



## **Notch-ligandi Jagged1 suojaa DNA:n eheyttä**

Pro Gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Molekyylibiotieteet, Solubiologia

Huhtikuu 2023

Ciia Haikarainen

Turun yliopiston laatujaarjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

CIIA HAIKARAINEN: Notch-ligandi Jagged1 suojaa DNA:n eheyttä

Pro gradu -tutkielma, 55 s.

Solubiologia

Huhtikuu 2023

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check-järjestelmällä.

---

Rintasyöpä on maailmanlaajuisesti naisten yleisin syöpätyyppi. Syövän tunnusmerkkejä ovat muun muassa kasvanut DNA-vaurioiden määrä sekä muutokset solujen normaalissa kasvussa ja ohjelmoidussa solukuolemassa. Osana Notch-soluviestintää Jagged1 osallistuu soluissa edellä mainittuihin prosesseihin. Jagged1:n korkea ilmentyminen on liitetty aggressiivisiin, huonon ennusteen rintasyöpiin, mikä tekee Jagged1:stä mielenkiintoisen ja potentiaalisen kohteen tulevaisuudessa kohdennettumille syöpähoidoille.

Erikoistyön tavoitteena oli selvittää Jagged1:n vaikutus DNA:n eheyden suojaamiseen replikaatiostressin ja mitoosin aikana. DNA-vaurioita tutkittiin MDA-MB-231-rintasyöpäsoluissa, joista käytössä oli villityyppi (WT) sekä Jagged1-hiljennetty (Jag1KO) solulinja. Soluihin aiheutettiin replikaatiostressiä hydroksiureakäsittelyllä, ja sen vaikutusta soluihin seurattiin hyödyntämällä Western blot -menetelmää sekä immunofluoresenssivärjäystä. Lisäksi tutkimuksessa selvitettiin, onko Jagged1:n puuttumisella vaikutus mitooseen. Osana projektia oli myös immunosaostuksen avulla varmistaa mitoottisista ihmisen alkion munuaissoluista (engl. human embryonic kidney cells, HEK; soluissa Jagged1 yli-ilmennetty) massaspektrometrialla saatu tulos Jagged1:n proteiini-proteiinivuorovaikutuksesta p53:n kanssa

Jag1KO-soluissa havaittiin alentunut replikaatiostressivaste. Jag1KO-soluissa havaittiin enemmän katkoksia DNA:n kaksoisäikeessä verrattaessa WT-soluihin eli Jagged1:n puuttuminen aiheutti soluihin DNA-vaurioita. Proliferaatiokokeessa nähtiin myös, että Jag1KO-solut jakautuivat hitaammin kuin WT-solut. Tämän lisäksi Jag1KO-soluissa mitoosi oli hitaampaa. Massaspektrometriasta saatu tulos Jagged1:n ja p53:n välisestä vuorovaikutuksesta mitoottisissa HEK-soluissa saatiin varmennettua.

Avainsanat: Jagged1, DNA:n eheys, DNA-vaurio, Mitoosi

*Kiitos Cecilia Sahlgrenille mahdollisuudesta työskennellä tämän projektin parissa. Iso kiitos ohjauksesta ja tuesta projektin aikana myös ohjaajilleni Marjaana Parikaiselle ja Emma Suhoselle sekä koko Cell fate -ryhmälle kaikesta avusta ja hauskoista hetkistä.*

# Sisälllys

LYHENTEET .....	1
1. Johdanto .....	3
2. Rintasyöpä.....	3
2.1 Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä .....	4
2.2 Syövän kantasolut rintasyövässä .....	5
3. Genomin epävakaas rintasyövässä.....	6
3.1 Geneettiset poikkeavuudet, jotka edistävät genomin epävakaas rintasyövässä .....	7
3.1.1 p53.....	8
4. Notch .....	8
4.1 Notch-signaointi.....	9
5. Jagged1 .....	11
5.1 Jagged1:n rakenne .....	12
5.2 Jagged1 rintasyövässä .....	13
5.2.1 Jagged1 ja kolmoisnegatiivinen rintasyöpä .....	15
5.3 Jagged1 rintasyövän hoidossa .....	15
6. DNA-vauriot.....	16
6.1 Replikaatiostressi .....	16
7. DNA-vauriovaste .....	17
7.1 DNA-vauriovaste mitoosin aikana .....	19
7.2 DNA-vauriovaste ja Notch .....	20
8. Tutkimuksen tavoitteet.....	22
9. Materiaalit ja menetelmät.....	23
9.1 Soluviljely.....	23
9.2 Proliferaatiokoe .....	23
9.3 Hydroksiureakäsittely .....	24
9.4 siRNA-hiljennys.....	24
9.5 Western blot .....	24
9.6 Proteiini-proteiinivuorovaikutus .....	26
9.6.1 Solusyklin synkronisointi .....	26
9.6.2 Immunosuostus .....	26
9.7 Mitoosikoe.....	27
9.8 Immunofluoresenssivärjäys.....	28
9.9 Kuvien käsittely ja tulosten analysointi .....	28
10. Tulokset.....	30

<b>10.1 Jagged1:n korkea ilmentyminen huonontaa selviämisenustetta kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä.....</b>	<b>30</b>
<b>10.2 Jagged1:n puuttuminen johtaa alentuneeseen replikaatiostressivasteeseen .....</b>	<b>31</b>
<b>10.3 Jagged1:n puuttuminen lisää DNA-vaurioiden määrää.....</b>	<b>34</b>
<b>10.4 Jag1KO-solut kasvavat hitaammin .....</b>	<b>35</b>
<b>10.5 Jag1KO-solujen mitoosi etenee hitaammin.....</b>	<b>37</b>
<b>10.6 Jagged1 on vuorovaikutuksessa p53:n kanssa mitoottisissa HEK-soluissa .....</b>	<b>38</b>
<b>11. Tulosten tarkastelu .....</b>	<b>40</b>
<b>11.1 Jagged1 suojaa DNA:n eheyttä .....</b>	<b>40</b>
<b>11.2 Jag1KO-solujen jakautuminen ja mitoosin eteneminen on hitaampaa .....</b>	<b>41</b>
<b>11.3. Jagged1 on vuorovaikutuksessa p53:n kanssa mitoottisissa HEK-soluissa.....</b>	<b>42</b>
<b>12. Yhteenveto .....</b>	<b>45</b>
<b>13. Lähteet.....</b>	<b>46</b>

## LYHENTEET

ATM	Ataksia-telangiektasia mutatoitunut, engl. ataxia-telangiectasia mutated
ATR	Ataksia-telangiektasia ja Rad3:n liittyvä, engl. ataxia-telangiectasia and Rad3-related
ATRIP	ATR-interaktioproteiini
BSA	naudan seerumin albumiini, engl. bovine serum albumin
CIN	kromosomaalinen epästabiilius, engl. chromosomal instability
CSL	transkriptiotekijä, engl. CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
DDR	DNA-vauriovaste, engl. DNA damage response
DNA	deoksiribonukleiinihappo, engl. deoxyribonucleic acid
dNTP	deoksinukleosiditriposfaatti, engl. deoxynucleoside triphosphate
ECL	tehostettu kemiluminesenssi, engl. enhanced chemiluminescence
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo, engl. ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermaalinen kasvutekijä, engl. epidermal growth factor
EMT	epiteelimesenkyymisiirtymä
ER	estrogeenireseptori
FBS	naudan sikiön seerumi, engl. fetal bovine serum
H2AX	histonivariantti
H3	histonivariantti
HEK	ihmisen alkion munuaissolu, engl. human embryonic kidney cell
HER2	ihmisen epidermaalinen kasvutekijäreseptori 2, engl. human epidermal growth factor receptor 2
HU	hydroksiurea
JAG1	Jagged1
Jag1KO	Jagged1-poistogeeninen
MAML	Mastermind-kaltainen, engl. Mastermind-like
MIN	Mikrosatelliittiepästabiilius, engl. microsatellite instability
MRN	MRE-RAD50-NBS1-kompleksi

NECD	Notch solun ulkopuolinen domeeni, engl. Notch extracellular domain
NICD	Notch solun sisäinen domeeni, engl. Notch intracellular domain
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos, engl. phosphate buffered saline
PDZ	PSD-95/Dlg/ZO-1-ligandi
PR	progesteronireseptori
RNA	ribonukleiinihappo, engl. ribonucleic acid
RPA	replikaatioproteiini A
SAC	tumasukkulan muodostumisen tarkastuspiste, engl. spindle assembly checkpoint
SDS	natriumdodekyylisulfaatti, engl. sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi, engl. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	keskiarvon keskivirhe, engl. standard error of the mean
siRNA	pienet interferoivat RNA-molekyylit, engl. small interfering RNA molecules
WT	villityyppi, engl. wildtype



## 1. Johdanto

## 2. Rintasyöpä

Rintasyöpä on nykyään maailmanlaajuisesti yleisin syöpä sen jälkeen, kun naisten rintasyöpä ohitti keuhkosityövän ilmaantuvuudessa ensimmäistä kertaa vuoden 2020 tilastoissa tarkasteltaessa molempia sukupuolia. Vuonna 2020 rintasyöpään sairastuneita arvioitiin olevan noin 2,3 miljoonaa uutta tapausta maailmanlaajuisesti. Tämä määrä sairastuneita vastaa 11,7 % kaikista uusista diagnosoiduista syöpätapauksista. Samana vuonna rintasyöpään kuolleiden määrä arvioitiin olevan noin 685 000 ihmistä, mikä teki siitä viidenneksi tappavimman syövän. (Sung ja muut 2021.) Rintasyöpädiagnoosien määrän nousuun on vaikuttanut maailmanlaajuisesti yleistynyt mammografiaseulonta sekä väestön vanheneminen (Hong ja Xu 2022). Rintasyövän tiedetään myös olevan perinnöllinen sairaus, mutta perinnölliset rintasyövät kattavat kuitenkin vain noin 5-10 % kaikista rintasyöpätapauksista (Yamauchi ja Takei 2018). Erityisesti länsimaissa rintasyöpäkuolleisuus on kuitenkin viime vuosina laskenut uusien tehokkaampien hoitomuotojen sekä varhaisessa vaiheessa tehtyjen diagnoosien ansiosta. Varhaisessa vaiheessa diagnosoitu rintasyöpä onkin usein täysin hoidettavissa (Hong ja Xu 2022).

Rintasyöpä ei ole yksi ja sama sairaus kaikilla, vaan eri rintasyövät eroavat toisistaan merkittävästi niin molekulaarisesti, histologisesti kuin myös selviämisenusteen osalta. Näin ollen rintasyövän hoidossa käytetään monia eri hoitomuotoja leikkaus- ja sädehoidoista aina vasta-aineita ja erilaisia inhibiittoreita hyödyntäviin kohdennettuihin hoitoihin. Yksilöidyt hoitomuodot ovatkin paljon käytettyjä rintasyövässä ja tärkeimpinä tekijöinä hoidon suunnittelussa pidetään kasvaimen kokoa, sen laatua ja sitä, onko syöpä jo levinnyt imusolmukkeisiin. (Barzaman ja muut 2020.)

Rintasyöpä voidaan myös jakaa alatyyppeihin useilla eri menetelmillä. Yksi hyvin yleisesti käytetty tapa luokitella on jakaa rintasyövät kolmeen eri alatyyppiin immunohistokemistisin perustein. Ensimmäinen tyyppi on rintasyöpä, joka ilmentää hormonireseptoria estrogeenille (engl. estrogen receptor, ER<sup>+</sup>) tai progesteronille (engl. progesterone receptor, PR<sup>+</sup>). Toinen tyyppi on rintasyöpä, joka ilmentää ihmisen epidermaalista kasvutekijäreseptoria 2 (engl. human

epidermal growth factor receptor 2, HER2<sup>+</sup>). Kolmas rintasyöpätyyppi on kolmoisnegatiivinen rintasyöpä, joka ei ilmennä mitään edellä mainituista reseptoreista, eli se on ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup> ja HER2<sup>-</sup>. (Barzaman ja muut 2020.) On myös arveltu, että kasvain saattaa usein olla muodostunut useasta eri alatyypistä ominaisuuksiltaan edustavasta solutyypistä. Rintasyöpäkasvaimet ovat usein heterogeenisiä ja syövän kantasolut on yhdistetty vahvasti rintasyöpään, mikä voisi mahdollistaa sen, että kasvaimen sisällä on näistä kantasoluista erilaistuneita toisistaan eroavia soluja, jotka yhdessä muodostavat kasvaimen. (Yeo ja Guan 2017.) Tämän takia pelkästään tämä tapa luokitella eri alatyyppejä ei välttämättä anna parasta tietoa kasvaimesta.

Yksi erityisesti tutkimuksen yhteydessä käytetty luokittelutapa on PAM50, joka tunnistaa molekulaariset erot perustuen 50 eri geenin ilmentymiseen. 50 geenin todettiin olevan minimimäärä molekyylytysin luotettavaan tunnistamiseen. Parhaan tarkkuuden molekyylytysin tunnistamiseen antavat geenit (n. 93 %) valittiin lopulta yli 1900 tutkitun geenin joukosta. (Parker ja muut 2009.)

## **2.1 Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä**

Muihin alatyyppeihin verrattaessa kolmoisnegatiivinen rintasyöpä on aggressiivisempi ja sen ennuste on huonompi ja kuolleisuus korkeampaa. Lisäksi kolmoisnegatiivinen rintasyöpä tekee herkästi kaukaisia etäpesäkkeitä, melkein puolissa kaikista tautitapauksista. Etäpesäkkeet ilmaantuvat usein aivoihin ja sisäelimiin jo suhteellisen varhaisessa vaiheessa (Dent ja muut 2007.) Lisäksi kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään sairastutaan keskimääräistä nuorempina kuin muihin rintasyövän alatyyppeihin, usein alle 40-vuotiaana (Morris ja muut 2007).

Kolmoisnegatiivisen rintasyövän erityinen molekulaarinen tyyppi on johtanut siihen, että sen hoitoon ei ole kohdennettu toimivia hormonaalisia tai molekulaarisia hoitokeinoja. Tämän takia käytetyin hoito kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään on edelleen kemoterapia, mutta senkin teho on heikko (Chaudhary ja muut 2018). Lisäksi erityisesti uusiutuvaan kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään ei ole standardoitua kemoterapiaa tai muutakaan hoitosuunnitelmaa, ja hoitovaste uusineelle kolmoisnegatiiviselle rintasyövälle on yleensä lyhyt ja

lopulta syöpä usein kasvaa ja leviää nopeasti (Won ja Spruck 2020). Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä voidaan jakaa molekulaarisesti edelleen kuuteen eri kategoriaan; tyvisolunkaltainen1, tyvisolunkaltainen2, immunomodulatorinen, mesenkymaalinen, mesenkymaalinen kantasolun kaltainen, sekä luminaalinen androgeenireseptori (Lehmann ja muut 2011).

Uusille tehokkaille hoidoille olisi tarvetta kolmoisnegatiivisen rintasyövän hoitamiseksi. Tämänhetkiset kohdennetummat hoidot ovat tarkoitettu vain tietyille kolmoisnegatiivisen rintasyövän alatyypeille ja niistäkin potilaista vain pieni osa on hyötynyt hoidoista ja näilläkin usein kehittynyt resistenssi hoidoille, mikä lopulta on johtanut syövän uusiutumiseen tai leviämiseen (Won ja Spruck 2020).

## **2.2 Syövän kantasolut rintasyövässä**

Syövän kantasolut ovat pieni ryhmä soluja kasvaimessa, jotka hallitsevat syövälle keskeisiä tekijöitä kasvaimessa, kuten kasvua, leviämistä ja hoitojen vastustamista. Syövän kantasolujen alkuperästä on esitetty kaksi toisistaan hieman eroavaa mallia, jotka selittävät kantasolujen synnyn lisäksi perusteet kasvainten heterogeenisyydelle. (Butti ja muut 2019.) Kloonievoluutiomallin (engl. clonal evolution) mukaan kasvaimen heterogeenisuus perustuu peräkkäisiin erilaisiin mutaatioihin, joiden seurauksena syntyy joukko erilaisia soluja. Tämän mallin mukaan näiden mutaatioiden seurauksena erilaistunut solu voi muuttua syövän kantasoluksi. (Lindeman ja Visvader 2010.) Toinen malli on niin kutsuttu hierarkiamalli (engl. hierarchical model). Tässä mallissa syövän kantasolut ovat pieni alapopulaatio soluja, joilla on kyky uusiutua ja erilaistua useiksi erilaisiksi solutyypeiksi ja näin saada aikaan heterogeenisuus kasvaimessa. Tässä mallissa hierarkiassa korkeimmalla olevat solut ovat alkujaan normaaleja kantasoluja, jotka mutaation seurauksena ovat muuttuneet syövän kantasoluiksi. (Kreso ja Dick 2014.)

Rintasyöpäkasvain oli ensimmäinen kiinteä kasvain, josta löydettiin syövänkantasoluja immuunipuutteisen hiiren rintasyöpäkasvaimesta (Al-Hajj ja muut 2003). Rintasyövän kantasolut voidaan tunnistaa siitä, että ne ilmentävät tiettyjä merkkiaineita solukalvolla, kuten esimerkiksi CD44, mutta myös siitä, että niiltä puuttuu tiettyjä merkkiaineita, kuten esimerkiksi CD24 (Barzaman ja muut

2020.) Rintasyövässä erityisen haitalliseksi syövän kantasolutyypiksi on havaittu solut, jotka ovat juuri CD44<sup>+</sup> ja CD24<sup>-</sup> -tyyppisiä. Soluja, joilla on kyseinen fenotyyppi, pidetään syöpää voimakkaasti edistävinä niiden solujen elinvoimaisuutta lisäävien ominaisuuksien vuoksi. (Chekhun ja muut 2015.) Sekä CD44 että CD24 ovat solukalvolla esiintyviä glykoproteiineja, jotka molemmat on liitetty syövän kehitykseen (Altevogt ja muut 2021; C. Chen ja muut 2018). Molempia käytetään myös merkkiaineina rintasyövän kantasolujen tunnistamiseen. Syövän kantasoluihin kohdennettuja hoitoja pidetään potentiaalisena hoitomuotona erityisesti kolmoisnegatiiviseen rintasyöpään ja yksi vaihtoehto voisi olla esimerkiksi estää CD44:n sitoutumista (O’Conor ja muut 2018.)

### **3. Genomin epävakaas rintasyövässä**

Genomin epävakaas on yksi syövän tunnusmerkeistä. Tämä epästabiilius helpottaa syövän etenemistä, koska kiinteistä kasvaimista löytyy viidestä kymmeneen olennaista mutaatiota, jotka tekevät kasvaimesta pahanlaatuisen ja genomin epävakaas lisää mutaatioiden syntymistä. (Hanahan ja Weinberg 2000.) Syövän kehityksen kannalta genomin epävakaas näyttäisi olevan jopa todella merkittävä tekijä, sillä normaali mutaationopeus ei riitä mahdollistamaan syövän etenemiselle välttämättömien mutaatioiden kertymistä (Ingvarsson 2006). Genomin epästabiilius pitää sisällään niin pienet rakenteelliset muutokset, kuten yhden emäsparin mutaatiot, kuin myös isommat muutokset, kuten kromosomifragmenttien tai kokonaisten kromosomien häviämisen tai lisääntymisen (Duijf ja muut 2019).

Kasvainten yhteydessä genomin epästabiilius voidaan luokitella kromosomaaliseksi epästabiiliudeksi (engl. chromosomal instability, CIN) tai mikrosatelliittiepästabiiliudeksi (engl. microsatellite instability, MIN). Näistä kahdesta MIN on huomattavasti harvinaisempaa ja johtuu pääasiassa mutaatiosta ituradan geeneissä, jotka vastaavat yhteensopimattomien nukleotidien korjaukseen (engl. mismatch repair) vaadittavien tekijöiden ilmentymisestä. MIN voi johtua myös somaattisesta mutaatiosta tai epigeneettisistä mekanismeista. CIN on erityisesti rintasyövässä huomattavasti yleisempi epästabiiliuden muoto

kuin MIN, ja sen on osoitettu ilmentyvän jopa 70 % rintasyöpäkasvaimista. (Ingvarsson 2006.)

CIN voidaan jakaa vielä tarkemmin numeeriseksi (nCIN) tai rakenteelliseksi (sCIN), ja molemmat ilmenevät usein rintasyövän yhteydessä. Numeerisessa muutoksessa ilmenee epänormaali kromosomien määrä ja rakenteellisessa muutoksia on kromosomien fragmenttien paikoissa tai niiden määrässä. (Ingvarsson 2006.) Aneuploidia eli yhden kromosomin poikkeava lukumäärä löydetään rintasyövän yhteydessä usein (Duijf ja muut 2019). Tämän lisäksi rintasyövässä genomit ovat usein tetraploidisia tai lähes triploidisia (Laughney ja muut 2015).

Myös epigeneettisillä mekanismeilla uskotaan olevan vaikutus genomien stabiiliuteen. Chen ja muut osoittivat hiirimallissa jo vuonna 1998, että metylaatioiden vähentyminen lisäsi genomien epästabiiliutta DNA-metyylitransferaasin suhteen poistogeenisissä hiirissä (R. Z. Chen ja muut 1998). Rintasyöville on myös ollut tyypillistä, että eri alatyypeillä on omat, jopa tyyppille spesifiset mallit niin yksittäisten geenien mutaatioissa kuin myös isommissa muutoksissa genomissa. Tämän takia onkin esitetty, että nämä genomisen epästabiiliuden mallit voisi olla hyvä ottaa huomioon rintasyöpädiagnoosien tekemisen yhteydessä. (Kalimutho ja muut 2019.)

### **3.1 Geneettiset poikkeavuudet, jotka edistävät genomien epävakautta rintasyövässä**

Rintasyöpien yhteydessä tunnistetaan usein mutaatioita geeneissä, joiden tehtävänä on ylläpitää DNA:n eheyttä tai osallistua DNA:n korjausmekanismin toimintaan (Duijf ja muut 2019). Tunnetuimmat rintasyöpään yhdistetyt geenimutaatiot ovat BRCA1:n ja BRCA2:n mutaatiot sekä tuumorisuppressori p53:n mutaatiot (Yamauchi ja Takei 2018). BRCA1:n ja BRCA2:n tiedetään olevan perinnöllisten rintasyöpien yleisimpiä aiheuttajia (Shiovitz ja Korde 2015). Näitä geenejä yhdistää niiden monitoiminnallisuus soluissa ja rooli genomien vakauden suojaamisessa. BRCA1 ja BRCA2 ovat välttämättömiä kromosomirakenteen säilyttämisessä (Ingvarsson 2006).

### 3.1.1 p53

Genomin suojelijanakin tunnettu p53 on transkriptiotekijä, jonka keskeinen tehtävä soluissa on genomin eheyden ylläpito DNA-vaurioiden korjaamisen kautta. p53 tunnetaan myös erityisesti sen roolista tuumorisuppressorina. Näiden lisäksi p53 osallistuu moniin eri prosesseihin soluissa kuten solusyklin pysäyttämiseen ja apoptoosiin (Vousden ja Prives 2009). p53 on transkriptiotekijänä keskeinen ja p53 aktivoi alavirtaan lukuisia eri signalointireittien tekijöitä, kuten esimerkiksi solusyklin pysäytyksen yhteydessä p21:n sekä CDK2:n. p53:n aktivaatio taas tapahtuu useiden eri stressisignaalien toimesta. (Levine 2020.)

Mutaatio *TP53*-geenissä on yleisin mutaatio syövissä (Stephens ja muut 2012) ja myös rintasyövän yhteydessä *TP53* on useimmin mutatoitunut geeni (Duffy ja muut 2018). Mutaatio on yleisimmin pistemutaatio eli yhden nukleotidin muuttuminen toiseksi tai sen katoaminen (Silwal-Pandit ja muut 2014). Myös p53:n mutaatiosta seuraavaa rintasyöpää pidetään joissakin tapauksissa perinnöllisenä (Shiovitz ja Korde 2015), kuten esimerkiksi Li-Fraumenin syndroomassa, jossa *TP53*-mutaatio periytyy dominantisti ituradassa ja aiheuttaa syndroomaa sairastaville yksilöille useita syöpiä heidän elinaikanaan (Kratz ja muut 2017). Ituradan mutaatiot p53:ssa ovat kuitenkin harvinaisia ja somaattiset mutaatiot taas hyvin yleisiä (Ingvarsson 2006). Mutatoituneen p53:n on huomattu olevan yleinen erityisesti kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä; jopa 80 %:ssa tapauksista on löydetty mutatoitunut *TP53*-geeni (Duffy ja muut 2018). Mutaatioiden yleisyyden takia p53:a käytetään biomarkkerina syövän ennusteessa ja sitä tutkitaan paljon myös mahdollisena kohteena syöpähoidoille.

## 4. Notch

Notch-geeni löydettiin jo yli sata vuotta sitten, kun tietyn *Drosophila melanogaster* -kannan siipien päissä ilmentyi pieniä lovia (engl. notch), joiden mukaan geeni sai nimensä (Morgan 1917). Notch on evolutiivisesti varhain konservoitunut ja pleiotrooppinen geeni eli se vaikuttaa useisiin eri ominaisuuksiin yksilössä. Notch on erityisen tärkeä osa yksilönkehityksen ja solujen erilaistumisen kannalta.

Notchin rooli ja vaikutus vaihtelee eri kudostyypeissä ja jopa samassa kudostyyppissä sen kehityksen eri vaiheissa. (Siebel ja Lendahl 2017.)

Nisäkkäillä on yhteensä neljä eri Notch-reseptoria (Notch1-4) ja yhteensä viisi eri ligandia (Jagged1-2 ja Delta-like1, -3 ja -4). Notch-reseptorit ovat solukalvon kerran läpäiseviä heterodimeerejä ja niiden rakenne voidaan jakaa kolmeen osaan; solukalvon ulkopuolinen osuus (engl. Notch extracellular domain, NECD), solukalvon läpäisevä osuus sekä solukalvon sisäpuoleinen domeeni (engl. Notch intracellular domain, NICD) (Nowell ja Radtke 2017). Notch-reseptorit tuotetaan solulimakalvostossa, josta reseptori siirtyy Golgin laitteeseen, jossa se käy läpi ensimmäisen proteolyttisen pilkkoutumisen, jonka jälkeen reseptori kuljetetaan solukalvolle (Siebel ja Lendahl 2017).

Notch ja erityisesti sen epänormaali toiminta on yhdistetty moniin sairauksiin ja erilaisiin geneettisiin häiriöihin, mutta erityisesti eri syöpiin. Syövän yhteydessä Notchin tiedetään voivan toimia joko onkogeeninä eli syöpää edistävänä tekijänä tai tuumorisuppressorina eli syövän kehitystä estävänä tekijänä eri syöpätyypeissä. (Nowell ja Radtke 2017.) Esimerkiksi rintasyövän yhteydessä Notch1:n on havaittu olevan onkogeenin tekijä (Rizzo ja muut 2008), mutta medulloblastooma aivokasvaimen yhteydessä Notch1 toimii tuumorisuppressorina (Fan ja muut 2004).

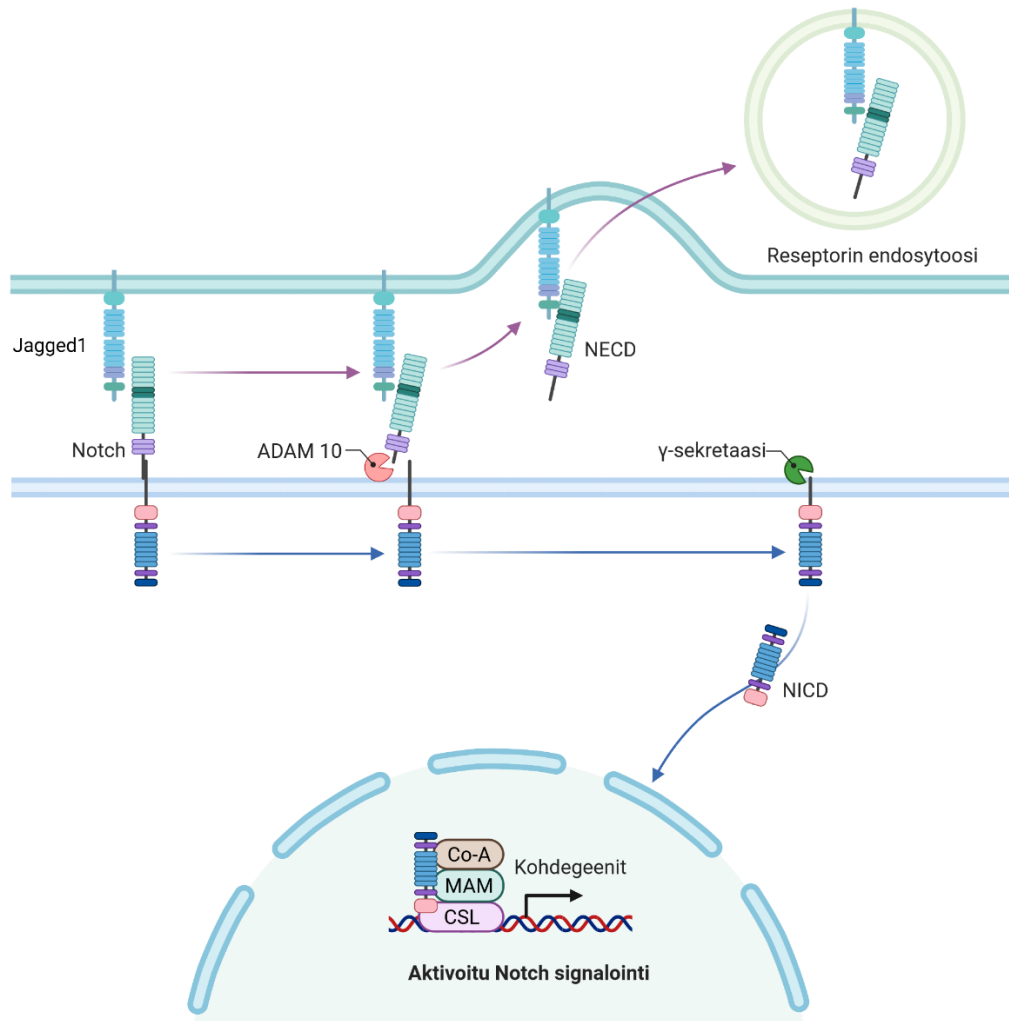
#### **4.1 Notch-signalointi**

Notch-signalointi on paikallista suoraa solu-soluvälitteistä viestintää ja se on molekulaarisesti suhteellisen yksinkertainen. Viestiketjuun ei kuulu toisiolähettejä ja entsyymejä, jotka säätelisivät viestintää. Viestintä aktivoituu, kun reseptori ja ligandi sitoutuvat toisiinsa. Aktivoitumista seuraa reseptorin kaksi proteolyttistä pilkkoutumista. Ensimmäinen näistä kahdesta pilkkoutumisesta tapahtuu metalloproteaasi ADAM10:n tai ADAM17:n toimesta. Tämän pilkkoutumisen seurauksena NECD irtoaa ja kulkeutuu ligandia esittelevään soluun endosytoosin kautta. Toinen pilkkoutuminen tapahtuu  $\gamma$ -sekretaasin toimesta ja sen seurauksena NICD irtoaa ja kulkeutuu tumaan, jossa se osallistuu kompleksin, joka aktivoi kohdegeenien transkription, muodostamiseen (kuva 1). (Bray 2006.)

Tumassa NICD sitoutuu DNA:ta sitovaan CSL-transkriptiotekijään (engl. CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) samalla syrjäyttäen siihen sitoutuneet repressorit. Tämän jälkeen NICD muodostaa kompleksin koaktivaattoreiden kanssa tehokkaamman sitoutumiskyvyn ja kohdegeenien transkription saavuttamiseksi. NICD:n poissaollessa tumasta sitoutuu repressorit kohdegeenien promootorialueelle kiinnittyneeseen CSL:ään näin estäen sen toiminnan ja kohdegeenien transkription. Notchin yhteydessä tunnetuimmat koaktivaattorit ovat Mastermind-like (MAML) ja histoniasetyylitransferaasit. Kompleksi aktivoi kohdegeenien transkription ja tunnettuja Notchin kohdegeenejä ovat esimerkiksi Hes- ja Hey-perheiden proteiinit. (Radtke ja Raj 2003.)

Notch-signaaloinnin aktiivisuutta säädellään muun muassa erilaisten translaation jälkeisten modifikaatioiden avulla, esimerkiksi fosforylaatioilla. Notchin transkriptionaalinen aktiivisuus esimerkiksi pystytään pysäyttämään fosforyloimalla sen tietty domeeni. Tämän fosforylaation jälkeen ubikitiiniligaasi FBXW7 ubikitinoiden sen, jonka jälkeen proteiini ohjautuu proteosomiin hajotukseen (Ranganathan ja muut 2011). Normaaleissa olosuhteissa Notch-signaaloinnin voimakkuus on tarkasti säädeltyä ja tarkan säätelyn uskotaan olevan mahdollista myös siksi, että signaalintireittiin ei kuulu entsyymejä tai muita toisiolähettejä (Aster ja muut 2017). Myös endosytoosilla on rooli signaaloinnissa. NECD:n endosytoosi ligandin mukana ligandia esittelevään soluun saa aikaan voiman, joka vetää reseptoria niin, että katkaisukohta toista proteolyttistä pilkkoutumista varten tulee paremmin esille (Musse ja muut 2012).





**Kuva 1.** Notch-signalointi. Signalointi käynnistyy, kun Notch-reseptori ja Jagged1-ligandi sitoutuvat toisiinsa. Sitoutumista seuraa kaksi proteolyyttistä pilkkoutumista, joista ensimmäinen tapahtuu ADAM10-proteaaasin toimesta ja toinen  $\gamma$ -sekretaasin toimesta. Näiden pilkkoutumisten jälkeen Notchin solun sisäinen domeeni (NICD) kulkeutuu tumaan, jossa se toimii transkriptiotekijänä sitouduttuaan CSL:ään koaktivaattoreiden, kuten mastermindin (MAM) kanssa ja lopulta käynnistää kohdegeenien transkription. Kuva tehty BioRender.com avulla.

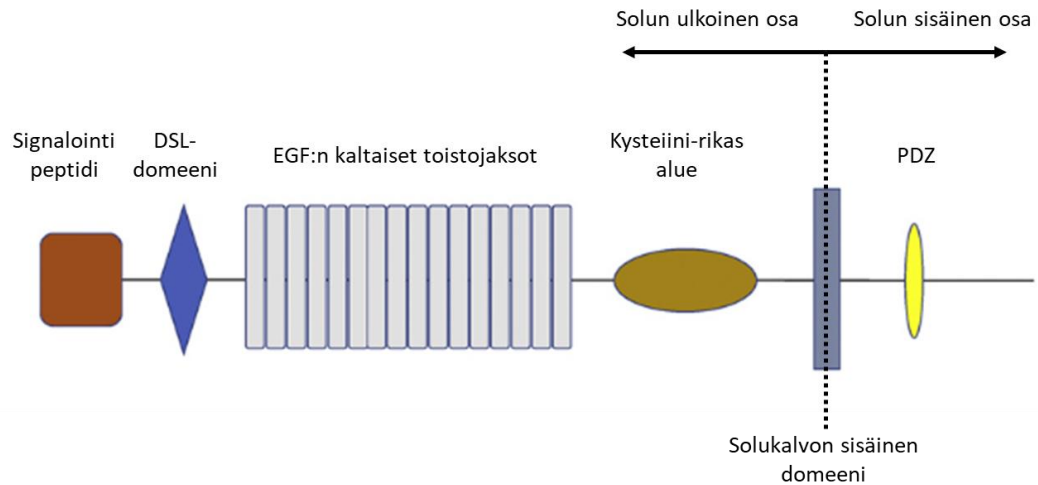
## 5. Jagged1

Jagged1 (Jag1) on yksi viidestä Notch-reseptoreiden ligandeista ja näin ollen tärkeä osa Notch-signaloinnissa. Notch-ligandi Jagged1 löydettiin ja nimettiin vuonna 1995 Lindsellin ja muiden toimesta. Ryhmä onnistui kloonamaan tekijän, jonka tiedettiin aktivoivan Notch-reseptorin toiminnan ja tämä tekijä sai nimen Jagged. (Lindsell ja muut 1995.)

Niin kuin Notch-reseptorit, myös Jagged1-ligandi on laajasti ilmennetty nisäkkäissä jo yksilönkehityksen aikana sen eri vaiheissa ja laajasti myös eri kudoksissa. Ihmisillä Jagged1:n ilmentyminen kehityksen aikana vaihtelee eri kehitysvaiheen ja eri kudosten välillä laajasti. Tarkemmin on havaittu, että alkion kehityksen aikana Jagged1 ilmentyy erityisesti muun muassa keuhkovaltimoissa ja muissa suurissa valtimoissa, haimassa ja tärkeimpien keuhkoputkien haarojen ympärillä. Aikuisilla yksilöillä Jagged1:n ilmentyminen on korkeaa muun muassa sydämessä ja haimassa sekä matalammin ilmentyneenä muun muassa keuhkoissa, maksassa ja leukosyyteissä (Grochowski ja muut 2016.)

### **5.1 Jagged1:n rakenne**

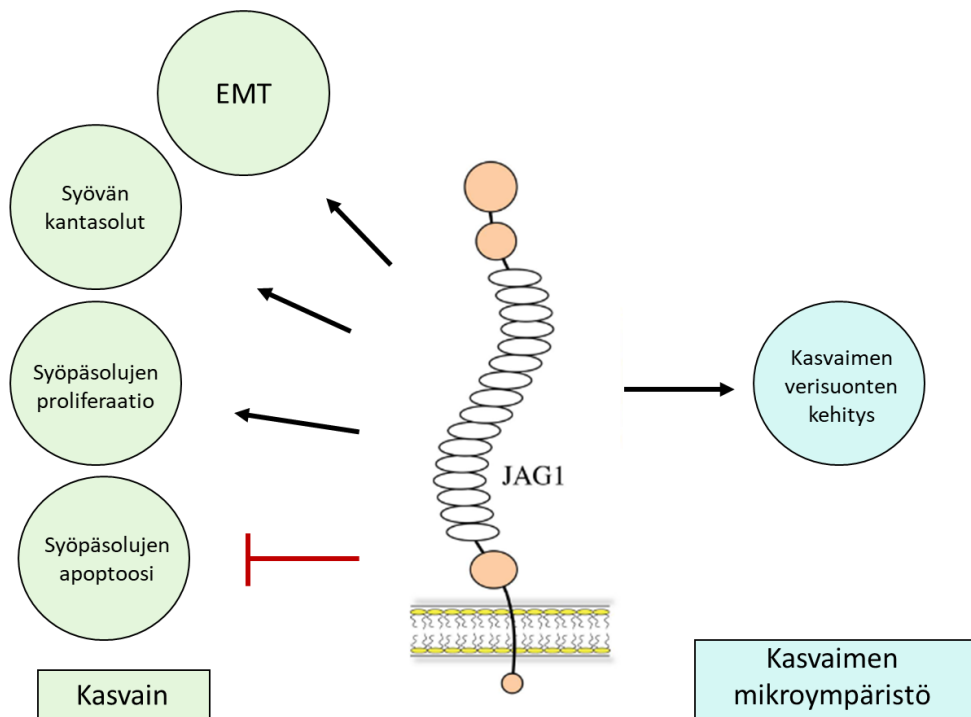
Jagged1:n rakenne voidaan jakaa kolmeen osaan; suhteellisen pieneen solun sisäiseen domeeniin, solukalvon sisäiseen domeeniin sekä suureen solunulkoiseen domeeniin (kuva 2). Solunulkoisen osan voidaan jakaa edelleen neljään osaan, joilla kaikilla on oma tarkoituksensa ligandin toiminnassa; signaalintipeptidiin, jonka jälkeen konservoitunut DSL-domeeni, jota seuraa 16 epidermaalisen kasvutekijän kaltaista toistoa (engl. epidermal growth factor-like, EGF-like) ja viimeisenä ennen solukalvon läpäisevää osaa kysteiinirikas domeeni. (Guarnaccia ja muut 2004.) Signaalintipeptidin tehtävä on varmistaa proteiinin oikea lokalisaatio solun pinnalla. DSL-domeeni tarvitaan Jagged1-ligandin Notch-reseptoriin sitoutumiseen, EGF-toistot taas lisäävät ligandin ja reseptorin välistä affiniteettia ja kysteiinit lisäävät proteiinin stabiiliutta. (Grochowski ja muut 2016.) Solun sisäiseen osaan kuuluu PDZ:aan sitoutuva motiivi (Xiu ja muut 2020).



**Kuva 2.** Jagged1:n rakenne. Ligandin rakenne voidaan jakaa kolmeen osaan; solun ulkoinen osa, solukalvon läpäisevä osa sekä solun sisäinen osa. Solun ulkoinen osa pitää sisällään signalointipeptidin, DSL-domeenin, EGF:n kaltaiset toistojaksot sekä kysteiniirikkaan alueen ja solun sisäinen osa PDZ:aan sitoutuvan motiivin. Kuva muokattu lähteestä (Xiu ja muut 2020).

## 5.2 Jagged1 rintasyövässä

Yleisesti Jagged1:llä on havaittu syövän yhteydessä olevan useita erilaisia syöpää edistäviä vaikutuksia (kuva 3). Jagged1 vaikuttaa esimerkiksi syöpäsolujen kasvuun ja estää syöpäsolujen apoptoosia. Lisäksi Jagged1 osallistuu syövän kantasolujen ylläpitoon sekä epiteeli-mesenkymysiirtymään (EMT). Syövän mikroympäristössä Jagged1 edistää angiogeneesiä. Jagged1 on yhdistetty eri syövissä myös etäpesäkkeiden muodostamiseen sekä hoitoresistenssin muodostumiseen. (Li ja muut 2014.) Jagged1:n on myös osoitettu olevan merkittävä tekijä rintasyövän etäpesäkkeiden muodostumisessa luustoon aktivoimalla Notch-signaaloinnin luusoluissa. Jagged1 aktivoi suoraan osteoklastien erilaistumista ja kasvaimen kasvua stimuloimalla interleukiini 6:n vapautumista osteoblasteista. Molemmat etäpesäkkeiden muodostamiseen vaikuttavat tekijät aiheuttivat enemmän muutoksia muodostuvan kasvaimen mikroympäristöön ja mikroympäristön kautta kasvaimen muodostumiseen tai kasvuun. (Sethi ja muut 2011.)



**Kuva 3.** Jagged1:n vaikutus syövässä. Jagged1 vaikuttaa syöpää edistävasti niin kasvaimeen kuin myös kasvaimen mikroympäristöön. Kasvaimessa Jagged1 lisää solujen kasvua ja estää apoptoosia sekä ylläpitää syövän kantasoluja ja vaikuttaa EMT-siirtymään. Kasvaimen mikroympäristössä Jagged1 edistää muun muassa kasvaimen verisuonten kehitystä. Muokattu lähteestä (Li ja muut 2014).

Yli-ilmentynyt Jag1 on yhdistetty erityisesti huonon ennusteen rintasyöpiin. Korkea Jag1 mRNA:n määrä on yhteydessä moniin ennustetta huonontaviin merkkeihin. Potilaiden, joilla oli korkea Jag1:n mRNA-määrä, kasvaimet olivat suurempia ja useammin ER- ja PR-negatiivisia, mutta yhteyttä HER2-statukseen ei nähty. Samassa tutkimuksessa osoitettiin myös, että potilaat, joilla oli korkea Jag1:n mRNA:n määrä olivat positiivisia myös p53:n mutaation osalta. (Reedijk ja muut 2008.) Korkean Jagged1:n sekä Notch1:n ilmentyminen on myös yhdistetty lääkeresistenssin muodostumiseen (Bhola ja muut 2016).

Jag1:n vaikutus eroaa eri rintasyövän alatyyppeiden välillä, mikä osoittaa jälleen Notch-signaaloinnin toiminnan moninaisuuden. Jag1:n tarkkaa roolia syövässä ja kehityksessä ei ole vielä systemaattisesti saatu selville (Xiu ja muut 2020). Koska Jag1:n vaikutus vaihtelee eri rintasyövän alatyyppeiden välillä, tarvitaan tarkempia tutkimuksia vaikuttavan mekanismin tai mekanismien tunnistamiseksi.

### **5.2.1 Jagged1 ja kolmoisnegatiivinen rintasyöpä**

Korkea Jag1:n ilmentyminen on liitetty yleisesti huonoon syövästä selviytymiseen (Dickson ja muut 2007) ja Jag1:n yli-ilmentymisen on havaittu olevan suurinta kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä verrattaessa ER<sup>+</sup> tai PR<sup>+</sup> rintasyöpiin (Xiu ja muut 2020). On havaittu, että kolmoisnegatiivisen rintasyövän yhteydessä Jagged1-välitteisen Notch1-aktivaation seurauksena NFκB-signaali aktivoituu sekä mitokondrioaineenvaihdunta käynnistyy, mikä saa aikaan eloonjäämisgeenien transkription aktivoitumisen soluissa (Hossain ja muut 2018). Koska Jagged1:n ennustetta huonontava vaikutus on yhdistetty rintasyöpään sekä syövän kantasoluihin pidetään sitä potentiaalisena kohteena tulevaisuuden kolmoisnegatiivisen rintasyövän tehokkaampaan hoitoon.

### **5.3 Jagged1 rintasyövän hoidossa**

Notch-signaali ja sen eri tekijöitä on pidetty potentiaalisina kohteina esimerkiksi rintasyövän hoidossa siitä asti, kun eri osien merkitys syövän yhteydessä on ilmennyt. Tähän mennessä on kokeiltu jo useampia eri tapoja vaikuttaa Notch-signaaliin syövän yhteydessä. Kaksi eniten käytettyä tapaa on ollut γ-sekretaasin toimintaan vaikuttaminen sekä monoklonaaliset vasta-aineet (Takebe ja muut 2014).

Muiden Notch-signaalin tekijöiden ohessa myös Jagged1:n toimintaan kohdennettuja menetelmiä on kehitetty. Jagged1:n toimintaa on myös hiljennetty γ-sekretaasi-inhibiittoreilla onnistuneesti esimerkiksi estämällä etäpesäkkeiden muodostumista luumun (Sethi ja muut 2011). γ-sekretaasi-inhibiittorien käyttöön liittyy kuitenkin isoja ongelmia, kuten toksisuutta erityisesti suolistossa, kun Notch-signaali ei toimi normaalisti (Takebe ja muut 2014). Tästä johtuen on pyritty kehittämään tarkempia tapoja kohdentaa vaikutus vain Jagged1:n toimintaan, kuten esimerkiksi hiljentämällä Jagged1-geenin toimintaa esimerkiksi siRNA:n avulla (Xiu ja muut 2020). Geenin hiljentämisen lisäksi yksi potentiaalisena pidetty tapa kohdentaa Jagged1:tä on terapeuttiset Jagged1-vasta-aineet. Tällaisella vasta-aineella on pystytty osoittamaan

kolmoisnegatiivista rintasyöpää hoitava vaikutus niin *in vitro* kuin myös *in vivo* erilaisia malleja käyttämällä (Masiero ja muut 2019).

## 6. DNA-vauriot

Elämän jatkumisen kannalta DNA:n ylläpitäminen eheänä on välttämätöntä. Samaan aikaan muutokset DNA:ssa ovat evoluution ja lajien kehityksen kannalta välttämättömiä, mutta muutokset myös saattavat edistää haitallisia asioita, kuten syöpää tai muita sairauksia ja ikääntymistä. Vauriot DNA:ssa voivat tapahtua sisäsyntyisesti soluissa tai solun ulkoisten tekijöiden toimesta. Ulkoisia tekijöitä ovat esimerkiksi säteily ja perimämyrkylliset yhdisteet ja solun sisäisiä tekijöitä ovat esimerkiksi reaktiiviset happiyhdisteet. (Chatterjee ja Walker 2017.)

### 6.1 Replikaatiostressi

Yksi DNA-vauriota aiheuttava tekijä on replikaatiostressi. Replikaatiostressi ilmenee ensin replikaation selkeällä hidastumisella, joka voi lopulta johtaa koko replikaatiohaarukan romahtamiseen, jota seuraa DNA:n kaksoisjuosteen vaurio. Solusyklin S-vaiheen tarkastuspisteet ovat kehittyneet vastaamaan DNA:n replikaatiossa mahdollisesti ilmeneviin ongelmiin ja näin estämään genomisen epävakauden muodostumista (Gaillard ja muut 2015.) Replikaatiostressiin on useita syitä, esimerkiksi DNA-polymeraasin toiminnan estyminen, tai DNA:n kaksoisjuosteen avautuminen estetään topoisomeraaseja inhiboimalla tai deoksinukleosiditriposfaattien (dNTP) määrän vähentyminen, jolloin DNA-synteesi ei etene (Kitao ja muut 2018).

Replikaatiostressiä soluille aiheuttaa ultraviolettisäteilyn lisäksi erilaiset kemialliset yhdisteet, kuten esimerkiksi hydroksiurea (HU). Teknisesti HU on replikaatiota inhiboiva tekijä ja sitä on tieteellisessä tutkimuksessa hyödynnetty DNA-vaurioiden tutkimisen lisäksi myös muun muassa solusyklin synkronisoinnissa sekä reaktiivisten happiyhdisteiden muodostamisessa (Musiałek ja Rybaczek 2021). HU aiheuttaa replikaatiostressiä estämällä ribonukleotidireduktaasin aktiivisuutta, minkä seurauksena dNTP:tä ei muodostu ja replikaation eteneminen ei onnistu (Kitao ja muut 2018).

## 7. DNA-vauriovaste

DNA-vauriovasteen (engl. DNA damage response, DDR) oikeanlainen toiminta on välttämätöntä ja kokonaisuutena DDR muodostuu monimutkaisesta signaalintiverkostosta, joka ylläpitää DNA:n eheyttä ja vakautta. Solut reagoivat DNA-vaurioihin aktivoimalla suuren ja monimutkaisen joukon signaaleja, jotka pitävät sisällään muun muassa solusyklin tarkastuspisteiden aktivaation ja solusyklin pysäytyksen, transkription tai sen jälkeisten tekijöiden repression tai aktivaation sekä tietyissä olosuhteissa ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin käynnistymisen (Duijf ja muut 2019).

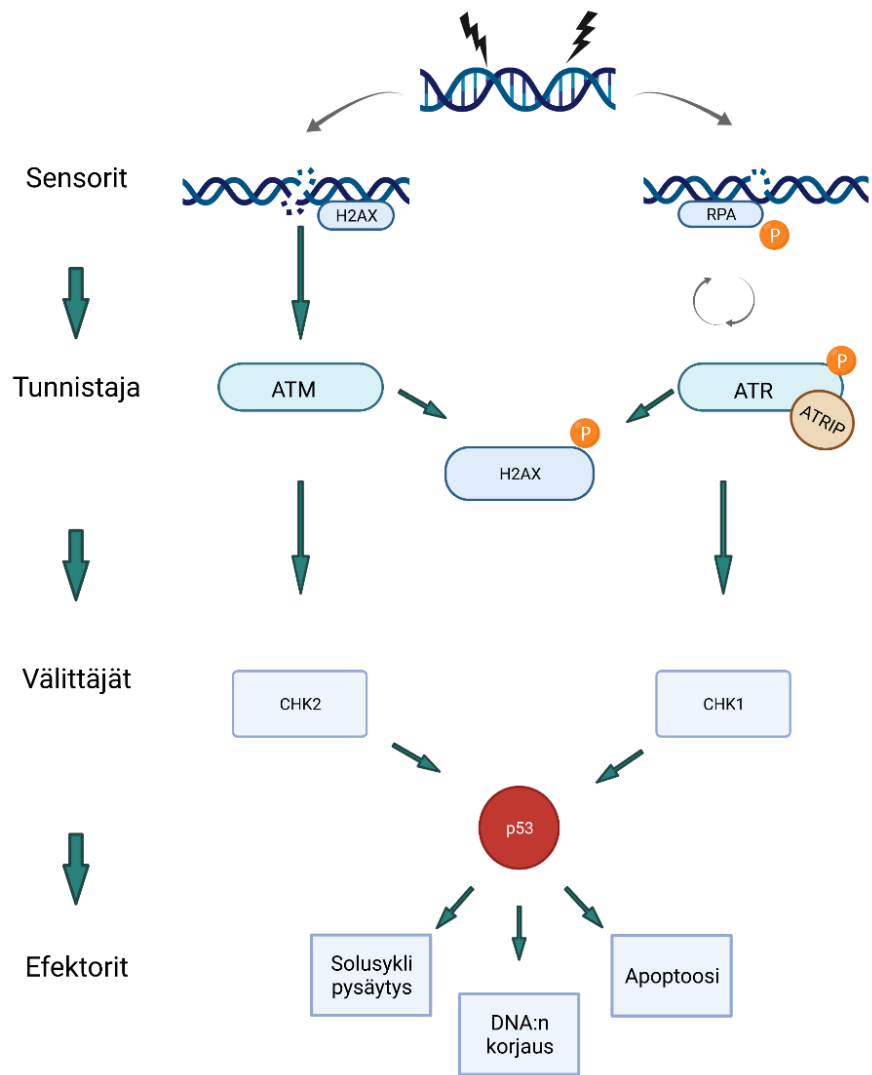
DDR-vaste kulkeutuu vaurion tunnistavilta tekijöiltä viestin välittäjien kautta varsinaisen vasteen aikaan saaville efektoreille (kuva 4) (Chatterjee ja Walker 2017). Kaksi DDR:n kannalta tärkeintä tekijää ovat ATM (ataksia-telangiectasia mutatoitunut, engl. ataxia-telangiectasia mutated) sekä ATR (ataksia-telangiectasia ja Rad3:n liittyvä, engl. ataxia-telangiectasia and Rad3-related). ATM ja ATR molemmat kuuluvat fosfatidylinositoli-3-kinaasiin liittyvään kinaasiryhmään (Matsuoka ja muut 2007.) DDR:ssä ATM reagoi pääsääntöisesti DNA:n kaksoisjuostevaurioon ja ATR taas yhden DNA-juosteen vaurioon (Carusillo ja Mussolino 2020).

ATR:n välittämä DNA-vauriovaste aktivoituu, kun ilmenee yhden juosteen DNA-vaurio, esimerkiksi replikaatiostressin yhteydessä replikaatiohaarukan pysähtyessä (Nam ja Cortez 2011). Replikaatioproteiini A (RPA) sitoutuu muodostuneeseen vapaaseen yksijuosteiseen DNA-pätkään (Vassin ja muut 2009). Sen jälkeen, kun RPA-proteiinit ovat päällystäneet paljastuneen yksijuosteisen DNA:n pystyy ATR-interaktioproteiini (ATRIP) sitoutumaan niihin ja aktivoimaan paikalle ATR:n, jolloin ATR-ATRIP-kompleksi muodostuu (Nam ja Cortez 2011). ATR:n aktivoimiseksi vauriopaikalle tarvitaan vielä DNA topoisomeraasi 2:n sitova proteiini, jonka jälkeen ATR aktivoituu ja käynnistää vauriovasteen fosforyloimalla muun muassa RPA:n ja tarkastuspistekinaasi 1:n (CHK1) (Kumagai ja muut 2006). CHK1:n toiminnan säätelyn kautta ATR:llä on keskeinen rooli genomien eheyden suojaamisessa, sillä solusyklin pysäytys G2/M-rajalle käynnistyy silloin, kun CHK1 aktivoituu ja fosforyloimalla estää esimerkiksi solun jakautumiseen vaadittavien syklinien toimintaa (Saldivar ja muut 2017).

DNA:n kaksoisjuosteen vaurion yhteydessä ATM:n aktivoituminen vaatii sekä autofosforylaation että MRE11-RAD50-NBS1-kompleksin (MRN) aktivoitumisen. Silloin kun DNA-vaurioita ei ole läsnä solussa ATM esiintyy dimeerinä tai multimeerinä ja autofosforylaatiot tarvitaan tämän di- tai multimeerirakenteen purkamiseen ja ATM:n vapauttamiseen kompleksista. MRN-kompleksi taas sitoutuu DNA:n kaksoisjuosteen katkoskohtaan ja saa ATM:n sitoutumaan kompleksin NBS1:n C-terminaaliseen päähän. (Dupré ja muut 2006.) Sitoutuminen lisää ATM:n kinaasiaktiivisuutta, minkä jälkeen se kykenee fosforyloimaan substraatteja, kuten esimerkiksi H2AX-histonin (Burma ja muut 2001). Fosforyloitu histoni H2AX tunnetaan myös nimellä  $\gamma$ H2AX ja se on myös tunnettu biomarkkeri DNA:n kaksoisjuosteen vauriolle (Kuo ja Yang 2008).  $\gamma$ H2AX-variantit leviävät DNA-vaurioalueelle ja luovat alustan, johon DDR:n muut komponentit pystyvät sitoutumaan ja käynnistämään DNA:n korjauksen (Stucki ja muut 2005).

Muutokset sekä ATR:n että ATM:n toiminnassa on yhdistetty syöpää edistäviksi tekijöiksi. DNA-vauriovasteen kompleksisuutta lisää se, että nämä kaksi reittiä risteytyvät monessa kohdassa myöhemmissä signaaloinnin vaiheissa ja pystyvät vaikuttamaan myös toistensa aktivaatioon (Jazayeri ja muut 2006). Molemmat reitit esimerkiksi aktivoivat p53:n toiminnan (Hafner ja muut 2019).





**Kuva 4.** DNA-vauriovaste. Yksinkertaistettu kuva DNA-vauriovasteen toiminnasta kaksoisjuosteen vauriossa ATM:n kautta sekä yhden juosteen vauriossa ATR:n kautta. Viesti kulkee sensoreilta tunnistajille ja tunnistajilta välittäjien kautta efektoreille, jotka saavat aikaan lopullisen vasteen. ATM aktivoi CHK2:n ja ATR-ATRIP-kompleksi aktivoi CHK1:n. Sekä CHK2 että CHK1 pystyvät aktivoimaan p53:n, jonka aktivoiminen voi johtaa useisiin solun eri kohtaloihin, kuten DNA:n korjaukseen tai solukuolemaan. Kuva tehty BioRender.com avulla.

## 7.1 DNA-vauriovaste mitoosin aikana

Mitoosi on soluissa tarkasti säädelty prosessi ja lähtökohtaisesti solut, joissa havaitaan vaurioita DNA:ssa eivät etene mitoosiin. Joskus kuitenkin saattaa solu siirtyä mitoosiin myös DNA-vaurion jälkeen esimerkiksi tarkastuspisteessä tapahtuneen virheen vuoksi tai DNA-vaurio voi tapahtua mitoosin aikana (Heijink ja muut 2013). Mitoosin aikainen DDR eroaa muista solusyklin vaiheista ja

yleisesti on ajateltu, että sen toiminta on hiljennetty ja uudelleen ohjelmoitu merkitsemään vauriot myöhempää, yleensä solusyklin G1-vaiheessa tapahtuvaa korjausta varten (Giunta ja muut 2010). Vaikka suurin osa DNA:n korjaukseen liittyvistä mekanismeista on hiljennettyinä mitoosin aikana, on havaittu myös vähäistä DNA:n korjaamista mitoosin aikana. Kun mitoottisiin soluihin aiheutettiin DNA:n kaksoisjuosteen vaurioita, pieni osa niistä korjattiin jo mitoosin aikana. Tässäkin tapauksessa kuitenkin suurin osa vaurioista korjattiin myöhemmin solun ollessa taas G1-vaiheessa sykliä. (Terasawa ja muut 2014.)

Myöhemmin on kuitenkin saatu näyttöä myös mitoosin aikaisesta DNA-vaurioiden tarkastuspisteestä. Esimerkiksi hiivoilla tehdyissä kokeissa on osoitettu, että on myös anafaasin aikainen DNA-vaurio tarkastuspiste (Yang ja muut 1997). Hiivoilla tehdyissä kokeissa on myös myöhemmin osoitettu, että DNA-vaurion yhteydessä tumasukkulan muodostumisen tarkastuspisteen (engl. spindle assembly checkpoint, SAC) aktivointi tapahtuu ATR:n ja ATM:n kautta (E. M. Kim ja Burke 2008). Hiivan ja ihmisen mitoosin välillä on kuitenkin suuria eroja ja siksi ei voida suoraan sanoa, että toiminta olisi täysin samanlaista myös esimerkiksi ihmisen soluissa. On kuitenkin näyttöä myös ihmisen soluilla siitä, että ainakin ATM kontrolloisi myös SAC:n aktivaatiota (Eliezer ja muut 2014). Suurin osa tutkimuksista liittyen DNA-vauriovasteen toimintaan mitoosin aikana on keskittynyt kahden DNA-juosteen vaurioon eli lähinnä ATM:n kautta käynnistyvään vasteeseen. Kuitenkin on myös näyttöä siitä, että replikaatiostressi aktivoi DDR:n mitoosin aikana (Minocherhomji ja muut 2015), jolloin vasteen käynnistävä tekijä voi olla myös ATR.

## **7.2 DNA-vauriovaste ja Notch**

Tutkimuksissa on saatu näyttöä, että Notch-signaloinnilla tai sen osilla on todennäköisesti rooli myös DNA-vauriovasteessa. On osoitettu, että Notch säätelee sekä ATM:n että ATR:n toimintaa soluissa, mutta vaikutukset näihin kahteen tekijään näyttäisi olevan päinvastaisia. NICD pystyy sitoutumaan ATM:ää säätelevään osaan ja estämään näin sen aktivaation. Tätä tulosta tukee myös saatu tulos siitä, että NICD-proteiinitasojen ollessa matalalla ATM:n aktiivisuus on korkeampaa kuin silloin, jos NICD:tä havaitaan soluissa paljon. (Vermezovic ja muut 2015.) ATR:n kohdalla on havaittu, että Notch pystyy

aktivoimaan sen toiminnan. Notch aktivoi ATR:n toiminnan, jonka avulla pystytään palauttamaan G2/M solusyklin siirtymävaiheen tarkastuspisteen toiminta (Miao ja muut 2020).

Kuitenkin tarkkaa mekanismia, jonka kautta Notch aktivoi ATR:n toimintaa ja inaktivoi ATM:n toimintaa ei toistaiseksi tunneta. Tämän lisäksi tutkimusta Notch-signalointiketjun muiden osien, kuten ligandien, vaikutuksesta DNA-vauriovasteeseen ei ole juurikaan tehty. Tarkempien tutkimusten tarvetta eri tekijöiden roolista sekä DNA-vauriovasteessa että mitoosissa lisää viime vuosina tehdyt havainnot siitä, kuinka perinteisesti DNA-vauriovasteeseen liitetyillä tekijöillä näyttäisi olevan rooli myös mitoosin säätelyssä (Petsalaki ja Zachos 2020). Kun tämä otetaan huomioon, on tarkempi tutkimus Jagged1:n mahdollisesta roolista molemmissa solun elinkyvyn kannalta merkittävässä prosesseissa kiinnostava. Koska sekä DNA-vauriot että mitoosi ovat merkittäviä prosesseja myös syövän etenemisen kannalta, voisi tarkempi tieto Notch-signaloinnin ja sen eri tekijöiden rooleista tulevaisuudessa auttaa kehittämään uusia tapoja hoitaa huonoennusteisia syöpiä.

## 8. Tutkimuksen tavoitteet

Tämän pro gradu -tutkielman tavoitteena on tutkia Jagged1:n roolia mitoosissa ja DNA:n korjausmekanismin toiminnassa.

Ryhmässä aikaisemmin saaduissa tuloksissa on nähty, että Jagged1:n sijoittuminen solussa muuttuu mitoosin aikana. Kun solu ei ole jakautumisvaiheessa, voidaan Jagged1 nähdä endoplasmakalvostolla ympäröimässä tumaa sekä solukalvolla. Mitoosin aikana Jagged1 nähdään kuitenkin tytärsolujen tumien vastakkaisissa reunoissa sekä tytärsolujen jakautumiskohdassa. Projektin tarkoituksena on tutkia Jagged1:n roolia mitoosissa. Lisäksi osana projektia halutaan nähdä millainen vaikutus Jagged1:n hiljentämisellä on solujen proliferaatioon verrattaessa villityyppisoluihin.

Osana erikoistyötä on myös tarkoitus validoida aikaisemmin ryhmässä saatu tulos liittyen Jagged1:n proteiini-proteiinivuorovaikutussuhteisiin. Jagged1:n kanssa mitoosin aikana vuorovaikutuksessa olevat proteiinit on saatu selville massaspektrometrian avulla ja osana tutkimusta on tarkoitus validoida Jagged1:n ja p53:n välinen vuorovaikutus.

Toinen osuus erikoistyössä liittyy Jagged1:n rooliin DNA:n korjausmekanismin toiminnassa ja DNA-vaurioiden määrässä. Ryhmässä aikaisemmin saatu tulos on osoittanut, että Notch1-reseptorilla on rooli DNA:n korjausmekanismin toiminnassa tai sen aktivaatiossa. Osana tutkimusta on selvittää, onko myös Jagged1:llä rooli DNA:n korjausmekanismin toiminnassa tai aktivaatiossa ja ilmeneekö soluissa enemmän DNA-vaurioita ilman Jagged1:tä. Tavoitteena on myös selvittää, onko mahdollinen rooli Jagged1:stä itsestään johtuvaa vai onko tulos riippuvainen alentuneesta Notch1:n aktivaatiosta.

## 9. Materiaalit ja menetelmät

### 9.1 Soluviljely

Tutkimuksessa käytettiin MDA-MB-231 ihmisen rintasyöpäsoluja, joista käytössä oli villityypin (WT) lisäksi Jagged1-poistogeeninen solulinja (Jag1KO). Lisäksi käytettiin ihmisen alkion munuaissoluja (engl. human embryonic kidney cells, HEK), joissa Jagged1 on yli-ilmennettynä. Soluja kasvatettiin DMEM-mediumissa (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose, Gibco), joka sisälsi 10 % (V/V) naudan sikiön seerumin (engl. fetal bovine serum, FBS, Serana), 2 mM L-glutamiinin (Gibco), 50 U/ml penisilliinin ja 50 µg/ml streptomysiinin (Sigma). Soluja kasvatettiin inkubaattorissa +37 °C:ssa ja 5 %:n hiilidioksidipitoisuudessa. Solut irrotettiin trypsiinillä, joka sisälsi 0,25 % EDTA:n (etyleenidiamiinitetraetikkahappo, Biowest), paitsi HEK-soluille, jotka irrotettiin mediumilla. Pesuihin käytettiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (engl. phosphate buffered saline, PBS, Biowest).

### 9.2 Proliferaatiokoe

Proliferaatiokokeessa oli tarkoitus seurata vaikuttaako Jagged1:n puuttuminen solujen jakautumisnopeuteen. Proliferaatiokokeessa solujen tumat värjättiin ja laskettiin neljässä eri aikapisteessä; 0 h, 24 h, 48 h ja 72 h. WT- ja Jag1KO-solut pestiin PBS:llä, irrotettiin trypsiini-EDTA:lla ja laskettiin automaattisella solulaskurilla (Bio-Rad). Molempia solutyyppejä tuli 96-kuoppalevylle kolme rinnakkaista kuoppaa jokaiselle aikapisteelle ja jokaiseen kuoppaan 5 000 solua. Tumien värjäykseen käytettiin Hoechst-reagenssia (Hoechst 33342, trihydrokloridi, Invitrogen) 1:2000 laimennoksena PBS:ssä, inkuboitui +37 °C 5 min, jonka jälkeen tumat kuvattiin Zeiss AxioVert A1 -mikroskoopilla 5x-objektiivilla kaksi kuvaa jokaisesta kaivosta. Tumat laskettiin ImageJ-ohjelman avulla ja tilastollinen analyysi tehtiin GraphPad Prism® 9 -versiolla, kaksisuuntaisella ANOVA-testillä ja tulos oli tilastollisesti merkitsevä, jos  $p < 0,05$ .

### 9.3 Hydroksiureakäsittely

WT- ja Jag1KO-solut jaettiin 6-kuoppalevylle kolmeen kaivoon kukin solutyypin. Hydroksiureakäsittelyssä solut käsiteltiin 2 mM hydroksiurealla (HU, Sigma), kahdessa eri käsittelyn keston aikapisteessä; 6 h sekä 24 h. Käsittely lopetettiin keräämällä solut 3x-Laemmli-puskuriin (0,1875 M Tris-HCl, pH 6.8, 104 mM natriumdodekyylisulfaatti [Fisher Scientific], 30 % (V/V) glyseroli [Fisher Scientific], 0,015 % (V/V) bromofenolisininen, 3 % (V/V) β-merkaptotetanoli [Sigma-Aldrich] ddH<sub>2</sub>O:ssa). Näytteet keitettiin 95 °C, 10 min ja säilytettiin -20 °C Western blot -analyysiin asti.

### 9.4 siRNA-hiljennys

Jag1:n siRNA-hiljennystä varten MDA-MB-231 WT-solut jaettiin 1/6 6-kuoppalevylle ja annettiin kiinnittyä yön yli. Seuraavana aamuna siRNA-transfektio tehtiin Lipofectamine<sup>®</sup> RNAiMax-reagenssilla (Invitrogen) valmistajan ohjeiden mukaisesti niin, että siRNA:n käyttökonsentraatio soluilla oli 25 nM. Mediumi vaihdettiin uuteen 4–6 tuntia transfektion jälkeen. Seuraavana päivänä aloitettiin HU-käsittelyt kuten edellä. Negatiivisena kontrollina käytettiin scrambled siRNA:ta eli siRNA:ta jonka sekvenssi on satunnainen eikä kohdennut mihinkään soluissa.

### 9.5 Western blot

SDS-PAGE-ajolla (natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi, engl. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) erotettiin proteiinit toisistaan koon mukaan. Käytettyjen geelien akryyliamidipitoisuus oli 6–15 % riippuen tutkittavan proteiinin koosta. Geeliä ajettiin 90 min 120 V. Proteiinien koon tunnistamista varten geelille ladattiin myös painostandardi merkkiaine Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad).

Proteiinit märkäsiirrostettiin akryyliamidigeeliltä nitroselluloosamembraanille (Amersham, Cytiva Life Sciences) 90 min 100 V jäällä. Siirrostuksen jälkeen membraania blokattiin maitoblokissa (5 % maito [Valio], 0,3 % Tween-20

PBS:ssä) 1 h huoneenlämmössä. Blokkauksen jälkeen membraani pestiin 3 x 5 min pesupuskurissa (0,3 % Tween-20 PBS:ssä). Pesujen jälkeen membraani siirrettiin 1:1000 laimennettuun primäärivasta-aineeseen ja inkuboitiin yön yli +4 °C pyöryksessä. Vasta-ainelaimennokset tehtiin 0,5 % BSA – PBS – 0,02 % natriumatsidiliuokseen. Käytetyt vasta-aineet ovat esitettynä taulukossa 1. Tämän jälkeen membraani pestiin 3 kertaa 5 min pesupuskurissa ja siirrettiin 1:10 000 maitoblokkiin laimennettuun sekundäärivasta-aineeseen ja inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä ravistelussa. Tämän jälkeen pestiin 3 kertaa 5 min pesupuskurissa ja pesujen jälkeen membraania inkuboitiin lyhyesti tehostettu kemiluminesenssi (engl. enhanced chemiluminescence, ECL) -reagenssissa, (Amersham™, Cytiva) ja kuvattiin iBright CL1500 -kuvauslaitteella (Invitrogen).

**Taulukko 1.** Käytetyt vasta-aineet

Primäärivasta-aine	Käyttölaimennos	Sekundäärivasta-aine	Käyttölaimennos
Notch1, D1E11 (3608) Cell Signaling Technology	1:1000	Anti-Rabbit-HRP PI- 1000 Vector Laboratories	1:10 000
Jagged1, 28H8 (2620) Cell Signaling Technology	1:1000	Anti-Rabbit-HRP PI- 1000 Vector Laboratories	1:10 000
RPA, subunit 9H8 (sc- 56770) Santa Cruz	1:1000	Anti-mouse-HRP PI- 2000 Vector Laboratories	1:10 000
HSC70/HSP73 (ADI- SPA-815) Enzo Life Sciences	1:10 000	Anti-Rat-HRP BA-9400 Vector Laboratories	1:10 000
Cleaved Notch1 (Val1744) Cell Signaling Technology	1:1000	Anti-Rabbit-HRP PI- 1000 Vector Laboratories	1:10 000
Phospho-Histone H3 (Ser10) Invitrogen	1:1000	Anti-mouse-HRP PI- 2000 Vector Laboratories	1:10 000

## **9.6 Proteiini-proteiinivuorovaikutus**

### **9.6.1 Solusyklin synkronisointi**

Immunosaostusta varten konfluentit HEK-solumaljat jaettiin 1/7 kymmenelle uudelle maljalle. Näiden solujen solusykli synkronisoitiin kaksoistymidiinikäsittelyllä. Ensimmäinen tymidiinipysäytys aloitettiin seuraavana päivänä vaihtamalla maljoille medium, johon oli lisätty 2 mM tymidiiniä ja inkuboitui 18 h. Tämän jälkeen solusykli vapautettiin pesemällä maljat kahdesti PBS:llä ja lisäämällä medium ilman tymidiiniä. 9 h inkuboinnin jälkeen toistettiin toinen tymidiinipysäytys kuten edellä ja toinen solusyklin vapautus kuten edellä.

### **9.6.2 Immunosaostus**

Valmisteltiin 400 µl sefaroosihelmiä (Protein G Sepharose 4 fast Flow beads, Cytiva) pesemällä ne 1 ml puskurissa (1 % BSA PBS:ssä) 30 min pyöryksessä huoneenlämmössä. Pesun jälkeen helmet sentrifugoitiin alas 12 000 x g, 30 s ja pestiin PBS:ssä ja sentrifugoitiin uudelleen kuten edellä ja poistettiin supernatantti ja lisättiin 200 µl RIPA-puskuria (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 % NP-40, 0,5 % natriumdeoksikolaatti, 0,1 % SDS, ultrasuodatetussa vedessä), johon oli lisätty proteaasi- (Roche) ja fosfataasi-inhibiittorit (Thermo Fisher), säilytettiin +4 °C käyttöön asti.

9 h toisen solusyklin vapautuksen jälkeen maljat pestiin varovasti kahdesti PBS:llä. Solut kerättiin lyysaamalla RIPA-puskuriin inhibiittoreilla. Viittä 10 cm maljaa kohden 1 ml puskuria jäällä, siirtämällä lyaatti maljalta toiselle. Annettiin lyaautua jäällä 10 min, jonka jälkeen sentrifugoitiin 14 000 x g, 10 min, +4 °C. Esipuhdistusta varten lyaatit yhdistettiin ja lisättiin 150 µl edellä valmistettuja helmiä ja inkuboitui jatkuvassa pyöryksessä 45 min, +4 °C. Inkubaation jälkeen sentrifugoitiin 1000 x g, 1 min, huoneenlämmössä, ja otettiin supernatantti talteen. Mitattiin proteiinikonsentraatio Pierce 660 -proteiinimäärityksellä valmistajan ohjeen mukaan (Pierce 660 nm Protein Assay Reagent, Thermo Fisher).



Immunosaostusta varten lisättiin jokaiseen näytteeseen 3 mg proteiinia ja haluttu määrä vasta-ainetta, esitetty taulukossa 2. Näytteitä inkuboitiin jatkuvassa pyörityksessä +4 °C, yön yli. Jäljelle jääneestä lysaatista tehtiin Western blot lysaattinäytteet lisäämällä RIPA-puskuri ja 20 µl 3x-Laemmli-puskuria, niin että lopullinen proteiinipitoisuus näytteessä oli 1 µg/µl. Vasta-aineinkubaation jälkeen jokaiseen näytteeseen lisättiin 50 µl edellä valmistettuja helmiä ja inkuboitiin 2 h, +4 °C, jatkuvassa pyörityksessä. Tämän jälkeen näytteet pestiin 3 kertaa RIPA-puskurissa, jossa ½ pitoisuus inhibiittoreita, ja 2 kertaa pesupuskurissa (50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Jokaisen pesun välissä sentrifugoitiin 500 x g, 1 min, +4 °C. Viimeisen pesun jälkeen poistettiin supernatantti ja lisättiin 50 µl 3x-Laemmli-puskuria ja varastoitiin -20 °C. Ennen Western blot -ajoa näytteitä keitettiin 10 min, +95 °C. Western blot -ajossa käytettiin valmista 4–15 % gradienttigeeliä (Mini-PROTEAN Precast Gel, Bio-Rad).

**Taulukko 2.** Immunosaostuksen vasta-aineet

Vasta-aine	Määrä (µg)	IgG-kontrolli	Määrä (µg)
Jagged1, 28H8 (2620) Cell Signaling Technology	1	Normal Rabbit IgG 2729 Cell Signaling Technology	1
P53, sc-126 Santa Cruz	0,2	Normal Rabbit IgG 2729 Cell Signaling Technology	0,2

### 9.7 Mitoosikoe

Solusyklin toisen vapautuksen jälkeen näytteitä kerättiin lyysaamalla yksi malja kummastakin solutyypistä tunnin välein alkaen aikapisteestä 8 h vapautuksesta 14 h aikapisteeseen asti. Solut lyysattiin 3x-Laemmli-puskuriin kuten näytteet edellä toisissa kokeissa ja säilöttiin -20 °C Western blot -analyysia varten. Western blotissa käytettiin vasta-aineina fosfo-H3-vasta-ainetta, joka on biomarkkeri mitoosille ja latauskontrollina HSC70-vasta-ainetta.

## 9.8 Immunofluoresenssivärjäys

Immunofluoresenssivärjäyksissä värjättiin MDA-MB-231 villityyppi- ja Jag1KO-soluja, jotta voitiin nähdä kuinka hydroksiureakäsittely vaikutti näihin soluihin ja oliko näiden kahden solutyypin välillä eroja DNA-vaurioiden määrässä. Solut siirrettiin peitelasien päälle edellisenä päivänä ennen käsittelyä. Soluja käsiteltiin hydroksiurealla 24 h, 2 mM pitoisuudella. Käsittelyn jälkeen värjäys aloitettiin pesulla, 3 kertaa +37 °C lämmitetyllä PBS:llä. Pesun jälkeen solut fiksattiin inkuboimalla 4 % (w/V) formaldehydillä PBS:ssä 10 min. Fiksaamisen jälkeen solut pestiin 3 kertaa 5 min PBS:llä, jonka jälkeen solut permeabilisoitiin 0,25 % Triton X-100:lla PBS:ssä 5 min ja tämän jälkeen peitinlaseja blokattiin (3 % BSA + 0,05 % Triton X-100 + 0,25 M glysiini PBS:ssä) 1 tunti huoneenlämmössä. Lisättiin primäärivasta-aineet peitinlaseille solujen päälle;  $\gamma$ -H2AX, laimennettuna 1:500 (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), kloonit JBW301, 05-636, Millipore), ja Jagged1 (Jagged1, 28H8 (2620) Cell Signaling Technology) laimennettuna 1:100. Laimennokset tehtiin puskuriin, joka sisälsi 3 % BSA, + 0,05 % Triton X-100 PBS:ssä. Inkuboitiin 1 tunti huoneenlämmössä tai yön yli +4°C. Tämän jälkeen solut pestiin 3 x 5 min PBS:llä, jonka jälkeen lisättiin sekundäärivasta-aineet (Alexa Fluor™ 555, anti-mouse, Invitrogen, Alexa Fluor™ 488, anti-rabbit, Invitrogen) 1:1000 laimennoksena, mukaan lisättiin myös DAPI (Sigma-Aldrich) 1:1000 laimennoksena, laimennokset tehtiin samaan puskuriin kuin primäärivasta-aineet. Inkuboitiin 1 tunti huoneenlämmössä valolta suojattuna. Pestiin 3 x 5 min PBS:llä ja huuhdeltiin ultrasuodatetulla vedellä. Lopuksi peitinlasit kiinnitettiin mikroskooppilaseille, solupuoli alaspäin, käyttämällä Mowiol-4-88 (Sigma) ja 1,4-diazabisyklo [2.2.2] oktaania (Dabco, Sigma). Näytteet kuvattiin Zeiss LSM880 –mikroskoopilla, 63x-objektiivilla.

## 9.9 Kuvien käsittely ja tulosten analysointi

Western blot -analyysia varten kuvista määritettiin proteiinitasot ImageJ-ohjelman (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) avulla. Tutkittavien näytteiden saadut intensiteetit normalisoitiin kontrollina toimineen HSC70:n intensiteetillä. Saadut tulokset myös summapistenormalisoitiin ja niistä määritettiin keskiarvon keskivirhe (engl.

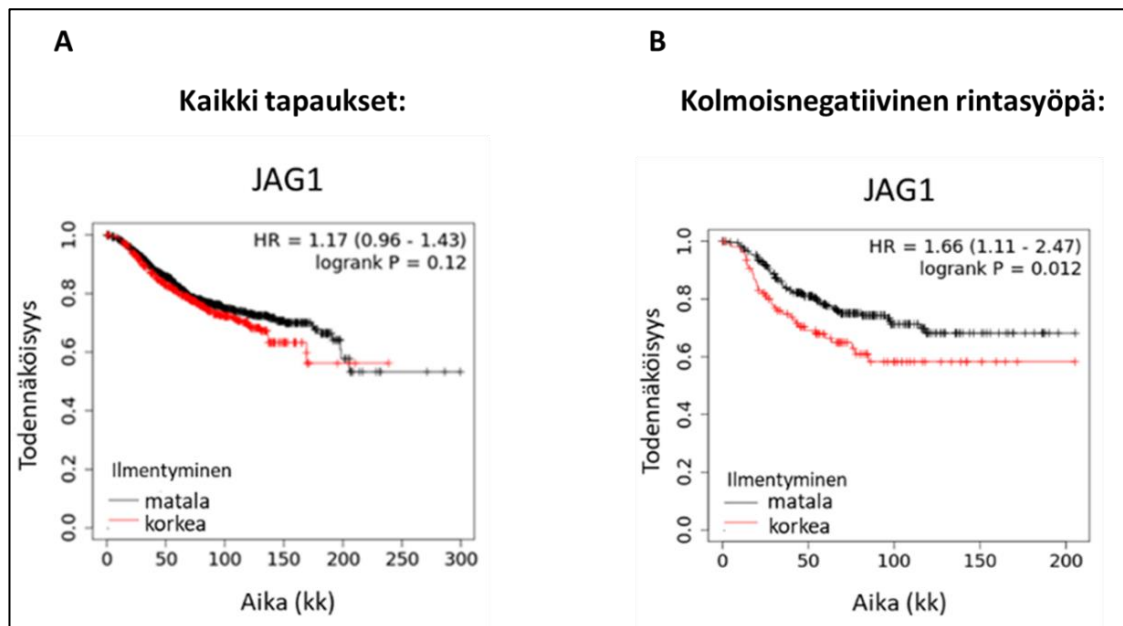
standard error of the mean, SEM) kuvaajia varten. Kuvaajat ja tilastollinen analyysi tehtiin GraphPad Prism® 9 -ohjelmalla. Tilastollisessa analyysissä käytettiin kaksisuuntaista ANOVA-testiä ja tulos oli tilastollisesti merkitsevä, jos  $p < 0,05$ . Myös mikroskooppikuvat käsiteltiin ImageJ-ohjelmalla.

Kaplan-Meier-kuvaajat tehtiin <https://kmplot.com> -sivustolla käyttämällä 216268\_s\_at Jag1:n koetinkokoelmaa ja tarkastelemalla mRNA:n tasoja rintasyövän yhteydessä. Tehtiin erikseen elossaoloennustekuvaajat; kaikki rintasyöpätapaukset (n=1879) sekä kolmoisnegatiivinen rintasyöpä (n= 404).

## 10. Tulokset

### 10.1 Jagged1:n korkea ilmentyminen huonontaa selviämisenustetta kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä

Kaplan-Meier elinaika-analyysin avulla haluttiin nähdä, kuinka korkea Jagged1:n ilmentymisen taso vaikuttaa rintasyövän selviämisenusteseen kaikissa rintasyöpätapauksissa ja erikseen vielä kolmoisnegatiivisen rintasyövän yhteydessä. Tuloksissa nähdään, että korkean Jagged1 mRNA:n ilmentymisen vaikutus huononsi kokonaiselossaoloaikaa tilastollisesti merkitsevästi kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä mutta ei yleisesti kaikkia rintasyöpätapauksia katsottaessa (kuva 5).



**Kuva 5. Jagged1:n korkea ilmentyminen huonontaa elossaoloennustetta kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä.** A) Korkean Jagged1:n ilmentymisen vaikutus kaikissa rintasyöpätapauksissa ( $n=1879$ ), ero ei ole tilastollisesti merkitsevä ( $p=0,12$ ). B) Korkean Jagged1:n ilmentymisen vaikutus kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä ( $n=404$ ). Tässä tapauksessa ero oli tilastollisesti merkitsevä ( $p=0,012$ ) ja korkea ilmentyminen huononsi elossaoloennustetta. Kuva tehty <https://kmplot.com> avulla.

## 10.2 Jagged1:n puuttuminen johtaa alentuneeseen replikaatiostressivasteeseen

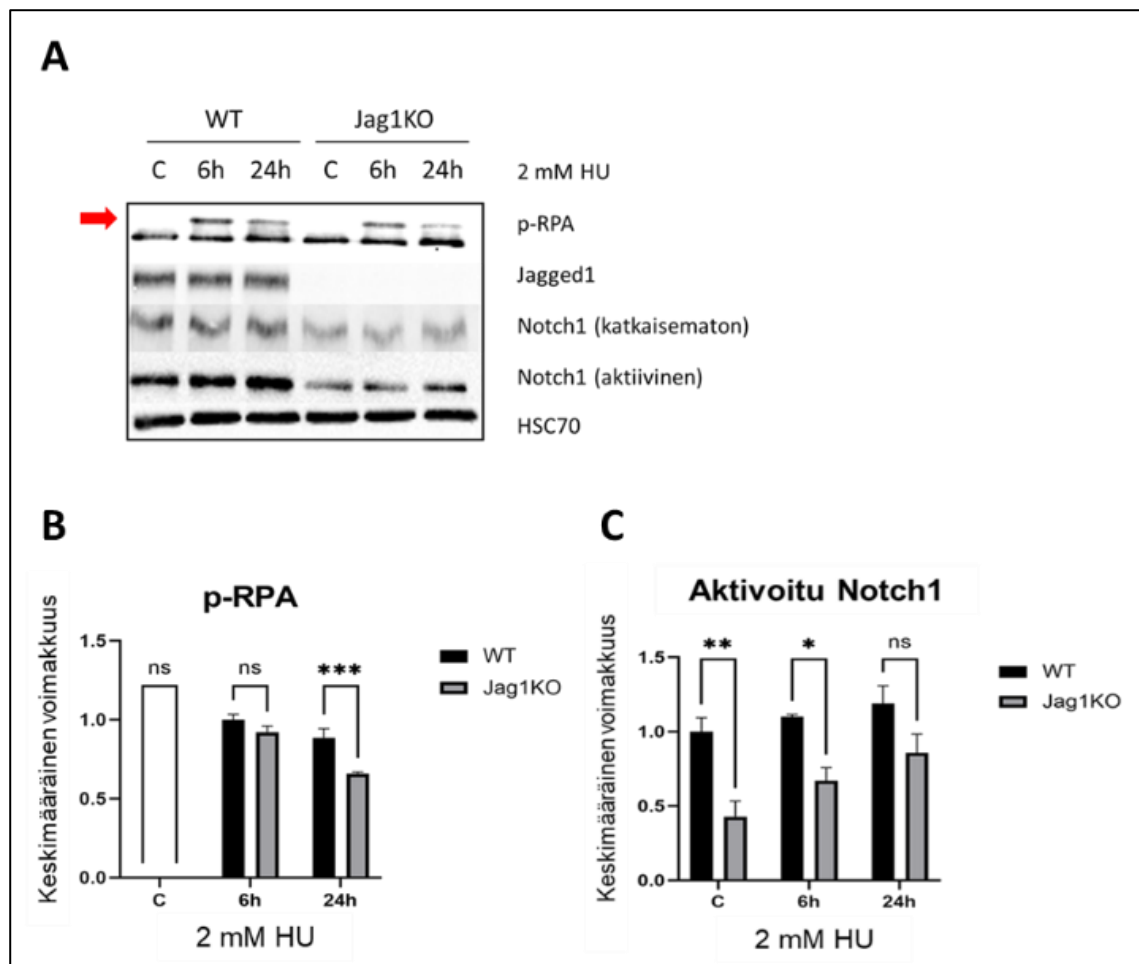
Yksi tutkimuksen tavoitteista oli selvittää, onko Jagged1:llä vaikutus DNA:n korjausmekanismin toimintaan. Vaikutusta tutkittiin mittaamalla soluista proteiinitasolla fosforyloituneen RPA-proteiinin (p-RPA) määrää soluissa, Western blot -menetelmän avulla. p-RPA on tunnettu merkkiaine yksijuosteisista DNA-vaurioista, joita syntyy replikaatiostressin seurauksena. RPA-proteiinin fosforylaatio vaaditaan DNA:n korjausmekanismin toiminnan käynnistymiseen. Mikäli mekanismi ei käynnisty kunnolla on seurauksena replikaatiohaarukan romahdus, joka johtaa DNA:n kaksoisjuosteen vaurioon.

Tutkimusta varten MDA-MB-231-rintasyöpäsolujen villityypille (WT) ja Jagged1-poistogeeniselle (Jag1KO) solulinjalle aiheutettiin replikaatiostressiä käsittelemällä soluja hydroksiurealla (HU) DNA-vaurioiden aiheuttamiseksi. Käsitteilyt tehtiin kahdella eri aikapisteellä; 6 h ja 24 h.

Western blot -tuloksista nähdään, että p-RPA:ta on Jag1KO-soluissa vähemmän verrattaessa WT-soluihin (kuva 6). Tuloksissa on nähtävissä alentuneet ilmentymistasot myös Notch1-proteiinin määrässä molemmissa, sekä katkaisemattomassa että aktiivisessa muodossa. Tuloksista nähdään myös, että kontrollitilanteessa sekä WT- että Jag1KO-soluissa, joita ei käsitelty hydroksiurealla ei ole nähtävissä p-RPA:ta, mistä tiedetään hydroksiureakäsittelyn onnistuneen. Tulosten perusteella voidaan todeta myös, että Jag1KO-solut ovat todella poistogeenisiä, koska Jagged1:tä ei proteiinitasolla näy Jag1KO-näytteiden kohdalla. Jagged1-tasot näyttävät WT-näytteissä pysyvän samanlaisina läpi HU-käsittelyjen. Myös latauskontrollina käytetyn HSC70:n tasot ovat tasaiset kaikissa tutkituissa näytteissä.

Western blot -tuloksista analysoitiin ilmentymistasojen voimakkuus ja saadut arvot normalisoitiin latauskontrollin avulla. Näille tuloksille tehtiin myös tilastollinen analyysi tarkempaa tarkastelua varten. Tuloksien tarkemmassa analysoinnissa nähdään, että ero p-RPA-proteiinin ilmentymisessä WT- ja Jag1KO-solujen välillä on tilastollisesti merkitsevä 24 h aikapisteessä ( $p < 0,05$ , kuva 6).

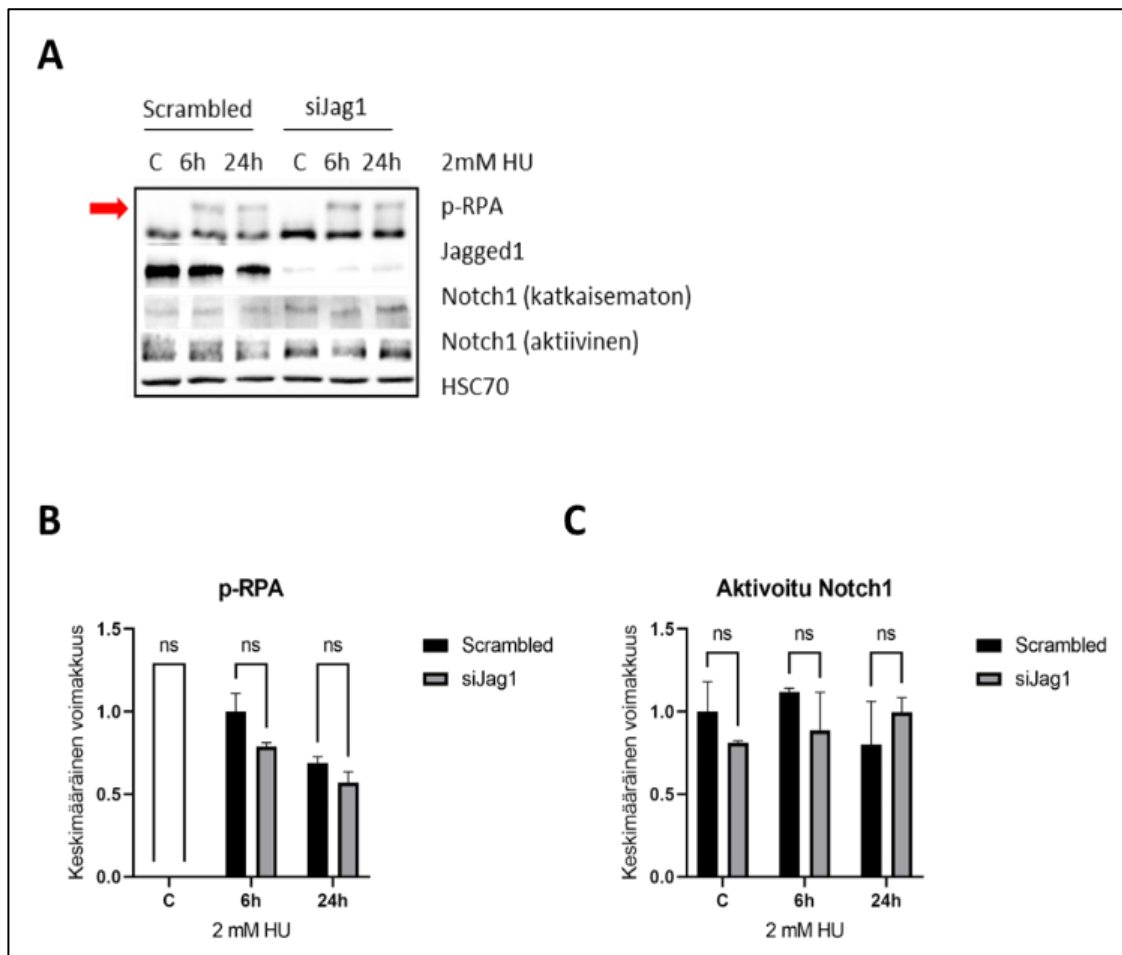
Sekä WT- että Jag1KO-soluissa nähdään myös aktiivisen Notch1:n määrän nousevan korkeammaksi, mitä pidempään HU-käsittely on kestänyt. Aktivoituneen Notch1:n määrä on tilastollisesti merkitsevästi alentunut Jag1KO-soluissa kontrollitilanteessa ja 6 h HU-käsittelyn jälkeen, mutta ei enää 24 tuntia kestäneen käsittelyn jälkeen.



**Kuva 6. Jag1KO-soluissa on alentunut replikaatiostressivaste.** A) Western blot -analyysi: WT- ja Jag1KO-solulinjat käsiteltiin 2 mM hydroksiurealla (HU) 6 h tai 24 h ajan replikaatiostressin aiheuttamiseksi. Tuloksissa nähdään alentuneet proteiinitasot p-RPA:n määrässä, merkitty punaisella nuolella. B) p-RPA-proteiinin ilmentymistasot normalisoituna ja tilastollisesti analysoituna. Ero p-RPA:n määrässä oli tilastollisesti merkitsevä 24 h aikapisteessä ( $p < 0,05$ ) C) Aktivoituneen Notch1:n ilmentymistasot normalisoituna ja tilastollisesti analysoituna. Ero aktivoituneen Notch1:n määrässä oli tilastollisesti merkitsevä ennen käsittelyä sekä 6 h aikapisteessä ( $p < 0,05$ ). Pylväiden korkeudet kuvaavat kolmen toiston summapisten normalisoitua keskimääräistä voimakkuutta ja hajonta on keskiarvon keskivirhe. Käytetty tilastollinen menetelmä oli kaksisuuntainen ANOVA-testi.

Edellä saadun tuloksen varmentamiseksi työ toistettiin myös siRNA-hiljennysmenetelmän avulla, jotta voidaan osoittaa, että edellä saatu tulos ei aiheudu mahdollisesta tahattomasta muutoksesta CRISPR-hiljennyksen yhteydessä. siRNA:n avulla saadaan hiljennettyä valitun geenin ilmentyminen pilkkomalla proteiinia koodaava lähetti-RNA, jolloin haluttua proteiinia ei ilmenny solussa.

Toisella hiljennysmenetelmällä saadut tulokset ovat samansuuntaiset kuin ensimmäiset tulokset. Yksi huomattava ero on se, että p-RPA:n määrä scrambled-kontrollissa laski 24 h aikapisteessä verrattuna 6 h aikapisteeseen. Vastaavaa laskua ei nähty villityyppisolulla. Tulosten tilastollisen analyysin mukaan erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä p-RPA:n määrässä eikä aktiivisen Notch1:n määrässä (kuva 7). Hyvin lähellä tilastollisesti merkitsevää eroa oltiin kuitenkin p-RPA:n määrässä aikapisteessä 6 h ( $p = 0,057$ ). 24 tunnin kohdalla p-RPA:n määrä siJag1-näytteissä näytti laskevan alemmas kuin Jag1KO-soluilla, mutta ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä verrattuna scrambled-kontrolliin, koska siinäkin nähtiin laskua. Ero edellä saatuihin tuloksiin oli myös se, että aktiivisen Notch1:n määrässä ei nähty samanlaista kasvavaa trendiä siRNA-tuloksissa. Saadut tulokset ovat kuitenkin kokonaisuudessaan samansuuntaiset kuin ensimmäiset tulokset. Erot edellä saatuihin tuloksiin voivat johtua siitä, että siRNA-hiljennyksellä ei saavuteta samaa täydellistä hiljennystä mikä poistogeenisillä soluilla on. Tämä voidaan todeta Western blot -tuloksista, joissa siRNA-hiljennyksen jälkeen on nähtävissä Jagged1:tä proteiinitasolla.



**Kuva 7. siJag1-soluissa on alentunut replikaatiostressivaste.** A) Western blot-analyysi: scrambled-kontrollisolut ja Jag1-hiljennetyt solut käsiteltiin 2 mM hydroksiurealla (HU) 6 h tai 24 h ajan replikaatiostressin aiheuttamiseksi. B) p-RPA-proteiinin ilmentymistasot normalisoituna ja tilastollisesti analysoituna. Erot p-RPA:n määrässä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä kummassakaan aikapisteessä, mutta ilmentymistaso on matalampi molemmissa siJag1-näytteissä verrattuna scrambled-kontrolliin. C) Aktivoituneen Notch1:n ilmentymistasot normalisoituna ja tilastollisesti analysoituna. Ero aktivoituneen Notch1:n määrässä ei ole tilastollisesti merkitsevää missään tilanteessa. Pylväiden korkeudet kuvaavat kolmen toiston summapisten normalisoitua keskimääräistä voimakkuutta ja hajonta on keskiarvon keskivirhe. Käytetty tilastollinen menetelmä oli kaksisuuntainen ANOVA-testi.

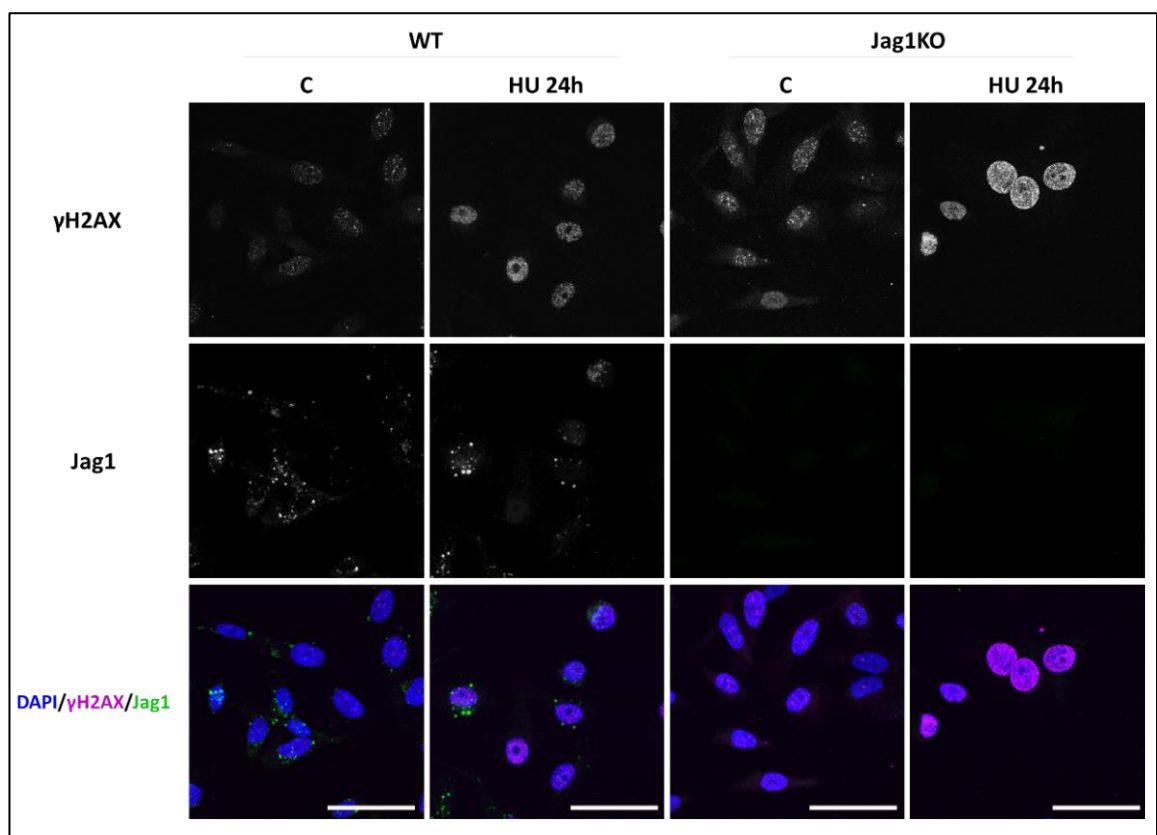
### 10.3 Jagged1:n puuttuminen lisää DNA-vaurioiden määrää

WT- ja Jag1KO-solujen välillä nähtiin ero p-RPA:n määrässä ja tähän liittyen haluttiin nähdä, onko solutyypin välillä eroa vaurioituneen DNA:n määrässä. Tätä varten WT- ja Jag1KO-soluille aiheutettiin jälleen replikaatiostressiä 24 h HU-käsitellyllä. DNA-vaurioiden tarkasteluun käytettiin immunofluoresenssi-värijäystä, joka hyödyntää fluoresoivia vasta-aineita halutun proteiinin havainnollistamisessa. Merkkiaineena DNA-vauriolle käytettiin fosforyloituneen



histoni H2AX:n määrää, joka tunnetaan myös nimellä  $\gamma$ H2AX. Histoni H2AX fosforyloidaan, kun DNA:n kaksoisjuoste vaurioituu, ja näin ollen sitä voidaan käyttää merkkiaineena DNA:n kaksoisjuosteen vaurioille.

Jag1KO-soluissa nähdään enemmän  $\gamma$ H2AX:ää jo verrattaessa käsittelemättömiä kontrollitilanteen soluja. Sama tulos toistuu myös HU-käsitellyissä soluissa; Jag1KO-soluissa voidaan nähdä enemmän DNA-vaurioita (kuva 8). DNA-vaurioiden määrä nousee käsittelyn aikana molemmissa solulinjoissa verrattaessa käsittelemättömiä soluja HU-käsiteltyihin.



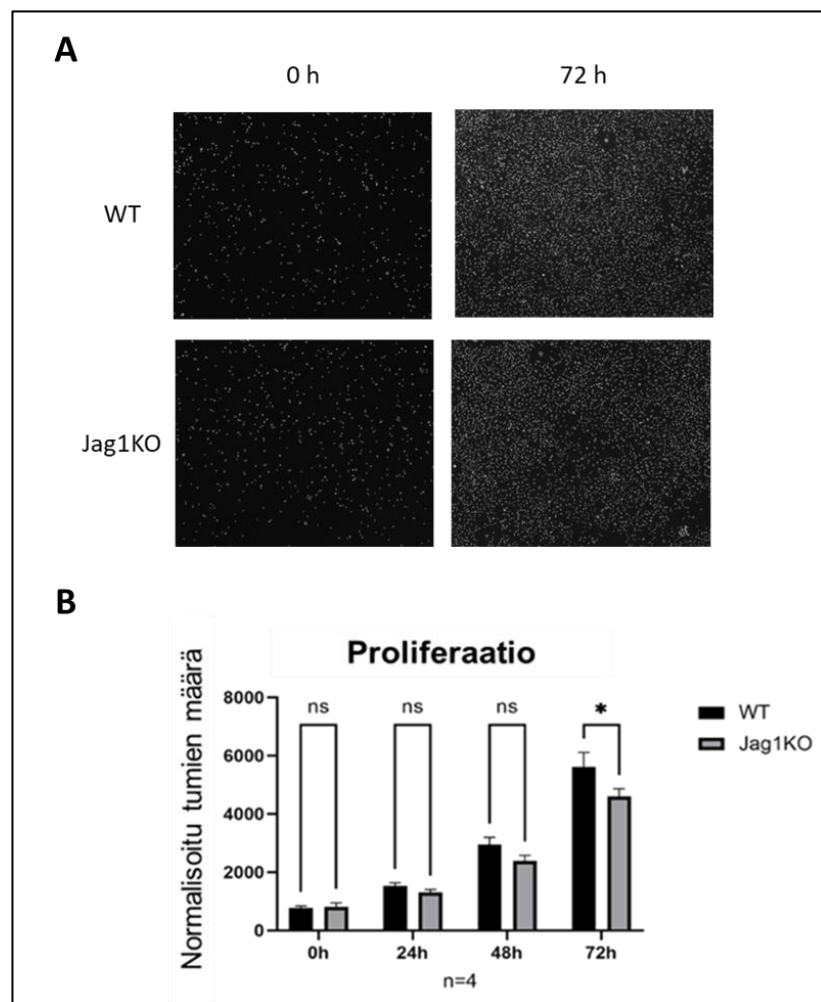
**Kuva 8. Jagged1:n puuttuminen lisää vaurioituneen DNA:n määrää.** WT- ja Jag1KO-soluja käsiteltiin 24 h 2 mM hydroksiurealla (HU), jonka jälkeen soluille tehtiin immunofluoresenssivärjäykset. Merkkiaineena DNA-vaurioiden määrälle toimii  $\gamma$ H2AX, jota nähdään enemmän Jag1KO-soluissa jo kontrollitilanteessa ja myös käsittelyn jälkeen. Jag1-värjäys osoittaa, että Jag1KO-solut eivät ilmennä ollenkaan Jagged1:tä. DAPI-värjäys osoittaa tumien sijainnin. Mittakaavapalkin koko on 50  $\mu$ m.

#### 10.4 Jag1KO-solut kasvavat hitaammin

Tutkimus perustui havaintoon, että Jagged1-poistogeenisiä soluja käsiteltäessä ne tuntuivat kasvavan hitaammin verrattaessa villityypin soluihin. Yksi

tutkimuksen tavoitteista oli osoittaa tämä ero. MDA-MB-231-rintasyöpäsolujen kasvua seurattiin laskemalla tumien eli siten myös solujen määrä neljässä eri aikapisteessä; 0 h, 24 h, 48 h ja 72 h. Soluista värjättiin jokaisen aikapisteen kohdalla tumat kuvien ottamista varten ja sen jälkeen tumien määrä laskettiin.

Ero WT- ja Jag1KO-solujen proliferaatiossa alkoi olla tilastollisesti merkitsevä 72 h aikapisteessä ( $p < 0,05$ , kuva 9). Vaikka erot muissa aikapisteissä eivät olleet tilastollisesti merkitseviä, olivat normalisoidut lasketut tumien määrät korkeammat WT-soluilla myös kaikissa muissa aikapisteissä paitsi 0 h, jossa tumien määrä näyttää olevan onnistuneesti sama.

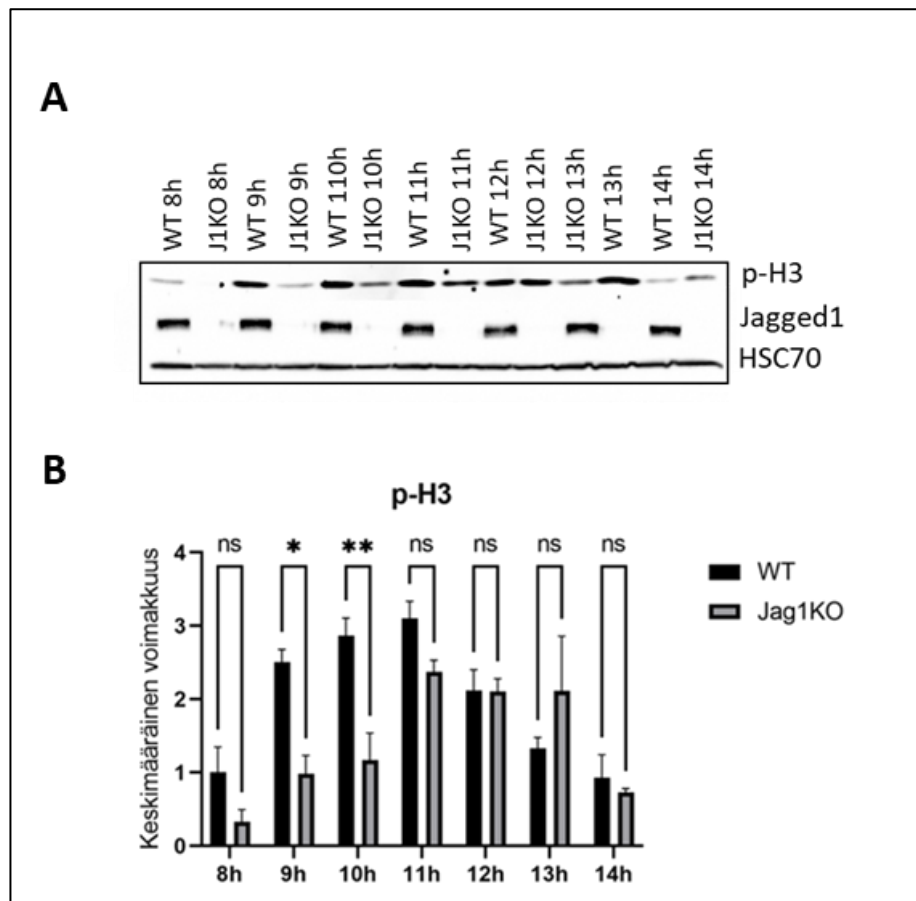


**Kuva 9. MDA-MB-231 Jag1KO-solut kasvavat hitaammin kuin WT solut.** Tumat värjättiin ja tumien määrä laskettiin neljässä eri aikapisteessä; 0 h, 24 h, 48 h ja 72 h. A) Esimerkkikuvat värjätystä tumista ja niiden määrän muutoksesta 0 h – 72 h. B) Aikapisteissä 24 h ja 48 h Jag1KO-soluja on vähemmän verrattaessa WT-soluihin, mutta ero solulinjojen välillä on tilastollisesti merkitsevä vain 72 h aikapisteessä,  $p < 0,05$ . Toistojen määrä kokeessa oli 4 ja tumien määrä on summapistenormalisoitu ja virhepalkki on keskiarvon keskivirhe. Käytetty tilastollinen menetelmä oli kaksisuuntainen ANOVA-testi.

## 10.5 Jag1KO-solujen mitoosi etenee hitaammin

Ryhmässä aikaisemmin saaduissa tuloksissa on nähty viitteitä siitä, että Jagged1:llä olisi rooli mitoosissa ja mitoosin normaalissa etenemisessä. Tämän takia tutkittiin, johtuuko ero WT- ja Jag1KO-solujen kasvussa ongelmista mitoosissa. Tätä varten WT- ja Jag1KO-solujen solusykliit synkronisoitiin kaksoistymidiinikäsittelyllä, jotta solut olisivat mitoottisia samaan aikaan. Tymidiini on DNA:n synteessin estäjä ja estää soluja siirtymästä solusyklin G1-vaiheesta S-vaiheeseen. Eroa mitoosissa tutkittiin proteiinitasolla mittaamalla fosforyloituneen histoni H3:n määrää. Histoni H3 on proteiini, joka fosforyloidaan mitoosissa kromatiinin kondensaation aikana. Fosforyloituneen histoni H3:n määrää seurattiin tunnin välein aikapisteissä 8 h - 14 h solusyklin vapauttamisen jälkeen.

Tuloksista nähdään, että WT-solut etenevät mitoosiin nopeammin kuin Jag1KO-solut ja koko mitoosi etenee solulinjojen välillä eri tahtiin. Ero on tilastollisesti merkitsevä 9 h ja 10 h kohdalla (kuva 10). Molemmat solutyypit saavuttavat korkeimman tason p-H3:n määrässä 11 h kohdalla. Myös 11 h aikapisteessä p-H3:n määrä on selvästi korkeampi WT-soluissa verrattuna Jag1KO-soluihin, mutta ero ei ole tilastollisesti merkitsevä. Ainoa aikapiste, jossa p-H3:n taso oli korkeampi Jag1KO-soluilla oli 13 h, mutta siinä ero ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevä.

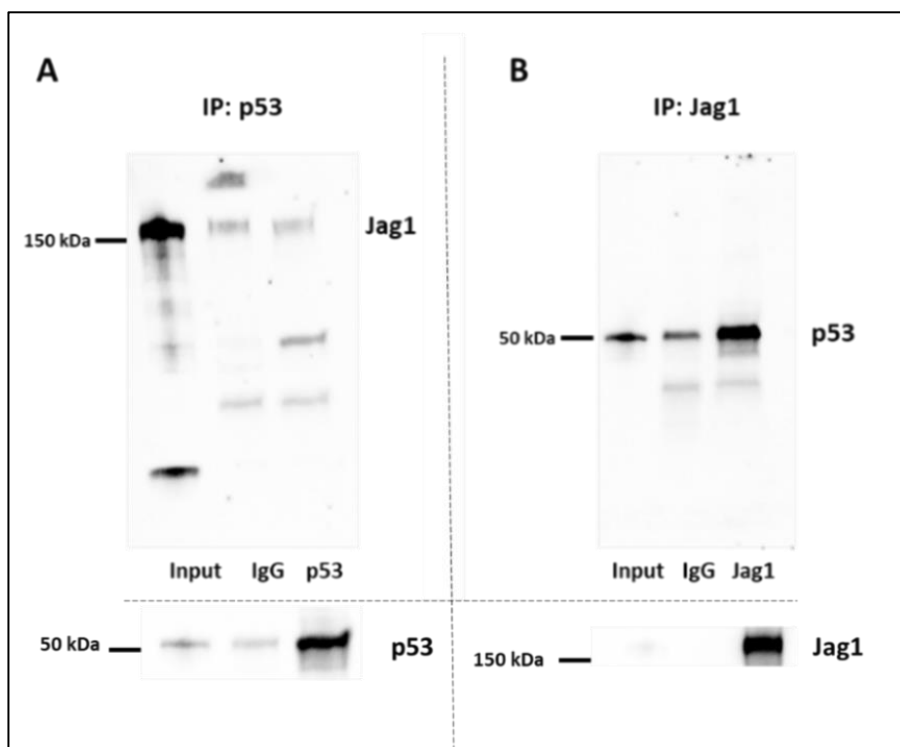


**Kuva 10. MDA-MB-231 Jag1KO-solujen mitoosi on hitaampi verrattaessa WT-soluihin.** Mitoosia seurattiin mittaamalla fosforyloidun histoni H3-proteiinin ilmentymistä. WT-soluissa p-H3 tasot nousivat aikaisemmin ja enemmän kuin Jag1KO-soluissa. Ero solulinjojen välillä on tilastollisesti merkitsevä ( $p < 0,05$ ) aikapisteissä 9 h ja 10 h. Jag1KO-solut eivät saavuta missään vaiheessa yhtä korkeaa ilmentymistasoa p-H3:n määrässä kuin WT-solut, mutta 13 h pisteessä p-H3:n määrä on korkeampi Jag1KO-soluissa kuin WT-soluissa. Pylväiden korkeudet kuvaavat kolmen toiston summapistenormalisoitua keskimääräistä voimakkuutta ja hajonta on keskiarvon keskivirhe. Käytetty tilastollinen menetelmä oli kaksisuuntainen ANOVA-testi.

## 10.6 Jagged1 on vuorovaikutuksessa p53:n kanssa mitoottisissa HEK-soluissa

Yksi tutkimuksen tavoitteista oli varmentaa aikaisemmin ryhmässä massaspektrometrialla saatu tulos Jagged1:n ja p53:n välisestä vuorovaikutuksesta mitoottisissa, Jagged1:tä yli-ilmentävissä HEK-soluissa. Proteiini-proteiinivuorovaikutuksen todentamiseksi hyödynnettiin koimmunosaostusmenetelmää, jossa tietty proteiini saadaan erotettua näytteestä vasta-aineiden avulla ja erottelun jälkeen voidaan tutkia, mitä proteiineja on tullut sitoutuneena erotettuun proteiiniin.

Tutkimusta varten HEK-solujen solusyklit synkronoitiin kaksoistymidiinikäsittelyn avulla saman aikaiseen mitooseen ja käsittelyn jälkeen tehtiin immunosaostus sekä Jagged1- että p53-vasta-aineiden avulla mitoottisille soluille. Tuloksista nähdään, että Jag1:n immunosaostuksen yhteydessä p53-proteiinin tasot ovat huomattavasti korkeammat verrattuna kontrollina toimineeseen IgG-immunosaostusnäytteeseen (kuva 11). Tulos ei kuitenkaan näytä toistuvan toiseen suuntaan vaan p53:n immunosaostusnäytteessä näyttäisi olevan yhtenevät määrät Jag1:tä verrattaessa kontrollina toimineeseen IgG-näytteeseen (kuva 11). Molemmissa tilanteissa haluttu proteiini näkyy selkeästi input-kontrollinäytteissä.



**Kuva 11. Jagged1:n ja p53:n välillä on proteiini-proteiinivuorovaikutus mitoottisissa HEK-soluissa. Vuorovaikutusta tutkittiin solusyklisynkronisoiduissa mitoottisissa HEK-soluissa immunosaostuksen avulla. A) Western blot -analyysi p53:n immunosaostuksesta Jagged1:n määrä ilmennettynä yläpuolelle ja alapuolella p53:n määrä ilmennettynä. B) Western blot -analyysi Jagged1:n immunosaostuksesta p53:n määrä ilmennettynä yläpuolella ja alapuolella Jag1:n määrä ilmennettynä.**

## 11. Tulosten tarkastelu

### 11.1 Jagged1 suojaa DNA:n eheyttä

Tulokset osoittavat DNA-vaurioiden määrän kasvun ja p-RPA-proteiinitasojen laskun Jag1KO-soluissa. Tämän perusteella voidaan päätellä, että DNA:n korjausmekanismi ei käynnisty kunnolla Jag1KO-soluissa, koska replikaatiostressin seurauksena DNA:n yhteen juosteeseen syntynyttä vauriota ei saada korjattua, jolloin seurauksena on replikaatiohaarukan romahdus ja lopulta DNA:n kaksoisjuosteen vaurio, joka nähdään mikroskooppikuivissa  $\gamma$ H2AX:n suuremmasta määrästä.

Kuitenkin jos tarkastellaan myös aktiivisen Notch1:n määrää, joka on lähtötasoltaan matalampi Jag1KO-poistogeenisissä soluissa, tämä tulos voi olla Notch1:n toiminnasta riippuvainen. Erityisesti koska ryhmässä aikaisemmin saadun tuloksen perusteella tiedetään, että Notch1:n hiljentäminen johtaa alentuneeseen replikaatiostressivasteeseen. Näissä Notch1-poistogeenisissä soluissa, joissa havaittiin alentunut replikaatiostressivaste aikaisemmin, nähtiin myös alentunut Jagged1:n ilmentymistaso. Näiden tulosten perusteella ei pystytä sanomaan kumpi olisi tulokseen ajava tekijä, Notch1:n vai Jagged1:n puute. Voidaan kuitenkin todeta perustuen kaikkiin saatuihin tuloksiin, että Notch1:n ja Jagged1:n välinen signalointi on isossa roolissa replikaatiostressivasteen normaalissa toiminnassa ja kumman tahansa puuttuminen johtaa alentuneeseen replikaatiostressivasteeseen. On kuitenkin myös huomioitava, että aktiivisen Notch1:n määrä nousee HU-käsittelyn aikana WT- ja Jag1KO-soluissa, mistä voidaan päätellä, että Jagged1 ei ole ainoa tekijä, joka osallistuu Notch-signaloinnin aktivoimiseen replikaatiostressin aikana.

Käytettäessä siRNA-hiljennystä tulos ei kuitenkaan toistunut niin, että erot olisivat olleet tilastollisesti merkitseviä. Näissä tuloksissa on kuitenkin myös suurempi hajonta toistojen välillä, mikä tekee tilastollisesti merkittävien erojen saamisen haastavaksi. Saatuun tulokseen saattaa vaikuttaa se, että siRNA:n avulla hiljennys ei ole täydellinen, vaan kaikissa Western blot -tulosten toistoissa on nähtävissä pieni määrä Jagged1:tä. Yksi mahdollinen selitys erolle on myös se, että siJag1-soluissa nähdään hiljentymisen välitön vaikutus soluun, kun taas Jag1KO-soluilla on ollut aikaa sopeutua Jagged1:n puuttumiseen. Tulokset olivat

kuitenkin suurilta osin samansuuntaiset eli p-RPA:n määrä oli matalampi sekä Jag1KO- että siJag1-soluissa sekä 6 h että 24 h aikapisteissä verrattuna kontrollisoluihin. siRNA-tuloksissa nähtävä aktiivisen Notch1:n määrän aleneminen ja suuri hajonta 24 h aikapisteellä saattaa selittyä osittain ongelmilla vasta-aineen kanssa, jota oli haastavaa saada aina näkymään kunnolla kuvattaessa, ja kyseisellä vasta-aineella käsitellyt membraanit olivat usein sotkuisempia verrattuna muihin vasta-aineisiin.

Jos edellä saatuja tuloksia haluttaisiin varmentaa vielä lisää, voitaisiin soluista seuraavaksi hiljentää Notch1 ja Jagged1 hyödyntämällä kullekin proteiinille spesifisiä inhibiittoreita. Jag1KO-solujen Jagged1:n puuttumiseen sopeutumisen aikana on myös mahdollisesti ehtinyt muodostua enemmän DNA-vauriota, ja siksi voisi olla hyvä varmentaa myös saatu DNA-vauriotulos siRNA:n avulla.

## **11.2 Jag1KO-solujen jakautuminen ja mitoosin eteneminen on hitaampaa**

Saatu proliferaatiotulos varmentaa solujen käsittelyssä huomattua eroa siitä, että Jag1KO-solut kasvavat hitaammin kuin WT-solut. Ero oli kuitenkin tilastollisesti merkitsevä vasta 72 h aikapisteessä. Saatu proliferaatiotulos voitaisiin vielä varmentaa esimerkiksi hyödyntämällä lusiferaasimenetelmää, jonka avulla voitaisiin seurata adenosiinitrifosfaatin (ATP) määrän muutoksia ja eroja solulinjojen välillä. ATP-tason avulla pystytään kvantifioimaan elävät solut ja sen avulla seurata proliferaatiota. Tulosta voitaisiin varmentaa myös seuraamalla solujen konfluenssia. Tässä kuitenkin ongelmana voisi olla solujen koko ero eri solulinjojen välillä ja myös se, että saman solulinjankin sisällä yksittäiset solut voivat olla hyvinkin erikokoisia. Proliferaatiokokeen aikana nähtiin isoja yksittäisiä soluja muodostuvan sekä WT- että Jag1KO-kasvatuksissa.

Mittaamalla p-H3:n määrä ja seuraamalla mitoosin etenemistä nähtiin, että ilman Jagged1:tä mitoosi käynnistyy hitaammin ja ettei p-H3:n määrä missään vaiheessa nouse yhtä korkeaksi kuin WT-soluissa korkeimmillaan 11 h aikapisteessä, mutta taso on korkeampi Jag1KO-soluilla 13 h aikapisteessä. Ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä. Käytetty p-H3-vasta-aine tunnistaa fosforylaation histoni H3:n seriini 10:ssä. Tämä fosforylaatio tapahtuu siinä vaiheessa, kun solu siirtyy solusyklin G2-vaiheesta M-vaiheeseen. Jagged1:n

puuttuminen näyttäisi siis vaikuttavan solujen kykyyn siirtyä mitooseen. On kuitenkin myös mahdollista, että syy hitaamman proliferaation tai mitoosin taustalla voisi olla tutkimuksessa aikaisemmin osoitettu suurempi DNA-vaurioiden määrä. On osoitettu, että erityisesti mitoosin aikainen DNA-vaurio myös hidastaa mitoosia merkittävästi (Ganem ja Pellman 2012). Tuloksen takana voi myös olla muutokset ATR:n tai ATM:n toiminnassa. Molemmat vaikuttavat esimerkiksi solusyklin S-vaiheen tarkastuspisteen toimintaan ja sitä kautta myös mitoosin etenemiseen.

Jagged1:n hiljentämisen on nähty myös aikaisemmissa tutkimuksissa hidastavan solujen proliferaatiota ja vaikuttavan solusyklin eri vaiheisiin ja näin myös mitoosin etenemiseen. Vaikutus proliferaatioon on nähty esimerkiksi paksusuolen syövän yhteydessä. Samassa tutkimuksessa havaittiin myös, että Jagged1:n hiljennys pysäytti solusyklin G0/G1-siirtymävaiheeseen, eli jo ennen mitoosia paksusuolisyöpäsoluissa. (Dai ja muut 2014.) Jagged1:n hiljentämisen on osoitettu pysäyttävän munasarjasyöpäsolujen solusyklin G2/M-siirtymän kohdalla (Steg ja muut 2011). Jagged1:n vaikutus solusykliin näyttäisi todennäköisesti olevan solutyypispesifinen.

Saadut tulokset ovat odotusten mukaisia, sillä aikaisemmin ryhmässä saatu transkriptomianalyysi osoitti muutoksia solujen kasvuun ja jakautumiseen liittyvissä geeneissä Jag1KO-soluissa verrattuna WT-soluihin. Nämä tulokset varmentavat tätä ensin saatua tulosta siitä, että Jagged1 on soluissa merkittävässä roolissa kasvussa ja jakautumisessa.

### **11.3. Jagged1 on vuorovaikutuksessa p53:n kanssa mitoottisissa HEK-soluissa**

Projektin aikana saatujen tulosten perusteella vuorovaikutusta ei pystytty täysin varmentamaan molempiin suuntiin, sillä p53:n immunosaostuksessa Jagged1:tä näytti olevan yhtä paljon myös IgG-kontrollinäytteessä. Tulos on kuitenkin tämän jälkeen onnistuttu varmentamaan ryhmässä selvästi. Tämän takia on todennäköistä, että immunosaostus ei ole täysin onnistunut koetta suorittaessa. Ongelmia on voinut olla esimerkiksi pesujen yhteydessä, jolloin näytteisiin on saattanut jäädä epäspesifisiä proteiineja häiritsemään. Todennäköisesti syy ei



ole esimerkiksi käytetyissä vasta-aineissa tai siinä, että reagenssit eivät olisi esim. pH-arvoiltaan sopivia, koska selkeä tulos saatiin ryhmässä myöhemmin samoilla vasta-aineilla ja reagensseilla.

Koska p53:n tiedetään olevan mutatoituneena suurimmassa osassa syöpiä, olisi seuraavaksi mielenkiintoista tutkia, että johtaako p53:n mutaatio pro gradu – projektin kokeissa käytetyissä MDA-MB-231-rintasyöpäsoluissa muutokseen Jagged1:n ja p53:n välisessä vuorovaikutuksessa. Tämä voi kuitenkin olla hankala todentaa immunosaostuksen avulla, sillä Jagged1:n määrä kyseisissä soluissa on huomattavasti matalampi kuin käytetyissä HEK-soluissa, jotka yllimentävät Jagged1:tä, ja näin ollen saadun proteiinin määrä voi olla liian matala. Tämän takia tulevaisuudessa tätä yhteyttä voitaisiin tutkia MDA-MB-231-soluissa läheisyysligaatiomenetelmää (engl. proximity ligation assay, PLA) hyödyntämällä. Vuorovaikutuksia voidaan yrittää osoittaa myös hyödyntämällä immunofluoresenssivärjäyksiä ja mikroskopiaa proteiinien sijoittumisen todentamiseen soluissa. Kuitenkin jo erikoistyön aikana mikroskopiassa ongelmaksi osoittautui se, että mitoottiset solut pyörivät ja irtoavat helposti värjäyksen aikana esimerkiksi pesujen yhteydessä.

Aikaisemmin tutkimuksissa on pystytty osoittamaan, että Notch-signaali ja p53 liittyvät toisiinsa. Esimerkiksi aktiivinen Notch eli solunsisäinen osa Notch:sta, on vuorovaikutuksessa p53:n kanssa ja inhiboi sitä estämällä p53:n fosforylaatiota ja transaktivaatiota (S. B. Kim ja muut 2007). Jagged1:n taas on osoitettu säätelevän p53:n toimintaa sydänlihaksen angiogeneettisen vasteen säätelyssä (Guan ja muut 2013). Mutta suoraa mitoosispesifistä vuorovaikutusta Jagged1:n kanssa ei ole nähty aikaisemmin.

Tässä työssä varmennetun p53-yhteyden lisäksi ryhmässä on myös saatu alustavia tuloksia Jagged1:n vuorovaikutuksesta MRN-kompleksin osien kanssa. Nämä vuorovaikutukset vahvistavat tässä tutkimuksessa tehtyä havaintoa siitä, että Jagged1:llä voi olla merkittävä rooli myös DNA-vauriovasteen toiminnassa. Vaatii kuitenkin tarkempia tutkimuksia, jotta saataisiin selville mekanismi, jonka kautta Jagged1 vaikuttaa näihin tekijöihin ja myös tutkimuksia siitä, mitä näille vuorovaikutuksille tapahtuu MDA-MB-231-soluissa ja kuinka mahdolliset muutokset saattavat vaikuttaa DNA:n eheyteen.

Tutkimuksissa on osoitettu useilla DNA-vauriovasteen tekijöillä olevan rooli myös mitosisin säätelyssä (Petsalaki ja Zachos 2020), vaikka niitä on usein pidetty kahtena toisistaan erillisinä prosesseina. Saatujen tulosten perusteella onkin mahdollista, että myös Jagged1 on yksi tällainen tekijä, jolla on rooli sekä mitosisissa että DNA-vauriovasteen toiminnassa.

## 12. Yhteenveto

Kolmoisnegatiivinen rintasyöpä on huonon ennusteen lisäksi myös rintasyöpätyypeistä haastavin hoitaa ja tehokkaille uusille hoitomenetelmille olisi suuri tarve. Tiedetään että solujen nopealla jakautumisella ja kasvulla sekä genomien epävakaudesta on suuri merkitys syövän kehittymisen kannalta.

Tämän pro gradu -työn tavoitteena oli selvittää Notch-ligandi Jagged1:n roolia DNA:n vauriovasteen aktivaatiossa sekä mitoosissa ja solujen proliferaatiossa. Jagged1:llä on havaittu olevan selviämisenustetta merkittävästi huonontava vaikutus erityisesti kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä. Jagged1:n on havaittu vaikuttavan useisiin syövän kehittymistä edistäviin prosesseihin soluissa, mutta tarkempia mekanismeja ei kuitenkaan vielä tunneta kattavasti.

Tutkimuksen aikana pystyttiin osoittamaan Jagged1-poistogeenisissä soluissa suurempi määrä DNA-vauriota sekä alentunut replikaatiostressivaste, minkä perusteella voidaan osoittaa Jagged1:llä olevan rooli DNA-vauriovasteen aktivaatioon ja toimintaan. Lisäksi tutkimuksissa osoitettiin Jagged1:n puuttumisen johtavan hidastuneeseen solujen proliferaatioon sekä solujen siirtymiseen solusyklin G1/S-vaiheesta eteenpäin. Tutkimuksen aikana saatiin myös varmennettua aikaisemmin saatu tulos Jagged1:n ja p53:n välisestä mitoosin aikaisesta proteiini-proteiinivuorovaikutuksesta.

Tulevaisuudessa voisi olla merkittävää saada selville onko tämä DNA:ta suojaava vaikutus ja mitoosin aikainen muutos toisistaan erillisiä rooleja vai jollain tavalla saman mekanismin ajamia prosesseja. Jagged1:n tarkemman roolin selvittäminen olisi merkittävä askel esimerkiksi kolmoisnegatiivisen rintasyövän hoitojen kehittymiseen.

### 13. Lähteet

- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3983–3988.
- Altevogt, P., Sammar, M., Hüser, L. & Kristiansen, G. (2021) Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *Int J Cancer* **148**:546–559.
- Aster, J. C., Pear, W. S. & Blacklow, S. C. (2017) The Varied Roles of Notch in Cancer. *Annu Rev Pathol* **12**:245–275.
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., ... Farahmand, L. (2020) Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology* **84**:106535.
- Bhola, N. E., Jansen, V. M., Koch, J. P., Li, H., Formisano, L., Williams, J. A., ... Arteaga, C. L. (2016) Treatment of Triple-Negative Breast Cancer with TORC1/2 Inhibitors Sustains a Drug-Resistant and Notch-Dependent Cancer Stem Cell Population. *Cancer Res* **76**:440–452.
- Bray, S. J. (2006) Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:678–689.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. & Chen, D. J. (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**:42462–42467.
- Butti, R., Gunasekaran, V. P., Kumar, T. V. S., Banerjee, P. & Kundu, G. C. (2019) Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* **107**:38–52.
- Carusillo, A. & Mussolino, C. (2020) DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells* **9**:1665.

- Chatterjee, N. & Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* **58**:235–263.
- Chaudhary, L. N., Wilkinson, K. H. & Kong, A. (2018) Triple-Negative Breast Cancer: Who Should Receive Neoadjuvant Chemotherapy? *Surg Oncol Clin N Am* **27**:141–153.
- Chekhun, S. V., Zadvornyy, T. V., Tymovska, Y. O., Anikusko, M. F., Novak, O. E. & Polishchuk, L. Z. (2015) CD44+/CD24- markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Exp Oncol* **37**:58–63.
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A. & Freeman, J. W. (2018) The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. *J Hematol Oncol* **11**:64.
- Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. & Jaenisch, R. (1998) DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* **395**:89–93.
- Cp, K., Mi, A., L, B., T, F., Je, G., Mc, G., ... D, M. (2017) Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **23**.
- Dai, Y., Wilson, G., Huang, B., Peng, M., Teng, G., Zhang, D., ... Qiao, L. (2014) Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer. *Cell Death Dis* **5**:e1170–e1170.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., ... Narod, S. A. (2007) Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* **13**:4429–4434.

- Dickson, B. C., Mulligan, A. M., Zhang, H., Lockwood, G., O'Malley, F. P., Egan, S. E. & Reedijk, M. (2007) High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* **20**:685–693.
- Duffy, M. J., Synnott, N. C. & Crown, J. (2018) Mutant p53 in breast cancer: Potential as a therapeutic target and biomarker. *Breast Cancer Res Treat* **170**:213–219.
- Duijf, P. H. G., Nanayakkara, D., Nones, K., Srihari, S., Kalimutho, M. & Khanna, K. K. (2019) Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. *Trends in Molecular Medicine* **25**:595–611.
- Dupré, A., Boyer-Chatenet, L. & Gautier, J. (2006) Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Struct Mol Biol* **13**:451–457.
- Eliezer, Y., Argaman, L., Kornowski, M., Roniger, M. & Goldberg, M. (2014) Interplay between the DNA damage proteins MDC1 and ATM in the regulation of the spindle assembly checkpoint. *J Biol Chem* **289**:8182–8193.
- Fan, X., Mikolaenko, I., Elhassan, I., Ni, X., Wang, Y., Ball, D., ... Eberhart, C. G. (2004) Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* **64**:7787–7793.
- Gaillard, H., García-Muse, T. & Aguilera, A. (2015) Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* **15**:276–289.
- Ganem, N. J. & Pellman, D. (2012) Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J Cell Biol* **199**:871–881.
- Giunta, S., Belotserkovskaya, R. & Jackson, S. P. (2010) DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol* **190**:197–207.

- Grochowski, C. M., Loomes, K. M. & Spinner, N. B. (2016) Jagged1 (JAG1): Structure, expression, and disease associations. *Gene* **576**:381–384.
- Guan, A., Gong, H., Ye, Y., Jia, J., Zhang, G., Li, B., ... Zou, Y. (2013) Regulation of p53 by jagged1 contributes to angiotensin II-induced impairment of myocardial angiogenesis. *PLoS One* **8**:e76529.
- Guarnaccia, C., Pintar, A. & Pongor, S. (2004) Exon 6 of human Jagged-1 encodes an autonomously folding unit. *FEBS Lett* **574**:156–160.
- Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A. & Lahav, G. (2019) The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**:199–210.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57–70.
- Heijink, A. M., Krajewska, M. & van Vugt, M. A. T. M. (2013) The DNA damage response during mitosis. *Mutat Res* **750**:45–55.
- Hong, R. & Xu, B. (2022) Breast cancer: An up-to-date review and future perspectives. *Cancer Commun (Lond)* **42**:913–936.
- Hossain, F., Sorrentino, C., Ucar, D. A., Peng, Y., Matossian, M., Wyczechowska, D., ... Miele, L. (2018) Notch Signaling Regulates Mitochondrial Metabolism and NF- $\kappa$ B Activity in Triple-Negative Breast Cancer Cells via IKK $\alpha$ -Dependent Non-canonical Pathways. *Front Oncol* **8**:575.
- Ingvarsson, S. (2006) Genomic Instability and Breast Cancer Progression. *Cancer Genomics Proteomics* **3**:137–146.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C. M., Lukas, J. & Jackson, S. P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**:37–45.

- Kalimutho, M., Nones, K., Srihari, S., Duijf, P. H. G., Waddell, N. & Khanna, K. K. (2019) Patterns of Genomic Instability in Breast Cancer. *Trends Pharmacol Sci* **40**:198–211.
- Kim, E. M. & Burke, D. J. (2008) DNA Damage Activates the SAC in an ATM/ATR-Dependent Manner, Independently of the Kinetochore. *PLoS Genet* **4**:e1000015.
- Kim, S. B., Chae, G. W., Lee, J., Park, J., Tak, H., Chung, J. H., ... Joe, C. O. (2007) Activated Notch1 interacts with p53 to inhibit its phosphorylation and transactivation. *Cell Death Differ* **14**:982–991.
- Kitao, H., Iimori, M., Kataoka, Y., Wakasa, T., Tokunaga, E., Saeki, H., ... Maehara, Y. (2018) DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Sci* **109**:264–271.
- Kreso, A. & Dick, J. E. (2014) Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* **14**:275–291.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y. & Dunphy, W. G. (2006) TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**:943–955.
- Kuo, L. J. & Yang, L.-X. (2008) Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* **22**:305–309.
- Laughney, A. M., Elizalde, S., Genovese, G. & Bakhoun, S. F. (2015) Dynamics of Tumor Heterogeneity Derived from Clonal Karyotypic Evolution. *Cell Rep* **12**:809–820.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y. & Pietenpol, J. A. (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **121**:2750–2767.



- Levine, A. J. (2020) p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer* **20**:471–480.
- Li, D., Masiero, M., Banham, A. H. & Harris, A. L. (2014) The notch ligand JAGGED1 as a target for anti-tumor therapy. *Front Oncol* **4**:254.
- Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. (2010) Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* **6**:89–97.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J. & Weinmaster, G. (1995) Jagged: A mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**:909–917.
- Masiero, M., Li, D., Whiteman, P., Bentley, C., Greig, J., Hassanali, T., ... Banham, A. H. (2019) Development of Therapeutic Anti-JAGGED1 Antibodies for Cancer Therapy. *Mol Cancer Ther* **18**:2030–2042.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., ... Elledge, S. J. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**:1160–1166.
- Miao, K., Lei, J. H., Valecha, M. V., Zhang, A., Xu, J., Wang, L., ... Deng, C.-X. (2020) NOTCH1 activation compensates BRCA1 deficiency and promotes triple-negative breast cancer formation. *Nat Commun* **11**:3256.
- Minocherhomji, S., Ying, S., Bjerregaard, V. A., Bursomanno, S., Aleliunaite, A., Wu, W., ... Hickson, I. D. (2015) Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* **528**:286–290.
- Morgan, T. H. (1917) The theory of the gene.
- Morris, G. J., Naidu, S., Topham, A. K., Guiles, F., Xu, Y., McCue, P., ... Mitchell, E. P. (2007) Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: A single-institution

- compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* **110**:876–884.
- Musiałek, M. W. & Rybaczek, D. (2021) Hydroxyurea-The Good, the Bad and the Ugly. *Genes (Basel)* **12**:1096.
- Musse, A. A., Meloty-Kapella, L. & Weinmaster, G. (2012) Notch ligand endocytosis: Mechanistic basis of signaling activity. *Semin Cell Dev Biol* **23**:429–436.
- Nam, E. A. & Cortez, D. (2011) ATR signalling: More than meeting at the fork. *Biochem J* **436**:527–536.
- Nowell, C. S. & Radtke, F. (2017) Notch as a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* **17**:145–159.
- O'Connor, C. J., Chen, T., González, I., Cao, D. & Peng, Y. (2018) Cancer stem cells in triple-negative breast cancer: A potential target and prognostic marker. *Biomark Med* **12**:813–820.
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., ... Bernard, P. S. (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* **27**:1160–1167.
- Petsalaki, E. & Zachos, G. (2020) DNA damage response proteins regulating mitotic cell division: Double agents preserving genome stability. *FEBS J* **287**:1700–1721.
- Radtke, F. & Raj, K. (2003) The role of Notch in tumorigenesis: Oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* **3**:756–767.
- Ranganathan, P., Weaver, K. L. & Capobianco, A. J. (2011) Notch signalling in solid tumours: A little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer* **11**:338–351.

- Reedijk, M., Pinnaduwege, D., Dickson, B. C., Mulligan, A. M., Zhang, H., Bull, S. B., ... Andrulis, I. L. (2008) JAG1 expression is associated with a basal phenotype and recurrence in lymph node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **111**:439–448.
- Rizzo, P., Miao, H., D'Souza, G., Osipo, C., Song, L. L., Yun, J., ... Miele, L. (2008) Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. *Cancer Res* **68**:5226–5235.
- Saldivar, J. C., Cortez, D. & Cimprich, K. A. (2017) The essential kinase ATR: Ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**:622–636.
- Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G. & Kang, Y. (2011) Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* **19**:192–205.
- Shiovitz, S. & Korde, L. A. (2015) Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Ann Oncol* **26**:1291–1299.
- Siebel, C. & Lendahl, U. (2017) Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev* **97**:1235–1294.
- Silwal-Pandit, L., Vollan, H. K. M., Chin, S.-F., Rueda, O. M., McKinney, S., Osako, T., ... Langerød, A. (2014) TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin Cancer Res* **20**:3569–3580.
- Steg, A. D., Katre, A. A., Goodman, B., Han, H.-D., Nick, A. M., Stone, R. L., ... Landen, C. N. (2011) Targeting the notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **17**:5674–5685.

- Stephens, P. J., Tarpey, P. S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D. C., ... Stratton, M. R. (2012) The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* **486**:400–404.
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J. & Jackson, S. P. (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**:1213–1226.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **71**:209–249.
- Takebe, N., Nguyen, D. & Yang, S. X. (2014) Targeting Notch signaling pathway in cancer: Clinical development advances and challenges. *Pharmacology & Therapeutics* **141**:140–149.
- Terasawa, M., Shinohara, A. & Shinohara, M. (2014) Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4. *PLoS Genet* **10**:e1004563.
- Vassin, V. M., Anantha, R. W., Sokolova, E., Kanner, S. & Borowiec, J. A. (2009) Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *J Cell Sci* **122**:4070–4080.
- Vermezovic, J., Adamowicz, M., Santarpia, L., Rustighi, A., Forcato, M., Lucano, C., ... d'Adda di Fagagna, F. (2015) Notch is a direct negative regulator of the DNA-damage response. *Nat Struct Mol Biol* **22**:417–424.
- Vousden, K. H. & Prives, C. (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**:413–431.

- Won, K.-A. & Spruck, C. (2020) Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol* **57**:1245–1261.
- Xiu, M.-X., Liu, Y.-M. & Kuang, B.-H. (2020) The oncogenic role of Jagged1/Notch signaling in cancer. *Biomed Pharmacother* **129**:110416.
- Yamauchi, H. & Takei, J. (2018) Management of hereditary breast and ovarian cancer. *Int J Clin Oncol* **23**:45–51.
- Yang, S. S., Yeh, E., Salmon, E. D. & Bloom, K. (1997) Identification of a mid-anaphase checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol* **136**:345–354.
- Yeo, S. K. & Guan, J.-L. (2017) Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends Cancer* **3**:753–760.