

**Pro gradu -tutkielma**

**Luun morfogeneettisen proteiini 4:n kohdegeenien SKIL  
ja ID2 vaikutukset rintasyöpäsoluihin**

**Johanna Lappeteläinen**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

08.08.2017

## ALKUSANAT

Tämä pro gradu on tehty Syöpägenomiikan ryhmässä, BioMediTechissä, Tampereen yliopistossa. Ensimmäiseksi haluan osoittaa suuret kiitokset ryhmänjohtajalle, professori Anne Kallioniemelle, että sain mahdollisuuden tehdä pro gradu-työtäni tutkimusryhmässäsi. Haluan myös kiittää kaikista asiantuntevista neuvoista ja kommentteista, joita sain työni aikana. Erityiskiitokset ohjaajalleni Minna Ampujalle kaikesta avusta, neuvoista ja kannustuksesta niin laboratoriotyön kuin kirjoitusprosessin aikana. Kiitokset myös kärsivällisyydestä ja joustavuudesta prosessin venyessä. Haluan myös kiittää kaikkia muita Syöpägenomiikan ryhmän jäseniä avusta ja neuvoista käytännön osuutta suorittaessani. Lisäksi kiitän työnantajaani sekä työtovereitani joustavuudesta opintojani kohtaan. Matka tämän pro gradun ääressä on ollut pitkä ja haasteellinen, mutta erittäin opettavainen. Viimeiseksi haluan vielä kiittää lapsiani, jotka ovat kärsivällisesti antaneet äidille rauhan ja mahdollisuuden opiskella, olette rakkaita.

Ylöjärvi 08.08.2017

Johanna Lappeteläinen

---

<b>Tekijä:</b>	Johanna Lappeteläinen	
<b>Tutkielman nimi:</b>	Luun morfogeneettisen proteiini 4:n kohdegeenien SKIL ja ID2 vaikutukset rintasyöpäsoluihin	
<b>English title:</b>	The effects of target genes of bone morphogenetic protein 4 SKIL and ID2 to breast cancer cell line	
<b>Päivämäärä:</b>	08.08.2017	<b>Sivumäärä:</b> 49
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
<b>Oppiaine:</b>	Solu- ja molekyylibiologia	
<b>Tutkielman ohjaaja(t):</b>	Professori Anne Kallioniemi, PhD Minna Ampuja, Professori Janne Ihalainen	

---

### Tiivistelmä:

Rintasyöpä on johtava naisten syöpäkuolemien aiheuttaja maailmanlaajuisesti. Luun morfogeneettiset proteiinit (BMP) ovat tranformoiva kasvutekijä beta- superperheeseen kuuluvia proteiineja. BMP:den tiedetään olevan osallisina monissa syöpätyypeissä. Rintasyövässä BMP4:llä on merkittäviä vaikutuksia solukasvuun, liikkuvuuteen ja levinnäisyyteen. Aiempien tutkimusten mukaan BMP4:n on havaittu laskevan solukasvua merkittävästi rintasyöpäsoluilla. Tämän tutkimuksen kohteena oli kaksi BMP4:n kohdegeeniä, ID2 (*Inhibitor of DNA binding 2*) ja SKIL eli SKI-like proto-onkogeeni. Hypoteesina oli selvittää johtuuko BMP4:n vaikutukset solukasvuun ID2- tai SKIL-geenistä. BT-474 ja T-47D rintasyöpäsoluja käsiteltiin ihmisen rekombinantti proteiini BMP4:lla tai pelkällä kuljettimella ( BMP4:n liuotusneste). ID2 ja SKIL hiljennettiin RNA häirinnän avulla käyttäen geneihin kohdennettuja siRNAa: siSKIL, siID2 ja kontrollina lusiferaasigeenin hiljentävä siLUC. Hiljentämisen vaikutuksia solukasvuun määritettiin solulaskuin kahdessa aikapisteessä. Geenien hiljentymisen varmistettiin RT-qPCR:llä. BMP4 laski solukasvua BT-474 ja T-47D soluilla merkittävästi. BMP4:n vaikutukset olivat yhteneväiset ryhmän aiempien tutkimusten kanssa. Solulaskujen perusteella geenien hiljentämisellä ei ollut vaikutusta solukasvuun. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää ovatko kyseiset geenit osallisina BMP4:n aiheuttamaan solukasvun alenemiseen. Tulokset osoittivat etteivät ID2 tai SKIL ainakaan yksistään ole vastuussa BMP4:n vaikutuksista solukasvuun.

**Author:** Johanna Lappeteläinen  
**Title of thesis:** The effects of target genes of bone morphogenetic protein 4 SKIL and ID2 to breast cancer cell line  
**Finnish title:** Luun morfogeneettisen proteiini 4:n kohdegeenien SKIL ja ID2 vaikutukset rintasyöpäsoluihin  
**Date:** 08.08.2017 **Pages:** 49  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell and Molecular Biology  
**Supervisor(s):** Professor Anne Kallioniemi, PhD Minna Ampuja, Professor Janne Ihalainen

---

### Abstract:

Breast cancer is the leading cause of cancer deaths among women worldwide. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are a protein family that belongs to transforming growth factor  $\beta$  superfamily. BMPs are involved in many cancer types. In the case of breast cancer BMP4 has a significant influence on cell growth, migration, and invasion. Previous studies have shown that BMP4 decreased cell growth of breast cancer cells significantly. The aim of this study was to examine two BMP4 target genes, Inhibitor of DNA binding 2 (ID2) and SKI-like proto-oncogene (SKIL). The hypothesis was that ID2 and SKIL were involved in the effects of BMP4 on cell growth. Breast cancer cells BT-474 and T-47D were treated with human recombinant BMP4 or vehicle (0,1 % BSA in 4 mM HCl). ID2 and SKIL were silenced by RNA interference using the targeted siRNAs; siSKIL, siID2 and a control was siLUC (luciferase gene). Effects of silencing on cell growth were followed by cell counting in two time points. Gene silencing was confirmed by qPCR. BMP4 decreased the growth of BT-474 and T-47D cells significantly. Effects of BMP4 were consistent with previous studies. Results of cell counting showed that the silencing of the genes did not affect cell growth. In conclusion, the aim was to observe whether the BMP4 target genes were involved in the BMP4 -induced decrease of cell growth in breast cancer cells. The results showed BMP4 decreased cell growth but they also showed that ID2 or SKIL alone does not to affect cell growth.

---

**Keywords:** Breast cancer, BMP, BMP4, ID2, SKIL

## SISÄLLYSLUETTELO

<b>ALKUSANAT</b> .....	2
Tiivistelmä .....	3
Abstract .....	4
<b>SISÄLLYSLUETTELO</b> .....	5
<b>LYHENTEET</b> .....	6
<b>1.JOHDANTO</b> .....	7
1.1Rintasyöpä .....	7
1.2Luun morfogeneettiset proteiinit .....	10
1.2.1Rakenne ja tehtävät .....	11
1.3Luun morfogeneettinen kasvutekijä 4 (BMP4) .....	15
1.3.1BMP4:n merkitys rintasyövässä .....	20
1.3.2BMP4:n kohdegeenit .....	23
<b>2TUTKIMUKSEN TAVOITTEET</b> .....	25
<b>3MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b> .....	26
3.1. Solulinjat ja viljely .....	26
3.2BMP4-käsittely .....	26
3.3Geenien hiljentämiseen käytetyt siRNA:t.....	27
3.4Transfektio .....	27
3.5qRT-PCR .....	28
3.6Funktionaaliset määritykset .....	30
<b>4TULOKSET</b> .....	30
4.1 RNAseq tulosten varmistaminen qRT-PCR:llä .....	31
4.2SKIL.....	32
4.2.1 Funktionaaliset määritykset .....	32
4.3ID2 .....	34
4.3.1siRNA toimivuuden testaaminen .....	34
4.3.2Funktionaaliset määritykset .....	35
<b>5TULOSTEN TARKASTELO</b> .....	36
<b>6LÄHDELUETTELO</b> .....	41

## LYHENTEET

BMP4	Luun morfogeneettinen proteiini 4 ( <i>Bone morphogenetic protein 4</i> )
BSA	Naudan seerumin albumiini ( <i>Bovine serum albumin</i> )
Cq	Kvantifiointijakso ( <i>Quantification cycle</i> )
ID2	DNA:han sitoutumisen estäjä ( <i>Inhibitor of DNA binding</i> )
LUC	Lusiferaasigeeni ( <i>Luciferase</i> )
RT-qPCR	Kvantitatiivinen käänteiskopiointi- ja polymeraasiketjureaktio ( <i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
siRNA	Pieni häiritsevä RNA ( <i>Small interfering RNA</i> )
SKIL	SKI-like proto-onkogeeni ( <i>SKI like proto-oncogene</i> )
TGF- $\beta$	Transformoiva kasvutekijä $\beta$ ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> )

## 1. JOHDANTO

Syöpä koskettaa jollakin tasolla jokaista suomalaista, sillä arviolta syöpään sairastuu kolmasosa suomalaisista elämänsä aikana. Suomessa yleisin syöpätyyppi on miehillä eturauhassyöpä ja naisilla rintasyöpä. Rintasyöpätutkimusta tehtäessä tavoitteena on löytää keinoja rintasyövän ehkäisyyn, varhaiseen toteamiseen, diagnostiikkaan, hoitomuotoihin sekä kuntoutumiseen. Tutkimuksen mielenkiinnon kohteena on muunmuassa syövän syntymekanismit. Tiedetään, että syövät aiheutuvat kun solujen jakaantumisen säätely elimistössä pettää ja solut alkavat jakautua ilman kontrollia. Luun morfogeneettiset proteiinit, BMP:t (engl. *bone morphogenetic protein*) ovat kasvutekijöitä, jotka ovat osallisina muunmuassa solujen jakaantumisessa, jonka vuoksi ne ovatkin tärkeä syöpätutkimuksen kohde.

### 1.1 Rintasyöpä

Rintasyöpä on naisten yleisin syöpä Suomessa sekä muualla maailmassa. Kaikista suomalaisten naisten syöivistä on vuonna 2014 Suomen syöpärekisterin mukaan ollut rintasyöpiä 31.1 % ([www.syoparekisteri.fi](http://www.syoparekisteri.fi), viitattu 25.2.2017) ja koko maailmassa luku on 25 % (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Rintasyöpään sairastuu yli 1,3 miljoonaa naista vuosittain, joista 450 000 menehtyy kyseiseen tautiin (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Rintasyöpä aiheuttaa suurimman osan työikäisten naisten kuolemista. Noin 15 % kaikista syöpäkuolemista on rintasyövän aiheuttamia ja Suomessa noin joka yhdeksäs nainen eli 11 % sairastuu elämänsä aikana rintasyöpään (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Rintasyövän ennuste on hyvä verrattuna moniin muihin syöpiin. Varsinkin Suomessa ennuste on Euroopan parhaimpia. Suhteellinen 5-vuotiselossaololuku normaaliväestöön verrattuna oli Suomen syöpärekisterin mukaan vuosina 2012 - 2014 91 % ([www.syoparekisteri.fi](http://www.syoparekisteri.fi), viitattu 25.2.2017). Kaikesta huolimatta Suomessa edelleen yli 800 naista menehtyy kyseiseen tautiin vuosittain (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015).

Rintasyöväälle ei tiedetä olevan yhtä yksittäistä aiheuttajaa, mutta useita riskitekijöitä on saatu selvitettyä. Tällaisia riskitekijöitä ovat mm. ikä, hedelmättömyys, ikä ensimmäisen raskauden aikana, menopaussin alkamisikä sekä hormonivalmisteiden käyttö vaihdevuosien

aikana (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Riskitekijöiden lisäksi tunnetaan mutatoituneita rintasyövälle altistavia geenejä, joista tunnetuimpien BRCA1 ja BRCA2 geenien kantajilla on perinnöllinen alttius kyseiselle sairaudelle (Roy ym., 2011). BRCA1 ja BRCA2 -geenien lisäksi tunnetaan muutama muukin rintasyövälle altistava geenimutaatio, kuten mutaatio CDH1 -geenissä (King-Spohn ja Pilarski, 2014). Mutaatio p53 geenissä altistaa perinnölliselle Li-Fraumenin syöpäoireyhtymälle, jonka on todettu aiheuttavan rintasyöpää jo varhaisessa iässä (Roy ym., 2011; King-Spohn ja Pilarski, 2014). STK11 geenimutaatio aiheuttaa Peutz-Jeghers syndrooman, jonka seurauksena elinikäinen rintasyöpäriski on 45 - 50 % (King-Spohn ja Pilarski, 2014). Mutaatio PTEN geenissä nostaa rintasyöpäriskin 25 – 50 -prosenttiin (King-Spohn ja Pilarski, 2014). Geenimutaatioiden kantajille tarjotaan mahdollisuutta käydä tiukoissa seurannoissa, kuten mammografiassa ja MRI-kuvauksissa säännöllisesti jo nuoresta iästä lähtien (King-Spohn ja Pilarski, 2014).

Rintasyöpä havaitaan tyypillisimmin kyhmystä rinnassa tai joissain tapauksissa kainalossa. Kyhmy tutkitaan tarkemmin mammografian ja ultraäänitutkimuksen avulla. Rinnassa olevasta muutoksesta otetaan kaikukuvauksen tai mammografian avulla paksuneulabiopsia. Paksuneulabiopsian perusteella määritellään kasvaimen pahanlaatuisuus sekä rintasyövän tyyppi ja sen myötä myös leikkauksen tarve. Varsinainen diagnoosi tehdään histopatologisen tutkimuksen perusteella (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Rintasyöpädiagnostiikassa syövälle määritetään pTNM-levinneisyysluokitus sekä kasvaimen histologista erilaistumista kuvaava kolmiportainen luokittelu (gradus). PTNM -luokittelussa otetaan huomioon primaarikasvaimen koko, kasvaimen levinneisyys alueellisiin imusolmukkeisiin sekä etäpesäkkeisiin (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Luokittelujen avulla saadaan muodostettua jonkinlainen kuva syövän ennusteesta.

Rintasyöpä jaotellaan yleisesti duktaaliseen ja lobulaariseen karsinoomaan. Rintasyöivistä 70 – 80 % on invasiivisia duktaalisia ja 5 – 15 % invasiivisia lobulaarisia karsinoomia (Weigelt ym., 2010; Suomen rintasyöpäryhmä ry, 2015). Lobulaarisen ja duktaalisen karsinooman erotusdiagnostiikkana käytetään E-cadherin värjäystä, joka on useimmiten negatiivinen lobulaarisessa karsinoomassa (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Näiden lisäksi on olemassa useita harvinaisempia rintasyöpämuotoja, kuten tubulaarinen, medullaarinen, invasiivinen kribriforminen ja papillaarinen karsinooma. Näiden esiintyvyys jää kuitenkin



0.1 - 5 prosenttiin kaikista rintasyöpätapauksista (Weigelt ym., 2010; Acevedo ym., 2014). Rintasyöpä voidaan myös jaotella molekylaarisiiin alaryhmiin. Nämä alaryhmät ovat HER2 onkogeneeni positiivinen ryhmä (*engl. Human epidermal growth factor receptor 2*), hormonireseptori eli ER (estrogeeni) tai PR (progesteroni) positiivinen, HER2 ja ER/PR positiivinen ryhmä sekä kolmoisnegatiivinen ryhmä (The Cancer Genome atlas Network, 2012; ks. yleiskatsaus Miller ym, 2014). Jaottelu voidaan tehdä myös geeniekspression avulla, jolloin luokat olisivat luminal A, luminal B, kolmoisnegatiivinen ja HER2 -positiivinen ryhmä, mutta tätä menetelmää ei käytetä kliinisesti kovin laajasti (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Luminaalisen A tyyppin solukuvassa karsinoomasolut näyttävät maitorauhasduktuksen sisemmiltä eli luminaalisilta soluilta (Weigelt ym., 2010). Kyseinen karsinooma on HER2 negatiivinen, ER ja / tai PR positiivinen ja Ki67 on matala (Goldhirsch ym., 2013). Luminaaliseen A-tyyppiin kuuluu suurin osa rintasyövistä (ks. yleiskatsaus Miller ym, 2014). Luminaaliseen B-tyyppiin kuuluvat karsinoomat ovat huomattavasti erilaistuneita kuin luminal A tyyppin karsinoomat sekä kooltaan suurempia (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Kyseiseen ryhmään kuuluvat karsinoomat ovat ER ja / tai PR positiivisia, HER2 positiivisia tai negatiivisia, mutta ne poikkeavat luminal A tyyppistä korkean Ki67 perusteella (Goldhirsch ym., 2013). Lisäksi luminal B karsinoomiin liittyy usein p53 geenin mutaatio (The Cancer Genome atlas Network, 2012; Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Kolmoisnegatiiviseen ryhmään kuuluvat karsinoomat ovat ER, PR ja HER2 negatiivisia (Weigelt ym., 2010; Goldhirsch ym., 2013). Kolmoisnegatiivisista karsinoomista suurin osa on basal like – karsinoomia (Weigelt ym., 2010; Goldhirsch ym., 2013). Niiden solukuvassa karsinoomasolut ovat maitorauhasduktuksen uloimpien eli basaalisolujen kaltaisia. Kyseiset solut ovat sytokeratiini 5 / 6 positiivisia (Weigelt ym., 2010; Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Myös basal like –karsinoomista suurin osa lukeutuu kolmoisnegatiivisten ryhmään. HER2 -tyypin karsinoomat ovat HER2 positiivisia sekä ER ja PR negatiivisia (Weigelt ym., 2010; Goldhirsch ym., 2013).

Rintasyövän hoitoon ja ennusteeseen vaikuttaa rintasyövän tyyppi. Yleisimpien syöpätyyppien eli duktaalisen ja lobulaarisen rintasyövän ennuste on samankaltainen, samoin myös medullaarisen rintasyövän. Harvinaisemmilla syöpätyypeillä on yleisesti vähän soluatyypiaa mikä yleensä viittaa suotuisaan ennusteeseen (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Poikkeuksena on mikropapillaarinen karsinooma joka leviää herkästi kainalon

imusolmukkeisiin suonihakuisuutensa vuoksi (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Myös syövän alatyypillä on merkitystä syövän hoidossa ja ennusteessa. Ennusteellisesti luminal A tyyppin syöville on parempi ennuste kuin luminal B tyyppin karsinoomilla (Weigelt ym., 2010). Kolmoisnegatiivisilla karsinoomilla on huonompi ennuste kuin luminal A / B tyypeillä. HER2 –tyypin karsinoomilla on huono ennuste, mutta tähän karsinoomaan tehoaa anti-HER2 –adjuvanttihoito, joka parantaa ennustetta (ks. yleiskatsaus Miller ym, 2014). Suurimman osan diagnosoiduista rintasyöivistä muodostavat estrogeeni ja progesteroniposiitiviset eli hormonireseptoriposiitiviset syövät. Näiden osuus on 65 - 75 % kaikista rintasyöivistä, määrän kohotessa jatkuvasti (ks. yleiskatsaus Miller ym, 2014).

Tärkeimpänä ennusteeseen ja taudin uusiutumiseen vaikuttavana tekijänä pidetään kainalon imusolmukemetastaaseja. Muita uusiutumisriskiä kasvattavia tekijöitä ovat mm. aggressiivinen solukuva sekä kasvaimen suuri koko. Histologisissa tutkimuksissa havaittu solujen suuri jakaantumisnopeus, joka saadaan selville proliferaatioantigeenivärjäyksellä eli Ki67:llä (ks. yleiskatsaus Miller ym, 2014), erilaistumisaste sekä HER-2 kasvutekijägeenin esiintyminen suurissa määrin viittaavat aggressiiviseen solukuvaan. Uusiutumisriskin on havaittu olevan suurempi nuoremmilla potilailla (Suomen Rintasyöpäryhmä ry, 2015). Rintasyövän hoitomenetelmiä on useita ja ne valitaan karsinooman tyyppin ja levinneisyyden mukaan. Hoitomuodon valintaan vaikuttavat myös potilaan ikä ja kunto sekä potilaan oma mielipide hoidosta.

## 1.2 Luun morfogeneettiset proteiinit

Luun morfogeneettiset proteiinit, BMP:t (engl. *bone morphogenetic protein*) ovat kasvutekijöitä, jotka kuuluvat transformoivan kasvutekijä betan, TGF $\beta$  -(engl. *Transforming growth factor beta*) superperheeseen (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011). Luun morfogeneettisten proteiinien ohella TGF $\beta$  -superperheeseen kuuluvat transformoivat kasvutekijä betat, aktiviinit, inhibiinit, NODAL ja anti-Mullerian hormoni (ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010; Schmierer ja Hill, 2007). TGF $\beta$  -superperheeseen kuuluvia molekyyliä yhdistää samankaltainen rakenne sekä viestintäreitti (Schmierer & Hill, 2007). Näitä solunulkoisia viestintämolekyyliä on tutkittu 1960-luvulta alkaen, jolloin Marshall Urist (1965) julkaisi ensimmäisen tutkimuksen proteiineista, jotka hän nimesi luun morfogeneettisiksi proteiineiksi. Nykyään tunnetaan 21 ihmiseltä löytyvää BMP:tä (ks.

yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010; ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011). BMP:t ovat tärkeässä roolissa monissa biologisen kehityksen prosesseissa jo yksilön alkukehityksestä lähtien (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho, 2001). Ne säätelevät solujen kasvua, jakautumista, liikkumista ja erilaistumista sekä osallistuvat monien elinten, kuten luukudoksen muodostumiseen (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011).

### 1.2.1 Rakenne ja tehtävät

BMP:t muodostuvat kahdesta monomeerista, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa disulfididisidoksella, muodostaen dimeerin (Sebald ym., 2004). BMP:n viestintämolekyyylimuoto koostuu 50-100 aminohaposta, joista seitsemän on kysteinejä. Kysteineistä kuusi muodostavat kolme molekyylinsisäistä disulfididisidosta ja seitsemäs muodostaa kovalenttisen disulfididisidoksen toisen monomeerin kanssa (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011). BMP:t voidaan jakaa alaryhmiin aminohapposekvenssin perusteella (Kawabata ym, 1998; Newfeld ym., 1999; Botchkarev, 2003, Ye ym., 2007). Tyypillisimpiä alaryhmiä ovat: BMP2 & 4, BMP5 - 8, BMP9 - 10 ja BMP12 – 14 (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011).

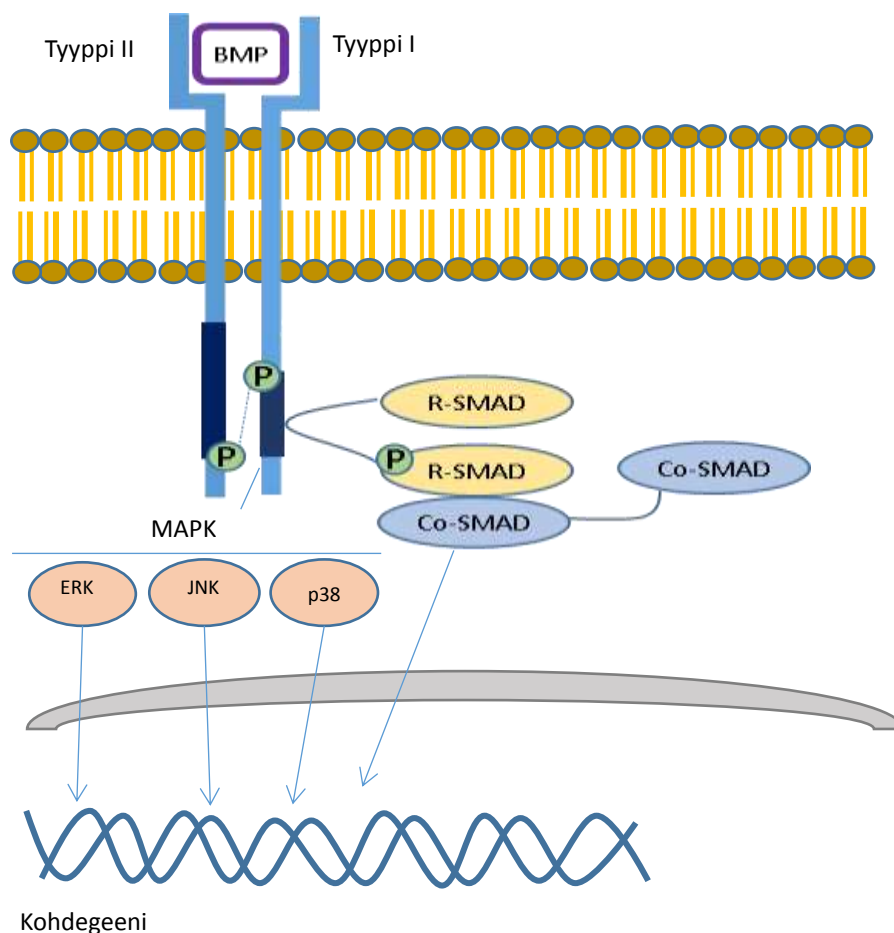
Luun morfogeneettiset proteiinit osallistuvat luun muodostumiseen. Ne stimuloivat mesenkymaalisolujen erikoistumista kondro- ja osteoblasteiksi ja saavat aikaan luun muodostumisen niin alkionkehityksen aikana kuin aikuisen luun vaurioiden korjaantumisessa (Wozney ja Rosen, 1998; Wozney, 2002). Vaikka näiden proteiinien tärkeimmän tehtävän on ajateltu olevan nimensämukaisesti luun muodostukseen osallistuminen, myöhempien tutkimusten mukaan BMP:n osuus erilaisissa kehitysvaiheissa on noussut jopa tärkeämmäksi tekijäksi. BMP:t osallistuvat muun muassa alkionkehityksen varhaisten vaiheiden säätelyyn, vasen-oikea asymmetrian muodostumiseen, hermoston ja luuston muodostumiseen, raajojen muodostumiseen sekä kudosten ja elinten muodostumiseen organogeneesin aikana (Hogan, 1996a; Zhao, 2003; ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010). Näiden proteiinien tärkeyttä alkiokehityksen aikana kuvaa Hoganin (1996b) havainnot siitä, että BMP2 ja BMP4 puuttuminen hiiriltä johtaa kuolemaan alkiokehityksen aikana ja BMP7 puutos johtaa kuolemaan pian syntymän jälkeen.

### 1.2.2 Signaalintireitit

BMP:t käyttävät samaa viestintäreittiä yhdessä muiden TFG $\beta$  superperheeseen kuuluvien molekyylien kanssa. Viestintä solun ulkopuolelta sisäpuolelle tapahtuu tyyppi I ja tyyppi II seriini-treoniinikinaasireseptorien välityksellä (Kuva 1). BMP:t voivat sitoutua kolmeen erilaiseen tyyppi I ja tyyppi II reseptoriin. Tyyppi I:n reseptoreita ovat BMPR1A/ALK3, BMPR1B/ALK6 ja ACVR1A/ALK2 ja tyyppi II:n BMPR2, ACVR2A/ActR-II ja ACVR2B/ActRIIB (ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010; Bragdon ym., 2011). Reseptorit koostuvat solunulkoisesta ligandin sitovasta N-terminaalista, kalvonsisäisestä osasta ja solunsisäisestä kinaasi C-terminaalista (ks. yleiskatsaukset de Caestecker, 2004; Alarmo ja Kallioniemi, 2010). Tyyppi I reseptorilla on lisäksi N- ja C-terminaalien välissä glysiini- ja seriinitähteitä sisältävä GS-alue, jota tarvitaan fosforyloitumiseen (Shi ja Massague, 2003, ks. yleiskatsaus de Caestecker, 2004).

BMP ligandi sitoutuu solukalvolla olevaan tyyppi I tai tyyppi II reseptoriin riippuen ligandista. BMP6:n ja BMP7:n on todettu sitoutuvan ensin tyyppi II reseptoriin ja BMP2:n ja BMP4:n taas tyyppi I reseptoriin (ks. yleiskatsaus de Caestecker, 2004; ks. yleiskatsaus Kallioniemi ja Alarmo, 2010). Kummassakin tapauksessa viestinnän onnistumiseen vaaditaan tyyppi I ja tyyppi II heterotetrameerisen kompleksin muodostuminen (ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010). Tyyppi I on kompleksissa hallitsevassa asemassa ligandin sitoutuessa siihen suuremmalla affiniteetillä kuin tyyppi II reseptoriin (Rosenzweig ym., 1995; ten Dijke ym., 2003). Eri BMP ligandit sitoutuvat eri BMP reseptoreihin erilaisella affiniteetillä. BMP4 sitoutuu BMPR1A ja BMPR1B reseptoreihin yhtä tehokkaasti kun taas BMP2 sitoutuu mieluummin BMPR1A reseptoriin. BMP7 sitoutuu mieluiten reseptoreihin ACVR1 ja BMPR1B (Kawabata ym., 1998; Macias-Silva ym., 1998; ten Dijke ym., 2003; Sebald ym., 2004). Tyypin II reseptori aiheuttaa tyypin I reseptorin GS-alueen fosforyloitumisen. Tämän seurauksena tyypin I reseptori fosforyloi R-SMAD:n eli reseptorisäädellyn SMAD:n (engl. Receptor-regulated SMAD) solulimassa. R-SMAD:ejat ovat SMAD 1, -5 ja -9. BMP6:n ja BMP7:n on havaittu aktivoivan SMAD1 ja SMAD5 kun taas BMP4:n tiedetään aktivoivan kaikki kolme R-SMAD:a (Aoki ym., 2001). R-SMAD:n fosforyloituminen mahdollistaa vuorovaikutuksen SMAD4 kanssa, joka tunnetaan myös nimellä Co-SMAD (engl. Common-SMAD) (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho, 2001). R-SMAD - SMAD4 heteromeerinen kompleksi kulkeutuu tumaan, jossa se saa aikaan kohdegeenin aktivoitumisen tai vaimentumisen olemalla vuorovaikutuksessa SMAD

sitoutumiskohtaan (*engl. Smad-binding element* tai *BMP response element*) kohdegeenin DNA sekvensissä (Feng ja Derynck, 2005). SMAD kompleksilla itsellään on heikko kyky sitoutua DNA:han, joten se käyttää sitoutumisessa apunaan monia muita proteiineja, kuten Runx perheen transkriptiotekijöitä ja estrogeenireseptoria (Hata ym., 2000; Zwijsen ym., 2003; Feng ja Derynck 2005; Miyazono ym., 2005), tuman koaktivaattoreita kuten p300/CBP sekä korepressoreita kuten c-Ski, SNo ja Tob (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho 2001; Zwijsen ym., 2003; Feng ja Derynck 2005; Miyazono ym., 2005). R-SMAD:t ja Co-SMAD:t ovat rakenteeltaan toistensa kaltaisia, ne muodostuvat kahdesta konservoituneesta pallomaisesta Mad-domeenista sekä niitä yhdistävästä ei-konservoituneesta domeenista (Massague ym., 2005).



**Kuva 1** BMP -signalointireitti. Luun morfogeneettisten proteiinien, BMP:den viestintäreitti solun sisälle tapahtuu solukalvolla olevien tyyppi I ja tyyppi II seriini-treoniinikinaasireseptorien välityksellä. BMP:t käyttävät SMAD viestintäreitin lisäksi myös esimerkiksi MAPK- viestintäreittejä.

BMP -signalointireittiä säädelään sekä solunsisäisesti että solunulkoisesti negatiivisella palautteella (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho 2001). Solunulkoinen säätely tapahtuu antagonistien avulla, joita tiedetään olevan yli 15. Antagonistit luokitellaan yleisesti kolmeen alaryhmään seuraavasti: Dan-perhe (*engl. Differential screening-selected gene aberrative in Neuroblastoma*), Tsg (*engl. twisted gastrulation*), Chordin-perhe ja lisäksi tiedetään joitakin alaryhmiin kuulumattomia antagonisteja. Antagonistien toiminta perustuu joko niiden kiinnittymiseen solukalvolla oleviin BMP reseptoreihin, estäen näin BMP:n kiinnittymisen niihin tai tarttumisella suoraan BMP molekyleihin (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011). Antagonistit voivat estää useiden BMP ligandien kiinnittymisen, esimerkiksi noggin on BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP13 ja BMP14 antagonisti. Chordin taas toimii antagonistina BMP2, BMP4 ja BMP7 ligandeille (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011). Signalointireitin säätelyä tapahtuu myös solukalvolla muunmuassa BAMBI:n toimesta (*engl. BMP and activin membrane bound inhibitor*). TFG $\beta$ -reseptorin kaltaiselta BAMBI:lta puuttuu solunsisäinen kinaasi domeeni. BAMBI pystyy toimimaan TFG $\beta$ -reseptorin kaltaisesti, mutta puuttuvan kinaasi domeenin vuoksi signaalinvälitys estyy (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho 2001).

Solunsisäinen säätely tapahtuu inhibiittori-SMAD:ien (I-SMAD), SMAD-6 ja SMAD-7 vaikutuksesta (Massague ym., 2005). I-SMAD:t sitoutuvat tyyppi I reseptorin solunsisäiseen domeeniin estäen tyyppi I reseptorin fosforyloitumisen. SMAD6 kilpailee lisäksi sitoutumisesta reseptoriaktiiviseen SMAD1:een yhdessä SMAD4:n kanssa, mikä johtaa inaktiivisen SMAD1 - SMAD6 kompleksin syntymiseen (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho 2001). I-SMAD:ien lisäksi solunsisäisestä säätelystä vastaavat SMAD ubikitini säätelytekijät 1 ja 2 eli Smurf1 ja Smurf2. Smurf1:n toiminta perustuu erityisesti SMAD1:n ja SMAD5:n ubikitinaatioon, joka johtaa niiden proteosomaaliseen hajoamiseen. Smurf2:n toiminta on vielä epäselvää, mutta tutkimukset ovat osoittaneet säätelyn perustuvan samaan mekanismiin kuin Smurf1:llä (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho 2001)

SMAD -viestintäreitin lisäksi BMP:t käyttävät myös muita tunnettuja viestintäreittejä solukalvolta solun sisään viestiessä, mutta niiden mekanismit eivät ole niin hyvin selvillä kuin SMAD -viestintäreitin. Tällaisia reittejä ovat esimerkiksi Erk -MAPK (*engl. extracellular signal-related kinase (ERK) – mitogen-activated protein kinase (MAPK)*), Wnt

(Attisano ja Labbe, 2004), JAK - STAT (ks. yleiskatsaus von Bubnoff ja Cho 2001; Nohe ym., 2004; Miyazono ym., 2005) ja Notch (Miyazono ym., 2005; Herpin ja Cunningham, 2007). BMP:den käyttämät viestintäreitit vaihtelevat BMP:n mukaisesti, esimerkiksi BMP4:n tiedetään aktivoivan p38 ja Erk - MAPK viestintäreitit muttei JNK reittiä (Kimura ym., 2000; Nohe ym., 2002; Nohe ym., 2004; Jin ym., 2006; Otani, 2007; Yang ym., 2007b; Ketolainen ym., 2010).

### 1.3 Luun morfogeneettinen kasvutekijä 4 (BMP4)

BMP4 luokitellaan kuuluvaksi samaan alaryhmään BMP2:n kanssa. BMP4:n ekspressoitumispaikkoja ovat muun muassa kateenkorva, luuydin, perna, aivot, selkäydin, sydän, luurankolihas, munuaiset, keuhkot, maksa, haima, virtsarakko, ruokatorvi, mahalaukku, tonsilla, kohtu, virtsanjohdin, iho ja prostata (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011; Alarmo ym., 2013). BMP4 osallistuu elimistössä moniin kehitysprosesseihin, kuten raajojen, sydämen, munuaisten ja sisäkorvan kehittymiseen sekä luuston korjaantumiseen ja uudelleen muodostumiseen (ks. yleiskatsaus Bragdon ym., 2011). Lisäksi BMP4:n on osoitettu BMP2:n ohella säätelevän hiiren maitorauhasen kehittymistä (Phippard ym., 1996; Cho ym., 2006), mikä tekee siitä merkittävän tutkimuskohteen rintasyöpää ajatellen.

BMP4:n kuten muidenkin BMP:den on havaittu olevan osallisina monissa eri syöpätyypeissä. BMP:den roolit ja esiintyvyys eri syövässä vaihtelee solujen, kudoksen ja BMP:n mukaan (Singh ja Morris, 2010; ks. yleiskatsaus Kallioniemi, 2012). BMP2:n on havaittu yli-ilmenevän kaikissa keuhkosyövässä (Langenfeld ym., 2005), kun taas BMP7:n tilanne on päinvastainen eturauhassyövässä (Masuda ym., 2004; Buijs ym., 2007b). BMP:illä on havaittu olevan samanlainen kaksoisrooli kuin TFG $\beta$ -superperheen jäsenillä liittyen syöpien ilmenemiseen (Derynck ym., 2001; Massague ja Gomis, 2006). Niiden on havaittu sekä edistävän, että estävän syövän kehittymistä (ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010). Tutkimuksissa on myös havaittu, että BMP:den viestintäreitteihin kohdistuvat muutokset saavat aikaan näkyviä muutoksia syöpäsoluissa (ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010; Thawani ym., 2010).

Syöpä lukeutuu geneettisiin sairauksiin ja se johtuu geneettisten muutosten kertymisestä tuumorisuppressori geeneihin sekä onkogeeneihin. Periytyviä syöpiä tutkimalla on havaittu

BMP:n signalointireittiin kytkeytyvissä komponenteissa, kuten SMAD4:ssä tai BMPRIA:ssa mutaatioita. SMAD4:n on havaittu mutatoituneen 15 – 20 %:ssa ja BMP reseptori tyyppi IA:n (BMPR1A) 20 – 25 %:ssa syöpävaaraa aiheuttavissa sairauksissa, kuten juveniilissa polypoosissa (Waite ja Eng, 2003; Chow ja Macrae, 2005). Noin 50 %:ssa kaikista satunnaisista haimasyövistä ja noin 30 %:ssa kaikista satunnaisista metastaattisista paksusuolensyövistä on löydetty mutatoitunut SMAD4 (Cheng ym., 2004, ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010). Mutatoitunut BMPR1A yhdistetään lisäksi joihinkin Cowden syndrooma tapauksiin (Harradine ja Akhurst, 2006). Helms ym. (2005) ovat havainneet tutkimuksessaan, että BMPR1B reseptorin liikatuotanto on yhteydessä rintasyöpäpotilaiden huonoon ennusteeseen. Samassa tutkimuksessa huomattiin myös, että BMPR1B:n esiintyminen ER positiivisessa rintasyövässä korreloi korkeaan tuumoriluokitukseen, proliferaatioindeksiin sekä sytogeneettiseen epästabiilisuuteen. BMPR1A, BMPR1B ja BMPR2:n ilmenemisen on havaittu puuttuvan pitkälle edenneissä eturauhassyövässä (Kim ym., 2000; Kim ym., 2004a), mutta samanlaisia havaintoja ei ole todettu rintasyövän kohdalla (Alarmo ym., 2007). SMAD9 puolestaan on havaittu hiljentyneen yhdessä kolmesta rintasyövästä (Cheng ym., 2004).

BMP ligandien ilmentymistä syövässä on tutkittu monissa eri tutkimuksissa, eri syöpätyypeillä ja kudoksilla. Useimmat tutkimukset on keskittyneet rinta- ja haimasyöpiin. Saadut tulokset ovat ristiriitaisia. Saman ligandin on havaittu toimivan eri tavalla syöpätyypistä riipuen. Myös tutkimusten välisissä tuloksissa on ristiriitaisuuksia. Tämän hetkisen tietämyksen mukaan BMP:den rooli syövässä on kaksisuuntainen, ne voivat toimia joko edistäjinä tai estäjinä (ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010). Näiden tekijöiden pohjalta on havaittu, että BMP4:lla on sekä positiivisia että negatiivisia vaikutuksia syöpäsoluihin. Lisäksi BMP4:n on havaittu vaikuttavan solujen erilaistumiseen, apoptoosiin sekä angiogeneesiin (ks. yleiskatsaus Kallioniemi, 2012).

BMP4:n on todettu ilmenevän useissa kasvaintyypeissä koko kehon alueella, kuten vatsanalueen tuumoreissa (Kim ym., 2011; Lombardo ym., 2011; Shirai ym., 2011), ovariokasvaimissa (Shepherd ym., 2003; Theriault ym., 2007; Laatio ym., 2011), melanoomassa (Hjertner ym., 2001; Holien ym., 2012) sekä pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa (Xu ym., 2011). Osassa syövästä BMP4 -taso on kohonnut



verrattuna normaaliin ja osassa tilanne on päinvastainen. Vatsan- ja suolistonalueen syövässä tavataan kohonneita arvoja (Deng ym., 2007; Kim ym., 2011; Chiu ym., 2012) kun taas aivoperäisissä kasvaimissa BMP4 ilmenemistaso on normaalia alhaisempi (Giacomini ym., 2006; Johnson ym., 2009). Rintasyövässä tavataan matalia BMP4 tasoja sekä syöpäkudoksessa, että normaalissa kudoksessa riippumatta korkeista transkriptiotasoista (Davies ym., 2008). Alarmon ym. (2007) tutkimuksen mukaan noin 25 %:ssa rintasyöpätapauksista BMP4 ilmenemistaso on kohonnut. Kim ym. (2011) tutkimuksen mukaan BMP4:n ilmenemistaso korreloi käänteisesti imusolmukemetastaaseihin sekä invasiivisuuteen vatsanalueen syövässä (Kim ym., 2011). BMP4 -tasojen on havaittu liittyvän taudin ennusteeseen joissakin syöpätyypeissä. Ovariokarsinooissa korkeat BMP4 tasot ilmentävät hyvää ennustetta (Laatio ym., 2011), kun taas pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooissa sekä hepatosellulaarisissa karsinooissa ennuste on päinvastainen (Xu ym., 2011; Guo ym., 2012b). BMP4:n geenimuunnokset ovat altistavana tekijänä kolorektaalisyöväälle (Slattery ym., 2012). Hepatosellulaarissa ja ovariosyövässä on havaittu yhteyksiä potilaan ennusteen ja BMP4 ilmenemistasojen välillä (ks. yleiskatsaus Kallioniemi, 2012). Kuten huomataan BMP4:n ilmeneminen vaihtelee syöpä- ja kudostyyppin mukaan ja voidaan myös päätellä, että BMP4:n toiminta sekä rooli vaihtelevat kasvaimen mukaan. Tämä BMP4:n kaksitahoinen rooli tuo mukanaan haasteita tutkimukselle.

BMP4:n on todettu inhiboivan solukasvua suurimmassa osassa kasvaintyypeistä, mutta myös päinvastaisia tutkimustuloksia on saatu. (ks. yleiskatsaus Kallioniemi, 2012) BMP4:n on havaittu aiheuttavan solukasvun alentumista käsitellyillä soluilla ainakin myeloomissa (Hjertner ym., 2001), basaalisolukarsinooissa (Sneddon ym., 2006) sekä rinnan (Ketolainen ym., 2010; Guo ym., 2012a), vatsanalueen (Shirai ym., 2011), keuhkojen (Buckley ym., 2004) ja haiman (Virtanen ym., 2011) karsinooissa. Melanoomassa (Rothhammer ym., 2005), paksusuolen ja ovarion (Shepherd ym., 2003) syövässä sekä hepatosellulaarisissa karsinooissa (Maegdefrau ym., 2009) ja retinoblastoomasoluissa (Haubold ym., 2010) BMP4 -käsitellyllä ei ole havaittu olevan vaikutusta solukasvuun. Osassa syövästä BMP4:n vaikutus on rajoittunut vain tiettyyn solulinjaan. Prostatakarsinooissa on havaittu, että LNCaP -soluilla BMP4 -lisäys alentaa solukasvua, kun taas muilla tutkimuksissa mukana olleilla solulinjoilla ei ole nähtävissä mitään

muutoksia solukasvussa (Brubaker ym., 2004; Dai ym., 2005; Feeley ym., 2005; Shaw ym., 2010; Lee ym., 2011). Samantapaisia tuloksia on saatu myös virtsarakkosyöpätutkimuksissa (Kim ym., 2004b). Aivoperäisissä syövässä tutkimustulokset vaihtelevat syöpätyypistä riippuen, esimerkiksi meningioomassa BMP4 lisää solukasvua (Johnson ym., 2009) kun taas glioblastoomassa tilanne on päinvastainen (Piccirillo ym., 2006).

Tutkimuksissa on havaittu BMP4:llä olevan myös muita vaikutuksia syövässä. Basaalisolusyöpäsoluissa (Sneddon ym., 2006), glioblastoomissa (Piccirillo ym., 2006), medulloblastoomissa (Zhao ym., 2008) ja paksusuolen syövän kantasoluissa (Lombardo ym., 2011) tehdyissä tutkimuksissa on havaittu BMP4 -käsittelyn liittyvän syöpäsolujen erilaistumiseen. Myelooma (Hjertner ym., 2001; Holien ym., 2012) ja retinoblastooma soluilla (Haubold ym., 2010) on BMP4 -käsittelyn jälkeen todettu lisääntyneitä apoptoosia, kun taas medulloblastooma soluilla apoptoosin on havaittu vähentyneen (Iantosca ym., 1999). BMP4 -käsittelyllä voidaan nostaa pro-apoptoottisen Bax proteiinin ilmenemistasoa ja alentaa anti-apoptoottisten Bcl-2 ja Bcl-xL proteiinien ilmentymistä (Lombardo ym., 2011). Apoptoosiin liittyviä tutkimuksia on kuitenkin tehty vasta muutamilla solulinjoilla ja -tyypeillä, joten tutkimustuloksista ei voida vetää kattavia johtopäätöksiä vielä tällä hetkellä (ks. yleiskatsaus Kallioniemi, 2012).

BMP4 vaikuttaa solukasvun lisäksi solujen liikkumiseen, leviämiseen sekä epiteelimesenkymaalilinjan (EMT) siirtymiseen (ks. yleiskatsaus Kallioniemi, 2012). Kaikki nämä tekijät ovat tärkeässä osassa, kun mietitään syöpäkasvaimen leviämistä sekä metastoitumista. Haimasyöpäsoluilla tehdyissä tutkimuksissa on saatu merkittäviä tuloksia siitä miten BMP4 -käsittely edistää solujen liikkumista, leviämistä sekä EMT-linjan siirtymistä (Hamada ym., 2007; Gordon ym., 2009; Virtanen ym., 2011). Yhteneväisiä tuloksia on saatu myös paksusuolisyöpäsoluilla (Deng ym., 2007; Deng ym. 2009) ja ovariokarsinoomissa (Theriault ym., 2007) sekä Leen ym. (2011) eturauhastutkimuksessa, jossa havaittiin BMP4 -käsittelyn lisäävän tuumorinkasvua sekä syövän leviämistä luuhun lisäten luunmuodostumista. Päinvastaisia tuloksia on saatu heptosellulaarisissa karsinoomissa (Maegdefrau ym., 2009) ja melanoomissa (Rothhammer ym., 2005) estettäessä BMP4:n toiminta. Eturauhassyövässä BMP4:llä ei ole havaittu olevan vaikutusta syöpäsolujen liikkumiseen tai leviämiseen (Dai ym., 2005; Feeley ym., 2005). BMP4:n

vaikutuksista solujen liikkumiseen, leviämiseen ja EMT-linjan siirtymiseen molekyylitasolla ei ole vielä varmaa tutkimustietoa, mutta sen oletetaan liittyvän matriksin metalloproteinaaseihin, kuten MMP-2 (Gordon ym., 2009). BMP4:n vaikutuksia on tarkasteltu myös in vivo – tutkimuksissa ainakin aivo-, rinta-, paksusuoli- ja keuhkosityöpien osalta. Suurimmassa osassa tutkimuksia on havaittu BMP4:n toimivan tuumorisuppressorina, kuten esimerkiksi Ketolainen ym. (2010) havainnot osoittavat, että BMP4 vaimentaa solukasvua niin in vivo kuin in vitro ympäristöissä. Samanaikaisesti kuitenkin BMP4:n on havaittu lisäävän solun liikkumista eli migraatiota, levinneisyyttä eli invaasiota sekä epiteeli-mesenkymaali tason siirtymistä (ks. yleiskatsaus Alarmo ja Kallioniemi, 2010).

BMP4:llä on havaittu lisäksi muitakin rooleja syövän kehittämisessä. Yksi tällainen on angiogeneesi eli verisuonten uudelleenmuodostus. Verisuonten muodostuminen on tärkeä tekijä kasvaimen synnyssä sekä sen leviämisessä (Weis ja Cheresch, 2011). Useissa tutkimuksissa on huomattu BMP4:n edistävän hiirenalkion kantasolujen muuntumista endoteelisoluiksi ja mikrovaskulaaristen endoteelisolujen muodostumista (Rothhammer ym., 2007; Suzuki ym., 2008). Tätä tukee myös Rothhammer ym. (2007) tutkimuksen tulokset melanomasoluilla, joissa vähennetty BMP4 aktiivisuus oli yhteydessä alentuneeseen endoteelisolujen määrään. Myös Maegdefrau ym. (2009) tutkimuksissa havaittiin sama ilmiö heptosellulaarisilla syöpäsoluilla. Kyseisessä tutkimuksessa ihmisen endoteelisolujen kyky suonten muodostamiseen oli alentunut. Lisäksi BMP4:n on havaittu vaikuttavan laskimoiden endoteelin rakenteeseen (Farnsworth ym., 2011). Guon ym. (2012b) tutkimuksessa BMP4 ilmeneminen on liitetty kohonneeseen verisuoni-invaasioon sekä pidemmälle kehittyneeseen syöpäluokitukseen heptosellulaarisissa karsinoomissa. Angiogeneesiin johtavat syyt löytyvät todennäköisesti BMP:n SMAD, ERK ja p38 viestintäreiteiltä. Luultavasti viestintäaktiivisuus johtaa angiogeenitekijän, kuten vaskulaarisen endoteelikasvutekijän VEGF (*engl. Vascular endothelial growth factor*) ilmentymiseen (Guo ym., 2012b).

BMP4 näyttää vaikuttavan kasvuun myös solusyklin kautta. Tutkimuksissa on saatu selville, että BMP4:n annostelu syöpäsoluille saa aikaan senesenssin eli solujen vanhenemisen tai solusyklin pysähtymisen G1-vaiheeseen (Buckley ym., 2004; Brubaker ym., 2004;

Ketolainen ym., 2010; Shirai ym., 2011; Zhou ym., 2011). Solusyklin säätelytekijöiden CCDN1 (Cyclin D1) ilmeneminen vähenee ja kasvurajoiteproteiinien p16 ja / tai p21 ilmeneminen lisääntyy (Brubaker ym., 2004; Su ym., 2009; Shirai ym., 2011). CCDN1 on keskeinen tekijä siirryttäessä solusyklissä G1-vaiheesta S-vaiheeseen (Musgrove ym., 2011). Sykliiniriippuvaisten inhibittoreiden p16 ja p21 aktiivisuuden lisääntyminen estää solusyklin etenemisen (Malumbres ym., 2009).

BMP4:n vaikutusta on tutkittu myös liittyen eri syöpäkasvaimien hoitoon ja havaittu sillä olevan mahdollisesti merkitystä hoidosta saatuun vasteeseen (Su ym., 2009; Laatio ym., 2011; Lombardo ym., 2011). BMP4:n kyky vaimentaa solukasvua on herättänyt tutkijoiden mielenkiinnon sen mahdollisuuksista hoitokeinoksi syöpää vastaan. Samanaikaisesti haittapuolena on kuitenkin solujen liikkumisen lisääntyminen

### 1.3.1 BMP4:n merkitys rintasyövässä

BMP4:n vaikutukset rintasyövässä ovat ristiriitaiset tutkimuksissa saatujen tulosten poiketessa toisistaan. MDA-MB-231 soluilla tehdyistä tutkimuksista kolmessa on havaittu BMP4:n lisäävän solujen liikkumista ja leviämistä (Ampuja ym., 2013; Guo ym., 2012a; Ketolainen ym., 2010), kun taas Shon ym. (2009) ryhmän saamat tulokset MDA--231 soluilla ovat päinvastaiset. Guo ym. (2012a) tutkimuksen tulokset osoittivat myös, että BMP4 ilmentymisen estäminen tai BMP noggin antagonisti johtavat solujen liikkumisen ja leviämisen vähenemiseen MCF7- ja MDA-MB-231 soluilla. Alarmo ja Kallioniemi toteavat katsausartikkelissaan (2010), että vaikka samalla BMP ligandilla samassa kudoksessa tehdyt tutkimustulokset ovatkin antaneet päinvastaisia tuloksia, niin silti näyttää siltä, että BMP:t toimivat syöpäprosessissa sekä estävinä että kiihdyttävinä tekijöinä.

Alarmo ym. (2007) tutkivat BMP2 – BMP8 ligandien ilmenemistä 22 rintasyöpäsolulinjassa, 39 primäärissä rintasyöpäkasvaimessa sekä normaaleissa rintarauhasen epiteelisoluissa ja maitorauhasissa. Tulokset osoittivat, että BMP4:n ja BMP7:n ilmenemistasot olivat korkeimmat tutkituista BMP:stä. BMP4 ekspressoitui 100 %:ssa tuumoreista sekä 95 %:ssa mukana olleista syöpäsolulinjoista, joihin lukeutuivat myös T-47D ja BT-474. Ainoa solulinja jossa BMP4:n ei havaittu ekspressoituvan kyseisessä tutkimuksessa oli HCC1419. Kyseinen tutkimus osoittaa, että BMP4:llä on merkittävä rooli kattavasti eri

rintasyöpälinjoissa. Ketolainen ym. (2010) osoittivat BMP4:n vaikutuksia rintasyöpäsoluissa. Tutkimuksessa selvitettiin BMP4 ilmenemistaso 22 rintasyöpäsolulinjassa sekä normaaleissa maitorauhassoluissa kvantitatiivisella RT-PCR:llä. Tulosten mukaan viidellä rintasyöpäsolulinjalla (HCC1419, UACC3133, MDA-436, HCC1954 ja SK-BR-3) BMP4 ilmenemistaso oli alhaisempi kuin normaalissa maitorauhassolussa. Suurimmat ilmenemistasot tulivat solulinjoilla, T-47D, MDA-453, DU4475, UACC732 ja HCC38, jonka tulos oli moninkertainen muihin verrattuna. Vuonna 2013 Alarmo ym. tutkivat BMP4:n ilmentymistä kliinisissä potilasnäytteissä, mukana oli 486 rintasyöpäpotilaan näytettä, joista puolet oli invasiivista duktaalista karsinoomaa ja puolet invasiivista lobulaarista karsinoomaa. Kyseinen tutkimus tehtiin immunohistokemiallisin värjäyksin ja tulokset osoittivat, että BMP4 ekspressio oli yleisesti ottaen voimakkaampi lobulaarisissa kuin duktaalisisissa karsinoomissa. Tutkimuksessa havaittiin myös, että voimakas BMP4 ekspressio oli yhdistettävissä matalaan proliferaatioon sekä kohonneeseen uusiutumiskirskiin.

Ketolaisen ym. (2010) tutkimuksessa havaittiin, että kaikilla tutkimuksessa mukana olevilla rintasyöpäsolulinjoilla (HCC1419, SK-BR-3, MDA-231, HCC38, HCC1954, MCF-7, MDA-361, T-47D ja ZR-75-30) BMP4 aiheutti merkitsevän solukasvun alenemisen viimeistään kuuden vuorokauden kuluttua käsittelystä. T-47D solulinjassa kasvun aleneminen oli dramaattisin ja se oli nähtävissä jo 12 tunnin kuluttua käsittelystä. Ketolainen ym. (2010) tutkivat myös syitä solukasvun alenemiselle kyseisillä rintasyöpälinjoilla. Apoptoottisten solujen määrässä ei ollut nähtävissä merkittävää eroa BMP4 käsiteltyjen ja käsittelemättömän kontrolliryhmän välillä. Solusyklin pysähtymisessä G1 –vaiheeseen havaittiin merkitsevät erot BMP4 käsitellyillä soluilla verrattuna kontrolliin. Kyseisen tutkimuksen perusteella voidaan ajatella, että BMP4 vaikutukset solukasvua alentavasti rintasyövässä johtuvat enemmän solusyklin pysähtymisestä G1-vaiheeseen, kuin apoptoosin lisääntymisestä. Ampuja ym. (2013) havaitsivat tutkimuksessaan, että BMP4:n solusyklin pysäyttämisen taustalla on kohonnut solusyklin estäjän p21 ilmenemistaso.

Ketolainen ym. (2010) tutkivat BMP4:n vaikutuksia solujen liikkumiseen jo mainituilla yhdeksällä solulinjalla. Solujen liikkuminen oli lisääntynyt dramaattisesti HCC1954, MDA-

321 ja MDA-361 soluilla jo kolmen päivän kuluttua BMP4 käsittelystä. T-47D soluilla solujen liikkumisen havaittiin vähentyneen ja loppuilla solulinjoilla BMP4 käsittelyillä ei havaittu olevan vaikutusta solujen liikkumiseen. Solujen leviämisen havaittiin lisääntyneen HCC1954 ja MDA-231 soluilla, kun taas MDA-361 ja T-47D soluilla ei saatu aikaiseksi johdonmukaisia tuloksia levinneisyyteen liittyen. Montesanon ym. (2007) tutkimustulokset tukevat myös BMP4:n aikaansaamaa solujen leviämisen lisääntymistä normaaleilla rintarauhasen epiteelisoluilla sekä lisäksi kyseisessä tutkimuksissa havaittiin BMP4:n aiheuttavan rakennemuutoksia rintarauhasen epiteelissä. Solujen liikkumisen ja leviämisen ollaan ajateltu johtuvan EMT:n käynnistymisestä, mutta Ketolaisen ym. (2010) tutkimuksessa epiteeli ja mesenkymaalimarkkerien (E-cadherin, Vimentin) ekspressiossa ei havaittu muutoksia. BMP4 käsittelyllä on havaittu olevan vaikutusta SMAD-viestintäreitillä (Ketolainen ym., 2010). SMAD1/5/8 fosforyloituivat sekä SMAD 4 ekspressoituu kaikilla tutkituilla, aiemmin mainituilla rintasyöpäsolulinjoilla BMP4 käsittelyn jälkeen, ERK1/2 ja p38:ssa ei havaittu fosforyloitumista. Tämä osoittaa, että BMP4 vaikuttaa läpi koko BMP:den käyttämän SMAD-viestintäreitit. BMP4:n vaimentaminen siRNAn avulla T-47D soluilla sai aikaan BMP4 ekspressiotason merkittävän lisääntymisen sekä solukasvun lisääntymisen kontrolliin verrattuna (Ketolainen ym., 2010). Tämä tukee BMP4:n merkittävää roolia rintasyöpäsolujen kasvussa. BMP4:n rooli rintasyövässä on joka tapauksessa kiistatta ristiriitainen ja sen toiminta on riippuvainen solulinjasta.

Rintasyövillä on todettu olevan taipumusta luumetastaaseihin (Alarmo ja Kallioniemi, 2010). Yhtenä mahdollisena tekijänä voi olla luun sialoproteiinin (BSP *engl, bone sialoprotein*) määrän lisääntyminen preosteoblasteissa (Bunyaratavej ym., 2000). BSP:t osallistuvat uudisluun muodostumiseen ja Bunyaratavej ym. (2000) ovat havainneet niiden ilmenemismäärän kohonneen rintasyöpäsoluissa. Toinen mahdollinen tekijä voi olla RUNX2, joka on BMP:n tunnettu kohdegeeni ja jota tarvitaan luiden osteolyyttisten metastaasien muodostumiseen rintasyövässä (Barnes ym., 2004; Javed ym., 2005; Schwaninger ym., 2007). BMP7:n yli-ilmenemisen on havaittu laskevan merkittävästi luumetastaasien määrää rintasyöpä *in vivo*-tutkimuksessa (Buijs ym. 2007a). Katsunon ym. (2008) tehdyssä vastaavassa tutkimusasetelmassa taas havaittiin, että aktiivinen BMP viestintä lisää invaasiota ja luumetastaaseja. Samaan tulokseen on päädytty myös Alarmon ym. (2008) tutkimuksessa, jossa havaittiin BMP7 olevan yhteydessä lisääntyneeseen

luumetastaasien muodostumiseen. Tutkimuksia tarvitaan joka tapauksessa lisää, jotta päästään selville BMP4:n vaikutusmekanismeista ja saadaan selvitettyä sen mahdollisuudet rintasyövän hoitoon liityen.

### 1.3.2 BMP4:n kohdegeenit

BMP4:n kohdegeenejä on tutkittu useissa tutkimuksissa monilla eri solutyypeillä. Eniten tutkimuksia on tehty Id-ryhmän geneillä, jonka vuoksi ne ovat parhaiten tunnetut BMP4:n kohdegeenit (Davis ym., 2008; Miyazono ym. 2010). Nishanian ym. (2004) tutkimuksessa tutkittiin geenien ekspressiotasoa 24 tuntia BMP4 -käsittelyn jälkeen ihmisen erilaistumattomilla syöpäsoluilla. Tulokseksi saatiin yli 1300 eri geeniä, joista noin 70 %:lla ilmenemistaso oli kohonnut. Pidemmällä BMP4 käsittelyajalla saadaan geenien määrää todennäköisesti lisättyä. Deng ym. (2009) tutkimuksessa saatiin microarray menetelmällä tunnistettua 91 eri BMP:itä säätelevää geeniä, joista 65 tehtävänä on voimistaa ja 26 vaimentaa BMP4 ilmenemistä. Kyseisessä tutkimuksessa ilmitulleista geneistä kuusi oli jo aiemmin yhdistetty BMP viestintäreittiin. Kohdegeenien luokitus määritettiin sen mukaan minkälaiseen biologiseen toimintaan ne liittyivät, kuten metabolia, adheesio, solun tukiranka, viestintä, kuljetus, proliferaatio, apoptoosi sekä transkriptionaalinen säätely (Deng ym., 2009). Kattavimmat tutkimukset on tehty rintasyöpäsoluilla. Ahmed ym. (2011) on tutkinut BMP4 käsittelyn vaikutuksia seitsemällä eri syöpäsolulinjalla kuudessa eri aikapisteessä. Kyseisessä tutkimuksessa löydettiin 1 678 eri geeniä, jotka sisälsivät jo aiemmin tunnettuja BMP4 kohdegeenejä sekä uusia ehdokkaita. Rodriguez-Martinez ym. (2011) tutkimuksessa tutkittiin BMP4 ja BMP7 kohdegeenejä seitsemällä eri rintasyöpäsolulinjalla, kuudessa eri aikapisteessä käyttäen microarray-menetelmää. Tulokseksi saatiin BMP4:lle 2 421 eri yliekspressoitunutta geeniä, joista eniten yliekspressoituneita olivat PTPRG (*engl. Protein tyrosine phosphatase, receptor type, G*), C12orf42, DUSP2 (*engl. Dual specificity phosphatase 2*), GNRHR (*engl. Gonadotropin-releasing hormone receptor*), APOC2 (*engl. Apolipoprotein C-II*) sekä ID1, ID 2, ID3 ja ID4 (*engl. Inhibitor of DNA binding 1 – 4*). Monet BMP:den kohdegeeneistä ovat samoja, jotka osallistuvat BMP:n SMAD viestintäreittiin, kuten I-SMAD:t (Alarmo ja Kallioniemi, 2010; Ampuja ym. 2017). Joidenkin kohdegeenien tiedetään osallistuvan luun muodostumiseen ja kehittymiseen, kuten transkriptiotekijät Inhibitor of differentiation (Id), Runx2, MFH-1, Vent2, Msx2 ja Dlx5 (Canalis ym., 2003).

ID-proteiinit (*engl. Inhibitor of DNA binding*) ovat keskeisiä tekijöitä BMP viestinnässä (Miyazono ym., 2002). ID- proteiinit ovat helix-loop-helix transkriptiotekijöitä, joilta puuttuu DNA:ta sitova domeeni. ID-proteiinit sitoutuvat joka paikassa ilmentyviin E - proteiiniperheen jäseniin estäen niiden sitoutumisen kohde DNA:han. (Lasorella ym., 2001; Forrest ym., 2004; Yang ym., 2013). Tämän ominaisuuden vuoksi ID-proteiineilla on keskeinen tehtävä geenien ilmenemisen säätelemisessä ja sitä kautta solujen erilaistumisessa sekä lisääntymisessä (Norton JD., 2000; Sikder ym., 2003). Tähän mennessä on löydetty neljä ID-perheenjäsentä nisäkkäillä, ID1 – 4. ID-perheen jäsenet eivät ole keskenään samanlaisia vaan ne koodaavat omia erillisiä geenejä ja ilmentävät eri proteiinirakennetta (Yang ym., 2013). Näiden erojen johdosta myös niiden toiminnalliset tehtävät eroavat toisistaan. ID2:n on havaittu ilmenevän laajasti immuunisoluissa (Ji ym., 2008; Yang ym., 2011). Yang ym. (2008) ovat tutkineet BMPR2 mutaation vaikutuksia ID- geenien ilmenemiseen keuhkovaltimoiden sileälihassoluissa (PASMC *engl, pulmonary artery smooth muscle cell*). He ovat osoittaneet, että ID1 ja ID2 ovat osallisia BMP4:n aiheuttamaan PASMC kasvun alenemiseen He huomasivat, että mutaatio BMPR2:ssa tai BMPR2:n hiljentäminen aikaansai BMP4 stimuloitujen ID1 ja ID2 geenien transkription heikentymisen. ID1 geenin hiljentymisen havaittiin estävän osittain BMP4:n antiproliferatiivisia vaikutuksia tutkittavissa soluissa. Useat ID – perheeseen kuuluvat DNA:han sitoutumisen estäjät ovat tunnettu BMP4 kohdegeeniryhmä (Hollnagel ym., 1999). ID1 – ID4 geenien on todettu olevan merkittävässä osassa rintakudoksen normaalissa sekä kasvainbiologiassa. (kts. yleiskatsaus de Candia ym., 2004). ID1 ja ID3 -geenien korkeita ilmenemistasoja on havaittu kasvaimen infiltroimien verisuonten endoteelisoluissa, ja hiirimallilla tehdyssä tutkimuksessa on huomattu, että rintasyövän uudisverisuonimuodostus on puutteellista, kun ID1 ja ID3 geenien ilmeneminen on häiriintynyt (kts. yleiskatsaus de Candia ym., 2004). ID2:n taas tiedetään olevan tärkeässä roolissa rinnan erilaistumisessa sekä imetyksessä, kun taas ID4 säätelee BRCA1:n ilmenemistä (kts. yleiskatsaus de Candia ym., 2004).

SKIL eli SKI like proto-onkogeeni (*engl. SKI like proto-oncogene*) tunnetaan myös nimillä: SNO, SnoA, SnoI ja SnoN. Se havaittiin ensimmäisen kerran lintujen Sloan-Kettering viruksen yhteydessä (Zhang ym. 2003). SKIL ja SnoN ovat erittäin homologiset proteiinit sekä rakenteeltaan että toiminnaltaan. SKIL/SnoN geeni koodaa proteiinia, joka on osa



SMAD viestintäreittiä. Kyseinen proteiini säätelee solukasvua sekä erilaistumista TGF- $\beta$ :n kautta. SKIL:n koodaama SKI -like proteiini estää TGF- $\beta$  viestinnän sitoutumalla sekä hajottamalla heteromeerisen SMAD kompleksin (Stroschein ym. 1999). SKIL/SnoN:a tavataan sekä sytoplasmassa että tumassa. On ajateltu, että sytoplasmainen SKIL/SnoN voisi estää vuorovaikutuksen Smad2/3:n ja Smad4:n välillä ja näin estää viestinnän tumaan. Tumassa taas SKIL/SnoN voi suoraan häiritä Smad-kompleksia (Zhang ym. 2003). Sytoplasmisella SKIL/SnoN:lla saattaa olla muitakin kuin Smad-viestintäreittiin liittyviä tehtäviä. SKIL/SnoN:n on havaittu indusoivan transformaatiota kanan alkion fibroplasteissa sekä lihasten erilaistumista viiriäisen alkion soluissa. Hiiritutkimukset ovat myös osoittaneet, että nämä proteiinit toimisivat myös tuumorisuppressoreina (Shinagawa ym. 2000). SKIL/SnoN:n yli-ilmenemisen on havaittu voivan johtaa solujen kasvuhäiriöön joidenkin TGF- $\beta$ - indusoitujen signaalien häviämisen johdosta. Tämä on mahdollinen mekanismi SKIL/SnoN onkogeneesin taustalla (Zhang ym. 2003). SKIL/SnoN säätelyllä voidaan olettaa olevan tärkeä rooli TGF- $\beta$  -aktiivisuuden kontrolloinnissa. Zhang ym. (2003) havaitsivat, että SKIL/SnoN esiintyi tutkituissa rintasyöpäkarsinoomissa, niin tumissa kuin sytoplasmassa vaihtelevin tasoin. Tutkimuksessa huomattiin, että SKIL/SnoN:n sytoplasmainen sijainti oli merkittävästi tiheampi duktaalisisissa karsinoomissa ja sen havaittiin myös korreloivan huonompaa ennustetta. Kun taas SKIL/SnoN sijoittumisen tumiin havaittiin viittavaan lobulaariseen karsinoomaan ja matalampaan tuumoriluokitukseen. Zhangin ym. (2003) tutkimuksessa todettiin myös, että SKIL/SnoN:n matala ilmenemistaso osassa rintasyövissä, kuten ER positiivisessa syövässä korreloi parempaa ennustetta, jolloin voidaan ajatella, että TGF- $\beta$  -viestinnän negatiivisen säätelijän puuttuminen on hyödyllistä rintasyövästä selviytymistä ajatellen.

## 2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Aiempien tutkimusten perusteella on havaittu, että BMP4 hidastaa rintasyöpäsolujen kasvua ja lisää migraatiota ja invaasiota. Aiempien tutkimusten perusteella on myös saatu selville BMP4:n kohdegeenejä, joiden voidaan olettaa olevan osallisia BMP4:n aiheuttamiin fenotyyppihin. Näiden kohdegeenien joukosta on valittu SKIL ja ID2 -geenit tarkemmin tutkittavaksi.

Tässä työssä on tarkoitus selvittää kahta rintasyöpäsolulinjaa käyttäen ovatko kohdegeenit SKIL ja ID2 osallisina BMP4:n aiheuttamaan rintasyöpäsolujen kasvun alentumaan. Rintasyöpäsolulinjoiksi valittiin T-47D ja BT-474, jotka reagoivat merkittävästi BMP4 stimulaatioon. Työ toteutetaan hiljentämällä SKIL ja ID2 –geenit RNA interferenssin avulla ja tutkimalla vaikutusta rintasyöpäsolujen kasvuun.

### 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

#### 3.1. Solulinjat ja viljely

Työssä käytettiin kahta rintasyöpäsolulinjaa, T-47D ja BT-474. Molemmat solulinjat on hankittu American Type Culture Collectionista (ATCC, Manassas, VA, USA). Soluja kasvatettiin +37 °C:ssa 5 % CO<sub>2</sub> -pitoisuudessa koko työn ajan. T-47D soluja kasvatettiin elatusaineessa, joka sisälsi RPMI 1640 -kasvatusliuosta (Roswell Park Memorial Institute), 10 % FBS (Fetal Bovine Serum), 2 mM glutamiinia, 4,5 mg/ml glukoosia, 0,01 M HEPES, 1,5 mg/ml natriumbikarbonaattia, 1 mM natriumpyruvaattia, 100 IU/ml insuliinia (Protaphane® Penfill, Novo Nordisk, Bagsværd, Tanska), 100 yksikköä/ml penisiliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. BT-474 soluja kasvatettiin elatusaineessa, joka sisälsi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) –kasvatusliuosta, 10 % FBS, 2 mM glutamiinia, 1 mM natriumpyruvaattia, 100 yksikköä/ml penisiliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. Insuliinia lukuunottamatta kaikki elatusaineiden komponentit hankittiin Sigma-Aldrichilta (St.Louis, MO, USA).

Soluja kasvatettiin viljelypulloissa, mutta varsinainen työ toteutettiin 24 -kuoppalevyillä. Kuopille jaettavaa solumäärää haarukoitiin BT-474 solujen kohdalla työn alkuvaiheessa ja saatujen tulosten perusteella päädyttiin solumäärään 70 000 solua/kuoppa. Aikaisempien tulosten perusteella T-47D soluilla käytettiin 30 000 solua/kuoppa. Mediumin määrä oli transfektiovaiheessa 600 µl/kuoppa ja muissa vaiheissa 500 µl/kuoppa. Tutkimuksissa käytettiin aina kuutta rinnakkaista näytettä ja jokainen koe toistettiin vähintään kaksi kertaa.

#### 3.2 BMP4-käsittely

BT-474 ja T-47D soluille tehtiin samanlaiset BMP4-käsittelyt kokeiden aikana. Transfektiovaiheessa kuopissa oleville soluille tehtiin joko BMP4 - tai kuljetinkäsittely

(vehikkeli). BMP4-käsittelyssä kasvatusliuokseen lisättiin 100 ng/ml ihmisen rekombinantti BMP4:ää eli Bone Morphogenetic Protein 4 recombinant human (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) joka oli liuotettu 4 nM HCl:ää ja 0,1 % naudan seerumin albumiinia eli BSA:ta (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) sisältävään kuljetinliuokseen. Kontrollisoluille lisättiin pelkästään rekombinanttiproteiinin kuljetinainetta. BMP4- tai kuljetinkäsittely uusittiin kolmen päivän kuluttua transfektiosta seitsemäntenä päivänä laskettaville soluille elatusaineen vaihdon yhteydessä.

### 3.3 Geenien hiljentämiseen käytetyt siRNA:t

Geenien hiljentämiseen käytettiin kolmea eri siRNA:a. ID2 ja SKIL geenien hiljentämiseen käytettiin ON-TARGETplus Smart pool 5 nmol ID2 ja SKIL siRNA:a (Dharmacon™). Mahdollista transfektiosta johtuvaa ekspressiotason muutosta kontrolloitiin hiljentämällä lusiferaasigeeni siLUCn (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) avulla. ID2 ja SKIL siRNA:t sisälsivät neljä eri sekvenssipätkää ja lusiferaasikontrolli yhden (Taulukko 1). ID2 ja SKIL siRNA:t liuotettiin RNAasi vapaaseen veteen valmistajan ohjeiden mukaisesti niin, että loppukonsentraatioksi saatiin 100 µM. Työssä käytettävät siRNA konsentraatiot laimennettiin 100 µM kantaliuoksesta ensin 1:10 laimennokseksi ja siitä sitten lopulliseksi konsentraatioksi kuopan tilavuus huomioon ottaen. Työssä käytetyt konsentraatiot vaihtelivat 10 nM:sta 40 nM:iin.

**Taulukko 1: siRNA sekvenssit. ID2, SKIL ja LUC siRNA:n sekvenssit (Dharmacon™)**

siRNA	Sekvenssi
<b>ID2</b>	GCACUGUGUGGCUGAAUAA
<b>ID2</b>	CGAUGAGCCUGCUAUACAA
<b>ID2</b>	GGACUCGCAUCCCACUAUU
<b>ID2</b>	CGUGAGGUCCGUUAGGAAA
<b>SKIL</b>	GAAUGAACAUGCUCAAAGA
<b>SKIL</b>	GCAAGUAAGUCCAUAUCAA
<b>SKIL</b>	GGGCAUACUCCAUAUCAA
<b>SKIL</b>	GGAAUUACAGUCAUGGUAAU
<b>LUC</b>	GCCATTCTATCCTCTAGAGGATG

### 3.4 Transfektio

Transfektiossa solujen sisälle viedään erityisen transfektioagenssin avulla pieni tutkittavaa geeniä häiritsevä ja sen hiljentävä siRNA (*engl. Small interfering RNA*). Ennen transfektiota soluille vaihdettiin tuore elatusaine (500 µl), johon oli lisätty BMP4 (100 ng/ml) tai kuljetin. SKIL transfektiota varten kyseisille soluille vaihdettiin seerumiton elatusaine, joka oli normaali elatusaine ilman 10 % FBS:a. Näille soluille lisättiin FBS (50 µl /kuoppa) kolmen tunnin päästä transfektioista. ID2 transfektio toteutettiin normaalissa elatusaineessa oleville soluille. Transfektiossa käytettiin 1nM INTERFERin® (Polyplus-transfection, Illkirch, Ranska) -agenssia siRNA:n kuljettamisessa solun sisälle. Transfektiossa tarvittavan siRNA:n määrä laskettiin kuoppaa kohden huomioiden kuopassa olevan mediumin kokonaismäärä (600 µl) ja halutun siRNA:n konsentraatio. Näiden perusteella laskettiin transfektiooliukseen tarvittavat reagenssimäärät, esimerkiksi siRNA konsentraatiolla 20 nM käytettiin tilavuuksia 1,2 µl siRNA + 95,8 µl elatusaine (seerumiton) + 3 µl interferiiniä, jolloin transfektiooliuksen määräksi saatiin 100 µl/kuoppa. Interferiinin määrä (3 µl) pidettiin vakiona kaikissa transfektioissa. Transfektiossa siRNA ja seerumiton, kyseiselle solulinjalle soveltuva elatusaine yhdistettiin ja sekoitettiin hyvin, seokseen lisättiin interferiini. Seosta vorteksoitiin 10 sekunnin ajan, jonka jälkeen inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen transfektiooliusta lisättiin kuopille 100 µl/kuoppa 30 minuutin sisällä inkubointiajan päättymisestä. Transfektioinnin jälkeen soluja kasvatettiin normaaliolosuhteissa 72h ilman toimenpiteitä, jonka jälkeen suoritettiin funktionaaliset kokeet.

### 3.5 qRT-PCR

Geenien hiljentämisen onnistuminen varmennettiin kvantitatiivisen, käänteiskopioijaentsyymiin perustuvan polymeerasiketjureaktion, qRT-PCR:n (*engl. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) avulla. qRT-PCR:ssä lähtömateriaalina toimii RNA tai mRNA (*engl. messenger-RNA*). RNA käännetään komplementaariseksi DNA:ksi, cDNA, käänteiskopioijaentsyymien avulla. Käännetty cDNA vastaa tutkittavaa geeniä ja toimii templaattina polymeerasiketjureaktiossa. Polymeerasiketjureaktiossa eli PCR:ssä on kolme vaihetta: denaturaatiovaiheessa korkean lämpötilan avulla saadaan DNA:n kaksoisjuoste aukeamaan ja juosteet irroitettua toisistaan. Alukkeiden kiinnittymisvaiheessa (*engl. annealing*) lämpötilaa laskemalla saadaan spesifit

alukkeet kiinnittymään niille komplementaarisiin kohtiin DNA -juosteessa. Spesifit alukkeet kiinnittyvät DNA:n vastinnauhoihin, halutun tutkittavan geenialueen molempiin päihin, näin saadaan monistettua vain tietty alue DNA:sta. Alukkeiden kiinnittymisen jälkeen tapahtuu varsinainen monistumisvaihe, jossa sykli sykliltä monistettavan DNA:n määrä kasvaa eksponentiaalisesti.

qRT-PCR:ää varten soluista eristettiin RNA 72h kuluttua transfektiosta. Solut kerättiin käyttäen kahden eri valmistajan lyysauspuskureita, RLT (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) ja RA1 (Macherey-Nagel GmbH & co, Düren, Germany). Lyysauspuskuriin lisättiin joko  $\beta$ -merkaptotetanolia tai 1 M DTT (ditiotreitoli) 3,5  $\mu$ l/350  $\mu$ l. Keräyksen jälkeen soluista eristettiin RNA Qiagenin RNeasy Minikit:llä (Qiagen GmbH) tai NucleoSpin® RNA kitillä (Macherey\_Nagel GmbH & co), valmistajien ohjeiden mukaan. Eristetty RNA käännettiin cDNA:ksi Super Script®III -kitillä (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). SuperScript®III -kitin ohjeiden mukainen inkubointiohjelma toteutettiin PTC-200 Peltier Thermal Cycler-laitteella (MJ Research Inc., Quebec, Kanada).

Käännetyt komplementaariset DNA:t (cDNA) laimennettiin RNA konsentraatiosta riippuen 1:2 – 1:10 steriilillä vedellä. Laimennetuista cDNA näytteistä ajettiin qRT-PCR Light Cycler 2.0 -laitteella (Roche, Basel, Sveitsi) ja Light Cycler Software 4.05-ohjelmistolla (Roche, Basel, Sveitsi). qRT-PCR näytteet valmistettiin Light Cycler TaqMan Master-kittiä (Roche, Basel, Sveitsi) käyttäen, valmistajan ohjeiden mukaisesti. qRT-PCR ajo ajettiin spesifisten alukkeiden avulla. ID2 ja SKIL -alukkeina käytettiin Sigman (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA) 100  $\mu$ m alukkeita, joita käytettiin konsentraatiossa 20  $\mu$ M. ID2 -alukkeiden sekvenssit olivat reverse 5'-AAAGAAATCATGAACACCGCTTA ja forward 5'-ATATCAGCATCCTGTCCTTGC. SKIL alukkeiden sekvenssit olivat reverse 5'-CTTGCCTATCGGCCTCAG ja forward 5'-GAGGCTGAATATGCAGGACAG. Koettimina työssä käytettiin Universal Probe Libraryn koettimia (Roche, Basel, Sveitsi). ID2:lle käytettiin Universal Probe Libraryn koetinta viisi, SKIL:lle koetinta kolmetoista. qRT-PCR-ohjelma alkoi denaturaatiovaiheella 10 min 95 °C. Varsinainen monistumisvaihe eli amplifikaatiovaihe koostui 45 syklistä. Yhden syklin sisältämät vaiheet olivat 10 sek 95 °C, 30 sek 60 °C ja 1 sek 72 °C. Viimeisen sekunnin aikana ohjelma mittasi sykliarvon ennen uuden syklin alkua. qRT-PCR-ohjelma päättyi 45 syklin jälkeen viilennysvaiheeseen 30 sek 40 °C. qRT-PCR ajo tehtiin aluksi kahdella rinnakkaisella näytteellä, mutta tulosten

vastatessa hyvin toisiaan rinnakkaisesta näytteestä luovuttiin. Jokainen näyte ajettiin tutkittavan geenin lisäksi housekeeping -geenillä. Tässä työssä käytettiin kahta eri Universal Probe Libraryn (Roche, Basel, Sveitsi) housekeeping geeniä. Toinen oli glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi eli GAPD (20  $\mu$ M konsentraatiossa) ja toinen oli hypoksantiini fosforibosyyli transferaasi eli HPRT (20  $\mu$ M konsentraatiossa). GAPD:lle sekä HPRT:lle käytettiin spesifejä Universal Probe Libraryn koettimia (Roche). Housekeeping -geenin avulla näytteestä saatiin määritettyä niiden geenien ekspressiotaso, jotka ekspressoituvat jokaisessa solussa vakiotasolla lähes koko ajan. Saatu housekeeping -geenin ekspressiotaso vähennettiin tutkittavan geenin tuloksesta, jolloin saadusta arvosta voitiin laskea ID2 ja SKIL -geenien ekspressiotaso. qRT-PCR:stä tulokseksi saadut sykliarvot eli Cq-arvot (*engl. Quantification cycle*) analysoitiin Microsoft Office Excel- ohjelmalla. Geenien ekspressiotaso on laskettu sykliarvojen perusteella kaavalla  $\Delta\Delta Cq \cdot 100$ .  $\Delta\Delta Cq$  ekspressio saatiin kaavalla  $BMP4 \Delta Cq$  jaettuna kuljettimen  $\Delta Cq$  ekspressiolla, jossa  $\Delta Cq$  tarkoittaa kohdegeenin Cq arvoa, josta on vähennetty housekeeping geenin Cq ja tästä saadusta Cq-arvosta on laskettu ekspressio  $2^{-\Delta Cq}$ . P-arvot on laskettu Mann-Whitney testillä GraphPad Prism -ohjelmalla (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

### 3.6 Funktionaaliset määriykset

Työssä haluttiin selvittää ID2:n ja SKIL:n mahdollisia vaikutuksia valittujen rintasyöpäsolujen funktionaaliin piirteisiin, mikä tässä tutkimuksessa tarkoitti kyseisten geenien vaikutusta solukasvuun. Solukasvu määritettiin laskemalla todelliset solumäärät kuopasta kolmantena ja kuudentena päivänä transfektiosta lukien. Solujen laskemista varten solut trypsinointiin 400  $\mu$ l/kuoppa +37 °C, kunnes solut olivat irronneet kuopista. Trypsinointi pysäytettiin kyseisen solulinjan elatusaineella (400  $\mu$ l/kuoppa). Solulaskuihin otettiin kuopasta 400  $\mu$ l yksisolususpensiota, joka lisättiin Coulter Isoton III Diluent – elektrolyyttiluokseen (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) suhteessa 1:20. Solut laskettiin Beckman Coulter Z1 Coulter® Particle Counter –solulaskurilla (Beckman Coulter). Solulaskuriin asetettiin laimennoskerroin, joka korjasi solumäärän vastaamaan solumäärää millilitrassa. Solut laskettiin kahteen kertaan laskentavirheiden välttämiseksi. Tulosten analysointivaiheessa solulaskujen tulokset korjattiin vastaamaan kuopalla olevaa todellista solumäärää kertomalla laskurin antama tulos 0.8:lla.

## 4 TULOKSET

Aiempien tutkimusten perusteella (Ketolainen ym., 2010; Rodriguez-Martinez ym., 2011) on havaittu, että BMP4:n lisääminen soluille vähentää solukasvua useissa rintasyöpälinjoissa. On huomattu, että varsinkin solulinjat BT-474 ja T-47D (Ketolainen ym., 2010; Ampuja ym. 2013) reagoivat erityisen voimakkaalla kasvunlaskulla BMP4 -käsittelyyn. Tässä työssä oli tarkoituksena tutkia tarkemmin Ampuja ym. (2017) tutkimuksissa selville saamien BMP4 kohdegeenien, SKIL ja ID2, mahdollista osallisuutta BMP4:n aiheuttamaan kasvunalentumaan.

### 4.1 RNAseq tulosten varmistaminen qRT-PCR:llä

Ampujan ym. (2017) tutkimukset osoittavat, että BMP4:n lisääminen soluille lisää SKIL ja ID2 -geenien ilmentymistä. Kyseisessä tutkimuksessa SKIL ja ID2 -geenien lisääntynyt ekspressiotaso on havaittu RNA sekvenssaatio menetelmällä. Tässä työssä haluttiin varmistaa, että aiemmin saadut RNA sekvenssaatiotulokset ovat toistettavissa qRT-PCR-menetelmällä. Tulosten toistettavuuden varmistamiseksi qRT-PCR toteutettiin käyttämällä ryhmässä aiemmin kerättyjä BT-474 ja T-47D soluja ja niistä eristettyjä RNA-näytteitä. BT-474 solut oli käsitelty BMP4:llä sekä kuljettimella ja kerätty neljän, kahdentoista ja kahdenkymmenen tunnin kuluttua käsittelystä. qRT-PCR:n avulla määritettiin vaikuttaako BMP4:n lisäys SKIL ja ID2 -geenien ekspressiotasoon soluissa (Taulukko 2). Tuloksen oikeellisuuden varmistamiseksi testi toistettiin BT-474 soluilla aikapisteistä kolme, kuusi ja kaksikymmentäneljä tuntia. Samat määritykset toistettiin T-47D solulinjan soluilla, jotka oli kerätty aikapisteistä kolme, kuusi ja kaksikymmentäneljä tuntia. Kolmen tunnin käsittelyn tulokset osoittavat BMP4-käsittelyn nostavan SKIL -geenin ekspressiotason molemmilla solulinjoilla noin kolminkertaiseksi kontrolliin verrattuna. SKIL -geenin ekspressiotaso on vielä 24 tunnin kohdalla vähintään puolitoistakertainen. ID2 -geenin ekspressiotaso on BT-474 soluilla 1,8 – 7,6 kertainen BMP4-käsitellyissä soluissa kontrolliin verrattuna. Vastaavat lukemat T-47D solulinjalla olivat 2,1 – 6,4 kertaiset verrattuna kuljetinkäsiteltyihin soluihin.

**Taulukko 2 SKIL ja ID2 -geenien ekspressiotasot.** SKIL ja ID2 -geenien ilmentymistaso BMP4-käsitellyillä BT-474 ja T-47D soluilla verrattuna kontrollin ilmentymistasoon aikapisteissä 3-24 tuntia.

---

**Solulinja    Geeni    Ekspressiotaso kontrolliin verrattuna eri aikapisteissä**

		3 t	4 t	6 t	12 t	24 t
<b>BT-474</b>	SKIL	3,2	8,9	3,2	2,8	2,9 / 4,5
	ID2	2,3	7,3	1,8	7,6	2,8
<b>T-47D</b>	SKIL	2,8		1,6		1,5
	ID2	2,1		3,5		6,4

## 4.2 SKIL

### 4.2.1 Funktionaaliset määritykset

Kohdegeenien vaikutusta BMP4:n aiheuttamaan kasvunalentumaan tutkittiin funktionaalisten määritysten avulla. BT-474 ja T-47D soluihin transfektoitiin SKIL-geenin hiljentävä siRNA, aiemmin hyväksi todettua 20 nM konsentraatiota käyttäen ja kontrollina toimi lusiferaasigeenin hiljentävä siRNA. Funktionaaliset määritykset toteutettiin laskemalla todelliset solumäärät kuoppaa kohden solulaskurilla.

Ennen solumäärien laskemista varmistettiin jokaisen eksperimentin yhteydessä SKIL -geenin hiljentymisen onnistuminen qRT-PCR:lla. qRT-PCR määritystä varten soluista kerättiin RNA 72 tunnin kuluttua transfektiosta. qRT-PCR:llä saatujen sykliarvojen perusteella laskettiin kyseisen geenin hiljentymisprosentti. Hiljentymisprosenttia laskettaessa solussa olevien muiden geenien ekspressiotaso eliminoitiin ajossa mukana olevan housekeeping -geenin avulla. Jäljelle jäävästä arvosta laskettiin  $\Delta\Delta Cq$  ekspressioarvo, joka kerrottiin sadalla hiljentymisprosentin selvittämiseksi. Hiljentymisen katsottiin onnistuneen, kun jäljellä oleva ekspressiotaso oli  $< 30\%$ . qRT-PCR -tulosten (Taulukko 3) mukaan hiljentymisprosentti BMP4 -käsitellyillä BT-474 soluilla oli 5,3 – 16,2 % ja kuljetinkäsitellyillä soluilla 5,2 – 17 %.

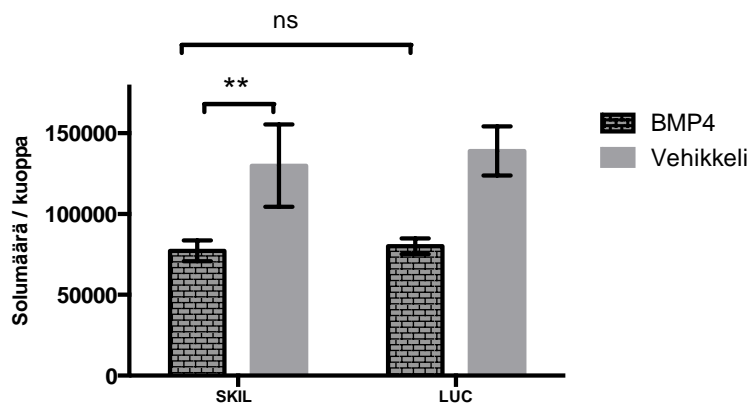
**Taulukko 3 SKIL- geenin hiljentyminen BT-474 ja T-47D soluilla.** SKIL -geenin hiljentyminen BMP4- ja kuljetinkäsitellyillä BT-474 ja T-47D -rintasyöpäsoluilla sekä ei käsitellyillä T-47D soluilla siRNA konsentraatiolla 20 nM. Hiljentymisprosentti on laskettu kaavalla  $\Delta\Delta Cq \times 100$ . Hiljentymisprosentti kuvaa solussa jäljellä olevaa SKIL -geenin ekspressiotasoa 72 tunnin kuluttua transfektiosta.

Solulinja	siRNA konsentraatio	Käsittely	Hiljentymisprosentti $\Delta\Delta Cq \times 100$
<b>BT-474</b>	20nM	BMP4	5,3 - 16,2
		kuljetin	5,2 – 17
<b>T-47D</b>	20nM	BMP4	59
		kuljetin	33



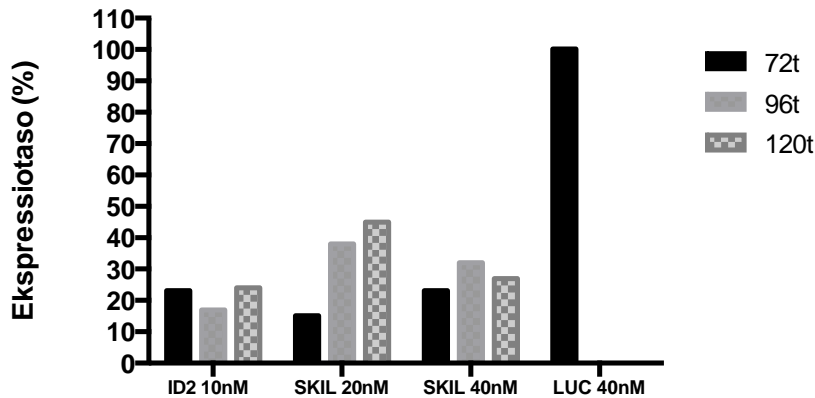
T-47D	20nM	Ei käsittelyä, 48t	27
		Ei käsittelyä, 72t	34

Kuopissa oleva solumäärä laskettiin solulaskurilla kolmen ja kuuden päivän kuluttua transfektiosta ja saatua tulosta verrattiin lusiferaasikontrollilla transfektoitujen kuoppien solumääriin. Solumäärät kuopissa kolmen päivän kuluttua transfektiosta eivät olleet oleellisesti muuttuneet alkutilanteesta, joten tutkimuksissa päädyttiin tarkastelemaan pelkästään kuudennen päivän solulaskuista saatuja tuloksia (Kaavio 1). BMP4 –käsittelyillä soluilla solumäärä jää alle 85 000 solua/kuoppa riippumatta siitä onko kyseisistä soluista hiljennetty SKIL- vai lusiferaasigeeni. Ilman BMP4 käsittelyä solumäärä on 130 000 - 140 000 solua/kuoppa hiljentämisestä riippumatta. BMP4-käsittelyn vaikutus solujen kasvuun on tilastollisesti merkitsevä  $p = 0,0022$ . SKIL -geenin vaikutus solukasvuun BT-474 soluilla jäi tilastollisesti merkityksettömäksi  $p = > 0,05$  kummallakin käsittelyllä.



**Kaavio 1 SKIL –geeni ei vaikuta BT-474 rintasyöpäsolujen kasvuun.** BT-474 rintasyöpäsolujen todellinen lukumäärä kuoppaa kohden kuuden päivän kuluttua transfektiosta. BMP4 –käsittelyjen solujen määrä on merkitsevästi alhaisempi kuin kuljetinkäsittelyjen (vehikkeli) solujen määrä  $p = 0,0022$  (\*\*). SKIL –geenin hiljentäminen ei vaikuta tilastollisesti merkitsevästi solumäärään kummallakaan käsittelyllä  $p = > 0,05$  (ns, engl. Non-significant). Määritykset tehtiin Beckman Coulter Z1 Coulter® Particle Counter –solulaskurilla (Beckman Coulter).

BT-474 solulinjalla saatujen tulosten perusteella samat käsittelyt toteutettiin T-47D soluilla. Ensimmäiset geenin hiljentymistä osoittavat hiljentämisprosentit olivat BMP4 –käsittelyillä soluilla 59 % ja kuljetinkäsittelyillä 33 % (Taulukko 3). Tulokset jäivät ennalta määritetyn onnistumisprosentin (< 30 %) yläpuolelle. Tulosten perusteella päädyttiin testaamaan SKIL siRNA:n toimivuutta T-47D soluilla eri konsentraatioin kolmessa eri aikapisteessä (Kaavio 2). Transfektion onnistumisen kontrolloimiseksi mukaan otettiin jo toimivaksi havaittu ID2 –geenin hiljentävä siRNA.



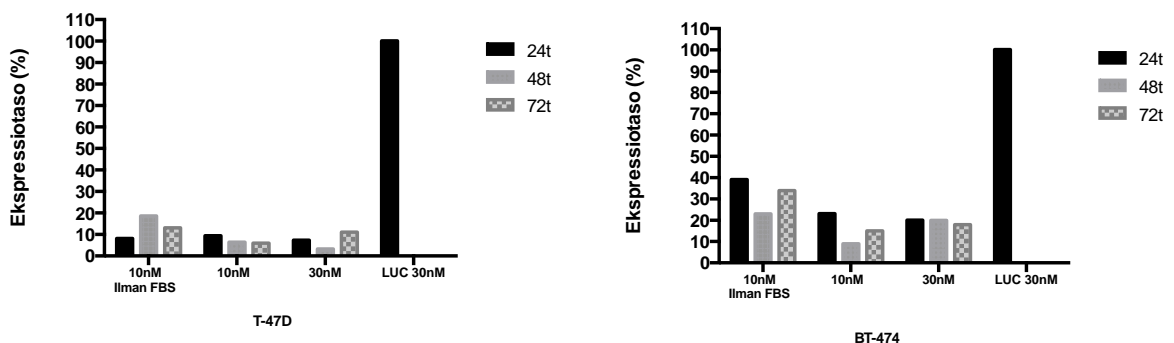
**Kaavio 2 SKIL ja ID2 geenien ekspressiotasot hiljentämisen jälkeen.** SKIL –geenin ekspressiotaso T-47D rintasyöpäsoluilla, siRNA konsentraatioilla 20nM ja 40 nM, määritettynä kolmessa eri aikapisteessä. Hiljentämisen onnistumisen varmistamiseksi määrittelyssä on käytetty mukana lusiferaasikontrollia (LUC), jonka ekspressiotasoksi on asetettu 100% sekä aiemmin onnistuneen tuloksen antanutta ID2 –geeniä.

SiRNA:n toimivuutta testattaessa saadut SKIL –geenin hiljentymisprosentit olivat 15 – 45 % välillä, painottuen > 23 % lukemiin, kun ID2 –geenin hiljentymisprosentit olivat 17 – 24 %. Tulosten epätasaisuuden ja korkeiden jäljellä olevien ekspressiotasojen perusteella päädyttiin jättämään SKIL –geenin tutkiminen T-47D –soluilla tähän.

## 4.3 ID2

### 4.3.1 siRNA toimivuuden testaaminen

ID2 geenin hiljentävästä siRNA:sta ei ollut ryhmässä aiempia tuloksia, joten ennen siRNA:n käyttöä tuli selvittää siRNA:n toimivuus, oikea konsentraatio sekä seerumin vaikutus siRNA:n toimivuuteen molemmilla solulinjoilla. Toimivuus testattiin konsentraatioilla 10 nM (ilman 10 % FBS ja sen kanssa) ja 30 nM, T-47D ja BT-474 soluilla, aikapisteissä 24, 48 ja 72 tuntia. (Kaavio 3).



**Kaavio 3 siRNA-konsentraatiot 10 nM ja 30 nM**

**hiljentävät ID2:n ilmentymisen T-47D ja BT-474 soluilla.** ID2 –geenin hiljentäminen testattiin 10 nM ja 30 nM siRNA konsentraatioilla kolmessa eri aikapisteessä T-47D ja BT-474 rintasyöpäsoluilla. Kontrollina

käytettiin lusiferaasigeenin (LUC) hiljentävää siRNAa konsentraatiolla 30nM. Lusiferaasikontrollin ekspressiotaso asetettiin 100 %:iin.

Hiljentymisprosentti laskettiin kuten edellä SKIL -geenin kohdalla. T-47D soluissa hiljentämisen jälkeen jäljellä oleva ID2 -geenin ekspressiotaso oli 3,3 – 18,6 % verrattuna lusiferaasikontrolliin (Kaavio 3). BT-474 soluissa vastaava ekspressiotaso ID-geenillä oli 9 – 39 % (Kaavio 3). T-47D soluilla ID2 – geenin hiljentyminen on nähtävissä jo 24 tunnin kohdalla, kun taas BT-474 soluilla riittävä hiljentyminen saavutetaan vasta 48 tunnin kohdalla. Molemmilla solulinjoilla vaste säilyy aina 72 tuntiin asti. ID2-geeni hiljentyi hieman paremmin soluissa, joiden kasvatusliuokseen oli lisätty 10 % FBS. Saatujen tulosten perusteella aloitettiin varsinaiset määritykset siRNA -konsentraatiolla 10nM ja lisäämällä siRNA soluille, joilla oli FBS:a sisältävää kasvatusliuosta.

#### 4.3.2 Funktionaaliset määritykset

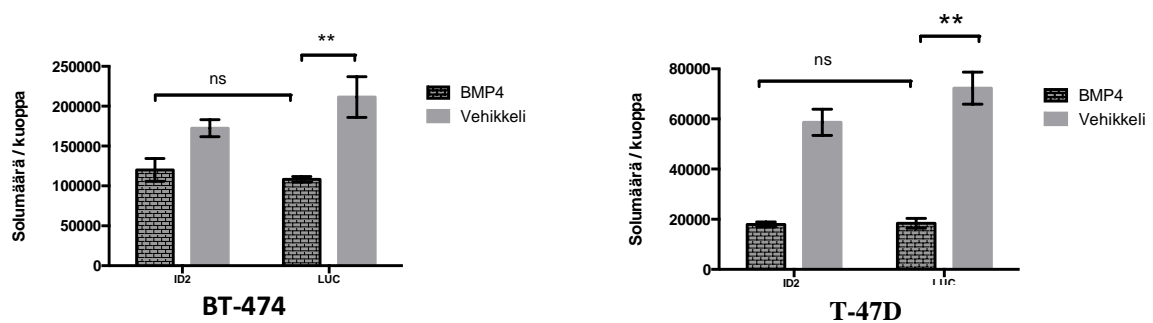
Funktionaaliset määritykset toteutettiin, kuten SKIL -geenillä, käyttäen 10 nM siRNA konsentraatiota ja FBS:ää sisältävää kasvatusliuosta. ID2-geenin hiljentyminen onnistuminen varmistettiin qRT-PCR-menetelmällä (Taulukko 4). BT-474 soluilla ID2 -geenin jäljellä oleva ilmentymistaso oli BMP4 käsitellyillä soluilla 3 – 6 % ja kuljetinkäsitellyillä 31 – 55 %. BMP4 käsitellyillä T-47D soluilla jäljellä oleva ilmentymistaso oli 26 – 30 % ja kuljetinkäsitellyillä 53 – 73 %. Koe toistettiin molemmilla solulinjoilla kaksi kertaa kuudella rinnakkaisella näytteellä.

**Taulukko 4 ID2- geenin hiljentyminen BT-474 ja T-47D soluilla.** ID2 –geeni hiljennettiin 10 nM siRNA:lla BMP4- ja kuljetinkäsitellyissä BT-474 ja T-47D –rintasyöpäsoluissa. Hiljentymisprosentti määritettiin qRT-PCR:illä saaduista sykliarvoista. Hiljentymisprosentti kuvaa solussa jäljellä olevaa ID2 –geenin ekspressiotasoa kolmesta eri eksperimentistä laskettuna 72 tunnin kuluttua transfektiosta.

Solulinja	Käsittely	Hiljentymisprosentti
<b>BT-474</b>	BMP4	3 – 6
	kuljetin	31 – 55
<b>T-47D</b>	BMP4	26 – 30
	kuljetin	53 – 73

Kolme päivää transfektiosta kuoppien solumäärät eivät olleet oleellisesti muuttuneet alkutilanteesta. Näiden havaintojen perusteella päädyttiin tarkastelemaan pelkästään kuudennen päivän kohdalla tehtyjä solulaskuja (Kaavio 4). Kuuden päivän kuluttua

transfektiosta BMP4 –käsiteltyjen BT-474 solujen solumäärä oli noin 110 000 – 120 000 solua/kuoppa sekä ID2 – tai lusiferaasihiljennetyillä soluilla. Kuljetinkäsitellyillä BT-474 soluilla vastaavat lukemat olivat noin 1,5 -kertaiset (172 000 – 211 000 solua/kuoppa). BT-474 soluilla BMP4:n aikaansaama solukasvun alentuminen oli tilastollisesti merkitsevä  $p = 0,0022$ . T-47D soluilla BMP4-käsiteltyjen ID2- tai lusiferaasihiljennettyjen solujen lukumäärä oli noin 18 000 solua/kuoppa. Vehikkelikäsiteltyjen solujen vastaavat lukemat olivat jopa nelinkertaiset (noin 58 000 – 72 000 solua/kuoppa). T-47D soluilla BMP4:n vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä  $p = 0,0022$ . ID2 – geenin vaikutus solukasvuun molemmilla solulinjoilla sekä käsittelyillä jäi tilastollisesti merkityksettömäksi  $p = > 0,05$ .



**Kaavio 4 ID2 –geeni ei vaikuta solukasvuun BT-474 ja T-47D rintasyöpäsoluilla.** BT-474 ja T-47D rintasyöpäsolujen todellinen lukumäärä kuoppaa kohden laskettiin kuuden päivän kuluttua transfektiosta. Kaaviossa on nähtävissä yhden eksperimentin tulos. Työ toistettiin samansuuntaisin tuloksin. BMP4 – käsiteltyjen solujen määrä/kuoppa (tumma pylväs) oli merkittävästi alhaisempi kuin kuljetinkäsiteltyjen (vehikkeli) solujen määrä/kuoppa (vaalea pylväs)  $p = 0,0022$  (\*\*). ID2 geenin vaikutus solukasvuun jäi tilastollisesti merkityksettömäksi  $p = > 0,05$  (ns, engl. Non-significant). Määritykset tehtiin Beckman Coulter Z1 Coulter® Particle Counter –solulaskurilla (Beckman Coulter).

## 5 TULOSTEN TARKASTELO

Aiemmin tehdyssä tutkimuksessa (Ampuja ym., 2017) on havaittu BMP4 – käsittelyn nostavan ID2 ja SKIL -geenien ekspressiotasoa rintasyöpäsoluissa. Tässä työssä saatujen tulosten mukaan ID2 ja SKIL -geenien ekspressiotaso oli 2,1 - 3,2 kertainen kontrolliin verrattuna jo kolmen tunnin BMP4-käsittelyn jälkeen. Vielä 24 tunnin jälkeen ekspressiotason havaittiin olevan ID2 -geenillä 2,8 – 6,4 kertainen ja SKIL - geenillä 1,5 – 4,5 kertainen kontrolliin verrattuna. Saadut tulokset ovat siis samansuuntaiset aiemmin saatujen tutkimustulosten kanssa.

Tutkimusasetelmassa määritettiin etukäteen, että transfektion katsottiin onnistuneen jos tutkittavan geenin hiljentyminenprosentti oli alle 30 %. Hiljentyminenprosentilla tarkoitetaan

solussa jäljellä olevaa tutkittavan geenin ekspressiotasoa verrattuna normaalitilanteeseen. Päinvastoin ajateltuna onnistuneeksi transfektioksi katsottiin tilanteet, joissa yli 70 % geeniekspressiosta saatiin hiljennettyä. ID2 -geenin hiljentämiseen käytetyn siRNAn toimivuus testattiin ennen varsinaisia määrittämiä. SiRNAn havaittiin toimivan T-47D soluilla erinomaisesti, hiljentymisprosentin ollessa alle 19 % aikapisteestä riippumatta. BT-474 solujen kohdalla ID2:n hiljentymisprosentti ei ollut niin alhainen kuin T-47D soluilla. Aikapisteiden väleillä oli nähtävissä selkeää eroa, parhaimmat hiljentymisprosentit saatiin 48 tunnin kuluttua transfektiosta. ID2:n hiljentyminen oli kuitenkin selkeästi havaittavissa vielä 72 tunnin kuluttua transfektiosta ja tätä aikapistettä päädyttiin käyttämään myös varsinaisissa töissä.

Saadut tulokset osoittavat, että SKIL ja ID2 -geenit hiljentyvät erinomaisesti BMP4 käsitellyissä BT-474 soluissa. Kuljetinkäsitellyissä BT-474 soluissa SKIL – geenin hiljentyminen on onnistunut, mutta ID2 – geenin osalla hiljentymisprosentti jää toivotun 30 %:n yläpuolelle. Tuloksista voidaan päätellä transfektion onnistuneen erinomaisesti SKIL – geenin kohdalla BT-474 rintasyöpäsoluilla riippumatta käsittelystä. ID2- geenin kohdalta voidaan todeta, että transfektio on onnistunut BMP4-käsitellyissä soluissa, mutta kuljetinkäsitellyissä soluissa transfektio ei ole jostain syystä onnistunut. T-47D soluilla SKIL -geenin ekspressiotaso hiljentyi alle puolet ensimmäisissä testeissä BMP4-käsitellyillä soluilla ja kuljetinkäsitellyillä soluilla noin kaksi kolmasosaa. Saatujen tulosten pohjalta päädyttiin vielä testaamaan SKIL siRNAn toimivuutta tarkemmin T-47D solulinjassa. Näiden testien tulokset olivat samaa luokkaa ensimmäisten tulosten kanssa. Hiljentymisprosentin jäädessä lähelle 30 %:n rajaa tai jopa korkeammaksi sekä tulosten epätasaisuuden perusteella voidaan päätellä, ettei SKIL-geeni hiljene T-47D soluissa ja tämän tuloksen perusteella päätettiin, että SKIL -geenin tutkiminen T-47D solulinjalla jätettiin tämän työn ulkopuolelle. T-47D solulinjalla ID2 – geenin hiljentyminen oli huomattavasti tehottomampaa, kuin BT-474 soluilla riippumatta siitä oliko soluja käsitelty BMP4:llä vai ei. ID2 -geenin hiljentymisprosentti oli BMP4 -käsitellyillä T-47D -soluilla  $\leq$  30 %, joten hiljentymisen voidaan sanoa onnistuneen. Kuljetinkäsitellyillä T-47D soluilla ID2 -geenin hiljentäminen ei onnistunut, kuten ei BT-474 soluillakaan.

Varsinaiset funktionaalisten määritysten tulokset saatiin laskemalla solujen todellinen määrä kuopissa kuudennen päivän kohdalla transfektoinnista. Tuloksista on selkeästi nähtävissä BMP4 -käsittelyn vaikutus solukasvuun molemmilla rintasyöpäsolulinjoilla. Ilmiö on sama mikä on toistunut monissa aiemmissa tutkimuksissa, kuten Ketolaisen ym. (2010) tutkimuksessa, T-47D rintasyöpäsoluilla, Ampujan ym. (2013) tutkimuksessa, BT-474 rintasyöpäsoluilla sekä Guon ym. (2012a) tutkimuksessa MDA-MB-231 soluilla. BMP4:n efekti ei ollut selkeästi nähtävissä vielä kolmen päivän kuluttua transfektiosta ja käsittelyn aloittamisesta, mutta kuuden päivän kohdalla ero oli selkeä. Tämä on linjassa Ketolaisen ym. (2010) tutkimuksen kanssa, jossa havaittiin myös, että BMP4:n aikaansaama efekti solukasvussa oli nähtävissä viimeistään kuuden päivän kuluttua transfektiosta. Funktionaalisista määrityksistä voitiin havaita, että molemmilla rintasyöpälinjoilla solujen määrä kuopalla kolmen päivän kuluttua transfektiosta oli alhaisempi sekä BMP4- että kuljetinkäsittelyissä soluissa, kuin kuopille laitettu solumäärä tutkimuksen ensimmäisenä päivänä. Tästä voidaan päätellä, että solut kärsivät transfektiosta ja niiden toipuminen kyseisestä käsittelystä kestää yli kolme päivää. Tästä havainnosta johtuen tulosten tarkastelussa on keskitytty tuloksiin, jotka on saatu kuuden päivän kuluttua transfektiosta. Tuloksista voidaan nähdä, että kuuden päivän kuluttua transfektiosta solujen jakautuminen oli ollut voimakkainta niillä soluilla, joihin oli transfektoitu kuljetin sekä LUC-kontrolli. Solut, joihin oli kuljettimen lisäksi transfektoitu SKIL tai ID2 siRNA olivat jakautuneet hieman heikommin kuin kontrollisolut, mutta kuitenkin selvästi voimakkaammin kuin BMP4 -käsittelyt solut. SKIL geenin kohdalla BMP4 -käsittelyt solut ovat jakautuneet hieman heikommin silloin, kun solut on transfektoitu SKIL siRNalla verrattuna kontrollina käytettyyn siLUCiin. ID2 siRNalla transfektoiduilla BMP4 käsittelyillä soluilla saatiin päinvastaiset tulokset SKIL tuloksiin nähden, solujen jakautuminen oli hieman voimakkaampaa soluilla joihin oli transfektoitu siID2 kuin siLUC. Solumäärien välinen ero oli kuitenkin niin pieni, ettei sitä voida pitää merkitsevänä, sillä rinnakkaisissa kuopissa olevien solumäärien hajonnat menevät päällekkäin verrattessa siID2 ja siLUC tuloksia toisiinsa.

Tuloksista nähdään, että BMP4- käsittely on vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi solukasvuun riippumatta siitä, onko kyseisistä soluista hiljennetty tutkittava geeni vai kontrollina käytetty luciferaasigeeni. SKIL- tai ID2 -geenin hiljentämisen ei nähdä

vaikuttaneen solukasvuun vaan solukasvun alenemisen voidaan päätellä aiempiin tutkimuksiin perustuen (Alarmo ym., 2007; Ketolainen ym., 2009; Guo ym. 2012a) johtuvan BMP4:n vaikutuksesta. BMP4:n solukasvua hillitsevä vaikutus tekee siitä mielenkiintoisen kohteen syöpähoitojen kehittämistä ajatellen. Samalla pitää kuitenkin huomioda BMP4:n vaikutukset lisätä solujen liikkumista, lisääntymistä sekä EMT-siirtymistä. Tästä kaksitahoisesta toiminnastaan johtuen sen soveltuvuus varteenotettavaksi vaihtoehdoksi syöpähoidoissa on ristiriitainen. Nykytietämyksen lisäksi tarvitaan lisää tietoa molekyyli-tason tapahtumista solujen kasvunalentamisen ja liikkumisen lisäämisen taustalla, jotta voidaan kehittää kohdennettuja hoitoja jokaiselle fenotyypille. Kallioniemi on yleiskatsauksessaan (2012) todennut, että yksi mahdollisuus tämän saavuttamiseksi voisi olla BMP4 kohdegeenien identifioiminen syöpäkuudoksilla.

Tämän työn tarkoituksena oli selvittää onko BMP4:n kahdella kohdegeenillä SKIL tai ID2 osallisuutta BMP4:n aiheuttamaan kasvun alentumaan. Tutkimuksessa saatujen tulosten perusteella SKIL -geenin hiljentäminen onnistui hyvin kaikissa BT-474 solulinjalla tehdyissä töissä. Funktionaalisten määritysten tuloksista voidaan kuitenkin havaita, että niillä soluilla missä SKIL -geeni oli hiljennetty, solukasvu oli samanlaista kuin soluilla, joihin oli laitettu lusiferaasi kontrolli. Tästä voidaan päätellä, ettei SKIL -geenin hiljentäminen vaikuttanut kumoavasti BMP4:n aiheuttamaan solukasvun laskuun BT-474 soluilla. ID2 -geenin kohdalla voidaan todeta sama efekti kuin SKIL -geenillä, funktionaalisissa määrittelyissä ei ole havaittavissa merkittävää eroa solumäärissä verrattuna siihen onko ID2 -geeni hiljennetty vai ei. ID2 -geenin hiljentämisprosentit osoittavat, että kyseisen geenin hiljentyminen on onnistunut samalla tavalla kummssakin tutkitussa solulinjassa. Mielenkiintoinen havainto on, että BMP4 -käsittelyillä soluilla ID2 -geenin jäljelläoleva ekspressiotaso oli tutkittavasta rintasyöpäsolulinjasta riippumatta huomattavasti matalampi kuin kuljetinkäsittelyillä soluilla. Kuljetinkäsitteltyjen solujen huonompi hiljentymisprosentti verrattuna BMP4 käsittelyihin soluihin ei ole selitettävissä tämän työn perusteella. Tämä herättää kuitenkin kysymyksiä. Miksi muilla siRNalla, kuten siSKIL ei ole havaittavissa samaa efektiä, vaan hiljentymisprosentit ovat yhtenevät molemmilla käsittelyillä. Sitoutuuko ID2 geenin hiljentävä siRNA esimerkiksi kuljettimessa olevan BSA:n kanssa? Edistääkö BMP4 jollain tavalla siRNAn viemistä solun sisälle ja

sitoutumista oikeaan paikkaan? Mielenkiintoista olisi myös pohtia miksi SKIL siRNA tarvitsee toimiakseen seerumittoman transfektio-olosuhteen, mutta ID2 ei?

Työssä saatujen tulosten perusteella voidaan vetää johtopäätös, ettei kumpikaan tutkimuksen alla olleista BMP4:n kohdegeeneistä SKIL tai ID2 ole ainakaan yksin vastuussa BMP4:n aiheuttamasta kasvun alentumisesta. Ei voida kuitenkaan sulkea pois etteikö jompi kumpi tai molemmat geenit voisi olla osallisia kasvun alentamiseen yhdessä toisen tai jopa useiden muiden geenien kanssa. Voikin olla todennäköistä ettei kyseinen efekti ole ollenkaan yhden geenin aiheuttama vaan usean geenin yhteistyötä. Aihetta olisikin mielenkiintoista tutkia tulevaisuudessa toisesta näkökulmasta. Olisi mielenkiintoista hiljentää solusta yhdellä kertaa useampi kohdegeeni transfektoimalla samaan soluun samalla kertaa useamman geenin siRNA:t. Jos tällaisella useampien geenien siRNA kombinaatiolla saisi kumottua BMP4:n aiheuttaman ilmiön, niin sen jälkeen voisi pudottaa yksi kerrallaan genejä pois tästä kombinaatiosta ja katsoa saako jonkun geenin poispudottaminen merkittäviä kasvumuutoksia aikaiseksi. Jatkotutkimuksia mietittäessä on myös hyvä pitää mielessä, että useat aiheesta tehdyt tutkimukset, niin *in vivo* kuin *in vitro*, on toteutettu yhdellä tai kahdella solulinjalla. Kuten tästäkin tutkimuksesta voidaan huomata, niin eri solulinjojen välillä on eroavaisuuksia, eikä yhdellä solulinjalla tai kudoksella saaduista tutkimustuloksista tule mennä vetämään suurempia johtopäätöksiä BMP:den vaikutuksista. Osa tuloksista saattaa aiheutua ihan solulinja- tai kudosspesifisyydestä. Ketolaisen ym. (2009) tutkimus antaa kuitenkin viitteitä siitä, että BMP4:n vaikutukset ovat samantyyppiset riippumatta siitä onko tutkimuksen kohteena tietystä syöpätyypistä otettu kasvainkudos vai solulinja. Kyseinen tulos antaa hyvät lähtökohdat sille, että solulinjoilla saadut tulokset BMP:den vaikutuksista ovat hyvin suurella todennäköisyydellä samansuuntaiset myös itse kudoksessa, mikä helpottaa tutkimustulosten suhteuttamisessa ihmiselimistöön.



## 6 LÄHDELUETTELO

Acevedo C., C. Amaya ja J-L. López-Guerra. 2014. Rare breast tumors: Review of the literature. *Rep Pract Oncol Radiother.* 19: 267-74.

Ahmed MI., AN. Mardaryev, CJ. Lewis, AA. Sharov ja NV Botchkareva. 2011. MicroRNA-21 is an important downstream component of BMP signaling in epidermal keratinocytes. *J Cell Sci.* 124:3399-404.

Alarmo EL., T. Kuukasjärvi, R. Karhu ja A. Kallioniemi. 2007. A comprehensive expression survey of bone morphogenetic proteins in breast cancer highlights the importance of BMP4 and BMP7. *Breast Cancer Research and Treatment.* 103:239–46.

Alarmo EL., T. Korhonen, T. Kuukasjärvi, H. Huhtala, K. Holli ja A. Kallioniemi. 2008. Bone morphogenetic protein 7 expression associates with bone metastasis in breast carcinomas. *Ann Oncol.* 19:308-14.

Alarmo EL. ja A. Kallioniemi. 2010. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis? *Endocr Relat Cancer.* 17:R123-R139.

Alarmo EL., H. Huhtala, T. Korhonen, L. Pylkkänen, K. Holli, T. Kuukasjärvi, S. Parkkila ja A. Kallioniemi. 2013. Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Modern Pathology.* 26:10-21.

Ampuja M., R. Jokimäki, K. Juuti-Uusitalo, A. Rodriguez-Martinez, EL. Alarmo ja A. Kallioniemi. 2013. BMP4 inhibits the proliferation of breast cancer cells and induces an MMP-dependent migratory phenotype in MDA-MB-231 cells in 3D environment. *BMC Cancer* 13:429.

Ampuja M., T. Rantapero, A. Rodriguez-Martinez, M. Palmroth, EL. Alarmo, M. Nykter ja A. Kallioniemi. 2017. Integrated RNA-seq and Dnase-seq analyses identify phenotype-specific BMP4 signaling in breast cancer. *BMC Genomics.* 18:68.

Aoki H., M. Fujii, T. Imamura, K. Yagi, K. Takehara, M. Kato ja K. Miyazono. 2001. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *Journal of Cell Science.* 114:1483–9.

Attisano L. ja E. Labbe. 2004. TGFb and Wnt pathway cross-talk. *Cancer Metastasis Reviews.* 23:53–61.

Barnes GL., KE. Hebert, M. Kamal, A. Javed, TA. Einhorn, JB. Lian, GS. Stein ja LC. Gerstenfeld. 2004. Fidelity of Runx2 activity in breast cancer cells is required for the generation of metastases-associated osteolytic disease. *Cancer Research.* 64:4506–13.

Botchkarev VA. 2003. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *Journal of Investigative Dermatology.* 120:36–47.

Bragdon, B., O. Moseychuk, S. Saldanha, D. King, J. Julian ja A. Nohe. 2011. Bone morphogenetic proteins: A critical review. *Cellular Signalling.* 23:609-20.

Brubaker KD., E. Corey, LG. Brown, RL. Vessella. 2004. Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem.* 91:151-60.

von Bubnoff A., K.W.Y. Cho. 2001. Intracellular BMP Signaling Regulation in Vertebrates: Pathway or Network?. *Developmental Biology.* 239:1-14.

- Buckley S., W. Shi, B. Driscoll, A. Ferrario, K. Anderson ja D. Warburton. 2004. BMP4 signaling induces senescence and modulates the oncogenic phenotype of A549 lung adenocarcinoma cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286:L81-L86.
- Buijs JT., NV. Henriquez, PG. van Overveld, G. van der Horst, I. Que, R. Schwaninger, C. Rentsch, P. ten Dijke, AM. Cleton-Jansen, K. Driouch, R. Lidereau, R. Bachelier, S. Vukicevic, P. Clézardin, SE. Papapoulos, MG. Cecchini, CW. Löwik ja G. van der Pluijm. 2007a. Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer Research.* 67:8742–51.
- Buijs JT., CA. Rentsch, G. van der Horst, PG. van Overveld, A. Wetterwald, R. Schwaninger, NV. Henriquez, P. ten Dijke, F. Borovecki, R. Markwalder, GN. Thalmann, SE. Papapoulos, RCM. Pelger, S. Vukicevic, MG. Cecchini, CW. Löwik ja G. van der Pluijm. 2007b. BMP7, a putative regulator of epithelial homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *American Journal of Pathology.* 171:1047–57.
- Bunyaratavej P., TG. Hullinger ja MJ. Somerman. 2000. Bone morphogenetic proteins secreted by breast cancer cells upregulate bone sialoprotein expression in preosteoblast cells. *Experimental Cell Research.* 260:324–33.
- Canalis E., AN. Economides ja E. Gazzo. 2003. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews.* 24:218–35.
- The Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 490:61-70.
- de Candia P., R. Benera ja DB. Solit. 2004. A role for ID proteins in mammary gland physiology and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 92:81-94.
- Cheng KH., JF. Ponte ja S. Thiagalingam. 2004. Elucidation of epigenetic inactivation of SMAD8 in cancer using targeted expressed gene display. *Cancer Research.* 64:1639-46.
- Chiu CY., KK. Kuo, TL. Kuo, KT. Lee ja KH. Cheng. 2012. The activation of MEK/ERK signaling pathway by bone morphogenetic protein 4 to increase hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *Mol Cancer Res.* 10:415-27.
- Cho KW., JY. Kim, SJ. Song, E. Farrell, MC. Eblaghie, HJ. Kim, C. Tickle ja HS. Jung. 2006 Molecular interactions between Tbx3 and Bmp4 and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development. *PNAS.* 103:16788–93.
- Chow E. ja F. Macrae. 2005. A review of juvenile polyposis syndrome. *J. Gastroenterol Hepatol.* 20:1634-40.
- Dai J., J. Keller, J. Zhang, Y. Lu, Z. Yao ja ET. Keller. 2005. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res.* 65:8274-85.
- Davies SR., G. Watkins, A. Douglas-Jones, RE. Mansel ja WG. Jiang. 2008. Bone morphogenetic proteins 1 to 7 in human breast cancer, expression pattern and clinical / prognostic relevance. *J Exp Ther Oncol.* 7:327-38.
- Davis BN., AC. Hilyard, G. Lagna ja A. Hata. 2008. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature.* 454:56-61.
- de Caestecker M. 2004. The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 15:1–11.
- Deng H., R. Makizumi, TS. Ravikumar, H. Dong, W. Yang ja WL. Yang. 2007. Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp Cell Res.* 313:1033-44.

- Deng H., TS. Ravikumar ja WL. Yang. 2009. Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 281:220-31.
- Derynck R., RJ. Akhurst ja A. Balmain. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet.* 29:117-29.
- Farnsworth RH., T. Karnezis, R. Shayan, M. Matsumoto, CJ. Nowell, MG. Achen ja SA. Stacker. 2011. A role for bone morphogenetic protein-4 in lymph node vascular remodeling and primary tumor growth. *Cancer Res.* 71:6547-57.
- Feeley BT., SC. Gamradt, WK. Hsu, N. Liu, L. Krenek, P. Robbins, J. Huard ja JR. Lieberman. 2005. Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res.* 20:2189-99.
- Feng XH. ja R. Derynck. 2005. Specificity and versatility in *tgf-b* signaling through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 21:659-93.
- Forrest S. ja C. McNamara. 2004. Id family of transcription factors and vascular lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:2014-20.
- Giacomini D., M. Páez-Pereda, M. Theodoropoulou, M. Labeur, D. Refojo, J. Gerez, A. Chervin, S. Berner, M. Losa, M. Buchfelder, U. Renner, GK. Stalla ja E. Arzt. 2006. Bone morphogenetic protein-4 inhibits corticotroph tumor cells: involvement in the retinoic acid inhibitory action. *Endocrinology.* 147:247-56.
- Goldhirsch A., EP. Winer, AS. Coates, RD. Gelber, M. Piccart-Gebhart, B. Thürlimann ja HJ. Senn. 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology.* 24:2206-23.
- Gordon KJ., KC. Kirkbride, T. How ja GC. Blobe. 2009. Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2. *Carcinogenesis.* 30:238-48.
- Guo D., J. Huang ja J. Gong. 2012a. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer. *Mol Cell Biochem.* 363:179-90.
- Guo X., L. Xiong, L. Zou ja J. Zhao. 2012b. Upregulation of bone morphogenetic protein 4 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 18:635-40.
- Hamada S., K. Satoh, M. Hirota, K. Kimura, A. Kanno, A. Masamune ja T. Shimosegawa. 2007. Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line. *J Cell Physiol.* 213:768-74.
- Harradine KA. ja RJ. Akhurst. 2006. Mutations of TGFb signaling molecules in human disease. *Annals of Medicine.* 38 403-14.
- Hata A., J. Seoane, G. Lagna, E. Montalvo, A. Hemmati-Brivanlou ja J. Massague. 2000. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell.* 100:229-40.
- Haubold M., A. Weise ja H. Stephan. 2010. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling in retinoblastoma cells. *Int J Biol Sci.* 6:700-15.
- Helms MW., J. Packeisen, C. August, B. Schittek, W. Boecker, BH. Brandt ja H. Buerger. 2005. First evidence supporting a potential role for the BMP/SMAD pathway in the progression of oestrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of Pathology.* 206:366-76.
- Herpin A. ja C. Cunningham. 2007. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *FEBS Journal.* 274:2977-85.

- Hjertner O., H. Hjorth-Hansen, M. Børset, C. Seidel, A. Waage ja A. Sundan. 2001. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood*. 97:516-22.
- Hogan BL. 1996a. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes and Development*. 10:1580-94.
- Hogan BL. 1996b. Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics & Development*. 6:432-8.
- Holien T., TK. Våtsveen, H. Hella, C. Rampa, G. Brede, LA. Grøseth, M. Rekvig, M. Børset, T. Standal, A. Waage ja A. Sundan. 2012. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. *Leukemia*. 26:1073-80.
- Hollnagel A., V. Oehlmann, J. Heymer, U. Ruther ja A. Nordheim. 1999. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 274:19833-45.
- Iantosca MR., CE. McPherson, SY. Ho ja GD Maxwell. 1999. Bone morphogenetic proteins-2 and -4 attenuate apoptosis in a cerebellar primitive neuroectodermal tumor cell line. *J Neurosci Res*. 56:248-58.
- Javed A., GL. Barnes, J. Pratap, T. Antkowiak, LC. Gerstenfeld, AJ. van Wijnen, JL. Stein, JB. Lian ja GS. Stein. 2005. Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *PNAS*. 102:1454-9.
- Ji M., HJ. Li, HC. Suh, KD. Klarmann, Y. Yokota ja JR. Keller. 2008. Id2 intrinsically regulates lymphoid and erythroid development via interaction with different target proteins. *Blood*. 112:1068-77.
- Jin EJ., SY. Lee, YA. Choi, JC. Jung, OS. Bang ja SS. Kang. 2006. BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway. *Molecules and Cells*. 22:353-9
- Johnson MD., MJ. O'Connell, F. Vitoja W. Pilcher. 2009. Bone morphogenetic protein 4 and its receptors are expressed in the leptomeninges and meningiomas and signal via the Smad pathway. *J Neuropathol Exp Neurol*. 68:1177-83.
- Kallioniemi A. 2012. Bone morphogenetic protein 4 – a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genetics*. 205:267-77.
- Katsuno Y., A. Hanyu, H. Kanda, Y. Ishikawa, F. Akiyama, T. Iwase, E. Ogata, S. Ehata, K. Miyazono ja T. Imamura. 2008. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene*. 27:6322-23.
- Kawabata M, T. Imamura ja K. Miyazono. 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 9:49-61.
- Ketolainen JM., EL. Alarmo, VJ. Tuominen, ja A. Kallioniemi. 2010. Parallel inhibition of cell growth and induction of cell migration and invasion in breast cancer cells by bone morphogenetic protein 4. *Breast Cancer Res Treat*. 24:377-86.
- King-Spohn K. ja R. Pilarski. 2014. Beyond BRCA1 and BRCA2. *Curr Probl Cancer*. 38:235-48.
- Kim IY., DH. Lee, HJ. Ahn, H. Tokunaga, W. Song, LM. Devereaux, D. Jin, TK. Sampath ja RA. Morton. 2000. Expression of bone morphogenetic protein receptors type-IA, -IB and -II correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Cancer Research*. 60:2840-4.
- Kim IY, DH. Lee, DK. Lee, HJ. Ahn, MM. Kim, SJ. Kim ja RA. Morton. 2004a. Loss of expression of bone morphogenetic protein receptor type II in human prostate cancer cells. *Oncogene*. 23:7651-9.

- Kim IY., DH. Lee, DK. Lee, WJ. Kim, MM. Kim, RA. Morton, SP. Lerner ja SJ. Kim. 2004b. Restoration of bone morphogenetic protein receptor type II expression leads to a decreased rate of tumor growth in bladder transitional cell carcinoma cell line TSU-Pr1. *Cancer Res.* 64:7355-60.
- Kim SG., HR. Park, SK. Min, JY. Choi, SH. Koh, JW. Kim ja HW. Lee. 2011. Expression of bone morphogenetic protein-4 is inversely related to prevalence of lymph node metastasis in gastric adenocarcinoma. *Surg Today.* 41:688-92.
- Kimura N., R. Matsuo, H. Shibuya, K. Nakashima ja T. Taga. 2000. BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *Journal of Biological Chemistry.* 275:17647-52.
- Laatio L., P. Myllynen, R. Serpi, J. Rysä, M. Ilves, E. Lappi-Blanco, H. Ruskoaho, K. Vähäkangas ja U. Puistola. 2011. BMP-4 expression has prognostic significance in advanced serous ovarian carcinoma and is affected by cisplatin in OVCAR-3 cells. *Tumour Biol.* 32:985-95.
- Langenfeld EM., J. Bojnowski, J. Perone ja J. Langenfeld. 2005. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Annals of Thoracic Surgery.* 80:1028-32.
- Lasorella A., T. Uo ja A. Iavarone. 2001. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene.* 20:8326-33.
- Lee YC., CJ. Cheng, MA. Bilen, JF. Lu, RL. Satcher, LY Yu-Lee, GE. Gallick, SN. Maity ja SH. Lin. 2011. BMP4 promotes prostate tumor growth in bone through osteogenesis. *Cancer Res.* 71:5194-203.
- Lombardo Y., A. Scopelliti, P. Cammareri, M. Todaro, F. Iovino, L. Ricci-Vitiani, G. Gulotta, F. Dieli, R. de Maria ja G. Stassi. 2011. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. *Gastroenterology.* 140:297-309.
- Macias-Silva M., PA. Hoodless, SJ. Tang, M. Buchwald ja JL. Wrana. 1998. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *Journal of Biological Chemistry.* 273:25628-36.
- Maegdefrau U., T. Amann, A. Winklmeier, S. Braig, T. Schubert, TS. Weiss, K. Schardt, C. Warnecke, C. Hellerbrand ja AK. Bosserhoff. 2009. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *J Pathol.* 218:520-9.
- Malumbres M. ja M. Barbacid. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 9:153-66.
- Massague J., J. Seoane ja D. Wotton. 2005. Smad transcription factors. *Genes and Development.* 19:2783-810.
- Massague J. ja RR. Gomis. 2006. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.* 580:2811-20.
- Masuda H., Y. Fukabori, K. Nakano, N. Shimizu ja H. Yamanaka. 2004. Expression of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) in human prostate. *Prostate.* 59:101-6.
- Miller E., H.J. Lee, A. Lulla, L. Hernandez, P. Gokare ja B. Lim. 2014. Current treatment of early breast cancer: adjuvant and neoadjuvant therapy. *F1000Research* 3:198.
- Miyazono K. ja K. Miyazawa. 2002. Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE.* 2002:E40.
- Miyazono K., S. Maeda ja T. Imamura. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 16:251-63.
- Miyazono K., Y. Kamiya ja M. Morikawa. 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem.* 147:35-51.

- Montesano R. 2007. Bone morphogenetic protein-4 abrogates lumen formation by mammary epithelial cells and promotes invasive growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 353:817-22.
- Musgrove EA., CE. Caldon, J. Barraclough, A. Stone ja RL. Sutherland. 2011. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer.* 11:558-72.
- Newfeld SJ., RG. Wisotzkey ja S. Kumar. 1999. Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor- $\beta$  family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics.* 152:783-95.
- Nishanian TG., JS. Kim, A. Foxworth A ja T. Waldman. 2004. Suppression of tumorigenesis and activation of Wnt signaling by bone morphogenetic protein 4 in human cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 3:667-75.
- Nohe A., S. Hassel, M. Ehrlich, F. Neubauer, W. Sebald, YI. Henis ja P. Knaus. 2002 The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry.* 277:5330-8.
- Nohe A., E. Keating, P. Knaus ja NO. Petersen. 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cellular Signalling.* 16:291-9.
- Norton JD. 2000. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci.* 113:3897-905.
- Otani H., F. Otsuka, K. Inagaki, M. Takeda, T. Miyoshi, J. Suzuki, T. Mukai, T. Ogura ja H. Makino. 2007. Antagonistic effects of bone morphogenetic protein-4 and -7 on renal mesangial cell proliferation induced by aldosterone through MAPK activation. *American Journal of Physiology. Renal Physiology.* 292:F1513-F1525.
- Phippard DJ., SJ. Weber-Hall, PT. Sharpe, MS. Naylor, H. Jayatalake, R. Maas, I. Woo, D. Roberts-Clark, PH. Francis-West, YH. Liu, R. Maxson, RE. Hill ja TC. Dale. 1996. Regulation of Msx-1, Msx-2, Bmp-2 and Bmp-4 during foetal and postnatal mammary gland development. *Development.* 122:2729-37.
- Piccirillo SG., BA. Reynolds, N. Zanetti, G. Lamorte, E. Binda, G. Broggi, H. Brem, A. Olivi, F. Dimeco ja AL. Vescovi. 2006. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature.* 444:761-5.
- Rodriguez-Martinez A., EL. Alarmo, L. Saarinen, J. Ketolainen, K. Nousiainen, S. Hautaniemi ja A. Kallioniemi. 2011. Analysis of BMP4 and BMP7 signaling in breast cancer cells unveils time-dependent transcription patterns and highlights a common synexpression group of genes. *BMC Med Genomics.* 4:80.
- Rosenzweig BL., T. Imamura, T. Okadome, GN. Cox, H. Yamashita, P. ten Dijke, CH. Heldin ja K. Miyazono. 1995. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *PNAS.* 92:7632-6.
- Rothhammer T., I. Poser, F. Soncin, F. Bataille, M. Moser ja AK. Bosserhoff. 2005. Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res.* 65:448-56.
- Rothhammer T., F. Bataille, T. Spruss, G. Eissner ja AK. Bosserhoff. 2007. Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. *Oncogene.* 26:4158-70.
- Roy R., J. Chun ja SN. Powell. 2011. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer.* 12:68-78.
- Schmierer B. ja CS. Hill. 2007. TGF $\beta$ -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 8:970-82.
- Schwaninger R., CA. Rentsch, A. Wetterwald, G. van der Horst, RL. van Bezooijen, G. van der Pluijm, CW. Lowik, K. Ackermann, W. Pyerin, FC. Hamdy, GN. Thalmann ja MG. Cecchini. 2007. Lack of noggin

expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *American Journal of Pathology*. 170:160–75.

Sebald W., J. Nickel, J.L. Zhang ja T.D. Mueller. 2004 Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/ receptor interaction. *Biological Chemistry*. 385:697–710.

Shaw A., J. Gipp ja W. Bushman. 2010. Exploration of Shh and BMP paracrine signaling in a prostate cancer xenograft. *Differentiation*. 79:41–7.

Shepherd T.G. ja M.W. Nachtigal. 2003. Identification of a putative autocrine bone morphogenetic protein-signaling pathway in human ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. *Endocrinology*. 144:3306–14.

Shi Y. ja J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113:685–700.

Shinagawa T., H.D. Dong, M. Xu, T. Maekawa ja S. Ishii. 2000. The *sno* gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *Oncogene*. 56:8100–08

Shirai Y.T., S. Ehata, M. Yashiro, K. Yanaqihara, K. Hirakawa ja K. Miyazono. 2011. Bone morphogenetic protein-2 and -4 play tumor suppressive roles in human diffuse-type gastric carcinoma. *Am J Pathol*. 179:2920–30.

Shon S.K., A. Kim, J.Y. Kim, K.I. Kim, Y. Yang ja J.S. Lim. 2009. Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 385:198–203.

Sikder H.A., M.K. Devlin, S. Dunlap, B. Ryu ja R.M. Alani. 2003. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell*. 3:525–30.

Singh A. ja R.J. Morris. 2010. The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 21:299–313.

Slattery M.L., A. Lundgreen, J.S. Herrick, S. Kadlubar, B.J. Caan, J.D. Potter ja R.K. Wolff. 2012. Genetic variation in bone morphogenetic protein (BMP) and colon and rectal cancer. *Int J Cancer*. 130:653–64.

Sneddon J.B., H.H. Zhen, K. Montgomery, M. van der Rijn, A.D. Tward, R. West, H. Gladstone, H.Y. Chang, G.S. Morganroth, A.E. Oro ja P.O. Brown. 2006. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:14842–7.

Stroschein S.L., W. Wang, S. Zhou, Q. Zhou ja K. Luo. 1999. Negative feedback regulation of TGF- $\beta$  signaling by the SnoN oncoprotein. *Science*. 286:771–4.

Su D., S. Zhu, X. Han, X. Y. Feng, H. Huang, G. Ren, L. Pan, Y. Zhang, J. Lu ja B. Huang. 2009. BMP4-Smad signaling pathway mediates adriamycin-induced premature senescence in lung cancer cells. *J Biol Chem*. 284:12153–64.

Suomen Rintasyöpäryhmä ry. 2015. Rintasyövän valtakunnallinen diagnostiikka- ja hoitosuositus. Painotalo Plus Digital Oy, Lahti.

Suzuki Y., K. Montagne, A. Nishihara, T. Watabe ja K. Miyazono. 2008. BMPs promote proliferation and migration of endothelial cells via stimulation of VEGF-A/VEGFR2 and angiopoietin-1/Tie2 signalling. *J Biochem*. 143:199–206.

ten Dijke P., O. Korchynskyi, G. Valdimarsdottir ja M.J. Goumans. 2003 Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 211:105–13.

- Thawani JP., AC. Wang, KD. Than, CY. Lin, F. La Marca ja P. Park. 2010. Bone morphogenetic proteins and cancer: review of the literature. *Neurosurgery*. 66:233-46.
- Theriault BL., TG. Shepherd, ML. Mujoomdarja MW. Nachtiqal. 2007. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. 28:1153-62.
- Virtanen S., EL. Alarmo, S. Sandström, M. Ampuja ja A. Kallioniemi. 2011. Bone morphogenetic protein -4 and -5 in pancreatic cancer-novel bidirectional players. *Exp Cell Res*. 317:2136-46.
- Weis SM. ja DA. Cheresh. 2011. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 17:1359-70.
- Waite KA. ja C. Eng. 2003. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF- $\beta$  family. *Nature Reviews. Genetics*. 4:763-73.
- Weigelt, B., F.C. Geyer ja J.S. Reis-Filho. 2010. Histological types of breast cancer: How special are they?. *Molecular Oncology*. 4:192-208.
- Wozney JM. ja V. Rosen. 1998 Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 346:26-37.
- Wozney JM. 2002. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 27:S2-S8.
- Xu T., CY. Yu, JJ. Sun JJ, Y. Liu, XW. Wang, LM. Pi, YQ. Tian ja X. Zhang. 2011. Bone morphogenetic protein-4-induced epithelial-mesenchymal transition and invasiveness through Smad1-mediated signal pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Med Res*. 42:128-37.
- Yang CY., JA. Best, J. Knell, E. Yang, AD. Sheridan, AK. Jesionek, HYS. Li, RR. Rivera, KC. Lind, LM. D'Cruz, SS. Watowich, C. Murre ja AW. Goldrath. 2011. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8(+) T cell subsets. *Nat Immunol*. 12:1221.
- Yang J., RJ. Davies, M. Southwood, L. Long, XD. Yang, A. Sobolewski, PD. Upton, RC. Trembath ja NW. Morrell. 2008. Mutations in bone morphogenetic protein type II receptor cause dysregulation of Id gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells. Implications for familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*. 102:1212-21.
- Yang J., X. Li, Y. Li, M. Southwood, L. Ye, L. Long, RS. Al-Lamki ja NW. Morrell. 2013. Id proteins are critical downstream effectors of BMP signaling in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 305:L312-L321.
- Yang X., PJ. Lee, L. Long, RC. Trembath ja NW. Morrell. 2007. BMP4 induces HO-1 via a Smad independent, p38MAPK dependent pathway in pulmonary artery myocytes. *American Journal of Respiratory, Cell and Molecular Biology*. 37:598-605.
- Ye L., JM. Lewis-Russell, HG. Kyanaston ja WG. Jiang. 2007. Bone morphogenetic proteins and their receptor signaling in prostate cancer. *Histology and Histopathology*. 22:1129-47.
- Zhao GQ. 2003. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis*. 35:43-56.
- Zhao H., O. Ayrault, F. Zindy, JH. Kim ja MF. Roussel. 2008. Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes Dev*. 22:722-7.
- Zhang F., M. Lundin, A. Ristimäki, P. Heikkilä, J. Lundin, J. Isola, H. Joensuu ja M. Laiho. 2003. Ski-related novel protein N (SnoN), a negative controller of transforming growth factor-beta signaling, is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Cancer Res*. 63:5005-10.



Zhou Z., L. Sun, Y. Wang, Z. Wu, J. Geng, W. Miu, Y. Pu, Y. You, Z. Yang ja N. Liu. 2011. Bone morphogenetic protein 4 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in glioma stem cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 26:77-83.

Zwijnsen A., K. Verschueren ja D. Huylebroeck. 2003. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Letters.* 546:133-9.