

# **GLUKOOSIN VAIKUTUS SCC-SOLUJEN UDP-SOKERIMETABOLIAAN**

Tuomas Ruotsalainen  
Syventävien opintojen opinnäytetyö  
Hammaslääketieteen koulutusohjelma  
Itä-Suomen yliopisto  
Terveystieteiden tiedekunta, Lääketieteen laitos  
Biolääketieteen yksikkö  
Kesäkuu 2019

ITÄ-SUOMEN YLIOPISTO, Terveystieteiden tiedekunta

Lääketieteen laitos

Hammaslääketieteen koulutusohjelma

RUOTSALAINEN, TUOMAS ES: Glukoosin vaikutus SCC-solujen UDP-sokerimetaboliaan

Opinnäytetutkielma, 45 sivua

Tutkielman ohjaaja: Sanna Oikari, FT

Kesäkuu 2019

Avainsanat: suun kasvaimet, hyaluronihappo, glukoosi, aineenvaihdunta

Syövässä sokerimetabolian on todettu muuttuvan. Tämä saattaa vaikuttaa muun muassa syöpäsolujen invaasiokykyyn ja migraatioon esimerkiksi hyaluronaanisynteesin kautta. Useissa syövässä on todettu muutoksia hyaluronaanimäärissä ja tämän on osoitettu vaikuttavan syövän ennusteeseen. Suusyöpä on maailmanlaajuisesti merkittävä syöpä ja sen hyaluronaani-aineenvaihdunnasta tietoa on rajoitetusti, joten tällainen tutkimus on tärkeä.

Tutkimuksen tarkoitus oli selvittää kuinka muutokset glukoosin saannissa ja tietyt solujen nukleotidimetaboliaan vaikuttavat käsitellyt muuntavat suusyöpäsolujen UDP-sokereiden ja hyaluronaanin tuotantoa ja miten nämä muutokset edelleen säätelevät solujen migraatiota.

Tutkimuksessa käytettiin kahta eri immortalisoitua kielen levyepiteelikarsinoomasolulinjaa: SCC-9 ja SCC-25. Verrokkisoluna toimivat immortalisoidut ihon keratinosyytit, HACAT-solut. UDP-sokerien määrittämiseen käytettiin HPLC:tä ja hyaluronaanimäärää tarkasteltiin ELSA:n avulla. Tulokset normalisoitiin totaaliproteiinimääriin, jotka määritettiin Pierce BCA-kitillä. Tämän lisäksi tarkasteltiin solujen migraatiota.

Hypoteesimme mukaisesti suurempi glukoosikonsentraatio kasvatusmediumissa vaikutti positiivisesti solujen tuottamiin UDP-sokerikonsentraatioihin. Tämä heijastui myös hyaluronaanimääriin: mitä korkeampi glukoosikonsentraatio sitä korkeampi hyaluronaanimäärä. Glukosamiinikäsittely, jonka tiedetään vaikuttavan UDP-sokerimääriin, vaikutti kaikilla solulinjoilla voimakkaimmin. Migraatioiden mielenkiintoisin tulos oli, että glukosamiinia saadessaan, SCC-25-solujen migraatio hidastuu merkittävästi.

Tuloksemme vahvistavat aikaisempia tutkimuksia hyaluronaanin merkityksestä syövässä. Tämän lisäksi tutkimuksemme osoitti, että HACAT-solut eivät toimi kontrollisoluna suun limakalvon soluille niiden erilaisuuden takia. Myös tutkimuksessa käytettyjen syöpäsolulinjojen välillä havaittiin eroja.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences  
School of Medicine  
Dentistry

RUOTSALAINEN, TUOMAS ES: The effect of glucose on UDP-sugar metabolism of SCC cells

Thesis, 45 pages

Tutor: Sanna Oikari, Ph. D.

June 2019

Keywords: mouth neoplasms, hyaluronic acid, glucose, metabolism

It has been noticed that cancer cells have many differences in their sugar metabolism. This might also affect hyaluronan (HA) synthesis and hence processes influenced by it, like cell's ability to invade and migrate. In many cancers, changes in the hyaluronan levels have been noted and it has been confirmed that it can have an effect on the prognosis. Oral cancer is notable cancer internationally and knowledge of its hyaluronan metabolism is limited so a study like this is important.

The aim of the study was to determine how changes in the glucose availability, and certain treatments effecting nucleotide metabolism modify oral cancer cells' UDP-sugar pools and hyaluronan production, and how these changes still regulate cell migration.

Two different immortalized oral squamous cell carcinoma cell lines were utilized in this study: SCC-9 and SCC-25. They were compared to HACAT cells, which are immortalized human keratinocytes. To detect the UDP-sugars, HPLC was used and the amount of hyaluronan was measured using ELSA. The results were normalized to the amount of total protein, which was determined by Pierce BCA. In addition, cell migration was observed.

According to our hypothesis higher glucose concentration in the cultivation medium had a positive effect on UDP-sugar concentrations produced by the cells. Similar effect was noticed also in the amount of hyaluronan: the higher the glucose concentration the higher the amount of hyaluronan. Of treatments influencing UDP-sugar pools, glucosamine had the strongest effect on every cell line studied. The most interesting result of the migrations was that the migration of SCC-25 cells was significantly reduced when glucosamine was present.

Our results confirm already existing studies about the importance of hyaluronan in cancer. In addition, our study points out that HACAT-cells are not functioning as proper controls to the cells of oral mucosa because of their differences in sugar metabolism. There were differences noted between the cancer cell lines as well.

1 JOHDANTO .....	5
1.1 Suusyöpä .....	5
1.1.1 Riskitekijät .....	6
1.2 Glukoosimetabolia syövässä .....	8
1.2.1 Glykolyysi .....	8
1.4 Pentoosifosfaattireitti.....	11
1.5 Heksosamiinibiosynteesireitti ja O-GlcNAc-modifikaatio .....	11
1.5.1 O-GlcNAc-modifikaatio.....	12
1.6 Hyaluronaani .....	12
1.6.1 Hyaluronaanisynteesi .....	13
1.6.2 Hyaluronaani ja syöpä.....	14
1.7 HA-reseptorit ja pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomat.....	15
1.7.1 CD44 .....	15
1.7.2 RHAMM .....	17
2 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	18
2.1 Solulinjat ja –viljely .....	18
2.2 Käsittelyt .....	20
2.3 UDP-sokerien uuttaminen ja puhdistus ENVI-Carb-patruunalla.....	22
2.4 HPLC .....	23
2.5 ELSA .....	25
2.6 Pierce BCA Proteiininääritys .....	27
2.7 Migraatiot .....	28
2.8 Tilastotestit .....	28
3 TULOKSET.....	29
3.1 UDP-sokerit (HPLC).....	29
3.1.1 Vaikutukset HaCaT-soluihin.....	29
3.1.2 Vaikutukset SCC-9-soluihin .....	30
3.1.3 Vaikutukset SCC-25-soluihin .....	30
3.1.4 Mannoosin ja Thiamet G:n vaikutukset .....	30
3.2 HaCaT vs SCC-9 vs SCC-25.....	34
3.3 Hyaluronaanimäärät (ELSA).....	35
3.4 Migraatiot .....	37
4 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA .....	39
4.1 UDP-sokerit.....	39
4.2 Hyaluronaanimäärät, -reseptorit ja -syntaasit.....	40
4.3 Migraatiot .....	41
LÄHTEET .....	42

## 1 JOHDANTO

Tutkimuksen tarkoituksena on selvittää kuinka muutokset glukoosin saannissa ja tietyt solujen nukleotidimetaboliaan vaikuttavat käsittelyt muuntavat suusyöpäsolujen UDP-sokereiden ja hyaluronaanin tuotantoa ja miten nämä muutokset edelleen säätelevät solujen migraatiota. Tutkimuksen hypoteesina on, että suurempi glukoosikonsentraatio vaikuttaa suotuisasti solujen UDP-sokerimetaboliaan ja tämän välityksellä hyaluronaansynteesiin sekä solujen lisääntyneeseen migraatioon.

Työ koostuu laboratorio-osasta ja kirjallisesta osasta. Laboratoriossa toteutettiin soluviljely ja solujen käsittelyt sekä aineisto ja menetelmät -kappaleessa läpi käydyt kokeelliset työt. Kirjallisessa osassa perehdytään suusyöpään, sokerimetaboliaan, hyaluronaaniin ja hyaluroaanireseptoreihin, mitkä ovat työn kannalta keskeisiä aihepiirejä.

### 1.1 Suusyöpä

Suusyövällä tarkoitetaan suuontelossa ja sen alueella esiintyviä syöpiä. Tavallisimmin se esiintyy huulten ja kielen alueella, mutta sitä voi esiintyä missä tahansa suuontelossa tai nielussa niin poskissa, ikenissä kuin suulaessakin.



**Kuva 1.** Levyepiteelikarsinoma kielessä. © Maria Siponen.

Suuontelossa esiintyvistä syöivistä tyypillisimpiä ovat kielen levyepiteelikarsinoomat. Ne kattavat noin 90% kaikista suuontelon syöivistä. Tämän lisäksi suussa esiintyy myös muiden syöpien metastaaseja ja rauhasepiteelistä peräisin olevia adenoomia kuten esimerkiksi sylkirauhaskasvaimia<sup>1</sup>.

Limakalvojen ja kielen tutkiminen kuuluvat hammaslääkärin perustutkimukseen. Tutkimuksen pohjalta voidaan puuttua poikkeaviin muutoksiin, joita ovat esimerkiksi valkoiset tai punaiset laikut, syylämäiset muutokset ja patit. Vuosittain suuontelon syöpätapauksia ilmenee Suomessa noin 250<sup>2</sup>, joista suurin osa on kielisyöpiä. Suusyövän diagnostiikassa olennaisena osana on patologisanatomisen tutkimus, joka tehdään edustavalta alueelta otetulle koepalalle. Tarvittaessa koepaloja otetaan useampia eri kohdista.

Suusyövät ovat yleensä hyvin vähäoireisia. Kipu ja tunnottomuus ovat usein myöhäisoireita. Kliinisiä tuntomerkkejä syövälle ovat erytro- ja leukoplakiset muutokset. Aiemmin mainittujen muutosten esiintyminen yhdessä on usein viite pahanlaatuisuudesta. Syöpään viittaava muutos saattaa olla myös haavautunut, pullottava tai kyhmymäinen.

### 1.1.1 Riskitekijät

Suusyövän riskiä lisäävät monet tekijät, jotka esitellään taulukossa 1. Näistä tärkeimpiä ovat alkoholi ja tupakka, jotka molemmat ovat karsinogeenisiä aineita<sup>3</sup>. Alkoholilla on myös limakalvoja kuivattava vaikutus. Alkoholien käytön seurauksena sylkirauhasissa tapahtuu toiminnallisia ja morfologisia muutoksia. Esimerkiksi edellä mainitut suusyöpää aiheuttavat tekijät vaikuttavat yhdessä käytettynä synergisesti. Myös alkoholin metaboliatuotteen, asetaldehydin, tiedetään olevan karsinogeeni. Näiden lisäksi tärkeä tekijä on erityisesti Aasiassa käytettävä betelpähkinästä valmistettu mälli.<sup>456</sup>

Suunielun syöpien yleistyessä on kiinnitetty huomiota niissä esiintyviin HPV-viruksiin. Esimerkiksi HPV16-viruksista on olemassa alati vahvistuvaa näyttöä sen osallisuudesta pään ja kaulan alueen syöpien etiologiassa.<sup>456</sup>

UV-säteilyn vaikutuksesta suusyöpiin kuuluvaan huulisyöpään on myös vahvat viitteet. UV-säteily pystyy aiheuttamaan muutoksia solussa vaurioittamalla esimerkiksi DNA:ta, joka voi

johtaa epäedullisiin mutaatioihin korjausmekanismien pettäessä. UV-säteily on jo aiemmin yhdistetty selvästi esimerkiksi ihosyöpään (Taulukko 1).

Vakiintuneet	Vahvasti viitteelliset	Mahdolliset
Tupakointi	Auringon UV-säteily	Immuunipuutokset
Purutupakka	Säteily	Proteesit?
Nuuskaus	Virukset (HPV)	Etnisyys?
Alkoholin väärinkäyttö		
Betel		

**Taulukko 1.** Mukailtu taulukko suusyövän riskitekijöistä<sup>456</sup>.

### 1.1.2 Hoito

Suusyöpää voidaan hoitaa leikkaamalla ja sädehoidolla. Hoito suunnitellaan yksilöllisesti potilaan tarpeen mukaan. Suuremmissa kasvaimissa käytetään hoitojen yhdistelmiä ja pienemmissä esimerkiksi pelkkää kirurgiaa. Lääkehoito ei ole yksinään riittävä esimerkiksi suun levyepiteelikarsinooman hoidossa, mutta sitä voidaan käyttää vain kirurgisen hoidon ja sädehoidon tukena<sup>1</sup>.

Pienet kasvaimet voidaan poistaa pelkästään leikkaamalla, mutta syövän edetessä ja kasvaessa sekä metastasoidessa esimerkiksi kaulan alueen imusolmukkeisiin, poistetaan myös imusolmukkeita kirurgisesti kauladissekaatiossa. Tämän lisäksi hoitoa täydennetään usein sädehoidolla.

Leikkaus on traumaattinen toimenpide, joka aiheuttaa potilaalle usein ongelmia tulevaisuudessa, sillä kasvainta poistettaessa on otettava selkeät ja riittävän suuret marginaalit sen reunoilta. Koska kliinisesti voi olla mahdotonta nähdä ero terveeseen kudokseen ja syöpäkudokseen välillä, syöpäkudosta saattaa jäädä poistamatta liian pienellä marginaalilla ja tämä johtaa syövän uusimiseen.

Sädehoitoa annettaessa pään- ja kaulan alueelle tulee huomioida sen vaikutukset myös muihin kudoksiin. Osa sädehoidon aiheuttamista ongelmista ilmenee lähes välittömästi sädehoidon aloittamisen jälkeen. Tällainen välitön seuraus hoidosta on esimerkiksi suun mukosiitti. Myöhemmin ilmenee esimerkiksi sädehoitoa pään ja kaulan alueelle saaneen ihmisen syljenjenerityksen huomattava heikkeneminen sylkirauhaskudoksen tuhoutumisen vuoksi. Tämä

vaikuttaa merkittävästi suun terveyteen. Muutoksia tapahtuu myös luukudoksessa ja sen verisuonissa, jotka vaurioituvat. Verisuonituksen heikentyminen johtaa helpommin nekroosiin mahdollisten tulevien toimenpiteiden yhteydessä tai niiden jälkeen ja tämä on otettava huomioon suunniteltaessa toimenpiteitä sädehoidon jälkeen.

## 1.2 Glukoosimetabolia syövässä

Syöpäsolujen metabolia on muuttunut. Tämä näkyy muun muassa niiden glukoosiaineenvaihdunnassa. Glukoosin sisäänotto soluihin on lisääntynyt ja niiden solukalvolla ekspresoidaan enemmän glukoositransporttereita kuin terveessä kudoksessa. Solut tuottavat myös enemmän laktaattia ja siirtävät sitä ympäristöönsä.

### 1.2.1 Glykolyysi

Glykolyysi on solujen tapa hankkia energiaa itselleen. Se voidaan jakaa kahteen vaiheeseen, jonka ensimmäisessä vaiheessa energiaa investoidaan reaktioihin, ja toiseen vaiheeseen, jossa energiaa tuotetaan (Kuva 2). Glykolyysissä solut hajottavat glukoosia erilaisten entsyymaattisten reaktioiden kautta muodostaen adenosiniitriposfaattia (ATP), joka on korkeaenerginen molekyyli, jota solut hyödyntävät energiaa vaativissa reaktioissa. Glykolyysissä muodostuu ATP:n lisäksi myös kaksi pyruvaattimolekyyliä, jotka jatkavat tarvittaessa edelleen trikarboksyylihappokiertoon (TCA-sykli).

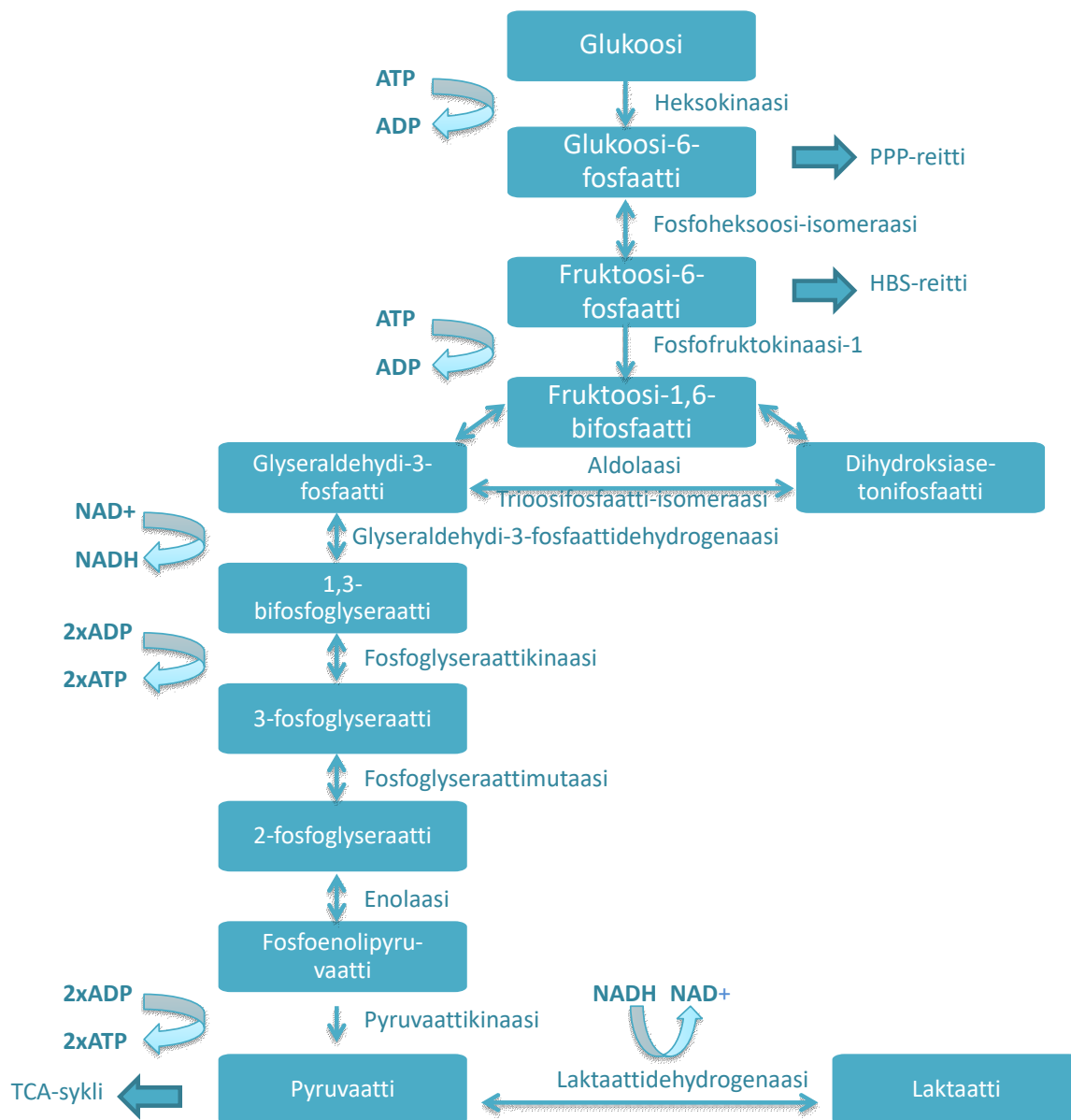
Glykolyysissä tarvitaan  $\text{NAD}^+$ -molekyylin pelkistävää potentiaalia, kun glyseraldehydi-3-fosfaattia muokataan entsyymaattisesti 1,3-bifosfoglyseraattiksi. Koska syöpäsolut käyttävät pääsääntöisesti glykolyysiä energiansa hankintaan, tarvittavan  $\text{NAD}^+$ :n määrä on suuri. Tarvittavan  $\text{NAD}^+$ -molekyylin solut saavat joko TCA-syklistä, jos happea on saatavilla, tai pelkistämällä pyruvaatista laktaattia. Laktaattimäärän onkin huomattu olevan korkeampi verrattuna normaaliin kudokseen monissa syövässä mukaan lukien suun levyepiteelikarsinooissa ja sen kasvu aiheuttaa myös ympäristön happamoitumista<sup>7</sup>. Laktaattia siirretään ympäristöön, josta sitä voidaan ottaa soluihin energian tuotantoa varten, mutta sillä on myös muita vaikutuksia kuten säädellä solujen migraatiota hyaluronaanin ja CD44-reseptorien kautta ja edistää verisuonten kasvua<sup>8</sup>.

Aerobisella glykolyysillä eli ns. Warburgin efektillä tarkoitetaan esimerkiksi syöpäsolujen tapaa hyödyntää glykolyysiä hapellisissa olosuhteissa<sup>9</sup>, vaikka TCA-sykli olisi mahdollinen.



TCA-syklin on huomattavasti energiatehokkaampi tapa tuottaa energiaa solun tarpeisiin. Glykolyysi tuottaa 2 ATP-molekyyliä kun taas TCA-sykli tuottaisi 32 ATP-molekyyliä. Silti syöpäsolut suosivat aerobista glykolyysiä. On esitetty, että solut käyttäisivät glykolyysin välituotteita rakennusaineinaan muun muassa lisääntyneeseen solunjakautumiseen. Myös glykolyysistä johtuva ekstrasellulaaritalan alentunut pH suosisi syöpäsoluja, jotka voivat adaptoitua siihen toisin kuin normaalit solut, jotka tuhoutuvat nekroosin kautta tai tuhoavat itsensä kaspasasiaktiivisuuden lisääntymisen seurauksena apoptoosin kautta<sup>10</sup> luoden kasvuedun syöpäsoluille.

Glukoosin tarpeen kasvaessa soluissa on tapahduttava muutoksia, jotka mahdollistavat paremman glukoosin käytön tai saatavuuden solun tarpeita varten. Onkin huomattu, että soluissa tapahtuu muutoksia glukoositransporttereissa, esimerkiksi GLUT1:ssä, jonka yli-ilmentäminen on tavallinen muutos useissa syövässä mukaan lukien suun levyepiteelikarsinoomissa<sup>111213</sup>. Glukoosi-, 3-fosfoglyseraatti- ja 2-fosfoglyseraattikonsentraatioiden on huomattu olevan matalampia suun levyepiteelikarsinoomissa verrattuna normaaliin kudokseen<sup>7</sup>. Nämä muutokset kielivät glukoosin käytön lisääntymisestä. Toisaalta syöpäsolut voivat alkaa käyttämään laktaattia tai rasvahappoja energianlähteenään.



**Kuva 2.** Glykolyysi ja sen entsyymit.

#### 1.4 Pentoosifosfaattireitti

Kun glukoosia otetaan soluun, se fosforyloidaan glukoosi-6-fosfaatiksi eli se varataan solun käyttöön. Glukoosi-6-fosfaatti ei ole ainoastaan glykolyysissä tarvittava väliaine, vaan se toimii myös lähtöaineena muissa metaboliareiteissä kuten esimerkiksi pentoosifosfaattireitillä (PPP-reitti). PPP-reitin suosiminen on soluille hyödyllistä, sillä pentoosifosfaattireitillä tuotetaan solujen käyttöön NADPH-molekyylejä, joita käytetään pelkistymisvoimana soluissa. Sitä tarvitaan muun muassa lipidi- ja nukleiinihapposynteesissä. PPP-reitillä tuotetaan myös riboosi-5-fosfaattia, jota käytetään nukleotidi ja nukleiinihapposynteesissä. Nämä molekyylit ovat tärkeitä solun jakautumisen ja metabolian kannalta, sillä nukleotidit voivat varastoida energiaa muodostamalla nukleosiditriposfaatteja, joista tunnetuin lienee ATP. Nukleotidit ovat osallisia myös solusignaaloinnissa. Tutkimustulokset osoittavat, että adenoosiinimonofosfaatin (AMP), guanosiinitrifosfaatin (GTP), guanosinidifosfaatin (GDP) ja guanosinimonofosfaatin (GMP) määrät ovat merkittävästi koholla suun levyepiteelikarsinoomissa verrattuna normaaliin kudokseen<sup>7</sup>.

#### 1.5 Heksosamiinibiosynteesireitti ja O-GlcNAc-modifikaatio

Pentoosifosfaattireitin lisäksi toinen glykolyysin väliainetta hyödyntävä biosynteesireitti on heksosamiinibiosynteesireitti (HBS-reitti). Heksosamiinibiosynteesireitin lähtöaineena toimii glykolyysin väliaine fruktoosi-6-fosfaatti ja sen lopputuotteena on uridiinidifosfaatti-N-asetyyliglukosamiini (UDP-GlcNAc). Arviolta noin 2-5 % glukoosista menee HBS-reitille tehden UDP-GlcNAc:sta yhden yleisimmistä UDP-sokereista. UDP-GlcNAc on tärkeä aine hyaluronanisynteesissä, sillä se on toinen hyaluronanin (HA) tuotossa tarvittavasta sokerijohdannaisista. Tämän lisäksi UDP-GlcNAc toimii prekursorina myös muille aminosokereille, joita vaaditaan glykoproteiini-, glykolipidi-, proteoglykaani- ja glukosaminoglykaanisynteesiin<sup>14,15</sup>.

Glutamiini on HBS-reitin kannalta tärkeä aminohappo, joka toimii reitin alussa aminosokereiden luovuttajana. Reitillä ensimmäisen entsyymin glutamiini:fruktoosi-6-fosfaattitransaminaasin (GFAT) aktiivisuutta säädelään monilla eri tavoilla, koska se vastaa HBS-reitille päätyvästä glukoosista.<sup>15</sup> Sääteilyyn vaikuttavat esimerkiksi fruktoosi-6-fosfaattikonsentraatio, UDP-GlcNAc:n tuottama negatiivinen palautekytkentä<sup>16</sup> sekä proteiinikinaasi A:n fosforylaatio<sup>17</sup>.

Vapaat radikaalit voimistavat HBS-reittiä. Tätä tietoa vahvistaa se, että HBS-reitin aktiivisuus kasvaa monenlaisten solustressiä aiheuttavien tekijöiden myötä, koska glukoosia otetaan soluihin enemmän ja glukoosimäärän nousun on huomattu vaikuttavan myös UDP-GlcNAc:n määrään sitä nostavasti.

### 1.5.1 O-GlcNAc-modifikaatio

O-GlcNAc-modifikaatio on proteiinien post-translacionaalinen glykolysaation muoto, jota tavataan sytoplasmassa ja tumassa. Modifikaatio muodostuu X-kromosomissa sijaitsevan OGT-entsyymiä eli O-linkattua N-asetyyli-glukosamiinitransferaasientsyymiä koodavan geenin avulla. Entsyymi liittyy N-asetyyli-glukosamiiniryhmän proteiiniin sen seriiniin tai treoniiniin vapaaseen hydroksyyliin O- $\beta$ -glykosididisidoksella. Sidoksen ja samalla modifikaation pilkkoo OGA-entsyymi. Modifioitujen proteiinien ovat varsin dynaamisia, sillä OGT- ja OGA-entsyymit ovat aktiivisia liittämään ja pilkkomaan N-asetyyli-glukosamiinia.<sup>1819202122</sup>

O-GlcNAc-modifikaatiosykliin on todettu vaikuttavan niin solun ulkoiset kuin sisäisetkin tekijät. Ulkoisia tekijöitä ovat mm. insuliini ja korkea glukoosipitoisuus. Leukosyyteillä on todettu antigeenien ja kemotaktisten aineiden vaikuttavan tuman sisäisten ja sytoplasmisten O-GlcNAc-modifikoitujen proteiinien suhteeseen. Modifikoitujen proteiinien määrät vaihtelevat myös solusyklin aikana ja tästä voidaan päätellä modifikaation olevan osa myös solusykliä. Tämän lisäksi se osallistuu myös translaation ja transkription säätelyyn sekä signaalinvälitykseen. Modifikaatiota ilmenee myös solun tukirangan rakenteissa.<sup>2123</sup>

O-GlcNAc:n määrään voidaan vaikuttaa sitä muodostavan ja pilkkovan entsyymin kautta esimerkiksi inhiboimalla ThiametG:n avulla OGA-entsyymiä, jolloin O-GlcNAc:n määrä nousee ja tämän on huomattu olevan yhteydessä hyaluroonaanituotantoon HAS3-entsyymin välityksellä<sup>24</sup>.

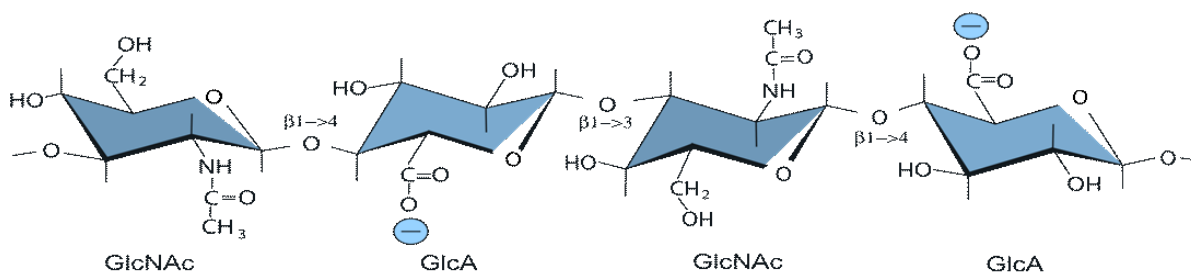
## 1.6 Hyaluroonaani

Hyaluroonaani (HA) on tärkeä soluväliaineen komponentti, joka on todettu osallistuvan moniin tehtäviin. Sitä tavataan fysiologisessa pH:ssa negatiivisesti varautuneena ja sen ominaisuuksiin kuuluu kyky sitoa nestettä. Varausta tasoittavat Na<sup>+</sup>-ionin kaltaiset positiiviset kationit, jotka selittävät myös vedensitomiskykyä. HA muodostaa solujen ympärille löyhän

matriksin ja siten helpottaa solujen liikkuvuutta ja osallistuu niiden kiinnittymiseen. Tästä syystä HA:lla on tärkeä osa esimerkiksi haavojen parantumisessa ja sen molekyylipainon ollessa pieni hyaluronaani stimuloi solujen kasvua ja indusoi verisuonten uudismuodostusta.<sup>25</sup>

Hyaluronaani on pitkä kymmenistä tuhansista disakkarideista polymeroitunut polysakkaridi, joka kuuluu glukosaminoglukaaneihin. Hyaluronaani koostuu kahdesta eri sokeriosasta: N-asetyyli-glukosamiinista ja glukuronihaposta. HA on suuri molekyyli, jonka paino on noin 4000-8000 kDa<sup>26</sup>. Hyaluronaania syntetisoidaan muista glykosaminoglykaaneista poiketen solukalvoilla olevien hyaluronaanisyntaasientsyymien välityksellä solujen ulkopuolelle. Synteesiin osallistuvat entsyymit ovat HAS1, HAS2 ja HAS3.

Hyaluronaanin hajoituksesta vastaavat hyaluronidaasientsyymit (HYAL1-4.) Lisäksi on osoitettu, että myös vapaat happiradikaalit osallistuvat hyaluronaanin hajoitukseen<sup>27</sup>. HYAL1 ja -2 pilkkomat HA-kappaleet ovat eri mittaisia ja niiden vasteet soluille ovat erilaisia. HYAL2 pilkkoo HA:n pidempiketjuisiksi palasiksi ja HYAL1 pilkkoo muodostuneita lyhyempiä ketjuja edelleen lyhyemmiksi solun sisällä endolysosomaalisesti. Pilkotut pidemmät 4-16 sokeriparin ketjut osallistuvat inflammatorisignointiin, joka on tärkeää esimerkiksi joissain syövässä. Pienet 4–6 disakkaridin HA-ketjut pystyvät indusoimaan NF- $\kappa$ B-signalointia ja metalloproteiinaasiaktiivisuutta. Kun HYAL-aktiivisuus syövässä kasvaa, HA-fragmentteja muodostuu niin paljon, että niitä ei ehditä ottaa solujen sisään ja ne jäävät signaloimaan solujen ulkopuolelle<sup>28,29</sup>.



**Kuva 3.** Hyaluronaaniketjua.

### 1.6.1 Hyaluronaanisynteesi

Hyaluronaanisyntaasit ovat ominaisuuksiltaan erilaisia. HAS1- ja HAS2-entsyymit tuottavat molekyyli­massaltaan suurempaa hyaluronaaniketjua kuin HAS3-entsyymi<sup>30</sup>. Monissa tutkimuksissa on havaittu HAS-entsyymien määrän muutoksia syövässä. Osassa tutkimuksia

muutokset nähdään mRNA-tasolla, mutta proteiinitasolla erityisesti HAS2-entsyymien määrien on osoitettu kohonneen. Jos HAS2-entsyymien toimintaa häirittiin, todettiin sen aiheuttavan solujen migraation vähentymistä kielen levyepiteelikarsinoomassa<sup>31</sup>.

Hyaluronaanisyntaasien aktiivisuus on riippuvainen lähtöaineista eli N-asetyyli-glukosamiinista ja glukuronihaposta<sup>32</sup>. HAS1 tarvitsee hyaluronaania muodostaakseen suuremman pitoisuuden UDP-sokereita kuin HAS2 tai HAS3. Näistä HAS3:lla on suurin affiniteetti edellä mainittuihin lähtöaineisiin, joten kyseinen isoentsyymi pystyy tehokkaasti hyödyntämään ympäristönsä lähtöaineet. Myös glukoosilla on vaikutusta entsyymiaktiivisuuteen, sillä kaikissa HAS-entsyymeissä huomattiin glukoosin puuttumisen vaikuttavan HA:n muodostukseen. Kuitenkin pienelläkin määrällä glukoosia HAS2 ja HAS3-entsyymit pystyivät tuottamaan HA:ta solujensa pinnalle. Glukoosin vaikutus peilautuu HA-synteesiin lähinnä UDP-sokereiden kautta, sillä niiden synteesi on riippuvainen solujen glukoositasoista<sup>3230</sup>.

Suun punajäkälä eli lichen planus (OLP) on krooninen limakalvosairaus. Sen tarkkaa syntymekanismia ei tunneta, mutta sen tiedetään olevan seurattava limakalvomuuutos malignisointumisriskinsä vuoksi. Lichen planuksessa HAS1- ja HAS2-ekspressiot muuttuvat<sup>33</sup>. Normaalissa suuontelon limakalvon epiteelikudoksessa HAS1- ja HAS2-ekspressioita ei juuri nähdä basaalikerroksessa, vaan ne lokalisoituvat lähinnä pinnallisiin kerroksiin, joissa ne ilmenevät granulaarisina tai vesikkelimäisinä, toisin kuin OLP:ssä, jossa edellä mainittuja ilmentymismuotoja ei erotu selkeästi. Erityisesti HAS2-ekspressio korostuu pinnallisissa kerroksissa normaaleissa näytteissä. Tutkimuksessa todettiin myös, että OLP:ssä HA:n värjäytymisen intensiteetti on voimakkaampi basaalisessa solukerroksessa kontrolliin verrattuna.<sup>33</sup>

### 1.6.2 Hyaluronaani ja syöpä

Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että hyaluronaanipitoisuudet muuttuvat erilaisissa karsinoomissa, lymfoomissa sekä melanosyyttisissä kasvaimissa ja hermoston kasvaimissa<sup>29</sup>. Esimerkiksi rintasyövässä hyaluronaanin määrä kasvaa ja HA-määrän kasvun tiedetään olevan merkki pahanlaatuisuudesta. Varhaiset tutkimustulokset suun levyepiteelikarsinoomasta esittivät, että hyaluronaanin määrä väheni syövän edetessä, ja että HA-määrän väheneminen korreloisi pahanlaatuisuuteen. Jos levyepiteelissä nähdään syövän esiasetta, dysplasiaa, hyaluronaania tavataan jo kaikissa solukerroksissa toisin kuin terveessä epiteelissä, jossa hyaluronaania ei ole uloimmissa solukerroksissa.<sup>3334</sup>

Kuten aiemmin todettiin: hyaluronaanimäärien on huomattu lisääntyvän suun lichen planuksessa, joka on seurattava, mahdollisesti syöpään johtava muutos suun limakalvoilla. Määrät ovat koholla erityisesti basaalisolukerrossa. Subepiteliaalisessa kudoksessa hyaluronaani värjäytyi voimakkaasti niin lichen planus -näytteissä kuin kontrolleissakin<sup>33</sup>.

Hyaluronaania syntetisoivat entsyymit tuottavat pitkäketjuista hyaluronaania, jota kasvainsolut voivat muokata oman toiminnan kannalta käyttökelpoisempaan muotoon. On huomattu, että kasvainsolut ilmentävät hyaluronaania pilkkovia hyaluronidaasientsyymejä, jolloin syntyy verisuonten kasvua edistäviä lyhytketjuista hyaluronaania<sup>25</sup>.

## 1.7 HA-reseptorit ja pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomat

### 1.7.1 CD44

CD44 on solukalvon glykoproteiini, joka koostuu ekstrasellulaarista, transmembraanisesta ja sytoplasmisesta osasta. CD44 toimii adheesiomolekyylinä hyaluronaanille ja monelle muulle molekyylille soluvälitilassa ja se välittää signaaleja ohjaten solujen toimintaa ja näin osallistuu muun muassa solujen kasvuun, migraatioon ja proliferaatioon<sup>31</sup>. Tiedetään, että CD44-ekspressiolla on merkitystä myös suusyövässä. Suusyöpäsolulinjoilla on huomattu, että käyttämällä CD44-vasta-ainetta, joka estää reseptorin toimintaa, suusyöpäsolujen migraatio vähenee<sup>31</sup>. CD44-reseptori toimii monesti yhdessä Receptor for Hyaluronan Mediated Motility –reseptorin eli RHAMM-reseptorin kanssa. Niiden interaktiot ovat usein yhdistetty syöpien malignisuuteen<sup>35</sup>.

CD44-reseptorin geeni koostuu 19 eksonista, joista 5 ensimmäistä ja 5 viimeistä eksonia ovat pysyviä. Yleensä CD44:n standardimuotona (CD44s) pidetään muotoa, josta puuttuu eksonit 6—14 eli kaikki variantit. Varianttien ilmentymisessä on havaittu muutoksia mm. suusyövässä. Proteiinitasolla CD44:ää ilmennetään erilaisina variantteina, jotka ovat seurausta erilaisista silmikoinneista. Varianteista saattaa puuttua joitain eksoneita tai niissä on pistemäisiä aminohappomuutoksia<sup>36,37</sup>.

CD44-proteiinin prosessoinnilla on todettu olevan tärkeä rooli sen toiminnassa. On todettu, että monissa syövässä kuten esimerkiksi rinta-, munasarja- ja paksusuolensyövässä CD44:n ekstrasellulaarinen osa pilkkotaan pois.<sup>28,38</sup> Suusyövässä tutkimustulokset osoittavat, että tähän prosessiin osallistuu ADAM-17-metalloproteinaasi. Kun ADAM-17-ekspressio on kor-

kea, on tavallisempaa, että kasvaimet lähettävät etäpesäkkeitä imusolmukkeisiin, koska metalloproteiinaasi pilkkoo solujen ja HA:n välistä CD44-kiinnitystä. AMAD-17 vaikuttaa myös moniin kasvutekijöihin lisäten niiden aktiivisuutta ja sen oletetaan olevan yhteydessä myös syövän kehittymisessä.<sup>39</sup> Vaikka CD44-määrät kohoavat usein syövässä, esimerkiksi syövän mahdollisessa esiasteessa lichen planuksessa ekspressiointensiteetti ja lokalisaatio ovat tutkimuksen mukaan lähes samat kuin normaaleissa kontrollinäytteissä<sup>33</sup>.

### 1.7.1 CD44v3, -v6 ja -v10

HSC-3-solut ovat suun levyepiteelikarsinoomasoluja, joilla tehdyt kokeet osoittivat, että tällä solulinjalla CD44v10 –variantilla on miltei kolminkertainen ilmentyminen verrattuna v3:een ja v6:een. CD44v10-variantti sisältää 14. eksonin, CD44v6 10. eksonin ja CD44v3 7. eksonin muuntuvista kymmenestä eksonista. *In vivo* tutkimuksissa on huomattu tuumorissa voimakkaasti ekspressoidun v10-muodon olevan yhteydessä sädehoidon tehottomuuteen ja metastasointiin<sup>40</sup>. Kaikkia CD44-reseptoreita ja kohdennetusti CD44v3-, CD44v6- ja CD44v10-reseptoreita häiritäessä vasta-aineilla niin, että vasta-aine sitoutuu HA:ta sitovaan osaan reseptorissa sen ”blokatien”, v6-variantin toiminnan estäminen vaikutti eniten solujen kasvuun. Kokonaisuudessa kaikkiin CD44-reseptoreihin sitoutuva anti-CD44-vasta-aine aiheutti suurimman, 50 %, hidastumisen kasvulle. Solujen vaste muuttui myös cisplatinille, kemoterapialäkkeelle, edellä mainitulla käsittelyllä. Erityisesti CD44 v6-vasta-aineen käyttäminen vaikutti solujen reagointiin läkkeelle heikentäen selkeästi niiden vastustuskykyä sille<sup>40</sup>.

CD44v3 –variantin ekspressiossa on tutkimusten mukaan muutoksia suusyövässä. Erään tutkimuksen mukaan terveessä suun kudoksessa v3-varianttia ilmennetään selkeästi, mutta syövässä sen ilmentäminen on vähentynyt<sup>41</sup>. Tämä löydös on ristiriidassa uudemman tutkimuksen kanssa, jossa todetaan, että variantteja ekspressoidaan kyllä primaareissa syöpäleesioissa, mutta erityisesti niiden metastaaseissa. Jos v3-variantin ekspressio oli korkea primaarissa tuumorissa, oli tutkimuksen mukaan todennäköisempää, että tuumori lähettää metastaaseja<sup>40</sup>.



### 1.7.2 CD44v9

CD44v9-variantti poikkeaa normaalista CD44-proteiinista, sillä variantissa on silmikoituna 13. eksoni. Sen esiintyminen terveessä kielen epiteelissä rajoittuu pääasiassa basaali- ja oksolukerrokseen ja värjäys näkyy pääasiassa solun pinnalla. CD44v9-ekspressiota ei nähdä solujen tyvikalvon puoleisella membraanilla ja alla olevassa tukikudoksessa sitä ei havaita<sup>42</sup>. Kun CD44v9 vähenee kielen levyepiteelikarsinomasoluissa, on todennäköisempää, että karsinoma metastasoi imusolmukkeisiin. Ekspressio vaihtelee eri tuumoreissa, mutta perifeerisen ekspression väheneminen tai puute on yhteydessä metastasointiin<sup>42</sup>. CD44v9 vaikutuksia on tutkittu myös suun levyepiteelikarsinomasolulinjoilla (OSCC) ja niissäkin on huomattu, että CD44v9 kohonnut ilmentäminen inhiboi OSCC-solujen invaasiota ja toisaalta CD44v9:n inhibitio lisää invaasiokykyä eri suusyöpäsolulinjoilla<sup>43</sup>.

### 1.7.2 RHAMM

RHAMM (Receptor for hyaluronan mediated motility eli reseptori hyaluronaanivälitteiselle liikkuvuudelle) on hyaluronaanireseptori. Sitä tavataan solujen sytoplasmassa lähinnä liittyen sentrosomeihin ja solun tukirangassa eli sytoskeletonissa. Edellä mainitut ovat muun muassa aktiininista ja mikrotubuluksista muodostuvia rakenteita. Mikrotubuluksiin RHAMM liittyy aminoterminaalista päästä ja karboksyyli ryhmä liittyy sentrosomeihin. Tumasukkulassa RHAMM-reseptorit ovat kiinnittyneenä sukkularihmaston säikeiden kärkiin. Interfaasissa RHAMM-reseptorit sijaitsevat solun reunoilla. RHAMM voidaan kuljettaa ekstraselulaaritilaan tiettyjen molekyylien indusoimana. Kuljetus tapahtuu ns. epätyypillisen kuljetuksen kautta, jossa molekyyllillä ei ole signaalipeptidiä eikä se ole riippuvainen endoplasmisesta retikulumista tai Golgin laitteesta.<sup>354445</sup>

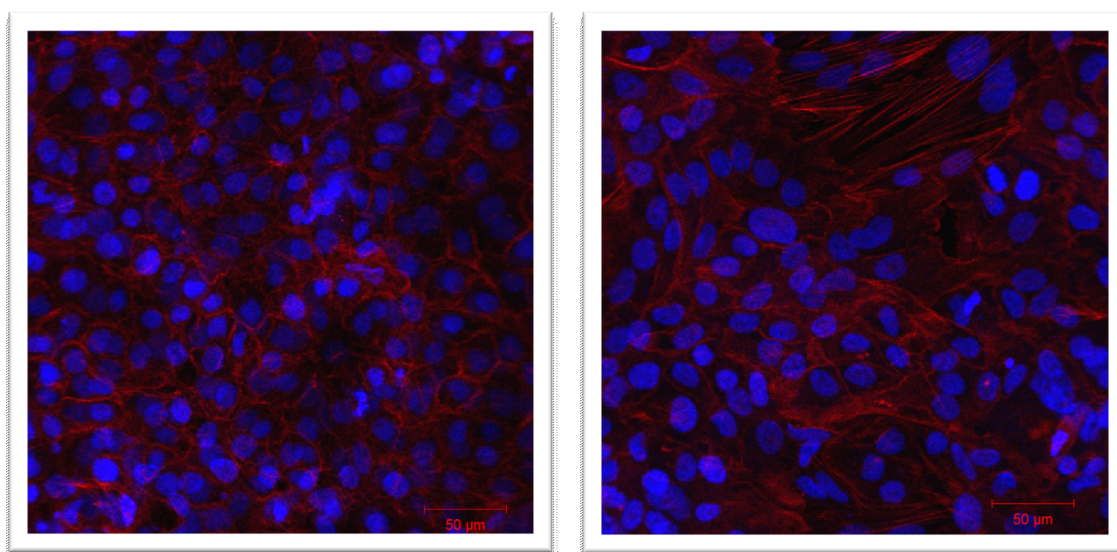
RHAMM-reseptorin funktiot ovat erilaisia solunsisäisesti ja -ulkoisesti. Sen normaali solunsisäinen funktio on esimerkiksi osallistuminen mitooseen säätelemällä tumasukkulan eheyttä. Lisäksi yliekspressoituna se voi vaikuttaa genomien stabiilisuuteen, joka on huomattu esimerkiksi multippelimyeloomassa<sup>46</sup>. On huomattu, että RHAMM-ekspressio on voimistunut suun levyepiteelikarsinomoissa ja syöpäsolulinjoissa verrattuna ihmisen normaaleihin suun keratinosyyttisoluihin<sup>47</sup>. Solut käyttävät reseptoria apunaan liikkumiseen, jonka takia se on mielenkiintoinen molekyyli esimerkiksi, jos siihen voitaisiin kohdentaa jokin lääkeaine esimerkiksi suusyövän hoidossa, sillä RHAMM:in yliekspression vaikutukset yhdistetään solujen kasvaneeseen proliferaatioon.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tässä kappaleessa esitellään tutkimuksessa käytetyt solulinjat ja niiden viljelyyn, käsittelyihin ja analysointiin tarvittavat mediumit, reagenssit ja laitteistot. Tämän lisäksi käsitellään menetelmät, joita tutkimuksessa on käytetty sekä tilastotestit.

### 2.1 Solulinjat ja -viljely

Tutkimuksessa käytettiin kolmea solulinjaa: HaCaT (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppenheim, Saksa), SCC-9 ja SCC-25 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). HaCaT-solut ovat immortalisoituja ihmisen ihon keratinosyyttejä. SCC-9- ja SCC-25-solut ovat molemmat kielen levyepiteelikarsinoomasoluja (Kuva 4). Ne ovat peräisin miespuolisilta henkilöiltä, SCC-25-solut ovat 70-vuotiaalta mieheltä kerättyjä ja SCC-9-solut ovat 25-vuotiaalta.



**Kuva 4.** SCC-25-solut vasemmalla ja SCC-9-solut oikealla. Solujen tumat on värjätty DAPI:lla ja aktiinisäikeet Alexa Fluor 594-phalloidiinilla.

Molempia SCC-solulinjoja viljeltiin samassa kasvatusmediumissa. HaCaT-soluille oli oma kasvatusmediuminsa. Käytetyt mediumit ja niissä käytetyt lisäaineet on kuvattu oheisessa taulukossa (Taulukko 2). Soluja kasvatettiin inkubaatiokaapissa (Sanyo CO<sub>2</sub> Incubator MCO-20AIC, Japan), jonka lämpötila oli +37°C ja hiilidioksidipitoisuus 5,0 %.

	HaCaT	SCC-9	SCC-25
Dulbecco's modified Eagle medium High Glucose (Euroclone, Milano, Italia)	500 ml		
Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco) 1:1 & Ham's F-12 (Lonza, Belgium)		500 ml	500 ml
FBS (Fetal Bovine Serum) (HyClone)	50 ml	50 ml	50 ml
Penisilliini / Streptomysiini (P/S) (Euroclone, Milano, Italia)	5 ml	5 ml	5 ml
L-glutamiini	5 ml		
Hydrokortisoni		550 $\mu$ l	550 $\mu$ l

**Taulukko 2.** Käytetyt solujen kasvatusmediumit. Mediumiin lisättyjen aineiden loppukonsentraatiot: FBS 10%, penisilliini/streptomysiini 50 $\mu$ g/ml, 50 U/ml, L-glutamiini 2 mM, hydrokortisoni 400 ng/ml.

Solujen jako tapahtui seuraavasti: HaCaT-solujen vanha kasvatusmedium poistettiin, jonka jälkeen pullo huuhdeltiin PBS:llä (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Calcium & magnesium, Euroclone, MI, Italy). Viikonlopun jälkeen HaCaT-solut olivat T75-pullossa, jolloin käytettiin 8ml PBS:ää. Viikolla soluja kasvatetaan T25-pullossa, johon lisätään 4ml PBS:ää.

PBS poistettiin ja pulloon lisättiin 1 ml/T25 tai 2 ml/T75 0,002 % EDTA-liuosta (Sigma, St. Louis, MO, USA) ja pullo siirrettiin inkubaatiokaappiin noin viideksi minuutiksi. Tämän jälkeen pullo nostettiin takaisin laminaariin, jossa EDTA-liuos poistettiin ja soluille lisättiin trypsiiniä (Biochrom AG, Berlin, Germany) 0,5 ml/T25 tai 1 ml/T75. Trypsiinin lisäämisen jälkeen solut siirrettiin takaisin inkubaatiokaappiin ja inkuboitiin noin 15 minuuttia, jonka jälkeen tarkistettiin mikroskoopilla, että solut olivat varmasti irronneet alustastaan.

Kun solut olivat irronneet, pulloon lisättiin 4,5 ml/T25 tai 9 ml/T75 kasvatusmediumia. Kasvatusmediumin lisäyksen jälkeen neste suspensioitiin hyvin ja suspensiosta otettiin tarvittaessa 20  $\mu$ l näyte, josta solut laskettiin hemosytometrillä. Kasvatukseen solususpensiota otettiin 0,5 ml/T25 tai 2 ml/T75. Kasvatusmediumia lisättiin kasvatuspulloon 4,5 ml/T25 tai 13 ml/T75 niin, että totaalivolyyymi oli 5ml/15ml. Tämän jälkeen solut siirrettiin inkubaatiokaappiin kasvamaan noin 3-4 vuorokaudeksi.

SCC-solujen jako tapahtui kuten HaCaT-solujen, mutta eroja oli kasvatuspullojen koossa. SCC-soluja kasvatettiin viikolla T75-pullossa ja viikonlopun yli solut kasvoivat T175-pulloissa. Mediumien ja liuosten määrä T75-pulloissa vastasi HaCaT-soluilla käytettyjä määriä. T175-pulloa huuhdeltaessa PBS:llä sitä käytettiin 12 ml. EDTA:ta lisättiin 5 ml ja trypsiiniä käytettiin 3 ml. Kasvatusmediumia lisättiin niin, että pullon kokonaistilavuudeksi tuli 30 ml.

Kokeita varten soluja laitettiin seuraavasti:

- 6-kuoppalevyille SCC-soluja 200 000 solua/kaivo, HaCaT-soluja 175 000 solua/kaivo
- 24-kuoppalevyille SCC-soluja 80 000 solua/kaivo, HaCaT-soluja 70 000 solua/kaivo

## 2.2 Käsittelyt

Kokeissa käytettiin seuraavia käsittelyjä: 25 mM Glukoosi 17,5 mM Glukoosi, 5 mM Glukoosi, 1 mM Glukosamiini, 20 mM Mannoosi ja 20  $\mu$ M Thiamet G. Solulinjakohtaisten käsittelymediumien valmistusohjeet ovat alla (Taulukko 3-5).

Käsittelyjen annettiin vaikuttaa soluilla 24 tuntia, jonka jälkeen näytteet kerättiin.

	25 mM Glc	17,5 mM Glc	5 mM Glc
Dulbecco's modified Eagle's medium (Euroclone, Milano, Italia)	44 ml	44 ml	44 ml
FBS (Fetal Bovine Serum) (HyClone)	5 ml	5 ml	5 ml
Penisilliini/Streptomysiini (P/S) (Euroclone, Milano, Italia)	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
1 M Glukoosi	1,25 ml	0,875 ml	0,250 ml

**Taulukko 3.** Glukoosikäsittelyiden valmistus HaCaT-soluille. Mediumiin lisättyjen aineiden loppukonsentraatiot: FBS 10%, penisilliini/streptomysiini 50µg/ml, 50 U/ml.

	25 mM Glc	17,5 mM Glc	5 mM Glc
Dulbecco's modified Eagle's medium (Euroclone, Milano, Italia)	44 ml	44 ml	44 ml
Ham's F-12 (Lonza, Belgium)	44 ml	44 ml	44 ml
FBS (Fetal Bovine Serum) (HyClone)	10 ml	10 ml	10 ml
Penisilliini/Streptomysiini (P/S) (Euroclone, Milano, Italia)	1 ml	1 ml	1 ml
Hydrokortisoni	0,110 ml	0,110 ml	0,110 ml
1 M Glukoosi	2 ml	1,25 ml	

**Taulukko 4.** Glukoosikäsittelyiden valmistus SCC-soluille. Mediumiin lisättyjen aineiden loppukonsentraatiot: FBS 10%, penisilliini/streptomysiini 50µg/ml, 50 U/ml, hydrokortisoni 400 ng/ml.

	1 mM GlcN	20 mM Man	20 $\mu$ M TG
Solulinjan 17,5 mM Glc-medium	5 ml	5 ml	5 ml
200 mM Glu-kosamiini	0,25 ml		
1 M Mannoosi		0,100 ml	
10mM Thiamet G			10 $\mu$ l

**Taulukko 5.** Käsitellyt solujen omista 17,5 mM Glc-mediumeista valmistettuina.

### 2.3 UDP-sokerien uuttaminen ja puhdistus ENVI-Carb-patruunalla.

UDP-sokerieristystä varten käsitellyt solut siirrettiin jäälle. Soluja kasvatettiin UDP-sokerikokeita varten 6-kuoppalevyillä, joista kasvatusmedium otettiin talteen HA-määrittystä varten.

Kun medium on poistettu, lisättiin kuoppiin 1 ml PBS:ää varovasti kuopan reunan kautta, jotta vältettäisiin irrottamasta soluja. Tämän jälkeen PBS poistettiin kuopista. Huuhtelu toistettiin kaksi kertaa.

Kuoppiin lisättiin 1 ml PBS:ää ja solut raaputettiin irti käyttäen steriilejä raaputtimia. Raaputettu solususpensio siirrettiin 15 ml muoviputkeen jäähautteelle, jonka jälkeen kuopat huuhdeltiin vielä 2\*1 ml PBS:llä ja saatava suspensio yhdistettiin aikaisemman suspension kanssa.

Solususpensio sentrifugoitiin (Heraeus® Sepatech, Megafuge® 1.0, Kendro Laboratory Products) 2000 g:llä 5 minuuttia. Tämän jälkeen PBS poistettiin varoen solupellettä. Pelletin päälle lisättiin 0,5 ml PBS:ää ja pelletti suspensoitiin siihen. Kun pelletti on suspensoitu, sonikoitiin näytettä (UP50H, Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Saksa) 20 sekuntia asetuksilla cycle 100 ja power 1. Sonikoinnin jälkeen putket siirrettiin jäälle.

Sonikoidusta 0,5 ml näytteestä otettiin 60  $\mu$ l näytettä Pierce BCA proteiininmäärittystä varten, jonka jälkeen siihen lisättiin 2 ml PBS:ää. Tässä vaiheessa näytteet voitiin tarvittaessa pakastaa -20 °C:ssa. Näytteet sentrifugoitiin uudelleen (Eppendorf AG, Centrifuge 5810R) +4 °C:ssä 8000 g:llä 20 minuutin ajan. Tällä ajalla esikäsiteltiin ENVI-CARB-pylväät (Sigma).

Pylväiden (Supelclean ENVI-CARB SPE-tubes 3 ml, 0,25 g, 57088, Sigma, St. Louis, MO, USA) esikäsitteily aloitettiin kokoamalla vakuumlaitteisto (Supelco, Visiprep™), johon ENVI-Carb-pylväät liitettiin.

Pylväät pestiin aluksi 3ml:llä 80 %:sta asetonitriiliä (J.T.Baker, Center Valley, PA, USA) käyttämättä vakuumia. Asetonitriilin jälkeen pylväiden läpi valutettiin 2,8 ml 0,1 %:sta trifluoroetikkahappoa (Fluka biochemika, St. Louis, MO, USA) vakuumin avulla. Viimeisenä ennen itse näytettä pylväät pestiin vielä 2,8 ml:llä Milli Q –vettä. Pylväät eivät saa kuivua missään vaiheessa niitä käsiteltäessä, joten niihin jätettiin noin 1mm edellistä liuosta.

Näyte pipetoitiin esikäsiteltyyn pylvääseen varoen mahdollista pellettiä ja annettiin valua pylvään läpi ilman vakuumia, jonka jälkeen pylväitä pestiin seuraavilla puskureilla vakuumin kanssa: 2 ml Milli Q –vettä, jonka jälkeen lisättiin 2 ml 25 %:lla asetonitriilillä. Sen jälkeen pylväisiin lisättiin vielä 2 ml 50 mM trietyyliammoniumasetaatipuskuria (TEAA) pH 7 (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Patruunoissa olevat näytteet eluointiin 1,8 ml:llä 25 %:lla asetonitriilillä 50 millimolaarisessa TEAA-puskurissa. Niiden annettiin valua 1,5 ml Eppendorf-putkiin välillä putkea vaihtaen. Tyhjät patruunat hävitettiin ja UDP-sokerit sisältävät eluaatit siirrettiin sentrifugaalihaihduttimeen (Thermo Electron Corporation, SPD131DDA-230) käyttäen asetuksia Run type: Vacuum run 0,1, ei lämmitystä. Haihdutetut näytteet säilytettiin pakastettuina -20 °C:ssa HPLC-analyysiä varten.

## 2.4 HPLC

HPLC (High-performance liquid chromatography eli korkean erotuskyvyn nestekromatografia) on erottelumenetelmä, jota käytetään tunnistamaan ja erottamaan edellisessä vaiheessa puhdistetut nukleotidit ja nukleotidisokerit. Tässä tutkimuksessa keskityimme määrittämään solujen tuottamia UDP-sokeripitoisuuksia, joita voidaan määrittää käyttämällä anioninvaihto-HPLC:tä.

Näytteet ajettiin HPLC:llä (Dionex, Thermo Fisher Scientific, ICS-3000 pumppuyksikkö, ICS detektori, Sunnyvale, CA, USA) käyttäen CarboPac™ PA1 column 4 x 250 mm (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) pylvästä. Laitteessa oli Gilson 234 –autoinjektori (Gilson,

Middleton, WI, USA) ja systeemiä ohjattiin Dionezin Chromeleon 6.80 ohjelmalla (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Näytteet liotettiin Milli Q –veteen (150µl).

Erottelupuskureina HPLC:ssä toimivat:

- A) Milli Q –vesi
- B) 1,3 M boorihappo, pH 7,5
- C) 1,0 M natriumasettaatti, pH 7,0
- D) 1,5 M boorihappo, pH 7,5

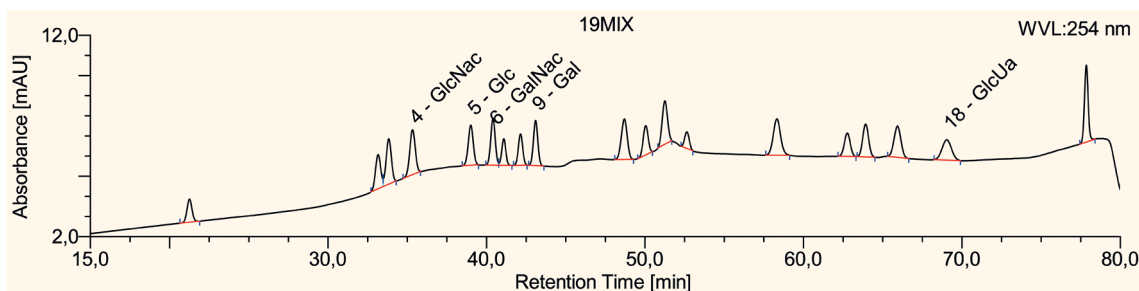
Pylväs tasapainotettiin 45 %/55 %/0 %/0 % (v/v/v/v) seoksella yllämainittuja puskureita. Tasapainotuksen jälkeen näytteet (100µl) injektoidiin pylväaseen ja eluoiitiin taulukon mukaisella ohjelmalla (Taulukko 6).

T0	45 %/ 55 %/0 %/0 %
T23	31 %/42 %/22 %/ 5 %
T34	21 %/37 %/32 %/10 %
T40	9 %/34 %/37 %/20 %
T60	5 %/23 %/56 %/16 %
T68	17 %/19 %/63 %/1 %
T72	15 %/17 %/67 %/1 %
T76	13 %/ 7 %/80 %/0 %
T77	13 %/7 %/80 %/0 %
T78	45 %/55 %/0 %/0 %
T87	45 %/55 %/0 %/0%

**Taulukko 6.** HPLC-ohjelma.

Pylvään erottelemat UDP-sokerit detektoitiin 254 nm allonpituudella ja niiden tuottamat piikit tunnistettiin retentioaikojen perusteella. Pitoisuudet laskettiin käyttämällä standardisuo-  
raa, joka saatiin ajamalla tunnettu määrä jokaista tunnistettavaa ainetta.





**Kuva 5.** Tyypillinen HPLC-tulos. Näytteenä käytetty standardiseosta, jossa on 19 eri nukleotidiä ja nukleotidisokeria. Työn kannalta kiinnostavien UDP-sokereiden piikit identifioidu.

## 2.5 ELSA

ELSA (enzyme-linked sorbent assay) on menetelmä, jota käytetään määrittämään hyaluronaanipitoisuus kerätyistä mediumnäytteistä. Menetelmä perustuu hyaluronaania sitovan HABR-koettimen (Hyaluronan binding region) ja biotinoidun bHABR:in sitoman hyaluronaanin osoitukseen. Streptavidini-peroksidaasi-substraatti –reaktio auttaa havaitsemaan HA:n.

Menetelmä aloitettiin pinoittamalla levyt HABR-liuoksella (1 µg/ml), jonka laimennus on 12 µl HABR + 12 ml 50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -puskuria pH 9,5. Valmistettua liuosta pipetoitiin 100 µl Nunc MaxiSorp® 96-kuoppalevyyn monikanavapipetillä. Tämän jälkeen levyä inkuboitiin 37 °C:ssä kaksi tuntia, jonka aikana HABR kiinnittyi levyyn.

Inkuboinnin jälkeen kuopat pestiin 3\*3 min 200 µl 0,5 % Tween-PBS –liuoksella. Pesut suoritettiin Labsystemsin pesurilla (Labsystems Multidrop 831, Finland) ja jokaisen pesun jälkeen edellinen pesuliuos kaadettiin pois ja kopistetaan kuivaksi paperipyyhettä vasten. Pesua tehostettiin käyttämällä jokaisen pesun aikana taseeravistelijaa.

Kun kuopat on pesty pinnoituksen jälkeen, estettiin epäspesifinen sitoutuminen 1 % BSA-PBS:llä. Jokaiseen kuoppaan lisättiin 250 µl 1 % BSA-PBS:ää ja levyä inkuboitiin 1 tunti 37 °C:ssa. Epäspesifiä sitoutumista halutaan estää, jotta kuoppiin lisättävät HA-näyte ja bHABR sitoutuisivat vain HABR:iin eivätkä esimerkiksi kuopan pohjaan. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin samanlainen pesu kuin ensimmäisenkin inkuboinnin jälkeen. Täten saatuja levyjä voidaan tarvittaessa säilyttää pakastettuina -20 °C:ssa.

Seuraavaksi kuoppiin lisättiin laimennetut HA-näytteet, jotka ovat 6-kuoppalevyillä kasva-  
neiden solujen kasvatusmediumit. Laimennokseen käytettiin 1 % BSA-PBS-liuosta niin, että  
lopputilavuus oli 350 µl. Laimennokset eri solulinjoilla olivat seuraavat (Taulukko 7):

Solulinja	HaCaT	SCC-9	SCC-25
Laimennussuhde	1:30	1:10	1:60

**Taulukko 7.** HA-näytteiden laimennus.

Hyaluronaanistandardien (10 µg/ml, ProVisc®, Algon Laboratories, Fort Worth, TX, USA)  
valmistus (Taulukko 8):

Välilaimennus: 10 µl 10 µg/ml HA + 1 % BSA-PBS.

HA-pitoisuus (ng/ml)	HA (µl)	1 % BSA-PBS (µl)
50 (välilaimennos)	100 µl 500 ng/ml	900
35	700 µl 50 ng/ml	300
25	715 µl 35 ng/ml	285
15	600 µl 25 ng/ml	400
10	665 µl 15 ng/ml	335
5	500 µl 10 ng/ml	500
2,5	500 µl 5 ng/ml	500
1	400 µl 2,5 ng/ml	600
0	-	-

**Taulukko 8.** Hyaluronaanistandardien valmistus.

Näytteitä ja standardeja pipetoitiin 100µl 96-kuoppalevyille suunnitelman mukaan ja niistä  
tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä. Levyä inkuboitiin 37 °C:ssa tunti, jonka jälkeen suori-  
tettiin levyn pesu 3\*3 min 200 µl 0,5 % Tween-PBS:llä kuten aiemminkin.

Tämän jälkeen valmistettiin bHABR-liuos (1µg/ml) lisäämällä 12 µl bHABR-stock:ia 12  
ml:ään 1 % BSA-PBS:ää, joka lisättiin levyille. Levyjä inkuboitiin tunti 37 °C:ssa, jonka  
jälkeen levy pestiin kuten aiemmin. Juuri ennen käyttöä valmistettiin 1:20 000 (1 µl+20 ml)  
Horse Radish Peroxidase in Streptavidin PBS:ssä (Vector Laboratories, Inc., Burlingame,  
CA, USA), jota pipetoitiin 100 µl kuoppiin ja inkuboitiin tunti 37 °C:ssa. Levy pestiin jälleen  
samalla tavalla kuin aikaisemmin.

Pesujen aikana valmistettiin substraatti-kromogeeniliuos laimentamalla 0,5 % TMB (3,3',5,5'-tetrametyylilibentsediini) substraattipuskurilla 1. Substraattipuskurissa oli 0,1 M natriumasetaattia, 1,5 mM sitruunahappoa, 0,005 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pH 6,0 ja MilliQ-vettä. Valmistettua liuosta pipetoitiin 100 µl kuoppiin ja inkuboitiin huoneen lämmössä pimeässä folion alla 25 minuuttia kunnes värireaktio tapahtui. Inkuboinnin jälkeen kuoppiin lisättiin 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, joka pysäytti värinmuodostusreaktion. Tämän jälkeen mitattiin absorbanssi kuoppalevylukijalla (Labsystems iEMS Reader MF) 450 nm:llä.

## 2.6 Pierce BCA Proteiininmääritys

Sekä UDP-sokerit että HA-tulokset normalisoitiin totaaliproteiininmääriin. Nämä näytteet kerättiin sonikoidusta solususpensiosta ja määritettiin käyttäen Piercen BCA-proteiini määritys kittiä. Tätä varten valmistettiin WR-reagenssia 200 µl kaivoa kohden sekoittamalla reagenssia A ja reagenssia B suhteessa 1:50 kitin ohjeen mukaisesti. Standardi (Protein Standard 200 mg BSA/ml, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) laimennettiin proteiininäytteen kanssa samaan puskuriin, PBS:ään, oheisen taulukon mukaisesti (Taulukko 9).

Proteiinipitoisuus (µg/µl)	Laimennus
2 µg/µl	2 µl (200 mg/ml) + 198 µl
1,5 µg/µl	45 µl (2 µg/µl) + 15 µl
1 µg/µl	60 µl (2 µg/µl) + 60 µl
0,5 µg/µl	60 µl ed. + 60 µl
0,25 µg/µl	60 µl ed. + 60 µl
0,125 µg/µl	30 µl ed. + 30 µl
0	60 µl puskuria

**Taulukko 9.** Pierce BCA proteiinistandardin laimennus.

Näytettä pipetoitiin kuoppiin 25 µl. Kun näytteet oli pipetoitu kuoppiin, lisättiin 200 µl valmistettua WR-reagenssia. Tämän jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin 37 °C:ssä puoli tuntia. Inkuboinnin jälkeen mitattiin absorbanssi kuoppalevylukijalla (Labsystems iEMS Reader MF) aallonpituudella 540 nm.

## 2.7 Migraatiot

Migraatiot suoritettiin solulinjasta huolimatta samalla tavalla kaikille kolmelle käytössä olleelle solulinjalle.

HaCaT-soluja laitettiin 70 000 solua/kuoppa ja SCC-soluja laitettiin 80 000 solua/kuoppa. Soluja pipetoitiin niin, että saatiin kuusi rinnakkaista näytettä jokaisesta eri käsittelystä. Tämän jälkeen solut siirrettiin kiinnittymään ja kasvamaan inkubaattoriin kahdeksi vuorokaudeksi.

Inkuboinnin jälkeen tarkistettiin mikroskoopilla (Olympus CK 2, Olympus Optical Co., Japan), että solut olivat kiinnittyneet kuoppiin. Tämän jälkeen tehtiin ristinmuotoiset haavat kuoppien pohjiin 1 ml pipetinkärkeä apuna käyttäen. Haavan tekemisen jälkeen kasvatusmedium imettiin pois Pasteur-pipetillä. Jokaiseen kuoppaan lisättiin käsittelyt (25 mM Glc, 17,5 mM Glc, 5 mM Glc, 1 mM GlcN, 20 mM Man ja 20  $\mu$ M TG (400  $\mu$ l)) omille riveillensä. Glukosamiini-, mannoosi- ja TG-käsittelyt valmistettiin juuri ennen migraatiokokeiden aloittamista.

Käsittelyjen jälkeen haavat kuvattiin (Nikon Digital Sight DS-L1, Nikon Corporation, Japan). Kuvauksen jälkeen solut siirrettiin inkubaattoriin ja annettiin kasvaa 24 tuntia. Tämän jälkeen solut kuvattiin uudelleen ja hävitettiin.

## 2.8 Tilastotestit

Tilastotesteinä käytettiin student's t-testiä tai yksisuuntaista monivarianssianalyysiä (ANOVA) ja post Hoc -testinä Dunnettin testiä. ANOVA:aa käytettiin UDP-sokeridatalle, hyaluronaanimäärille ja migraatioille, kun vertailtiin käsittelyjen vaikutuksia. Eri solulinjoja vertailtaessa käytettiin Student's t-testiä. Tilastotestit ja taulukot piirrettiin käyttäen GraphPad Prism -ohjelman windows-versiota 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3 TULOKSET

Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia erilaisten tekijöiden vaikutusta UDP-sokeri- ja hyaluroonaanisynteesiin sekä migraatioon kolmella eri solulinjalla. Tutkimuksessa käytettiin seuraavia käsittelyjä: 25 mM Glukoosi 17,5 mM Glukoosi, 5 mM Glukoosi, 20 mM Mannoosi, 1 mM Glukosamiini ja 20  $\mu$ M Thiamet G, joka vaikuttaa OGA-entsyymiä inhiboiden nostaen O-GlcNAc:in määrää. Tarkasteltavia UDP-sokereita oli viisi: UDP-GlcNAc, UDP-Glc, UDP-GlcUA, UDP-GalNAc ja UDP-Gal.

Tulokset osoittavat, että käsittelyt vaikuttivat HaCaT-, SCC-9- ja SCC-25-soluihin. Kaikissa solulinjoissa UDP-GlcNAc ja UDP-GalNAc saivat tilastollisen merkitsevyyden glukosamiinikäsittelyssä. Glukosamiinin todettiin lisäävän huomattavasti UDP-GlcNAc- ja UDP-GalNAc-tasoa. Toisaalta huomattiin, että glukosamiinikäsittely vähentää selkeästi UDP-Glc:n ja UDP-Gal:in tuottoa kautta solulinjojen.

Kasvava glukoosikonsentraatio näyttää vaikuttavan hypoteesimme mukaan nostaen UDP-sokeritasoja glukoosin saatavuuden kasvaessa. Näin ollen 5 mM:ssa glukoosissa kasvaneet solut tuottavat vähemmän UDP-sokereita kuin kontrolli tai 25 mM:ssa glukoosikäsittelyssä kasvaneet solut.

#### 3.1 UDP-sokerit (HPLC)

##### 3.1.1 Vaikutukset HaCaT-soluihin

Käsittelyiden vaikutus HaCaT-soluille näkyy tilastollisesti merkittävänä glukosamiinin vaikutuksena UDP-sokerien tuottoon. Glukosamiini lisää merkittävästi UDP-GlcNAc:in ja UDP-GalNAc:in tuotantoa ja vähentää UDP-Glc:n ja UDP-Gal:n tuotantoa.

Tilastollisesti merkittäväksi osoittautui myös 5 mM glukoosikäsittelyn vähentävä vaikutus UDP-Glc:n määriin. Huomioitavaa on myös, että HaCaT-solut eivät tuottaneet detektoitavia määriä UDP-Gal:ia 5mM glukoosikäsittelyssä (Kuva 6).

### 3.1.2 Vaikutukset SCC-9-soluihin

SCC-9-soluilla käsittelyistä tilastollisesti merkittäviä olivat glukosamiinin UDP-GlcNAc:in tuottamista lisäävä vaikutus. Glukosamiini lisäsi myös UDP-GalNAc:in tuottoa. Glukoosin vaikutus menee hypoteesin mukaan: kasvava glukoosikonsentraatio lisäsi eri UDP-sokereiden tuottoa (Kuva 7).

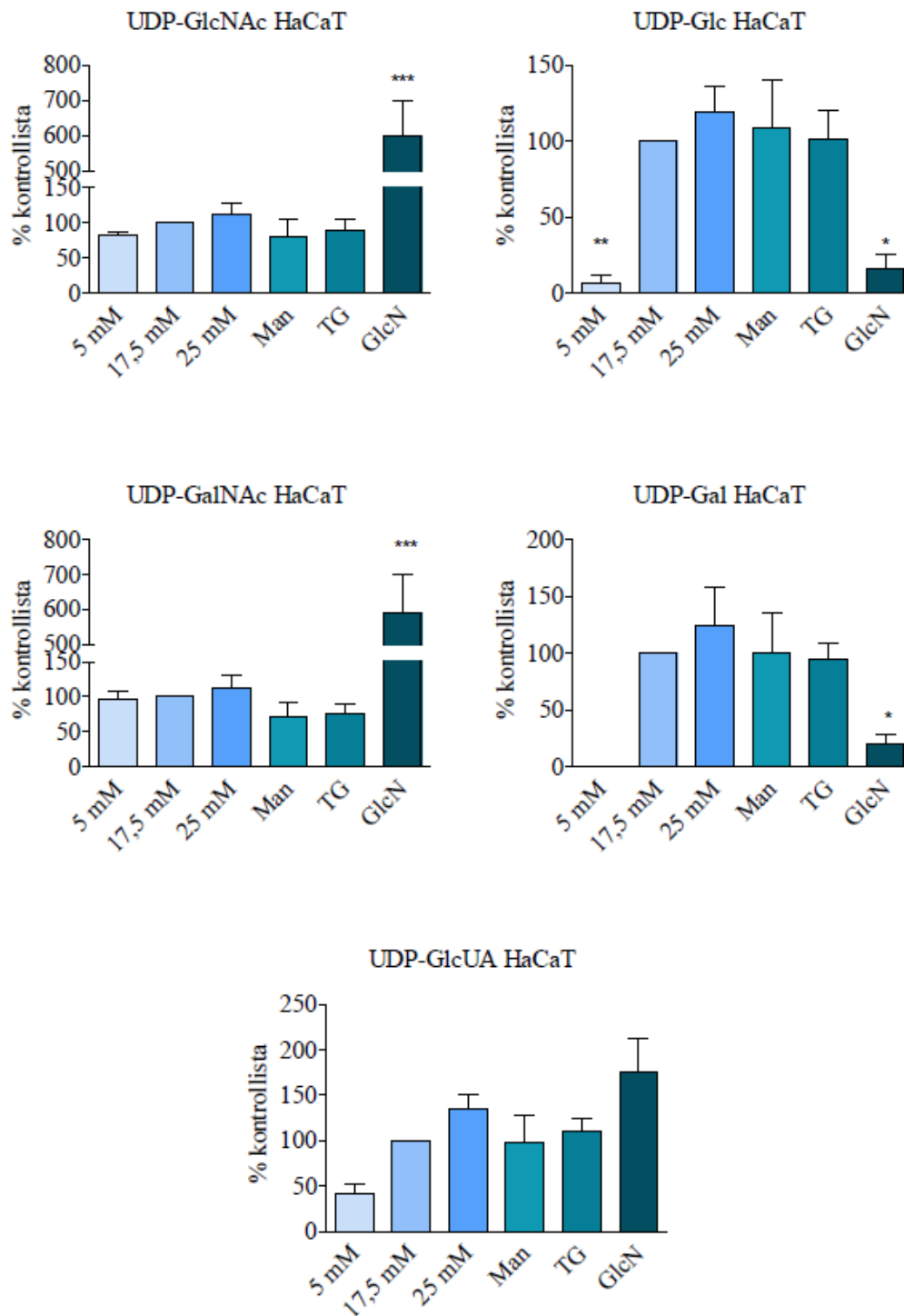
### 3.1.3 Vaikutukset SCC-25-soluihin

Kuten muillakin tutkituilla solulinjoilla tilastollisesti merkittäviksi käsittelyiksi SCC-25-soluilla osoittautui glukosamiinin lisäävä vaikutus UDP-GlcNAc- ja UDP-GalNAc-tasoihin. Muilla käsittelyillä ei saatu tilastollista merkitystä. SCC-25-solulinjalla kasvava glukoosikonsentraatio lisää tasaisesti eri UDP-sokereiden tuotantotasoa (Kuva 8).

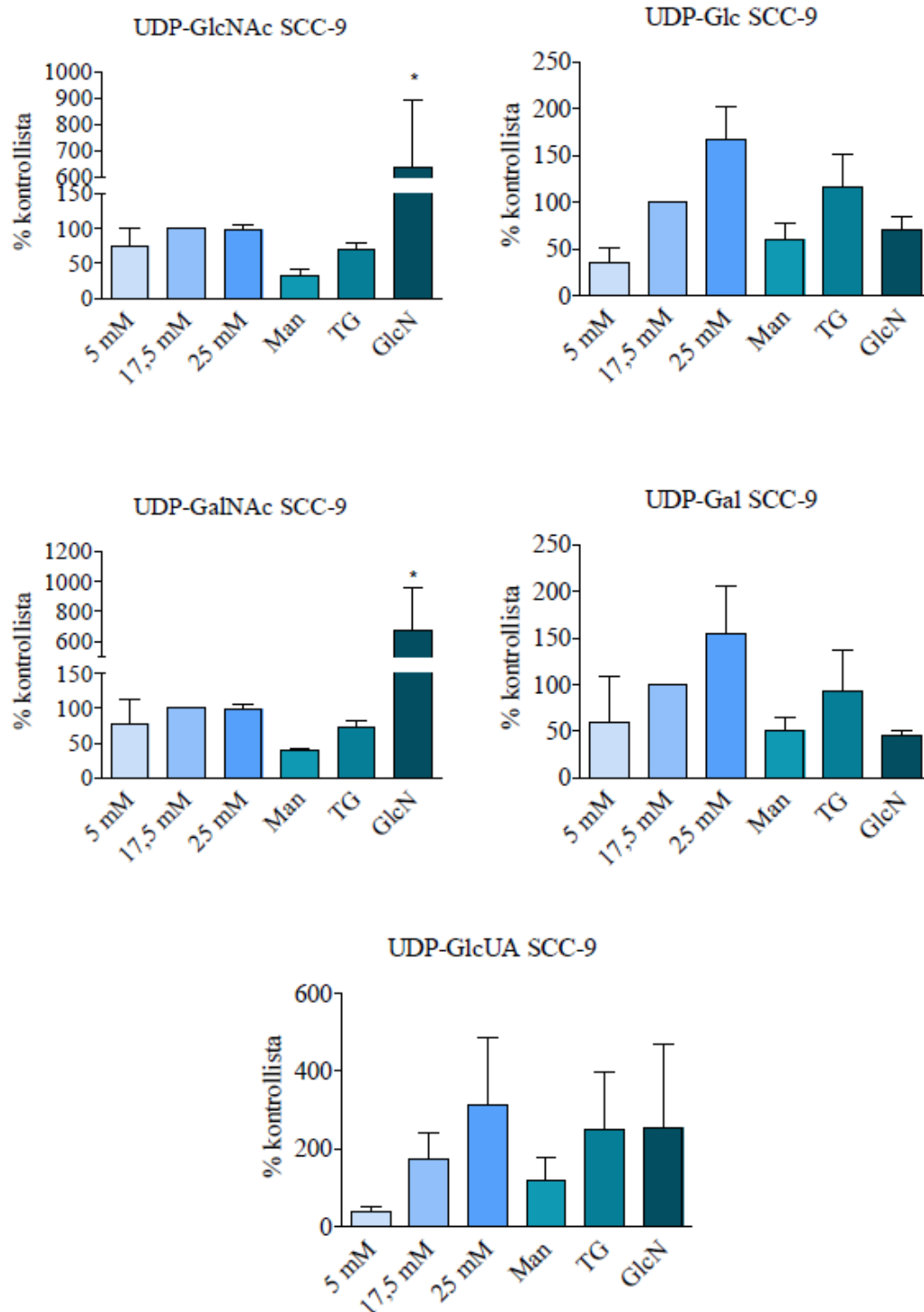
### 3.1.4 Mannoosin ja Thiamet G:n vaikutukset

Thiamet G –käsittely näyttäisi lievästi nostavan kaikkia UDP-sokeritasoja SCC-25-soluilla.

Mannoosilla näyttäisi olevan laskeva vaikutus UDP-GlcNAc-, UDP-GalNAc- ja UDP-GlcUA-tasoihin HaCaT- ja SCC-9-soluilla, mutta päinvastainen vaikutus SCC-25-soluilla. UDP-Glc:n ja UDP-Gal:in tuotanto kasvaa mannoosikäsittelyssä SCC-25-soluilla toisin kuin SCC-9-soluilla (Kuvat 6-8).

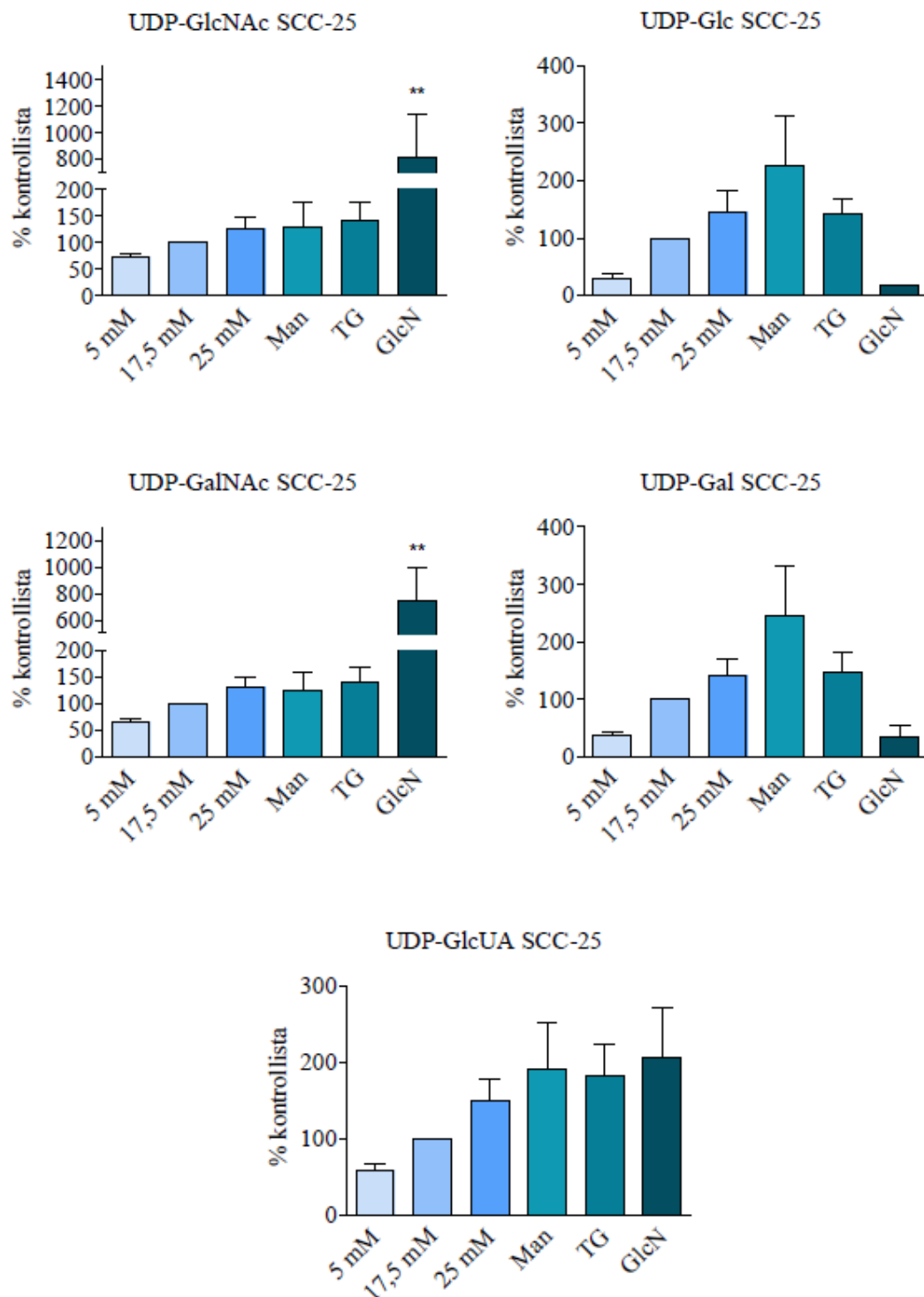


**Kuva 6.** Muutokset HaCaT-solujen UDP-sokerimäärissä eri käsittelyjen seurauksena. Kontrollina toimii 17,5 mM glukoosikäsittely. Tilastollinen merkittävyys on laskettu käyttämällä yksisuuntaista varianssianalyysia (ANOVA) ja Dunnettin monivertailutestiä (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).  $n=2-3$  (tilastollisen merkittävyyden saaneiden  $n=3$ ) ja pylväs kuvaa keskiarvoa.  $\pm$ SEM.



**Kuva 7.** Muutokset SCC-9-solujen UDP-sokerimäärissä eri käsittelyjen seurauksena. Kontrollina toimii 17,5 mM glukoosikäsittely. Tilastollinen merkittävyys on laskettu käyttämällä yksisuuntaista varianssianalyysia (ANOVA) ja Dunnettin monivertailutestiä (\* $p < 0,05$ ).  $n=2-3$  (tilastollisen merkittävyyden saaneiden  $n=3$ ) ja pylväs kuvaa keskiarvoa.  $\pm$ SEM.



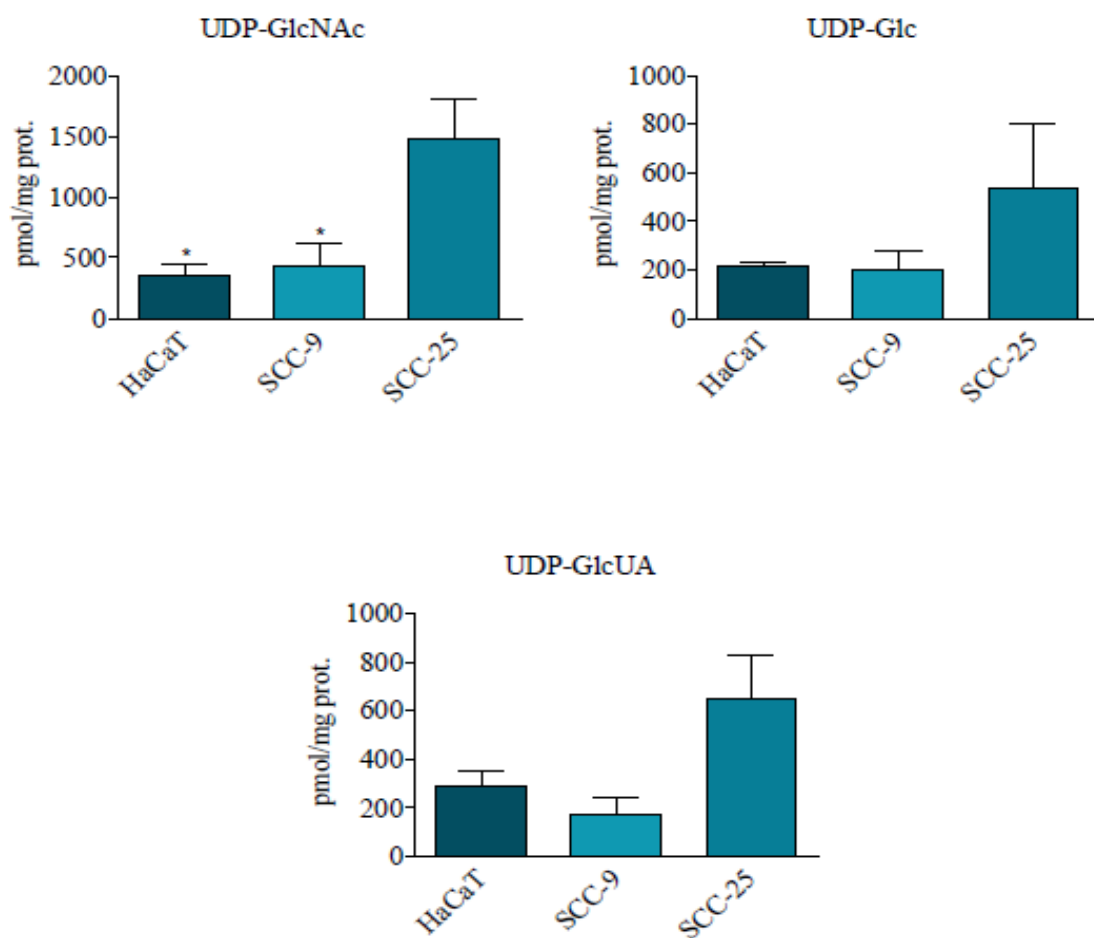


**Kuva 8.** Muutokset SCC-25-solujen UDP-sokerimäärissä eri käsittelyjen seurauksena. Kontrollina toimii 17,5 mM glukoosikäsittely. Tilastollinen merkittävyys on laskettu käyttämällä yksisuuntaista varianssianalyysia (ANOVA) ja Dunnettin monivertailutestiä (\*\* $p < 0,01$ ).  $n=2-3$  (tilastollisen merkittävyyden saaneiden  $n=3$ ) ja pylväs kuvaa keskiarvoa.  $\pm$ SEM.

### 3.2 HaCaT vs SCC-9 vs SCC-25

HaCaT-solut ovat ihon keratinosyyttejä ja SCC-9- ja SCC-25-solut ovat kielen levyepiteeli-syöpäsoluja. HaCaT-solut toimivat tutkimuksessa kontrollisoluina kielisyöpäsoluille.

SCC- ja HaCaT-solujen kontrollinäytteiden välillä tilastollisesti merkitseviä eroja ilmeni tarkemmin tarkastelluissa UDP-sokereissa vain UDP-GlcNAc:ssa. Tilastollisen merkitsevyyden saivat HaCaT vs SCC-25 ja SCC-9 vs SCC-25 (Kuva 9).



**Kuva 9.** HaCaT-, SCC-9- ja SCC-25-solujen 17,5 mM glukoosikontrollinäytteiden välillä ilmenevät erot UDP-sokerimäärissä. Tilastollinen merkittävyys on laskettu käyttämällä yksisuuntaista varianssianalyysia (ANOVA) ja Tukeyn testiä,  $n = 2-3$  (tilastollisen merkittävyyden saaneiden  $n=3$ ). Pylväs kuvaa keskiarvoa.  $\pm$ SEM.

### 3.3 Hyaluronaanimäärät (ELSA)

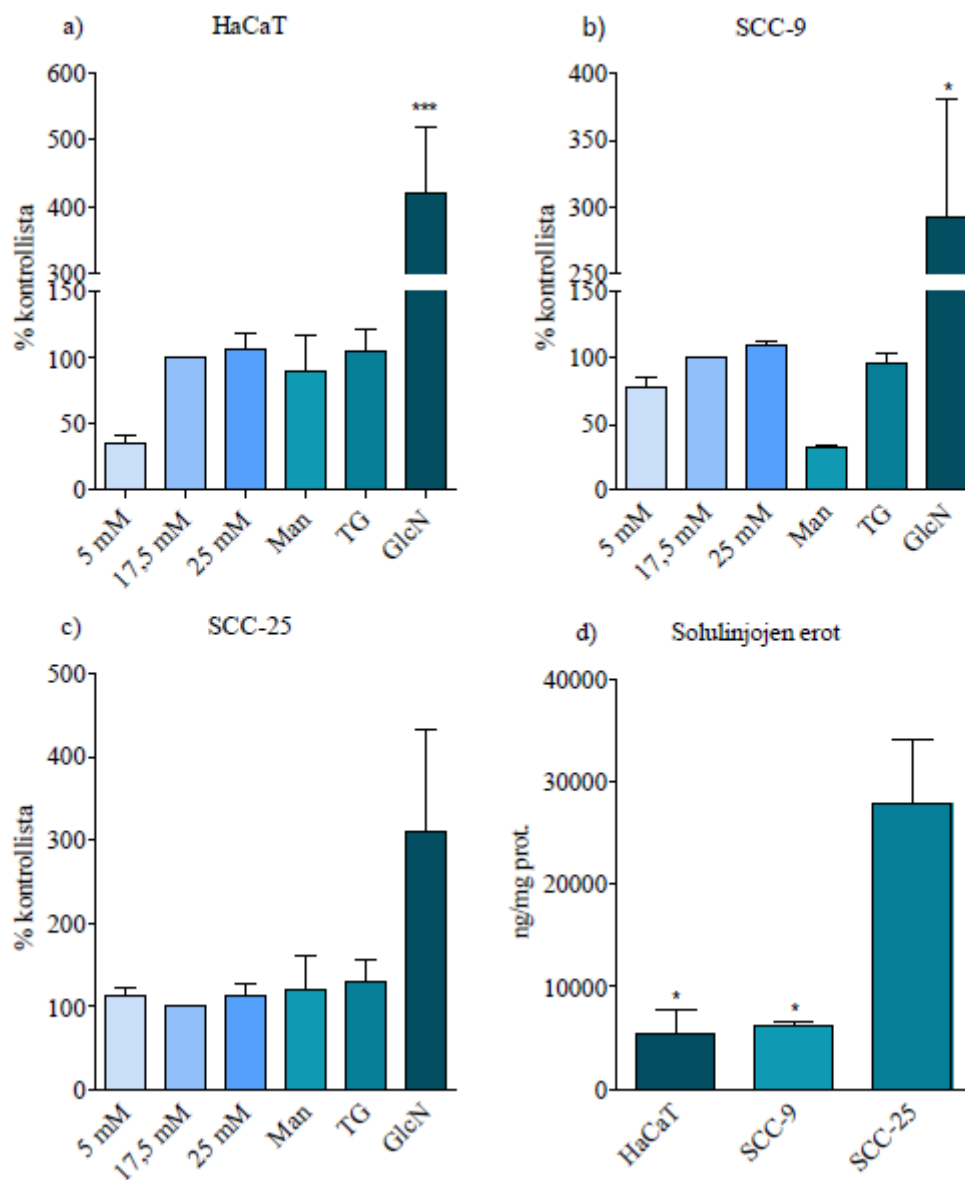
HaCaT-soluilla käsittelyt vaikuttivat odotetulla tavalla HA-määriin. Kasvava glukoosikonsentraatio näyttäisi lisäävän hyaluronaanitasoja; 5 mM glukoosilla hyaluronaanin tuotanto on vähäisempää ja glukoosikonsentraation kasvaessa hyaluronaanimäärät nousevat. Mannoosikäsittely näyttäisi vähentävän, Thiamet G:llä ei ollut juuri vaikutusta ja glukosamiini lisäsi hyaluronaanimäärää voimakkaasti. Kontrollina toimi 17,5 mM glukoosi (Kuva 10 a).

SCC-9-soluilla kasvava glukoosikonsentraatio toteutti samaa kaavaa kuin HaCaT-solut: kun glukoosipitoisuus nousi, hyaluronaania tuotettiin enemmän. Mannoosi vaikutti selvästi vähentäen, Thiamet G:llä ei ollut juuri vaikutusta ja glukosamiini lisäsi hyaluronaanimäärää ja sai tilastollisen merkittävyyden. Kontrollina toimi 17,5 mM glukoosi (Kuva 10 b).

SCC-25-soluilla glukoosin määrän muutokset eivät vaikuttaneet selvästi hyaluronaanin muodostukseen. Mannoosin ja Thiamet G:n vaikutus oli lievästi nostava, mutta glukosamiinikäsittely aiheutti selkeän nousun hyaluronaanitasoissa (Kuva 10 c).

Vertailtaessa kolmen solulinjan 17,5 mM glukoosikontrollia huomattiin, että SCC-25-solut tuottivat selkeästi eniten hyaluronaania, kun taas HaCaT- ja SCC-9-solulinjojen välillä ei ollut merkittävää eroa.

Tulokset viittaavat siihen, että syöpäsolut tuottaisivat enemmän hyaluronaania kuin keratiinosyytit (Kuva 10 d).



**Kuva 10.** HaCaT-, SCC-9- ja SCC-25-solujen tuottamat hyaluronaanimäärät eri käsittelyjen välillä. Kontrollina toimii 17,5 mM glukoosikäsittely. Tilastollinen merkittävyys on laskettu käyttämällä yksisuuntaista varianssianalyysia (ANOVA) ja Dunnetin monivertailutestiä (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ )  $n=3$ . Pylväs kuvaa keskiarvoa. Vertailussa d) käytettiin Tukeyn post-Hoc testiä.  $\pm$ SEM.

### 3.4 Migraatiot

HaCaT-solulinjalla 5 mM:n glukoosikäsittelyn hidastava vaikutus näkyi selkeästi ja sai tilastollisen merkittävyyden. Muut käsittelyt eivät sanottavasti vaikuta HaCaT-soluihin (Kuva 11 a).

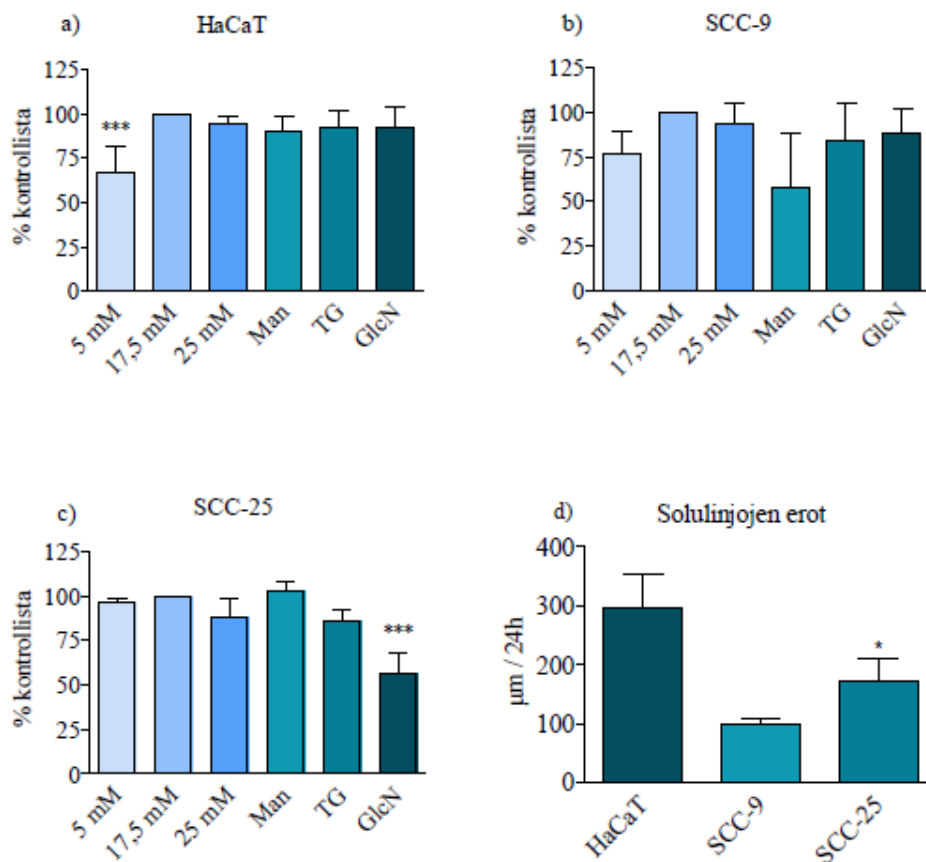
SCC-9-soluilla 5 mM glukoosi- ja mannoosikäsittelyt näyttäisivät hidastavan migraatiota verrattuna 17,5 mM glukoosikontrolliin. Mannoosin migraatiota laskeva vaikutus näkyi selkeimmin (Kuva 11 b).

SCC-25-solujen migraatio ei hidastunut 5 mM glukoosikäsittelyssä. Mielenkiintoista oli, että 25 mM glukoosikäsittely hidasti migraatiota hieman. Thiamet G ja erityisesti glukosamiini näyttäisivät hidastavan migraatiota.

Mielenkiintoista oli, että glukosamiini hidastaa solulinjan migraatiota selkeästi, vaikka glukosamiinin tiedetään vaikuttavan hyaluronaanisynteesiin lisäten sitä ja hyaluronaanin vaikuttavan migraatioon oletettavasti sitä edistävästi (Kuva 11 c).

Vertailtaessa soluja 17,5 mM:n glukoosikontrollikäsitellyssä käy ilmi, että HaCaT-solulinjan migraationopeus on huomattavasti suurempi kuin SCC-solulinjojen. Tästä syystä HaCaT-soluja ei voida käyttää kontrollina migraatioissa.

Näyttäisi myös, että kielen levyepiteelisyöpäsolulinjoista SCC-25-solulinja migroisi SCC-9:ää enemmän. Tilastollinen merkittävyys on saatu vertailemalla HaCaT- ja SCC-25-solulinjoja (Kuva 11 d).



**Kuva 11.** HaCaT-, SCC-9- ja SCC-25-solujen migraatioerot eri käsittelyjen välillä. Tilastollinen merkittävyys on laskettu käyttämällä yksisuuntaista varianssianalyysia (ANOVA) ja Dunnettin monivertailutestiä (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ) HaCaT  $n=4$ , SCC-9  $n=2$ , SCC-25  $n=3$ . Tilastotestit on tehty vain HaCaT- ja SCC-25-solulinjoille. Pylväs kuvaa keskiarvoa.  $\pm$ SEM.

## 4 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Tutkimustulokset osoittavat, että suurempi glukoosikonsentraatio kasvatusmediumissa vaikutti positiivisesti solujen tuottamiin UDP-sokerikonsentraatioihin. Tämä heijastui myös hyaluronaanimääriin: mitä korkeampi glukoosikonsentraatio sitä korkeampi hyaluronaanimäärä. Glukosamiinikäsittely, jonka tiedetään vaikuttavan UDP-sokerimääriin, vaikutti kaikilla solulinjoilla voimakkaimmin. Nämä havainnot tukevat tutkimukselle asetettua hypoteesia.

Tuloksemme vahvistavat myös aikaisempia tutkimuksia hyaluronanin merkityksestä syövässä. Tämän lisäksi tutkimuksemme osoitti, että HACAT-solut eivät toimi kontrollisoluina suun limakalvon soluille niiden erilaisuuden takia. Tutkimuksessa käytettyjen syöpäsolulinjojen välillä havaittiin myös eroja.

Seuraavaksi käsitellään tutkimuksen kannalta keskeisimpiä ja mielenkiintoisimpia havain- toja ja niihin liittyviä pohdintoja.

### 4.1 UDP-sokerit

UDP-sokerit ovat tärkeitä aktiivisia monosakkarideja, jotka toimivat solujen sokerijohdan- naisten rakenneosina. Niitä muodostetaan glykolyysin välituotteista, joten niiden muodostus on riippuvaista glukoosista. Syöpäsolujen muuttuneen glukoosimetabolian vuoksi glukoo- sitransporttereita ilmennetään usein enemmän solukalvolla takaamaan solun glukoosin saanti tarpeen lisääntyttyä.

Käyttämiemme HaCaT-solujen optimaalinen glukoosikonsentraatio soluviljelyssä on 25 mM, joka saattaa vaikuttaa vertailuun, sillä SCC-solujen glukooptimi on 17,5 mM glu- koosi ja 17,5 mM glukoozia käytettiin tässä tutkimuksessa myös HaCaT-soluilla käsittely- mediumissa.

Kun HaCaT-soluilla oli saatavilla vähän glukoozia (5 mM), näyttää siltä, että UDP-glukoosin HPLC:llä havaittava määrä oli vähäisempi ja sitä oli käytetty UDP-GlcUA:n valmistuk- seen. Koska glukoozia ei ollut saatavilla, UDP-glukoosin käyttö kohdennettiin UDP- GlcUA:n tuottoon eikä niinkään mahdollisen varastosokerin, glykokeenin, muodostukseen,

jota voidaan valmistaa UDP-glukoosista. Toisaalta matalassa glukoosikonsentraatiossa syöpäsolutkaan eivät käyttäneet glukoosia juurikaan UDP-glukoosin tuottoon.

Myös glukosamiinikäsittelyssä UDP-glukoosia detektoitiin vähän ja tuotanto painottui UDP-GlcNAc:iin ja UDP-GlcUA:han, jotka ovat hyaluronaanin substraatteja. Tämä UDP-glukoosin vähäisempi detektointi selittyy glukosamiinilla sillä, että se on spesifisti HBS-reittiin vaikuttava aminosokeri. Toisaalta huomioitavaa on, että glukosamiinikäsittely ei kuitenkaan johtanut migraation lisääntymiseen HaCaT-soluilla, vaikka se lisääkin suoraan hyaluronaanin substraatteja.

#### **4.2 Hyaluronaanimäärät, -reseptorit ja -syntaasit**

SCC-25-solujen tulos oli mielenkiintoinen. Niille 5 mM glukoosikäsittely ei vaikuttanut hidastavasti hyaluronaanin tuottoon, vaan ne tuottivat 5 mM glukoosissa jopa enemmän hyaluronaania kuin kontrollissa. 5mM glukoosi ei myöskään hidastanut niin selkeästi SCC-solujen migraatiota toisin kuin se hidasti HaCaT-soluja. Solujen kesken on siis mitä ilmeisimmin eroja hyaluronaania tuottavien entsyymien ekspresion ja / tai aktiivisuuden välillä. Olisi mielenkiintoista tietää miten solut ilmentävät eri HAS-entsyymejä.

Toisaalta merkitystä voi olla myös hyaluronaanireseptorien ilmentämisellä. Nämä ovat osana hyaluronaanivälitteistä solujen migraatiota, sillä on todettu, että esimerkiksi RHAMM-reseptoria ilmenetään useissa suun levyepiteelikarsinoomissa ja on ylössäädely kaikissa Yamanon tutkimuksessa käytetyissä solulinjoissa<sup>47</sup>. Solut käyttävät RHAMM-reseptoria apunaan liikkumiseen, jonka takia se on mielenkiintoinen molekyyli esimerkiksi, jos siihen voitaisiin kohdentaa jokin lääkeaine esimerkiksi suusyövän hoidossa, sillä RHAMM:in yliekspresion vaikutukset yhdistetään solujen kasvaneeseen proliferaatioon.

Olisi mielenkiintoista tietää miten käsittelyt vaikuttaisivat solujen invasiivisyyteen, sillä jos olettamus hyaluronaanimäärän kasvun vaikutuksesta migraation tai invasiivisyyden lisäämiseen pätee, voisi selittyä osin myös se miksi SCC-solut tuottavat hyaluronaania enemmän alhaisessa glukoosikonsentraatiossa.



### 4.3 Migraatiot

Kuten aiemmin todettiin hyaluronaanilla voi olla migraatiota lisäävä tai vähentävä vaikutus, mutta hyaluronaaniketjun pituudella voi olla myös roolia migraatioissa. Toisaalta suuri määrä hyaluronaania saattaa aiheuttaa liian tiukan matriksin ja haitata tällä tavalla migraatiota. Oletimme, että kasvava hyaluronaanimäärä vaikuttaa migraatioon sitä edistävästi.

Koska käyttämämme koejärjestelmä ei ole herkkä lyhytketjuiselle hyaluronaanille, hyaluronaania saatettiin tuottaa vieläkin enemmän. Saattaa olla, että keskipitkä- ja pitkäketjuinen hyaluronaani lisäävät migraatiota, mutta lyhyemmät hidastavat tai toimivat häiritsevästi migraatioissa. Solut voivat ilmentää myös eri määriä eri hyaluronaanisyntaaseja. HAS1 ja HAS2 tuottavat pidempiä hyaluronaaniketjuja ja HAS3 lyhyempiä. Toisaalta tutkimukset ovat osoittaneet lyhytketjuisen hyaluronaanin olevan tärkeä osa angiogeneesiä eli verisuonten kasvua, joka on välttämättömyys myös kasvaimelle sen kasvaessa.

Tällä hetkellä hyaluronaania ja sen ilmentymistä suusyövässä on tutkittu suhteellisen vähän *in vivo* -näytteissä. Tutkimuksia löytyy CD44-reseptorista ja HAS2-entsyymistä sekä yksistään HA:sta suusyövässä. Aikaisemman tiedon valossa olisi hyvä tutkia myös esimerkiksi HAS1- ja HAS2-entsyymien ilmentymistä, HYAL1- ja HYAL2-entsyymien ilmentymistä ja HA:ta ja korreloida niitä keskenään ja arvioida niiden vaikutusta syöpään. Glukosamiinikäsittelyissä kaikki solut tuottivat paljon hyaluronaania, joka todettiin käyttäen ELSA:aa. HaCaT- ja SCC-9-solut eivät kuitenkaan migroineet 17,5 mM glukoosikontrollista huomattavasti poiketen. SCC-25-solujen migraatio sen sijaan hidastui merkittävästi. Miksi migraatio hidastuu? Tehdyn tutkimuksen perusteella sitä on vaikea sanoa ja lisää tutkimuksia aiheesta vaadittaisiin. Voivatko korkeat hyaluronaanipitoisuudet hidastaa migraatiota tai vaikuttaako eri hyaluronaanisyntaasien tuottamat eri mittaiset hyaluronaaniketjut siihen? Miten käytetyt solulinjat ilmentävät eri hyaluronaanisyntaaseja? Selittykö tällä SCC-25-solujen käyttäytyminen migraatiokokeissa?

## LÄHTEET

1. Montero PH, Snehal PG. Cancer of the Oral Cavity. 2015;24(3):491-508. doi:10.1016/j.soc.2015.03.006.CANCER
2. NORDCAN. Tärkeimpiä tilastotietoja lyhyesti: Suomi - Suuontelo. Association of the Nordic Cancer Registries. <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=20&country=246>. Published 2017. Accessed March 5, 2019.
3. Blot WJ, Mclaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. 1988;3282-3287.
4. Schiller JT, Møller B, Clark S, et al. Human Papillomavirus Infection as a Risk Factor for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2002;344(15):1125-1131. doi:10.1056/nejm200104123441503
5. Rosenquist K, Hansson BG, Bladström A, et al. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*. 2005;125(12):1337-1344. doi:10.1080/00016480510043945
6. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):309-316. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.06.002
7. Ogawa T, Washio J, Takahashi T, Echigo S, Takahashi N. Glucose and glutamine metabolism in oral squamous cell carcinoma: Insight from a quantitative metabolomic approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;118(2):218-225. doi:10.1016/j.oooo.2014.04.003
8. Hirschhaeuser F, Sattler UGA, Mueller-Klieser W. Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Res*. 2011;71(22):6921-6925. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1457
9. Warburg, O., Wind, F., Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol*. 1926;182(1):519-530. doi:10.1097/00000441-193107000-00022
10. Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer*. 1999;80(12):1892-1897. doi:10.1038/sj.bjc.6690617
11. Li S, Yang X, Wang P, Ran X. The effects of GLUT1 on the survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(3):624-634. doi:10.1159/000354466
12. Shen YM, Arbman G, Olsson B, Sun XF. Overexpression of GLUT1 in colorectal

- cancer is independently associated with poor prognosis. *Int J Biol Markers*. 2011;26(3):166-172. doi:10.5301/JBM.2011.8550
13. Tohma T, Okazumi S, Makino H, et al. Overexpression of glucose transporter 1 in esophageal squamous cell carcinomas: A marker for poor prognosis. *Dis Esophagus*. 2005;18(3):185-189. doi:10.1111/j.1442-2050.2005.00489.x
  14. Kim YH, Nakayama T, Nayak J. Glycolysis and the Hexosamine Biosynthetic Pathway as Novel Targets for Upper and Lower Airway Inflammation. 2018;10(1):6-11.
  15. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2000;58:13-18. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.07703.x
  16. McKnight GL, Mudri SL, Mathewes SL, Traxinger RR, Marshall S, Sheppard PO, O'Hara PJ. Molecular Cloning, cDNA Sequence, and Bacterial Expression of Human Glutamine:Fructose-6-phosphate Amidotransferase\*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;(16):25208-25212.
  17. Cinque U, Kress H. Functional regulation of glutamine : fructose-6-phosphate aminotransferase 1 (GFAT1) of *Drosophila melanogaster* in a UDP- N - acetylglucosamine and cAMP-dependent manner. 2001;412:401-412.
  18. Vosseller K, Sakabe K, Wells L, Hart GW. Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc : a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification. *Current Opinion in Chemical Biology* 2002, 6:851-857. doi:10.1016/S1367-5931(02)00384-8
  19. Zachara NE, Hart GW. O -GlcNAc a sensor of cellular state : the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. 2004;1673:13-28. doi:10.1016/j.bbagen.2004.03.016
  20. Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins : Signal Transduction and O-GlcNAc. 2001;291(March):2376-2379.
  21. Hart GW, Akimoto Y. The O-GlcNAc Modification. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., eds. *Essentials of Glycobiology. 2nd Edition*. 2nd editio. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1954/>.
  22. Shafi R, Iyer SPN, Ellies LG, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. 2000;97(11):5735-5739.
  23. Slawson C, Copeland RJ, Hart GW. O-GlcNAc Signaling : A Metabolic Link

- Between Diabetes and. 2011;35(10):547-555. doi:10.1016/j.tibs.2010.04.005.O-GlcNAc
24. Deen AJ, Arasu UT, Pasonen-Seppänen S, et al. UDP-sugar substrates of HAS3 regulate its O-GlcNAcylation, intracellular traffic, extracellular shedding and correlate with melanoma progression. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(16):3183-3204. doi:10.1007/s00018-016-2158-5
  25. Toole BP, Hascall VC. Hyaluronan and Tumor Growth. *Am J Pathol.* 2002;161(3):745-747. doi:10.1016/S0002-9440(10)64232-0
  26. Band PA, Heeter J, Wisniewski H-G, et al. Hyaluronan molecular weight distribution is associated with the risk of knee osteoarthritis progression. *Osteoarthr Cartil.* 2015;23(1):70-76. doi:10.1016/j.joca.2014.09.017.Hyaluronan
  27. Ågren UM, Tammi RH, Tammi MI. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(7):996-1001.
  28. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(8):2452-2459. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001
  29. Sironen RK, Tammi M, Tammi R, Auvinen PK, Anttila M, Kosma V. Hyaluronan in human malignancies. *Exp Cell Res.* 2010;317(4):383-391. doi:10.1016/j.yexcr.2010.11.017
  30. Itano N, Sawai T, Yoshida M, et al. Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties \*. 1999;274(35):25085-25092.
  31. Wang SJ, Earle C, Wong G, Bourguignon LYW. Role of hyaluronan synthase 2 to promote CD44-dependent oral cavity squamous cell carcinoma progression. 2013;3(April):511-520. doi:10.1002/HED
  32. Rilla K, Oikari S, Jokela TA, et al. Hyaluronan Synthase 1 ( HAS1 ) Requires Higher Cellular UDP-GlcNAc Concentration than HAS2 and HAS3 \* □. 2013;288(8):5973-5983. doi:10.1074/jbc.M112.443879
  33. Siponen M, Kullaa A, Nieminen P, Salo T, Pasonen-sepp S. Altered expression of hyaluronan , HAS1-2 , and HYAL1-2 in oral lichen planus. 2015:401-409. doi:10.1111/jop.12294
  34. Kosunen A, Ropponen K, Kellokoski J, et al. Reduced expression of hyaluronan is a strong indicator of poor survival in oral squamous cell carcinoma. 2004:257-263. doi:10.1016/j.oraloncology.2003.08.004
  35. Maxwell CA, Mccarthy J, Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM :

- moonlighting or dual oncogenic functions ? 2008. doi:10.1242/jcs.022038
36. Sreaton GR, Bell M V, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. 1992;89(December):12160-12164.
  37. Tolg C, Hofmann M, Herrlich P, et al. Splicing choice from ten variant variability establishes CD44. 1993;21(5):1225-1229.
  38. Okamoto I, Tsuiki H, Kenyon LC, et al. Short Communication Proteolytic Cleavage of the CD44 Adhesion Molecule in Multiple Human Tumors. 2002;160(2):441-447.
  39. Takamune Y, Ikebe T, Nagano O. ADAM-17 associated with CD44 cleavage and metastasis in oral squamous cell carcinoma. 2007;169-177. doi:10.1007/s00428-006-0350-y
  40. Wang SJ, Wong G, Heer A De, Xia W, Bourguignon LYW. CD44 Variant Isoforms in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. doi:10.1002/lary.20506
  41. Hudson DL, Speight PM, Fiona M. ALTERED EXPRESSION OF CD44 ISOFORMS IN SQUAMOUS-CELL CARCINOMAS AND CELL LINES DERIVED FROM THEM. 1996;463:457-463.
  42. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, Zhao M, Kudo Y, Ogawa I. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. 2000;36:545-549.
  43. Sato S, Miyauchi M, Ogawa I, et al. Inhibition of CD44v9 upregulates the invasion ability of oral squamous cell carcinoma cells. 2003;39:27-30.
  44. Maxwell CA, Keats JJ, Crainie M, et al. RHAMM Is a Centrosomal Protein That Interacts with Dynein and Maintains Spindle Pole Stability. 2003;14(June):2262-2276. doi:10.1091/mbc.E02
  45. Assmann V, Jenkinson D, Marshall JF, Hart IR. The intracellular hyaluronan receptor RHAMM / IHABP interacts with microtubules and actin filaments. 1999;3954:3943-3954.
  46. Maxwell CA, Rasmussen E, Zhan F, et al. NEOPLASIA RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma. 2019;104(4):1151-1159. doi:10.1182/blood-2003-11-4079.Supported
  47. Yamano Y, Uzawa K, Shinozuka K, Fushimi K. Hyaluronan-mediated motility : A target in oral squamous cell carcinoma. 2008:1001-1009.