



Påverkan av Dicer i regleringen av sköldkörtelspecifika proteiner samt proliferation och migration i ML-1-celler

Taru Lassila, 38134

tlassila@abo.fi

Pro gradu-avhandling

Handledare: Kid Törnquist

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

17.11.2018, Åbo Akademi

ÅBO AKADEMI

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Taru Lassila, 2018

Påverkan av Dicer i regleringen av sköldkörtelspecifika proteiner samt proliferation och migration i ML-1-celler

Pro gradu-avhandling, 65 sidor

Nyckelord: Dicer, miRNA, sköldkörtelcancer, EMT

Abstrakt

Dicer är ett enzym som hör till klass III RNA endonukleaser. Dicer har en central uppgift i RNAi-signalräckan, var den reglerar syntesen av bland annat miRNA:er. Felaktig reglering av miRNA:er samt nedreglering av Dicer har påvisat i flera cancerformer, inklusive sköldkörtelcancer. Målet med detta pro gradu-projekt var att undersöka ifall överuttryck eller nedtystning av Dicer har en påverkan på normala sköldkörtelceller (N-thy-Ori-3-1) och follikulära sköldkörtelcancer celler (ML-1). Redan i början av arbetet konstaterades det att N-thy-Ori-3-1-cellerna inte längre kan karakteriseras som normala sköldkörtelceller eftersom cellerna påvisar flera kännetecken för cancer. N-thy-Ori-3-1-cellerna påvisar till exempel en ökad migrationsförmåga i jämförelse med ML-1-cellerna. På grund av dessa resultat fortsattes projektet endast med ML-1-celler. Resultaten påvisar att överuttryck av Dicer ökar ML-1-cellernas proliferation samt nedreglerar uttrycket av det sköldkörtelspecifika proteinet Tg. Dessutom påvisar resultaten att nedtystning av Dicer nedreglerar ML-1-cellernas proliferation och migration. Dessa resultat antyder på att överuttryck av Dicer resulterar i en aggressivare fenotyp, medan nedtystning av Dicer resulterar i en mera normal-liknande fenotyp i ML-1-celler.

ÅBO AKADEMI UNIVERSITY
Faculty of Science and Engineering
Taru Lassila, 2018

The Impact of Dicer in the regulation of thyroid-specific proteins as well as proliferation and migration in ML-1 cells

M.Sc. Thesis, 65 pages

Keywords: Dicer, miRNA, thyroid cancer, EMT

Abstract

Dicer is an enzyme that is a member of the class III RNA endonuclease family. Dicer has a central role in the RNAi signalling pathway, where it controls the synthesis of miRNAs. Incorrect regulation of miRNAs as well as downregulation of Dicer has been shown in several cancers, including thyroid cancer. The aim of this Master's project was to investigate whether overexpression or knockdown of Dicer has an effect on normal thyroid cells (N-thy-Ori-3-1) and follicular thyroid cancer cells (ML-1). At the beginning of the work it was found that the N-thy-Ori-3-1 cells can no longer be characterized as normal thyroid cells because the cells show several hallmarks of cancer. The N-thy-Ori-3-1 cells, for example demonstrate an increased migration ability in comparison to the ML-1 cells. Due to these results, the project continued only with ML-1 cells. The results demonstrate that overexpression of Dicer increases the proliferation of the ML-1 cells, and downregulates the expression of the thyroid-specific protein Tg. In addition, the results show that Dicer knockdown downregulates the proliferation and migration of the ML-1 cells. These results indicate that overexpression of Dicer results in a more aggressive phenotype, while Dicer knockdown results in a more normal-like phenotype in ML-1 cells.

Innehållsförteckning

Förkortningar	1
1 Inledning	3
2 Litteraturoversikt	4
2.1 Sköldkörteln och syntesen av sköldkörtelhormoner	4
2.1.1 Natrium/jodid symporter.....	7
2.1.2 Tyreperoxidas	8
2.1.3 Tyreoglobulin.....	9
2.2 Sköldkörtelcancer	9
2.3 Molekylära funktionen av Dicer	11
2.3.1 MikroRNA	12
2.3.2 Dicer proteinets uppgift i RNA-interferens signalräckan	12
2.3.3 Dicer proteinets struktur och interaktioner	15
2.4 Dicer proteinets påverkan på sköldkörtelns utveckling och funktion	17
2.5 Dicer1 och dess koppling till human cancer	18
2.5.1 Dicer1 mutationer	18
2.6 Epitel-mesenkymal övergång (EMT).....	19
2.6.1 E- och N-cadherin	20
2.6.2 Vimentin	21
3 Målsättningar	22
4 Material och metoder	24
4.1 Cellinjer och odling.....	24
4.2 Transfektion av celler	24
4.3 Western blot	25
4.3.1 Framställning av celllysats	26
4.3.2 SDS-PAGE och överföring av proteiner till ett nitrocellulosamembran.....	26
4.3.3 Immunoblottnings.....	27
4.4 Migration och invasion	30
4.5 ³ H-inkorporering	31
4.6 Statistik	32
5 Resultat	33
5.1 Uttrycket av Dicer är lägst i ML-1-celler i jämförelse med FTC-133-cellerna	33

5.2 ML-1-cellernas proliferation är signifikant uppreglerad medan migrationen är signifikant nedreglerad i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna	34
5.3 Proteinuttrycket av TPO och NIS är signifikant högre i ML-1-celler än i N-thy-Ori-3-1-celler	35
5.4 Effektivt överuttryck och nedreglering av Dicer i ML-celler.	37
5.5 Överuttryck av Dicer ökar ML-1-cellernas proliferation medan nedtystning av Dicer minskar ML-1-cellernas proliferation samt migration.....	38
5.6 Överuttryck av Dicer minskar proteinuttrycket av Tg i ML-1-celler.....	40
5.7 Överuttryck eller nedreglering av Dicer har ingen effekt på proteinuttrycket av NIS i ML-1-celler	41
5.8 Överuttryck av Dicer har ingen effekt på proteinuttrycket av omoget E-cadherin i ML-1-celler	43
5.9 Nedtystning av Dicer påverkar inte uttrycket E-cadherin i ML-1-celler	44
5.10 Nedtystning av Dicer ökar proteinuttrycket av N-cadherin i ML-1-celler.....	46
6 Diskussion	48
6.1 N-thy-Ori-3-1-cellerna uttrycker kännetecknen för cancer.....	48
6.2 Dicer påvisar cancerfrämjande egenskaper i ML-1-celler	49
6.3 Överuttryck av Dicer minskar ML-1-cellernas uttryck av Tg	50
6.4 Dicer saknar en effekt på uttrycket av NIS	50
6.5 Nedtystning av Dicer ökar proteinuttrycket av N-cadherin	51
6.6 Dicer saknar en effekt på uttrycket av E-cadherin	52
6.7 Slutsatser och fortsatt forskning.....	52
7 Tillkännagivande.....	54
8 Litteraturförteckning.....	55
Bilaga 1: Kemikalier och ämnen.....	60
Bilaga 2: Recept.....	62
Bilaga 3: Plasmidkarta på pCAGGS-Flag-hsDicer	64
Bilaga 4: Plasmidkarta på pCAGGS-mCherry.....	65

Förkortningar

ARG	Argonaut
ATC	Anaplastisk sköldkörtelcancer
BSA	Bovint serumalbumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
dsRBD	Dubbelsträngad-RNA bindnings-domän
dsRBP	Dubbelsträngad-RNA bindnings-protein
dsRNA	Dubbelsträngad-RNA
DTC	Differentierad sköldkörtelcancer
DUF283	Domän med okänd funktion 283
EDTA	Etylendiamintetra-acetylsyra
EMT	Epitelial-mesenkymal övergång
FBS	Fetalt kalvserum
FTC	Folikulär sköldkörtelcancer
HRP	Pepparrotsperoxid
MAPK	Mitogen-aktiverade protein kinaser
MET	Mesenkymal-epitelial övergång
miRNA	MikroRNA
mRNA	Budbärar-RNA
MTC	Medullär sköldkörtelcancer
NIS	Natrium/jodid-symporter
PACT	Protein aktiverare av interferon-inducerade proteinkinas
Pax-8	Human parad box 8
PBS	Fosfatbuffrad saltlösning
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kinas
pre-miRNA	Prekursor-mikroRNA
P/S	Penicillin-streptomycin
PTC	Papillär sköldkörtelcancer
qRT-PCR	Kvantitativ omvänt transkriptas-polymeraskedjereaktion
RISC	RNA-inducerat nedtystningskomplex
RLC	RISC laddnings komplex
RNA	Ribonukleinsyra

RNAi	RNA-interferens
RNas	Ribonukleas
shRNA	Kort-hårnåls-RNA
siRNA	Små störande-RNA
TBS	Tris-buffrad saltlösning
TBST	Tris-buffrad saltlösning innehållande Tween 20
TCA	Trikloroättiksyra
Tg	Tyreoglobulin
TPO	Tyreoperoxidas
TRBP	HIV transaktiverande respons-RNA-bindande protein
TRH	Tyreotropinfrisättande hormon
TSH	Tyreoidestimulerande hormon
TSHR	Tyreoidestimulerande hormon receptor
TTF-1	Sköldkörtel transkriptionsfaktor 1
T ₃	Trijodtyronin
T ₄	Tyroxin

1 Inledning

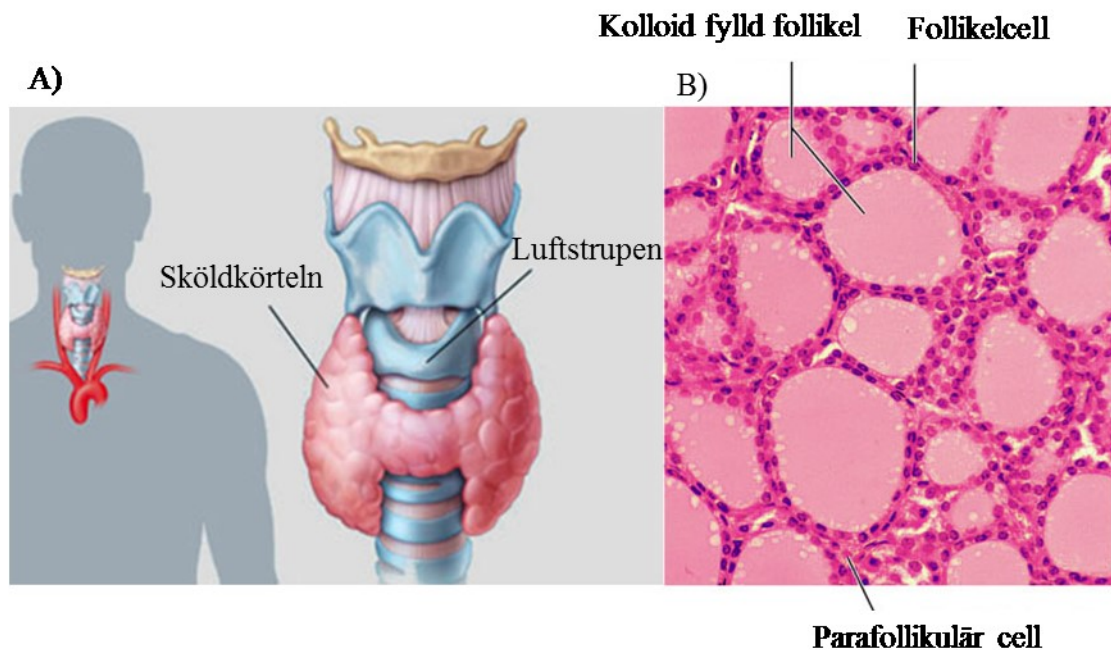
Sköldkörteln är en endokrin körtel som finns i halsen, rakt under struphuvudet. Sköldkörtelns viktigaste uppgift är att producera sköldkörtelhormonerna tyroxin (T_4) och trijodtyronin (T_3) som i sin tur påverka ämnesomsättningen. Sköldkörtelcancer är den vanligaste endokrina cancerformerna och under det senaste årtiondena har det observerats att antalet sköldkörtelcancerfall har ökat mest i jämförelse med andra cancerformer. Dessutom har det observerats att kvinnor drabbas av sköldkörtelcancer cirka 3 gånger oftare än män. Den mest förekommande formen av sköldkörtelcancer är papillär sköldkörtelcancer som utgör cirka 85 % av alla sköldkörtelcancerfall. Den näst vanligaste sköldkörtelcancerformen är follikulär sköldkörtelcancer som utgör cirka 10 % av alla fall. Båda formerna anses vara väl differentierade former av sköldkörtelcancer.

Dicer är ett enzym som hör till klass III RNA endonukleaser. Dicer är mest känd för sin roll i RNA-interferens (RNAi) signalvägen var Dicer reglerar syntesen av microRNA:er (miRNA) samt små-störande RNA:er (eng. small interfering RNA, siRNA). Mogna miRNA:er kan bland annat förhindra translation genom att bryta ner eller nedtysta proteinkodande mRNA:er. En nedreglering av Dicer samt en felaktig reglering av miRNA:er har påvisats i bland annat sköldkörtelcancer. Dessutom har det observerats att nedregleringen av Dicer-uttrycket korrelerar med flera aggressiva särdrag i sköldkörtelcancer, exempelvis metastasering. Målet med detta projekt var att undersöka ifall överuttryck eller nedtystning av Dicer påverkar normala sköldkörtelceller (N-thy-Ori-3-1-celler) och follikulära sköldkörtelcancer celler proliferation samt migration. Ett ytterligare mål var att undersöka ifall överuttryck eller nedtystning av Dicer påverkar proteinuttrycket av olika sköldkörtelspecifika proteiner samt EMT-markörer.

2 Litteraturöversikt

2.1 Sköldkörteln och syntesen av sköldkörtelhormoner

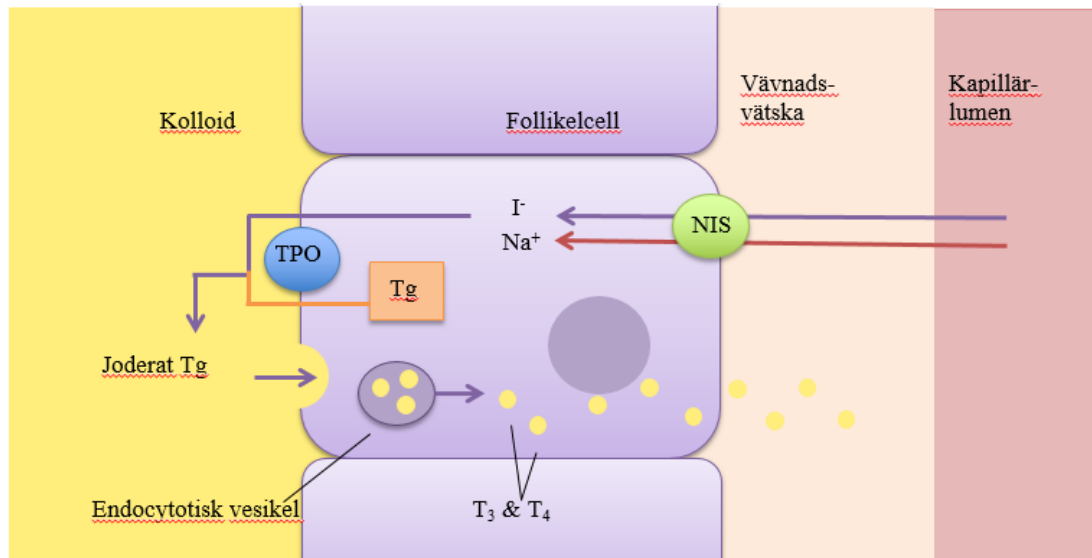
Sköldkörteln ligger i halsen, rakt under struphuvudet. Sköldkörteln väger oftast mellan 20 och 30 gram och den består av två stycken lober. Loberna sitter fast vid luftröret och är sammanbundna med varandra genom en smal brygga av vävnad. Dessa lober är uppbyggda av folliklar som producerar sköldkörtelhormonerna tyroxin (T_4) och trijodtyronin (T_3). Folliklarnas väggar byggs upp av ett lager epitelceller som också kallas för follikelceller och i follikellumen finns en protein-innehållande vätska som kallas för kolloid (figur 1). Tyreoglobulin (Tg) är ett exempel på ett protein som follikelcellerna producerar och som lagras i kolloiden. En tyreoglobulinmolekyl består av cirka 120 molekyler av aminosyran tyrosin. Runt folliklarna finns ett kapillärnät som både transporterar näringsämnen till follikelcellerna samt transporterar sköldkörtelhormoner från folliklarna till blodomloppet och slutligen till vävnaderna. Sköldkörteln består inte enbart av follikelceller utan också av parafollikulära celler som finns i bindväven mellan folliklarna. De parafollikulära cellerna producerar kalcitonin som är ett kalciumreglerande hormon (Sand et al., 2006).



Figur 1. Sköldkörtelns placering i människokroppen samt sköldkörtelns uppbyggnad. A) Sköldkörteln ligger i halsen, rakt under struphuvudet. Sköldkörteln är fäst vid luftstrupen. B) Sköldkörteln består av två stycken lober och dessa lober är i sin tur uppbyggda av folliklar. Folliklarnas väggar byggs upp av follikelceller. Follikellumen består av en protein-innehållande vätska som kallas för kolloid. Sköldkörteln består inte endast av follikelceller utan också av parafollikulära celler som finns i bindväven mellan folliklarna. Figurerna är modifierade från webbsidorna: <http://www.kilpirauhanen.com/tietopankki/kilpirauhanen/> och <http://edusanjalbiochemist.blogspot.fi/2012/12/how-thyroid-hormones-are-formed.html>, den 26.03.2018.

Produktionen av T_4 och T_3 börjar med att follikelcellerna tar upp jodid- och natriumjoner från blodomloppet. Upptagningen av jonerna över cellmembranet sker med hjälp av natrium/jodid symportern (eng. sodium/iodide symporter, NIS). Efter att jodidjonerna har upptagits, hjälper enzymet tyreperoxidase (eng. thyroid peroxidase, TPO) att jodera tyrosinmolekyler i tyreoglobulinet. TPO finns i cellmembranet som bygger upp follikellumens vägg. För att slutligen bilda sköldkörtelhormonerna kopplas de joderade tyrosinmolekyler i samma tyreoglobulinmolekyl ihop med varandra parvis. Skillnaden mellan T_4 och T_3 är att T_4 innehåller fyra stycken jodatomer medan T_3 består av tre stycken jodatomer. Sköldkörtelhormonerna förvaras i follikellumen fästa vid Tg. Innan utsöndring tas hormonerna upp i endocytotiska vesikler. Dessa vesikler släpper ut sköldkörtelhormonerna inne i follikelcellerna och samtidigt frisätts hormonerna också från Tg. Eftersom hormonerna är fettlösliga kan

hormonerna diffundera genom cellmembranet till vävnadsvätskan och till kapillärerna som omger folliklarna (Sand et al., 2006). Syntesen av sköldkörtelhormonerna illustreras i figur 2. Produktionen av sköldkörtelhormoner är nödvändig eftersom hormonerna reglerar ämnesomsättningen, som i sin tur reglerar den normala tillväxten samt utvecklingen. Sköldkörtelhormonerna är även viktiga för regleringen av ämnesomsättningen i en fullvuxen individ (Mullur et al., 2014).



Figur 2. Syntes av sköldkörtelhormonerna tyroxin (T₄) och trijodtyronin (T₃) i follikelcellerna. Produktionen påbörjas av att follikelcellerna tar upp jodidjoner samt natriumjoner från blodomloppet, med hjälp av natrium/jodid symportern (eng. sodium/iodide symporter, NIS). Därefter joderas tyrosinmolekylerna i tyreoglobulin (Tg) med hjälp av enzymet tyreperoxidase (TPO). Sköldkörtelhormonerna bildas genom att de joderade tyrosinmolekylerna i samma tyreoglobulinmolekyl kopplas ihop parvis. T₃ består av tre stycken jodatomer medan T₄ består av fyra stycken jodatomer. Det färdiga sköldkörtelhormonerna förvaras i follikellumen kopplade vid Tg. Sköldkörtelhormonerna kommer in i follikelcellerna i vesikler och frisätts från vesiklerna samt Tg inne i cellen. Sköldkörtelhormonerna är sedan fritt diffundera genom cellmembranet till vävnadsvätskan och blodomloppet.

Produktionen av sköldkörtelhormonerna styrs av tyreideastimulerande hormonet (TSH) som utsöndras från hypofysens framlob. TSH utsöndringen regleras i sin tur av tyreotropinfrisättande hormonet (eng. thyrotropin-releasing hormone, TRH) som produceras i hypothalamus. Dessutom påverkar också mängden tyroxin och trijodtyronin i blodomloppet utsöndringen av både TSH och TRH (Sand et al., 2006).

2.1.1 Natrium/jodid symporter

NIS är ett transmembrant glykoprotein som är bundet till follikelcellernas basolaterala membran. I en undersökning gjord av Caillou och kollegor framkom det att i normal vävnad är uttrycket av NIS begränsat till follikelceller som är placerade intill kapillärerna (Caillou et al., 1998). Som tidigare nämnts är NIS involverat i det första steget av sköldkörtelhormon-syntesen. NIS transporterar alltid samtidigt två stycken natriumjoner (Na^+) och en jodidjon (I^-) in i cellen, i en process som kallas för kotransport. Denna transport kräver en elektrokemisk gradient av Na^+ mellan insidan och utsidan av cellen. Gradient upprätthålls i sin tur av $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ som pumpar Na^+ ut ur cellen (Pohlenz och Refetoff, 1999). NIS påträffas inte endast i sköldkörteln utan kan också påträffas i andra vävnader som till exempel spottkörtlarna, bröstvävnad under amning, lungornas epitelceller, tarmens enterocyter, placenta och testiklarna (Targovnik et al., 2017). TSH fungerar som den huvudsakliga regleraren av jodid-transporten genom att först styra transkriptionen av NIS och sedan förflytta NIS till follikelcellernas basolaterala membran. I follikelcellerna reglerar TSH dessutom NIS-proteinets nedbrytning (Micali et al., 2014). I människan kodas NIS av SLC5A5-genen. Förändringar i uttrycket och funktionen av NIS orsakade av mutationer i denna gen kan leda till flera olika sköldkörtelstörningar, exempelvis hypotyreos där sköldkörteln inte kan producera tillräckligt med sköldkörtelhormon. Mutationer kan också leda till så kallad struma, som är en annan vanlig sköldkörtelstörning som beror på brist i jod-transporten (Targovnik et al., 2017).

I de flesta studier har det visats att mängden och placeringen av NIS i det basolaterala membranet av de follikulära cellerna är förminskat i maligna sköldkörteltumörer (Spitzweg et al., 2001). Dessutom har Caillou och kollegor påvisat att mängden av celler som uttrycker NIS korrelerar med sköldkörtelcancers differentieringsgrad och att antalet celler med TSH-receptorer är förminskat i sköldkörtelcancer. Förminskningen av TSH-receptorer kunde delvis förklara det förminskade uttrycket av NIS i sköldkörtelcancer (Caillou et al., 1998). Dock finns det också många undersökningar som påvisat att uttrycket av NIS är uppregerat i sköldkörtelcancer (Dohan et al., 2001).

Eftersom NIS har förmågan att transportera I⁻ från blodomloppet till follikelcellerna utnyttjas NIS för både diagnostisering och behandling av flera benigna och maligna sköldkörtelstörningar. Denna funktion används exempelvis vid radioaktivt jod ablation där cancerceller som eventuellt blivit kvar efter operation hittas och förstörs. Behandling med radioaktivt jod är oftast effektivt för patienter med en väl differentierad form av sköldkörtelcancer, alltså papillär eller follikulär sköldkörtelcancer. Behandlingen blir oftast ineffektiv när sköldkörtelcancer cellerna har förlorat uttrycket av funktionellt NIS och kan inte längre ta upp radioaktivt jod. Detta har noterats i icke-differentierade former av sköldkörtelcancer (Liu och Xing, 2012).

2.1.2 Tyreoperoxidas

TPO är ett hemprotein som finns i det apikala membranet av alla follikelceller. Som tidigare nämnt har TPO flera uppgifter i syntesen av sköldkörtelhormoner. TPO katalyserar oxideringen av jodid, joderar tyrosinmolekylerna i tyreoglobulinet samt kopplar joderade tyrosinmolekyler till varandra för att skapa sköldkörtelhormonerna T₃ och T₄ (Segev et al., 2003). Genuttrycket av TPO regleras av sköldkörtel transkriptionsfaktor 1 och 2 (eng. thyroid transcription factor 1/2, TTF-1/ TTF-2) samt human parax box 8 (eng. human paired box 8, Pax8) (Ruf och Carayon, 2006). En förlust av TPO uttrycket har förknippats med ett förminskat jod intag och en försämrad syntes av sköldkörtelhormoner, vilket i sin tur kan leda till problem vid regleringen av hela sköldkörtelns funktion, inklusive tillväxt. Vid en autoimmun sköldkörtelsjukdom, som till exempel Hashimotos struma samt Graves sjukdom kan kroppen börja producera autoantikroppar mot TPO. Därför är undersökningar som mäter nivåerna av TPO-antikroppar den bästa metoden för att detektera autoimmuna sköldkörtelsjukdomar (Armengol et al., 2001).

Kunskapen om betydelsen av TPO i sköldkörtelcancer är delvis bristfällig och dessutom finns det en del motstridiga resultat. Dock har flera forskningsgrupper påvisat att uttrycket av TPO är hämmat i differentierad sköldkörtelcancer. I vissa former av differentierad sköldkörtelcancer har det upptäckts muterade TPO gener. Dessutom finns det forskningsresultat som antyder att TPO har en lägre enzymaktivitet i sköldkörtelcancer (Czarnocka et al., 2001). Flera forskningsgrupper

har nyligen undersökt uttrycket av olika TPO mRNA splitsningsvarianter i humana sköldkörteltumörer. Till exempel Le Fourn och kollegor har påvisat att splitsning av TPO ökar i benigna och maligna sköldkörtelvävnader. Förändringar i splitsningsprocessen kan förekomma vid utvecklingen av tumörer, vilket i sin tur kan leda till förändringar i proteinets struktur samt dess aktivitet. Detta kunde delvis förklara minskningen i både uttrycket och aktiviteten av TPO som har observerats i sköldkörtelcancer (Le Fourn et al., 2004).

2.1.3 Tyreoglobulin

Tg är ett matrixprotein inuti sköldkörteln som fungerar som en bas för syntesen av sköldkörtelhormoner. Tg fungerar också som en specifik biomarkör för papillär- och follikulär sköldkörtelcancer. Dessutom fungerar Tg som en av de viktigaste antigenerna vid autoimmuna sköldkörtelsjukdomarna. Joderat Tg lagras i follikellumen men Tg återabsorberas till follikelcellerna när cellerna stimuleras av TSH. I follikellumen nedbryts Tg till sköldkörtelhormonerna T₃ och T₄. Sköldkörtelhormonerna utsöndras sedan till blodomloppet. Genuttrycket av Tg regleras av de sköldkörtelspecifika transkriptionsfaktorerna TTF-1 och Pax8. Mutationer i genen som kodar för Tg leder oftast till bristfällig syntes av sköldkörtelhormoner, vilket i sin tur kan leda till hypotyreos och till och med struma (Lin, 2008).

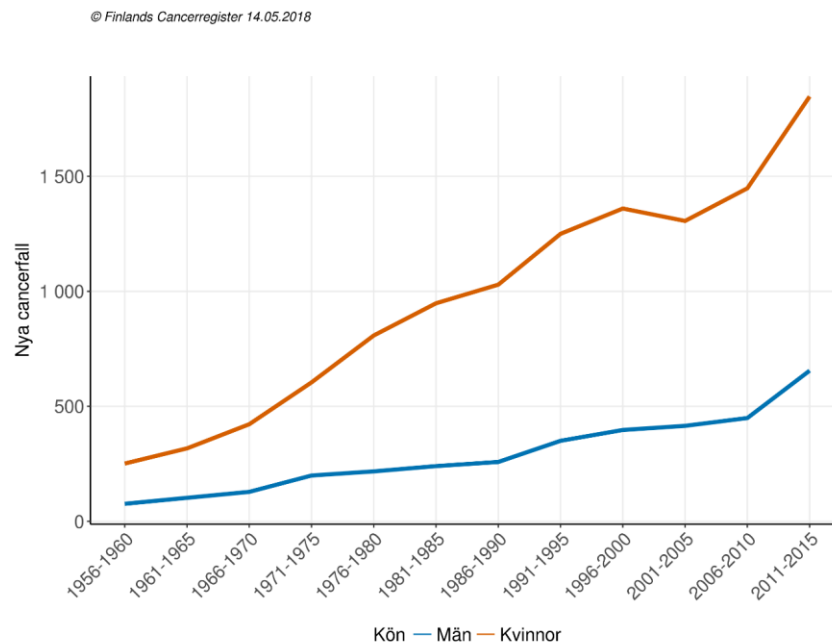
Tg förekommer normalt i små mängder i kroppen, men koncentrationen kan stiga vid olika sköldkörtelstörningar. Därför används till exempel förhöjda Tg koncentrationerna som ett verktyg för att detektera återkomst av sköldkörtelcancer. Tg kan utsöndras av differentierade cancerceller som exempelvis papillära- och follikulära sköldkörtelcancerceller. Dock utsöndrar icke-differentierade medullära- och anaplastiska sköldkörtelcancerceller oftast inte Tg (Indrasena, 2017).

2.2 Sköldkörtelcancer

Sköldkörtelcancer är den vanligaste endokrina cancerformerna och under det senaste decenniet har det observerats att sköldkörtelcancer också är en av de snabbaste ökande cancertyper i hela världen (figur 3) (Erler et al., 2014). Även om sköldkörtelcancer har blivit vanligare i hela världen har patienter med sköldkörtelcancer oftast en väldigt god överlevnad och dödligheten har stadigt sjunkit.

Även om det är osäkert varför sköldkörtelcancer har blivit vanligare, finns det faktorer som kan öka risken för att insjukna i sköldkörtelcancer. Faktorer som kan öka risken för sköldkörtelcancer är till exempel exponering för strålning, hormonella faktorer, reducerat jodintag, lymfocytisk tyreoidit samt ärftlighet (Kondo et al., 2006). Sköldkörtelcancer drabbar både unga och gamla, men det har observerats att kvinnor drabbas cirka tre gånger oftare av sköldkörtelcancer än män. Dessutom har det observerats att de mindre aggressiva sköldkörtelcancerformerna är vanligare hos kvinnor medan de mera aggressiva formerna är lika vanliga hos båda könen. Denna könsskillnad är dåligt förstådd men det har förslagits att skillnaden beror på de kvinnliga könshormonerna och deras receptorer (Rahbari et al., 2010).

Den vanligaste formen av sköldkörtelcancer är papillär sköldkörtelcancer (eng. Papillary thyroid carcinoma, PTC) som utgör cirka 85 % av alla sköldkörtelcancerfall (Jin et al., 2013). Efter PTC är follikulär sköldkörtelcancer (eng. Follicular thyroid carcinoma, FTC) den vanligaste förekommande formen av sköldkörtelcancer och utgör cirka 10 % av alla fall. Både PTC och FTC är väl differentierade former av sköldkörtelcancer som ursprungligen har bildats från follikelcellerna. PTC har bland annat förknippats med mutationer i gener som kodar för intracellulära proteiner som påverkar mitogen-aktiverade protein kinas (MAPK) – signalräckan. Den vanligaste av dessa mutationer är BRAF-mutationen som har påträffats i 60 % av alla PTC fall. I FTC är mutationer i gener som uttrycker Ras-proteiner i sin tur allmänt förekommande. Två andra viktiga former av sköldkörtelcancer är anaplastisk sköldkörtelcancer (eng. Anaplastic thyroid carcinoma, ATC) och medullär sköldkörtelcancer (eng. Medullary thyroid carcinoma, MTC). ATC bildas från icke-differentierade PTC- eller FTC-celler och utgör cirka 1 % av alla sköldkörtelcancerfall. ATC anses vara den aggressivaste formen av sköldkörtelcancer och överlevnadsprognosen är dålig. ATC har också förknippats med mutationer i gener som kodar för BRAF- och Ras-proteiner. Dessutom har ATC förknippats med mutationer i gener som kodar för p53 och fosfatidylinositol-3-kinas (eng. phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K). MTC bildas från parafollikulära celler och utgör cirka 5 % av alla sköldkörtelcancerfall. I likhet med de andra formerna har det identifierats mutationer som ofta förekommer i MTC. Exempelvis mutation i RET-proto-onkogenen är en av de vanligaste mutationerna som har påträffats i MTC (Fagin och Wells, 2016).



Figur 3. Antalet nya sköldkörtelcancerfall mellan åren 1956 och 2015 i Finland. Antalet sköldkörtelcancerfall har ökat i Finland både hos kvinnor och män under det senaste decennierna. Ökningen är mera markant hos kvinnor än hos män. Den röda linjen indikerar antalet sköldkörtelcancerfall hos kvinnor medan den blå linjen indikerar antalet sköldkörtelcancerfall hos män. Figuren tagen från webbsidan: <https://cancerregistry.fi/statistics/cancer-statistics/>, den 14.05.2018.

2.3 Molekylära funktionen av Dicer

Dicer är ett enzym som hos människan kodas av *DICER1*-genen. Dicer hör till klass III RNA endonukleaser och Dicer är mest känd för sin roll i RNA-interferens (RNAi) signalräckan. I denna kanoniska roll är Dicer en viktig reglerare av syntesen av mikroRNA (miRNA) och små-störande RNA (eng. small interfering RNA, siRNA), samt ett växande antal andra små RNA-molekyler av olika ursprung. Dock finns det ett ökande antal bevis på att Dicer även har en funktion utanför RNAi-signalräckan. Exempelvis endonukleasaktiviteten hos Dicer har inte bara påträffats vid syntesen av små RNA-molekyler men också vid bearbetning av endogena och exogena substrat. Dessutom har det observerats att dess uppgift inte endast är begränsats till klyvning, utan Dicer kan också reglera andra cellulära processer (Song och Rossi, 2017).

2.3.1 MikroRNA

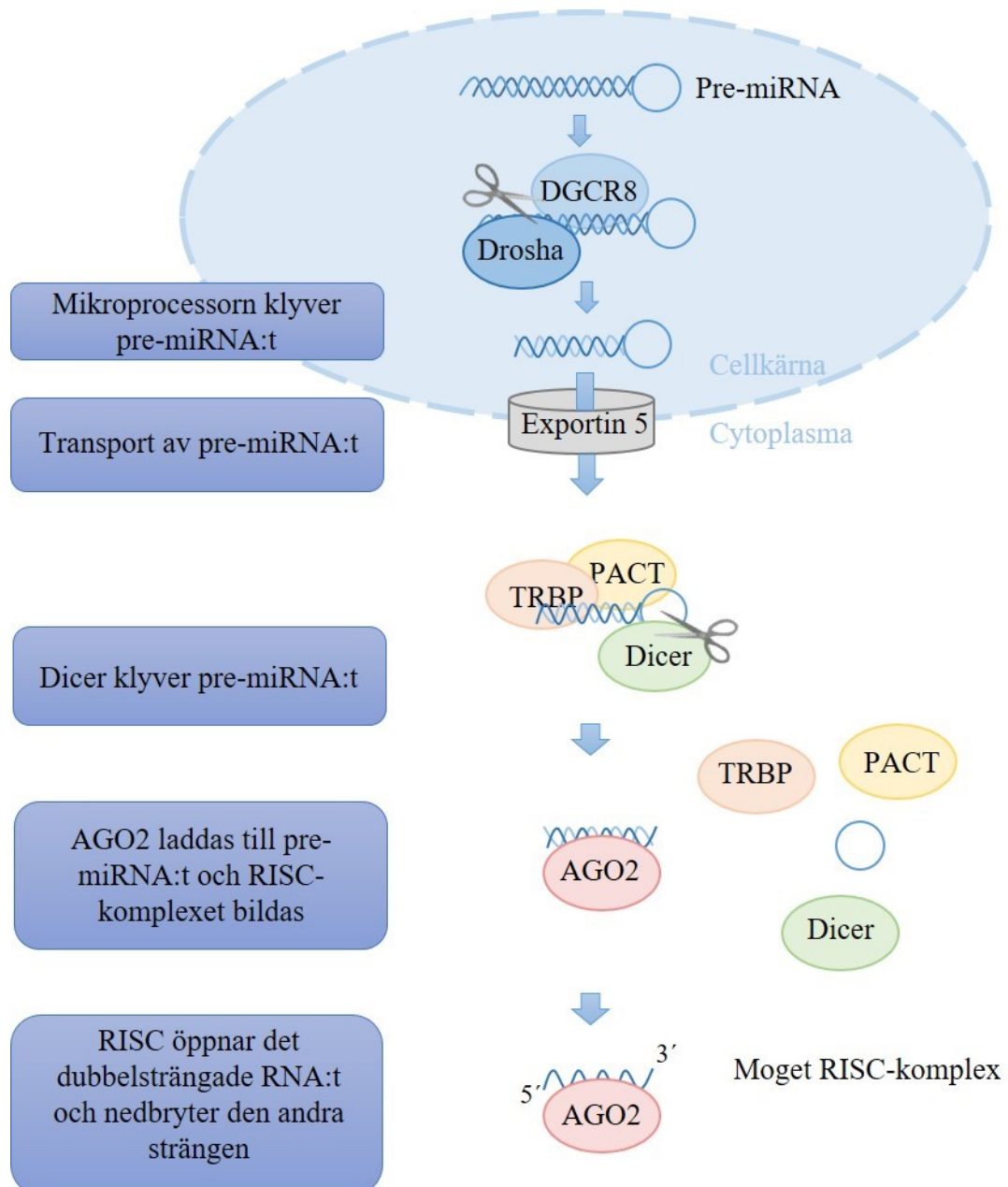
En icke-kodande RNA-molekyler kallas för miRNA. miRNA-molekylernas viktigaste uppgift i cellen är att förhindra translation genom att nedtysta eller bryta ner proteinkodande budbärar-RNA-molekyler (messenger RNA, mRNA) i en biologisk process som kallas för RNAi (Ha och Kim, 2014). Genom att förhindra translationen av mRNA-molekyler som är involverade i olika signalräckor, kan miRNA:er påverka många cellulära processer som till exempel proliferation, apoptos, överlevnad, tillväxt, föråldring och migration (Fuziwara och Kimura, 2017). Det antas att miRNA-molekyler och en del andra små icke-kodande RNA-molekyler har utvecklats för att skydda cellen från oönskat genetiskt material. Gener som kodar för miRNA:er utgör en av de rikligaste genfamiljerna och dessa gener hittas bland annat i djur, växter, protister och en del virus. I dagens läge har det i människan hittats 2588 olika miRNA:er, dock är inte alla deras specifika funktioner kända (Ha och Kim, 2014). Det antas att över 50 % av alla humana mRNA:er är påverkade av miRNA-medierad reglering (Fuziwara och Kimura, 2017). Utvecklingen av flera cancertyper, inklusive alla varianter av sköldkörtelcancer, har associerats med felaktig reglering av miRNA:er. Dessutom kan miRNA:er fungera både som tumörsuppressorer och som så kallade oncomiRs som främjar utvecklingen av cancer (Erler et al., 2014).

2.3.2 Dicer proteinets uppgift i RNA-interferens signalräckan

Hos djur är miRNA-molekylerna cirka 22 nukleotider långa och de produceras av RnasIII-proteinerna Drosha och Dicer. RNAi-signalräckan producerar inte enbart miRNA-molekyler. Under RNAi sker också biogenes av andra små RNA-molekyler, inkluderat siRNA-molekyler som också kan inhibera translationen. Efter translation genomgår pre-miRNA:t en mognadsprocess som består av flera steg. Denna mognadsprocess illustreras i figur 4. Pre-miRNA:t är både långt och innehåller en så kallad lokal stam-ögla-struktur där den mogna miRNA-molekylens sekvenser är inbäddade. En typisk pre-miRNA-molekyl består av en stam som är cirka 33-35 baspar, en terminal ögla och ett enkelsträngat RNA-segment på både 5'- och 3' sidan. Mognadsprocessen påbörjas genom att nukleära RNaset Drosha klipper av stam-ögla och frisläpper en hårnåls-formad RNA-molekyl. Likasom Dicer, är Drosha ett klass III RNA endonukleas som fungerar specifikt på dubbelsträngat RNA (dsRNA). Drosha bildar tillsammans med sin kofaktor DGCR8 ett komplex som kallas för

mikroprocessor. Mikroprocessorns uppgift är att både känna igen och klyva pre-miRNA:t på en specifik plats. Drosha klyver pre-miRNA-molekylen ungefär 11 baspar från den så kallade basala korsningen och ungefär 22 baspar från den apikala korsningen. Den basala korsningen ligger mellan molekylen dubbelsträngade stam och det enkelsträngade segmentet. Den apikala korsningen är i sin tur kopplad med den terminala öglan (Ha och Kim, 2014).

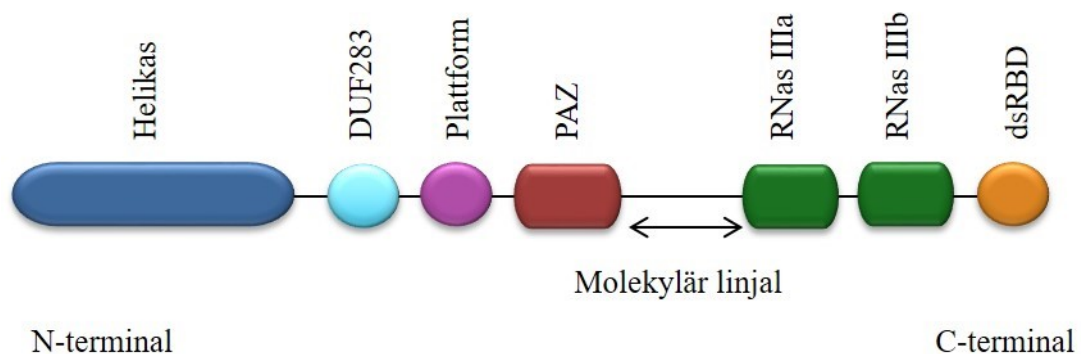
Efter klyvning transporteras pre-miRNA:t från cellkärnan ut i cytoplasman där mognadsprocessen kan fortsätta. Transporten av pre-miRNA:t sker med hjälp av proteinet Exportin 5 som bildar ett så kallad transportkomplex tillsammans med det nukleära proteinet RAN•GTP samt pre-miRNA-molekylen. Efter att pre-miRNA-molekylen har transporterats igenom kärnporkomplexet sker det hydrolys av GTP, vilket i sin tur leder till att komplexet upplöses och pre-miRNA-molekylen frisätts i cytosolen (Ha och Kim, 2014). I cytoplasman bildar pre-miRNA:t ett komplex som kallas för pre-RISC tillsammans med Dicer. Pre-miRNA:t klyvs sedan av Dicer med hjälp av två stycken olika dubbelsträngade-RNA bindningsproteiner (dsRBP). I människan är dessa proteiner HIV transaktiverande respons-RNA-bindande proteinet (TRBP) och proteinaktiverare av interferon-inducerade proteinkinaser (eng. Protein Activator of the interferon-induced protein kinase, PACT). Dicer klyver pre-miRNA:t i närheten av terminala öglan vilket frisätter ett litet RNA-duplex. Det dubbelsträngade RNA:t inkorporeras sedan med "Argonaut 2"-proteinet (ARG2) för att skapa det så kallade RNA-inducerade nedtystningskomplexet (eng. RNA-induced silencing complex, RISC). Inkorporeringen sker med hjälp av ett RISC-laddningskomplex (eng. RISC loading complex, RLC). Innan inkorporeringen av ARG2, blir en av de två RNA-strängarna vald som den styrande eller aktiva strängen. ARG2 inkorporeras av RLC med denna styrande sträng. ARG2-proteinerna både öppnar det dubbelsträngade RNA:t och nedbryter den så kallade passagerarsträngen. Slutligen förflyttar sig det laddade RISC-komplexet till mål-mRNA:t. Den RISC-bundna mogna miRNA-molekylen eller siRNA-molekylen kan antingen styra en sekvensspecifik nedbrytning av komplementär RNA eller inhibera translation genom att komplementärt binda till mål-mRNA:t (Song och Rossi, 2017).



Figur 4. RNA-interferens signalräckan. Signalräckan inleds med att mikroprocessorn som består av endonukleaset Drosha och dess kofaktor DGCR8 klyver pre-miRNA:t inne i cellkärnan. Den frisatta hårnåls-formade miRNA-molekylen transporteras sedan till cytoplasman, varefter pre-miRNA:t bildar ett komplex som kallas för pre-RISC tillsammans med Dicer och två stycken dubbelsträngade-RNA bindningsproteiner. pre-miRNA:t klyvs sedan på nytt av Dicer och en kort dubbelsträngad RNA molekyl frisätts. Det dubbelsträngade miRNA:t inkorporeras sedan med "Argonaut 2"-proteinet (ARG2) för att bilda ett RNA-inducerat nedtystningskomplex (eng. RNA-induced silencing complex, RISC). ARG2-proteinets uppgift är att både öppna det dubbelsträngade RNA:t samt bryta ner den andra strängen. Till slut förflyttar sig RISC komplexet som innehåller det mogna miRNA:t till mål mRNA:t.

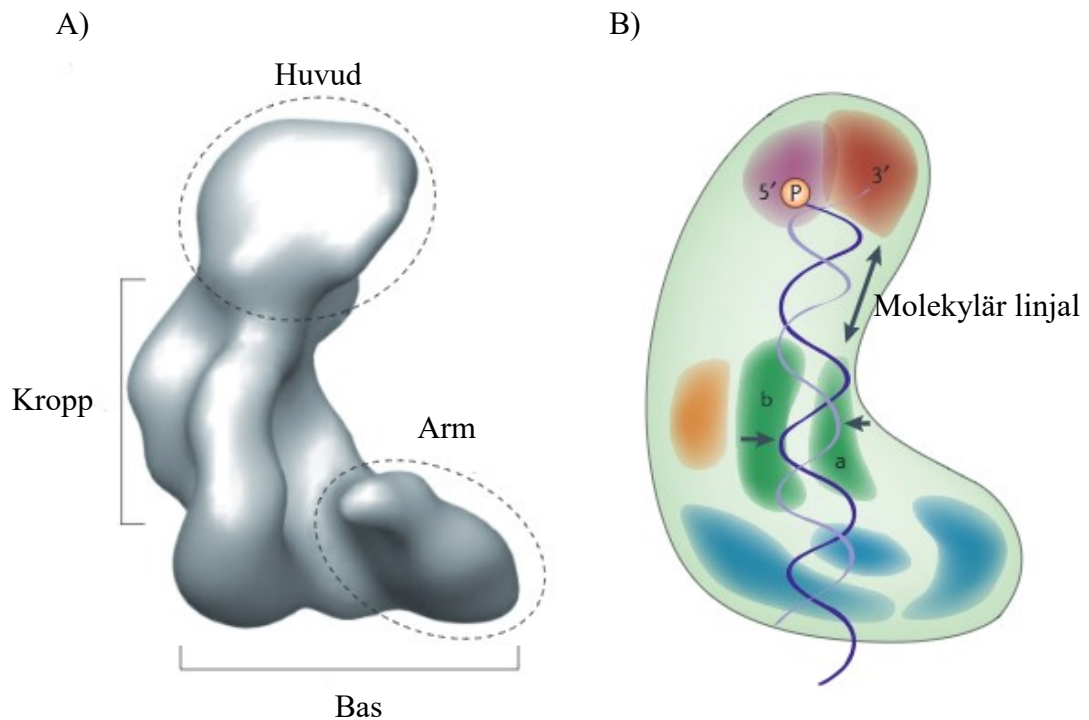
2.3.3 Dicer proteinets struktur och interaktioner

Dicer proteinet har troligen uppstått i tidiga eukaryota organismer, eftersom Dicer proteinet saknas från arkéobakterier men kan hittas i många eukaryota organismer, inklusive svampar, växter och djur. Även om de flesta arter, till exempel däggdjur och nematoder, endast har en Dicer-gen, har vissa arter flera Dicer-homologer med olika uppgifter (Ha och Kim, 2014). Hos alla arter där Dicer har påvisats är Dicer ett stort multidomänt enzym, med en tertiärstruktur (Foulkes et al., 2014). En mera klar bild om hur Dicer1 proteinet är uppbyggt fås om man studerar det oveckade proteinets struktur (figur 5). C-terminalen består av RNasIII-domänerna och den så kallade dubbelsträngad-RNA bindnings-domänen (dsRBD), medan N-terminalen består av domänerna som gör Dicer unikt. I den yttersta ändan av N-terminalen finns en helikas-domän och efter helikas-domänen följer en liten domän med en okänd funktion som kallas för DUF283 (eng. Domain of unknown function 283). Bredvid DUF283-domänen finns PAZ- och plattform-domänen (eng. Platform domain) (Sawh och Duchaine, 2012).



Figur 5. Illustration av domänernas ordning i det oveckade humana Dicer1 proteinet. Dicer1 proteinets C-terminal består av två stycken Ribonukleas III-domäner (RNasIII) samt en dubbelsträngad-RNA bindnings-domän (dsRBD). N-terminalen består i sin tur av domäner som gör Dicer unikt. Till dessa domäner hör bland annat Helikas-domänen som är placerad i den yttersta ändan av N-terminalen. Efter Helikas-domänen följer en domän med okänd funktion som kallas DUF283 (eng. Domain of unknown function 283). Bredvid DUF283-domänen finns PAZ- och plattform-domänen (eng. Platform domain) (Modifierad från Sawh och Duchaine, 2012).

Kryogenelektronmikroskopi-rekonstruktioner samt kristallografiska studier antyder att Dicer är format som ett "L" (figur 6A). I den yttersta ändan, vid huvudet av L-formen finns de tätt sammankopplade PAZ- och plattform-domänerna (Lau et al., 2012). Både PAZ- och plattform-domänen innehåller en så kallad bindningsficka. PAZ-domänen binder till pre-miRNA när molekylerna innehåller ett två-nukleotidöverhäng i 3'-ändan av molekylerna. Plattform-domänen binder i sin tur till fosfatgruppen i 5'-ändan av pre-miRNA-molekylerna (Tian et al., 2014). Bindningsfickorna är placerade så att de kan vara upptagna samtidigt av både 3'- och 5'-ändorna av pre-miRNA-molekylerna när RNA-molekylerna består av ett två-nukleotider långt överhäng i 3'-ändan (Ha och Kim, 2014). På den nedre halvan eller "kroppen" av L-formen ligger RNaseIIIa- och RNaseIIIb-domänerna. Dessa domäner bildar tillsammans en intramolekylär dimer och dimeren bildar i sin tur en katalytisk kärna. Det antas att vardera domänen är ansvarig för att klyva en sträng av det dubbelsträngade pre-miRNA:t (Foulkes et al., 2014). För att förklara hur Dicer alltid producerar RNA-molekyler med en specifik storlek har det föreslagits att region mellan PAZ- och RNaseIII-domänerna fungerar som en så kallad molekylär linjal (eng. molekular ruler) (Ha och Kim, 2014). Dessutom är dsRBD också placerad vid kroppen av det L-formade proteinet. Den specifika strukturen av Dicer helikaset är fortfarande okänd, men det antas att helikas-domänen bildar en struktur som liknar ett gångjärn vid basen av L-formen. Dessutom antas det att helikas-domänen känner igen och virar sig runt dsRNA-molekyler (Foulkes et al., 2014). Domänernas organisering i humana Dicer1-proteinet illustreras i figur 6B.



Figur 6. Tertiärstrukturen av humana Dicer1-proteinet. A) Elektronmikroskopisk bild över Dicer1-proteinet som antyder på att proteinet är format som ett "L". B) Domänernas organisering i humana Dicer1-proteinet. Färgerna i figuren stämmer överens med färgerna i Figur 4 och illustrerar var de olika domänerna är placerade i den tertiära strukturen. Vid huvudet av proteinet finns både PAZ- och plattformdomänerna (eng. Platform domain). PAZ domänen binder till pre-miRNA-molekylens 3'-ända medan plattform-domänen binder till fosfatgruppen i 5'-ändan av pre-miRNA-molekylen. RNaseIIIa- och RNaseIIIb- domänerna bildar tillsammans en intramolekylär dimär vid kroppen av proteinet. Dessutom finns den dubbelsträngade-RNA bindnings-domänen (dsRBD) vid kroppen av proteinet. Vid basen av proteinet finns helikas-domänen. (Modifierad från Foulkes et al., 2014).

2.4 Dicer proteinets påverkan på sköldkörtelns utveckling och funktion

Eftersom Dicer har en väldigt central roll i syntesen av mikroRNA och för uttrycket av mRNA, har Dicer proteinets påverkan på utvecklingen och cancer undersökts flitigt. Dock finns det få forskningsgrupper som undersökt hur Dicer påverkar sköldkörtelns utveckling. I en undersökning gjord av Frezzetti och kollegor påvisades det att sköldkörtelns tidiga differentiering inte påverkas av brist på Dicer i Dicer-knockoutmöss. Däremot utvecklar mössen efter födseln gradvis en allvarlig hypotyreos vilket leder till förminskad kroppsvikt och kortare livslängd. Noggrannare undersökningar har visat att knockoutmössen har förlorat en stor del av sköldkörtelns

follikulära struktur samt uppvisar funktionella avvikelser och nedreglering av de sköldkörtelspecifika proteinerna NIS, Tg, TPO och TSH (Frezzetti et al., 2011). I en väldigt liknande undersökning gjord av Rodriguez och kollegor påvisades också att mössens tidiga sköldkörtelutveckling inte påverkas av brist på Dicer, men mössen lider av allvarlig hypertyros. Dessutom observerades det att när mössen föråldras börjar sköldkörtelvävnaden uppvisa kännetecken på neoplastiska förändringar, som till exempel en ökning i follikelcellernas proliferation, dedifferentiering samt förlust av uttrycket av Pax8, NIS och TPO. Dessa två undersökningar antyder på att brist på Dicer och därmed brist på moget miRNA orsakar allvarliga störningar i sköldkörteln funktions och differentiering (Rodriguez et al., 2012).

2.5 Dicer1 och dess koppling till human cancer

Flera undersökningar har redan påvisat en nedreglering av Dicer och ett förändrat miRNA-uttryck i många olika cancertyper. Erler och kollegor har exempelvis påvisat att mRNA för Dicer är nedreglerat i maligna sköldkörtelprov i jämförelse med normal vävnad samt benigna neoplasier. Dessutom har Erler och kollegor observerat att ett förminskat uttryck av Dicer i malign vävnad, korrelerar med många aggressiva särdrag i sköldkörtelcancer, som till exempel metastasering och invasion till lymf- eller blodkärlen (Erler et al., 2014). I en undersökning publicerad av Khoshnaw och kollegor undersöktes förändringar i uttrycket av Dicer under utvecklingen av bröstcancer. I undersökningen påvisades det att uttrycket av Dicer minskar gradvis samt korrelerar med progressionen av bröstcancer. Dessutom observerades det att förlust av Dicer associeras med aggressiva särdrag samt en sämre överlevnads prognos (Khoshnaw et al., 2012). Även om Dicer är nedreglerat i de flesta cancertyper, finns det en hel del motstridiga resultat som påvisar upphöjda nivåer av Dicer, ett exempel är prostatacancer (Chiosea et al., 2006).

2.5.1 Dicer1 mutationer

Under de senaste åren har Dicer1-genen och dess mutationer också väckt ett stort intresse. Undersökningar har visat att en nedärvd mutation i Dicer1-genen kan ge upphov till ett så kallat Dicer1-syndrom som oftast påverkar barn och unga vuxna.

Denna genetiska sjukdom orsakar i sin tur en predisponering för att utveckla ovanliga benigna och maligna tumörer, till exempel den sällsynta lungcancertypen pleuropulmonal blastom, tumörer i Sertoli-Leydig cellerna, multinodulär struma och differentierad sköldkörtelcancer (Rio Frio et al., 2011; Schultz et al., 2011; de Kock et al., 2014). I det flesta fallen skapar mutationen ett förkortat protein vilket oftast också leder till att proteinet blir icke-funktionellt. Denna mutation leder oftast till att Rnas III-domänen förlorar sin funktion, som i sin tur påverkar hela RNAi-signalräckan (Fernandez-Martinez et al., 2017). Dock finns det en del nyligen publicerade studier som påvisar att patienter med Dicer1-syndrom inte endast har en muterad allel utan två. Studierna antyder att den första muterade allelen nedärvs av föräldrarna medan den andra uppstår som en somatisk mutation. Dessutom har dessa somatiska mutationer också påvisats påverka Rnas III-domänen. Dessa undersökningar indikerar att Dicer kanske kunde fungera som en tumörsuppressor (Wu et al., 2013).

2.6 Epitel-mesenkymal övergång (EMT)

Redan vid tidiga stadier av den embryonala utvecklingen bidrar celler med epitelialt och mesenkymalt ursprung till strukturen och funktionen av organ som utvecklas. Dock är inte dessa fenotyper alltid permanenta. Under rätta omständigheter kan epiteliala och mesenkymala celler växla mellan dessa två fenotyper. Epitel-mesenkymal övergång (eng. Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) är en process där epitelcellerna förändras till en mera rörlig och mesenkymal-liknande fenotyp (Micalizzi et al., 2010). En av de mest fundamentala händelserna under EMT är nedreglering av epiteliala markörer samt uppreglering av mesenkymala markörer. Till epiteliala markörer räknas till exempel E-cadherin och till mesenkymala markörer räknas till exempel N-cadherin samt vimentin (Iamshanova et al., 2017). Denna växling bidrar till att cellerna förlorar till exempel cellkontakter och cellpolaritet (Vuoriluoto et al., 2011). EMT kan initieras av många olika faktorer, exempelvis inflammation, tillväxtfaktorer samt syrebrist (Iamshanova et al., 2017). Den motsatta processen kallas för mesenkymal-epitel övergång (eng. Mesenchymal-Epithelial Transition, MET). Betydelsen av både EMT samt den omvända processen MET har studeras grundligt i däggdjurens utveckling. Det har framkommit att utvecklingen av organ och flera embryonala processer är beroende av växlingen mellan epiteliala och mesenkymala fenotyper. Exempelvis gastrulationen, neurallistens (eng. neural crest),

hjärtklaffarnas, njurarnas samt musklernas utveckling är beroende av växlingen mellan epiteliala och mesekymala fenotyper (Micalizzi et al., 2010). Nyligen har det dessutom förslagits att EMT är involverad i framskridning av cancer, speciellt under invasion och migration av tumörceller till olika organ för att bilda metastaser (Vuoriluoto et al., 2011).

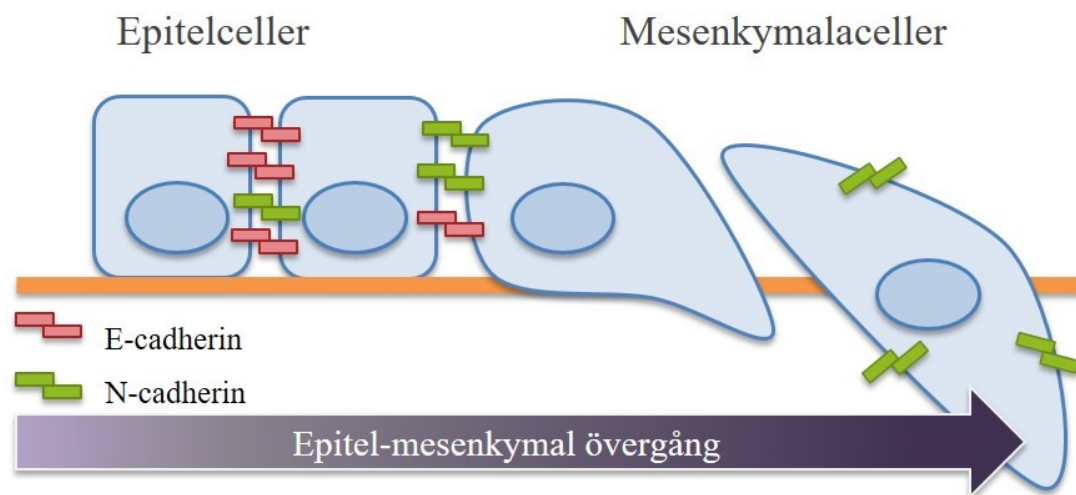
2.6.1 E- och N-cadherin

Cadherinerna utgör en stor grupp av proteiner som är viktiga för bland annat cell-adhesion, vävnadsorganisering samt morfogenes. Till de mest kända cadherinerna hör det så kallade klassiska cadherinerna E- och N-cadherin. De klassiska cadherinerna är transmembrana glykoproteiner som består av en stor extracellulär domän samt en kort intracellulär domän som kopplas till cytoskelettet med hjälp av ett komplex där exempelvis α - och β -cateniner har en viktig roll (Slowinska-Klencka et al., 2012). Det klassiska cadherinerna ansvarar för kontakter mellan cellerna. Dessa kontakter skapas när cadherinernas extracellulära domäner från två närliggande celler växelverkar. Kontakterna får stadga från att cadherinernas intracellulära domän är bundet till aktin som är en del av cytoskelettet. Kontakterna mellan cellerna har en viktig uppgift i utvecklingen av organ och vävnad under embryogenesen samt krävs för att upprätthålla den normala vävnadens struktur i en vuxen organism (Ivanov et al., 2001).

Som tidigare nämnts är nedregleringen av E-cadherin-uttrycket en av de viktigaste händelserna under EMT. Nedregleringen av E-cadherin-uttrycket kan exempelvis orsakas av transkriptionsfaktorerna Slug, Snail, och Twist som induceras under EMT. Samtidig som cancercellerna förlorar E-cadherin, uppregleras uttrycket av N-cadherin (figur 7). N-cadherin uttrycks normalt i fibroblaster, neurala celler samt endotelceller. N-cadherin förknippas ofta med en mera invasiv och aggressiv cancer fenotyp. E-cadherin kan dessutom anses fungera som en tumörsuppressör. E-cadherin kan binda dess cytoplasmiska domän till β -catenin och genom att separera β -catenin förhindra dess transport till cellkärnan. När β -catenin frisätts från cadherinerna kan proteinet förflyttas till cellkärnan och stimulera transkriptionen av olika gener involverade i EMT. Exempelvis inducerar β -catenin-uttrycket av vimentin i bröstcancerceller, vilket i sin tur leder till att cellerna övergår till en mera mesenkymal och invasiv fenotyp (Breier et al., 2014).

2.6.2 Vimentin

Vimentin är ett intermediärfilament som normalt uttrycks i celler med ett mesenkymalt ursprung. Vimentin fungerar som en så kallad organisatör för proteiner som är involverade i bland annat migration, cellfäste samt cell-signalering (Ivaska et al., 2007). Det har påvisats att epitelceller som genomgår EMT uttrycker ökade nivåer av vimentin. Vimentin har bevisats reglera migration samt invasion under EMT i olika celltyper (Vuoriluoto et al., 2011). Vimentin reglerar migration och invasion bland annat genom interaktioner med aktin. Aktin i sin tur bygger upp så kallade lamellipodia och invapodia som krävs för cellernas rörelse och invasion (Helfand et al., 2011; Kidd et al., 2014) Förutom att vimentin påverkar migrationen som en del av cytoskelettet, påverkar vimentin dessutom migration-relaterad signalering. Vuoriluoto och kollegor har exempelvis påvisat att ökade nivåer av vimentin under EMT ökar också uttrycket av tyrosin-kinaset Axl, som i sin tur ökar cellernas migration (Vuoriluoto et al., 2011).



Figur 7. Illustration av Epitel-mesenkymal övergång. Under epitel-mesenkymal övergång (EMT) nedregleras uttrycket av E-cadherin i epitelcellerna medan uttrycket av N-cadherin uppreglas. Denna växling bidrar till att cellerna bli rörligare och förändras till en mera mesenkymal-liknande fenotyp. Dessutom förlorar cellerna kontakter med andra celler samt cellpolaritet.

3 Målsättningar

Sköldkörtelcancer är den vanligaste endokrina cancerformen och under det senaste decenniet har antalet sköldkörtelcancerfall observerats öka i hela världen (Erler et al., 2014). I sköldkörtelcancerceller har det påvisats en nedreglering av enzymet Dicer, vars viktigaste funktion är att reglera syntesen av miRNA i en process som kallas för RNAi. miRNA:er kan i sin tur förhindra translation genom att bryta ner eller nedtysta proteinkodande mRNA:er (Ha och Kim, 2014). Studier har även påvisat att utvecklingen av alla former av sköldkörtelcancer kan förknippas med felaktig reglering av miRNA:er (Erler et al., 2014). Under utvecklingen av cancer har epitelcellerna påvisats övergå till en mera rörlig och mesenkymala-liknande fenotyp, i en process som kallas för EMT. Under EMT förlorar cellerna bland annat cellkontakter samt cellpolaritet (Vuoriluoto et al., 2011). Under framskridningen av cancer kan cellerna dessutom påbörja en så kallad dedifferentiering, vilket betyder att cellerna förlorar sin specifika karaktär. Kännetecknen för sköldkörtelcancercellernas dedifferentiering är bland annat ett minskat uttryck av sköldkörtelspecifika proteiner (Antonelli et al., 2008).

Opublicerat data från Törnquists forskningsgrupp har påvisat att när kalciumfrisättning blockeras, ökar Dicer-nivåerna i ML-1-celler. Ökningen av Dicer har i sin tur påvisats öka uttrycket av det sköldkörtelspecifika proteinerna TPO och NIS samt minska uttrycket av EMT-markörer i ML-1-celler. Därmed antyder dessa resultat på att ML-1-cellerna får en mer normal-liknande fenotyp, eventuellt till följd av en ökning i Dicer-uttrycket. Dessa resultat var utgångspunkten för detta pro gradu-projekt och därmed var det huvudsakliga målet att undersöka om överuttryck eller nedtystning av Dicer har en påverkan på normala sköldkörtelceller (N-thy-Ori-3-1-celler) och follikulära sköldkörtelcancerceller (ML-1-celler).

Specifika syften med denna pro gradu-projekt var att:

- 1) Undersöka om överuttryck eller nedtystning av Dicer påverkar uttrycket av olika sköldkörtelspecifika proteiner i N-thy-Ori-3-1- och ML-1-celler.
- 2) Undersöka om överuttryck eller nedtystning av Dicer påverkar N-thy-Ori-3-1- och ML-1-cellernas proliferation samt migration.
- 3) Undersöka om Dicer modulerar uttrycket av mesenkymala-markörer i ML-1-celler.
- 4) Undersöka om Dicer ökar uttrycket av mesenkymala-markörer i N-thy-Ori-3-1-celler.

4 Material och metoder

4.1 Cellinjer och odling

Till en början användes både normala sköldkörtellinjen N-thy-Ori-3-1 och follikulära sköldkörtelcancerlinjen ML-1 för alla experimenten. Men eftersom N-thy-Ori-3-1-cellerna inte fysiologiskt uppförde sig som normala sköldkörtelceller utan påvisade kännetecken för cancer, fortsattes experimenten med endast ML-1-celler. N-thy-Ori-3-1-cellern köptes från Health Protection Agency Culture Collection (Salisbury, UK) och odlades i RPMI 1640-medium (Lonza Bioscience, Basel, Switzerland) som innehöll 10 % fetalt kalvserum (eng. Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) samt 100 U/ml penicillin-streptomycin (P/S, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA). ML-1-cellerna erhöles av Dr Johann Schönberger (University of Regensburg, Germany) och odlades i Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) som innehöll 10 % FBS, 2mM L-glutamin och 100 U/ml P/S. Båda cellinjerna odlades i en inkubator vid 37 °C med 5 % koldioxid samt en vattenmättad atmosfär. Cellernas medium byttes varannan dag och cellerna delades när cellerna var cirka 80-90 % konfluenta. Cellerna lossades med 0,02 % etylendiamintetra-acetylsyra (eng. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) i fosfatbuffrad saltlösning (eng. Phosphate-buffered saline, PBS) (bilaga 2).

4.2 Transfektion av celler

Transfektion är en grundläggande metod inom molekylärbiologin som används för att introducera främmande genetiskt material till cellen. Ändamålet med metoden är att manipulera celler att producera eller minska uttrycket av ett specifikt protein. I denna studie utfördes transfektioner för att både nedreglera och överuttrycka Dicer i ML-1-celler. När ML-1-cellerna transfekterades med en specifik siRNA-molekyl (Eurofins Genomics, Tyskland, tabell 1) nedreglerades uttrycket av Dicer, och därmed bildades Dicer-nedstystade celler. siRNA-molekylerna fungerar genom att binda till RISC, varefter komplexet använder siRNA-molekylen som mall för att finna den komplementära mRNA strängen som kodar för det specifika proteinet. siRNA-molekylen tillsammans med RISC aktiverar sedan RISC RNaser som klyver det

specifika mRNA:t och nedreglera därmed uttrycket av Dicer i cellen. ML-1-cellerna transfekterades även med en kontroll-siRNA (Eurofins Genomics, Tyskland, tabell 1) för att skapa referensceller. När ML-1-celler transfekterades med en plasmid som kodar för Dicer, överexpresserades Dicer proteinet i cellerna (Addgene, Cambridge, MA, USA, bilaga 3). Dessutom transfekterades cellerna med en kontrollplasmid (Addgene, Cambridge, MA, USA, bilaga 4) för att bilda referensceller.

Tranfektion utfördes genom elektroporeing. Elektroporering innebär att elektriska pulser bildar tillfälligt öppningar i cellmembranet och genom dessa öppningar kan siRNA-molekyler eller plasmider diffundera in i cellen. Cellerna räknades och cellkoncentrationen justerades till cirka 2 miljoner celler per transfektion. Sedan pelleterades cellerna i fyra minuter med 12 000 x g samt suspenderades i Opti-MEM (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA), varefter antingen 2 µM siRNA eller 20 µg plasmid tillsattes. Cellerna elektroporerades vid 240 V och 975 µF. Efter elektroporeringen överfördes cellerna till nytt medium, varefter cellerna odlades i 48 timmar innan cellerna användes för experiment.

Tabell 1. siRNA sekvenserna som användes för transfektion.

siRNA	Primärsekvens
Negativ kontroll	5'-CCU-ACA-UCC-CGA-UCG-AUG-AUG-TT- 3'
siDicer	5'-UUU-GUU-GCG-AGG-CUG-AUU-CTT- 3'

4.3 Western blot

Western blot är en metod som används inom cell- och molekylärbiologin. Metoden möjliggör identifiering samt detektering av specifika proteiner med hjälp av antikroppar. Först separeras proteinerna i ett celllysat enligt molekylär storlek genom gelelektrofores i en process som kallas SDS-PAGE (eng. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis), varefter proteinerna överförs från gelen till ett nitrocellulosamembran. Till slut görs en så kallad immunoblottnings där proteinerna visualiseras genom att inkubera membranet med antikroppar specifika för proteinerna av intresse.

I denna studie utfördes western blot för att undersöka uttrycket av Dicer, olika sköldkörtelspecifika proteiner, samt markörer för EMT/MET på proteinnivå. De sköldkörtelspecifika proteinerna som undersöktes var TG, NIS, och TPO. EMT/MET markörerna som undersöktes var E-cadherin och N-cadherin. Dessutom undersöktes uttrycket av hushållsgenerna Hsc70 eller β -aktin för att säkerställa att laddningen var jämn (tabell 2).

4.3.1 Framställning av celllys

Celllys framställdes av både icke-behandlade N-thy-Ori-3-1- och ML-1-celler samt av tranfekterade ML-1-celler. ML-1-celler tranfekterades antingen med en Dicer-nedtystande siRNA eller en Dicer överuttryckande plasmid. 48 timmar efter behandling påbörjades framställningen av celllys genom att lossa cellerna med EDTA från odlingsplattan. Därefter räknades cellkoncentrationen och beroende på behandlingen justerades cellkoncentrationen så att varje celllys innehöll 150 000/300 000 celler. Cellerna tvättades sedan tre gånger med 1 x PBS, varefter cellerna lyserades genom att tillsätta 3 x Laemmlibuffert (bilaga 2). Laemmlibuffert innehåller bland annat β -merkaptoetanol vars uppgift är att denaturerar proteiner i celllysatet genom att bryta disulfidbryggor i proteinerna. Celllysaten överfördes till eppendorfrör som slutligen kokades i 5 minuter. Dessutom framställde Muhammad Yasir Asghar celllys av follikulära sköldkörtelcancer cellinjen FTC-133 och anaplastiska sköldkörtelcancer cellinjen C643 som användes i ett experiment i detta pro gradu-projekt.

4.3.2 SDS-PAGE och överföring av proteiner till ett nitrocellulosamembran

De färdiga celllysaten laddades till en 10 % SDS-polyakrylamidgel. Polyakrylamidgelen består av en nedre gel med pH-värdet 8,8 samt en övre gel med pH-värdet 6,8. Den övre gelen har dessutom en lägre akrylamidkoncentration (4 %) än den nedre gelen (8 %). Den låga akrylamidkoncentrationen i den övre gelen bildar en porös gel där proteinerna inte separeras, dock samlas alla proteinerna i tunna band vid skiktet mellan den övre och nedre gelen. En högre akrylamidkoncentration i den

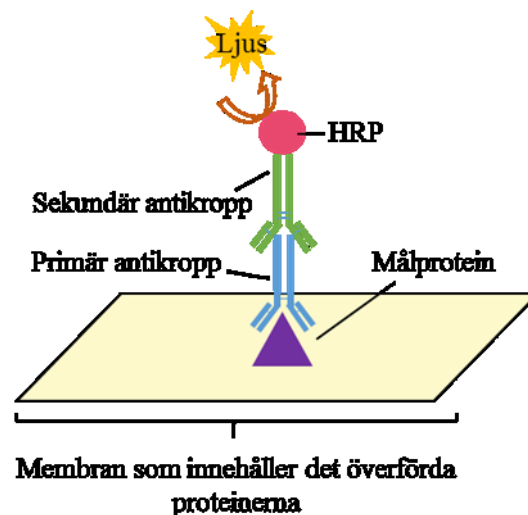
nedre gelen bildar smalare porer i gelen, vilket leder till att de mindre proteinerna vandrar snabbare än de större proteinerna och proteinerna separeras enligt storlek. Separeringen av proteinerna i celllysaten, med SDS-PAGE utfördes med hjälp av en SDS-PAGE körbuffert (bilaga 2) samt med elektriska spänningen vid 120 V ända tills alla proteinerna var separerade. SDS-PAGE körbuffertens uppgift är att tillsammans med β -merkapotetanolen denaturera proteinerna och gör de negativt laddade vilket gör att proteinerna kan lätt vandra mot pluspolen. Tillsammans med proteiner separerades en protein markör som användes för att kunna avgöra de separerade proteinernas storlek (Page Ruler plus prestained protein ladder, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Efter elektroforesen överfördes proteinerna från polyakrylamidgelen till ett nitrocellulosamembran (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA). Proteinöverföringen gjordes genom våt överföring (eng.wet transfer) och med hjälp av en så kallad överföringskassetten. Överföringskassetten byggdes upp enligt följande; underst placerades tre stycken whatmanpapper, i mitten placerades gelen samt nitrocellulosamembranet ovanpå och överst placerades igen tre stycken whatmanpapper. Den färdiga överföringskassetten samt överföringsbuffert (bilaga 2) placerades i överföringsapparaten. Proteinerna överfördes från polyakrylamidgelen till nitrocellulosamembranet genom att de negativa proteinerna rör sig emot den positiva polen med hjälp av elektrisk spänning. Den elektriska spänning som användes vid överföring var 100 V under 60 minuter.

4.3.3 Immunoblotning

Efter överföring av proteinerna från gelen till nitrocellulosamembranet inkuberades membranet med 5 % fettfrimjök upplöst i 1 x Tris-buffrad saltlösning (TBS, bilaga 2) innehållande Tween 20 (TBST, bilaga 2) i en timme, under omskakning. Mjökproteinerna förhindrar antikropparnas ospecifika bindning till membranet. Efter inkuberingen tvättades membranet tre gånger i TBST, varefter membranet inkuberades i en specifik primär antikropp under en natt, vid 4 °C. Den primära antikroppen binder till målproteinerna på membranet (figur 8). Nästa dag tvättades membranet igen tre gånger med TBST och därefter inkuberades membranet med en sekundär antikropp i en timme. Den sekundära antikroppens uppgift är att binda till den primära antikroppen. Dessutom är den sekundära antikroppen bundet till enzymet

pepparrotsperoxidas (eng. horseradish peroxidase, HRP). Både de primära och sekundära antikropparna var utspädda i 1 x PBS som innehöll 1 % bovin serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) och 0,02 % natriumazid (NaN_3) enligt koncentrationerna i tabell 2. Efter en timme tvättades membranet åter tre gånger med TBST, varefter membranet sköljdes med en ECL-lösning (eng. enhanced luminescens, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) som innehåller luminol. När luminolen kommer i kontakt med HRP, oxideras luminolen som skapar en ljusreaktion och denna ljusreaktion kan sedan detekteras på röntgenfilm (Fuji Medical X-ray Film). Filmen framkallades med en framkallningsmaskin (Agfa Curix 60) i ett mörkerrum, varefter resultaten analyserades med hjälp av programmet ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA).



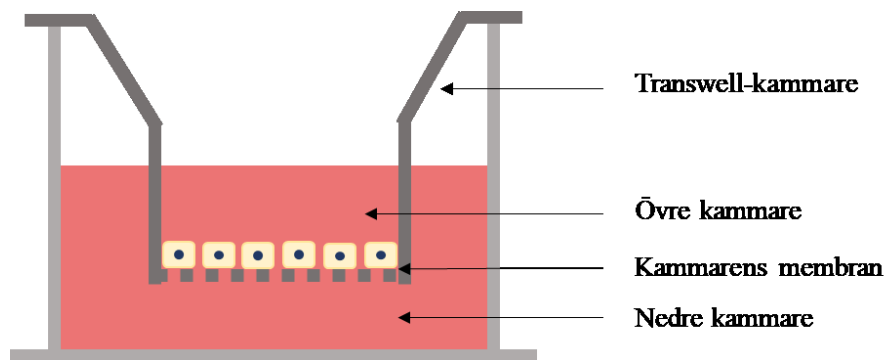
Figur 8. Principen för immunoblotning. Den primära antikroppen binder först till målproteinerna på nitrocellulosamembranet, varefter den sekundära antikroppen binder till den primära antikroppen. Den sekundära antikroppen är konjugerad till enzymet pepparrotsperoxidas (eng. horseradish peroxidase, HRP) som skapar en ljusreaktion när enzymet reagerar med luminol som finns i ECL-lösningen. Detta ljus kan detekteras på röntgenfilm.

Tabell 2. Primära och sekundära antikroppar som användes för western blot.

Primära antikroppar	Utspädning	Leverantör
get anti-natrium/jodid-symporter	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
get anti-tyreoglobulin	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
kanin anti-Dicer	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
kanin anti-E-cadherin	1:1000	Abcam (Cambridge, England) Fick från Lea Sistonen.
kanin anti-N-cadherin	1:1000	Merck Millipore (Burlington, MA, USA) Fick från John Eriksson.
kanin anti- β -aktin	1:1000	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
mus anti-tyreoperoxidas	1:200	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
råtta anti-Hsc70	1:4000	Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)
Sekundära antikroppar	Utspädning	Leverantör
HRP-konjugerad anti-mus	1:3000	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
HRP-konjugerad anti-råtta	1:3000	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
HRP-konjugerad get-anti-kanin	1:2000	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)
HRP-konjugerad åsna-anti-get	1:10 000	Promega (Madison, WI, USA)

4.4 Migration och invasion

Rörlighet är en av de levande cellernas viktigaste egenskaper. Cellernas migration är en del av befruktningen, embryonalutvecklingen, immunförsvaret samt många patologiska processer, som t.ex. metastasering och inflammation. På grund av detta är metoder som undersöker migration väldigt viktiga, speciellt inom cancer forskning (Justus et al., 2014). Migrations- och invasions-experiment utfördes för att undersöka om nedtystning och överuttryck av Dicer påverkar ML-1-cellernas migration och invasion. Experimenten utfördes med hjälp av Transwell-kamrar (Corning Inc.; Corning, NY, USA) med en diameter på 6,5 mm och porstorleken 8 μm (figur 9). För att undersöka cellernas invasion överströks Transwell-kamrarnas membran med 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ kollagen IV (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) och lämnades för att torka övernatten i laminarskåp. Nästa dag räknades och justerades cellkoncentrationen till 100 000/200 μl . Cellerna överfördes sedan till Transwell-kamrarnas övre kammare. I den nedre kammaren tillsattes vanligt medium. Till både undre och övre kammaren tillsattes dessutom mitomycin C (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) för att förhindra proliferationen. Cellerna inkuberades i 7-16 timmar under vilket cellerna migrerade genom membranet. Migrationen avslutades genom att suga bort cell-mediet och torka membranytan. Cellerna fixerades sedan med 2 % paraformaldehyd i 10 minuter samt färgades med 0,1 % kristallviolett i 5 minuter, varefter membranerna tvättades två gånger i 1 x PBS och en gång i vatten. Nästa dag efter att membranerna torkat, räknades cellerna som migrerat genom membranet i mikroskop med 40 x förstoring från åtta stycken olika fält per kammare.



Figur 9. Migrations-experiment utfördes med hjälp av Transwell-kamrar. Inför invasions experiment överströks kammarens membran med kollagen IV. Cellerna pipetterades till den övre kammaren medan vanligt medium tillsattes till den nedre kammaren.

4.5 ^3H -inkorporering

Cellproliferation antyder på en ökning av mängden celler till följd av en normal process där cellerna växer och delas. Cellernas proliferaion är oftast en bra indikering på cellernas välmående. Celler som inte längre är normal kan uppvisa olika proliferaionshastigheter i jämförelse med normala celler, till exempel cancerceller kan påvisa en ökning i proliferaionshastigheten. På grund av detta är metoder som undersöker cellernas proliferaion viktiga inom cancerforskningen. H^3 -inkorporering utfördes för att undersöka om nedtysning och överuttryck av Dicer påverkar ML-1-cellernas proliferaion. Experimenten påbörjades med att 75 000 celler odlades på 35-mm cellodlingsplattor under 24 timmar. Cellerna odlades i normalt DMEM och för varje behandling gjordes tre stycken replikat. 4 timmar innan experimentet avslutades tillsattes ^3H -thymidin (0,4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Efter 4 timmar tvättades cellerna tre gånger med iskall 1 x PBS varefter cellerna fixerades under 10 minuter i 5 % trikloroättiksyra (eng. trichloroacetic acid, TCA). Cellerna upplöstes sedan med 0,1 M NaOH under 10 minuter och därefter överfördes NaOH lösningen till scintillationsrör och Optiphase Hisafe 3 scintillationsvätska (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) tillsattes. För att bestämma mängden prolifererande celler mättes provens radioaktivitet med hjälp av Wallac 1410 scintillationsräknaren (Wallac, Finland).

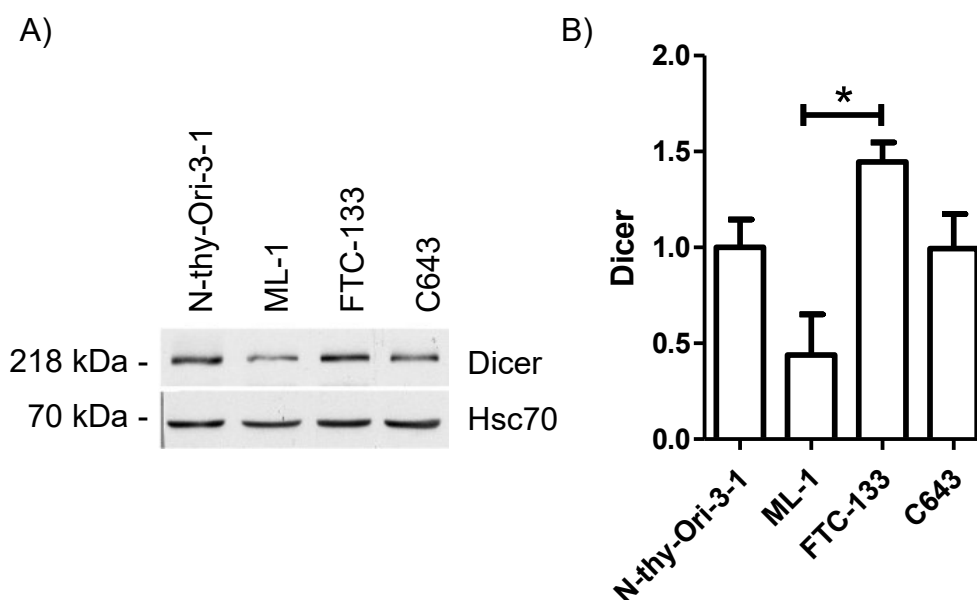
4.6 Statistik

Resultaten analyserade med programmet GraphPad Prism 6. När två grupper undersöktes analyserades resultaten med t-test. När tre eller flera grupper undersöktes analyserades resultaten med "One-Way ANOVA" och Bonferroni's post hoc test. Resultaten anges som medeltal + medelvärde + medelfel (SEM) och p-värdet under 0,05 anses som statistiskt signifikant, medan p-värdet över 0,05 anses som icke-signifikant. I figurerna representerar ns ett p-värde $\geq 0,05$ och symbolerna * ett p-värde $\leq 0,05$, ** ett p-värde $\leq 0,01$, och *** ett p-värde $\leq 0,001$.

5 Resultat

5.1 Uttrycket av Dicer är lägst i ML-1-celler i jämförelse med FTC-133-cellerna

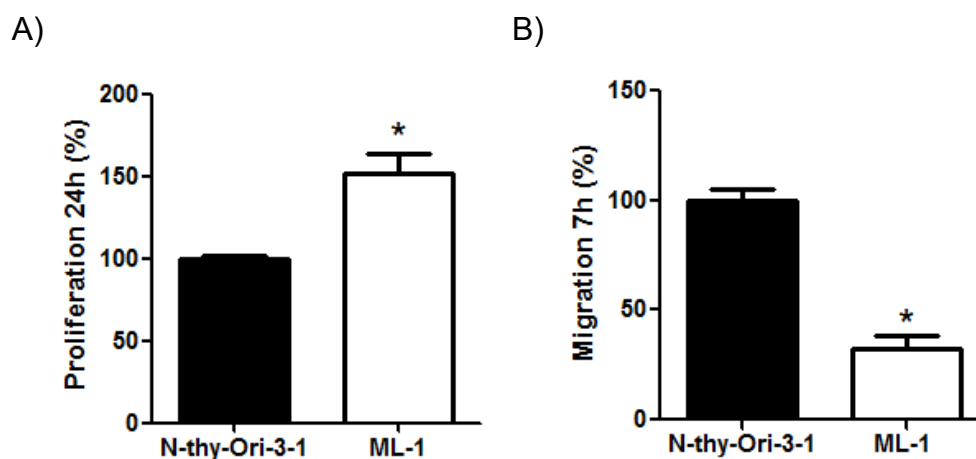
Detta Pro-gradu projektet påbörjades med att undersöka proteinuttrycket av Dicer i olika sköldkörtelcancer cellinjer i jämförelse med den normala sköldkörtelcellinjen N-thy-Ori-3-1. Undersökningen utfördes med hjälp av western blot-analys. Sköldkörtelcancer cellinjerna som jämfördes var den follikulära sköldkörtelcancer cellinjen ML-1, den follikulära sköldkörtelcancer cellinjen FTC-133 och den anaplastiska sköldkörtelcancer cellinjen C643. Resultaten påvisar att Dicer är signifikant nedreglerat i ML-1-celler i jämförelse med FTC-133-cellerna (figur 10 B).



Figur 10. Undersökning av Dicer-uttrycket på proteinnivå. A) Representativ immunoblott för analys av Dicer-proteinuttrycket i N-thy-Ori-3-1, ML-1-, FTC-133- och C643-celler. B) Kvantifierat proteinuttryck av Dicer. Proteinuttrycket av Dicer normaliserades med uttrycket av hushållsgenen Hsc70. Statistisk analys utfördes med "One-Way ANOVA" med post hoc test Bonferroni. Statistisk signifikans anges med * som representerar ett p-värde på $\leq 0,05$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.2 ML-1-cellernas proliferation är signifikant uppreglerad medan migrationen är signifikant nedreglerad i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna

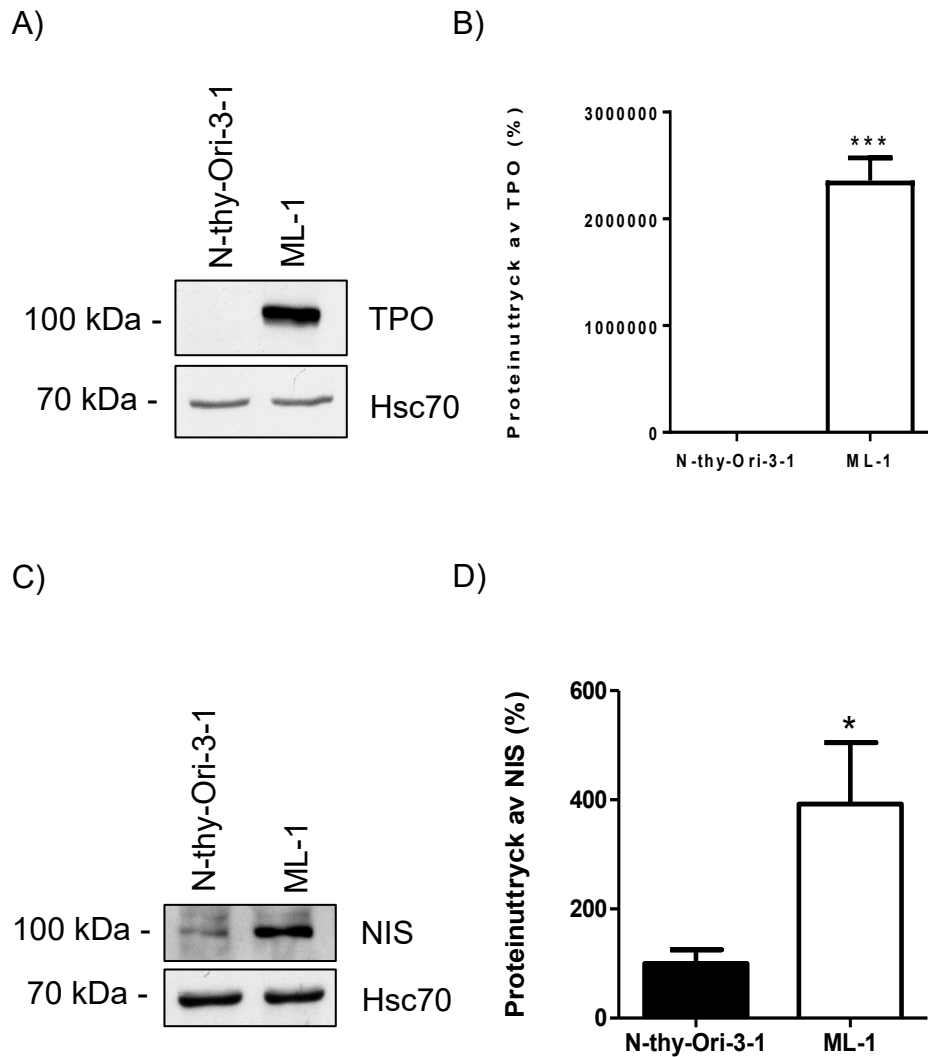
Eftersom Dicer har påvisats vara nedreglerat i sköldkörtelcancer (Erler et al., 2014) och ML-1-cellerna har påvisats uttrycka låga nivåer av Dicer i jämförelse med FTC-133-cellerna (figur 10 B) bestämdes det att de fortsatta experimenten utförs endast med N-thy-Ori-3-1-celler och ML-1-celler. För att undersöka om det finns en skillnad i ML-1-cellernas basala proliferation i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna utfördes ^3H inkorporering. I resultaten kan det tydligt detekteras en signifikant uppreglering i ML-1-cellernas proliferation i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna efter 24 timmar (figur 11 A). Dessutom undersöktes det ifall det finns en skillnad i ML-1-cellernas basala migration och invasion i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna. Migrationsexperiment utfördes med hjälp av Transwell-kamrar vars membran överströks med kollagen IV. Resultaten visar att ML-1-cellerna har en signifikant lägre förmåga till migration samt invasion i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna (figur 11 B).



Figur 11. Undersökning av N-thy-Ori-3-1-cellernas och ML-1-cellernas basala proliferation samt migration. A) Proliferation av N-thy-Ori-3-1-cellerna och ML-1-cellerna efter 24 timmar. **B)** Basal migration samt invasion under 7 timmar. Statistisk analys utfördes med t-test. Signifikansen anges med * som representerar ett p-värde på $\leq 0,05$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.3 Proteinuttrycket av TPO och NIS är signifikant högre i ML-1-celler än i N-thy-Ori-3-1-celler

Till följd av sköldkörtelcancer cellernas dedifferentiering kan sköldkörtelcancer cellerna förlora uttrycket av sköldkörtelspecifika proteiner. På basen av detta var det av intresse att jämföra proteinuttrycket av olika sköldkörtelspecifika proteiner i N-thy-Ori-3-1-celler och ML-1-celler. Proteinuttrycket av TPO och NIS undersöktes med hjälp av western blot-analys. I resultaten kan det detekteras en signifikant uppreglering i uttrycket av NIS i ML-1-celler i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-celler. Dessutom kan det detekteras att uttrycket av TPO totalt saknades i N-thy-Ori-3-1-cellerna (figur 12 B och D).



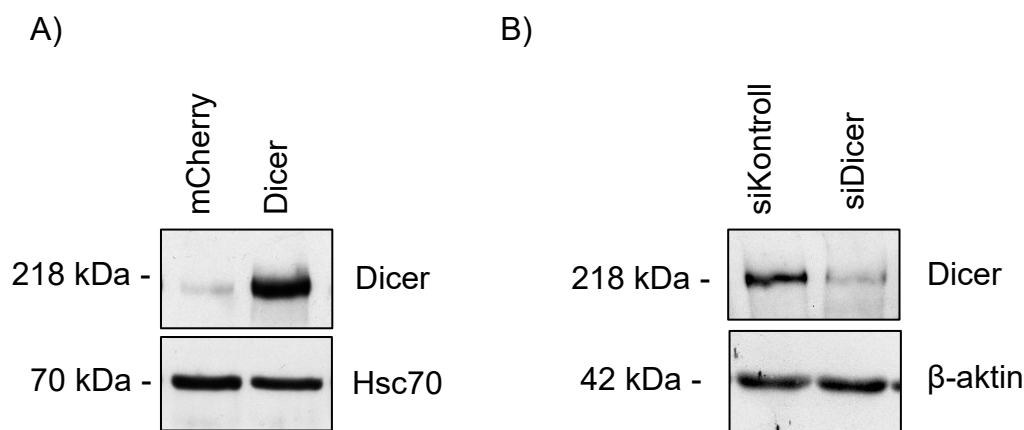
Figur 12. Undersökning av TPO- och NIS-uttrycket i N-thy-Ori-3-1-celler och ML-1-celler. **A)** Representativ immunoblott för analys av tyreperoxid (TPO) i N-thy-Ori-3-1-celler och ML-1-celler. **B)** Kvantifierat proteinuttryck av TPO. **C)** Representativ immunoblott för analys av natrium/jodid symporter-uttrycket (NIS) i N-thy-Ori-3-1-celler och ML-1-celler. **D)** Kvantifierat proteinuttryck av NIS. Proteinuttrycket av både TPO och NIS normaliserades med uttrycket av hushållsgenen Hsc70. Statistisk analys utfördes med t-test. Signifikansen anges med * som representerar ett p-värde på $\leq 0,05$ och med *** som representerar ett p-värde på $\leq 0,001$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.4 Effektivt överuttryck och nedreglering av Dicer i ML-celler.

De tidigare experiment som utfördes med normala sköldkörtelceller (N-thy-Ori-3-1) och med follikulära sköldkörtelcancer (ML-1) antyder att karaktärer för de normala sköldkörtelcellerna har försvunnit (figur 11 och 12). På grund av dessa resultat var N-thy-Ori-3-1-cellerna inte längre ett bra alternativ som en normal sköldkörtelcellinje och det beslöts att alla fortsatta experimenten görs endast med ML-1-celler.

ML-1-celler transfekterades både för att nedreglera och överuttrycka Dicer. Dicer-överuttryckande celler skapades genom att transfektera ML-1-celler med en plasmid som kodar för Dicer och därmed överuttrycker Dicer i cellen (Dicer). Dessutom transfekterades cellerna med en kontrollplasmid för att bilda referensceller (mCherry). Dicer-nedtystade celler skapades genom att transfektera ML-1-celler med en specifik siRNA-molekyl som nedreglerar uttrycket av Dicer (siDicer). Dessutom transfekterades ML-1-cellerna med en kontroll-siRNA för att skapa referensceller (siKontroll).

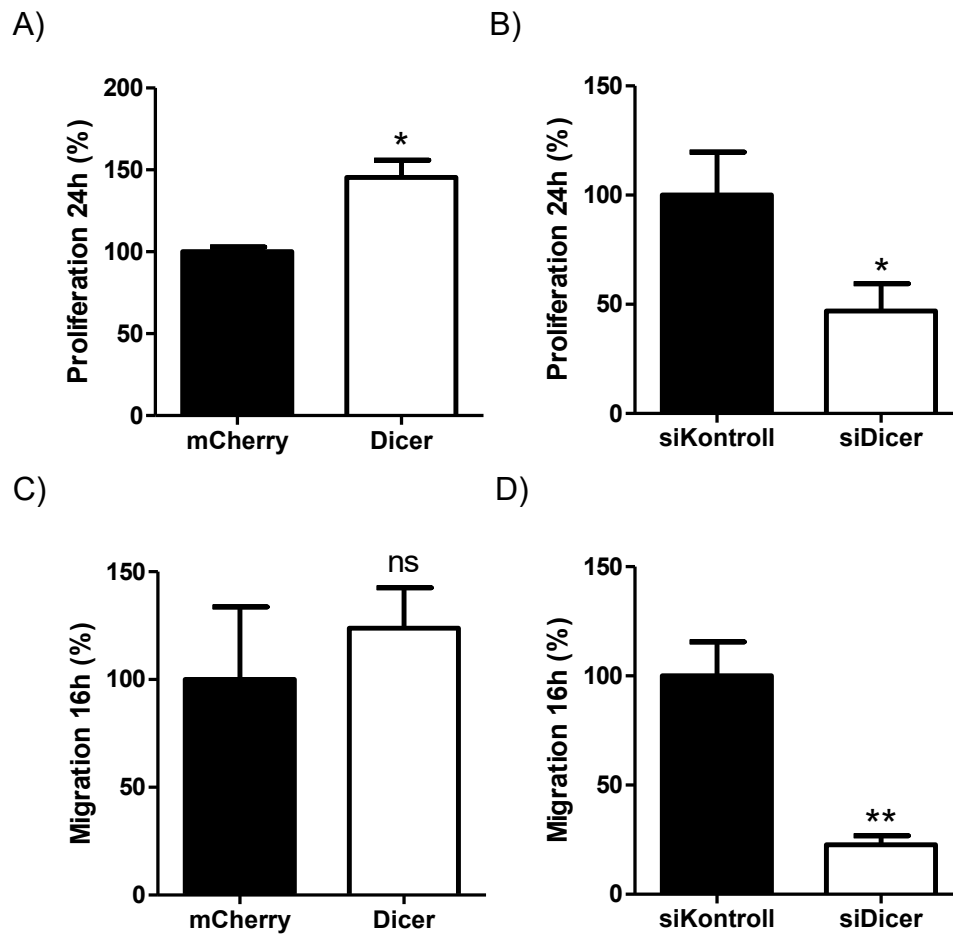
Innan varje experiment med Dicer-överuttryckande celler och Dicer-nedtystade celler påbörjades, utfördes western blot-analys för att försäkra att transfektionerna av ML-1-cellerna fungerat. Från resultaten framgår det att Dicer är uppreglerat i Dicer-överuttryckande cellerna i jämförelse med referenscellerna (figur 13 A). Från resultaten framgår också att Dicer är nedreglerat i Dicer-nedtystade celler i jämförelse med referenscellerna (figur 13 B).



Figur 13. Undersökning av transfektions effektiviteten i ML-1-celler genom analys av Dicer-proteinuttrycket. A) Representativ immunoblott för analys av Dicer i Dicer-överuttryckande celler (Dicer) samt referensceller (mCherry). Lysaten framställdes 48 timmar efter transfektion. Proteinuttrycket av Dicer normaliserades med uttrycket av hushållsgenen Hsc70. **B)** Representativ immunoblott för analys av Dicer i Dicer-nedtystade celler (siDicer) samt referensceller (siKontroll). Lysaten framställdes 48 timmar efter transfektionen. Proteinuttrycket av Dicer normaliserades med uttrycket av hushållsgenen β -aktin.

5.5 Överuttryck av Dicer ökar ML-1-cellernas proliferation medan nedtysning av Dicer minskar ML-1-cellernas proliferation samt migration

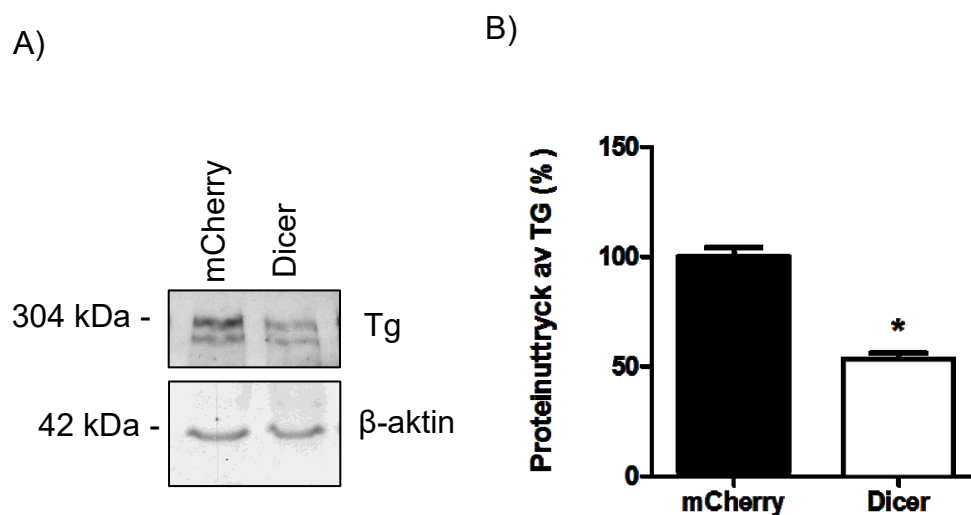
Eftersom Dicer är involverat i produktionen av moget miRNA och miRNA:er har i sin tur påvisats påverka både proliferation och migration (Fujiwara och Kimura, 2017), var det av intresse att undersöka om överuttryck eller nedtysning av Dicer påverkar ML-1-cellernas basala proliferation samt migration. Proliferations-experiment utfördes med hjälp av H^3 -inkorporering, medan migrations-experiment utfördes med hjälp av Transwell-kamrar med kollagen IV-överdragna membran. Resultaten påvisar en signifikant uppreglering i Dicer-överuttryckande celler (Dicer) proliferation i jämförelse med referenscellerna (mCherry) efter 24 timmar (figur 14 A). Resultaten påvisar dock en signifikant nedreglering i proliferationen av Dicer-nedtystade cellerna (siDicer) i jämförelse med referenscellerna (siKontroll) efter 24 timmar (figur 14 B). Dessutom påvisar resultaten att Dicer-överuttryck inte har en signifikant effekt på ML-1-cellernas migration samt invasion i jämförelse med referenscellerna (figur 14 C), medan nedtysning av Dicer minskar på ML-1-cellenas förmåga till migrationen samt invasionen, efter 16 timmar (figur 14 D).



Figur 14. Undersökning av Dicer överuttryckande- och Dicer-nedtystade cellers basala proliferation samt migration. ML-1-cellerna transfekterades antingen med en Dicer-överuttryckande plasmid eller med en Dicer-nedtystande siRNA. Experimenten påbörjades 48 timmar efter transfektionen. **A)** Basal proliferation av Dicer-överuttryckande celler (Dicer) i jämförelse med referensceller (mCherry) efter 24 timmar. **B)** Basal proliferation av Dicer-nedtystade celler (siDicer) i jämförelse med referensceller (siKontroll) efter 24 timmar. **C)** Basal migration samt invasion av Dicer-överuttryckande celler i jämförelse med referensceller efter 16 timmar. **D)** Basal migration och invasion av Dicer-nedtystade celler i jämförelse med referenscellerna. Statistik analys utfördes med t-test. Signifikansen anges med * som representerar ett p-värde på $\leq 0,05$ och med ** som representerar ett p-värde på $\leq 0,01$. Icke-signifikanta resultat anges med ns som representerar ett p-värde $\geq 0,05$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.6 Överuttryck av Dicer minskar proteinuttrycket av Tg i ML-1-celler

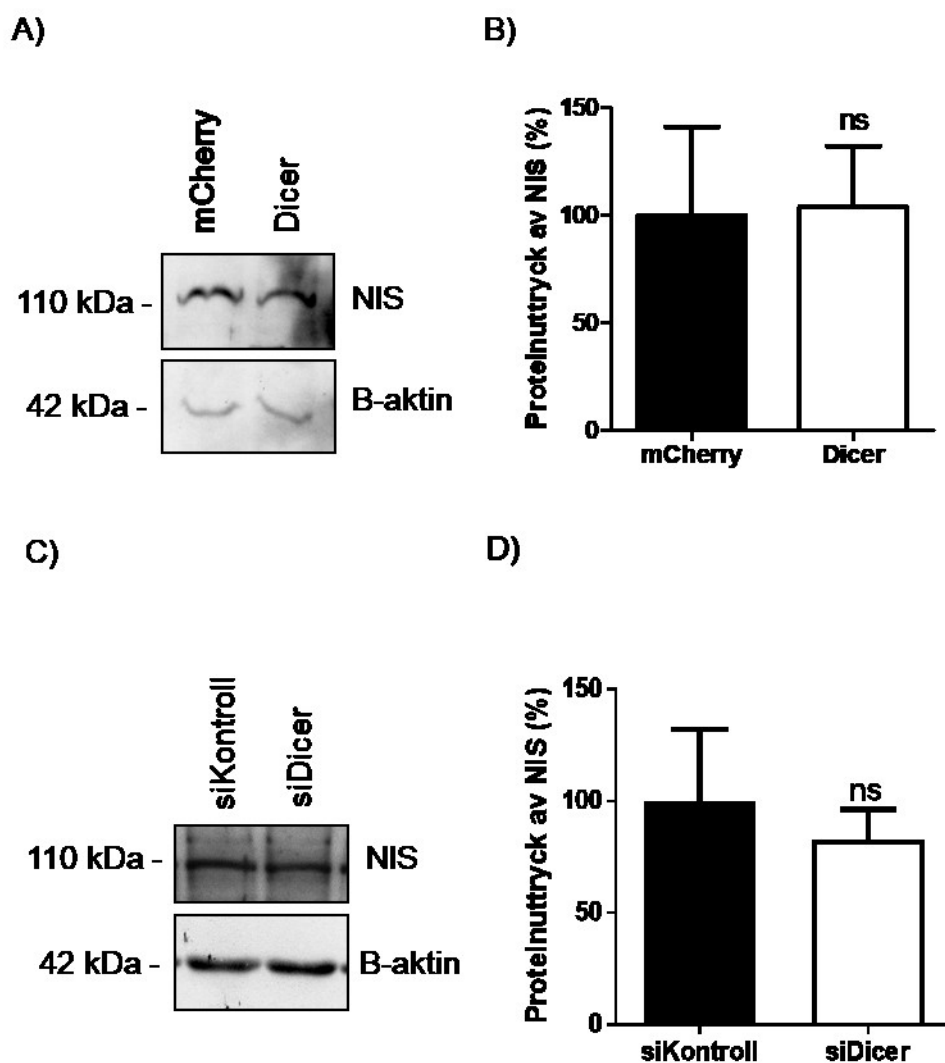
Undersökningar har påvisat att PTC och FTC som anses vara väl differentierade formerna av sköldkörtelcancer fortfarande uttrycker det sköldkörtelspecifika proteinet Tg. Dock har det påvisats att MTC och ATC som anses vara icke-differentierade former av sköldkörtelcancer har förlorat uttrycket av exempelvis Tg (Indrasena, 2017). Dessutom har undersökningar med Dicer-knockoutmöss påvisat ett minskat uttryck av flera sköldkörtelspecifika proteiner, inklusive Tg (Frezzetti et al., 2011). På basen av detta undersöktes proteinuttrycket av Tg i Dicer-överuttryckande celler (Dicer) i jämförelse med referensceller (mCherry). Resultaten påvisar en signifikant nedreglering i proteinuttrycket av Tg i Dicer-överuttryckande cellerna i jämförelse med referenscellerna (figur 16).



Figur 16. Undersökning av Tg-uttrycket i Dicer-överuttryckande celler. ML-1-cellerna transfekterades med en Dicer-överuttryckande plasmid och celllysaten framställdes 48 timmar efter transfektion. **A)** Representativ immunoblot för analys av tyreoglobulin-uttrycket (Tg) i Dicer-överuttryckande celler (Dicer) i jämförelse med referensceller (mCherry). **B)** Kvantifierat proteinuttryck av Tg. Proteinuttrycket av Tg normaliserades med uttrycket av hushållsgenen β -aktin. Statistik analys utfördes med t-test. Signifikansen anges med * som representerar ett p-värde på $\leq 0,05$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.7 Överuttryck eller nedreglering av Dicer har ingen effekt på proteinuttrycket av NIS i ML-1-celler

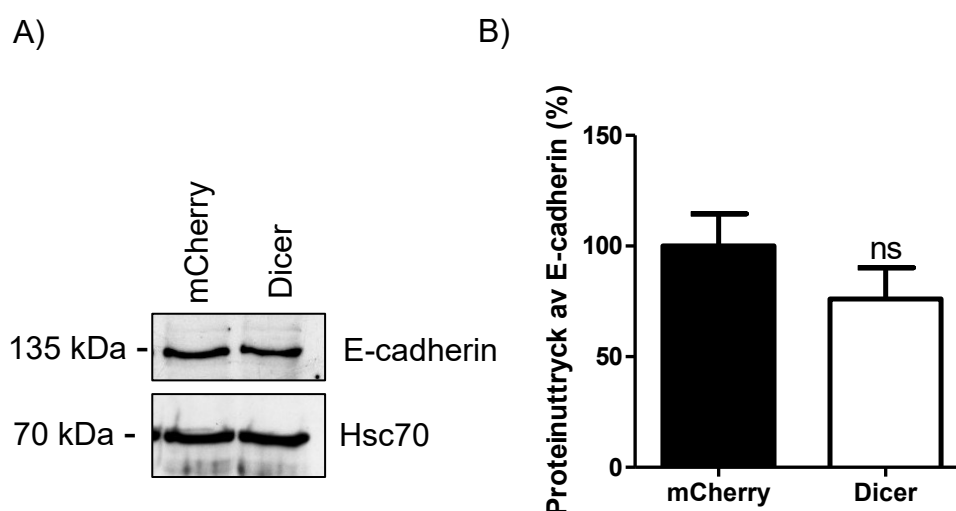
Uttrycket av NIS har påvisat vara nedreglerat i sköldkörtelcancer (Spitzweg et al., 2001). Dessutom har undersökningar med Dicer-knockoutmöss påvisat ett minskat uttryck av flera sköldkörtelspecifika proteiner, inklusive NIS (Frezza et al., 2011). På basen av detta undersöktes proteinuttrycket av NIS i både Dicer-överuttryckande celler (Dicer) och Dicer-nedstygade celler (siDicer). Resultaten påvisar ingen signifikant effekt i proteinuttrycket av NIS i Dicer-överuttryckande celler eller i Dicer-nedstygade celler i jämförelse med referensceller (figur 17 B och D).



Figur 17. Undersökning av NIS-uttrycket i Dicer-överuttryckande celler och Dicer-nedtystade celler. ML-1-cellerna transfekterades antingen med en Dicer-överuttryckande plasmid eller med en Dicer-nedtystande siRNA och celllysaten framställdes 48 timmar efter transfektion. **A)** Representativ immunoblott för analys av natrium/jodid symporter-uttrycket (NIS) i Dicer-överuttryckande celler (Dicer) i jämförelse med referensceller (mCherry). **B)** Kvantifierat proteinuttryck av NIS. **C)** Representativ immunoblott för analys av NIS-uttrycket i Dicer-nedtystade celler (siDicer) i jämförelse med referensceller (siKontroll). **D)** Kvantifierat proteinuttryck av NIS. Proteinuttrycket av NIS normaliserades med uttrycket av hushållsgenen β -aktin. Statistik analys utfördes med t-test. Icke-signifikanta resultat anges med ns som representerar ett p-värde $\geq 0,05$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.8 Överuttryck av Dicer har ingen effekt på proteinuttrycket av omoget E-cadherin i ML-1-celler

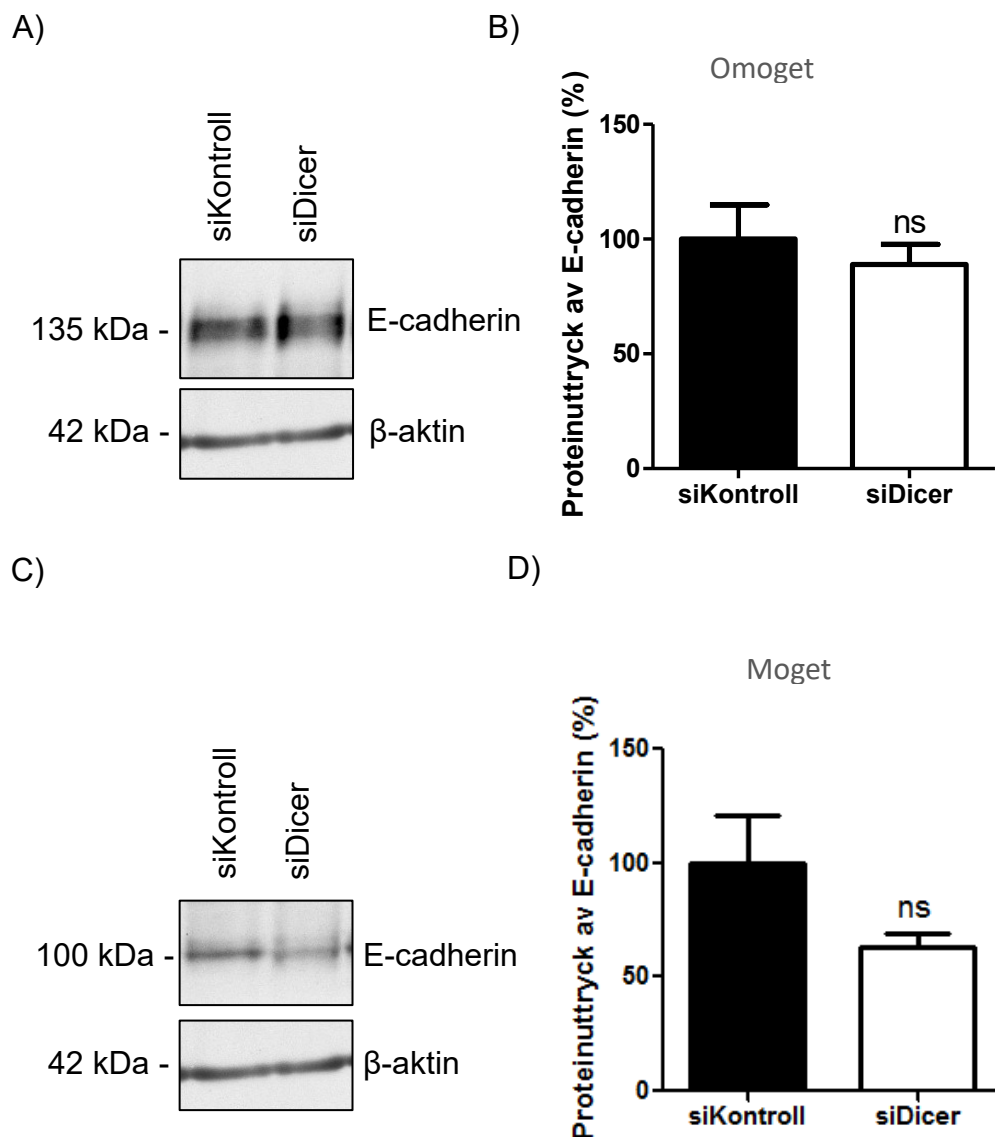
Celler som genomgår EMT har påvisats förlora uttrycket av E-cadherin samtidigt som uttrycket av N-cadherin ökar. Nyligen har det dessutom påvisats att EMT är involverat i framskridning av cancer, särskilt under invasion och migration (Vuoriluoto et al., 2011). Tidigare experiment har redan påvisat att Dicer-överuttryck ökar ML-1-cellernas proliferation men har ingen effekt på cellernas migration (figur 14 A). På basen av detta var det av intresse att vidare undersöka ifall överuttryck av Dicer påverkar proteinuttrycket av EMT-markören E-cadherin. Resultaten visar ingen signifikant effekt på proteinuttrycket av omoget E-cadherin i Dicer-överuttryckande celler (mCherry) i jämförelse med referenscellerna (Dicer) (figur 18 B). Flera försök utfördes för att detektera moget E-cadherin, men inga användbara immunoblottar kunde erhållas.



Figur 18. Undersökning av uttrycket av omoget E-cadherin i Dicer-överuttryckande celler. ML-1-cellerna transfekterades med en Dicer-överuttryckande plasmid och celllysaten framställdes 48 timmar efter transfektion. **A)** Representativ immunoblott för analys av omoget E-cadherin-uttryck i Dicer-överuttryckande celler (Dicer) i jämförelse med referenscellerna (mCherry). **B)** Kvantifierat proteinuttryck av omogent E-cadherin. Proteinuttrycket av omoget E-cadherin normaliserades med uttrycket av hushållsgenen Hsc70. Statistik analys utfördes med t-test. Icke-signifikanta resultat anges med ns som representerar ett p-värde $\geq 0,05$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.9 Nedtystning av Dicer påverkar inte uttrycket E-cadherin i ML-1-celler

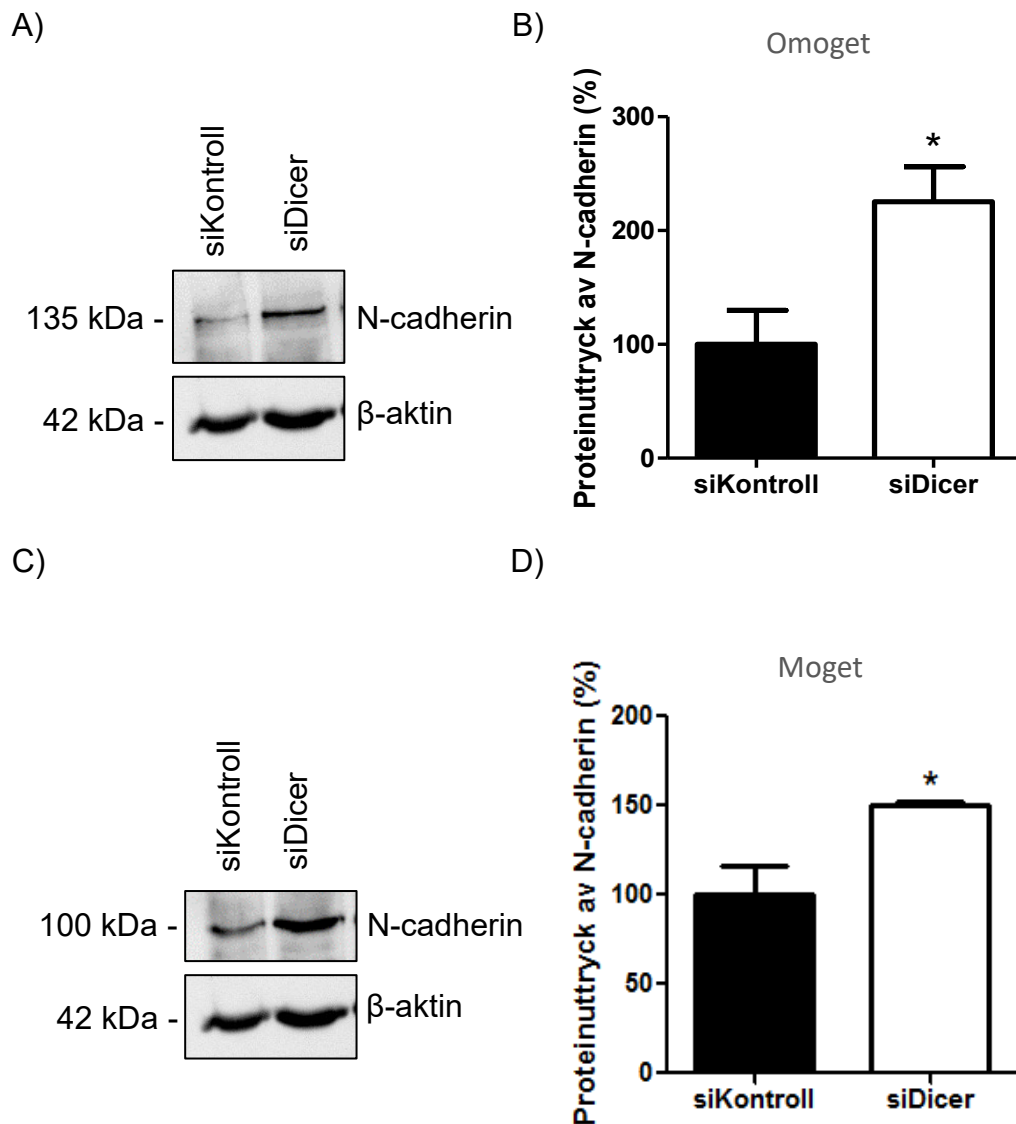
Eftersom tidigare experiment (figur 14 B och D) har påvisat att både proliferationen och migrationen är nedreglerad i Dicer-nedtystade celler var det av intresse att undersöka ifall denna nedreglering påverkas av E-cadherin. Uttrycket av E-cadherin har påvisats öka när cellerna genomgår MET, som är den omvända processen till EMT (Vuoriluoto et al., 2011). Resultaten påvisar ingen signifikant effekt på proteinuttrycket av antingen omoget eller moget E-cadherin i Dicer nedtystade celler (siDicer) i jämförelse med referenscellerna (siKontroll) (figur 19 B och D).



**Figur 19. Undersökning av uttrycket av omoget och moget E-cadherin i Dicer-
nedtystade celler.** ML-1-cellerna transfekterades med en Dicer-
nedtystande siRNA och celllysaten framställdes 48 timmar efter transfektion. **A)** Representativ immunoblott för analys av omoget E-cadherin-uttryck i Dicer-
nedtystade celler (siDicer) i jämförelse med referensceller (siKontroll). **B)** Kvantifierat proteinuttryck av omoget E-cadherin. **C)** Representativ immunoblot för analys av moget E-cadherin-
uttryck i Dicer-
nedtystade celler i jämförelse med referensceller. **D)** Kvantifierat proteinuttryck av moget E-cadherin. Proteinuttrycket av både omoget och moget E-
cadherin normaliserades med uttrycket av hushållsgenen β -aktin. Statistik analys utfördes med t-test. Icke-signifikanta resultat anges med ns som representerar ett p-
värde $\geq 0,05$. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

5.10 Nedtystning av Dicer ökar proteinuttrycket av N-cadherin i ML-1-celler

Eftersom tidigare experiment (figur 14 B och D) har påvisat att både proliferationen och migrationen är nedreglerad i Dicer-ndetystade celler var det av intresse att undersöka ifall denna nedreglering påverkas av N-cadherin. Uttrycket av N-cadherin har påvisats minska i celler som genomgår MET och öka när cellerna genomgår den motsatta processen, det vill säga EMT (Vuoriluoto et al., 2011; Iamshanova et al., 2017). Resultaten påvisar en signifikant ökning i proteinuttrycket av både omoget och moget N-cadherin i Dicer-ndetystade cellerna (siDicer) i jämförelse med referenscellerna (siKontroll) (Figur 15 B och D).



**Figur 20. Undersökning av uttrycket av omoget och moget N-cadherin i Dicer-
nedtystade celler.** ML-1-cellerna transfekterades med en Dicer-
nedtystande siRNA och celllysaten framställdes 48 timmar efter transfektion. **A)** Representativ immunoblott för analys av omoget N-cadherin i Dicer-
nedtystade celler (siDicer) i jämförelse med referenscellerna (siKontroll). **B)** Kvantifierat proteinuttryck av omoget N-cadherin. **C)** Representativ immunoblott för analys av moget N-cadherin i Dicer-
nedtystade celler i jämförelse med referenscellerna. **D)** Kvantifierat proteinuttryck av moget N-cadherin. Proteinuttrycket av både omoget och moget N-cadherin normaliserades med uttrycket av hushållsgenen β-aktin. Statistisk analys utfördes med t-test. Signifikansen anges med * som representerar ett p-värde på <0,05. Resultaten anges som medeltal + SEM (n=3).

6 Diskussion

6.1 N-thy-Ori-3-1-cellerna uttrycker kännetecknen för cancer

Vid jämförelse av Dicer-uttrycket i N-thy-Ori-3-1-, ML-1-, FTC-133- och C643-celler påvisas att proteinuttrycket av Dicer är signifikant nedreglerat i ML-1-cellerna endast i jämförelse med FTC-133-cellerna. Eftersom Dicer-uttrycket har påvisats vara nedreglerat i cancer, inklusive sköldkörtelcancer, var det av intresse att fortsätta med att undersöka ML-1-cellernas proliferation och migration i jämförelse med den normala sköldkörtelcellinjen N-thy-Ori-3-1 (Erler et al., 2014). Resultaten påvisar att den follikulära sköldkörtelcancercellinjen ML-1 har en uppreglerad proliferation och en nedreglerad migration i jämförelse med den normala sköldkörtellinjen N-thy-Ori-3-1. Proliferationsresultatet är förväntat eftersom ett av det mest grundläggande kännetecknen för cancer är att cancercellerna har en ökad proliferation i jämförelse med normala celler. Däremot är migrationsresultatet oväntat eftersom normala sköldkörtelceller borde migrera mindre samt vara mindre invasiva i jämförelse med sköldkörtelcancerceller. Därmed påvisar N-thy-Ori-3-1-cellerna ett av det mest grundläggande kännetecknen för cancer (Hanahan och Weinberg, 2000). En möjlig orsak till N-thy-Ori-3-1-cellernas förändrade karaktär kunde vara att N-thy-Ori-3-1-cellerna har erhållit en eller flera mutationer som i sin tur har gett upphov till en malign fenotyp.

Eftersom både TPO och NIS är essentiella för produktionen av sköldkörtelhormoner var det av intresse att undersöka proteinuttrycket av båda proteinerna i ML-1-celler i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna. Resultaten påvisar att ML-1-cellerna har en signifikant uppreglering i uttrycket av NIS i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna. I resultaten kan det dessutom detekteras att N-thy-Ori-3-1-cellerna har förlorat uttrycket av TPO fullständigt. Eftersom normala sköldkörtelceller borde uttrycka både TPO och NIS kan det antas att N-thy-ori-3-1-cellerna har börjar förlora karaktären för normala sköldkörtelceller och möjligen övergått till en mer dedifferentierad fenotyp. Dedifferentiering är en process där cellerna övergår från en mera differentierad fenotyp till en mindre differentierad fenotyp och processen anses också som ett viktigt kännetecken för cancer (Katoh et al., 2004; Floor et al., 2012). Detta betyder att dessa resultat är ett ytterligare stöd på antagande att N-thy-Ori-3-1-cellerna har transformerats till en mera malign fenotyp.

En annan möjlig orsak till N-thy-Ori-3-1-cellernas förändrade karaktär kunde vara att cellerna har förväxlats eller kontaminerats med sköldkörtelcancer celler som ständigt har odlats vid sidan om N-thy-Ori-3-1-cellerna. På grund av dessa resultat konstaterades det att N-thy-Ori-3-1-cellerna inte längre uppför sig som normala sköldkörtelceller vilket betyder att cellerna inte längre fungerar som en pålitlig kontrollcellinje. Till följd av detta fortsattes inte N-thy-Ori-3-1-cellernas användning i detta pro gradu-projekt. Dessutom är det värt att notera att cellinjen N-thy-Ori-3-1 är den enda normala sköldkörtelcellinjen som är tillgänglig för forskning och det finns väldigt bristfälligt data om karaktären av dessa celler.

6.2 Dicer påvisar cancerfrämjande egenskaper i ML-1-celler

I detta pro gradu-projekt transfekterades ML-1-cellerna antingen med en Dicer-överuttryckande plasmid för att skapa Dicer-överuttryckande celler eller med en Dicer-nedstytande siRNA för att skapa Dicer-nedstytade-celler. Efter att en tillräckligt effektiv transfektion erhöles med både plasmid och siRNA undersöktes påverkan av Dicer-överuttryck och nedreglering i ML-1-celler med hjälp av proliferations- och migrationsexperiment. Överuttryck av Dicer har ingen effekt på ML-1-cellernas migration samt invasion men eftersom resultaten påvisar att överuttryck av Dicer uppreglerar ML-1-cellernas proliferation, antyder det på att överuttryck av Dicer främjar ML-1-cellernas progression till en aggressivare cancerfenotyp. Dessa resultat överensstämmer med resultaten som påvisar att nedstytning av Dicer i sin tur nedreglerar ML-1-cellernas proliferation och migration. Detta antyder därmed på att nedstytning av Dicer eventuellt leder till att ML-1-cellerna övergår till en mer normalliknande fenotyp. Utgående från dessa resultat kan det konstateras att Dicer påvisar cancer främjande egenskaper i ML-1-celler. Dock är resultaten motstridiga gentemot största delen av litteraturen som antyder att Dicer fungerar som en tumörsuppressor. Uttrycket av Dicer har påvisat vara nedreglerat i sköldkörtelcancer och dessutom har det observerats att ett förminskat uttryck av Dicer korrelera med aggressivare särdrag i bland annat sköldkörtelcancer (Erler et al., 2014). En möjlig orsak till att dessa resultat är motstridiga med största del av litteraturen är att funktionen av Dicer är cellinjespecifik. Även om de flesta undersökningarna antyder på att Dicer fungerar som en tumörsuppressor, finns det även undersökningar som

stöder antagandet att Dicer har cancerfrämjande egenskaper. I en underökning gjord av Vaksman och kollegor undersöktes uttrycket av olika komponenter av RNAi-signalräckan, inklusive Dicer i olika stadier av äggstockscancer. Undersökningen påvisade att uppreglering av Dicer-uttrycket korrelerar med progressionen av äggstockscancer (Vaksman et al., 2012).

6.3 Överuttryck av Dicer minskar ML-1-cellernas uttryck av Tg

Både PTC och FTC är väl differentierade former av sköldkörtelcancer, vilket betyder att cancercellerna har bibehållit follikelcellernas karaktär, inklusive uttrycket av det sköldkörtelspecifika proteinet Tg. Icke-differentierade sköldkörtelcancerceller har däremot påvisat förlora uttrycket av till exempel Tg (Indrasena, 2017). Den follikulära sköldkörtelcancercellinjen ML-1 har dock karaktäriserats som en svagt differentierad cellinje som fortfarande utsöndrar Tg (Schönberger et al., 2000). På grund av detta var det av intresse att undersöka ifall överuttryck av Dicer påverkar proteinuttrycket av Tg i ML-1-celler.

I resultaten kan det detekteras en signifikant nedreglering av Tg-uttrycket i Dicer-överuttryckande cellerna. Eftersom ett minskat uttryck av sköldkörtelspecifika proteiner är ett kännetecken för dedifferentiering kunde resultaten antyda att överuttryck av Dicer resulterar i ML-1-cellernas dedifferentiering. Sköldkörtelcancercellernas dedifferentiering ger oftast upphov till en aggressivare fenotyp som är betydligt svårare att behandla och leder därmed till en sämre prognos (Antonelli et al. 2008). Detta resultat stöder också det tidigare antagande att Dicer har cancer främjande egenskaper i ML-1-celler.

6.4 Dicer saknar en effekt på uttrycket av NIS

Eftersom NIS har en central roll i produktionen av sköldkörtelhormoner och NIS har påvisats vara nedreglerat i sköldkörtelcancer, var det av intresse att undersöka ifall överuttryck eller nedstytning av Dicer påverkar proteinuttrycket av NIS i ML-1-celler. Resultaten påvisar ingen signifikant effekt på uttrycket av NIS vid överuttryck eller nedstytning av Dicer i ML-1-celler. Eftersom proteinuttrycket av NIS undersöktes med hjälp av western blot-analys påvisar resultaten endast mängden protein och inte var i cellen NIS lokaliserat och ifall proteinet är funktionellt. Detta betyder att även

om en signifikant skillnad i uttrycket av NIS inte kan detekteras vid överuttryck eller nedtystning av Dicer, kan det inte uteslutas att Dicer påverkar placeringen och funktionen av NIS. Flera underökningar har påvisat att i sköldkörtelcancer celler lokaliserar NIS i både det basolaterala membranet och i cytosolen, eller endast i cytosolen. När NIS förblir intracellulärt förlorar proteinet dessutom sin funktion vid produktionen av sköldkörtelhormoner (Dohan et al., 2001). På grund av detta skulle det vara intressant att undersöka, med till exempel immunhistokemisk analys ifall överuttryck eller nedreglering av Dicer påverkar placeringen av NIS i cellen. Detta skulle i sin tur ge en indikering på ifall Dicer påverkar proteinets funktion. Eftersom TSH har påvisat påverka uttrycket och placeringen av NIS i cellen skulle det dessutom vara intressant att undersöka ifall Dicer påverkar uttrycket av TSHR i ML-1-celler (Micali et al., 2014).

6.5 Nedtystning av Dicer ökar proteinuttrycket av N-cadherin

Cancer cellernas spridning och metastasering är en av de största orsakerna bakom den höga mortaliteten hos cancerpatienter. Denna spridning och metastasering är i sin tur starkt kopplat med EMT. Under EMT förlorar cellerna sin epitel-liknande fenotyp och övergår till en rörligare mesenkymal-liknande fenotyp (Virtakoivu et al., 2016). Nedregleringen av den epiteliala markören E-cadherin och uppregleringen av den mesenkymala markören N-cadherin är en av de mest grundläggande händelserna under EMT. MET är den omvända processen till EMT (Iamshanova et al., 2017).

Resultaten påvisar en signifikant nedreglering av både migration och invasion i Dicer-ndetystade celler. För att vidare undersöka ifall denna nedreglering orsakas av en Dicer-ndetystnings-medierad MET, var det av intresse att undersöka proteinuttrycket av olika EMT-markörer i Dicer-ndetystade celler. I resultaten kan det detekteras en signifikant uppreglering i både omoget och moget N-cadherin i Dicer-ndetystade celler. Eftersom N-cadherin har förknippats med en mera invasiv och aggressiv cancer fenotyp antyder resultatet på att cellerna har övergått till en ännu aggressivare cancerfenotyp till följd av Dicer-ndetystning (Breier et al., 2014). Resultatet är dock motstridigt med de tidigare observationer som påvisar att nedtystning av Dicer minskar ML-1-cellernas migration samt invasion, och antyder på att cellerna övergår till en mer normal-liknande fenotyp, alltså genomgår MET. Eftersom dessa resultat är

motstridiga skulle det i fortsättningen vara intressant att undersöka ifall nedstytning av Dicer också ökar uttrycket av EMT-markören vimentin. Likadant som N-cadherin, borde även vimentin-nivåerna öka när cellerna genomgår EMT (Iamshanova et al., 2017). Dessutom skulle det i fortsättningen vara viktigt att studera ifall överuttryck av Dicer påverkar uttrycket av N-cadherin i ML-1-celler.

6.6 Dicer saknar en effekt på uttrycket av E-cadherin

E-cadherin är en annan EMT-markör vars uttryck undersöktes i både Dicer-nedstytade- och Dicer-överuttryckande-celler. Resultaten påvisar att varken nedstytning eller överuttryck av Dicer har en effekt på proteinuttrycket av EMT-markören E-cadherin. Enligt litteraturen var det förväntat att ifall cellerna genomgår EMT är proteinuttrycket av E-cadherin nedreglerat medan om cellerna genomgår MET är proteinuttrycket av E-cadherin uppreglerat (Iamshanova et al., 2017). En möjlig orsak till varför överuttryck eller nedreglering av Dicer inte påverkar uttrycket av E-cadherin kunde vara att effekten inte ännu kan detekteras efter 48 timmar i ML-1-celler. Det skulle därmed vara intressant att undersöka ifall en effekt på E-cadherin kunde detekteras om celllysaten skulle framställas 72 timmar efter transfektion, istället för 48 timmar.

6.7 Slutsatser och fortsatt forskning

Målet med detta pro gradu-projekt var att undersöka ifall överuttryck eller nedstytning av Dicer har en påverkan på normala sköldkörtelceller (N-thy-Ori-3-1-celler) och follikulära sköldkörtelcancer-celler (ML-1-celler). För att uppnå målet påbörjades projektet med att undersöka ifall det finns en skillnad i ML-1-cellernas förmåga till proliferation samt migration i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna. Resultaten påvisar att ML-1-cellerna har en ökad förmåga till proliferation i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna. Dock påvisar ML-1-cellerna en minskad förmåga till migration samt invasion i jämförelse med N-thy-Ori-3-1-cellerna. N-thy-Ori-3-1-cellernas ökade migration samt invasion antyder på att cellerna har transformerats till en malign fenotyp. Ett ytterligare stöd på antagande är att resultaten påvisar att N-thy-Ori-3-1-cellerna har ett minskat uttryck av NIS och förlorat uttrycket av TPO fullständigt. Eftersom resultaten indikerar på att N-thy-Ori-3-1-cellerna inte fysiologiskt uppför sig som normala sköldkörtelceller utfördes alla de fortsatta experimenten med endast ML-

1-celler. Projektet fortsattes med att undersöka om överuttryck eller nedreglering av Dicer påverkar ML-1-cellernas proliferation samt migration. Resultaten visar att överuttryck av Dicer ökar ML-1-cellernas proliferation, medan nedstängning av Dicer minskar ML-1-cellernas proliferation samt migration. Syftet med projektet var också att undersöka ifall Dicer påverkar uttrycket av olika sköldkörtelspecifika proteiner samt uttrycket av mesenkymala-markörer i ML-1-celler. När Dicer-överuttrycks minskar uttrycket av sköldkörtelspecifika proteinet Tg, medan när Dicer nedstängs ökar uttrycket av EMT-markören N-cadherin i ML-1-celler.

Avslutningsvis kan det konstateras att dessa resultat antyder på att N-thy-Ori-3-1-cellerna inte längre kan karakteriseras som normala sköldkörtelceller eftersom cellerna påvisar flera kännetecken för cancer. Dessutom kan det konstateras att största delen av resultaten antyder på att överuttryck av Dicer resulterar i en aggressivare fenotyp, medan nedstängning av Dicer resulterar i en mera normal-liknande fenotyp i ML-1-celler.

I fortsättningen skulle det vara intressant att vidare undersöka ifall Dicer påverkar uttrycket av EMT-markörerna E- och N-cadherin samt uttrycket av sköldkörtelspecifika proteinerna Tg och NIS på mRNA-nivå i ML-1-celler. mRNA-uttrycket kan exempelvis undersökas med hjälp av kvantitativ omvänt transkriptas-polymeraskedjereaktion (eng. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR). Dessutom skulle det vara intressant att utföra samma experiment som utfördes i detta pro gradu-projekt men med en annan sköldkörtelcancerlinje. Experimenten kunde exempelvis utföras med FTC-133-celler som i likhet med ML-1-celler är follikulära sköldkörtelcancerceller men uttrycker höga nivåer av Dicer. Eftersom Dicer är involverad i produktionen av moget miRNA kunde man även i framtiden undersökas ifall överuttryck eller nedstängning av Dicer i ML-1-celler respektive normal sköldkörtelceller påverkar mängden av specifika miRNA:er.

7 Tillkännagivande

Först och främst vill jag tacka professor Kid Törnquist för möjligheten att få arbeta i en intressant forskningsgrupp. Dessutom vill jag tack honom för en god handledning under hela mitt pro gradu-projekt. Jag vill även tacka mina nuvarande kollegor Muhammad Yasir Ashgar och Ilari Pulli för att de alltid haft tid att hjälpa mig i mitt labbarbete samt i skrivandet av denna avhandling. Dessutom vill jag tacka mina före detta kollegor Kati Kemppainen och Emilia Holm. Även om de inte längre arbetar i samma forskningsgrupp som jag har de alltid tid och tålamod med mina oändliga frågor.

Dessutom vill jag tacka mina studievänner Sandra, Vilma, Helena, Emma och Niklas som gjort mina fem år i Åbo oförglömliga. Med dem har jag fått både skratta och gråta, men allra viktigaste av allt, vara helt mig själv. Jag vill även tacka min vän Jenny som alltid är ett bra sällskap och som påminner mig om att det också finns ett liv utanför studierna. Ett särskilt tack vill jag också ge min pojkvän Nicolas som har både hjälpt mig att orka igenom denna skrivprocess och stött mig när stressen nästan tagit över.

Lopuksi haluan vielä kiittää Inkeri mummia, joka on aina tukenut ja kannustanut minua eteenpäin. Ilman mummin tukea en olisi tähän pystynyt.

8 Litteraturförteckning

- Antonelli, A., Fallahi, P., Ferrari, S. M., Carpi, A., Berti, P., Materazzi, G., ... Miccoli, P. (2008). Dedifferentiated thyroid cancer: A therapeutic challenge. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(8), 559–563.
- Armengol, M. P., Juan, M., Lucas-Martín, A., Fernández-Figueras, M. T., Jaraquemada, D., Gallart, T., & Pujol-Borrell, R. (2001). Thyroid Autoimmune Disease: Demonstration of Thyroid Antigen-Specific B Cells and Recombination-Activating Gene Expression in Chemokine-Containing Active Intrathyroidal Germinal Centers. *The American Journal of Pathology*, 159(3), 861–873.
- Breier, G., Grosser, M., & Rezaei, M. (2014). Endothelial cadherins in cancer. *Cell and Tissue Research*, 355(3), 523–527.
- Caillou, B., Troalen, F., Baudin, E., Talbot, M., Filetti, S., Schlumberger, M., & Bidart, J.-M. (1998). Na⁺/I⁻ Symporter Distribution in Human Thyroid Tissues: An Immunohistochemical Study¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(11), 4102–4106.
- Chiosea, S., Jelezcova, E., Chandran, U., Acquafondata, M., McHale, T., Sobol, R. W., & Dhir, R. (2006). Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 169(5), 1812–1820.
- Czarnocka, B., Pastuszko, D., Janota-Bzowski, M., Weetman, A. P., Watson, P. F., Kemp, E. H., ... Lange, D. (2001). Is there loss or qualitative changes in the expression of thyroid peroxidase protein in thyroid epithelial cancer? *British Journal of Cancer*, 85(6), 875–880.
- de Kock, L., Sabbaghian, N., Soglio, D. B.-D., Guillerman, R. P., Park, B.-K., Chami, R., ... Foulkes, W. D. (2014). Exploring the Association Between DICER1 Mutations and Differentiated Thyroid Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(6), E1072–E1077.
- Dohan, O. (2001). RAPID COMMUNICATION: Predominant Intracellular Overexpression of the Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) in a Large Sampling of Thyroid Cancer Cases. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(6), 2697–2700.
- Erlor, P., Keutgen, X. M., Crowley, M. J., Zetoune, T., Kundel, A., Kleiman, D., ... Fahey, T. J. (2014). Dicer expression and microRNA dysregulation associate with aggressive features in thyroid cancer. *Surgery*, 156(6), 1342–50; discussion 1350.
- Fagin, J. A., Wells, S. A., & Jr. (2016). Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 375(11), 1054–1067.

- Fernández-Martínez, L., Villegas, J. A., Santamaría, Í., Pitiot, A. S., Alvarado, M. G., Fernández, S., ... Balbín, M. (2017). Identification of somatic and germ-line DICER1 mutations in pleuropulmonary blastoma, cystic nephroma and rhabdomyosarcoma tumors within a DICER1 syndrome pedigree. *BMC Cancer*, 17(1), 146.
- Floor, S. L., Dumont, J. E., Maenhaut, C., & Raspe, E. (2012). Hallmarks of cancer: Of all cancer cells, all the time? *Trends in Molecular Medicine*, 18(9), 509–515.
- Foulkes, W. D., Priest, J. R., & Duchaine, T. F. (2014). DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 14(10), 662–672.
- Frezzetti, D., Reale, C., Cali, G., Nitsch, L., Fagman, H., Nilsson, O., ... Di Lauro, R. (2011). The microRNA-processing enzyme Dicer is essential for thyroid function. *PloS One*, 6(11), e27648.
- Fuziwara, C. S., & Kimura, E. T. (2017). MicroRNAs in thyroid development, function and tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 456, 44–50.
- Ha, M., & Kim, V., (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Helfand, B. T., Mendez, M. G., Murthy, S. N. P., Shumaker, D. K., Grin, B., Mahammad, S., ... Goldman, R. D. (2011). Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Molecular Biology of the Cell*, 22(8), 1274–1289.
- Iamshanova, O., Fiorio Pla, A., & Prevarskaya, N. (2017). Molecular mechanisms of tumour invasion: regulation by calcium signals. *The Journal of Physiology*, 595(10), 3063–3075.
- Indrasena, B. S. H. (2017). Use of thyroglobulin as a tumour marker. *World Journal of Biological Chemistry*, 8(1), 81–85.
- Ivanov, D. B., Philippova, M. P., & Tkachuk, V. A. (2001). Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry*, 66(10), 1174–1186.
- Ivaska, J., Pallari, H.-M., Nevo, J., & Eriksson, J. E. (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2050–2062.
- Jin, J., Phitayakorn, R., Wilhelm, S. M., & McHenry, C. R. (2013). Advances in management of thyroid cancer. *Current Problems in Surgery*, 50(6), 241–289.
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of Visualized Experiments*, (88), e51046.

- Katoh, M., Shaw, C., Xu, Q., Van Driessche, N., Morio, T., Kuwayama, H., ... Shaulsky, G. (2004). An orderly retreat: Dedifferentiation is a regulated process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7005–7010.
- Khoshnaw, S. M., Rakha, E. A., Abdel-Fatah, T. M., Nolan, C. C., Hodi, Z., Macmillan, D. R., ... Green, A. R. (2012). Loss of Dicer expression is associated with breast cancer progression and recurrence. *Breast Cancer Research and Treatment*, 135(2), 403–413.
- Kidd, M. E., Shumaker, D. K., & Ridge, K. M. (2014). The Role of Vimentin Intermediate Filaments in the Progression of Lung Cancer. *American Journals of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(1), 1–6.
- Kondo, T., Ezzat, S., & Asa, S. L. (2006). Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 292–306.
- Lau, P.-W., Guiley, K. Z., De, N., Potter, C. S., Carragher, B., & MacRae, I. J. (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(4), 436–440.
- Le Fourn, V., Ferrand, M., & Franc, J.-L. (2004). Differential expression of thyroperoxidase mRNA splice variants in human thyroid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1689(2), 134–141.
- Lin, J.-D. (2008). Thyroglobulin and human thyroid cancer. *Clinica Chimica Acta*, 388(1–2), 15–21.
- Liu, Z., & Xing, M. (2012). Induction of Sodium/Iodide Symporter (NIS) Expression and Radioiodine Uptake in Non-Thyroid Cancer Cells. *PLoS ONE*, 7(2), e31729.
- Micali, S., Bulotta, S., Puppini, C., Territo, A., Navarra, M., Bianchi, G., ... Russo, D. (2014). Sodium iodide symporter (NIS) in extrathyroidal malignancies: focus on breast and urological cancer. *BMC Cancer*, 14(1), 303.
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), 117–134.
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., & Brent, G. A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews*, 94(2), 355–382.
- Pohlenz, J., & Refetoff, S. (1999). Mutations in the sodium/iodide symporter (NIS) gene as a cause for iodide transport defects and congenital hypothyroidism. *Biochimie*, 81(5), 469–476.
- Rahbari, R., Zhang, L., & Kebebew, E. (2010). Thyroid cancer gender disparity. *Future Oncology (London, England)*, 6(11), 1771–1779.

- Rio Frio, T., Bahubeshi, A., Kanellopoulou, C., Hamel, N., Niedziela, M., Sabbaghian, N., ... Tischkowitz, M. (2011). DICER1 mutations in familial multinodular goiter with and without ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *The Journal of the American Medical Association*, 305(1), 68–77.
- Rodriguez, W., Jin, L., Janssens, V., Pierreux, C., Hick, A.-C., Urizar, E., & Costagliola, S. (2012). Deletion of the RNaseIII Enzyme Dicer in Thyroid Follicular Cells Causes Hypothyroidism with Signs of Neoplastic Alterations. *PLoS ONE*, 7(1), e29929.
- Ruf, J., & Carayon, P. (2006). Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 445(2), 269–277.
- Sand, O., Sjaastad Ø. V., Haug, E., Bjålie, J. G. (2006). *Människokroppen: Fysiologi och Anatomi*. 2 uppl. Stockholm: Liber, kap 6, 196–197.
- Sawh, A. N., & Duchaine, T. F. (2012). Turning Dicer on its head. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(4), 365–366.
- Schultz, K. A. P., Pacheco, M. C., Yang, J., Williams, G. M., Messinger, Y., Hill, D. A., ... Priest, J. R. (2011). Ovarian sex cord-stromal tumors, pleuropulmonary blastoma and DICER1 mutations: a report from the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *Gynecologic Oncology*, 122(2), 246–250.
- Schönberger, J., Eilles, C, Bauer, J., Weber, G., Chahoud, I., Grimm, D, ... Grimm, D. (2000). ORIGINAL ARTICLE Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1. *Journal of Molecular Medicine*, 78, 102–110.
- Segev, D. L., Umbricht, C., & Zeiger, M. A. (2003). Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surgical Oncology*, 12(2), 69–90.
- Slowinska-Klencka, D., Sporny, S., Stasikowska-Kanicka, O., Popowicz, B., & Klencki, M. (2012). E-cadherin expression is more associated with histopathological type of thyroid cancer than with the metastatic potential of tumors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(4), 509–515.
- Song, M.-S., & Rossi, J. J. (2017). Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *The Biochemical Journal*, 474(10), 1603–1618.
- Spitzweg, C., Harrington, K. J., Pinke, L. A., Vile, R. G., & Morris, J. C. (2001). The Sodium Iodide Symporter and Its Potential Role in Cancer Therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(7), 3327–3335.
- Targovnik, H. M., Citterio, C. E., & Rivolta, C. M. (2017). Iodide handling disorders (NIS, TPO, TG, IYD). *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(2), 195–212.

- Tian, Y., Simanshu, D. K., Ma, J.-B., Park, J.-E., Heo, I., Kim, V. N., & Patel, D. J. (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Molecular Cell*, 53(4), 606–616.
- Vaksman, O., Hetland, T. E., Trope', C. G., Reich, R., & Davidson, B. (2012). Argonaute, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression in serous ovarian carcinoma. *Human Pathology*, 43(11), 2062–2069.
- Virtakoivu, R., Mai, A., Mattila, E., De Franceschi, N., Imanishi, S. Y., Corthals, G., ... Ivaska, J. (2015). Vimentin-ERK Signaling Uncouples Slug Gene Regulatory Function. *Cancer Research*, 75(11), 2349–2362.
- Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J.-P., Nevo, J., Gjerdrum, C., ... Ivaska, J. (2011). Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*, 30(12), 1436–1448.
- Wu, M., Sabbaghian, N., Xu, B., Addidou-Kalucki, S., Bernard, C., Zou, D., ... Foulkes, W. (2013). Biallelic DICER1 mutations occur in Wilms tumours. *The Journal of Pathology*, 230(2), 154–164.

Bilaga 1: Kemikalier och ämnen

Kemikalier

Akrylamid 30 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
APS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromfenolblå	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatriumvätefosfat (Na_2HPO_4)	J. T. Baker, Deventer, Holland
DMEM medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Etylendiamintetra-acetylsyra (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetalkalvserum	Gibco, Grand Island, NY, USA
Fettfrimjölkpulver	Valio, Helsingfors, Finland
Glycerol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kaliumdivätefosfat (KH_2PO_4)	Riedel-de Haën, Seelze, Tyskland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumklorid (KCl)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Kollagen IV	BD, Biosciences, San Jose, CA, USA
Kristallviolett	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
β -merkaptoetanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Metanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mitomycin C	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumazid (NaN_3)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumklorid (NaCl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Opti-MEM	Gibco, Grand Island, NY, USA
Page Ruler Plus prestained protein ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Grand Island, NY, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640 medium	Lonza Bioscience, Basel, Switzerland
Scintillationsvätska	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Triklorättiksyra (TCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TEMED	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TRIZMA ® bas	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Gibco, Grand Island, NY, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

³ H-tymidin	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Western lightning plus-ECL-kit	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

Plasmider

mCherry (#41583)	Addgene, Cambridge, MA, USA
Dicer plasmid (#41584)	Addgene, Cambridge, MA, USA

siRNA

siKontroll	Eurofins Genomics, Tyskland
siDicer	Eurofins Genomics, Tyskland

Primära antikroppar

get anti-natrium/jodid-symporter	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
get anti-tyreoglobulin	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
kanin anti-Dicer	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
kanin anti-E-cadherin	Abcam (Cambridge, England)
kanin anti-N-cadherin	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
kanin anti- β -aktin	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
mus anti-tyreoperoxidas	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
råtta anti-Hsc70	Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)

Sekundära antikroppar

HRP-konjugerad anti-mus	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
HRP-konjugerad anti-råtta	Cell Signaling Technology (Denver, MA, USA)
HRP-konjugerad get-anti-kanin	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)
HRP-konjugerad åsna-anti-get	Promega (Madison, WI, USA)

Bilaga 2: Recept

10 x TBS

- Trisbas 200 mM
- NaCl 1,5 M
- pH justerades till 7,5

10 x PBS

- NaCl 137 mM
- KCl 27 mM
- KH_2PO_4 15 mM
- Na_2HPO_4 80 mM
- Volymen justerades till 1 l med MQ-vatten
- pH justerades till 7,4

10 x SDS-PAGE-körbuffert

- Tris-base 30 g
- Glycin 144 g
- SDS 5 g
- H_2O 1 l
- pH justerades till 8,5

Överförningsbuffert

- Tris 6 g
- Glycin 28,8 g
- Metanol 400 ml
- Volymen justerades till 2 l med MQ-vatten

3 x Laemmlibuffert (50 ml)

- Glycerol 15 ml
- SDS (10 %) 13 ml
- Tris-HCl (0,625M, pH 6,8) 15 ml
- Bromfenolblå (0,15 %) 5,0 ml
- B-merkaptoetanol 1,5 ml
- H_2O 0,5 ml

SDS-polyakrylamidgel

Undre gel (10 %, 30 ml)

- H_2O 11,9 ml
- 30 % akrylamid 10,0 ml
- 1,5 M Tris (pH 8,8) 7,5 ml
- 10 % SDS 0,3 ml
- 10 % APS 0,3 ml
- TEMED 0,012 ml

Övre gel (4 %, 10 ml)

- H₂O 6,8 ml
- 30 % akrylamid 1,7 ml
- 1,0 M Tris (pH 6,8) 1,25 ml
- 10 % SDS 0,1 ml
- 10 % APS 0,1 ml
- TEMED 0,01 ml

Odlingsmedium för N-thy-Ori-3-1-cellerna

- RPMI 1640 medium 500 ml
- FBS (10 %) 50 ml
- L-glutamin 5 ml
- Penicillin/Streptomycin 2,5 ml

Odlingsmedium för ML-1-cellerna

- DMEM medium 500 ml
- FBS (10 %) 50 ml
- Penicillin/Streptomycin 2,5 ml (100 U/ml)

0,02 % EDTA i PBS + trypsin (100 ml)

- 0,5 % EDTA 400 µl
- PBS 99,6 ml
- Trypsin 4 ml

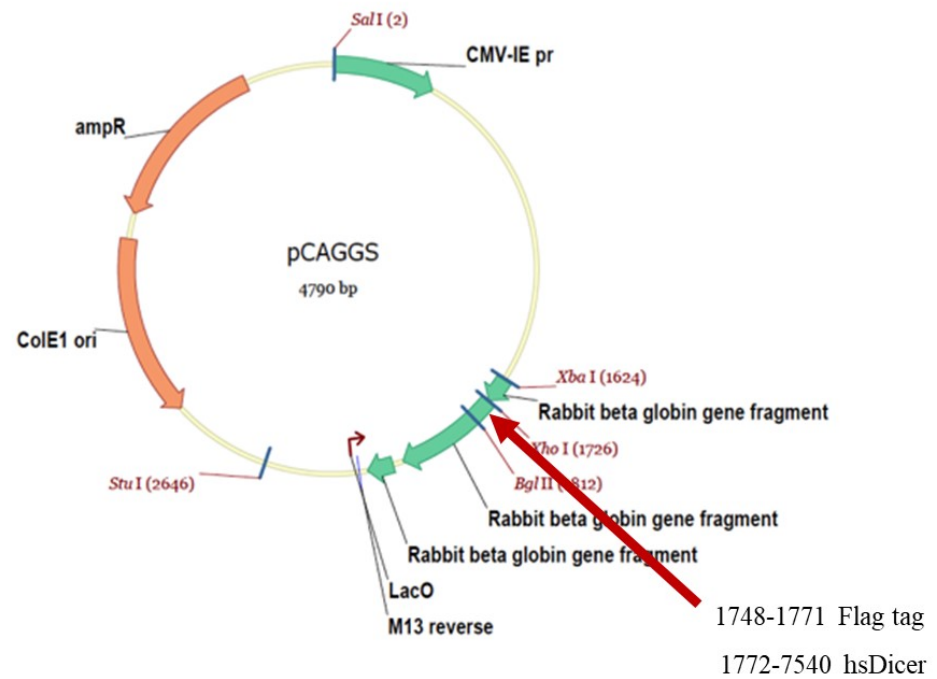
1 % BSA i PBS + 0,02 % NaN₃ (50 ml)

- PBS 49,9 ml
- BSA 0,5 g
- NaN₃ (10 %) 100 µl

1 x TBST

- 10 x TBST 100 ml
- H₂O 900 ml
- Tween 20 1 ml

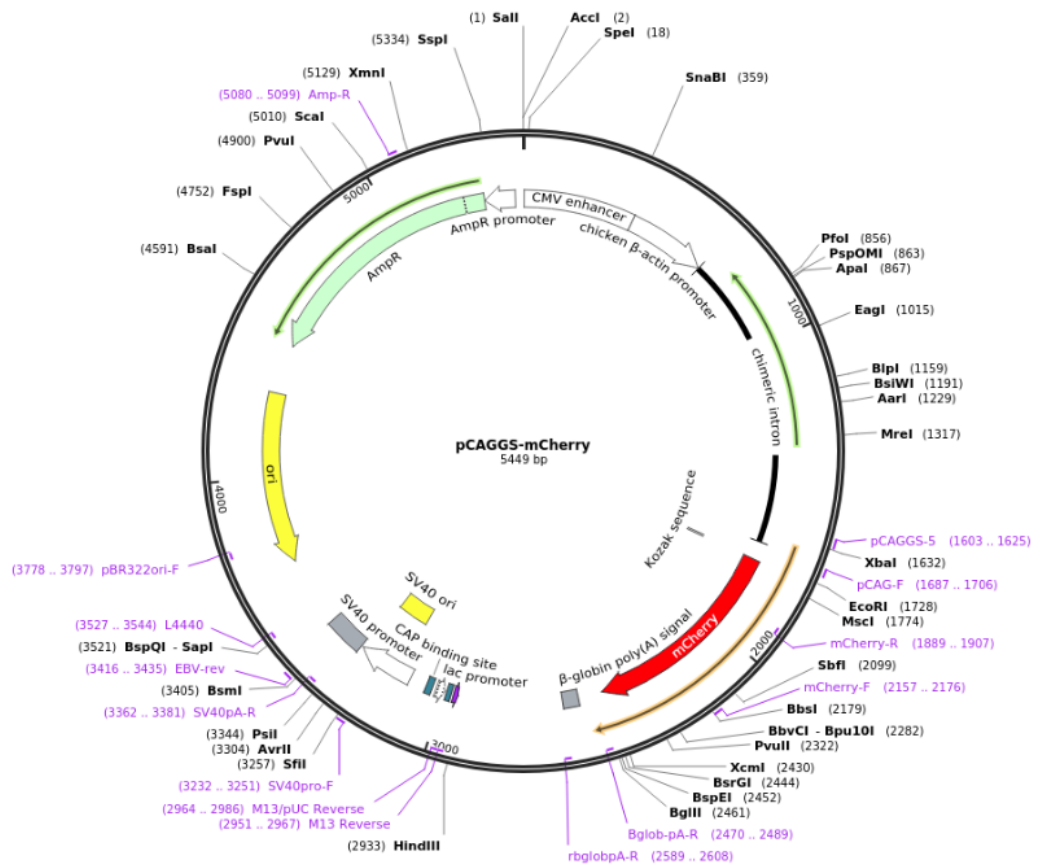
Bilaga 3: Plasmidkarta på pCAGGS-Flag-hsDicer



Strukturen av en tom vektor (pCAGGS) med införd flag tag samt hsDicer gen

Plasmidkartan modifierad från: <http://www.addgene.org/41584/> 30.10.2018

Bilaga 4: Plasmidkarta på pCAGGS-mCherry



Strukturen av en tom vektor (pCAGGS) med införd mCherry gen

Plasmidkartan från: <http://www.addgene.org/41583/> 30.10.2018