75 % konfluenteja, solut pestiin kahdesti Hank's Balanced Salt Solution -liuoksella (HBSS) (Lonza, Belgia), jonka jälkeen soluille lisättiin 20 ml kasvatusliuosta (DMEM 2 mM L-glutamiini, 50 µg/ml streptomysiini ja 50 U/ml penisilliini), joka oli joko seerumiton tai sisälsi 1 % seerumin. C8161-melanoomasoluja kasvatettiin tässä liuoksessa 48 tuntia +37 °C 5 % CO₂, jonka jälkeen kasvatusliuos kerättiin talteen ja steriilisuodatettiin 0,2 µm filtterin (Stedim Biotech) läpi. Kerätty kasvatusliuos (nk. conditioned medium, CM) pakastettiin -20 °C, mikäli sitä ei heti konsentroitua.

Melanoomasoluilta kerätty kasvatusliuos konsentroidiin Amicon® Ultra 30K (Millipore) suodatusputkilla. Putket esikäsiteltiin sentrifugoimalla 2900x g, roottorilla A-4-62 (Eppendorf Centrifuge 5810 R) 1 ml:llä ionivaihdetta vettä 5 minuutin ajan. Putkiin lisättiin 4 ml steriilisuodatettua kasvatusliuosta ja tämä konsentroidiin 40-kertaiseksi sentrifugoimalla 2900x g 10 minuutin ajan. Konsentroidu kasvatusliuos (30K CM) laimennettiin 10 kertaiseksi tuoreeseen korkean glukoosipitoisuuden DMEM-liuokseen, joka oli joko seerumiton tai sisälsi 1 % seerumin (FBS), 2 mM L-glutamiini, 50 µg/ml streptomysiini sulfaattia ja 50 U/ml penisilliiniä. Liuos steriilisuodatettiin laimennuksen jälkeen 0,2 µm filtterin (Stedim Biotech) läpi ja säilytettiin -20 °C:ssa käyttöön asti. 30K-suodatusputkista läpikäyty kasvatusliuos konsentroidiin vielä käyttämällä Milliporen 3K suodatusputkia, jotka oli esikäsitelty samalla tavalla kuin 30K suodatusputket. Tällöin saatiin konsentroitua kaikki yli 3 kDa, mutta alle 30 kDa kokoiset melanoomasolujen erittämät molekyylit.

3.2 Solujen käsittely

12-kuoppalevyille (Greiner bio-one, Cellstar®) istutettiin fibroblasteja, 80 000 solua kuoppaa kohden. Soluja kasvatettiin 48 tuntia +37 °C 5 % CO₂. Kuopat pestiin kerran HBSS-liuoksella ja solut käsiteltiin kahden tunnin ajan esikäsitteilyliuoksella (DMEM, korkea glukoosipitoisuus, seerumiton tai 1 % seerumin sisältävä, 2 mM L-glutamiini, 50 µg/ml streptomysiini sulfaatti ja 50 U/ml penisilliini) +37 °C 5 % CO₂. Esikäsitteilyn jälkeen soluille tehtiin käsittelyt. Seerumin (1 %) sisältävissä käsittelyissä kontrollina

soluilla käytettiin sekä esikäsittelyliuosta (K) että konsentroitua esikäsittelyliuosta (30K KM), joka oli valmistettu ja laimennettu samoin kuin kasvatusliuos (30K CM). Käsittelyliuoksina soluille laitettiin C8161-soluilta kerätty, konsentroitua ja laimennettu kasvatusliuos (conditioned medium, 30K CM) sekä konsentroidun kasvatusliuos (CM). 24 tunnin käsittelyn jälkeen solujen käsittelyliuokset kerättiin hyaluronaanimääritykseen ja solujen lukumäärä näytteissä laskettiin solulaskukammion avulla. Seerumittomissa käsittelyissä solut esikäsiteltiin kuten yllä seerumittomalla esikäsittelyliuoksella ja kontrollina käsittelyissä oli seerumiton esikäsittelyliuos. Näytteet kerättiin ja solut laskettiin kuten seerumillisen käsittelyn näytteet.

Proteiinien keräystä varten 3 cm maljoille istutettiin fibroblasteja, 200 000 solua maljaa kohden. Soluja kasvatettiin ylläpitokasvatusliuoksessa 48 tuntia +37 °C 5 % CO₂. Solut pestiin kerran HBSS-liuoksella ja käsiteltiin esikäsittelyliuoksella kahden tunnin ajan. Esikäsittelyn jälkeen soluille vaihdettiin seerumillinen (1 %) C8161-soluilta kerätty ja konsentroitua kasvatusliuos (30K CM) sekä kontrolliliuokset (K ja 30K KM). 24 tunnin kuluttua soluista eristettiin proteiinit. Solumaljat siirrettiin jäille ja näytteistä kerättiin liuokset hyaluronaanimääritykseen. Solut pestiin kerran kylmällä PBS:llä ja soluille lisättiin 1,5 ml PBS:ää, pH 7.4, johon solut raaputettiin muovisen lastan avulla.

RNA näytteiden keräystä varten 6-kuoppalevyille istutettiin fibroblasteja 150 000 solua kuoppaa kohden. 6-kuoppalevyille istutettuja soluja kasvatettiin 72 tuntia ylläpitoliuoksessa +37 °C 5 % CO₂. Solut pestiin kerran HBSS-liuoksella ja esikäsiteltiin kahden tunnin ajan esikäsittelyliuoksella. Esikäsittelyn jälkeen soluille vaihdettiin joko C8161-soluilta kerätty ja konsentroitua seerumiton tai seerumillinen kasvatusliuos (30K CM) ja kontrolliliuokset (K ja 30K KM). Soluja kasvatettiin ennen keräystä 24 tuntia, +37 °C 5 % CO₂.

3.3 Hyaluronaanin määrittäminen ELISA-tyyppisellä menetelmällä (HA-ELISA)

Näytteiden sisältämän hyaluronaanin määrittäminen tehtiin ELISA-tyyppisellä menetelmällä (Hiltunen ym., 2002). 96-kuoppalevy (Nunc™, nunc-immuno plate C96) pinnoitettiin hyaluronaania sitovalla proteiinilla (Hyaluronan binding region, HABR tai Hyaluronan binding complex, HABC) (1 µg/ml). Hyaluronaania sitova alue, HABR, on eristetty naudan polviruston aggregaationista, jonka N-terminaaliosassa päässä on hyaluronaania sitova alue sekä hyaluronaania sitova Link-osa (Tammi ym., 1994). Kuhunkin levyn kuoppaan lisättiin 100 µl liuosta ja levyä pidettiin kahden tunnin ajan +37 °C:ssa, jonka jälkeen levy pestiin kolmesti 0.5 % Tween-PBS-liuoksella. Epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi levy käsiteltiin 1 % BSA (Sigma, St. Louis, USA)-PBS-liuoksella tunnin ajan +37 °C:ssa, jonka jälkeen levy pestiin kolmesti 0.5 % Tween-PBS:llä. Levy säilytettiin -20 °C:ssa enintään viiden päivän ajan.

Hyaluronaanimäärityksessä näytteistä käytettiin laimennuksia 1:50 ja 1:70. Näytteet laimennettiin 1 % BSA-PBS:ään. Korkean molekyylipainon 1 % natriumhyaluronaatista (ProVisc®, Alcon, Fort Worth, Teksas, USA) (1 µg/ml) valmistettiin laimennossarja 1 % BSA-PBS:ään 50, 35, 25, 15, 10, 5, 2.5, 1 ja 0 ng/ml pitoisuuksin. Levyille pipetoitiin kutakin näytettä kolmena rinnakkaisena 100 µl ja hyaluronaanistandardia kahtena rinnakkaisena 100 µl kuhunkin kuoppaan. Levy käsiteltiin tunnin ajan +37 °C:ssa, jonka jälkeen se pestiin kolmesti 0.5 % Tween-PBS:llä.

Hyaluronaanin tunnistamista varten levy käsiteltiin biotinyloidulla HABR:lla (1 µg/ml) tunnin ajan +37 °C:ssa, jonka jälkeen se pestiin kolmesti 0.5 % Tween-PBS:llä.

Levyille lisättiin Horse Radish Peroxidase Streptavidiniä (Vector, SA-5004) 1:20 000 PBS:ssä. Levy pidettiin tunnin ajan +37 °C:ssa, jonka jälkeen levy pestiin kolmesti 0.5 % Tween-PBS:llä. Levyille lisättiin 0.5 % TMB-DMSO-substraattiliuos, joka oli laimennettu 1:50 0.5 % TMB-substraattipuskurilla (0.1 M natriumasettaatti, 1.5 mM sitruunahappo, 0.005 % H₂O₂, pH 6.0). Värireaktion annettiin kehittyä levyllä 10 minuutin ajan valolta suojattuna huoneenlämmössä, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin 50 µl 2 M rikkihappoa ja absorbanssi luettiin välittömästi levynlukijalla (Molecular Devices, Vmas kinetic microplate reader). Hyaluronaanistandardisuorasta tehtiin kuvaaja Excel-taulukko-ohjelmalla (Microsoft™) ja saatuja näytteiden absorbanssi-arvoja verrattiin standardisuoraan, jonka avulla määritettiin näytteiden hyaluronaanipitoisuus.

3.4 Proteiininäytteiden keräys ja Western blot

3.4.1 Proteiininäytteiden eristys

Proteiininäytteiden eristämisessä käytettiin kaupallista Qiagenin Qproteome proteiinin eristyskittiä. Solut raaputettiin maljoilta muovisen lastan avulla PBS:ään ja soluliuokset siirrettiin eppendorf-putkiin. Putket sentrifugoitiin roottorilla FA45-30-11 (Eppendorf), 500x g 10 minuutin ajan +4 °C (Eppendorf Centrifuge 5810R). Pelletti liuotettiin uudelleen 1,5 ml:iin kylmää PBS:ää, pH 7.4, ja sentrifugoitiin 500x g 10 minuutin ajan +4 °C. Kukin solupelletti liuotettiin 333 µl:aan kylmää CE1-liuosta (Qproteome® Cell compartemet kit, Qiagen), johon oli lisätty 1:100 proteaasi-inhibiittori -liuosta (Qproteome® Cell compartemet kit, Qiagen). Näytteitä pidettiin sekoittajassa 10 minuutin ajan +4 °C:ssa. Tämän jälkeen näytteet sentrifugoitiin 1000x g 10 minuutin ajan +4 °C:ssa ja supernatantti kerättiin talteen ja pakastettiin -70 °C. Pelletti liuotettiin 333 µl:aan kylmää CE2-liuosta (Qproteome® Cell compartemet kit, Qiagen), johon oli lisätty 1:100 proteaasi-inhibiittori -liuosta (Qproteome® Cell compartemet kit, Qiagen). Näytteitä pidettiin sekoittajassa 30 minuutin ajan +4 °C:ssa, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin 6000x g, 10 minuutin ajan +4 °C:ssa. Sekä supernatantti että pelletti pakastettiin -70 °C. Näytteistä ei voitu mitata proteiinkonsentraatiota Bradfordin-menetelmällä CE1 ja -2-liuosten sisältämien aineiden takia.

3.4.2 Western blot

Qiagenin Qproteome® Cell compartemet kit:llä kerätyt proteiininäytteet kalvo- ja sytoplasmisesta osasta solua valmistettiin SDS-PAGE -ajoa varten pelkistävään näytopuskuriin. Näytteitä otettiin 75 µl, johon lisättiin 25 µl, 4x näytopuskuria (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glyseroli, 0.2 M DTT, 0.02 % bromofenolisininen). Näytteitä keitettiin viiden minuutin ajan, jonka jälkeen ne jäähdytettiin jäällä. Kutakin näytettä otettiin elektroforesiajohon 20 µl. Molekyylipainomarkkerina ajossa käytettiin #SM0671 (Fermentas, PageRuler™, Prestained Protein Ladder). Näytteet, sekä kalvoproteiinit että sytosoliset proteiinit eroteltiin SDS-PAGE-ajopuskurissa (0.025 M Tris, 0.192 M glysiini, 0.1 % SDS, pH 8.3), ensin 4 % ylägeelissä 130 V 20 minuutin ajan ja 10 % alageelissä 180 V 35 minuutin ajan. Ajon jälkeen geelit tasapainotettiin siirrostuspuskurissa (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20 % metanoli) 10 minuutin ajan.

Proteiinit siirrostettiin geelistä joko siirrostuspuskurilla käsitellylle nitroselluloosakalvolle (Whatman®, Protran® nitroselluloosakalvo, huokoskoko 0.45 µm) tai metanolilla käsitellylle PVDF immobilon -kalvolle (Millipore, Immobilon-FC PVDF kalvo, huokoskoko 0,45 µm) riippuen vasta-aineleimauksesta. Geelit siirrostettiin 240

mA:ssa, 30 minuutin ajan SemiDry-laitteella (Biometra). Siirrostuksen jälkeen kalvot huuhdeltiin 0.1 % Tween-TBS:llä ja nitroselluloosakalvot värjättiin Ponceau-liuoksella proteiinien siirtymisen varmistamiseksi.

3.4.3 HAS2 vasta-ainevärjäys

Siirrostatet PVDF-kalvot käsiteltiin epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi tunnin ajan huoneenlämmössä 2 % BSA - 0.1 % Tween-TBS -liuoksessa. Primaarivasta-aine HAS2:lle (sc34067, Santa Cruz, Kalifornia, USA) laimennettiin 1:200 2 % BSA - 0.1 % Tween-TBS:ään. Kalvot käsiteltiin vasta-aineen kanssa yön yli pyörittäjässä +4 °C:ssa, jonka jälkeen ne pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä. Sekundaarivasta-aine anti-vuohi, Alexa Fluor 680 (A21084, InVitrogen, Kalifornia, USA) laimennettiin 1:8000 2 % BSA - 0.1 % Tween-TBS:ään. Kalvot käsiteltiin sekundaarivasta-aineen kanssa tunnin ajan huoneenlämmössä pyörytyksessä. Vasta-aineleimauksen jälkeen kalvot pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä, jonka jälkeen ne kuvattiin Odyssey-skannerilla (LI-COR® Inc.) ja kvantitoitiin Odyssey V3.0 -ohjelmalla.

HAS2-vasta-ainetunnistuksen jälkeen kalvot käsiteltiin 0.2 M NaOH-liuoksella viiden minuutin ajan vasta-aineiden poistamiseksi. Tämän jälkeen kalvot pestiin kahdesti viiden minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä. Kalvot käsiteltiin epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi tunnin ajan huoneenlämmössä 2 % BSA - 0.1 % Tween-TBS -liuoksessa. Kalvoille lisättiin primaarivasta-aine, joka tunnisti aktiinin (A2066, Sigma, St. Louis, USA) 1:1000 2 % BSA - 0.1 % Tween-TBS:ssä. Kalvot käsiteltiin primaarivasta-aineen kanssa yön yli pyörytyksessä, +4 °C:ssa, jonka jälkeen kalvot pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä ja tämän jälkeen kalvoille lisättiin sekundaarivasta-aine anti-kani (35568, DyLight TM 680, Pierce, Rockford, USA) 1:8000 2 % BSA - 0.1 % Tween-TBS:ssä. Kalvoja käsiteltiin sekundaarivasta-aineen kanssa tunnin ajan pyörytyksessä huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä. Kalvot kuvattiin Odyssey-skannerilla (LI-COR® Inc.) aallonpituudella 700 nm, intensiteetillä 7.0. Kalvot kvantitoitiin Odyssey V3.0 -ohjelmalla. Kustakin kalvosta mitattu leimatun proteiinin intensiteetti suhteutettiin samasta kalvosta leimatun aktiinin intensiteettiin.

3.4.4 CD44 ja alfa-SMA vasta-ainevärjäys

Siirrostatet nitroselluloosakalvot käsiteltiin epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi tunnin ajan huoneenlämmössä 3 % maito - 0.1 % Tween-TBS -liuoksessa. Kalvoilta leimattiin samanaikaisesti CD44 (Hermes 3) (saatu lahjoituksena prof. Sirpa Jalkaselta Turusta) sekä aktiini primaarivasta-aineilla. Vasta-anti CD44:lle laimennettiin 1:100 ja aktiini-vasta-aine (A2066, Sigma, St. Louis, USA) 1:1000 1 % maito - 0.1 % Tween-TBS:ään. Kalvot käsiteltiin vasta-aineiden kanssa yön yli, pyörittäjässä +4 °C:ssa, jonka jälkeen ne pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä. Sekundaarivasta-aine CD44:lle anti-hiiri (35518, DyLight TM 680, Pierce, Rockford, USA) sekä aktiinille anti-kani (35568, DyLight TM 680, Pierce, Rockford, USA) laimennettiin molemmat 1:8000 1 % maito - 0.1 % Tween-TBS:ään. Kalvot käsiteltiin sekundaarivasta-aineiden kanssa tunnin ajan huoneenlämmössä pyörytyksessä, jonka jälkeen kalvot pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä. Kalvot kuvattiin Odyssey-skannerilla (LI-COR® Inc.) aallonpituudessa 700 nm, intensiteetillä 7.0. Kalvot kvantitoitiin Odyssey V3.0 -ohjelmalla. Kustakin kalvosta mitattu leimatun proteiinin intensiteetti suhteutettiin samasta kalvosta leimatun aktiinin intensiteettiin.

Fibroblasteista eristetyistä proteiineista tutkittiin CAF:ien ilmentämiä α -SMA-tasoja leimaamalla nitroselluloosakalvot α -SMA-vasta-aineella. Kalvot käsiteltiin ensin epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi tunnin ajan huoneenlämmössä 3 % maito - 0.1 % Tween-TBS -liuoksessa. Primaarivasta-aine α -SMA (A2547, kloonin 1A4, Sigma, St. Louis, USA) laimennettiin 1:500 1 % maito - 0.1 % Tween-TBS:ään ja käsiteltiin pyörityksessä yön yli, +4 °C:ssa, jonka jälkeen kalvot pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä. Tämän jälkeen kalvoille lisättiin sekundaarivasta-aine, anti-hiiri (35518, DyLight TM 680, Pierce, Rockford, USA) 1:8000 1 % maito - 0.1 % Tween-TBS:ssä. Kalvot käsiteltiin sekundaarivasta-aineen kanssa tunnin ajan pyörityksessä huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne pestiin neljästi 15 minuutin ajan 0.1 % Tween-TBS:llä. Kalvot kuvattiin Odyssey-skannerilla (LI-COR® Inc.) aallonpituudessa 700 nm, intensiteetillä 7.0. Kuvantamisen jälkeen kalvot käsiteltiin 0.2 M NaOH-liuoksella ja kalvoille tehtiin aktiini-vasta-ainevärijäys kuten HAS2-kalvoille.

3.5. RNA-näytteet ja qPCR

3.5.1 RNA-eristys

24 tunnin kasvatuksen jälkeen 6-kuoppalevy siirrettiin jäälle ja solujen käsittelyliuos kerättiin HA-määrittystä varten. RNA:n eristyksessä soluille lisättiin 1 ml EuroGOLD RNAPure™ -reagenssia (EuroClone, Pero, Italy), jonka annettiin vaikuttaa huoneenlämmössä pari minuuttia. Solut irrotettiin muovisen lastan avulla ja siirrettiin eppendorf-putkiin. Putkien annettiin seistä 5 minuuttia, jonka jälkeen näytteet siirrettiin jäälle. Putkiin lisättiin 200 μ l kloroformia ja sekoitettiin hyvin. Putkia seisotettiin jäähauteella 5 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin 13 000x g (Heraeus Instruments, Biofuge pico) 15 minuutin ajan +4 °C:ssa. Muodostunut kirkas yläfaasi siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen ja tähän lisättiin 500 μ l 2-propanolia. Näytteet sekoitettiin hyvin ja siirrettiin -20 °C:een 30 minuutiksi. Näytteet sentrifugoitiin 13 000x g 15 minuutin ajan +4 °C:ssa. Supernatantti poistettiin huolellisesti ja pelletille lisättiin 1 ml 75 % etanolia ja näytteet sekoitettiin ja sentrifugoitiin 13 000x g 15 minuutin ajan +4 °C:ssa. Etanoli poistettiin ja pelletin annettiin hetken kuivahtaa, jonka jälkeen se liuotettiin 21 μ l:aan RNAasi-vapaata vettä. Näytteitä pidettiin vielä viiden minuutin ajan lämpöhauteella +65 °C:ssa RNA:n sekundaarirakenteiden avaamiseksi ja lopuksi RNA-pitoisuus mitattiin NanoDrop® ND-1000 spektrofotometrillä. RNA-näytteet säilytettiin -70 °C:ssa.

3.5.2 cDNA synteesi

cDNA-synteesiä varten RNA:ta otettiin 800 ng kutakin näytettä. cDNA-synteesi valmistettiin Verso™ SYBR® Green 2-step QRT-PCR Kit Plus ROX Vial (Thermo Scientific, Waltham, USA) -reagenssien avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti. cDNA-synteesi ajettiin MJ Research PTC-200 laitteella, ohjelmalla: 30 minuuttia +42 °C, 2 minuuttia +95 °C, 1 minuutti +4 °C. cDNA-näytteet laimennettiin 10 ng/ μ l:ssa pitoisuuksiin. cDNA:sta ajettiin ensin standardilaimennussarja, jolla määritettiin alukkeiden toimivuus hArpo, hHas1, hHas2, hHas3, hCD44, hHyal 1-2 alukkeilla, Verso™ SYBR® Green 2-step QRT-PCR Kit Plus ROX Vial (Thermo Scientific, Waltham, USA) -reagenssien avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti, Mx3000P™ -laitteella (Stratagene), MxPro-ohjelmalla.

3.5.3. Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiivista PCR-ajoa (qPCR) varten valmistettiin mastermix-seos valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kustakin alukkeesta valmistettiin 10 µM kantaliuos, josta aluketta otettiin PCR-reaktioon. Kvantitatiivisessa PCR-reaktiossa kontrolligeeninä (housekeeping gene) käytettiin Arpo-geeniä ja cDNA:ta otettiin ajoon saman verran tutkittavalle geenille kuin kontrolligeenille. Kustakin näytteestä oli kolme rinnakkaista ja qPCR-reaktiot suoritettiin Mx3000P™ -laitteella (Stratagene), MxPro-ohjelmalla (15 minuuttia +95 °C, 40 sykliä: 15 sekuntia +95 °C, 1 minuutti +59 °C, 30 sekuntia +72 °C ja lopuksi sulamispisteen määrittäminen lämpötiloissa +59 °C-+95 °C-+72 °C-+95 °C). Kvantitatiivisessa PCR-reaktiossa käytettiin alukkeina hHas1 (Oligomer, Helsinki, Suomi), hHas2 (AIV-Instituutti, Kuopio, Suomi), hHas3 (Oligomer, Helsinki, Suomi), hCD44 (Oligomer) ja hHyal2 (Oligomer). Alukkeilla monistetut cDNA:t normalisoitiin Arpo-geenin (hArpo, AIV-Instituutti, Kuopio, Suomi) kanssa. Kvantitatiivisessa PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet ja cDNA määrät on listattu taulukkoon 1.

3.5.4. Kvantitatiivisen PCR ajon analysointi

Kvantitatiivisen PCR-reaktion tulokset analysoitiin Mx3000P™ -laitteen MxPro-ohjelman Comparative Quantitation -toiminnolla. Jokaisen näytteen rinnakkaiset määritykset käytiin läpi ja poikkeavat sulamispisteet tai Ct-arvot poistettiin analyysistä. Kunkin analysoitavan geenin yksi kontrollinäyte (K1) asetettiin kalibraattoriarvoksi (100) ja saadut arvot normalisoitiin ajossa käytetyn Arpo-kontrolligeenin tuloksiin.

Taulukko 1. Kvantitatiivisessa PCR:ssä käytettyjen alukkeiden sekvenssit sekä templaatin määrä

Geeni	Aluke	Templaattia	Aluketta/reaktio
hARPO	5'AGATGCAGCAGATCCGCAT	10–30 ng	0,75 µl
	3'GTGGTGATGCCCAAAGCTTG		0,75 µl
hHAS2	5'CAGAATCCAAACAGACAGTTC	10 ng	0,75 µl
	3'TAAGGTGTTGTGTGTGACTG		0,75 µl
hCD44	5'CATCTACCCAGCAACCCTA	10 ng	0,75 µl
	3'CTGTCTGTGCTGTCCGGTGAT		0,75 µl
hHAS1	5'CAAGATTCTTCAGTCTGGAC	30 ng	0,5 µl
	3'TAAGAACGAGGAGAAAGCAG		0,5 µl
hHAS3	5'CTTAAGGGTTGCTTGCTTGC	30 ng	0,5 µl
	3'GTTCGTGGGAGATGAAGGAA		0,5 µl
hHyal2	5'CCTCTGGGGCTTCTACCTCT	20 ng	0,75 µl
	3'CTGAACACGGAAGCTCACAA		0,75 µl
hHyal1	5'GCCCTCTATCCCAGCATCTA	-	
	3'CTCACCCAGAGCACCCTC		

3.6. Arrayt

3.6.1. Sytokiini- ja angiogeneesiarrayt

Sytokiini Arrayn (Proteome Profiler™ Human Cytokine Array, ARY005, R&D Systems, Minneapolis, USA) sekä Angiogeneesi Arrayn (Proteome Profiler™ Human Angiogenesis Array, ARY007, R&D Systems, Minneapolis, USA) avulla tutkittiin erilaisia sytokiinejä ja angiogeneesitekijöitä, joita C8161-melanoomasolut erittävät kasvuliukseensa. Melanooma-soluilta kerättyä kasvatusliuosta (30K CM, konsentroitua ja

laimennettu kuten aikaisemmin ilmoitettu), otettiin näytteeksi 1 ml ja arrayt valmistettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kontrollina käsittelyssä käytettiin 1ml konsentroitua kontrolliliuosta (30K KM, valmistettu kuten aikaisemmin ilmoitettu). Tulosten kuvantamiseksi filmille, kalvoille valmistettiin kemiluminesenssiliuos, Horse Radish Peroxidase (HRP) 1:1 (West Pico Stable Peroxidase Solution ja West Pico Luminol Enhancer Solution, SuperSignal®, Pierce, Rockford, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kalvoja pidettiin kemiluminesenssiliuoksessa viiden minuutin ajan valolta suojattuna ja tämän jälkeen kalvot siirrettiin muovitaskun väliin ja valotettiin eri valotusajoilla filmille (Kodak®) ja filmit kehitettiin välittömästi (Kodak®).

3.6.2 Fosfokinaasi Array

Fibroblasteja istutettiin 6 cm:n maljoille, 500 000 solua kutakin maljaa kohden. Soluja kasvatettiin ylläpitokasvatusliuoksessa 48 tunnin ajan, +37 °C 5 % CO₂. Alkukasvatuksen jälkeen soluille vaihdettiin 24 tunniksi esikäsittelyliuos. Vuorokauden esikäsittelyn jälkeen soluille lisättiin käsittelyliuokset. Kontrollinäytteille lisättiin konsentroitua kontrolliliuosta (30K KM) ja käsittelynäytteille lisättiin konsentroitua kasvatusliuosta (30K CM). Soluja kasvatettiin käsittelyliuoksissa +37 °C 5 % CO₂ ja näytteet kerättiin 30 minuutin ja kahden tunnin käsittelyn jälkeen. Proteiinit eristettiin Proteome Profiler™ Phosphokinaasi Arrayhin (ARY003, R&D Systems, Minneapolis, USA) valmistajan ohjeen mukaisesti.

96-kuoppalevyille (Nunc™, nunc-immuno plate C96) pipetoitiin proteiininäytteitä kolmena rinnakkaisena 3 ja 5 µl kutakin. Standardina proteiinimäärityksessä käytettiin BSA liuosta (1 µg/µl), josta tehtiin myös kolme rinnakkaista määritystä 1, 2, 4, 6, 8 ja 10 µg/µl pitoisuuksilla. Kuhunkin kuoppaan lisättiin Bradfordin-värireagenssia (0.1 mM Coomassie Brilliant Blue G-250, 4.75 % etanoli, 8.5 % fosforihappo) ja annettiin vaikuttaa viiden minuutin ajan tasoravistelussa. Absorbanssit mitattiin ELISA-lukijalla (Molecular Devices, Vmas kinetic microplate reader). BSA-standardisuoran avulla määritettiin näytteiden absorbansseista proteiinipitoisuudet ja näytteitä otettiin fosfokinaasi array-määritykseen 91 µg:aa. Array valmistettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Fosfokinaasi Arrayn tulosten kuvantamiseksi filmille, kalvoille valmistettiin kemiluminesenssiliuos HRP-substraatti 1:1 (West Pico Stable Peroxidase Solution ja West Pico Luminol Enhancer Solution, SuperSignal®, Pierce, Rockford, USA). Kalvoja pidettiin kemiluminesenssiliuoksessa viiden minuutin ajan valolta suojattuna ja kalvot siirrettiin muovitaskun väliin. Kalvot valotettiin eri valotusajoilla filmille (Kodak®) ja filmit kehitettiin välittömästi (Kodak®).

3.6.3 Array-filmien tulkinta

Sytokiiniarrayn tulokset tulkittiin filmiltä silmämääräisesti, koska kontrollikalvolle ei muodostunut verrattavaa intensiteettiä. Intensiteetit jaettiin kolmeen luokkaan riippuen intensiteetin vahvuudesta: heikko intensiteetti (+), keskivahva intensiteetti (++) ja vahva intensiteetti (+). Angiogeneesi- ja fosfokinaasiarrayfilmit skannattiin kuvatiedostoiksi ja nämä analysoitiin Fiji ImageJ -ohjelmalla. Kukin rivi arrayfilmistä analysoitiin kerrallaan ja kunkin pisteen intensiteettiä verrattiin kontrollikalvon pisteen intensiteettiin. Positiivisen pisteen puuttuessa verrattavalta kalvolta, pisteen intensiteettiä verrattiin keskimääräisen taustan intensiteettiin verrattavalta kalvolta. Analysoidut tulokset vietiin taulukkolaskentaohjelma Exceliin (Microsoft® Office) ja tuloksista muodostettiin kuvaajat.

3.7 Konfokaali- ja valomikroskooppinäytteet

3.7.1 Hyaluronaanivärjäys

Kahdeksankuoppainen kammiolasi (Chamber Slide TM System, 177445) esikäsiteltiin seerumilla 30 minuutin ajan $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 . Käsittelyn jälkeen kaikkiin kuoppiin istutettiin 40 000 solua. Soluja kasvatettiin 48 tuntia ylläpitoliuoksessa $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 , jonka jälkeen kuoppiin vaihdettiin käsittelyliuokset. Kontrolliliuoksena käytettiin esikäsitteilyliuosta ja käsittelynä konsentroitua kasvatusliuosta. Soluja pidettiin käsittelyssä 24 tuntia $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 , jonka jälkeen kuopat pestiin fosfaattipuskurilla (PB) ja kiinnitettiin 2 % paraformaldehydillä huoneen lämmössä 20 minuutin ajan. Kuopat pestiin PB:llä ja permeabilisoitiin 0.1 % Triton X-100 - 1 % BSA-PB -liuoksella 10 minuutin ajan huoneen lämmössä. Kuoppiin lisättiin hyaluronaaniin sitoutuvaa koetinta, bHABC (50 $\mu\text{g/ml}$), 1:20 1 % BSA-PB-puskurissa. Kammiolasia pidettiin yön yli bHABC-liuoksessa, kosteuskammiossa $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa, jonka jälkeen kammiolasi pestiin viidesti PB:llä ja kuoppiin lisättiin ABC-liuos (Vectastain ABC-Kit, PK-6100 standard, Vector, Kalifornia, USA) valmistajan ohjeiden mukaisesti. ABC-liuoksen annettiin vaikuttaa tunnin ajan kosteuskammiossa. Tämän jälkeen kammiolasi pestiin viidesti PB:llä ja lasiin lisättiin viideksi minuutiksi DAB-värjäysliuos (0.5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA) 0.03 % H_2O_2 PB:ssä. Kammiolasi pestiin viidesti PB:llä, jonka jälkeen lasi käsiteltiin nopeasti Mayerin hematoksyliiniliuoksella. Kammiolasi pestiin kolmesti tislatulla vedellä ja kuivatettiin. Kammiolasille levitettiin kerros Supermountia (BioGenex, Kalifornia, USA) ja kuivatettiin lämpökaapissa $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 30 minuutin ajan, jonka jälkeen peitinlasi (24x50 mm, Menzel Gläser, Brunswick, Saksa) kiinnitettiin Aquamountilla (VWR International Ltd., Pennsylvania, USA). Lasi kuvattiin Nikon FXA -valomikroskoopilla.

3.7.2 Punasolukoe

Punasolukokeessa tutkittiin solujen ympärille muodostuvan hyaluronaanivaipan kokoa käsitellyissä fibroblastisoluisissa. Lasiselle kammiolaseille (Ibidi) istutettiin 1000–2000 solua. Soluja kasvatettiin 48 tuntia ylläpitoliuoksessa, jonka jälkeen kuopat pestiin HBSS-liuoksella. Osaan kuopista lisättiin kontrolliliuos (K) ja osaan lisättiin melanoomasoluilta kerätty ja konsentroitua kasvatusliuos (30K CM). Soluja kasvatettiin yön yli $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 . Kasvatuksen jälkeen näytteille vaihdettiin uusi kasvatusliuos (DMEM, korkea glukoosipitoisuus, 1 % FBS, 2 mM L-glutamiini, 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomysiini sulfaatti ja 50 U/ml penisilliini), joka sisälsi fluoresoivaa (Alexa fluor 568) HABC:ia 5 $\mu\text{g/ml}$. Kammiolasia pidettiin 15 minuutin ajan lämpökaapissa $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 ja tämän jälkeen kuoppiin lisättiin fiksattuja punasoluja (Sigma, St. Louis, USA) 1 % BSA-PB-liuoksessa. Kuoppiin, johon oli istutettu 1000 solua, laitettiin 5 000 000 punasolua ja kuoppiin, johon oli istutettu 2000 solua, laitettiin 6 000 000 punasolua. Solut kuvattiin tämän jälkeen Zeiss LSM700-konfokaalimikroskoopilla.

3.7.3 Hyaluronaani- ja CD44-värjäys konfokaalimikroskopiaan

Hyaluronaani- ja CD44-konfokaalivärjäyksissä tutkittiin sekä solun sisäistä että solun ulkoista hyaluronaania ja CD44-reseptoria. Kahdeksankuoppainen kammiolasi (Lab-Tek, Chambered # 1.0 Borosilicate coverglass system, 155411) esikäsiteltiin 0.02 M etikkahappoliuoksella, joka sisälsi 1.5 % kollageeni I-liuosta tunnin ajan huoneenlämmössä. Kuopat pestiin tämän jälkeen HBSS-liuoksella ja kuhunkin kuoppaan istutettiin 25 000 fibroblastisolua. Soluja kasvatettiin ylläpitoliuoksessa 48 tuntia $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5

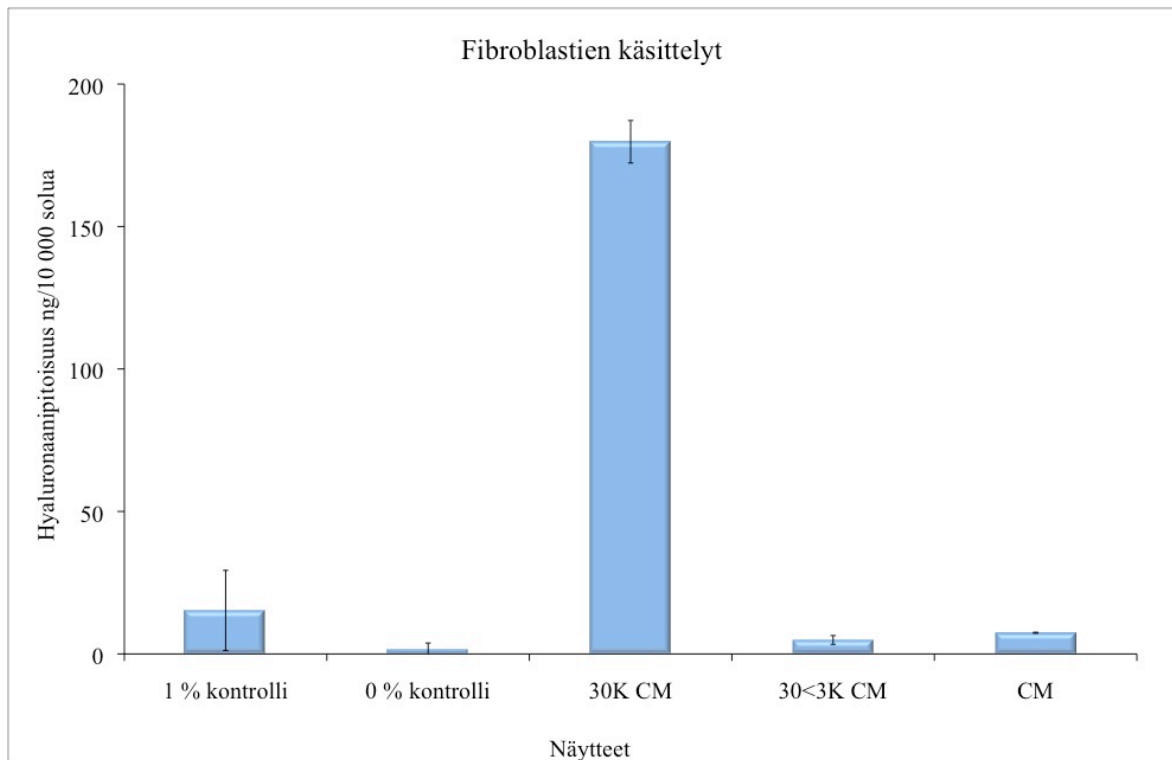
% CO₂, jonka jälkeen kuopat pestiin kahdesti HBSS-liuoksella ja kuoppiin lisättiin joko kontrolliliuos (K) tai konsentroidu kasvatuliuos (30K CM). Käsittelyn annettiin vaikuttaa 24 tuntia +37 °C 5 % CO₂, jonka jälkeen kuopat huuhdeltiin PB-puskurilla ja solut kiinnitettiin 4 % paraformaldehydillä huoneen lämmössä 30 minuutin ajan. Kuopat pestiin viidesti PB-puskurilla ja kaksi kontrollikuoppaa sekä kaksi näytekuoppaa permeabilisoitiin 0.1 % Triton X-100 - 1 % BSA-PB -liuoksella 10 minuutin ajan huoneen lämmössä. Loput kaksi kontrollikuoppaa ja kaksi näytekuoppaa käsiteltiin 1 % BSA liuoksella 10 minuutin ajan huoneenlämmössä. Kuoppiin lisättiin hyaluronaaniin sitoutuvaa koetinta, bHABC (50 µg/ml) 1:20 sekä CD44:ään sitoutuvaa primaarivasta-ainetta, Hermes3 (saatu lahjaksi prof. Sirpa Jalkaselta, Turusta), 1:200 1 % BSA-PB-liuoksessa. Kammiolasia pidettiin yön yli kosteuskammiossa +4 °C:ssa, jonka jälkeen kuopat pestiin viidesti PB-puskurilla ja näytteille lisättiin sekundaarivasta-aineet. CD44:lle Fitc-anti-hiiri 1:100 (sc-2010, Santa Cruz, Kalifornia, USA) ja biotinyloituun hyaluronaaniin sitoutuvaa Texas Red-Streptavidiini (SA-5006, Vector, Kalifornia, USA) 1:1000 PB-puskurissa. Näytteitä pidettiin kosteuskammiossa tunnin ajan sekundaarivasta-aineiden kanssa ja tämän jälkeen kuopat pestiin neljästi PB-puskurilla ja näytteet jätettiin PB-puskuriin. Värjätty kammiolasi mikroskopoiitiin Zeiss LSM700-konfokaalimikroskoopilla.

3.8 Tilastollinen analyysi

Tilastollisessa analysoinnissa eri sarjoille tehtiin varianssianalyysi sekä 1 % seerumin sisältäville kasvatuliuosarjoille (n=6) että seerumittomille kasvatuliuosarjoille (n=6). Kummassakin tilastollisessa varianssianalyysissä mukana oli näytteiden sisältämä hyaluronaanipitoisuus (HA ng/10 000 solua) sekä keräyssarjan numero. Seerumin sisältävistä kasvatuliuosarjoista otettiin mukaan sarjat, jotka sisälsivät kontrollin sekä konsentroidun kontrollin (30K KM). Käsittelyjen välistä tilastollista merkittävyyttä tutkittiin post hoc analyysillä (LSD post hoc test).

4. TULOKSET

Fibroblastien hyaluronaanisynteesi kasvoi huomattavasti kun niitä käsiteltiin melanoomasoluilta kerätyllä kasvatusliuoksella, joka oli konsentroidu 30 kDa-konsentraatiopylväillä. Kun soluja käsiteltiin liuoksella, joka oli konsentroidu 3 kDa-konsentraatiopylväillä ja sisälsi 3–30 kDa kokoisia molekyylejä, ei tuloksissa havaittu samanlaista hyaluronaanisynteesiä kasvattavaa vaikutusta. Tämän tuloksen avulla saatiin selville, että ainoastaan yli 30 kDa:n kokoiset melanoomasolujen erittämät tekijät aktivoivat fibroblastien hyaluronaanisynteesiä ja näiden tulosten jälkeen näytteitä käsiteltiin ainoastaan 30 kDa-konsentraatiopylväillä konsentroidulla kasvatusliuoksella. 30 kDa-konsentraatiopylväillä konsentroidun kasvatusliuoksen aiheuttama hyaluronaanituotannon kasvu fibroblastisoluiissa oli yli 30-kertainen kontrollinäytteisiin verrattuna (Kuva 3). Seerumillinen (1 %) kasvatusliuos lisäsi fibroblastien hyaluronaanisynteesiä 4–20 kertaiseksi (Kuva 4) ja seerumiton kasvatusliuos lisäsi fibroblastien hyaluronaanisynteesiä 2–18 kertaiseksi (Kuva 6).

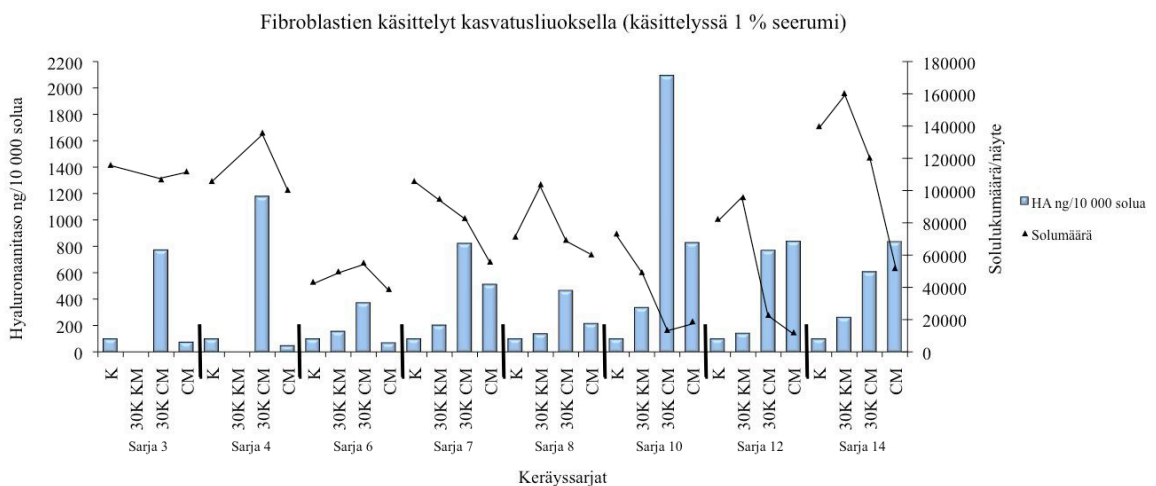


Kuva 3. Konsentraatiopylväiden valinta tutkimukseen. Fibroblasteja käsiteltiin sekä 30 kDa- että 3 kDa-pylväillä konsentroidulla kasvatusliuoksella 24 tuntia. HA-ELSA menetelmällä mitatun hyaluronaanin määrä on laskettu eri näytteissä ng/10 000 solua kohden. Kontrollina käsittelyssä on sekä 1 % seerumin sisältävä että seerumiton (0 %) esikäsitelyliuos. 30 kDa pylväillä konsentroidun 1 % seerumin sisältävän kasvatusliuoksen (30K CM) läpätullut neste konsentroidiin 3 kDa pylväillä (30<3K). Näytteet käsiteltiin myös pelkällä melanoomasoluilta kerätyllä 1 % seerumin sisältävällä kasvatusliuoksella (CM). Tämä koe on tehty yhden kerran ja tulokset on ilmoitettu kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvosta ja pylväisiin on merkattu näiden näytteiden vaihteluväli.

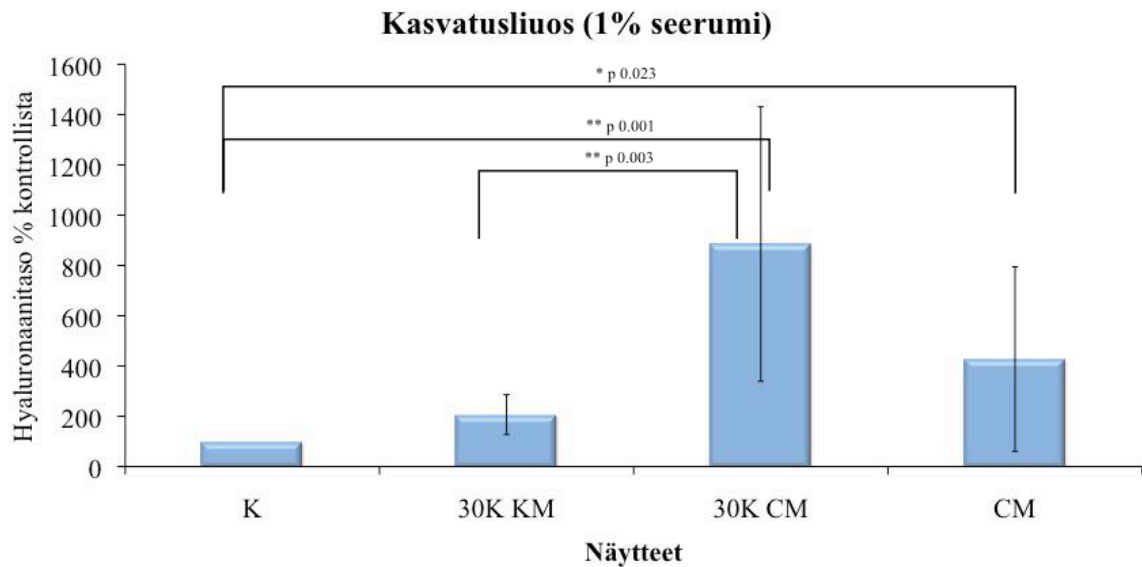
4.1 HA-ELSA tulokset

Fibroblastisoluja käsiteltiin useassa kokeessa sekä 1 % seerumin sisältävällä kasvatusliuoksella että seerumittomalla kasvatusliuoksella. Eri kokeiden tulokset keräyssarjoista sekä 1 % seerumin sisältävästä että seerumittomasta kasvatusliuoksesta on esitetty kuvissa 4 ja 6. Eri sarjojen rinnakkaiset näytteet on yhdistetty, joista on laskettu hyaluronaanin keskiarvo HA ng/ 10 000 solua kutakin käytettä kohden sekä näytteiden keskiarvoinen solumäärä kussakin sarjassa. Kaikissa kokeissa melanoomasoluilta kerätyn ja konsentroidun kasvatusliuoksen havaittiin kasvattavan huomattavasti hyaluronaanisynteesiä sekä 1 % seerumin sisältävällä että seerumittomalla kasvatusliuoksella (30K CM) verrattuna kontrollinäytteisiin. Näissä kokeissa havaittiin myös konsentroidun kontrollin lisäävän hyaluronaanisynteesiä pelkkään kontrolliin verrattuna (seerumin vaikutus), mutta tämä ei kuitenkaan kasvattanut hyaluronaanisynteesiä yhtä paljon kuin melanoomasoluilta kerätty ja konsentroitunut kasvatusliuos (Kuvat 4 ja 6).

Fibroblasteissa, jotka oli käsitelty pelkällä C8161-melanoomasoluilta kerätyllä kasvatusliuoksella (ei konsentroitunut eikä laimennettu 1:10), havaittiin myös hyaluronaanisynteesin kasvua kun pitoisuudet laskettiin HA ng/10 000 solua. Kuitenkin näissä näytteissä oli yleisesti ottaen huomattavasti vähemmän soluja kuin muissa näytteissä sekä 1 % seerumin sisältävässä että seerumittomassa kasvatusliuoksessa. Pelkkä kasvatusliuos sisälsi samoja hyaluronaanisynteesiä lisääviä molekyylejä kuin konsentroitunut kasvatusliuoskin, mutta tästä kasvatusliuoksesta melanoomasolut olivat kuluttaneet ravintoaineet vähiin, joten fibroblastien kasvu heikentyi tällä käsittelyllä (Kuvat 4 ja 6). Eri kasvatusliuosarjoista laskettiin myös kaikkien näytteiden keskiarvot, joita verrattiin kontrollin arvoon. Näistä tuloksista saatiin selville montako prosenttia eri käsitellyt ovat nostaneet hyaluronaanin tuotantoa fibroblasteissa kontrolliin verrattuna. Nämä tulokset molemmista kasvatusliuosarjoista on kerätty kuvaan 5 (seerumillinen) ja 7 (seerumiton).



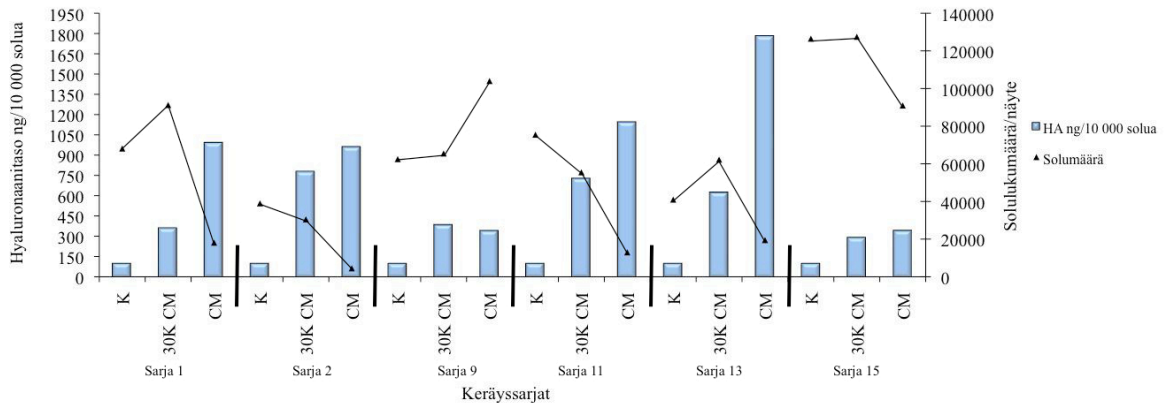
Kuva 4. Fibroblastien käsitelysarjat 1 % seerumin sisältävällä kasvatusliuoksella. Rinnakkaisista näytteistä on laskettu keskiarvo hyaluronaanin suhteen (HA ng/10 000 solua) sekä kunkin näytteen solumäärän keskiarvo. Näytesarjoissa ovat eri käsitelyinä kontrolli (K), konsentroitunut kontrolli (KK), konsentroitunut kasvatusliuos (30K CM) sekä käsittely pelkällä kasvatusliuoksella (CM).



Kuva 5. Keskiarvot näytteistä 1 % seerumin sisältävässä kasvatusliuoksessa. Kustakin keräyssarjasta laskettiin näytteiden keskiarvot, joita verrattiin kontrolliin (asetettu arvoon 100). Näin saatiin selvitettyä montako prosenttia eri käsittelyt ovat nostaneet hyaluronaanintuotantoa kontrolliin verrattuna. Näytteille laskettiin myös keskihajonta. Tuloksille tehtiin varianssianalyysi, johon otettiin mukaan sarjat, joissa käsittelyissä oli ollut mukana tavallinen kontrolli (K) sekä konsentroidu kontrolli (30K KM) (n=6). Kasvatusliuoskäsittely lisää selvästi fibroblastien hyaluronaanisynteesiä (p=0,003), eri keräyssarjat eivät vaikuttaneet tulokseen (p=0,057). Varianssianalyysin post hoc (LSD) testissä verrattiin eri käsittelyjen välistä tilastollista merkittävyyttä kontrollin ja konsentroidun kasvatusliuoskäsittelyn (30K CM) välillä (**p 0,001) sekä kontrollin ja kasvatusliuoskäsittelyn (CM) välillä (*p 0,023) oli tilastollinen merkittävyys. Myös konsentroidun kontrollin (30K KM) ja konsentroidun kasvatusliuoskäsittelyn (30K CM) välillä (**p 0,003) oli tilastollinen merkittävyys.

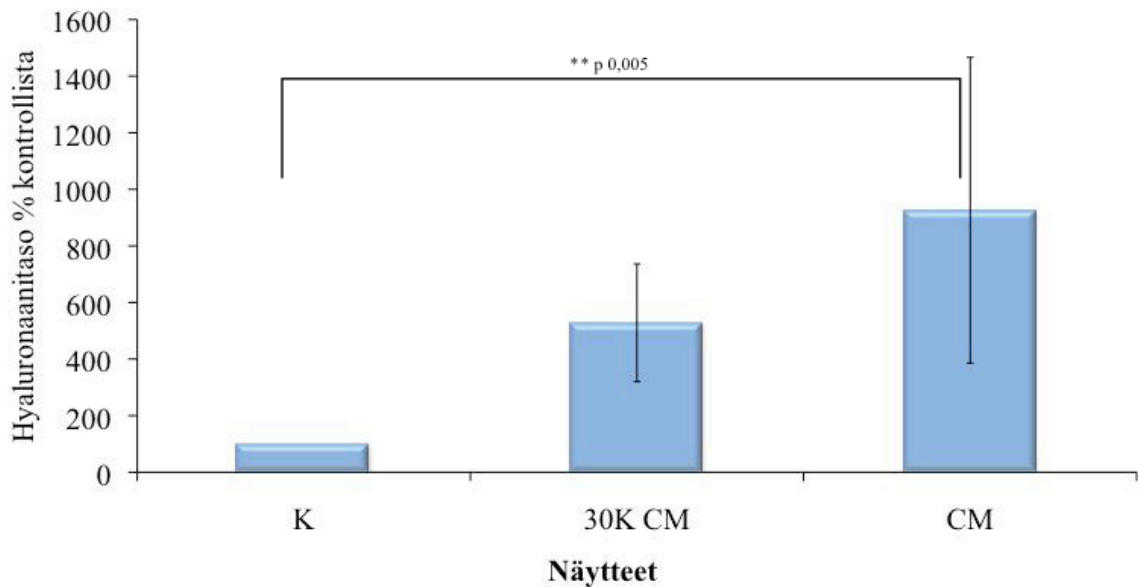
Fibroblastit, jotka oli käsitelty seerumittomalla kasvatusliuoksella, tuottivat myös huomattavasti kontrollinäytteitä enemmän hyaluronaania, noin 2–6 kertaisesti. Myös näissä näytteissä hyaluronaanituotannon kasvu havaittiin soluilla, jotka oli käsitelty pelkällä kasvatusliuoksella. Kuten 1 % seerumin sisältävällä kasvatusliuoksella, myös seerumittomassa kasvatusliuoskäsittelyssä (CM) solumäärät näytteissä olivat huomattavasti matalammat kuin muissa näytteissä, johtuen todennäköisesti kasvatusliuoksen ravinteiden köyhyydestä. Kontrollinäytteet seerumittomassa käsittelyssä antavat osittain kuvaa fibroblastien hyaluronaanin tuotannosta ilman kasvatusliuoksen seerumista johtuvaa vaikutusta (Kuvat 6 ja 7).

Fibroblastien käsittelyt kasvatusliuoksella (seerumiton käsittely)



Kuva 6. Fibroblastien käsittelysarjat seerumittomalla kasvatusliuoksella. Rinnakkaisista näytteistä on laskettu keskiarvot, jotka on ilmoitettu hyaluroonanin määränä ng/10 000 solua kohden. Kuvaan on myös merkitty rinnakkaisten näytteiden solumäärän keskiarvo kussakin näytteessä. Näytteinä eri sarjoissa ovat kontrolli (K), konsentroitunut seerumiton kasvatusliuos (30K CM) sekä käsittely pelkällä seerumittomalla kasvatusliuoksella (CM).

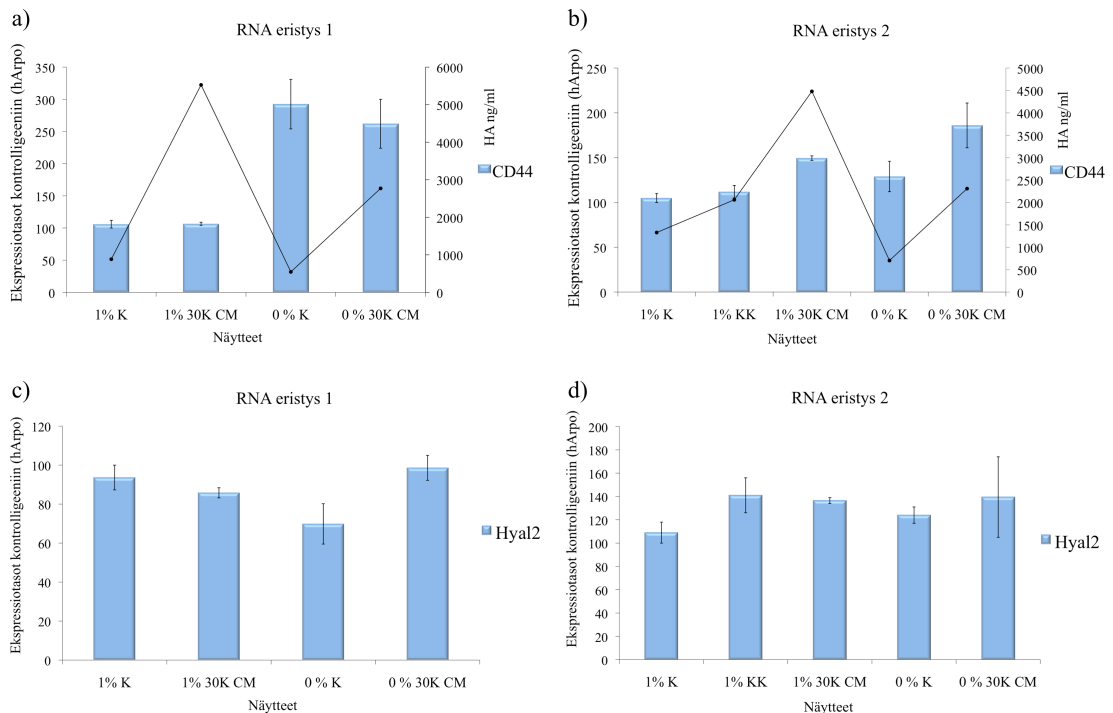
Kasvatusliuos (seerumiton)



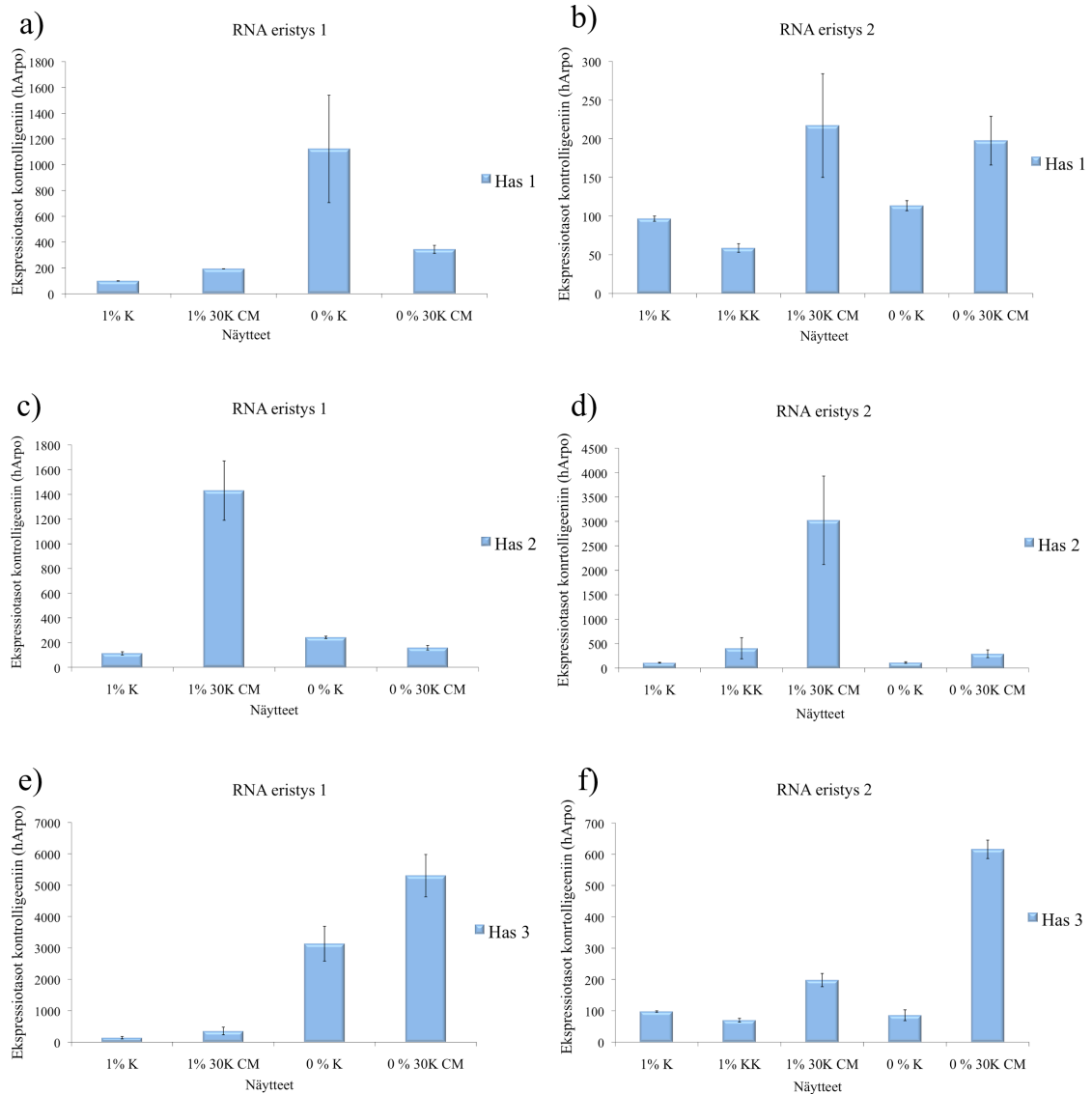
Kuva 7. Näytteiden keskiarvot seerumittomassa kasvatusliuoksessa. Kustakin keräyssarjasta laskettiin näytteiden väliset keskiarvot, joita verrattiin kontrolliin (asetettu arvoon 100). Näin saatiin selvitettyä montako prosenttia eri käsittelyt ovat nostaneet hyaluroaanituotantoa kontrolliin verrattuna. Keräyssarjojen keskiarvoista laskettiin myös keskihajonta. Sarjoille tehtiin varianssianalyysi, joka osoitti käsittelyllä olevan tilastollista merkittävyyttä ($p=0,016$) ja keräyssarjat eivät vaikuttaneet käsittelyihin tilastollisesti ($p=0,149$). Varianssianalyysin post hoc (LSD) testissä tilastollinen merkittävyys eri käsittelyjen välille tuli ainoastaan kontrollin (K) ja seerumittoman kasvatusliuoskäsittelyn (CM) välille ($**p 0,005$).

4.2 qPCR-tulokset

Kvantitatiivisellä PCR:llä haluttiin selvittää hyaluronaanireseptorin ja sitä hajottavan hyaluronidaasi 2:n ilmentymistasojen muutoksia mRNA-tasolla. CD44:n mRNA ilmenemistasoihin käsittelyllä ei ollut vaikutusta ja kontrolloissa että konsentroiduissa kasvatusliuosnäytteissä qPCR-reaktion Ct-arvot olivat 19–21 syklin sisällä. Hyaluronidaasi 2:n ilmentymistasoissa ei myöskään ollut selkeää eroa eri käsittelyjen välillä ja qPCR-reaktiosta kontrollinäytteet ja konsentroidut kasvatusliuosnäytteet olivat 21–24 Ct:n välillä (Kuva 8). Kvantitatiivisellä PCR:llä haluttiin selvittää myös hyaluronaanisynteesiin vaikuttavia muutoksia mRNA tasolla, etenkin hyaluronaanisyntaasin suhteen. Melanoomasoluilta kerätty kasvatusliuos (30K CM) lisäsi huomattavasti Has2:n mRNA:n ilmentymistä. Hyaluronaanisyntaasi 2:n ilmentyminen nousi erityisesti 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM) (Ct:t 18–20) verrattuna kontrollinäytteisiin (Ct:t 20–23), kun taas melanoomasoluilta kerätty seerumiton konsentroidu kasvatusliuos (30K CM) lisäsi Has3:n ilmentymistä (Ct:t 25–26) verrattuna kontrollinäytteisiin (Ct:t 28–29). Hyaluronaanisyntaasi 1:n mRNA:n ilmentymiseen ei käsittely vaikuttanut ja näytteiden välillä ei ollut selkeää eroa ja qPCR tuloksissa sekä kontrollinäytteiden että kasvatusliuoskäsittelyn Ct-arvot olivat syklien 27–29 sisällä (Kuva 9). Kukin tutkittava geeni ajettiin kolmena rinnakkaisena näytteenä qPCR:llä ja näytteet normalisoitiin kontrollina käytettyyn Arpo-geeniin. Kvantitatiivisella PCR:llä saadut mRNA-ilmentymistasojen tulokset on koottu kuviin 8 ja 9.



Kuva 8. Kvantitatiivisen PCR:n tulokset. Fibroblastisoluista eristettiin RNA kahdella erillisellä kerralla. Hyaluronaania sitovan reseptorin, CD44:n, sekä sitä hajottavan Hyal2:n mRNA tasoissa ei ollut selkeää eroa näytteiden välillä eri RNA-eristyskerroilla. Kuvissa a ja b) CD44:n qPCR tulokset ja kuvissa c) ja d) Hyal2:n qPCR tulokset. Kuhunkin kuvaan on lisätty rinnakkaisten käsittelyjen vaihteluväli sekä CD44-kuvaajaan RNA-eristyksen yhteydessä kerätystä näyteliuoksesta määritetty hyaluronaanipitoisuus (ng/ml) kussakin näytteessä (viiva). mRNA:n ilmenemistasoja (pylväs) on verrattu kontrolligeeni Arpoon ja kunkin ajon ensimmäinen kontrollinäyte on asetettu kalibraattoriarvoon (100).

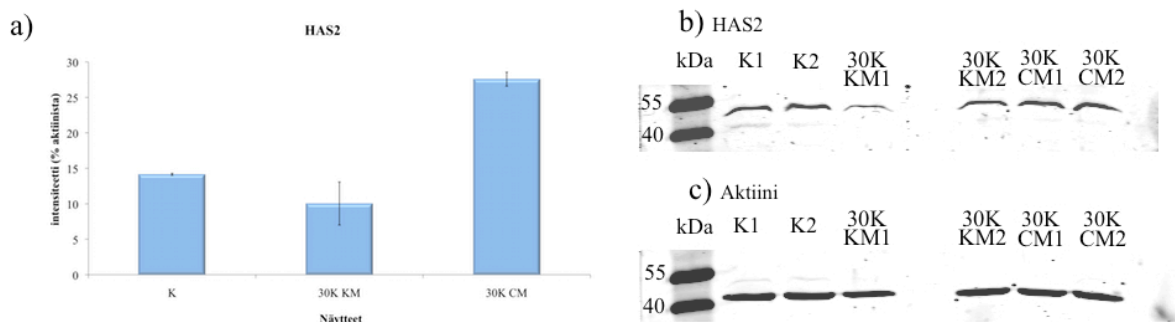


Kuva 9. Hyaluraanisyntaasin mRNA-tasot. Kvantitatiivisella PCR:llä selvitettiin kasvatusliuoksen vaikutusta Has1-3:n mRNA tasoihin. Hyaluraanisyntaasi 1:n mRNA ilmentymistasoissa ei ollut selkeää eroa kummallakaan RNA-eristyskerralla (kuvat a ja b). Hyaluraanisyntaasi 2:n mRNA ilmentymistasoissa havaittiin nousua molemmissa RNA-kokeissa käsiteltäessä solut 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla kasvatusliuoksella (1 % 30K CM) (kuvat c ja d). Hyaluraanisyntaasi 3:n mRNA ilmentymistasoissa havaittiin nousua molemmissa RNA-kokeissa käsiteltäessä solut konsentroidulla seerumittomalla kasvatusliuoksella (0 % 30K CM) (kuvat e ja f). Kunkin kuvan pylväisiin on lisätty rinnakkaisten näytteiden vaihteluväli ja mRNA:n ilmenemistasoja on verrattu (pylväs) kontrolligeeni Arpoon. Kunkin ajon ensimmäinen kontrollinäyte on asetettu kalibraattoriarvoon (100).

4.3 Western blot -tulokset

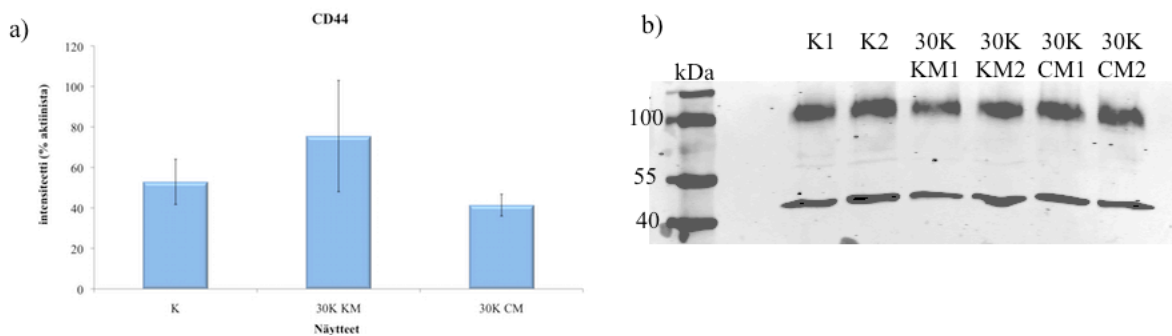
Western blot -menetelmän tarkoituksena oli selvittää melanoomasolujen erittämien kasvutekijöiden vaikutusta fibroblastien proteiinisynteesiin. Hyaluraanisyntaasi 2:n

proteiinimäärä oli noussut näytteissä, jotka oli käsitelty 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM) verrattuna kontrollikäsitelyyn. Tämä tulos tukee qPCR:llä saatuja tuloksia Has2:n mRNA ilmentymistason noususta. Kalvossa, joka oli leimattu HAS2:lla, näkyi selkeä vasta-aineen tunnistama vyöhyke noin 52 kDa kohdalla. Laskennallinen koko HAS2 proteiinille on 63 kDa, mutta proteiineleimauksissa on raportoitu HAS2-vasta-aineen tunnistavan 52 kDa kokoisen proteiinin (Karousou ym., 2010). Yllättävää oli että proteiinieristyksessä Qiagenin Qproteome® Cell compartemet kit:llä HAS2:n ilmentyminen oli noussut solun sytosolisen osan proteiineissa, vaikka HAS2 on solukalvoproteiini (Kuva 10). Kalvoon, johon oli siirrostettu kalvoproteiinit, ei saatu HAS2 vasta-aineella esiin mitään.



Kuva 10. Western blot tulokset HAS2 ja aktiini vasta-aineväryksestä. Kuvassa a) Odyssey V3.0. (Li-Cor) laitteella mitatut näytteiden intensiteetit. Hyaluraanisyntaasi 2 -proteiinin intensiteetit on suhteutettu aktiinin intensiteettiin. Aktiinin arvoksi on asetettu 100 kussakin näytteessä. Näytteiden käsittelyssä on käytetty 1 % seerumin sisältävää liuosta ja näytteet on käsitelty joko kontrolliliuoksilla (K ja 30K KM) tai konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM). Kuvassa d) Western blot -kalvo solun sytosolisesta osasta leimatusta HAS2-proteiinista (52 kDa) ja kuvassa c) Western blot -kalvo proteiinieristysen sytosolisesta osasta leimatusta aktiinista (42 kDa). Tämä koe on tehty yhden kerran ja tulokset on ilmoitettu kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvosta (pylväs) ja pylväisiin on merkattu näiden näytteiden vaihteluväli.

CD44 saatiin määritettyä sekä solun kalvoproteiineista että solun sytosolisista proteiineista. Kummankin proteiinifraktion näytteistä CD44-vasta-aine värjäsi vahvan vyöhykkeen, jonka koko oli noin 110 kDa. Tämä koko vastaa aiemminkin melanoomasoluista eristettyä CD44:n perusmuotoa suurempaa proteiinvyöhykettä (Bajorath ym., 1998), jonka kuitenkin voidaan olettaa olevan CD44-proteiini (Kuva 11). Käsitely konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM) ei vaikuttanut CD44-vasta-aineella värjättyjen vyöhykkeiden intensiteetteihin. CD44-proteiinieristysen tulokset tukevat myös qPCR:n tuloksia (Kuva 11). Kunkin vasta-aineella leimatun proteiinin intensiteettitasoa kalvoissa suhteutettiin samasta kalvosta vasta-aineleimauksella saadun aktiinin intensiteettitasoon (Kuvat 10 ja 11).

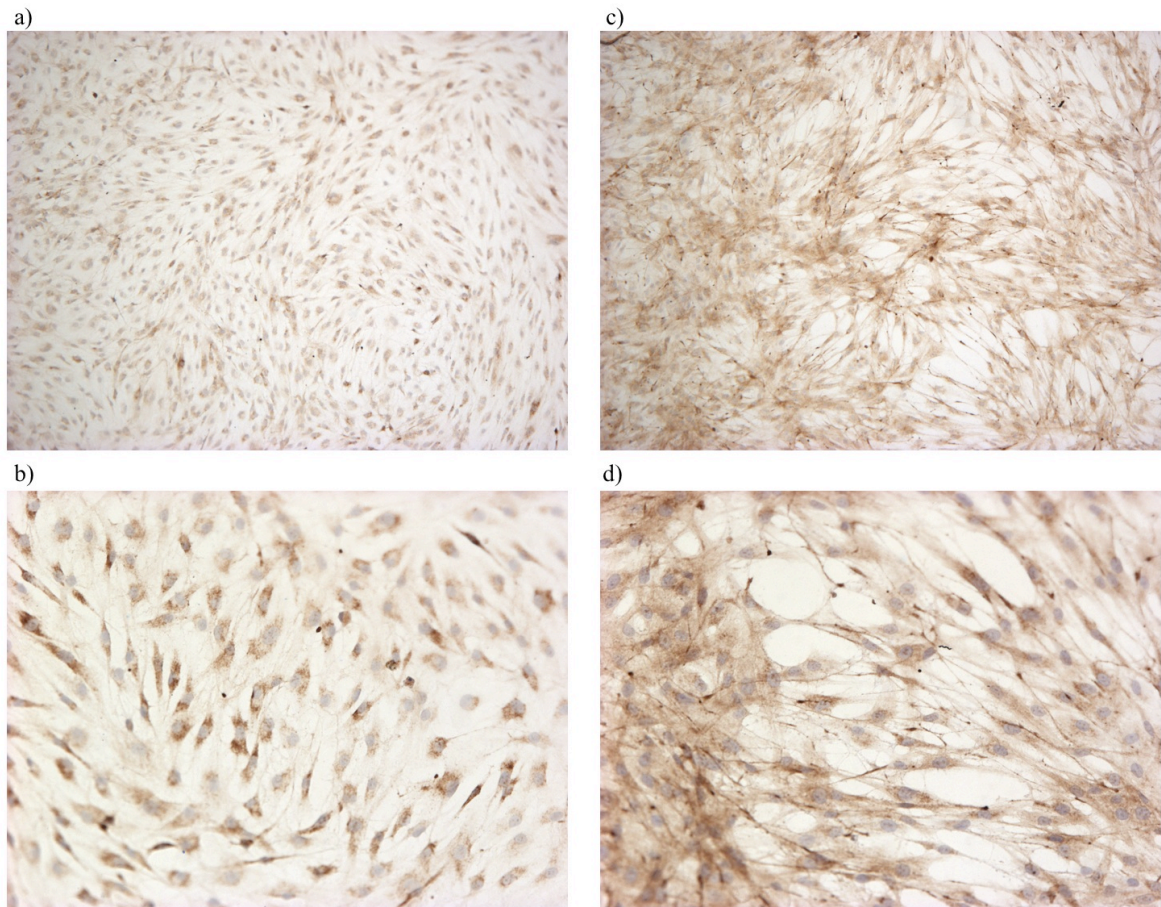


Kuva 11. Western blot tulokset CD44:n ja aktiinin vasta-aineväryksestä. Kuvassa a) Odyssey V3.0 (Li-Cor) laitteella mitatut näytteiden intensiteetit solujen sytosolisesta proteiinosasta. CD44-proteiinin intensiteetit on suhteutettu aktiinin intensiteettiin (%:ia). Näytteiden käsittelyssä on käytetty 1 % seerumin sisältävää kasvatusliuosta. Näytteet on käsitelty joko kontrolliliuoksilla (K ja 30K KM) tai konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM). Kuvassa b) Western blot -kalvo vasta-ainevärytyksestä CD44-proteiinista (~90 kDa) sekä aktiinista (42 kDa) solujen sytosolisesta proteiinosasta. Tämä koe on tehty yhden kerran ja tulokset (pylväs) on ilmoitettu kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvosta ja pylväisiin on merkattu näiden näytteiden vaihteluväli.

Proteiininäytteiden vasta-ainevärykset α -SMA:n kanssa antoivat hyvin heikon vyöhykkeen sytosolisista proteiineista, mutta tuloksissa ei ollut havaittavissa selkeää eroa eri käsittelyjen välillä kontrolli- ja käsittelynäytteiden. Alfa-SMA:n tasot olivat yleisesti ottaen proteiininäytteissä huomattavasti matalammat kuin aktiinin (tulokset eivät ole esillä). Itse aktiinin vasta-aineväryys saatiin esille sekä kalvoproteiinosassa että sytosolisessa proteiinosassa. Aktiinitasot kalvoproteiineissa olivat kuitenkin huomattavasti pienemmät kuin aktiinitasot solun sytosolisissa proteiineissa.

4.4 Konfokaali- ja valomikroskooppivärykset

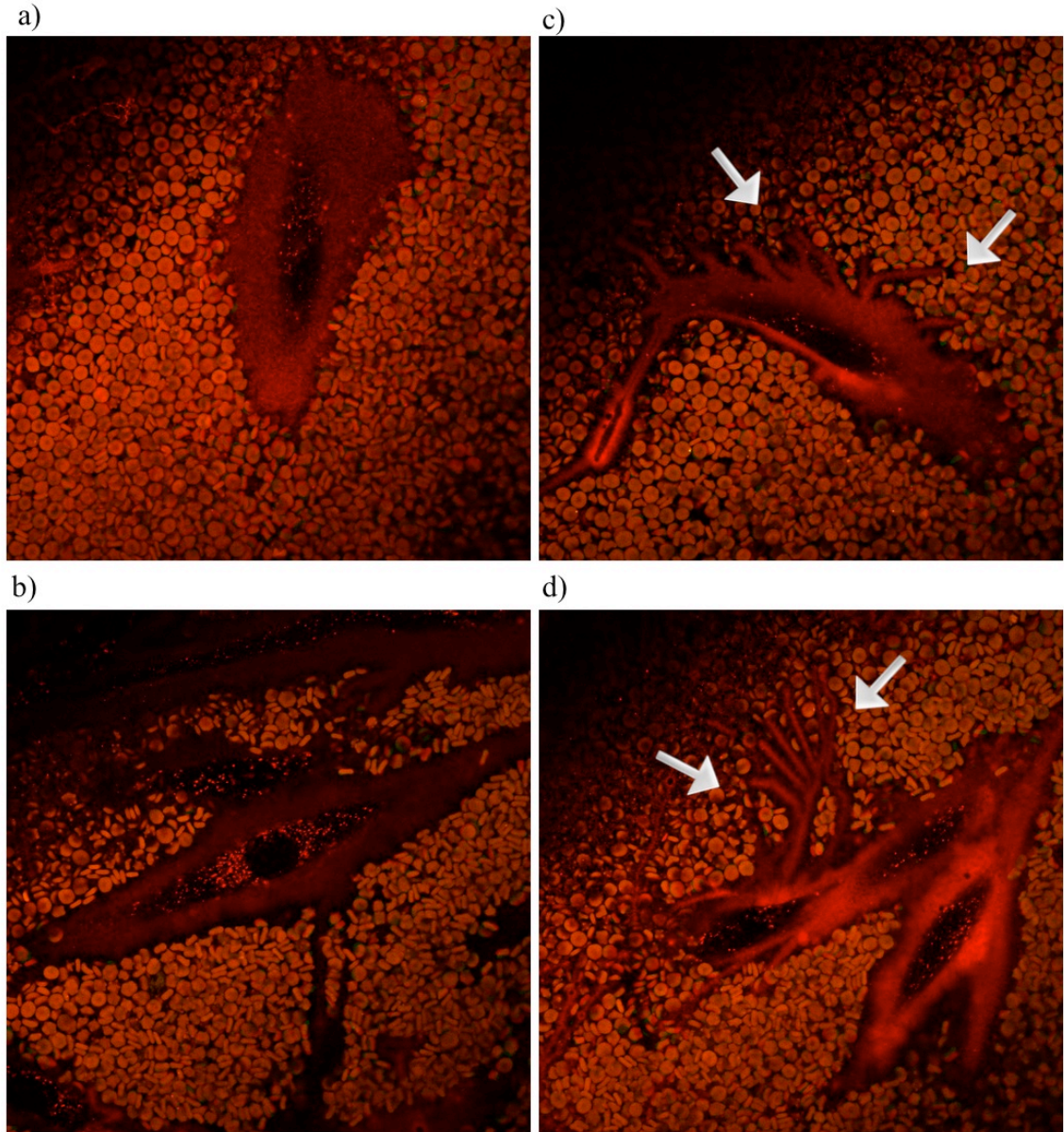
Valomikroskooppinäytteistä haluttiin tarkastella mm. hyaluronaanin värytymistä sekä paikantumista soluissa eri käsittelyjen välillä. Melanoomasolujen erittämät tekijät lisäsivät fibroblastien hyaluronaanivärytyvyyttä valomikroskooppinäytteissä verrattuna kontrollisoluihin. Näytteet oli käsitelty 1 % seerumin sisältävällä kontrolliliuoksella (K) tai konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM). Hyaluronaani väryttiin soluista biotinyloidun hyaluronaaniin sitoutuvan proteiinin (bHABC) ja tämän kromogeenin 3-3'-diaminobenzidiinin (DAB) avulla. Reaktion lopputuloksena hyaluronaani värytyy ruskeaksi. Tumat saatiin esille näytteistä hematoksyliiniliuoksella (purppura). Käsitellyillä soluilla havaittiin myös morfologisia muutoksia solujen rakenteessa. Solut olivat muodoltaan huomattavasti pidempiä kuin kontrollisolut ja ne muodostivat pitkiä ulokkeita viereisiin soluihin. Tämä oli havaittavissa tarkasteltaessa soluja valomikroskoopilla jo 4-kertaisella suurennoksella (Kuva 12).



Kuva 12. Hyaluronaani-DAB-värjäys 2 % paraformaldehydillä kiinnitetyille fibroblasteille. Solut oli permeabilisoitu 0.1 % Triton X-100 - 1 % BSA-PB -liuoksella. Kuvassa a) 4x objektiivilla otettu kuva soluista, jotka on käsitelty 1 % seerumin sisältävällä kontrolliliuoksella (K) ja kuvassa b) 10x objektiivilla otettu kuva samasta näytteestä. Kuvassa c) 4x objektiivilla otettu kuva soluista, jotka on käsitelty 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM) ja kuvassa d) 10x objektiivilla otettu kuva samasta näytteestä. Solujen hyaluronaani on värjätty hyaluronaaniin sitoutuvan biotinyloidun proteiinin avulla (ruskea) ja tumat on värjätty hematoksyliiniliuoksella (purppura). Solut on kuvattu Nikon FXA -valomikroskoopilla.

Punasolukokeen tarkoituksena oli tutkia konsentroidun kasvatusliuoksen vaikutusta hyaluronaanivaipan muodostumiseen elävien solujen pinnalle. Solut istutettiin mahdollisimman harvaan, jotta punasolut pystyvät asettumaan solujen ympärille. Lisääntyneen solunulkoisen hyaluronaanin määrän myötä punasolut eivät pysty tulemaan yhtä lähelle solukalvoa kuin vähemmän solunulkoista hyaluronaania sisältävien solujen yhteyteen.

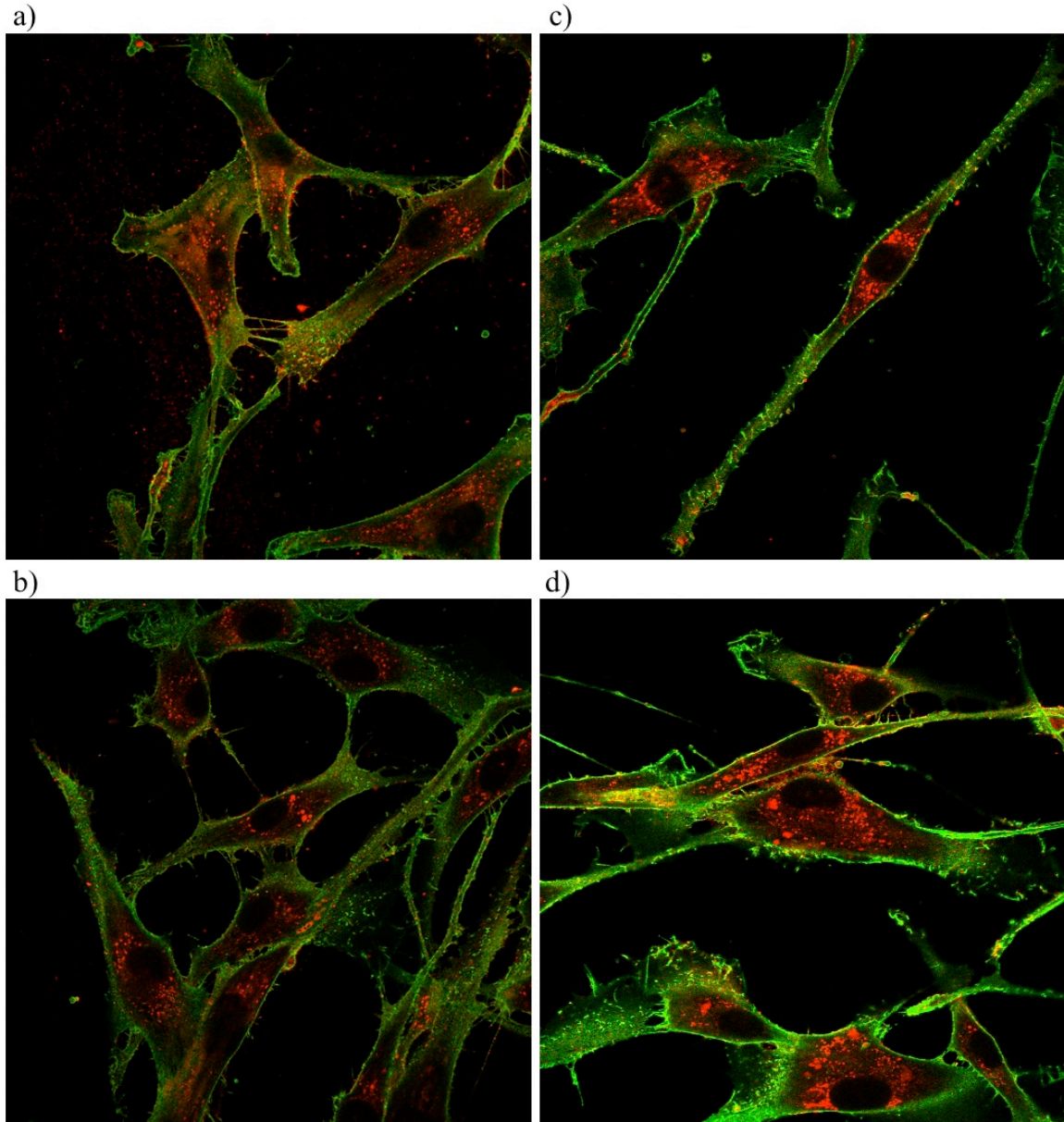
Punasolukokeessa havaittiin selkeästi 1 % seerumin sisältävällä kasvatusliuoksella (30K CM) käsiteltyjen fibroblastien muodostaneen kasvatusalustaansa enemmän haaroja ja ulokkeita verrattuna kontrollisoluihin. Käsitellyt solut olivat myös tuottaneet huomattavasti enemmän hyaluronaania kasvuympäristöönsä sekä solu-ulokkeidensa yhteyteen. Näitä solu-ulokkeita ei ollut havaittavissa yhtä selkeästi kontrollisoluista kuin käsitellyistä soluista. Käsitellyt solut myös värjäytyivät huomattavasti vahvemmin fluoresoivalla HABC:lla kuin kontrollisolut (Kuva 13).



Kuva 13. Punasolukoe fibroblasteille. Fibroblasteja istutettiin harvaan Ibidi-kammiolasille. Solut käsiteltiin joko 1 % seerumin sisältävällä kontrolliliuoksella (K) tai konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM) 24 tuntia. Ennen kuvausta eläville soluille lisättiin käsittelyliuos, joka sisälsi fluoresoivaa HABC:ia $5\mu\text{g/ml}$ sekä $5\text{--}6 \times 10^6$ punasolua. Kuvissa a) ja b) kontrolliliuoksella käsitellyt fibroblastit ja kuvissa c) ja d) konsentroidulla kasvatusliuoksella käsitellyt fibroblastit. Kuvissa c) ja d) on selkeästi havaittavissa konsentroidun kasvatusliuoskäsittelyn aikaansaamat solu-ulokkeet (nuoli) sekä solujen ympärillä oleva vahva hyaluronaanivaippa. Solut kuvattiin Zeiss LSM700-konfokaalimikroskoopilla 40x öljyimmissio-objektiivilla.

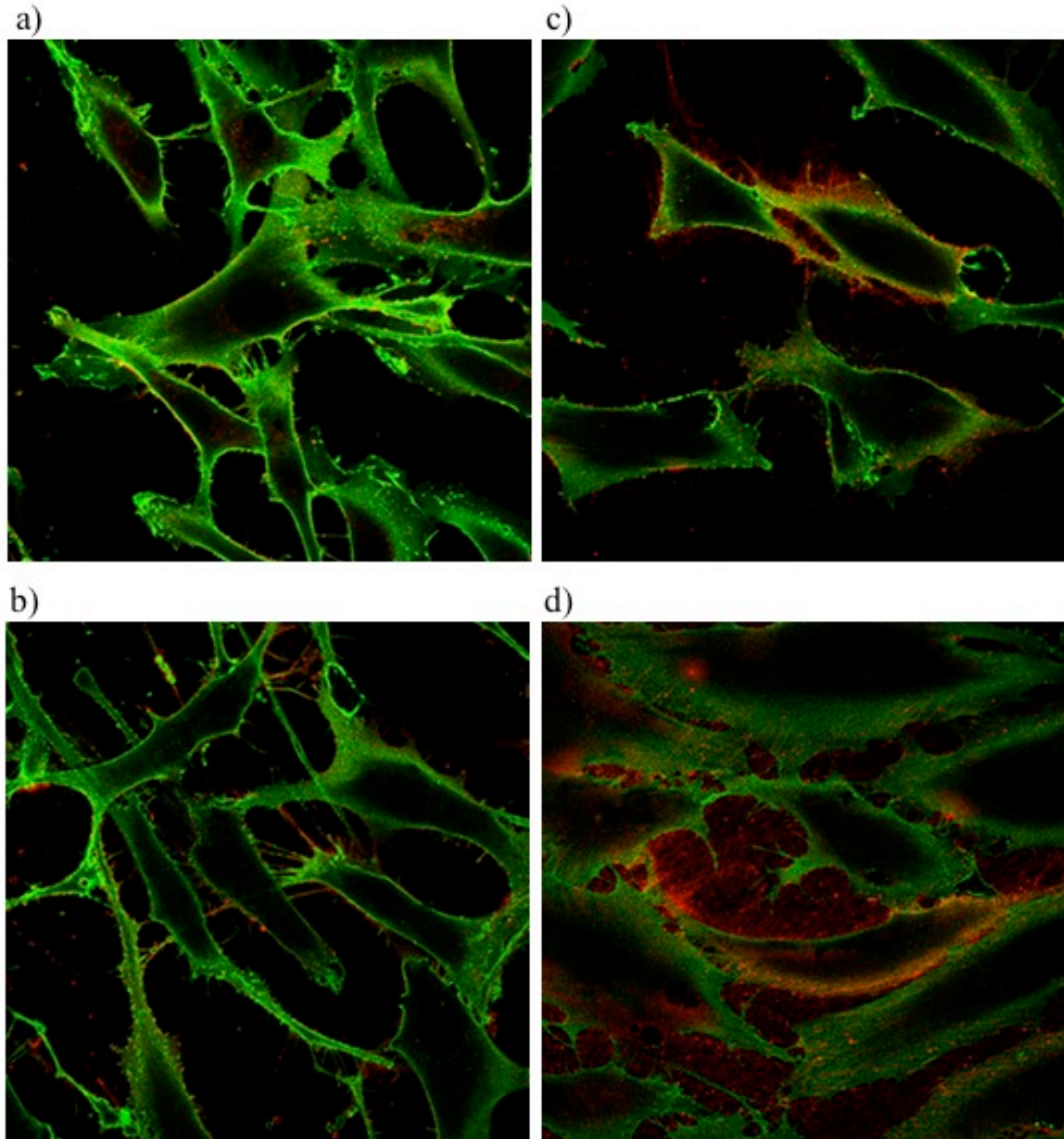
Konfokaalimikroskooppinäytteillä haluttiin tutkia mm. CD44-reseptorin ja hyaluronaanin paikantumista ja määrää soluissa eri käsittelyjen välillä. Immunofluoresenssivärijäyksillä haluttiin myös tarkastella valomikroskooppinäytteissä havaittua fibroblastien erilaista morfologiaa, jonka konsentroidu kasvatusliuoskäsittely sai aikaan. Konfokaalinäytteissä, joissa fibroblastit oli käsitelty 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla kasvatusliuoksella, havaittiin 0.1 % Triton X-100 - 1 % BSA-PB - liuoksella permeabilisoiduissa soluissa selkeästi vahvempi hyaluronaanivärijäytyvyys läpi

solun verrattuna kontrollisoluihin. Myös kontrollisolujen hyaluronaanivärjäytyvyys oli selkeää, mutta käsitellyissä näytteissä hyaluronaani värjäytyi vahvemmin (Kuva 14). Näytteet joita ei ollut permeabilisoitu, vaan käsitelty ainoastaan 1 % BSA-PB-liuoksella solunulkoisen hyaluronaanin värjäämiseksi, oli havaittavissa myös eroa käsittelyjen välillä. Kontrollinäytteissä oli havaittavissa huomattavasti vähemmän solunulkoista hyaluronaania kuin kasvatusliuoksella käsitellyissä näytteissä (Kuva 15).



Kuva 14. Solunsisäinen ja -ulkoisen hyaluronaani. Konfokaalikuvantamista varten fibroblastit oli käsitelty 4 % paraformaldehydillä ja permeabilisoitu 0.1 % Triton X-100 - 1 % BSA-PB -liuoksella. Hyaluronaani (punainen) on leimattu bHABC koettimella ja CD44 (vihreä) Hermes3 vasta-aineella. Kuvissa a) ja b) kontrollisolut on käsitelty 1 % seerumin sisältävällä kontrolliliuoksella (K) 24 tunnin ajan ennen solujen kiinnittämistä paraformaldehydillä. Kuvissa c) ja d) solut on käsitelty 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM) 24 tunnin ajan ennen solujen kiinnittämistä paraformaldehydillä. Solut kuvattiin Zeiss LSM700-konfokaalimikroskoopilla 63x öljyimmersionobjektiivilla.

CD44-reseptorin fluoresoivissa leimoissa ei ollut havaittavissa eroavaisuuksia permeabilisoitujen (Kuva 14) tai permeabilisoimattomien (Kuva 15) solujen välillä. CD44-reseptorit sijaitsivat pääasiassa solukalvolla. Myös pitkät haarakkeet, joita fibroblastit olivat muodostaneet läheisiin soluihin värjäytyivät vahvasti CD44-vasta-aineella. Tämä osoittaa että haarakkeet muodostuvat mahdollisesti solukalvorakenteista eivätkä pelkästään hyaluronaanista (Kuvat 14 ja 15).

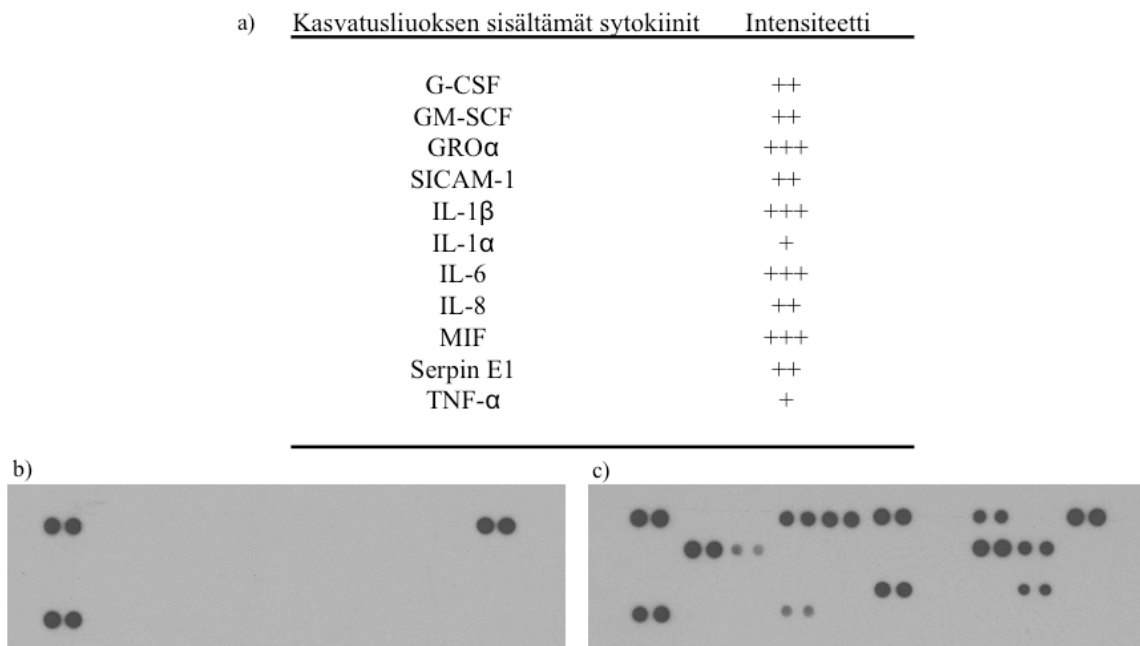


Kuva 15. Solunulkoinen hyaluronaani. Konfokaalikuvantamista varten fibroblastit kiinnitettiin 4 % paraformaldehydillä käsittelyn jälkeen. Permeabilisoinnin sijasta solut käsiteltiin 1 % BSA-PB-liuoksella ja hyaluronaani (punainen) värjättiin soluista bHABC koettimen avulla ja CD44 (vihreä) Hermes3 vasta-aineella. Kuvissa a) ja b) solut on käsitelty 24 tunnin ajan 1 % seerumin sisältävällä kontrolliliuoksella (K) ja kuvissa c) ja d) solut on käsitelty 24 tunnin ajan 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla kasvatusliuoksella (30K CM). Solut kuvattiin Zeiss LSM700-konfokaalimikroskoopilla 63x öljyimmersion-objektiivilla.

4.5 Array-tulokset

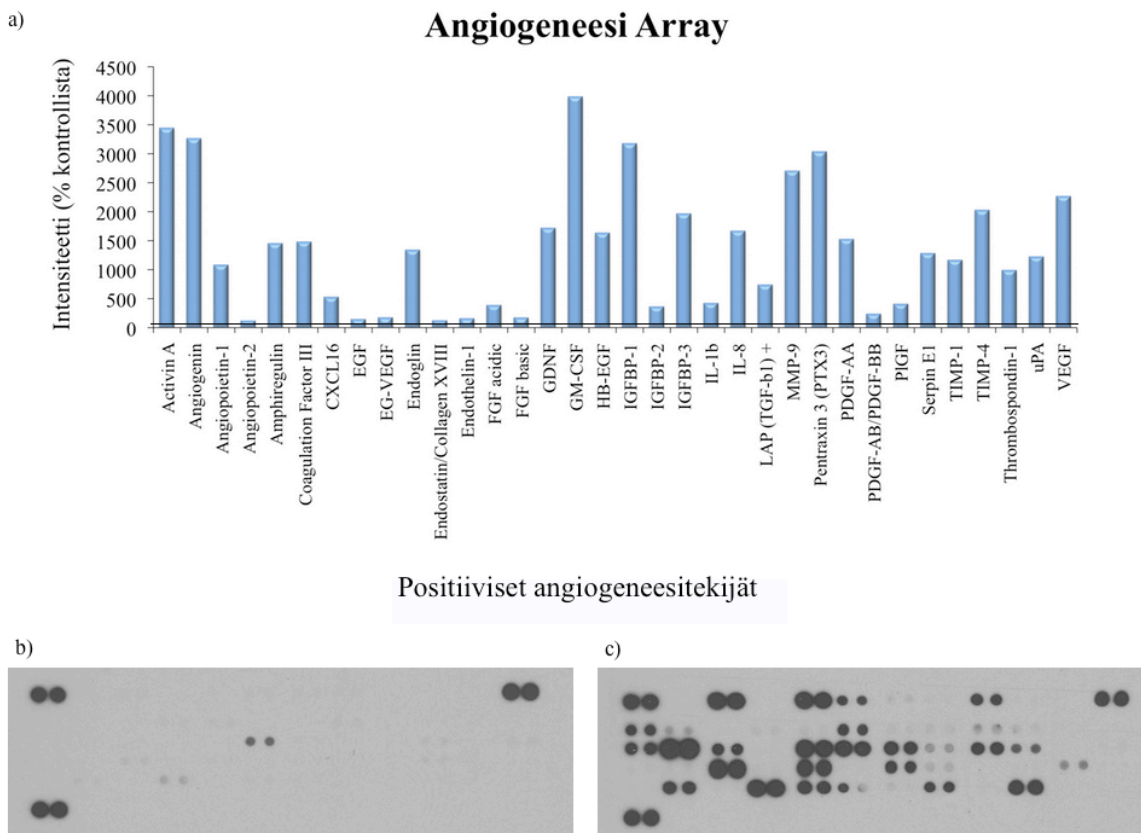
Kaupallisten angiogeneesiarray ja sytokiiniarray -menetelmän avulla haluttiin selvittää mitä sytokiinejä ja angiogeneesitekijöitä melanoomasolut erittävät kasvatusliuokseensa ja mitkä mahdollisesti toimivat fibroblastien hyaluronaanisynteesiä aktivoivina tekijöinä. Fosfokinaasiarrayn avulla haluttiin selvittää erilaisia kinaasireittejä, jotka aktivoituvat fibroblasteissa konsentroidun kasvatusliuoskäsittelyn seurauksena. Näiden tulosten avulla haluttiin saada tietoa signalointireiteistä, jotka mahdollisesti johtavat fibroblastien hyaluronaanisynteesin lisääntymiseen sekä muihin morfologisiin muutoksiin. Fosfokinaasiarrayssä fibroblastit käsiteltiin joko konsentroidulla 1 % seerumin sisältävällä kontrolliliuoksella (30K KM) tai 1 % seerumin sisältävällä konsentroidulla melanoomasolujen kasvatusliuoksella.

Sytokiiniarrayssä todettiin melanoomasoluilta kerätystä kasvatusliuoksesta useita positiivisia pisteitä (kuva 16 c), kun taas kontrollinäytteessä positiivisen tuloksen antoivat ainoastaan arraykalvon omat kontrollipisteet (Kuva 16 b). Tämä tulos osoittaa C8161-melanoomasolujen erittäneen kaikki todelliset sytokiinit kasvatusliuokseen eivätkä ne olleet peräisin viljelyliuoksesta tai seerumista. Sytokiiniarray osoitti, että C8161-melanoomasolut erittävät mm. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α sytokiinejä kasvatusliuokseensa (Kuva 16).



Kuva 16. Sytokiiniarray. Melanoomasoluilta kerätystä ja konsentroidusta kasvatusliuoksesta tutkittiin sen sisältämät sytokiini kaupallisella Sytokiini Arraylla. Sytokiiniarrayn skannattiin kuvatedostoiksi ja kunkin pisteen intensiteetti tulkittiin silmämääräisesti. Intensiteetit jaettiin kolmeen luokkaan riippuen intensiteetin vahvuudesta: vahva intensiteetti (+++), keskivahva intensiteetti (++) ja heikko intensiteetti (+). Kalvot oli käsitelty joko pelkällä kontrolliliuoksella (30K KM) tai kasvatusliuoksella (30K CM). Kuvaan a) on listattu kasvatusliuoksen sisältämät sytokiinit. Kuvassa b) on skannattu kuva kontrollikalvosta ja kuvassa c) on skannattu kuva näytekalvosta.

Angiogeneesiarrayn tuloksissa oli havaittavissa myös pelkän konsentroidun kontrolliliuoksen (30K KM) sisältävän useita positiivisia angiogeneesitekijöitä, joista osa oli heikompia ja osa vahvempia intensiteeteiltään (Kuva 17 b) ja tämä tulos selittyy seerumin sisältämistä tekijöistä. Verrattavan kalvon pisteen puuttuessa yhteenlasketun taustan osuus vähennettiin verrattavista näytteistä. Käsittelyn (30K CM) intensiteeteistä laskettiin keskiarvot kahden pisteen välille ja nämä suhteutettiin kontrollin (30K KM) intensiteettikeskiarvoihin. Käsittely (30K CM) antoi erittäin voimakkaan positiivisen intensiteetin useissa pisteissä (Kuva 17 c). Tämä koe osoitti C8161-melanoomasolujen erittämien angiogeneesiä aktivoivien molekyylien tasojen nousun kerätyssä kasvatusliuoksessa (Kuva 17).

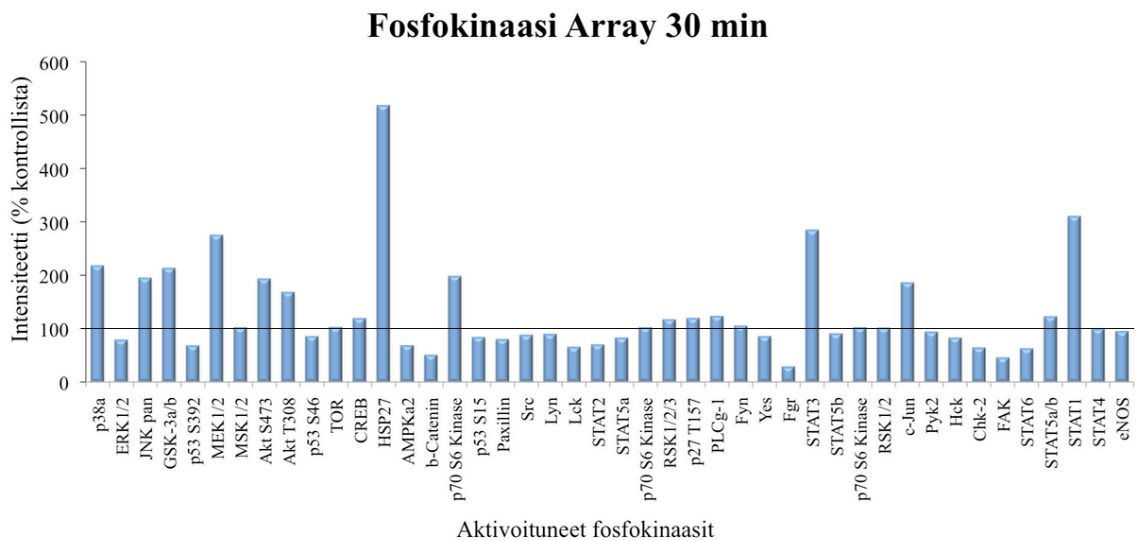


Kuva 17. Angiogeneesiarray. Melanoomasoluilta kerätyistä ja konsentroidusta kasvatusliuoksesta tutkittiin sen sisältämät angiogeneesitekijät kaupallisella Angiogeneesi Arraylla. Angiogeneesifilmit skannattiin kuvatiedostoiksi ja kunkin pisteen intensiteetti tulkittiin Fiji ImageJ ohjelmalla riveittäin. Kalvot oli käsitelty joko kontrolliliuoksella (30K KM) tai kasvatusliuoksella (30K CM). Kuvassa a) on tehty positiivisten angiogeneesitekijöiden intensiteeteistä pylväsdiagrammi. Käsittelynäytteen intensiteettiä on verrattu kontrollikalvolta saatuun saman tekijän intensiteettiin tai kalvon taustakeskiarvoon (% kontrollista). Kuvassa b) on skannattu kuva kontrollinäytteen angiogeneesikalvosta ja kuvassa c) on käsitellyn näytteen skannattu kuva angiogeneesikalvosta.

Fosfokinaasiarrayn näytteet kerättiin kahdesta eri aikapisteestä, 30 minuutin ja kahden tunnin käsittelyn jälkeen. Kontrollikäsittelyn (30K KM) näytteistä todettiin useita positiivisia fosfokinaaseja (Kuva 18 b). Sekä kontrollinäytteissä (30K KM) että käsitellyissä näytteissä (30K CM) eri fosfokinaasien intensiteettitasot olivat huomattavasti

laskeneet 30 minuutin aikapisteestä kahden tunnin aikapisteeseen (Kuvat 18 a ja 19 a). Suurin osa aktivoituneista fosfokinaaseista molempien aikapisteiden kontrollinäytteissä olivat samoja kuin konsentroidulla kasvatusliuoksella aktivoituneet kinaasit. Fosfokinaasiarrayn tuloksissa verrattiin konsentroidulla kasvatusliuoksikäsitellyllä aktivoituneiden fosfokinaasien intensiteettitasojen eroa kontrollinäytteisiin. Näistä tuloksista saatiin tietoa C8161-melanoomasolujen erittämien tekijöiden aktivoimista signalointireiteistä fibroblasteissa, jotka mahdollisesti johtavat hyaluronaanisynteesin lisääntymiseen ja HAS2 mRNA- ja proteiinitason nousuun (Kuvat 18 ja 19).

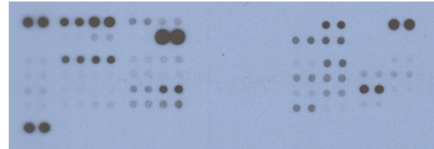
a)



b)

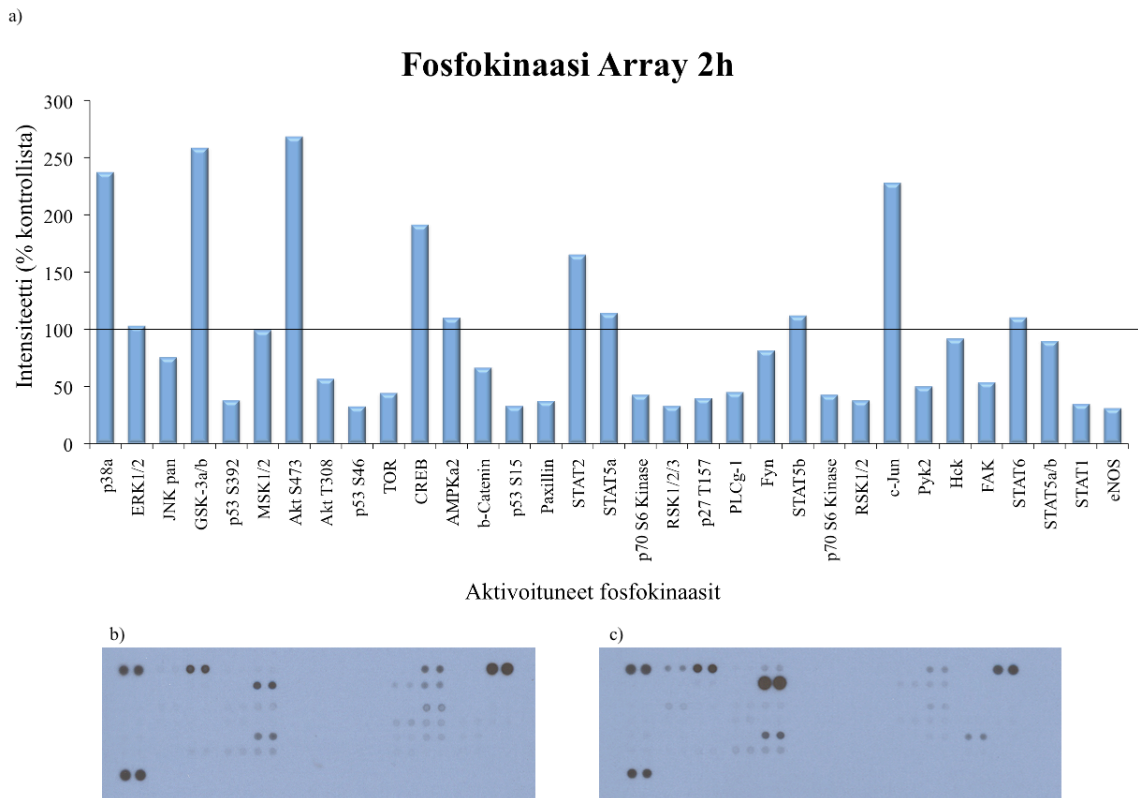


c)



Kuva 18. Fosfokinaasiarray 30 minuutin aikapisteessä. Fosfokinaasiarrayn kuvat skannattiin kuvatiedostoiksi ja kunkin pisteen intensiteetti tulkittiin Fiji ImageJ -ohjelmalla riveittäin. Näytteet Fosfokinaasiarrayhin kerättiin 30 minuutin kuluttua käsittelystä. Fibroblastisolut oli käsitelty joko konsentroidulla kontrolliliuoksella (30K KM) tai kasvatusliuoksella (30K CM). Fosfokinaasiarray käsittelyyn otettiin kustakin näytteestä 91 µg proteiinia. Kuva a) osoittaa aktivoituneiden fosfokinaasien intensiteettitasoja käsitellyissä (30K CM) fibroblasteissa verrattuna kontrollinäytteiden (30K KM) positiivisiin intensiteetteihin. Kuvassa b) on skannattu kuva kontrollikalvosta 30 minuutin aikapisteessä ja kuvassa c) on skannattu kuva käsittelykalvosta 30 minuutin aikapisteessä.

Useat fosfokinaasit kuten HSP27, STAT1, STAT3 olivat aktivoituneet 30 minuutin käsittelyn jälkeen (Kuva 18), mutta kahden tunnin kohdalla niiden tasot olivat laskeneet kontrollitason alle tai nolnaan. Muutamien fosfokinaasien tasot olivat puolestaan nousseet kahden tunnin kasvatusliuoksikäsitelyn jälkeen verrattuna 30 minuutin käsittelyyn. Tällaisia fosfokinaaseja olivat mm. p38, CREB, STAT2, STAT6 ja c-Jun. STAT1:n taso oli puolestaan laskenut huomattavasti kahden tunnin käsittelyn jälkeen, vaikka se oli edelleen aktiivinen kontrolliliuoksella käsitellyissä fibroblasteissa (Kuva 19).



Kuva 19. Fosfokinaasiarray kahden tunnin aikapisteessä. Fosfokinaasiarrayn kuvat skannattiin kuvatiedostoiksi ja kunkin pisteen intensiteetti tulkittiin Fiji ImageJ -ohjelmalla riveittäin. Näytteet Fosfokinaasiarrayhin kerättiin kahden tunnin kuluttua käsittelystä. Fibroblastit oli käsitelty joko kontrolliliuoksella (30K KM) tai kasvatusliuoksella (30K CM). Fosfokinaasiarray käsittelyyn otettiin kustakin näytteestä 91 µg proteiinia. Kuvassa a) on verrattu käsittelynäytteiden positiivisia intensiteettejä kontrollinäytteen intensiteetteihin. Kuvassa b) on kontrollikalvo kahden tunnin aikapisteessä kerätystä näytteestä. Kuvassa c) on käsittelykalvo kahden tunnin aikapisteessä kerätystä näytteestä.

Kunkin array-filmin tulokset skannattiin kuvatiedostoiksi ja näistä tulkittiin intensiteetit Fiji ImageJ -ohjelmalla. Kunkin arrayn kalvokontrollit osoittivat, että näytteen valmistus oli onnistunut, mikä ilmeni kalvojen omista positiivisissa kontrolleissa kalvojen reunimmaisissa pisteissä (Kuvat 16, 17, 18 ja 19).

5. TULOSTEN TARKASTELU

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia C8161-melanoomasolulinjan erittämien tekijöiden vaikutusta ihon fibroblastien hyaluronaanisynteesiin ja solujen morfologiaan. Tarkoituksena oli selvittää hyaluronaanimetaboliaan liittyvien geenien ilmentymistä qPCR-menetelmällä sekä selvittää erilaisia signaalintipolkuja, jotka aktivoituvat kasvatusliuoskäsittelyllä. Tutkimustulokset osoittavat, että C8161-melanoomasolujen erittävän kasvatusliuokseensa tekijöitä, jotka aktivoivat fibroblasteissa hyaluronaanisynteesiä. Käsittelemällä fibroblasteja 1 % seerumin sisältävällä kasvatusliuoksella (30K CM), fibroblastien Has2 mRNA:n ilmentymistaso nousi huomattavasti ja myös hyaluronaanisynteesissä oli huomattava kasvu kun taas Has3:n mRNA:n ilmentymistason nousu havaittiin puolestaan käsittelemällä fibroblasteja seerumittomalla kasvatusliuoksella (30K CM) (Kuva 9). Kummallakaan kasvatusliuoksella

ei ollut havaittavissa vaikutusta fibroblastien CD44:n tai Hyal2:n mRNA tasojen ilmentymiseen (Kuva 8). Kasvatusliuoskäsittely aiheutti fibroblasteille myös morfologisia muutoksia, jotka ilmenivät solun muodostamina pitkinä ulokkeina, jotka verkostoituivat viereisiin soluihin (Kuva 12). Käsittelyllä muodostuneiden ulokkeiden toimintaa tai tarkoitusta ei tässä opinnäytetyössä selvitetty.

Kasvaimen kehityksessä ja kasvainsolujen invaasiassa ympäröiviin kudoksiin solunulkoisen väliaineen hajotus ja uudelleenmuokkaus ovat avaintekijöitä (Ishii ym., 2003). Kasvainsolut erittävät kasvutekijöitä ja sytokiinejä ympäristöönsä, jotka aktivoivat strooman soluja, lähinnä fibroblasteja muokkaamaan soluväliainetta (ks. katsausartikkeli Kalluri ja Zeisberg, 2006). Solujenvälinen kommunikointi on erittäin tärkeässä roolissa normaalienkin solujen vuorovaikutuksessa, mutta se korostuu etenkin kasvaimen ympäristössä (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). Melanoomasolujen erittämien tekijöiden on raportoitu lisäävän kasvaimen strooman fibroblastien hyaluronaanin tuotantoa (Edward ym., 2005; Godden ym., 1999). Lisääntyneen hyaluronaanin määrän uskotaan auttavan mm. kasvainsolujen invaasiota, migraatiota ja kasvaimen angiogeneesiä (Ichikawa ym., 1999). Tämän työn tulokset tukevat aikaisempia tuloksia, sillä C8161-melanoomasoluilta kerätty kasvatusliuos aktivoi huomattavasti ihon fibroblastien hyaluronaanisynteesiä (Kuvat 4 ja 6).

C8161-melanoomasoluilta kerätyissä kasvatusliuoksissa oli huomattavaa eroa fibroblastien hyaluronaanisynteesiin eri keräyssarjojen välillä, kuten vaihteluvälit tuloksissa osoittavat (Kuva 5 ja 7). Osa keräyssarjoista lisäsi huomattavasti enemmän fibroblastien hyaluronaanisynteesiä kun taas toiset keräyssarjat vähän vähemmän verrattuna kontrollikäsittelyyn. Tämä tasoerojen vaihtelu osittain johtui C8161-melanoomasolujen kasvuvauhdista sekä silmämääräisesti arvioidusta solujen konfluenssista. Sarjojen tasoeroja olisi voitu mahdollisesti vähentää istuttamalla joka kerta saman verran C8161-melanoomasoluja. Tasoittamalla erot eri kasvatusliuoskeräyssarjojen välillä olisi mahdollisesti voitu vakioda tekijät, jotka yhtä vahvasti vaikuttavat fibroblastien hyaluronaanisynteesiin.

C8161-melanoomasoluilta kerätty kasvatusliuos jaettiin eri molekyylipainoluokkiin (>30 kDa, 30 kDa<3 kDa, <3 kDa) käyttäen konsentrintipylväitä. Ainoastaan 30 kDa-konsentraatiopylväillä konsentroidulla kasvatusliuoksella oli huomattava vaikutus fibroblastien hyaluronaanisynteesiin. Tämän tuloksen perusteella voidaan olettaa hyaluronaanisynteesiä aktivoivien molekyylin olevan yli 30 kDa kokoisia (Kuva 3) ja jatkokokeissa käytettiin vain 30 kDa-pylväillä konsentroitua kasvatusliuosta. Näissä tutkimuksissa käsittelyissä oli mukana sekä 1 % seerumi sekä seerumiton kasvatusliuos ja kunkin kasvatusliuoksen vaikutus fibroblastien hyaluronaanisynteesiin varmistettiin HA-ELSA menetelmällä jokaisen keräyksen jälkeen ennen muita kokeita. Jokaisessa keräyssarjassa sekä 1 % seerumin sisältävä että seerumiton konsentroitua kasvatusliuos lisäsi fibroblastien hyaluronaanisynteesiä huomattavasti kontrollikäsittelyihin verrattuna (Kuva 5 ja 7), mutta vaste oli pienempi seerumittomassa kasvatusliuoksessa. Vaikka lisääntyneen hyaluronaanisynteesin on raportoitu lisäävän solujen proliferaatiota (Kosaki ym., 1999), tässä opinnäytetyössä ei tutkittu melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutusta fibroblastien proliferaatioon. Toisaalta on myös raportoitu päinvastaisia tuloksia, Edward ym., (2010) tutkivat hyaluronaanin määrän vaikutusta fibroblastien kasvuun ja havaitsivat ettei hyaluronaanin lasku Has2 siRNA transfektion jälkeen ei vaikuttanut solujen proliferaatioon.

Histokemiallisissa värjäyksissä hyaluronaania ilmeni huomattavasti enemmän kasvatusliuoksella käsitellyissä soluissa eli värjäystulokset tukivat hyvin HA-ELSA menetelmällä saatuja tuloksia hyaluronaanitason noususta kasvatusliuoksen vaikutuksesta (Kuva 12). Myös konfokaalimikroskooppinäytteissä soluista havaittiin konsentroidun kasvatusliuoksikäsitellyn aktivoineen fibroblastien hyaluronaanituotantoa. Näissä, etenkin kasvatusliuoksella (30K CM) käsitellyissä soluissa, solunulkoista ja -sisäistä hyaluronaania oli huomattavasti enemmän kontrollisoluihin verrattuna (Kuva 14). Konsentroidulla kasvatusliuoksella käsitellyt solut ovat erittäneet solun basaalipuolelle ja ympäristöönsä huomattavasti enemmän hyaluronaania kuin kontrollisolut (Kuva 15). Nämä mikroskooppitulokset tukevat HA-ELSA määrittämiä fibroblasteista. C8161-melanoomasoluilta kerätty ja konsentroitunut kasvatusliuos lisää fibroblastien hyaluronaanisynteesiä kontrollikäsitelyihin verrattuna.

Fibroblastien morfologia oli muuttunut kontrollisoluihin verrattuna ja tämä havaittiin sekä valomikroskoopi- että konfokaalimikroskooppinäytteistä (Kuvat 12, 13, 14 ja 15). Fibroblastit olivat huomattavasti pidempiä ja pitkulaisempia ja niissä oli havaittavissa ulokemaisia haaroja toisiin soluihin ja ympäristöönsä (Kuva 12). Nämä morfologiset muutokset olivat paremmin havaittavissa punasolukokeessa, jossa elävät fibroblastit olivat muodostaneet kasvatusliuoksikäsitellyllä suuremman hyaluronaania sisältävän alueen solujen ulkopuolelle sekä solusta haarautui pitkiä ulokkeita kauemmas solujen ympärille (Kuva 13). Nämä morfologiset muutokset voivat osaltaan edesauttaa solujen välistä kommunikointia tai lisätä solujen migraatiota ympäristössään. Fibroblastien on raportoitu erittävän useita eri kasvutekijöitä jotka vaikuttavat kasvaimen stroomaa ympäröiviin soluihin. Fibroblastien erittämistä kasvutekijöistä mm. VEGF:n on raportoitu lisäävän epiteelisolujen migraatiota ja angiogeneesin kehittymistä (ks. katsausartikkeli Itano ym., 2008). Näillä fibroblastien muodostamilla ulokkeilla voikin mahdollisesti olla rooli solujen jukstakriinisessä signaaloinnissa tai ne voivat mahdollisesti houkuttaa ympäröivistä verisuonista monosyyttejä ja magrofaageja kasvainsolujen ympärille.

Melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutusta tutkittiin myös hyaluronaanimetaboliaan liittyvien geenien ilmentymiseen. Kvantitatiivisen PCR:n tuloksista havaittiin 1 % seerumin sisältävän kasvatusliuoksen nostavan Has2 mRNA-tasoa huomattavasti kontrollinäytteisiin verrattuna, mutta seerumittomassa kasvatusliuoksikäsitelyssä tätä samaa ei ollut havaittavissa. Toisaalta Has3:n mRNA:n ilmentyminen nousi huomattavasti kontrollinäytteisiin verrattuna seerumittomalla kasvatusliuoksikäsitelyllä (Kuva 9). Kumpikin kasvatusliuoksikäsitely aktivoi Has:ien mRNA-tasoa ja aktivaatiovaste riippui käytettävästä seerumipitoisuudesta. Hyaluronaanireseptorin, CD44:n, tasoissa ei ollut havaittavissa eroa eri käsittelyjen välillä eivätkä käsittelyt vaikuttaneet Hyal2:n mRNA tasoihin (Kuva 8).

Western blot -menetelmällä tutkittiin HAS2:n, CD44:n ja α -SMA:n ilmentymistä proteiinitasolla ja nämä tulokset tukivat qPCR:llä saatuja tuloksia. Melanoomasolujen erittämät tekijät nostivat HAS2:n ilmentymistä myös proteiinitasolla (Kuva 10). Hyaluronaanisyntaasi 2:n tason lisääntyminen sekä mRNA- että proteiinitasolla vahvistaa HAS2:n olevan vastuussa seerumillisen kasvatusliuoksen aiheuttamasta hyaluronaanisynteesin lisääntymisestä. Kuten qPCR:llä ei myöskään proteiinitasolla ilmennyt havaittavaa eroa käsittelyjen välille CD44-tasoihin (Kuva 11). Metastaasivaiheen melanoomasolujen on raportoitu tuottavan enemmän hyaluronaanin reseptoria CD44:ää ja vapauttavan tätä ympäristöönsä (Goebeler ym., 1996), mutta tässä opinnäytetyössä ei havaittu melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikuttavan fibroblastien CD44-

reseptorin tasoihin mRNA-, proteiininäytteissä tai immunovärjäyksissä eri käsittelyjen välillä (Kuvat 8, 11, 14 ja 15). Verihuitalekasvutekijän (PDGF) on raportoitu lisäävän CD44-reseptorin ilmenemistasoa (Zhu ym., 2006). Vaikka angiogeneesiarrayn tulokset (Kuva 17) osoittavat, C8161-melanoomasolujen erittävän runsaasti PDGF:ää, tällä ei näyttäisi olevan kuitenkaan havaittavaa vaikutusta fibroblastien CD44-reseptorin ilmentymistasoihin (Kuvat 8 ja 11).

Proteiininäytteistä tutkittiin myös α -SMA:n tasoja eri käsittelyillä. Alfa-SMA-proteiinin ilmentyminen on useissa tutkimuksissa liitetty fibroblastien erilaistumiseen myofibroblasteiksi tai CAF:seiksi (Hinz ym., 2001; Zeine ym., 2009). Melanoomasolujen erittämät tekijät eivät aikaansaaneet muutoksia α -SMA:n ilmenemistasoissa ja tämä viittaa siihen, että käsittely ei ole saanut fibroblasteja erilaistumaan CAF:ksi vaikka hyaluraanisynteesi on lisääntynyt huomattavasti, mikä on tyypillistä CAF:llä (Meran ym., 2007). Toisaalta on myös mahdollista että vasta-aine ei ole toiminut tai vasta-ainevärjäysolosuhteet eivät ole olleet kyseiselle vasta-aineelle optimaaliset.

Sytokiiniarraylla saatiin selville monia sytokiinejä, joita C8161-melanoomasolut erittävät kasvatusliuokseensa (Kuva 16). Kaikkien C8161-melanoomasolujen erittämien sytokiinien tasot olivat hyvin korkeat, ainoastaan IL-1 α ja TNF- α intensiteettitasot olivat muita matalammat. Sytokiinien, kuten makrofaagien migraatiota inhiboivan tekijän (MIF), on raportoitu vaikuttavan tuumorisuppressori p53:n ilmentymistasoon ja lisäävän mm. solujen apoptoosia (Mitchell ym., 2002), mitä tässä opinnäytetyössä ei kuitenkaan tutkittu. Kuten sytokiiniarraystä voidaan havaita, melanoomasolujen erittämän MIF:n intensiteettitaso oli hyvin korkea (Kuva 16) ja p53:n eri fosforylaatiomuodot fosfokinaasiarrayssä matalat (Kuvat 18 ja 19). Tästä ei voida kuitenkaan suoranaisesti päätellä johtuvatko mahdollisesti fibroblasteissa aktivoituneet p53 tuumorisuppressori-proteiinin aktiivisuustasot C8161-melanoomasolujen tuottamasta MIF:sta.

Angiogeneesiarrayn avulla saatiin selville useita tekijöitä, joita C8161-melanoomasolut erittävät (Kuva 17). Etenkin EGF:n on raportoitu lisäävän keratinosyyteissä hyaluraanisynteesiä aktivoimalla HAS2:ta (Pasonen-Seppänen ym., 2003). Angiogeneesiarrayn tuloksissa kuitenkin C8161-melanoomasoluilta kerätyssä liuoksessa EGF:n tasot olivat hyvin pienet verrattuna muihin kasvutekijöihin kuten FGF:ään, PDGF:ään tai VEGF:ään. Aikaisemmissa kokeissa, Godden ym., 1999 ovat raportoineet etenkin PDGF-AA- sekä PDGF-BB-kasvutekijöiden lisäävän hyaluraanisynteesiä fibroblasteissa (Godden ym., 1999). Angiogeneesiarray -tuloksissa oli havaittavissa lisääntynyt PDGF-AA:n määrä melanoomasolujen kasvatusliuoksessa, mutta ei niinkään PDGF-BB:n. Tässä opinnäytetyössä fibroblasteja ei käsitelty pelkästään PDGF-AA-kasvutekijällä ja tutkittu sen vaikutusta fibroblastien hyaluraanisynteesiin. Onkin mahdollista, että juuri PDGF-AA on vastuussa myös tässä opinnäytetutkimuksessa havaitusta fibroblastien hyaluraanisynteesin aktivaatiosta.

Angiogeneesiarrayn tuloksissa oli mukana myös muutamia MMP-molekyylejä ja näiden inhibiittoreita, joita C8161-melanoomasolut olivat erittäneet kasvatusliuokseensa kuten MMP-9, TIMP-1 ja TIMP-4 (Kuva 17). Metastaasivaiheen melanoomasolujen on raportoitu erittävän mm. MMP-1:tä, MMP-2:ta ja MMP-9:ää, jotka mm. edesauttavat melanoomakasvaimen ympärillä olevan kudoksen hajottamista sekä lisäävät kasvainsolujen invaasiota (Yamazoe ym., 2009). Näissä tuloksissa melanoomasolujen erittämistä angiogeneesitekijöistä MMP-9:n taso oli kohonnut kontrolliin verrattuna (Kuva

17). Toisaalta melanoomasolujen on raportoitu lisäävän fibroblastien MMP-1 tuotantoa erittämällä kasvutekijöitä kuten IL-1 β :aa ja FGF-2:ta (Löffek ym., 2005). Sytokiini- ja angiogeneesiarrayn tulokset osoittavat melanoomasolujen erittävän IL-1 α sekä FGF-2:ta, kuten aikaisemmin on julkaistu (Löffek ym., 2005; Yamazoe ym., 2009). Näistä tuloksista ei voida kuitenkaan päätellä onko melanoomasoluilta kerätty kasvatusliuos lisännyt fibroblastien MMP-tuotantoa (Kuvat 16 ja 17).

Fosfokinaasiarrayllä saatiin selville monia käsittelyllä aktivoituneita solunsisäisiä fosfokinaaseja (Kuvat 18 ja 19). Osalla 30 minuutin käsittelyn jälkeen aktivoituneista fosfokinaaseista aktiivisuustasot olivat laskeneet kahden tunnin käsittelyn jälkeen. Toisaalta osa vasteesta kehittyi hitaammin ja tuli esille vasta kahden tunnin käsittelyllä (Kuva 19). Käsittelemällä soluja pelkästään konsentroidulla 1 % seerumin sisältävällä kontrolliliuoksella (30K KM), aktivoituivat useat fosfokinaasireitit fibroblasteissa. Kasvatusliuoskäsittelyllä aktivoituja fosfokinaasireittejä verrattiinkin kontrollikäsittelyyn, jotta tasoerot eri käsittelyjen välillä saataisiin selville (Kuvat 18 ja 19). Melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutusta fibroblasteissa aktivoituneisiin fosfokinaaseihin on tutkittu melko vähän. Tässä opinnäytetyössä saatiin paljon uusia tuloksia sekä melanoomasolujen erittämistä tekijöistä että melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutuksesta fibroblasttien signaalointiin ja aktivoituneisiin fosfokinaaseihin. Melanooman ympärillä olevien fibroblastien on raportoitu ilmentävän etenkin MMP-1 ja ICAM-1 molekyyliä *in vitro* kokeissa (Wandel ym., 2000) ja kasvainta ympäröivien fibroblastien on havaittu erittävän myös insuliinin kaltaisia kasvutekijöitä (IGF) (ks. katsausartikkeli Elenbaas ja Weinberg, 2001) sekä hepatosyyttikasvutekijää (HGF) melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutuksesta (Kankuri ym., 2005). Luun morfogeneettisen proteiinin (BMB-2 ja BMB-4) on havaittu lisäävän fibroblastien MMP:ien tuotantoa, etenkin MMP-1:n, MMP-2:n, MMP-3:n sekä MMP-13:sta (Rothhammer ym., 2008). Kirjallisuudesta löytyy kuitenkin melko vähän julkaisuja melanoomasolujen vaikutuksista fibroblastien signaalointiin ja erittämiin molekyyliin. Tästä tutkimuksesta onkin erittäin suurta hyötyä myöhemmässä tutkimuksessa melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutuksesta fibroblasteihin, jossa voidaan selvittää minkä signaalointireitin kautta melanoomasolut aktivoivat fibroblastit myofibroblasteiksi tai CAF:ksi ja lisäävät kasvaimen strooman fibroblastien hyaluronaanituotantoa ja siten mahdollisesti edesauttavat melanooma-kasvaimen invaasiota.

Kaupalliset arrayt (sytokiini, angiogeneesi ja fosfokinaasi) antoivat paljon lupaavia tuloksia erilaisista kasvutekijöistä ja sytokiineistä, joita melanoomasolut erittävät ja jotka aktivoivat useita fosfokinaaseja fibroblasteissa, mitkä johtavat hyaluronaanisynteesin kasvuun ja morfologisiin muutoksiin. Näiden tulosten perusteella ei voida kuitenkaan päätellä, mikä tai mitkä tekijät suoranaisesti vaikuttavat lisääntyneeseen hyaluronaanituotantoon. Tuloksissa on otettava myös huomioon useamman kasvutekijän yhteisvaikutus fibroblastien hyaluronaanisynteesin muutoksiin. Olisikin erittäin tärkeää jatkossa selvittää melanoomasolujen erittämät tekijät, jotka aktivoivat Has2-geenin ilmentymiseen johtavia signaalointireittejä fibroblasteissa. Tämän opinnäytetyön tutkimusta olisi hyvä jatkaa tutkimalla erilaisia signaalointireittien inhibiittoreita, jotka estävät melanoomasolujen erittämien molekyylien vaikutuksen HAS2-entsyymin toimintaan. Signaalointireitit, jotka johtavat kasvaimen strooman hyaluronaanitason nousuun, ovat mahdollisia lääkeshoidon kohteita melanooman hoidossa. Estämällä melanoomasolujen erittämien tekijöiden vaikutus fibroblastien hyaluronaanisynteesiin, voitaisiin mahdollisesti estää melanoomasolujen invaasiota ja migraatiota ympäröiviin kudoksiin. Tällaisella

hoidolla voitaisiin mahdollisesti vähentää kasvainsolujen invaasiota, jolloin ne olisi helpompi hoitaa kirurgisesti.

LÄHDELUETTELO

- Ackermann, J., Frutschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A. ja Beermann, F.** (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res.* **65**, 4005-4011.
- Aguzzi, M. S., Faraone, D., D'Arcangelo, D., De Marchis, F., Toietta, G., Ribatti, D., Parazzoli, A., Colombo, P., Capogrossi, M. C. ja Facchiano, A.** (2010). The FGF-2-derived peptide FREG inhibits melanoma growth in vitro and in vivo. *Mol. Ther.*
- Amin, D. N., Bielenberg, D. R., Lifshits, E., Heymach, J. V. ja Klagsbrun, M.** (2008). Targeting EGFR activity in blood vessels is sufficient to inhibit tumor growth and is accompanied by an increase in VEGFR-2 dependence in tumor endothelial cells. *Microvasc. Res.* **76**, 15-22.
- Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., Eriksson, U. ja Pietras, K.** (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **69**, 369-378.
- Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J. F. ja Hart, I. R.** (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J. Cell. Sci.* **112 (Pt 22)**, 3943-3954.
- Auvinen, P., Tammi, R., Parkkinen, J., Tammi, M., Ågren, U., Johansson, R., Hirvikoski, P., Eskelinen, M. ja Kosma, V. M.** (2000). Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am. J. Pathol.* **156**, 529-536.
- Bajorath, J., Greenfield, B., Munro, S. B., Day, A. J. ja Aruffo, A.** (1998). Identification of CD44 residues important for hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J. Biol. Chem.* **273**, 338-343.
- Bandarchi, B., Ma, L., Navab, R., Seth, A. ja Rasty, G.** (2010). From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol. Res. Pract.* **2010**, 583748. Epub 2010 Aug 11.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. ja Tomic-Canic, M.** (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Rep. Reagent* **16**, 585-601.
- Basbaum, C. B. ja Werb, Z.** (1996). Focalized proteolysis: Spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 731-738.
- Belicchi, M., Pisati, F., Lopa, R., Porretti, L., Fortunato, F., Sironi, M., Scalamogna, M., Parati, E. A., Bresolin, N. ja Torrente, Y.** (2004). Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.* **77**, 475-486.
- Blackburn, J. S., Liu, I., Coon, C. I. ja Brinckerhoff, C. E.** (2009). A matrix metalloproteinase-1/protease activated receptor-1 signaling axis promotes melanoma invasion and metastasis. *Oncogene* **28**, 4237-4248.
- Blundell, C. D., Mahoney, D. J., Cordell, M. R., Almond, A., Kahmann, J. D., Perczel, A., Taylor, J. D., Campbell, I. D. ja Day A. J.** (2007). Determining the molecular basis for the pH-dependent interaction between the link module of human TSG-6 and hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **282**, 12976-12988.
- Bougatef, F., Menashi, S., Khayati, F., Naimi, B., Porcher, R., Podgorniak, M. P., Millot, G., Janin, A., Calvo, F., Lebbe, C. ym.** (2010). EMMPRIN promotes melanoma cells malignant properties through a HIF-2alpha mediated up-regulation of VEGF-receptor-2. *PLoS One* **5**, e12265.
- Bourguignon, L. Y., Singleton, P. A., Zhu, H. ja Diedrich, F.** (2003). Hyaluronan-mediated CD44 interaction with RhoGEF and rho kinase promotes Grb2-associated binder-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase signaling leading to cytokine (macrophage-colony stimulating factor) production and breast tumor progression. *J. Biol. Chem.* **278**, 29420-29434.

- Bourguignon, L. Y.** (2008). Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 251-259.
- Camenisch, A. P., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A. Jr, Kubalak, S., Kiewer, S. E. ja McDonald, J. A.** (2000). Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest.* **106**, 349-360.
- Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Angela, D., Ferlazzo, A. M. ja Calatroni, A.** (2006). TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-1beta modulate hyaluronan synthase expression in human skin fibroblasts: Synergistic effect by concomitant treatment with FeSO4 plus ascorbate. *Mol. Cell. Biochem.* **292**, 169-178.
- Castaneda, C. A., Cortes-Funes, H., Gomez, H. L. ja Ciruelos, E. M.** (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 751-759.
- Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Sifaki, M., Krasagakis, K., Katonis, P., Karamanos, N. K. ja Tzanakakis, G. N.** (2009). Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1323-1331.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. ja MacDonald, I. C.** (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 563-572.
- Chen, W. Y., Marcellin, E., Hung, J. ja Nielsen, L. K.** (2009). Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in streptococcus zooepidemicus. *J. Biol. Chem.* **284**, 18007-18014.
- Chesney, J., Metz, C., Stavitsky, A. B., Bacher, M. ja Bucala, R.** (1998). Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J. Immunol.* **160**, 419-425.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W. ym.** (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954.
- de la Motte, C., Nigro, J., Vasanji, A., Rho, H., Kessler, S., Bandyopadhyay, S., Danese, S., Fiocchi, C. ja Stern, R.** (2009). Platelet-derived hyaluronidase 2 cleaves hyaluronan into fragments that trigger monocyte-mediated production of proinflammatory cytokines. *Am. J. Pathol.* **174**, 2254-2264.
- de Wit, P. E., Moretti, S., Koenders, P. G., Weterman, M. A., van Muijen, G. N., Gianotti, B. ja Ruiter, D. J.** (1992). Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 168-173.
- Duterme, C., Mertens-Strijthagen, J., Tammi, M. ja Flamion, B.** (2009). Two novel functions of hyaluronidase-2 (Hyal2) are formation of the glycocalyx and control of CD44-ERM interactions. *J. Biol. Chem.* **284**, 33495-33508.
- Edward, M., Gillan, C., Micha, D. ja Tammi, R. H.** (2005). Tumour regulation of fibroblast hyaluronan expression: A mechanism to facilitate tumour growth and invasion. *Carcinogenesis* **26**, 1215-1223.
- Edward, M., Quinn, J. A., Pasonen-Seppänen S., M. Ja Tammi, R. H.** (2010). 4-Methylumbelliferone inhibits tumour cell growth and the activation of stromal hyaluronan synthesis by melanoma cell-derived factors. *Br. J. Dermatol.* **162**, 1224-1232.
- Elenbaas, B. ja Weinberg, R. A.** (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* **264**, 169-184.
- Ferrara, N. ja Davis-Smyth, T.** (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25.

- Folberg, R., Hendrix, M. J. ja Maniotis, A. J.** (2000). Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **156**, 361-381.
- Fuchs, E.** (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* **445**, 834-842.
- Fraser, J. R., Laurent, T. C., Pertoft, H. ja Baxter, E.** (1981). Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem. J.* **200**, 415-424.
- Gaggioli, C. ja Sahai, E.** (2007). Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res.* **20**, 161-172.
- Godden, J. L., Edward, M. ja MacKie, R. M.** (1999). Melanoma cell-derived factor stimulation of fibroblast glycosaminoglycan synthesis--the role of platelet-derived growth factor. *Eur. J. Cancer* **35**, 473-480.
- Goebeler, M., Kaufmann, D., Bröcker, E. B. ja Klein, C. E.** (1996). Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors. *J. Cell Sci.* **109**, 1957-1964.
- Gordon-Thomson, C., Jones, J., Mason, R. S. ja Moore, G. P.** (2005). ErbB receptors mediate both migratory and proliferative activities in human melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res.* **15**, 21-28.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. ja Hynes, N. E.** (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**, 1647-1655.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. ja Longaker, M.** (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321.
- Harris, E. N., Weigel, J. A. ja Weigel, P. H.** (2004). Endocytic function, glycosaminoglycan specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *J. Biol. Chem.* **279**, 36201-36209.
- Hiltunen, E. L. J., Anttila, M., Kultti, A., Ropponen, K., Penttinen, J., Yliskoski, M., Kuronen, A. T., Juhola, M., Tammi, R., Tammi, M. ja Kosma, V. M.** (2002). Elevated hyaluronan concentration without hyaluronidase activation in malignant epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* **62**, 6410-6413.
- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. ja Chaponnier, C.** (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2730-2741.
- Hofmann, U. B., Wespthal, J. R., Waas, E. T., Zendman, A. J., Cornelissen, I. M., Ruiter, D. J. ja van Muijen, G. N.** (1999). Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer* **81**, 774-782.
- Hofmeister, V., Schrama, D. ja Becker, J. B.** (2008). Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 1-17.
- Hoschuetzky, H., Aberle, H. ja Kemler, R.** (1994). Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* **127**, 1375-1380.
- Huang, L., Grammatikakis, N., Yoneda, M., Banerjee, S. D. ja Toole, B. P.** (2000). Molecular characterization of a novel intracellular hyaluronan-binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 29829-29839.
- Ichikawa, T., Itano, N., Sawai, T., Kimata, K., Koganehira, Y., Saida, T. ja Taniguchi, S.** (1999). Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 935-939.

- Iida, J. ja McCarthy, J. B.** (2007). Expression of collagenase-1 (MMP-1) promotes melanoma growth through the generation of active transforming growth factor-beta. *Melanoma Res.* **17**, 205-213.
- Inamdar, G. S., Madhunapantula, S. V. ja Robertson, G. P.** (2010). Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 624-637.
- Isacke, C. M. ja Yarwood, H.** (2002). The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 718-721.
- Ishii, G., Sangai, T., Oda, T., Aoyagi, Y., Hasebe, T., Kanomata, N., Endoh, Y., Okumura, C., Okuhara, Y., Magae, J. ym.** (2003). Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **309**, 232-240.
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y. ym.** (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **274**, 25085-25092.
- Itano, N., Zhuo, L. ja Kimata, K.** (2008). Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression. *Cancer. Sci.* **99**, 1720-1725.
- Ivanov, V. N. ja Hei, T. K.** (2005). Combined treatment with EGFR inhibitors and arsenite upregulated apoptosis in human EGFR-positive melanomas: A role of suppression of the PI3K-AKT pathway. *Oncogene* **24**, 616-626.
- Jalkanen, S., Jalkanen, M., Bargatze, R., Tammi, M. ja Butcher, E. C.** (1988). Biochemical properties of glycoproteins involved in lymphocyte recognition of high endothelial venules in man. *J. Immunol.* **141**, 1615-1623.
- Javelaud, D., Mohammad, K. S., McKenna, C. R., Fournier, P., Luciani, F., Niewolna, M., Andre, J., Delmas, V., Larue, L., Guise, T. A. ym.** (2007). Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res.* **67**, 2317-2324.
- Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R. C., Ghafoor, A., Feuer, E. J. ja Thun, M. J.** (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J. Clin.* **55**, 10-30.
- Jokela, T. A., Jauhiainen, M., Auriola, S., Kauhanen, M., Tiihonen, R., Tammi, M. I. ja Tammi, R. H.** (2008). Mannose inhibits hyaluronan synthesis by down-regulation of the cellular pool of UDP-N-acetylhexosamines. *J. Biol. Chem.* **283**, 7666-7673.
- Kalluri, R. ja Zeisberg, M.** (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 392-401.
- Kankuri, E., Cholujova, D., Comajova, M., Vaheri, A. ja Bizik, J.** (2005). Induction of hepatocyte growth factor/scatter factor by fibroblast clustering directly promotes tumor cell invasiveness. *Cancer Res.* **65**, 9914-9922.
- Karjalainen, J. M., Tammi, R. H., Tammi, M. I., Eskelinen, M. J., Ågren, U. M., Parkkinen, J. J., Alhava, E. M. ja Kosma, V. M.** (2000). Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *Am. J. Pathol.* **157**, 957-965.
- Karousou, E., Kamiryo, M., Skandalis, S. S., Ruusala, A., Asteriou, T., Passi, A., Yamashita, H., Hellman, U., Heldin, C. H. ja Heldin, P.** (2010). The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **285**, 23647-23654.
- Klein, W. M., Wu, B. P., Zhao, S., Wu, H., Klein-Szanto, A. J. ja Tahan, S. R.** (2007). Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod. Pathol.* **20**, 102-107.

- Kosaki, R., Watanabe, K. ja Yamaguchi, Y.** (1999). Overproduction of hyaluronan by expression of the hyaluronan synthase Has2 enhances anchorage-independent growth and tumorigenicity. *Cancer Res.* **59**, 1141-1145.
- Kultti, A., Pasonen-Seppänen, S., Jauhiainen, M., Rilla, K. J., Kärnä, R., Pyöriä, E., Tammi, R. H. ja Tammi, M. I.** (2009). 4-methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3. *Exp. Cell Res.* **315**, 1914-1923.
- Lacal, P. M., Ruffini, F., Pagani, E. ja D'Atri, S.** (2005). An autocrine loop directed by the vascular endothelial growth factor promotes invasiveness of human melanoma cells. *Int. J. Oncol.* **27**, 1625-1632.
- Laurent, T. C. and Fraser, J. R.** (1992). Hyaluronan. *FASEB J.* **6**, 2397-2404.
- Lazar-Molnar, E., Hegyesi, H., Toth, S. ja Falus, A.** (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**, 547-554.
- Lee, J. T. ja Herlyn, M.** (2007). Microenvironmental influences in melanoma progression. *J. Cell. Biochem.* **101**, 862-872.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B. ja McKay, R. D.** (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-595.
- Lesley, J., Hascall, V. C., Tammi, M. ja Hyman, R.** (2000). Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J. Biol. Chem.* **275**, 26967-26975.
- Leslie, M. C. ja Bar-Eli, M.** (2005). Regulation of gene expression in melanoma: New approaches for treatment. *J. Cell. Biochem.* **94**, 25-38.
- Li, L., Asteriou, T., Bernert, B., Heldin, C. H. ja Heldin, P.** (2007). Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: Importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB. *Biochem. J.* **404**, 327-336.
- Lin, K., Baritaki, S., Militello, L., Malaponte, G., Bevelacqua, Y. ja Bonavida, B.** (2010). The role of B-RAF mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF-kappaB/Snail/RKIP/PTEN circuit. *Genes Cancer.* **1**, 409-420.
- Lokeshwar, V. B. ja Selzer, M. G.** (2000). Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessels, and vein-derived human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 27641-27649.
- Löffek, S., Zigrino, P., Angel, P., Anwald, B., Krieg, T. ja Mauch, C.** (2005). High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 638-643.
- Maxwell, C. A., Keats, J. J., Crainie, M., Sun, X., Yen, T., Shibuya, E., Hendzel, M., Chan, G. ja Pilarski, L. M.** (2003). RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2262-2276.
- Maxwell, C. A., McCarthy, J. and Turley, E.** (2008). Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: Moonlighting or dual oncogenic functions? *J. Cell Sci.* **121**, 925-932.
- McKee, C. M., Penno, M. B., Cowman, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Bao, C. ja Noble, P. W.** (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. the role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.* **98**, 2403-2413.
- Melnikova, V. O., Balasubramanian, K., Villares, G. J., Dobroff, A. S., Zigler, M., Wang, H., Petersson, F., Price, J. E., Schroit, A., Prieto, V. G. ym.** (2009). Crosstalk between protease-activated receptor 1 and platelet-activating factor receptor regulates melanoma cell adhesion molecule (MCAM/MUC18) expression and melanoma metastasis. *J. Biol. Chem.* **284**, 28845-28855.

- Melnikova, V. O. ja Bar-Eli, M.** (2008). Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. *Cancer. Biol. Ther.* **7**, 997-1003.
- Melnikova, V. O., Dobroff, A. S., Zigler, M., Villares, G. J., Braeuer, R. R., Wang, H., Huang, L. ja Bar-Eli, M.** (2010). CREB inhibits AP-2alpha expression to regulate the malignant phenotype of melanoma. *PLoS One* **5**, e12452.
- Meran, S., Thomas, D., Stephens, P., Martin, J., Bowen, T., Phillips, A. ja Steadman, R.** (2007). Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype. *J. Biol. Chem.* **282**, 25687-25697.
- Meran, S., Luo, D. D., Simpson, R., Martin, J., Wells, A., Steadman, R. ja Phillips, A. O.** (2011). Hyaluronan facilitates transforming growth factor- β 1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor interaction. *J. Biol. Chem.* **286**, 17618-17630.
- Meyer, K. ja Palmer, J. W.** (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* **107**, 629-634.
- Miletti-Gonzalez, K. E., Chen, S., Muthukumaran, N., Saglimbeni, G. N., Wu, X., Yang, J., Apolito, K., Shih, W. J., Hait, W. N. ja Rodriguez-Rodriguez, L.** (2005). The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Res.* **65**, 6660-6667.
- Milner, C. M., Tongsoongnoen, M. S., Rugg, M. S. ja Day, A. J.** (2007). The molecular basis of inter- α -inhibitor heavy chain transfer on to hyaluronan. *Biochem Soc Trans.* **35**, 672-676.
- Monz, K., Maas-Kuck, K., Schumacher, U., Schulz, T., Hallmann, R., Schnaker, E. M., Schneider, S. W. ja Prehm, P.** (2008). Inhibition of hyaluronan export attenuates cell migration and metastasis of human melanoma. *J. Cell. Biochem.* **105**, 1260-1266.
- Moretti, S., Pinzi, C., Spallanzani, A., Berti, E., Chiarugi, A., Mazzoli, S., Fabiani, M., Vallecchi, C. ja Herlyn, M.** (1999). Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int. J. Cancer* **84**, 160-168.
- Morneo-Bueno, G., Peinado, H., Molina, P., Olmeda, D., Cubillo, E., Santos, V. ym.** (2009). The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat. Protocol* **4**, 1591-1613.
- Muramatsu, T., Kobayashi, N., Tada, H., Yamaji, M., Shirai, T., Mori, T. Ja Ohnishi, T.** (1992). Induction and repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts in organ-cultured normal human skin. *Arch. Dermatol.* **284**, 232-237.
- Nabeshima, K., Iwasaki, H., Koga, K., Hojo, H., Suzumiya, J. ja Kikuchi, M.** (2006). Emmprin (basigin/CD147): Matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol. Int.* **56**, 359-367.
- Nakamura, M. ja Tokura, Y.** (2011). Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J. Dermatol. Sci.* **61**, 7-13.
- Nikkola, J., Vihinen, P., Vlaykova, T., Hahka-Kemppinen, M., Kähäri, V. M. ja Pyrhönen, S.** (2002). High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* **97**, 432-438.
- Nykopp, T. K., Rilla, K., Tammi, M. I., Tammi, R. H., Sironen, R., Hämäläinen, K., Kosma, V. M., Heinonen, S. ja Anttila, M.** (2010). Hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in the accumulation of hyaluronan in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer* **10**, 512.
- Oliferenko, S., Kaverina, I., Small, J. V. ja Huber, L. A.** (2000). Hyaluronic acid (HA) binding to CD44 activates Rac1 and induces lamellipodia outgrowth. *J. Cell Biol.* **148**, 1159-1164.
- Padua, D. ja Massague, J.** (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res.* **19**, 89-102.

- Pasonen-Seppänen, S., Karvinen, S., Törrönen, K., Hyttinen, J. M., Jokela, T., Lammi, M. J., Tammi, M. I. ja Tammi, R.** (2003). EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures: Correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 1038-1044.
- Peng, H., Usas, A., Olshanski, A., Ho, A. M., Gearhart, B., Cooper, G. M. ja Huard, J.** (2005). VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 2017-2027.
- Perl, A. K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H. ja Christofori, G.** (1998). A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* **392**, 190-193.
- Pienimäki, J. P., Rilla, K., Fülöp, C., Sironen, R. K., Karvinen, S., Pasonen, S., Lammi, M. J., Tammi, R., Hascall, V. C. ja Tammi, M. I.** (2001). Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **276**, 20428-20435.
- Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A. M., McNally, J. ja Lowy, D. R.** (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **23**, 1739-1748.
- Rai, S. K., Duh, F. M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M. I. ja Miller, A. D.** (2001). Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope proein of which mediates oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4443-4448.
- Ribatti, D., Vacca, A., Ria, R., Marzullo, A., Nico, B., Filotico, R., Roncali, L. ja Dammacco, F.** (2003). Neovascularisation, expression of fibroblast growth factor-2, and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathological progression in human malignant melanoma. *Eur. J. Cancer* **39**, 666-674.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. ja Weissman, I. L.** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.
- Rilla, K., Siiskonen, H., Spicer, A. P., Hyttinen, J. M., Tammi, M. I. ja Tammi, R. H.** (2005). Plasma membrane residence of hyaluronan synthase is coupled to its enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 31890-31897.
- Rodeck, U., Bossler, A., Graeven, U., Fox, F. E., Nowell, P. C., Knabbe, C. ja Kari, C.** (1994). Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res.* **54**, 575-581.
- Rodeck, U., Melber, K., Kath, R., Menssen, H. D., Varello, M., Atkinson, B. ja Herlyn, M.** (1991). Constitutive expression of multiple growth factor genes by melanoma cells but not normal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 20-26.
- Rothhammer, T., Poser, I., Soncin, F., Bataille, F., Moser, M. ja Bosserhoff, A. K.** (2005). Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res.* **65**, 448-456.
- Rothhammer, T., Bataille, F., Spruss, T., Eissner, G. ja Bosserhoff, A. K.** (2007). Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene* **26**, 4158-4170.
- Rothhammer, T., Braig, S. ja Bosserhoff, A. K.** (2008). Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts. *Eur. J. Cancer* **44**, 2526-2534.
- Satyamoorthy, K., Li, G., Gerrero, M. R., Brose, M. S., Volpe, P., Weber, B. L., Van Belle, P., Elder, D. E. ja Herlyn, M.** (2003). Constitutive mitogen-activated protein kinase activation in melanoma is mediated by both BRAF mutations and autocrine growth factor stimulation. *Cancer Res.* **63**, 756-759.

- Sharma, A., Tran, M. A., Liang, S., Sharma, A. K., Amin, S., Smith, C. D., Dong, C. ja Robertson, G. P.** (2006). Targeting mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase in the mutant (V600E) B-raf signaling cascade effectively inhibits melanoma lung metastases. *Cancer Res.* **66**, 8200-8209.
- Sharpless, N. E., Kannan, K., Xu, J., Bosenberg, M. W. ja Chin, L.** (2003). Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* **22**, 5055-5059.
- Sibilia, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F. M., Schlessinger, J. ja Wagner, E. F.** (2000). The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* **102**, 211-220.
- Slipicevic, A., Holm, R., Nguyen, M. T., Bohler, P. J., Davidson, B. ja Florenes, V. A.** (2005). Expression of activated akt and PTEN in malignant melanomas: Relationship with clinical outcome. *Am. J. Clin. Pathol.* **124**, 528-536.
- Slominski, A., Wortsman, J., Carlson, A. J., Matsuoka, L. Y., Balch, C. M. ja Mihm, M. C.** (2001). Malignant melanoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 1295-1306.
- Spicer, A. P. ja McDonald, J. A.** (1998). Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J. Biol. Chem.* **273**, 1923-1932.
- Stetler-Stevenson, W. G.** (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: Metalloproteinase-independent biological activities. *Sci. Signal.* **1**, re6.
- Sun, J. ja Stetler-Stevenson, W. G.** (2009). Overexpression of tissue inhibitors of metalloproteinase 2 up-regulates NF-kappaB activity in melanoma cells. *J. Mol. Signal.* **4**, 4.
- Takada, Y., Singh, S. ja Aggarwal, B. B.** (2004). Identification of a p65 peptide that selectively inhibits NF-kappa B activation induced by various inflammatory stimuli and its role in down-regulation of NF-kappaB-mediated gene expression and up-regulation of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 15096-15104.
- Tammi, R., Ågren, U. M., Tuhkanen, A. L. ja Tammi, M.** (1994). Hyaluronan metabolism in skin. *Prog. Histochem. Cytochem.* **29**, 1-81.
- Tammi, R., Ripellino, J. A., Margolis, R. U. ja Tammi, M.** (1988). Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J. Invest. Dermatol.* **90**, 412-414.
- Tammi, R. H., Kultti, A., Kosma, V. M., Pirinen, R., Auvinen, P. ja Tammi, M. I.** (2008). Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 288-295.
- Tejera-Vaquero, A., Barrera-Vigo, M. V., Lopez-Navarro, N. ja Herrera-Ceballos, E.** (2010). Growth rate as a prognostic factor in localized invasive cutaneous melanoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **24**, 147-154.
- Toole, B. P.** (2004). Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer.* **4**, 528-539.
- Torres, V. A., Tapia, J. C., Rodriguez, D. A., Lladser, A., Arredondo, C., Leyton, L. ja Quest, A. F.** (2007). E-cadherin is required for caveolin-1-mediated down-regulation of the inhibitor of apoptosis protein survivin via reduced beta-catenin-Tcf/Lef-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7703-7717.
- Turley, E. A., Noble, P. W. ja Bourguignon, L. Y.** (2002). Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* **277**, 4589-4592.
- Uong, A. ja Zon, L. I.** (2010). Melanocytes in development and cancer. *J. Cell. Physiol.* **222**, 38-41.

- van Kempen, L. C., van den Oord, J. J., van Muijen, G. N., Weidle, U. H., Bloemers, H. P. ja Swart, G. W.** (2000). Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am. J. Pathol.* **156**, 769-774.
- Wandel, E., Grasshoff, A., Mittag, M., Haustein, U. F. ja Saalbach, A.** (2000). Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. *Exp. Dermatol.* **9**, 34-41.
- Wang, F., Grigorieva, E. V., Li, J., Senchenko, V. N., Pavlova, T. V., Anedchenko, E. A., Kudryavtseva, A. V., Tsimanis, A., Angeloni, D., Lerman, M. I. ym.** (2008). HYAL1 and HYAL2 inhibit tumour growth in vivo but not in vitro. *PLoS One* **3**, e3031.
- Weeraratna, A. T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M. ja Trent, J. M.** (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell.* **1**, 279-288.
- Wei, H., Cai, Q., Rahn, R. Ja Zhang, X.** (1997). Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deguanosine in DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **23**, 148-154.
- Weigel, P. H. ja DeAngelis, P. L.** (2007). Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **282**, 36777-36781.
- Weigel, P. H., Hascall, V. C. ja Tammi, M.** (1997). Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.* **272**, 13997-14000.
- Weissmann, B., Meyer, K., Sampson, P. ja Linker, A.** (1954). Isolation of oligosaccharides enzymatically produced from hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **208**, 417-429.
- Wigh, T. N.** (2002). Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 617-623.
- Xie, S., Luca, M., Huang, S., Gutman, M., Reich, R., Johnson, J. P. ja Bar-Eli, M.** (1997). Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **57**, 2295-2303.
- Xu, W., Angelis, K., Danielpour, D., Haddad, M. M., Bischof, O., Campisi, J., Stavnezer, E. ja Medrano, E. E.** (2000) Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **23**, 5924-5929.
- Yamazoe, Y., Tsubaki, M., Matsuoka, H., Satou, T., Itoh, T., Kusunoki, T., Kidera, Y., Tanimori, Y., Shoji, K., Nakamura, H. ym.** (2009). Dimethylfumarate inhibits tumor cell invasion and metastasis by suppressing the expression and activities of matrix metalloproteinases in melanoma cells. *Cell Biol. Int.* **33**, 1087-1094.
- Yu, Q. ja Stamenkovic, I.** (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* **14**, 163-176.
- Zeine, R., Salwen, H. R., Peddinti, R., Tian, Y., Guerrero, L., Yang, Q., Chlenski, A. ja Cohn S. L.** (2009). Presence of cancer-associated fibroblast inversely correlates with Schwannian stroma in neuroblastoma tumors. *Mod. Pathol.* **22**, 950-958.
- Zhang, L., Underhill, C. B. ja Chen, L.** (1995). Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res.* **55**, 428-433.
- Zhang, Y., Feng, X. H. and Derynck, R.** (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* **394**, 909-913.

Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L. W., Weinberg, K., Barr, M. L., Demetriou, A. ja Wu, G. D. (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells* **24**, 928-935.

Zhou, B., Oka, J. A., Singh, A. and Weigel, P. H. (1999). Purification and subunit characterization of the rat liver endocytic hyaluronan receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 33831-33834.

Zoltan-Jones, A., Huang, L., Ghatak, S. ja Toole, B. (2003). Elevated hyaluronan production induced mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **46**, 45801-45810.

www.cancer.fi (06.03.2011). Syöpäjärjestöt, tiedotteet: Taustapaperi: Ihosyöpien yleistyminen jatkuu väestön vanhetessa (28.4.2009).

www.solunetti.fi

www.tilastokeskus.fi (18.01.2011). Tilastotietokannat, Tietokannat: PX-Web StatFin, Terveys/Kuolemansyyt. Ihon melanooma (C43), molemmat sukupuolet, vuosina 1969-2009, ikäluokissa 15-65.