



Hlutverk DNA methýleringar í bandvefsumbreytingu brjóstþekju

Ólöf Gerður Ísberg



**Raunvísindadeild
Háskóli Íslands
2012**

Hlutverk DNA methýleringar í bandvefsumbreytingu brjóstþekju

Ólöf Gerður Ísberg

16 eininga ritgerð sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum gráðu í lífefnafræði

Leiðbeinendur
Magnús Karl Magnússon
Þórarinn Guðjónsson

Raunvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, mars 2012

Hlutverk DNA methýleringar í bandvefsumbreytingu brjóstþekju
16 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í lífefnafræði

Höfundarréttur © 2012 Ólöf Gerður Ísberg
Öll réttindi áskilin

Raunvísindadeild
Verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Hjarðarhaga 2-6
107 Reykjavík

Sími: 525 4000

Skráningarupplýsingar:
Ólöf Gerður Ísberg, 2012, *Hlutverk DNA methýleringar í bandvefsumbreytingu
brjóstþekju*, BS ritgerð, Raunvísindadeild, Háskóli Íslands, 44 bls.

ISBN XX

Prentun: XX
Reykjavík, mars 2012

Ágrip

Bandvefsumbreyting (EMT, epithelial-mesenchymal transition) er þekkt ferli þar sem þekjufrumur öðlast bandvefsfrumueiginleika. EMT á sér stað í fósturþroskun og einnig hefur það verið tengt við framþróun krabbameina. miRNA eru talin gegna mikilvægu hlutverki í stjórnun á umritunarþáttum sem stýra EMT. Minnkuð tjáning miRNA200 fjölskyldunnar, og miR205, miR203 og E-cadherin genanna hefur verið tengd við EMT og er þessi bæling talin eiga þátt í EMT ferlinu. Nýlega hefur því verið lýst að æðapæl geti örvað þekjufrumur til að undirgangast EMT og reyndist þessi umbreyting vera óafturkræf. Tilgangur verkefnisins var að kanna hvort methýlering á CpG eyjum miRNA genasvæðanna valdi því að æðapelsörvað EMT gangi ekki til baka. Brjóstapækjustofnfrumulínurnar D492, D492M, D492M1, D492M2 og D492E1 voru meðhöndlaðar með bísúlfíði og stjórnsvæði EMT stjórngena mögnuð upp með PCR og raðgreind til að kanna hvort methýlering væri til staðar. Það sást munur á methýleringarmynstri, sérstaklega í genunum miR200c og miR205 sem bendir til þess að methýlering hafi hlutverki að gegna í EMT.

Abstract

EMT (epithelial-mesenchymal transition) is a well-known process where epithelial cells acquire mesenchymal traits. EMT occurs in embryogenesis and it has also been connected to cancer progression. miRNA genes are considered to play an important role in regulating transcription factors important for EMT. The miRNA200 family, miR203, miR205, and E-cadherin have been found suppressed in EMT. It was recently described that endothelial cells can induce epithelial cells to undergo an irreversible EMT. The purpose of the project was to examine whether DNA methylation in CpG islands of miRNA genes is responsible for the irreversibility of the endothelial induced EMT. The breast stem cell line D492, and its derivatives D492M, D492M1, D492M2, and D492E1 were bisulfite treated and the regulatory regions of the miRNA200 family, miR203, miR205 and E-cadherin amplified with PCR and sequenced. There was a difference in the methylation pattern especially in miR200c and miR205 which suggests that methylation might have a role in irreversible endothelial induced EMT.

Þakkir

Ég vil þakka Magnúsi Karli Magnússyni og Þórarni Guðjónssyni kærlega fyrir að leyfa mér að taka þátt í þessu verkefni. Það hefur verið mjög skemmtilegt og lærdómsríkt að vinna á rannsóknarstofunni og þessi reynsla á eflaust eftir að nýtast í framtíðinni. Jóni Þór Bergþórssyni og Bylgju Hilmarsdóttur vil ég þakka fyrir góða leiðsögn og hjálp. Einnig vil ég þakka meðlimum SCRU (Stem Cell Research Unit) fyrir aðstoð, hjálp og skemmtun á rannsóknarstofunni. Að lokum vil ég þakka fjölskyldu minni fyrir að sýna stuðning við verkefnið.

Efnisyfirlit

Ágrip	III
Abstract	V
Þakkir.....	VII
Efnisyfirlit	IX
Myndaskrá.....	XI
Töfluskrá.....	XIII
1. Inngangur	1
1.1 Brjóstkirtilinn.....	1
1.2 Krabbamein	3
1.3 Brjóstakrabbamein	5
1.3.1 Bandvefsumbreyting, EMT (epithelial-mesenchymal transition).....	7
1.4 Sameindalíffræði.....	8
1.4.1 MicroRNA	8
1.4.2 Methýlering	9
1.4.3 D492 frumulínan.....	9
2. Aðferðir og efni.....	13
2.1 Frumurækt.....	13
2.2 Einangrun og hreinsun DNA.....	14
2.3 Meðhöndlun DNA með bísúlfíði	14
2.4 Mögnun á DNA með Polymerase chain reaction, PCR.....	15
2.5 Rafdráttur í agarósageli	21
2.6 Raðgreining.....	22
3. Niðurstöður	25
3.1 D492E1 frumur eru teningslaga en D492M1 og D492M2 frumur eru ílangar	25
3.2 Mögnun tókst fyrir genasvæðin miR200c, miR200ba1, miR200ba2, miR205 og miR203.....	26
3.3 Bandvefsfrumur virðast vera meira methýleraðar en þekjufrumur í D492 brjóstastofnfrumulínunni.....	36
4. Umræður.....	41
5. Heimildir	43

Myndaskrá

Mynd 1: Þroskun brjóstkirtilsins í mús.	1
Mynd 2: Brjóstkirtilinn er samansettur úr þekjuvef, fituvef og æðaríkum stoðvef.....	3
Mynd 3: Tíðni brjóstakrabbameins hjá konum og körlum á Íslandi fram til 2006.	6
Mynd 4: Æðapæl örvar EMT og greinótta formgerð.	11
Mynd 5: Smásjármyndir staðfesta að D492E1 frumur eru teningslaga en D492M1 og D492M2 frumur eru ílangar.	25
Mynd 6: Mögnun tókst á miR205 og miR200ba2 genasvæðunum.	27
Mynd 7: Mögnun tókst ekki fyrir miR200c genasvæðið eftir að magnesíum styrk var breytt.	28
Mynd 8: Mögnun tókst ekki fyrir miR203 genasvæðið eftir að magnesíum styrk var breytt.	28
Mynd 9: Mögnun tókst fyrir genasvæðin miR200c, miR205, miRba1 og miRba2.	32
Mynd 10: Mögnun tókst fyrir D492M1, D492M2 og D492M fyrir miR203 genasvæðið.	35
Mynd 11: Mögnun tókst fyrir D492M2 og D492E1 fyrir miR200c genasvæðið.....	35
Mynd 12: CpG eyja í raðgreiningu.....	37
Mynd 13: Túlkun á styrk methýleringar.....	38
Mynd 14: D492M er yfirleitt meira methýlerað en D492.	39

Töfluskrá

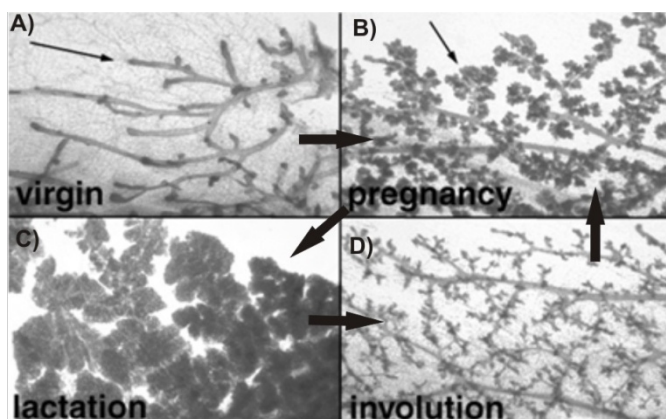
Tafla 1: Vaxtarþættir í H14 æti.	13
Tafla 2: PCR blanda fyrir ytri og innri hvörf.	19
Tafla 3: Öll sýnin eru keyrð á grunn PCR hitaprógrammi.	20
Tafla 4: Bindihitastig vísa fyrir hvert miRNA svæði.	21
Tafla 5: ExoSAP blanda.	23
Tafla 6: Hitaprógramm fyrir ExoSAP hvarf.	23
Tafla 7: Raðgreiningarblanda.	24
Tafla 8: Hitaprógramm fyrir raðgreiningu.	24
Tafla 9: Magn hreinsaðs DNA.	26
Tafla 10: Magnesíum styrk breytt.	27
Tafla 11: Ný PCR blanda fyrir ytri hvörf PCR.	29
Tafla 12: Ný PCR blanda fyrir innri hvörf PCR.	30
Tafla 13: Nýtt hita prógramm fyrir mögnun.	31
Tafla 14: Hitastigi þar sem binding vísa fer fram breytt.	33
Tafla 15: DeCode blanda.	34
Tafla 16: PCR blanda með DeCode blöndu.	34

1. Inngangur

1.1 Brjóstkirtillinn

Brjóstkirtillinn er eitt af þeim einkennum sem aðgreinir spendýr frá öðrum dýrum. Hann er byggingarlega breytilegt líffæri sem breytist með aldri, tíðarhring og æxlunarstöðu kvenna. Við fósturþroskun þroskast brjóstavefurinn í báðum kynjum þ.a. brjóstkirtillinn er eins hjá báðum kynjum við fæðingu. Við kynþroska þroskast brjóstkirtillinn hjá konum vegna áhrifa kynhormónanna estrógens og prógesteróns, en estrógen örvar þroskun fósturbandvefsfruma. Hjá körlum veldur kynhormónið testósterón þeim áhrifum á fósturbandvefsfrumur að það hindrar vöxt brjóstkirtilsins (Ross og Pawlina 2011).

Brjóstkirtillinn er við eðlilegar lífeðlisfræðilegar aðstæður í óvirku ástandi. Þegar þungun á sér stað fer kirtillinn úr óvirku ástandi í endastigsþroskun sem undirbýr kirtilþekjuna undir hlutverk sitt, sjá mynd 1.

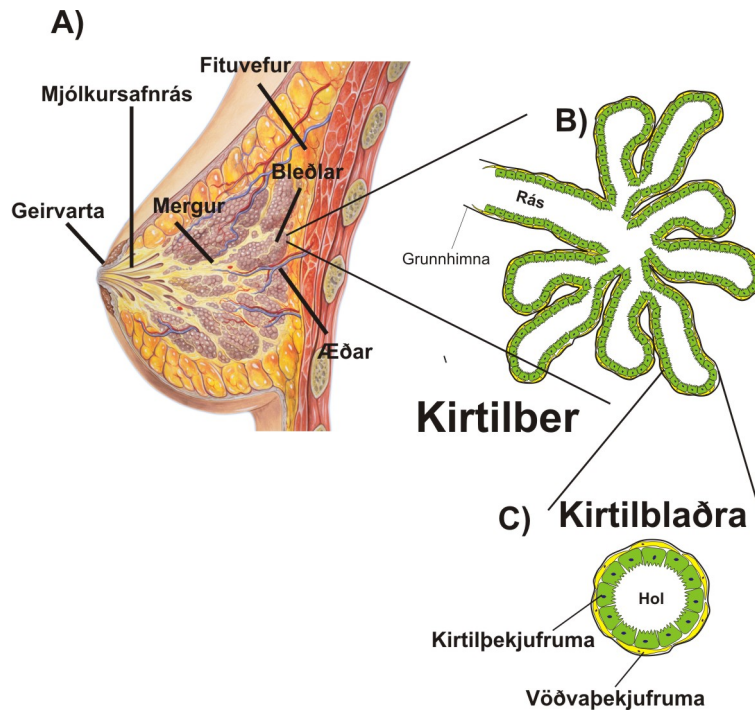


Mynd 1: Þroskun brjóstkirtilsins í mús.

A) Í ókynþroska mús er kirtillinn í óvirku ástandi. Þekjuvefurinn í brjóstkirtlinum er greinóttur. B) Við þungun fjölga kirtilberum talsvert og kirtillinn er þá kominn í virkt ástand. C) Þegar músin er á mjólkurmyndunarstigi fjölga kirtilberum enn þá meira samfara mjólkurmyndun. D) Rýrnun verður á kirtli eftir mjólkurmyndunarstigið. Brjóstkirtillinn fer ekki aftur í óvirkt ástand (Health 1997).

Óvirkur fullorðinn brjóstkirtil er samansettur af 15-20 óreglulegum kirtilberum sem eru aðskildir með trefjóttum bandvefi. Berin liggja út frá geirvörtu og þeim er skipt í smærri kirtilber. Enda kirtilberin eru kölluð terminal duct lobular units, TDLUs, en TDLUs eru virknieiningar brjóstisins og sjá m.a. um að framleiða mjólk og að koma henni í safnrásir brjóstisins (Nelson og Bissell 2005). Kirtilber eru úr tvílaga vef. Innra lagið er úr skautuðum kirtilþekjufrumum sem framleiða mjólk en ytra lagið er úr vöðvþekjufrumum sem geta dregist saman og eru nauðsynlegar til að flytja mjólkina. Utan um brjóstaleiðslur og kirtilber er grunnhimna en hún aðskilur þekjuvefina frá aðliggjandi stoðvef sem inniheldur m.a. bandvefsfrumur og æðapelsfrumur (Howard og Gusterson 2000), sjá mynd 2.

Brjóstkirtilinn myndast með ferli sem einkennist af greinóttri formgerð (branching morphogenesis) en það er ferli sem er mjög vel varðveitt í dýraríkinu. Greinótt formgerð er m.a. þekkt í myndun lungna, nýrna, blöðruhálskirtils og munnvatnskirtla (Ingthorsson, Sigurdsson og fl. 2010). Brjóstkirtilinn líkist umbreyttum svitakirtli sem þroskast snemma í fósturþroskun þegar yfirhúðin þykknar og þekjufrumur ráðast inn í umliggjandi vef, fósturbandvef. Til þess að þekjufrumur geti ráðist í umliggjandi vef taka þær að hluta til upp tjáningarmynstur bandvefsfruma (Sigurdsson, Hilmarsdóttir og fl. 2011). Þetta ferli, svokallað bandvefsumbreyting (epithelial-to-mesenchymal transition – EMT) er vel þekkt í fósturþroska en í krabbameinum er talið að frumur sem hafi undirgengist slíka breytingu geti haft hlutverk í meingerð þess sjúkdóms (sjá síðar í kafla 1.3.1).



Mynd 2: Brjóstkirtillinn er samansettur úr þekjuvef, fituvef og æðaríkum stoðvef.

A) Brjóstkirtillinn er samansettur greinóttum þekjuvef eða kirtilberum sem liggja frá geirvörtu. Í brjóstinu er einnig fituvefur og bandvefur. B) Endakirtilberin, eða TDLU eru virknieiningar brjóstsins. Grunnhimnan aðskilur þekjufrumurnar frá bandvefnum. C) Þekjuvefur brjóstkirtilsins er samansettur úr kirtilþekjuvef og vöðvæþekjuvef. Kirtilþekjufrumurnar framleiða mjólkina en vöðvæþekjufrumur hjálpa til með samdrætti að flytja mjólkina í mjólkursafnrás (Ingthorsson, Sigurdsson og fl. 2010).

1.2 Krabbamein

Í mannlíkamanum er 10^{14} frumur. Venjulegar frumur í líkamanum vaxa, skipta sér og sérhæfa sig eða fara í stýrðan frumudauða. Krabbameinsfrumur verða til vegna stökkbreytinga í frumum. Slíkar stökkbreytingar geta þannig leitt til þess að krabbameinsfrumur brjóta þær reglur sem venjulegar frumur í líkamanum fara eftir m.a. með því skipt sér ótakmarkað eða koma sér hjá stýrðum frumudauða. Krabbameinsfrumur fjölga sér þannig með klónal vexti og mynda æxli. Á síðari stigum getur vöxtur þeirra orðið ífarandi, þannig geta krabbameinsfrumurnar rutt sér braut inn í aðlæga vefi og einnig komist í blóðrás, flust á aðra staði og myndað meinvörp.

Þau gen sem koma helst við sögu í æxlismyndun má flokka í tvo aðalflokka, þ.e. æxlisgen og æxlisbæligen. Flokkur æxlisgena stuðlar að auknum frumuvexti eða hindrar

frumudauða en æxlisbæligen hindra frumuvöxt eða geta stuðlað að frumudauða. Við stökkbreytingar í þessum genum er oftast um að ræða örvasi (t.d. genamögnun) stökkbreytingar í æxlisgenum en hindrandi stökkbreytingar í æxlisbæligenum.

Ífarandi vöxtur er eitt meginþekki sem aðskilur illkynja æxlisfrumur frá góðkynja æxlisfrumum. Þegar góðkynja æxli eru fjarlægð eru góðar líkur á að fólk nái fullum bata. Illkynja æxli geta myndað meinvörp víða um líkamann þannig að krabbameinið dreifist og nær ómögulegt verður að meðhöndla það. Meinvörpin eru oftast valdur að dauða krabbameinssjúklinga.

Talið er að sex þekki skilji krabbameinsfrumur frá venjulegum frumum. Þessi þekki eru:

- æxlisfrumur verjast frumudauða,
- æxlisfrumur hvetja myndun nýrra æða,
- æxlisfrumur viðhalda óheftri frumufjölgun,
- æxlisfrumur komast sér hjá eðlilegri vaxtabælingu,
- æxlisfrumur virkja ferli sem stuðla að ífarandi vexti (sem geta leitt til myndunar meinvarpa,
- verða ódauðlegar m.a. með tjáningu á telomerasa geninu (Hanahan og Weinberg 2011).

Þekjuvefsæxli (carcinoma) er sá flokkur krabbameina sem myndast í þekjuvef og er langalgengasta gerð krabbameina. Aðrir meginflokkar krabbameina eru t.d. sarkmeini (sarcoma), hvítbæði (leukemia) og eitelfrumukrabbamein (lymphoma). Sarkmeini myndast í stoðfrumuvef, en hvítbæði og eitelfrumukrabbamein myndast í blóðmyndandi vef. Þekjuvefsæxli er algengasta krabbameinið, eða um 80% tilvika. Orsaka getur m.a. verið að leita í því að frumuskiptingar eru þar tíðar og því hugsanlega meiri líkur á stökkbreytingu og einnig er þekjuvefur oft berskjaldaður gegn utanaðkomandi skemmdum (Strachan T. og Read A. 2004). Nánar verður fjallað um þekjuvef í kafla 1.3.

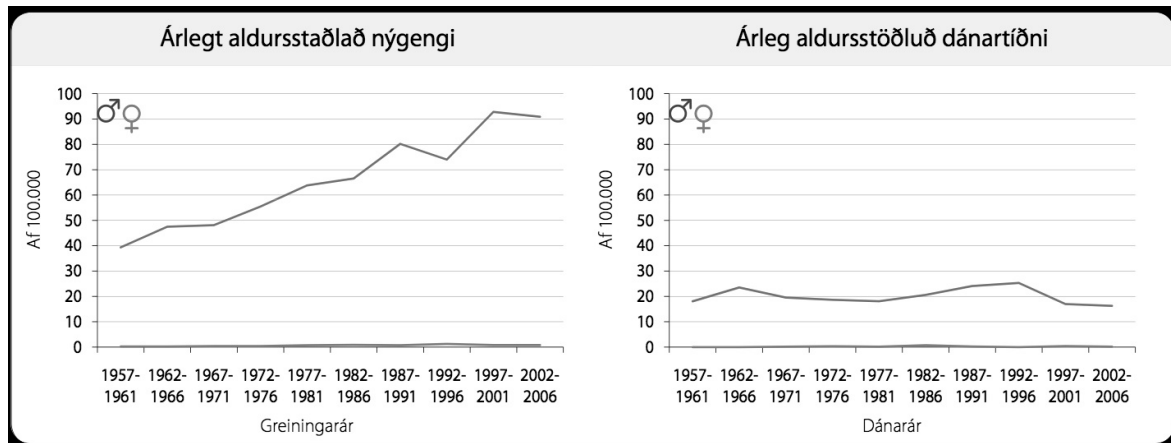
Krabbamein myndast ekki af einni stökkbreytingu heldur samansafni af stökkbreytingum sem á endanum valda krabbameini. Það eru margs konar stökkbreytingar sem geta orðið á erfðaeðfinu við t.d. eftirmyndun og nýmyndun. Þetta eru m.a. litningabreytingar, basabreytingar og sviperfðabreytingar (epigenetic modification). Viðgerðiferli og gen eru

til staðar og gera við stökkbreytingarnar en það er möguleiki að einhverjar stökkbreytingar komist fram hjá þessum viðgerðarferlum. Gallar í þessum ferlum og þessum genum eru ein af orsökum arfgengra krabbameina. Einnig geta gallar í genum sem stýra frumuhring og frumskiptingu valdið krabbameinsmyndun (Alberts B., Johnson A. og fl. 2008).

1.3 Brjóstakrabbamein

Krabbamein er eitt algengasta banamein í heiminum í dag og deyja 1 af hverjum 5 úr þessum sjúkdómaflokki. Flest krabbamein eru til komin vegna blöndu erfða og umhverfis en einnig eru til undirflokkar krabbameina með sterkan erfðapátt.

Brjóstakrabbamein er algengasta krabbameinið sem greinist hjá konum í heiminum í dag en um 10% kvenna mega gera ráð fyrir því að fá brjóstakrabbamein (Dalgin, Alexe og fl. 2007). Brjóstakrabbamein er í 5. sæti yfir algengustu dánarorsök vegna krabbameins (IARC 2010). Á Íslandi greinast um 195 konur árlega með brjóstakrabbamein. Karlar geta líka fengið brjóstakrabbamein þó að það sé mjög sjaldgæft en um 2 tilfelli greinast hér á landi árlega. Á mynd 3 má sjá tíðni og dánartíðni brjóstakrabbameins í konum og körlum (Krabbameinsfélagið 2012).



Mynd 3: Tíðni brjóstakrabbameins hjá konum og körlum á Íslandi fram til 2006.

Til vinstri: Mikil aukning hefur verið á tíðni brjóstakrabbameins á síðustu árum en það má m.a. rekja til þess að fleiri konur en áður fara í krabbameinsskoðun. Til hægri: Dánartíðni hefur lækkað á síðustu 20 árum. Þessi lækkun gæti verið vegna þess að fleiri konur fara í krabbameinsskoðun og því meiri líkur á að finna krabbameinið snemma og hefja meðferð (Jónasson og Tryggvadóttir 2008).

Breytingar í BRCA genum vega þungt hjá þeim konum sem hafa sterka ættarsögu á brjóstakrabbameini. BRCA1 tengist áhættu á krabbameini í brjóstum og eggjastokkum en BRCA2 tengist áhættu á krabbameini í brjóstum, blöðruhálskirtli, brisi og víðar. Bæði BRCA 1 og 2 eru skilgreind sem viðgerðargen (Strachan T. og Read A. 2004).

Einkenni brjóstakrabbameins eru margvísleg en oftast er þó sjúkdómurinn einkennalaus á fyrstu stigum. Síðari einkenni eru m.a. að brjóstið bólgnar allt eða hluti þess, verkur í brjósti, hnúður í handakrika og hnúður í brjósti. Áhættuþættir þess að fá brjóstakrabbamein eru t.d. öldrun, sjúkrasaga, fjölskyldusaga, þyngd, hreyfingaleysi og áfengisneysla. Svipaðir áhættuþættir eru meðal karla en þar má bæta við hátt estrógen magn og Klinefelter sjúkdómurinn (XXY) en Klinefelter er sjúkdómur þar sem karlar eru með auka X litning og eru þess vegna með ýmis kveneinkenni.

1.3.1 Bandvefsumbreyting, EMT (epithelial-mesenchymal transition)

EMT er ferli þar sem þekjufrumur taka á sig svipgerð bandvefsfruma og samhliða því tapa þær sérhæfðum einkennum sínum þar á meðal frumuviðloðun og skautun og öðlast í stað þessara svipgerð fósturbandvefs s.s. aukið frumuskrið, ífarandi vöxt og viðnám gegn stýrðum frumudauða. Í myndun brjóstskirtillsins þá öðlast þekjufrumur tímabundið slík bandvefslík einkenni og geta þess vegna vaxið inn í umliggjandi bandvef (Brabletz og Brabletz 2010). EMT getur verið afturkræft ferli en þá öðlast bandvefsfrumurnar þekjuvefseiginleika og kallast umbreytingin þekjuvefsumbreyting (MET, mesenchymal-epithelial transition). EMT og MET hafa mikilvæg hlutverk í nokkrum þroskunarferlum t.d. myndun fósturbandvefsfruma, miðlags í holfóstursmyndun og í myndun greinóttar formgerðar í nokkrum líffærum. EMT hefur líka verið tengt við krabbamein og eru þar tengd við illvígari hegðun og óhagstæðar batahorfur í krabbameini. Þessi umbreyting á krabbameinsfrumum með aukinni bandvefssvipgerð hefur í för með sér tap eða minnkaða tjáningu þekjuvefskennipróteina (t.d. E-cad), aukinni tjáningu bandvefskennipróteina (N-Cad), meiri hreyfanleika og ífarandi vöxt (Polyak og Weinberg 2009).

Á rannsóknarstofu í stofnfrumufræðum, var nýlega sýnt fram á að æðapelsfrumur örva EMT í brjóstavef. Samrækt með æðapeli á brjóstastofnfrumulínunni D492 í þrívíðri rækt leiddi til örvunar bæði á greinótttri formgerð og EMT (Sigurdsson, Hilmarsdóttir og fl. 2011).

Eins og áður sagði er talið að krabbameinsfrumur geti undirgengist EMT ferlið og með því geti hinar illkynja frumur öðlast bandvefseiginleika sem getur stuðlað að ífarandi vexti. Náið samspil er á milli æðapelsfruma og krabbameinsfruma. Þegar æxli hefur náð að vaxa að ákveðinni stærð þá er áframhaldandi vöxtur háður æðanýmyndun í æxlinu. Slík hvatning á æðanýmyndun er eitt af grunneinkennum krabbameinsfruma (sjá kafla 1.2). Sú tilgáta að æðapelið geti auk þess að mynda æðar og þannig flytja næringu einnig örvað EMT umbreytingu gefur æðanýmyndun í æxlum aukna þýðingu. Þetta gæti þannig verið eitt þeirra mikilvægu skrefa sem stuðlað að ífarandi vexti og síðar tilfærslu inn í blóðrás og meinvarpamyndun.

Svokölluð micro RNA, eða miRNA (sjá kafla 1.4.1), eru talin gegna mikilvægu hlutverki í

stjórnun á umritunarþáttum sem stýra EMT. Sjónum hefur sérstaklega verið beint að minnkaðri tjáningu miRNA200 fjölskyldunnar í krabbameinum en hún er talin gegna mikilvægu hlutverki við að viðhalda þekjuvefs eiginleikum (Brabletz og Brabletz 2010). Nýlegar rannsóknir hafa einnig sýnt að meðlimir miRNA fjölskyldunnar eru mikilvægir stjórnendur sérhæfingar og þekjuvefseinkenna í mörgum vefjum (Gregory, Bracken og fl. 2008).

1.4 Sameindalíffræði

1.4.1 MicroRNA

miRNA eru vel varðveittar litlar RNA sameindir sem stjórna mikilvægum líffræðilegum ferlum. Þetta eru sameindir sem skrá ekki prótein en geta myndað tvíþátta bindingu við mRNA og þannig minnkað stöðugleika þeirra og hindrað þýðingu (Alberts B., Johnson A. og fl. 2008). Í genamengi mannsins má finna a.m.k. 1500 mismunandi miRNA (miRBase, built 18) og þau virðast stjórna að minnsta kosti þriðjung þi gena sem skrá prótein. Sýnt hefur verið fram á að miRNA tekur þátt í fjölmörgum ferlum þar á meðal stjórnun á EMT (Gregory, Bracken og fl. 2008). Einnig er talið að miRNA hafi hlutverki að gegna í stýringu á stofnfrumuvirkni, sérhæfingu og fósturþroskun. Rannsóknir hafa sýnt að miRNA getur virkað sem æxlisgen og æxlisbæligen (Polyak og Weinberg 2009) en í krabbameinum hefur bæði fundist lækkun og hækkun á mismunandi miRNA genum.

Komið hefur fram að miR200 fjölskyldan og miR205 hafa verið tengd EMT, sem æxlisbæligen. miR200 fjölskyldan samanstendur af miR200c, miR200b, miR200a, miR141 og miR429. miR200c og miR141 eru á sama stýrilsvæðinu á litningi 12 en miR200b, miR200a og miR429 eru á litningi 1. Tvö stýrilsvæði eru á litningi 1 þannig að talað er um stýrilsvæði miR200ba1 og miR200ba2. Í krabbameinum er miR200 fjölskyldan oft bæld og það sama má segja um miR205, miR203 og E-cadherin (Wiklund, Bramsen og fl. 2011). Talið er að miR200c hindri klónalvöxt í brjóstakrabbameinsfrumum hugsanlega með áhrifum á svokallaðar krabbameinsstofnfrumur.

Á þessum miRNA svæðum eru einnig CpG eyjar sem geta bent til að methýlering hafi áhrif á genastjórnun á svæðunum (sjá næsta kafla, 1.4.2 methýlering).

1.4.2 Methýlering

DNA methýlering flokkast undir sviperfðabreytingar (epigenetics modifications) ásamt histónabreytingum og staðsetningu kirkisagnar. Methýlering er oftast tengd þöggun á tjáningu en hún hefur einnig hlutverk tengd grenagreypingu (imprinting) þar sem ofmetýleringu (hypermethylation) veldur því að aðeins önnur samsæta frá foreldrum er tjáð (Sandoval og Esteller 2012).

Methýleringarmynstur getur erfst frá móðurfrumu til dótturfrumu í frumuskiptingu. DNA methýlering er oftast á CpG eyjum, CpG ströndum, stýrilsvæðum gena og á endurteknum röðum. Skipulag og viðhald DNA methýleringarmynsturs er nauðsynlegt fyrir þroskun spendýra og eðlilega líkamsstarfsemi fullorðinna einstaklinga. DNA methýlering er leið til að bæla genastarfsemi og til að viðhalda stöðugleika erfðaefnisins með því að halda í skefjum endurteknum röðum. Breytingar á DNA methýleringu tengjast ýmsum sjúkdómum, öldrun og myndun krabbameina (Strachan T. og Read A. 2004).

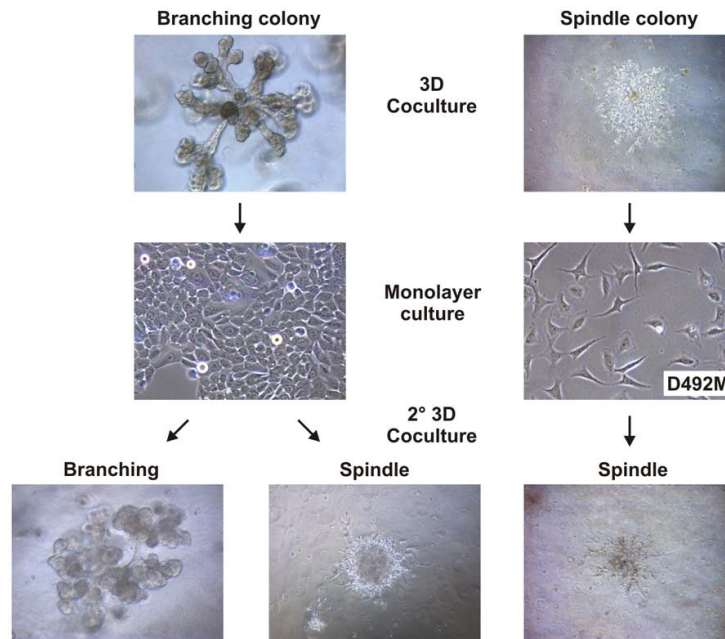
DNA methýlering spilar lykilhlutverk í þöggun á genatjáningu, genagreypingu og óvirkjun á X-litningi. Erfðir gallar í DNA-methýleringu og genagreypingu valda göllum í þroskun og auka áhættu á æxlismyndun. Nýlegar niðurstöður sýna að DNA-methýlering og litningabreytingar geta verið upphafsatburðir í æxlismyndun. DNA methýlering og litningabreytingar tengjast innbyrðis og RNA sem skráir ekki prótein tengir þessi tvö ferli (Polyak og Weinberg 2009).

1.4.3 D492 frumulínan

D492 frumulínan er brjóstapekjstofnfrumulína. D492 var einangruð frá frumum í hreiðri nálægt grunnhimnu (suprabasal niche) úr venjulegum brjóstskirtli og því næst gerð

ódaudleg með því að nota retróvírusarferju sem innihélt E6 og E7 æxlisgen frá HPV-16 sem er vörtuveira. Þessi frumulína hefur viðhaldið upprunalegri svipgerð sinni í frumurækt og getur sérhæfst og myndað greinótta formgerð í þrívíðri rækt með myndun á tvílaga þekju með bæði vöðvabekjufrumum og kirtilþekjufrumum. (Gudjonsson, Villadsen og fl. 2002; Fridriksdóttir, Villadsen og fl. 2005). Frumulínan getur einnig undirgengist EMT umbreytingu ef hún er ræktuð í samrækt í þrívíðu umhverfi með æðabelsfrumum (Sigurdsson, Hilmarsdóttir og fl. 2011). Slík bandvefsumbreytt afbrigði af D492 hafa verið einangruð og kallast nú D492M. M stendur þá fyrir „mesenchymal“ en það þýðir bandvefur. Í verkefninu eru einnig notaðar D492M1, D492M2 og D492E1, E stendur fyrir „epithelial“ en það þýðir þekjuvefur. D492M1 og D492M2 eru nýlega einangraðar bandvefsfrumulínur frá D492 og eru ekki jafn stöðugar og D492M. D492M2 er enn óstöðugri en D492M1.

Ef D492 frumum sem höfðu undirgengist greinótta formgerð var endursáð í tvívíðri rækt og ræktaðar aftur upp í þrívíðri rækt með æðabeli þá gátu þær bæði myndað greinótta formgerð og EMT. Ef hins vegar D492 bandvefsfrumurnar (D492M) sem höfðu undirgengist EMT var endursáð í tvívíðri rækt og ræktaðar upp í þrívíðri rækt þá gátu þær einungis myndað bandvefsfrumur, sjá mynd 4.



Mynd 4: Æðapæl örvar EMT og greinótta formgerð.

D492 þekjufrumur í samrækt með æðapeli. Til vinstri: D492 frumur sem höfðu undirgengist greinótta formgerð var endursáð í tvívíða rækt og ræktaðar upp með æðapeli í þrívíðri rækt. Þær mynduðu bæði greinótta formgerð og bandvefsfrumur sem höfðu farið í gegnum EMT ferlið. Til hægri: Sama var gert við D492M frumurnar en þær mynduðu einungis bandvefsfrumur (Sigurdsson, Hilmarsdóttir og fl. 2011).

D492M getur því ekki umbreytt aftur í þekjuvefsfrumu með greinótta formgerð, það er að segja hún virðist ekki undirgangast MET. Vitað er að í þessum frumulínum er miR200 fjölskyldan, miR205, miR203 og E-cadherin bæld þ.a. spurning er hvort að methýlering sé að stjórna þessum svæðum og það er það sem ég kannaði í þessu verkefni.

2. Aðferðir og efni

2.1 Frumurækt

Frumurækt er aðferð þar sem frumur eru ræktaðar undir stýrðum aðstæðum. Aðferðin felst í því að rækta og viðhalda lifandi frumulínum aðskildum frá upprunalegum vef sínum. Frumurnar eru ræktaðar við ákveðið hitastig, sérstakri gasblöndu og í sérstöku vaxtaræti svo eitthvað sé nefnt en ræktunarskilyrði fyrir hverja frumugerð eru mismunandi.

Frumulínur sem unnið var með voru D492M1, D492M2 og D492E1. Frumulínurnar voru sóttar í fljótandi nitur (-196°C) og þær spunnar niður í skilvindu í 3 mín á 2000 mín⁻¹. Floti var hent og frumurnar leystar upp í æti og þeim sáð í ræktarflöskur. Frumur voru ræktaðar á H14 æti, en það samanstendur af DMEM/F12 æti (Gibco) sem er blandað við vaxtarþætti og 50 IU/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, sjá töflu 1 (EGF er frá Peptotech, aðrir vaxtarþættir frá Sigma-Aldrich).

Tafla 1: Vaxtarþættir í H14 æti.

Vaxtarþættir eru mikilvægir svo að frumur geti vaxið og fjölgað sér.

H14	35 µl/ml	Upprunalegur styrkur	Endanlegur styrkur
Insulin (Ins)	4.38	2.0 mg/ml	250.00 ng/ml
Transferrin (Tf)	17.50	20.0 mg/ml	10.00 µg/ml
EGF	17.50	20.0 µg/ml	10.00 ng/ml
Na-Selenite (Na-Sel)	35.00	2.6 µg/ml	2.60 ng/ml
Estradiol (Est)	35.00	1.0*10 ⁻⁷ M	1.00*10 ⁻¹⁰ M
Hydrocortisone (Hydro)	35.00	1.4*10 ⁻³ M	1.40*10 ⁻⁶ M
Prolactine	35.00	150.0 IU	0.15 IU

Flöskurnar voru geymdar í hitaskápi við 37°C. Annan hvern dag eftir að frumurnar höfðu verið settar í rækt, þá var skipt um æti. Fylgst var með frumuræktinni með smásjá og eftir 5 daga voru frumurnar búnar að þekja botninn í öllum flöskunum og því tilbúnar fyrir DNA einangrun.

2.2 Einangrun og hreinsun DNA

Til að hreinsa frumurnar var 5 ml af Phosphate-buffered saline, PBS, bætt á frumurnar. PBS var síðar sogað í burtu og 1 ml af trypsíni sett út í. Trypsín rífur öll tengsl á milli frumna og losar frumurnar af botninum. Eftir 2-3 mínútna bið við 37°C var 4 ml af PBS bætt út í og öllu blandað saman með pípettu. Frumurnar voru skildar frá vökvanum með skilvindu og vökvinn var fjarlægður.

Til að einangra og hreinsa DNA var notað Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). Í kittinu var m.a. ethanol til þess að fella út kjarnsýrurnar og RNAsi til þess að brjóta niðri RNA. Framkvæmdin fór fram á litlum súlum, þannig að DNA var bundið á súlurnar en efnin sem við vildum losa okkur við fóru í botninn á eppendorf glasinu og var síðan hellt í burtu. Í lokin var DNA leyst af súlunni og styrkur þess mældur með ljósmæli við 260 nm bylgjulengd.

2.3 Meðhöndlun DNA með bísúlfíði

Bísúlfíð meðferð á DNA veldur því að cytósín umbreytist í urasil. Ef methyl hópur er á cytósíni, þá umbreytist það ekki í urasil. Með því að skoða DNA eftir meðhöndlun með bísúlfíði er seinna hægt að ráða fram úr methýleringarmynstri DNA.

Notað var EpiTect Bisulfide kit (QIAGEN) til þess að meðhöndla DNA með bísúlfíði. Það fól meðal annars í sér að umbreyta DNA með því að afmynda það með hitun og natríum bísúlfíð. Síðan var DNA látið á EpiTect súlu og þvegið með því að nota ákveðinn dúa og skilvindu. Þvotturinn er framkvæmdur til þess að hreinsa öll merki um natríum bísúlfíð.

2.4 Mögnun á DNA með Polymerase chain reaction, PCR

PCR aðferðin er ein af grundvallaraðferðum í sameindaerfðafræði og er notuð til að magna upp ákveðin svæði í erfðamenginu. PCR-mögnun getur verið liður í genaklónun, arfgerðargreiningu, raðgreiningu og öðrum rannsóknaraðferðum.

PCR fer fram við 3 hitastig. Upphafs DNA er hitað upp í 93-95°C en við það hitastig brotna vetnistenging sem halda DNA þáttunum saman þannig að DNA verður einþátta. Síðan er hitastigið lækkað í ca. 52-63°C en þá bindast vísar við DNA. DNA nýmyndunin á sér stað við 72°C. Eftir þetta ferli er búið að tvöfalda erfðaefnið sem var í upphafi. Endurtekning á ferlinu gefur næst 4 þætti og þar á eftir 8 þætti. Svona er hægt að halda áfram þangað til að nógu mikið magn af DNA hefur myndast til að vinna með. Þegar sýni er undirbúið fyrir PCR þá er búið til PCR lausn sem inniheldur oftast magnesíum, dúalausn, “forward” og “reverse” vísa, dNTP, hitaþolinn pólýmerasa og vatn. Magnesíum jónir í PCR blöndunni eru notaðar til að mynda komplexa við basapör, vísa og DNA þætti. Ef magnesíum styrkur er of lítill þá leiðir það til lítillar PCR afurðar en aftur á móti ef magnesíum styrkur er of mikill þá getur það valdið misþörun og PCR afurðin getur orðið ónákvæm. dNTP eru basar/kirni sem innihalda trífosfathóp og er raðað á einþátta DNA og fjölliðað með brottnámi pýrófosfats af pólýmerasa. Dúalausnin er notuð til þess búa til efnafræðilegt umhverfi sem hentar bæði fyrir virkni og stöðugleika DNA pólýmerans. Stundum er notuð dúalausn sem inniheldur magnesíum. “Forward”- og “reverse” vísar eru einþátta DNA bútar sem eru mótsvarandi 3’enda DNA svæðisins sem verið er að magna upp. Vísarnir bindast við ákveðið hitastig og passa það að DNA basaparist ekki saman aftur. Hitaþolinn pólýmerasi er ensím sem getur eftirmyndað DNA við hátt hitastig. Algengasti hitaþolni pólýmerasinn er Taq pólýmerasinn en hann hefur ekki viðgerðarvirkni og gerir því fleiri villur í eftirmynduninni. Oft er Taq pólýmerasa blandað saman við annan pólýmerasa t.d. Pfu sem hefur viðgerðarvirkni til þess að koma í veg fyrir villur.

Eftir að DNA hefur verið meðhöndlað með bísúlfíði þá verða DNA bútarnir minni en ella, einnig brotnar DNA þannig að mögnun verður erfðari. Til þess að fá sem bestar niðurstöður, er notað “touchdown” PCR. “Touchdown” PCR er miklu sértækara en

venjulegt PCR. Þá er ekki eitt fast hitastig fyrir bindingu vísa heldur er notað hitastigsbil. Þannig er hægt að tryggja að vísarnir bindist DNA í stað þess að láta þá bindast ósértækt og eiga á hættu á að fá óhreint og ónákvæmt PCR. Til þess að auka enn sértækni PCR hvarfsins er bæði keyrt PCR með ytri og innri vísam. Ytri vísarnir ná yfir stærra svæði á DNA heldur en innri vísarnir. Þessi PCR aðferð er kölluð “nested” PCR.

Staðsetning innri vísa sem notaðir voru fékkst úr áður birtum greinum (Wiklund, Bramsen og fl. 2011; Reinhold, Reimers og fl. 2007) en staðsetning ytri vísanna var hönnuð með Methprimer forriti (<http://www.urogene.org/methprimer/>). Hér fyrir neðan má sjá basaraðir hvers genasvæðis fyrir sig og hægt er að sjá magn CpG eyja í hverri röð. Staðsetning ytri vísanna eru í grænu lettri en innri vísanna í rauðu.

miR203, 65 CpG eyjar:

GAAGTTCCCTTTGAAGTGAGAGGGGCTGGGGTGGGTGTGTCCAGCCCAGCCCCACACCACCG
GAGAGCTAGCGCGGCCCTGGGCTCCTGTCTGGGGCGTGGTCCTCACCTGTTCCGGCCACCCTGGG
CCTCGACCCGGCCAAGGTGGAGCCCCGGGCCCTCCGTGCGCCCAGCACCCCCGGCCCAGACG
AGACGGTTCGGGCGTGGCCCGGCGGGGACCCA**GAACCCGGGAGGCCAGGTG**CGCCCAGGCCAG
GCGCTGGAGGCTGGGGCGCCGGATGGGGCGGGGCGCCGCTGAGTCAGGGCCACCCCCGCGCG
GGCGCGCGGAGCAGGTCCCCGGGCCGTGGAGGATCAGTCGCGGGACCTATGGGCCCGGGAGCC
GCCCCGCCCGAAAAACCGGTCTGGGCCAGCGCGGGCGGGGCACATTCCGGCGCCGGGAAGGGC
GGCTGCGCCGCATAAAAGGCGCCGCGCGCTGGCCACCGCCGCTCGGAGCTCAGCCGCCCTGC
CACGCGGGGCCCGCGGGACGAGGGGACGCCGGGGCCAGCGAGGACGCGGGCGGGGCTGGGCTT
GGCGGCTGGGATCCCCAGCGCCAGGCGAGGGCGTCTAAGGCGTCCGGTACGGCGTCGGGGCC
GGGTG**GCTGCAGCAGGGCAGGGG**TGCGCGACCAGCGGGGATCTGGGCGCAGGGGGCCGGTCCC
CGGGATCCGCAGGCGACGCGGGCGGTCCCAAGGGCGTCGGGGGCTCCTCTCTCCGCAGCTCGG
CGAACCGACGGTGTGGGGACTCGCGCG**CTGGGTCCAGTGTTCTT**AAACAG

E-cadherin, 15 CpG eyjar:

TCCAGCTTGGGT**GAAAGAGTGAGACCCATCTCCAAA**CGAACAAACAAAA**ATCCCAAAAA**
CAAAGAACTCAGCCAAGTGTAAGCCCTTCTGATCCCAGGTCTTAGTG[AGCCACCGGCGG
GGCTGGGATTCGAACCCAGTGGAATCAGAACCGTGCAGGTCCCATAACCCACCTAGACCCTAG
CAACTCCAGGCTAGAGGGTCACCGCGTCTATGCGAGGCCGGGTGGGCGGGCCGTCAGCTCCGC
CCTGGGGAGGGTCCGCGCTGCTGATTGGCTGTGGCCGGCAGGTGAACCCTCAGCCAATCAGC
GGTACGGGGGGCGGTGCCTCCGGGGCTCACCTGGCTGCAGCCACGCACCC**CCTCTCAGTGGCGT**
CGGAACTGCAAAGCACCTGTGAGCTTGCAGGAAAGTCAGTTCAGACTCCAGCCCGCTCCAGCCGG
CCCGACCCGACCGCACCCGGCGCCTGCCCTCGCTCGGCGTCCCC**GGCAGCCATGGGCCCTTGG**
AGCCGCAGC

miR200ba1, 17 CpG eyjar:

GGCCCCACAGAAGCCT**TCCATCCTGGCTTTTGTTC**AACTCGGTGGGCGGCAAGGTGGGGGCG
GGACGGAGTCTGCGGGGCCCTGCGGGGCCCGGGCCTGCGTCAACCGTCACTGGCCCGCCTCCCGCC
CGG**CCTATGGGAGCCAGGGGA**CACACCTGTCGGGGGCCAGGAGCGGAGATTGGCCAGCGGGA
GCTCGCACCTGTGTGGGGCGGGGAGCACTGCTCCTTGTAAGGCGAGCCCCCGCCGAGCCGGCTC
TTCCCTCCCGAGGCCCCACCTCGCCACCGCTCCCATTTGTCGGTCCGCTCGAACTCTCCCA
GAGACGGGCGAGTTGTCCACCTGTGCA**GGTCTGAACTGACTTCTGTG**CCAGGGCCTCGCCTGA
CGGGGGCAGGAAGCTCACCTTGCAGG

miR200ba2, 17 CpG eyjar:

GACGCAGAGGGAAGAACCTGAGTGCCCGCCAGGCCGAGCTCCGCACCCACCCCCGGCAGCC
TCTGACTCCCGGCTCGGCTCCCGCGGTCGGGGAGGGTTGGATTTACACTTTGTTCTCGAGGCC
GCACCATTGATTAAGCCCGTCGGGCAGGTTAACCAACAAGTTAGGTTTTACGCCGGGATCACA
TTCCTCGCCGGGCGCTCCACCCACCCAGCCTGTGCAGGTGGGACCCGGCCAGGCAGGCGGG
CAGGGCGGCCAGGTGCGCCGAGGGGCGCCTCCACGGGGAGTGTGCTCCGCAGAGAACCCTTG
CTGGGGCGGCTCTGGGCCTCTGACTCACTCTGGATTTCCCAAGCTGAGTCTGGCCCCGCGGT
GATGATTAACCAACACCTCAACCGG

miR205, 8 CpG eyjar:

CACTGTCTGTCTGTGCAGCAGGTGCAAGGACGTGTTGAACTAGCTCTCTGCAGCCTCCTTGAG
GATGTGATCCTATGGGAGGGGTAGGAGTATTCAGGTCCTTGACATCTCCAAATGTGTGATTCC
GGGATGCCAAAGGCCTTTGGCCAGGTAATGCAGTGTCTACAGGCTGAGGTTGACATGCATCCCC
ACCTCTGAGAAAAAGATCCTCAGACAATCCATGTGCTTCTCTTGTCTTCATTCCACCGGAGTC
TGTCTCATAACCAACCAGATTTCAAGTGGAGTGAAGTTCAGGAGGCATGGAGCTGACAACCATGA
GGCCTCGGCAGCCACCGCCACCACCGCCGCCACCACCGTAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCAGCAGCAGCAGCAAGAGTAACTCTGACTTAGGAATAGAGACAGCCAGAGAGAAATG
TGATCAATGAAGGAGACATCTGGAGTG]TGCGTGCTTCTCAGAGGGACGGGTGATGGGCAGAT
TGAAAAAGCACCAGATGGGAACCTTAATCTTTCTT

miR200c, 16 CpG eyjar:

GCACCCACTCTCTGGGGGCAGGTGGGCCCGGTGACAGGTAAGGCCACCAGGGGAGAGGTCTT
GGGCTGAGCTTGGGACTGCAGAGGGGGATGAGGGTGGGTAATCGGTGTGTGTCGCGGGTTCG
GGAAAGGCTGCCGGGGGTAGGGGAAGGTGGCTCAGAGGCGGGCGGGCCGACGGTCGAGGGGCT
TCGGAGGGCCTGCTTGGACTGCAACCTGGGCCTCGTGATCAGCGACCCAGGGTGTGGCTGGTGG
CGGGCAGCAGGGCTCACCAGGAAGTGTCCCCAGGGACTCGGGTGGTGGGGGGATGGGAGCCAG
GGATCTGCAGCTTTTCCGCAGGGATCTGGGCCTGAAGCTGCCTGACCCAAGGTGGGCGGGCTG
GGCGGGGGCCCTCGTCTTACCCAGCAGTGTGGGTGCGGTTGGGAGTCTCTAATACTGCCGGG
TAATGATGGAGGCCCTGTCCCTGTG

Ytri hvörf fyrir PCR voru fyrst undirbúin. PCR blöndur fyrir miRNA svæðin voru búnar til, sjá töflu 2. Hvert miRNA svæði er með mismunandi blöndu því ekki eru sömu vísarnir notaðir í blöndunum. Öll framkvæmdin fór fram á ís þar sem hitastig getur m.a. haft áhrif á vísa og DNA. Þegar blandan var tilbúin var hún sett í PCR glös en þar var búið að setja DNA frá hverju sýni. Farið var með PCR glösin í PCR tækið til þess að magna bútana upp. Mismunandi hitaprógramm var notað fyrir svæðin vegna mismunandi CG hlutfalls í vísunum. Öll hvörfín voru keyrð á grunn PCR hitaprógrammi, sjá töflu 3, en svo voru notuð breytileg hitastig þar sem vísarnir bindast DNA, sjá töflu 4. Eftir að búið var að magna upp fyrir ytri hvörfín voru innri hvörfín mögnuð með PCR afurð frá ytri hvörfunum. Sama PCR blanda var notuð og sýnd er í töflu 2 en þá voru vísar fyrir innri hvörfín notaðir. Lokaafurðir sem notaðar voru áfram í raðgreiningu voru innri hvörfín (Taq polymerasi, dNTP, dúi og Mg^{2+} eru frá Fermentas, vísar frá TAG Copenhagen).

Tafla 2: PCR blanda fyrir ytri og innri hvörf.

Fyrst er blanda fyrir ytri hvörfín búin til og bísúlferað DNA notað. Fyrir innri hvörfín er hins vegar tekið 1µl frá ytri blöndunni og blandað við innri blönduna. Þessi blanda er fyrir 1 sýni.

Efni	µl fyrir eitt sýni
Mg ²⁺ (25 mM)	5.00
H ₂ O	14.88
10x Dúi	2.50
Vísar F+R (0.4 µM)	1.00
dNTP (10 mM)	0.50
TaqPol (5 U/ml)	0.12
DNA	1.00
Heild	25.00

Tafla 3: Öll sýnin voru keyrð á grunn PCR hitaprógrammi.

Breytilegt er við hvaða hitastig vísarnir bindast vegna mismunandi CG hlutfalls. X stendur fyrir breytileikann en lesa má úr töflu 4 hvaða hitastig á að vera fyrir hvert par af vísun. Í skrefi 2 lækkar hitastigið um 0.5 í hverjum hring þannig að það lækkar um 11°C alls.

Skref	Hitastig [°C]	Tími	
1	95	5 mín	
	95	30 sek	
2	X	30 sek	22 hringir
	og -0.5 í hverjum hring		
	72	30 sek	
	94	30 sek	
3	X	30 sek	20 hringir
	72	30 sek	
4	72	7 mín	
	4	∞	

Tafla 4: Bindihitastig vísa fyrir hvert miRNA svæði.

Breytilegt er við hvaða hitastig vísarnir bindast.

Ytri hvörf	Fyrri 22 hringir [°C]	Seinni 20 hringir [°C]
miR200ab1	57	48
miR200ab2	57	48
miR200c	63	54
miR203	61	52
miR205	57	48
E-cadherin	61	52
Innri hvörf		
miR200ab1	61	52
miR200ab2	61	52
miR200c	58	49
miR203	63	54
miR205	57	48
E-cadherin	63	54

2.5 Rafdráttur í agarósaflaupi

Rafdráttur er aðferð til að aðskilja prótein eftir lengd, hleðslu eða stærð og til að aðskilja kjarnsýrur eftir lengd til þess að ákvarða stærð. Aðferðin byggist á því að hlaðnar agnir færast í átt að andstætt hlöðnu skauti í rafsviði. Sameindirnar eru dregnar í gegnum hlaupkennt efni sem myndar eins konar sigti eða net en þessi efni eru yfirleitt annað hvort agarósi eða pólýakrýlamíð. Ethidíum brómíð er bætt í hlaupið til þess að gera DNA sýnilegt en það binst inn á milli basapara í DNA helix. Þegar búið er að rafdraga má greina DNA bútana með útfjólubláu ljósi, en þeir mynda eins konar bönd.

Búið var til 2% agarósaflaup með því að blanda 1 g af agar og 50 mL af 0.5xTBE dú (Tris/Borate/EDTA). Styrkur hlaupsins var valinn eftir stærð DNA bútanna sem voru rafdrengir. Lausnin var hituð í örbylgjuofni í 2 mín og látin sjóða til að losna við kristalla. Lausnin var kæld, 3 µl af ethidium brómið var bætt út í og blandað saman við. Blöndunni var hellt í mót með greiðu og látin storkna. Hlaupið var fært yfir í rafdráttartæki, þar sem greiðan var tekin úr hlaupinu og sýni sett í brunna. Einnig var 1 kb stigi settur til viðmiðunar (Fermentas). Rafdráttur var settur af stað við 60V spennu í 45 mín. DNA sem er mínus hlaðið dregst að plús hlaðna skautinu. Til að lesa úr hlaupinu var það sett undir UV-ljós þannig að böndin sáust.

2.6 Raðgreining

Til að greina röð basa í erfðaeftirmyndun er notuð aðferð sem er kölluð raðgreining. Raðgreining byggist á því að eftirmynda DNA. Þetta er ekki eins og gert er í PCR aðferðinni heldur eru notuð venjuleg kirni ásamt dídeoxý kirnum sem eru flúormerkt þannig að eftirmyndunin stoppi alltaf þegar flúormerkt kirni tengist þættinum. Dídeoxý kirni hafa –H í staðin fyrir –OH á þriðja kolefni sykrunnar en það veldur því að pólýmerasinn getur ekki tengst og eftirmyndun stöðvast. Hvert dídeoxý kirni hefur sinn flúormerktan lit. Flúormerkingin sýnir á hvaða kirni eftirmyndunin stöðvast. Að lokum fást allar mögulegar styttri útgáfur af bútnum vegna þess að ddNTP er sett inn á tilviljanakenndum stöðum. Raðgreiningar hvarfið fer fram í PCR vél. Til að lesa úr raðgreiningunni er notaður raðgreinir. Raðgreinirinn virkar þannig að hárpípur sem eru með leysigeisla á endanum draga sýni upp í sig og rafdraga það í pípunum. Tækið nemur hvaða flúormerkti hópur er næstur í röðinni þegar sýnið fer fram hjá leysigeislanum. Þannig skilar tækið frá sér kirnaröðinni ásamt grafískri mynd.

ExoSAP blanda var gerð en blandan hreinsar PCR afurðir fyrir t.d. raðgreiningu. Blandan inniheldur Exonúkleasa I og Shrimp alkaline phosphatasa, SAP (Fermentas). Exonúkleasinn brýtur niður vísa en SAP fjarlægir dNTP.

Um 2 μl af afurðum úr innra hvarfi PCR voru meðhöndlaðir með ExoSAP blöndu, sjá töflu 5. 6 μl af blöndu var blandað saman við PCR afurðirnar og keyrt á PCR hitaprógrammi, sjá töflu 6. Í hitaprógramminu er ExoSAP blandan látin blandast við afurðina í 37°C en síðan er blandan gerð óvirk í 72°C en þetta kemur í veg fyrir að eitthvað af sýni geti tapast.

Tafla 5: ExoSAP blanda.

Blandan undirbýr sýnin fyrir raðgreiningu.

Efni	μl
H ₂ O	5.98
10x SAP dúi	0.80
Exonúkleasi 1 (20 U/ μl)	0.02
SAP (1 U/ μl)	0.20
Heild	6.00

Tafla 6: Hitaprógramm fyrir ExoSAP hvarf.

Við 37°C er ensímið í dúanum virkt en við 72°C er það gert óvirkt.

Hitastig[°C]	Tími [mín]
37	60
72	15
4	∞

Eftir ExoSAP keyrsluna var raðgreiningar blanda búin til, sjá töflu 7. Notast var við raðgreiningar blöndu sem innihélt m.a. vísa, ddH₂O og flúormerkt kirni (BDT mix frá Applied Biosystems). 1.5 μl af ExoSAP afurð var blandað saman við 8.5 μl af raðgreiningarblöndunni og keyrt á hitaprógrammi, sjá töflu 8, í PCR tæki.

Tafla 7: Raðgreiningarblanda.

BDT stendur fyrir big dye terminator. Nauðsynlegt er að blanda ExoSAP lausn við raðgreiningarblönduna til þess að fá niðurstöður úr raðgreiningartæki.

Efni	μl
PCR reaction	1.50
5xBDT dúi	2.00
Vísar (0.4 μM)	0.25
BDT mix	1.00
dH ₂ O	5.25

Tafla 8: Hitaprógramm fyrir raðgreiningu.

DNA er magnað upp þannig að eftirmyndun stöðvast alltaf á dídeoxíð kirnum og þannig má greina basaröð DNA bútsins.

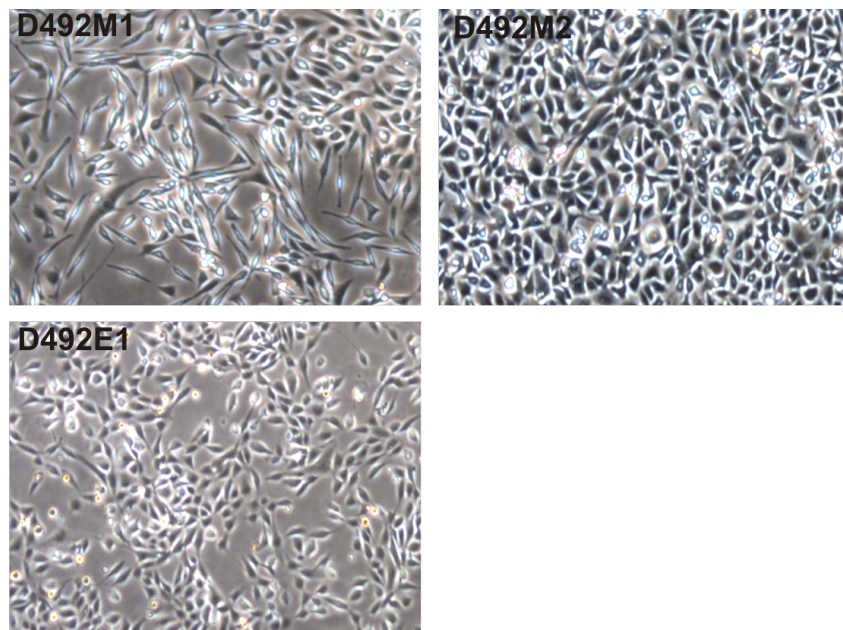
Skref	Hitastig[°C]	Tími [sek]	
1	95	60	
	95	10	
2	55	5	25 hringir
	60	240	
3	4	∞	

15 μl af 42 mM EDTA var bætt í PCR glösin og það allt sett saman í eppendorf glös, samtals 25 μl. 62 μl af 96% ethanóli var bætt út í, vortexað og sett í 30 mínútur í skilvindu við 3500 g. Ethanólinu var síðan hellt af og bætt var 120 μl af 70% ethanóli og þetta var sett í skilvindu í 15 mínútur við 3500 g. Ethanólinu var hellt af og glösin þurrkuð. Þegar allt ethanólið var gufað upp voru sýnin leyst upp í 15 μl af formamíði áður en þau voru sett í raðgreiningartækið. Einnig voru sýnin færð yfir í raðgreiningarglös. Til að lesa úr raðgreiningunni var notað forritið CodonCode Aligner.

3. Niðurstöður

3.1 D492E1 frumur eru teningslaga en D492M1 og D492M2 frumur eru ílangar

Með smásjá var hægt að sjá hversu vel frumurnar uxu og lögun þeirra. Frumurnar uxu vel á æti og þá sérstaklega D492M2 en þar voru frumurnar orðnar frekar þéttar eins og sjá má á mynd 5. Erfitt er að sjá lögun frumanna en D492M1 og D492M2 voru ílangar (spindle-like) en D492E1 var teningslaga. Frumuræktunin staðfesti svipgerð frumanna og því var hægt að halda áfram og einangra DNA úr frumunum.



Mynd 5: Smásjármyndir staðfesta að D492E1 frumur eru teningslaga en D492M1 og D492M2 frumur eru ílangar.

D492M2 frumurnar uxu heldur mikið þannig að erfitt er að sjá lögun þeirra á myndinni sjálfri. En greinilegur munur er á lögun milli D492M1 og D492E1 þar sem D492E1 er með teningslaga lögun en D492M1 er með ílanga lögun.

3.2 Mögnun tókst fyrir genasvæðin miR200c, miR200ba1, miR200ba2, miR205 og miR203

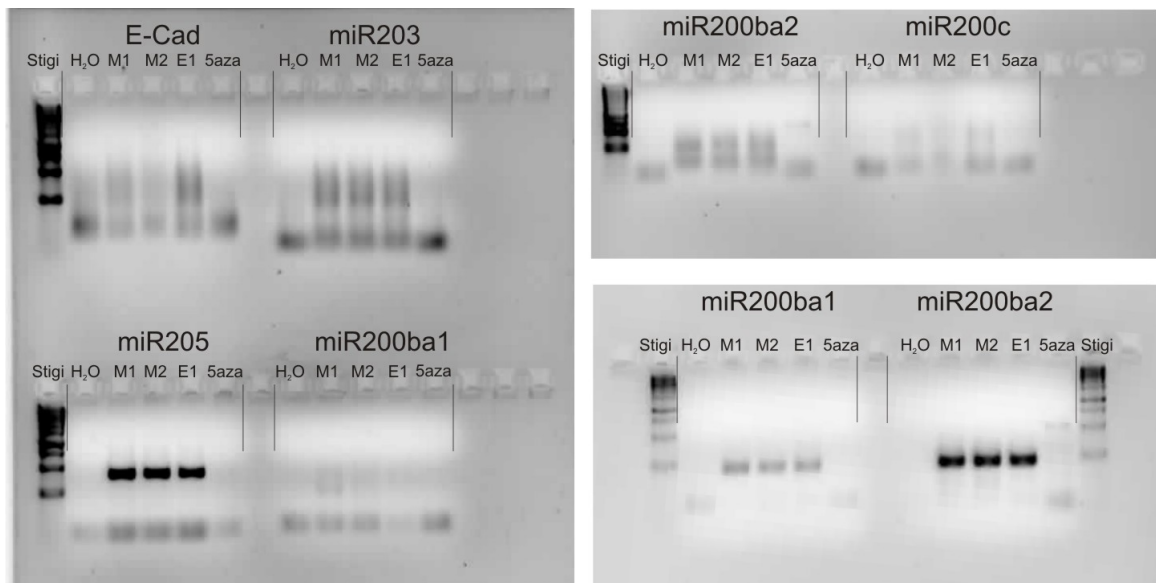
DNA var hreinsað og magn þess mælt í ljósgleypnimæli áður en reynt var að magna það upp. Í töflu 9 er magn hreinsaðs DNA sýnt.

Tafla 9: Magn hreinsaðs DNA.

OD segir til um hreinleika DNA en hreint DNA hefur hlutfall $A_{260/280} = 1.8$. Ef hlutfallið væri lægra en 1.8 þá væri DNA mengað af próteinum.

Sýni	ng/ μ l	OD ($A_{260/280}$)
D492M1	194.2	1.94
D492M2	1834.2	1.97
D492E1	271.4	1.94

Það gekk mjög erfiðlega að magna upp miRNA genasvæði í bísúlfíð meðhöndluðu DNA. Í upphafi var PCR mögnun aðeins framkvæmd á bísúlfíð-DNA úr D492M1, D492M2 og D492E1 en síðar var bísúlfíð-DNA úr upprunalegu línunum D492 og D492M einnig magnað. Einnig voru tvö sýni notuð til viðmiðunar en annað var vatnssýni en hitt var 5aza DNA en það er DNA sem hefur verið meðhöndlað með 5aza (5-azacytidin) en það tekur alla methýleringu af. Engin bönd ættu að koma fyrir vatnssýnið og 5aza DNA. Fyrst tókst einungis að magna upp búta fyrir miR205 genasvæðið með aðferðinni sem lýst var í aðferðafræðikaflanum en aðferðin var endurtekin og þá fengust bönd fyrir miR200ba1 og miR200ba2, sjá mynd 6.



Mynd 6: Mögnun tókst á miR205 og miR200ba2 genasvæðunum.

Bönd fengust fyrir miR205, miR200ba1 og miR200ba2. Í hinum sýnunum sjást aðeins vísar.

Til að magna upp DNA fyrir miR203, miR200c og E-cadherin var mismunandi blanda af PCR blöndu prófuð. Fyrir miR200c var magnesíum styrk breytt og DNA var þynnt, sjá töflu 10, en engin bönd birtust, mynd 7.

Tafla 10: Magnesíum styrk breytt.

Lausnir A-E sýna hvernig styrk magnesíums var breytt.

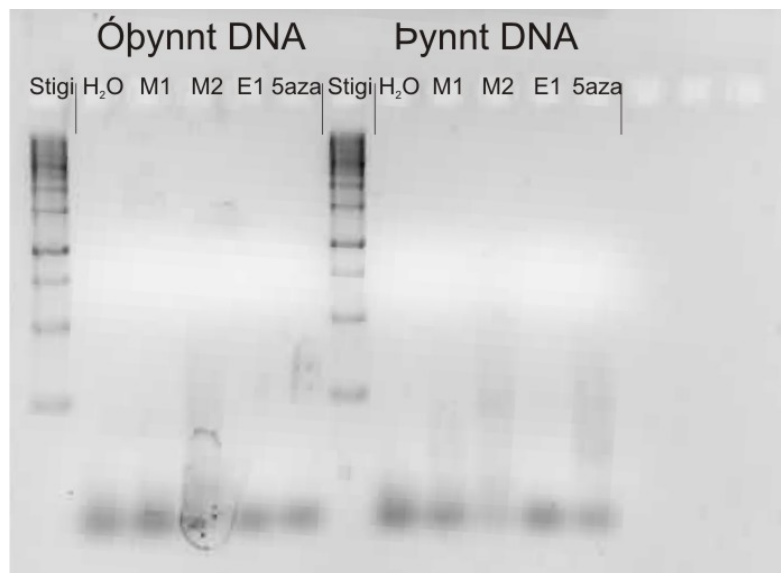
Efni	µl fyrir eitt sýni	Lausn A	Lausn B	Lausn C	Lausn D	Lausn E
Mg ²⁺ (25 mM)	5.00	3.00	4.00	5.00	6.00	7.00
H ₂ O	14.88	16.88	15.88	14.88	13.88	12.88
10x dúi án Mg	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
PrímF+R (0.4 µM)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
dNTP (10 mM)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
TaqPol (5 U/µl)	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
DNA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Heild	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00



Mynd 7: Mögnun tókst ekki fyrir miR200c genasvæðið eftir að magnesíum styrk var breytt.

Það var rafdreigið fyrir bæði þynnt og óþynnt DNA úr D492M1 en þynnta DNA-ið var blandað 50/50 við vatn.

Þetta var einnig gert fyrir E-cadherin og miR203, sjá mynd 8, en þar komu heldur engin bönd fram.



Mynd 8: Mögnun tókst ekki fyrir miR203 genasvæðið eftir að magnesíum styrk var breytt.

Rafdregið var fyrir þynnt og óþynnt DNA úr D492M2. Þynnta DNA-ið var blandað 50/50 við vatn.

Prófaðar voru nýjar lausnir fyrir PCR blöndunina, blandaðir nýir vísar, DNA fyrir innra PCR þynnt en engin bönd birtust fyrir þessi þrjú svæði sem átti eftir að magna upp. Hitaprógrammið fyrir E-cadherin og miR203 var breytt og prófað var að keyra miR203 ytra hvarfið þannig að fyrri 22 hringirnir byrjuðu í 53°C en seinni 20 hringirnir væru í 50°C. Ytra hvarfið fyrir E-cadherin byrjaði í 55°C í fyrri 22 hringjunum en var lækkað í 50°C í seinni 20 hringjunum. Innra hvarfið fyrir miR203 og E-cadherin var keyrt á sama hitaprógrammi og áður en án árangurs.

Næst var prófað að taka öll sýnin fyrir öll miRNA genasvæðin og reynt að magna upp. Ný PCR blanda var búin til, sjá töflu 11, þar sem notaður var 10x dúi með Mg^{2+} og Taq pólýmerasanum var blandað 50/50 við Dream Taq pólýmerasa (Fermentas). Þar sem lítið var eftir af bísúlfíð-DNA voru einungis notaðir 0.5 μ l. Gerð var eins blanda fyrir innri hvörfin nema að 1 μ l frá ytra hvarfinu var notaður í stað DNA.

Tafla 11: Ný PCR blanda fyrir ytri hvörf PCR.

Það var einungis notaðir 0.5 μ l af DNA vegna þess hve lítið var eftir.

Efni	μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.0
H ₂ O	5.8
Dúi 10x með Mg	1.0
Vísar F+R (0.4 μ M)	0.6
dNTP (10 mM)	1.0
TaqPol (5 U/ μ l)+ Dream Taqpol (5 U/ μ l)	0.1
DNA	0.5
Heild	10.0

Tafla 12: Ný PCR blanda fyrir innri hvörf PCR.

Þynnt var ytri blönduna með 20 μl af vatni og síðan var tekið 1 μl af DNA úr ytri blöndunni fyrir innri blönduna.

Efni	μl
MgCl ₂ (25 mM)	1.3
H ₂ O	7.3
Dúi 10x með Mg	1.3
Vísar F+R (0.4 μM)	0.7
dNTP (10 mM)	1.3
TaqPol (5 U/ μl) + Dream Taq pol (5 U/ μl)	0.1
DNA	1.0
Heild	13.0

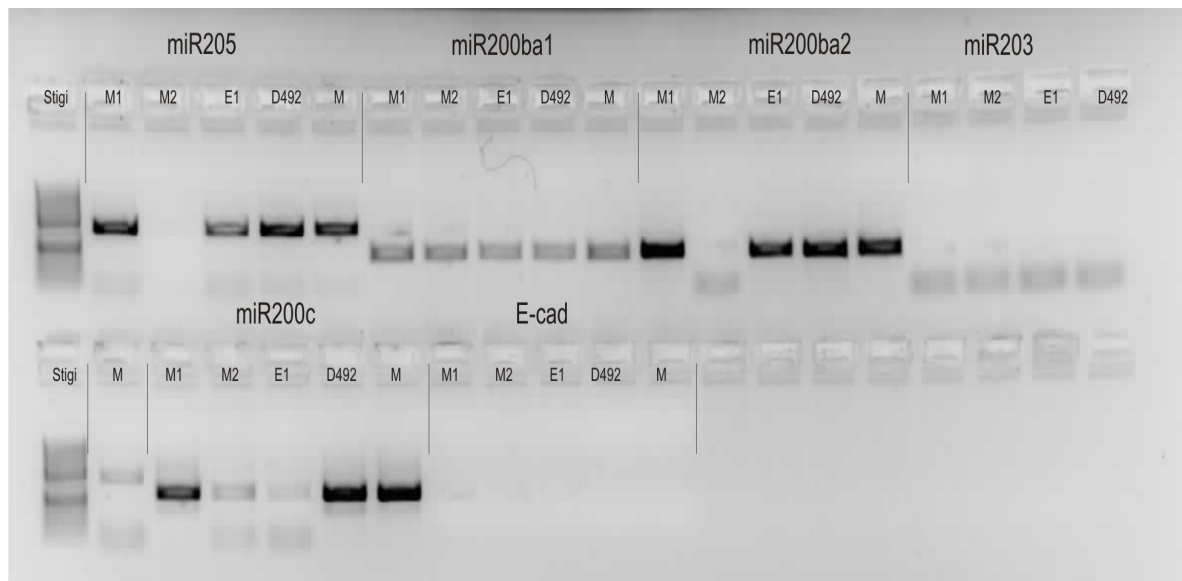
Grunnhitaprógramminu var einnig breytt, sjá töflu 13, þar var fyrri hringjum fækkað úr 22 í 20. Auk þess voru gerðar lagfæringar á tíma hvers skrefs í prógramminu. Öll sýnin voru keyrð á sama hitaprógramminu.

Tafla 13: Nýtt hita prógramm fyrir mögnun.

Öll svæðin voru keyrð á sama prógrammi. Fækkað var úr 22 hringjum í 20 hringi þannig að hitastigið lækkar aðeins um 10°C. Prógrammið keyrt bæði fyrir ytri og innri hvörf.

Skref	Hitastig [°C]	Tími [sek]	
1	95	60	
	95	15	
2	60	15	20 hringir
	og -0.5°C í hverjum hring		
	72	30	
	95	15	
3	50	15	20 hringir
	72	30	
	72	420	
4	4	∞	

Loksins fengust bönd eftir rafdrátt, sjá mynd 9. Mögnun tókst fyrir miR200c og svæðin 3 sem þegar höfðu verið mögnuð upp. Að vísu átti eftir að magna upp D492 og D492M þannig að mögnun fyrir miR205, miR200ba1 og miR200ba2 var lokið. miR200c mögnunin var ekki alveg fullkomin þar sem dauf bönd birtust fyrir D492M2 og D492E1 en seinna kom í ljós að ekki var hægt að raðgreina böndin. Einnig átti eftir að ná að magna DNA fyrir E-cadherin og miR203 en lítið DNA var eftir.



Mynd 9: Mögnun tókst fyrir genasvæðin miR200c, miR205, miRba1 og miRba2.

Á myndinni vantar D492M2 fyrir bæði miR205 og miR200ba2 en það hafði áður verið magnað svo það kom ekki að sök. Hjá miR203 virðist D492M hafa náð einhverri mögnun en bandið var of dauft fyrir raðgreiningu. Annars sjást aðeins vísar hjá miR203 þannig að binding vísa við DNA hefur ekki tekist. Engin bönd né vísar sjást hjá E-cadherin.

Aftur var prófað nýtt hitaprógramm, tafla 14, en sömu blöndur og sýndar voru í töflum 2 og 3 voru notaðar. Hitaprógrammið var nánast eins og í töflu 13 nema hitastigi þar sem binding vísa á sér stað var breytt. Öll sýnin fyrir hvert svæði voru keyrð á nýja prógramminu (tafla 14).

Tafla 14: Hitastigi þar sem binding vísa fer fram breytt.

Þetta er nánast sama tafla og tafla 13 nema að hitastigi þar sem vísar bindast er breytt. Einnig er breytt lækkunin á hitastiginu en hitastigið lækkar aðeins um 0.4°C í hverjum hring.

Skref	Hitastig [°C]	Tími [sek]	
1	95	60	
	95	15	
2	63	15	20 hringir
	og -0.4°C í hverjum hring		
	72	30	
	95	15	
3	55	15	20 hringir
	72	30	
4	72	420	
	4	∞	

Mögnunin tókst alls ekki og sáust einungis vísar fyrir miR203 í gelinu.

Mögnun fyrir miR200c, E-cadherin og miR203 var aftur gerð með svipaðri PCR blöndu og í töflu 11 nema minna var af vísunum en meira af pólýmerasa og vatni. Þessi blanda var notuð bæði fyrir innri og ytri hvörf. PCR hitaprógrammið var aðeins breytt frá töflu 4 en ytri hvörfin voru keyrð á 61°C í fyrri 20 hringjunum og 52°C í seinni 20. Innri hvörfin voru keyrð á 63°C í fyrri 20 en 54°C í seinni 20 hringjunum. Engin bönd mynduðust.

Næst var reynt að prófa PCR blöndu sem fékkst frá DeCode, sjá töflu 15. Í töflu 16 sést hvernig loka PCR blandan var undirbúin. Þynna þurfti D492M2, D492 og D492M með vatni. Það var u.þ.b. 1 µl eftir í D492M2 og D492M en nánast ekkert í D492.

Tafla 15: DeCode blanda.

Það er sérstaklega erfitt að magna upp CG rík svæði og miR203 er með mörg slík svæði. Blandan inniheldur m.a dímethýl súlfoxíð og betaine en þau rífa í sundur DNA þannig að auðveldara verður að magna upp genasvæðin.

Efni	ml
Taq dúi (með $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	1.000
MgCl ₂ (250 mM)	0.992
Betaine (5 M)	1.260
dNTP (2 mM)	1.000
Dímethýl súlfoxíð	0.500
Taq pólýmerasi (5 U/ μ l)	0.141
Heild	4.893

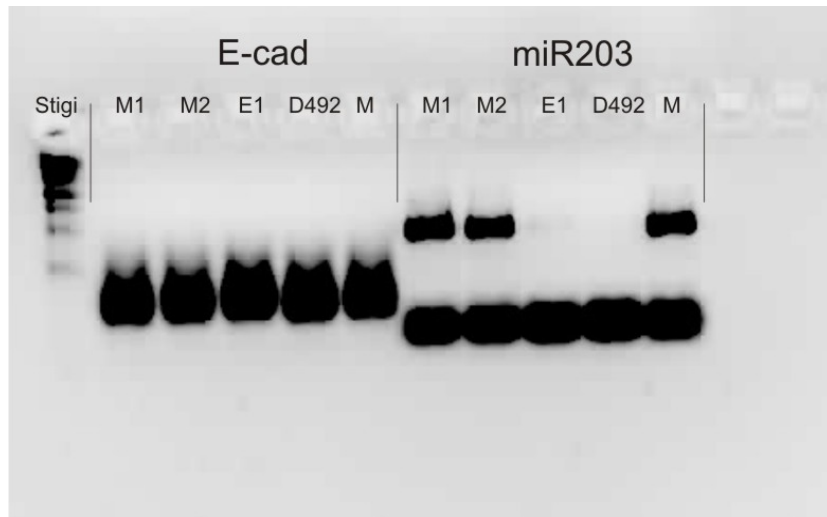
Tafla 16: PCR blanda með DeCode blöndu.

Í blöndunni frá DeCode er pólýmerasi, dNTP o.fl. (sbr. Tafla 15).

Efni	μ l
H ₂ O	9
DeCode blanda	8
Vísar F+R (0.4 μ M)	2
DNA	1
Heild	20

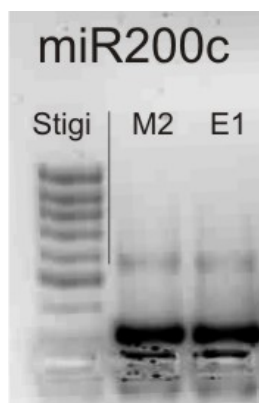
Sýni fyrir E-cadherin og miR203 voru blönduð með þessari blöndu og keyrð á grunn PCR hitaprógrammi, tafla 3 Fyrri 22 hringirnir voru keyrðir á 61°C en þeir seinni á 52°C. Sama blanda var notuð fyrir innri hvörfin og þau voru einnig keyrð á grunn PCR prógramminu nema við 63°C í fyrri 22 hringjunum og 54°C í seinni 20 hringjunum.

Loksins tókst mögnun fyrir miR203. Bönd fyrir D492M1, D492M2 og D492M birtust, sjá mynd 10. Einungis sjást vísar hjá E-cadherin.



Mynd 10: Mögnun tókst fyrir D492M1, D492M2 og D492M fyrir miR203 genasvæðið. Mögnun tókst fyrir D492M1, D492M2 og D492M. Líklegast er að mögnun fyrir D492 hafi ekki tekist vegna þess að DNA var nánast búið. Hjá E-cadherin eru engin bönd heldur aðeins vísar. DMSO veldur því að böndin verða rosalega upplýst.

Sama aðferð var notuð til að magna miR200c hjá D492M2 og D492E1, nema hitastigi var aðeins breytt. Keyrt var á grunn PCR prógrammi en ytra hvarfið var keyrt við 63°C í fyrri 22 hringjunum en 54°C í seinni 20. Í innra hvarfinu var keyrt við 58°C í fyrri 22 hringjunum en við 49°C í seinni 20. Mögnunin tókst og má sjá greinileg bönd á mynd 11.

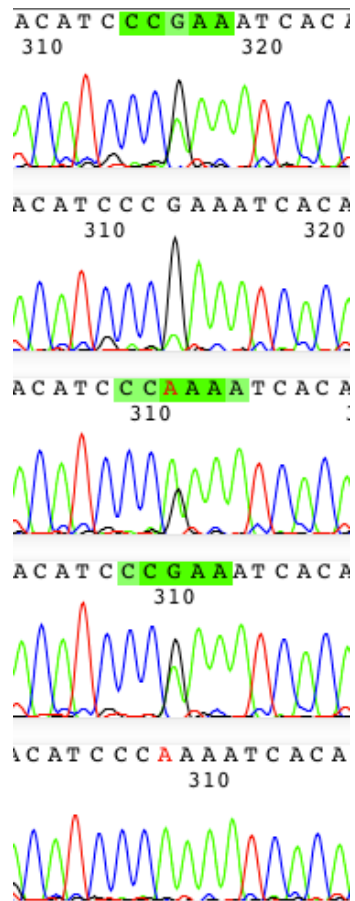


Mynd 11: Mögnun tókst fyrir D492M2 og D492E1 fyrir miR200c genasvæðið. Böndin líkjast vísur í fyrstu en eru í raun DNA bönd sem eru í kringum 300 basapör.

3.3 Bandvefsfrumur virðast vera meira methýleraðar en þekjufrumur í D492 brjóstastofnfrumulínunni

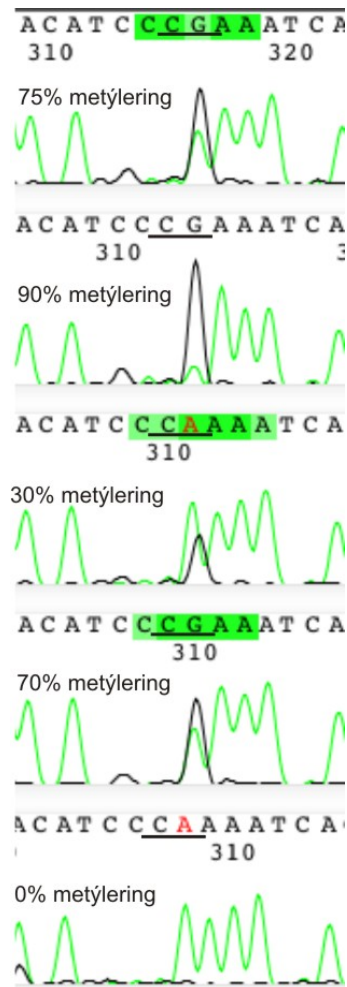
Raðgreiningin gekk ágætlega fyrir sig. Einungis þurfti að gera eina breytingu frá raðgreiningaraðferðinni en breyta þurfti PCR hitaprógramminu, sjá töflu 3. Breytingin fólst í því að hitastig fyrir bindingu vísa var lækkað úr 55°C í 50°C.

Hægt er að fá niðurstöðurnar á grafisku formi, sjá mynd 12. Þar sést basaröðin fyrir hvert svæði í DNA. Kanna átti metýleringu á CpG eyjum. Á mynd 13 sést að hægt er að fá einfaldari niðurstöður frá raðgreiningartæki þannig að hægt sé að skoða methýleringuna betur.



Mynd 12: CpG eyja í raðgreiningu.

Hér sjást basaraðir fyrir mismunandi frumulínur. Græna merkið yfir basana þýðir að það sé breyting á milli raðanna, en það passar þar sem þarna er CpG eyja sem er með mismunandi methýleringarmynstur. Rauða línan táknar thymín, bláa er fyrir cytosín, svarta er fyrir gúanín og sú græna er fyrir adenín.



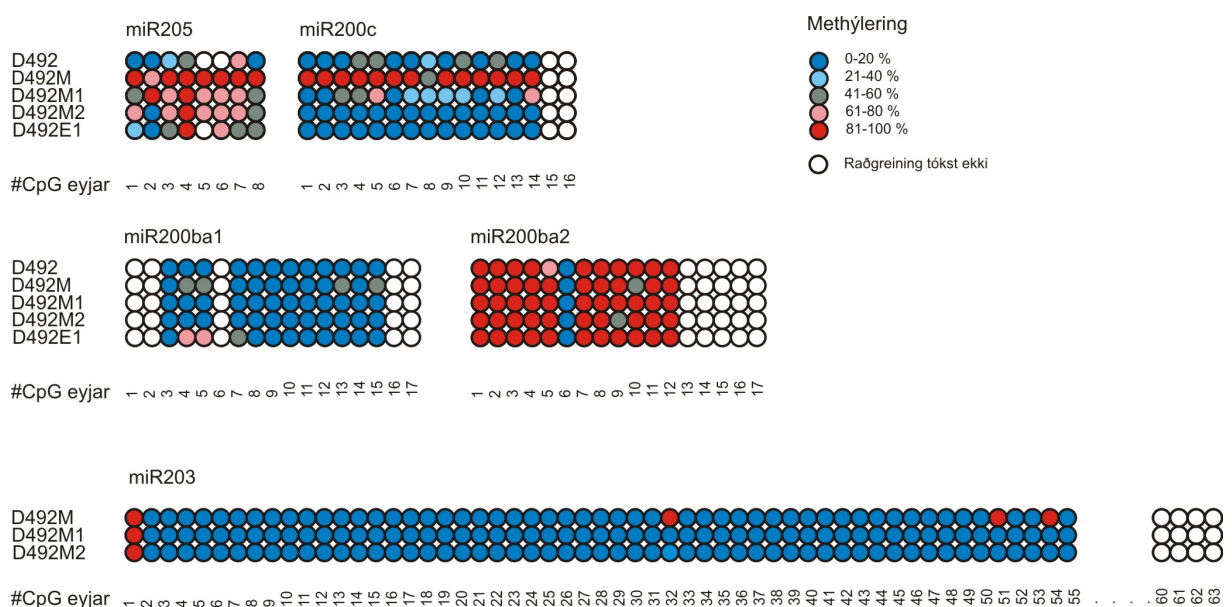
Mynd 13: Túlkun á styrk methýleringar.

Hér sést CpG eyja sem er mismunandi methýleruð eftir því á hvaða sýni er horft á. Horft er á hlutfall á milli G (gúanín) og A (adenín) til að meta methýleringuna. Á neðstu myndinni er t.d. engin methýlering en á næst efstu myndinni er 90-100% methýlering.

Niðurstöður úr raðgreiningu voru teknar saman og settar í kúlulíkan, sjá mynd 14. Á genasvæðunum miR203 og miR200ba1 er almennt nánast engin methýlering og örlítill methýlering er á miR200c genasvæðinu. Á miR200ba2 genasvæðinu er mikil methýlering og einnig er mikil methýlering á miR205 genasvæðinu. Nánast enginn munur er á methýleringarmynstri milli frumulínanna á genasvæðum miR203, miR200ba1 og miR200ba2. Hins vegar má sjá mun á methýleringarmynstri hjá frumulínunum á miR200c og miR205 genasvæðunum. Eins og sést á mynd 14, má sjá að á genasvæði miR205 er D492M í heild með meiri methýleringu en D492. D492M1 og D492M2 eru báðar með meiri methýleringu en D492 og minni methýleringu en D492M, og er D492M1 nær

D492M en D492M2 nær D492. D492E1 hefur heldur meiri methýlingu en D492. Þetta getur passað við að skýringu á bældri tjáningu miR205 tengist methýlingu og gæti einnig skýrt af hverju D492M hefur svo stöðuga svipgerð.

Á miR200c genasvæðinu er D492M mikið methýlerað en mun minni methýling er á D492 frumulínunni. D492M1 er aðeins methýlerað en engin methýling er á D492M2 og D492E1. Þessi munur á methýlingu á genasvæði miR200c gæti, svipað og rætt var um fyrir miR205, einnig átt þátt í að skýra af hverju D492M hefur svo stöðuga svipgerð.



Mynd 14: D492M er yfirleitt meira methýlerað en D492.

Á myndinni sést að það er nánast engin methýling á miR200ba1 en hins vegar er mikil methýling hjá miR200ba2. Ef myndin er skoðuð vel þá sést að D492M er í flestum tilfellum alltaf meira methýlerað en D492 sem þar sem er nánast engin methýling nema í miR200ba2. Einnig sést að D492M1, D492M2 og D492E1 eru yfirleitt ekki eins methýleruð og D492M en samt meira methýleruð en D492.

Ekki tókst að magna E-cadherin upp og því eru engar niðurstöður um DNA methýlingu á því genasvæði.

4. Umræður

Í þessari rannsókn hef ég kannað methýleringar á stýrilsvæðum nokkurra miRNA gena úr bjóstastofnfrumulínum með bandvefs- eða þekjuvefssvipgerð. Tilgangurinn var að kanna hvort sviperfðabreytingar eins og methýlering hafi áhrif á stjórnun þessara miRNA genasvæða í EMT.

Nýlegar rannsóknir á Rannsóknarstofu í stofnfrumufræðum (Sigurdsson, Hilmarsdóttir og fl. 2011) sýndu að æðapel örvaði D492 stofnfrumulínuna til að undirgangast EMT. EMT ferlið var ekki afturkræft eins og greinóttá formgerðin sem að einkennir þessa frumulínu. Í niðurstöðukafla (mynd 14) má sjá að D492 þekjufrumulínan er yfirleitt minna methýleruð á þeim svæðum sem ég rannsakaði en D492M. Sérstaklega sá ég að methýlering var áberandi í CpG eyjum á stjórnsvæðum miR203 og miR200c. Þetta gæti bent til þess að methýlering hafi hlutverki að gegna í bælingu þessara tveggja stjórn gena sem gegna hlutverki í að stýra EMT. Það var áhugavert að D492M1 og D492M2, nýlega einangraðar frumulínur og ekki jafn stöðugar og D492M, eru með methýleringu sem liggur nokkuð á milli D492M og D492. Þar sem þetta eru frumulínur sem hafa ekki náð að mynda stöðugt EMT þá kæmi þetta heim og saman við að methýlering gæti skýrt stöðugleika MET umbreytingar í þessum frumulínum. Aukin methýlering á stýrilsvæðum miR200 fjölskyldunnar bendir til að þöggun á þessum genasvæðum geti sagt til hversu stöðug EMT umbreytingin er í D492M. Þekjuvefslínan D492E1 er líka nýmynduð og óstöðug frumulína en hún var aðeins meira methýleruð en D492. Mestur munur á methýleringu var hjá miR205 og miR200c genasvæðunum en þau eru öflug í að viðhalda þekjufrumueiginleikum. Frekari rannsóknir eru nauðsynlegar til að kanna stöðugleika þessara nýju undirlína af D492.

Áhugavert væri að skoða methýleringu í fleiri frumulínum. Þar má meðal annars nefna frumulínuna MDA-MB-231 sem hefur sterka EMT svipgerð (Sigurdsson, Hilmarsdóttir og fl. 2011). Einnig væri áhugavert að skoða stjórnsvæði þessara miRNA gena í sýnum úr brjóstakrabbameinssjúklingum. Sérstaklega væri áhugavert að skoða krabbamein af undirgerðinni „basal-like“ með tilliti til methýleringar á þessum svæðum en þessi æxli hafa

oftar verið til staðar sem EMT breytingar en aðrar undirgerðir brjóstakrabbameina (Sarrío, Rodríguez-Pinilla og fl. 2008).

Ef methýlering er til staðar í brjóstaaæxlum á miRNA200 stjórnsvæðum væri áhugavert að kanna hvort hægt væri að snúa þessari svipgerð við með lyfjum sem hafa áhrif á methýleringar. Til eru lyf sem afmethýlera DNA, t.d. 5-azacytidín en það afmethýlerar almennt methýleruð svæði í erfðamenginu. 5-azacytidín er efnalíking af basanum cýtósín og er helst notað í meðferð gegn mergmisþroskaheilkenni (myelodysplastic syndrome, MDS) sem er afbrigði af bráðahvítblæði og einnig er verið að þróa það sem lyf gegn öðrum tegundum bráðahvítblæðis (Ziembra, Hayes og fl. 2011). Áhugarvert væri að kanna áhrif 5-azacytidín á D492M þ.e. hvort bandvefsfrumurnar gætu orðið aftur að þekjuvefsfrumum en þá myndi t.d. tjáning á N-cadherin kennipróteini minnka og tjáning á E-cadherin kennipróteini myndi aukast.

Ef það tekst að snúa við EMT svipgerð með slíku lyfi gæti það vakið spurningar um hvort 5-azacytidín hefði klíníská þýðingu í meðferð brjóstakrabbameinssjúklinga, sérstaklega þeirra með basal-líka svipgerð. 5-Azacytidín er m.a. í klínískum rannsóknum í ýmsum krabbameinum en þó ber að hafa í huga að þetta lyf er ekki sérhæft og getur því afmethýlerað önnur svæði í genamenginu sem gæti haft slæmar afleiðingar.

Niðurstöður rannsóknarinnar sýna að methýlering á stýrilsvæðum miR200c og miR205 eykst í frumum sem hafa farið í gegnum EMT. Einnig gefa þær til kynna að methýleringin sé minni í frumum sem nýlega hafa undirgengist EMT, þar sem bandvefsumbreytingin getur enn gengið til baka, en í D492M frumulínunni sem er með stöðuga bandvefssvipgerð. Frekari rannsóknir snúa að því að staðfesta þöggun á tjáningu miR200 fjölskyldunnar í D492M1 og D492M2 sem og að skoða hvaða áhrif yfirjáning miR200c hefur á svipgerð hennar.

5. Heimildir

- Alberts B., Johnson A. og fl., Ritst. (2008). Molecular Biology of the Cell, Garland Science.
- Brabletz, S. og T. Brabletz (2010). "The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer?" EMBO Rep **11**(9): 670-677.
- Dalgin, G. S., G. Alexe og fl. (2007). "Portraits of breast cancer progression." BMC Bioinformatics **8**: 291.
- Fridriksdóttir, A. J., R. Villadsen og fl. (2005). "Maintenance of cell type diversification in the human breast." J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**(1): 61-74.
- Gregory, P. A., C. P. Bracken og fl. (2008). "MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition." Cell Cycle **7**(20): 3112-3118.
- Gudjonsson, T., R. Villadsen og fl. (2002). "Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties." Genes Dev **16**(6): 693-706.
- Hanahan, D. og R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Health, N. I. O. (1997). "Development of the Mammary Gland." Sótt 24.02.2012, af <http://mammary.nih.gov/atlas/wholemounts/normal/index.html>.
- Howard, B. A. og B. A. Gusterson (2000). "Human breast development." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(2): 119-137.
- IARC. (2010). "Globocan 2008." Sótt 20.02.2012, af <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.
- Ingthorsson, S., V. Sigurdsson og fl. (2010). "Endothelial cells stimulate growth of normal and cancerous breast epithelial cells in 3D culture." BMC Res Notes **3**: 184.
- Jónasson, J. G. og L. Tryggvadóttir, Ritst. (2008). Krabbamein á Íslandi. Reykjavík, Krabbameinsfélagið.
- Krabbameinsfélagið (2012). "Brjóstakrabbamein." Sótt 20.02.2012, af <http://www.krabbameinsskra.is/?icd=C50>.
- Nelson, C. M. og M. J. Bissell (2005). "Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation." Semin Cancer Biol **15**(5): 342-352.

- Polyak, K. og R. A. Weinberg (2009). "Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits." Nat Rev Cancer **9**(4): 265-273.
- Reinhold, W. C., M. A. Reimers og fl. (2007). "Detailed DNA methylation profiles of the E-cadherin promoter in the NCI-60 cancer cells." Mol Cancer Ther **6**(2): 391-403.
- Ross, M. og W. Pawlina, Ritst. (2011). Histology A Text and Atlas, Lippincott Williams & Wilkins.
- Sandoval, J. og M. Esteller (2012). "Cancer epigenomics: beyond genomics." Curr Opin Genet Dev **22**(1): 50-55.
- Sarrio, D., S. M. Rodriguez-Pinilla og fl. (2008). "Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype." Cancer Res **68**(4): 989-997.
- Sigurdsson, V., B. Hilmarsdottir og fl. (2011). "Endothelial induced EMT in breast epithelial cells with stem cell properties." PLoS One **6**(9): e23833.
- Strachan T. og Read A., Ritst. (2004). Human Molecular Genetics, Garland Science.
- Wiklund, E. D., J. B. Bramsen og fl. (2011). "Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer." Int J Cancer **128**(6): 1327-1334.
- Ziamba, A., E. Hayes og fl. (2011). "Development of an oral form of azacytidine: 2'3'5'triacetyl-5-azacytidine." Chemother Res Pract **2011**: 965826.