



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

***HOXB13*-poistogeenisten eturauhassyöpäsolumallien luominen CRISPR-Cas9-menetelmällä**

Karttunen Janina

Biologia (Fysiologia ja Genetiikka)
Pro gradu -tutkielma
Laajuus: 30 op

Ohjaajat:
Christoffer Löf
Johanna Schleutker
Christina Nokkala

7.6.2022
Turku

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Biologia, Fysiologia ja Genetiikka

Tekijä: Janina Karttunen

Otsikko: *HOXB13*-poistogeenisten eturauhassyöpäsolumallien luominen CRISPR-Cas9-menetelmällä

Ohjaajat: Christoffer Löf, Johanna Schleutker, Christina Nokkala

Sivumäärä: 56 sivua

Päivämäärä: 7.6.2022

Eturauhassyöpä on miesten yleisimpiin kuuluva syöpätyyppi. Sen kehittymiseen vaikuttavat muun muassa ikä ja etninen tausta. Myös perinnöllisyydellä on vaikutus syövän puhkeamiseen. Yksi tunnettu eturauhassyövälle altistava perintötekijä on *HOXB13*-geenin G84E-variantti, jonka on esitetty olevan suomalainen perustajamutaatio. Runsaasta tutkimuksesta huolimatta tarkkaa syövälle altistavaa mekanismia ei ole kuvailtu. Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää protokolla ja luoda *HOXB13*-poistogeenisiä eturauhassyöpäsolumalleja tutkimustarkoituksiin käyttäen CRISPR-Cas9 -menetelmää. Työhön suunniteltiin kaksi ohjain-RNA-sekvenssiä, joiden perusteella kohdennetun kaksijuosteisen DNA:n katkaisemisen seurauksena geenistä oli tarkoitus poistua osa, samalla tuhoten normaalin lukukehyksen. Käyttövalmiita solulinjoja ei kuitenkaan tutkielman puitteissa saatu tehtyä. Tuloksia tarkastellessa huomattiin, että toinen ohjain-RNA ohjasi Cas9-nukleaasin katkaisemaan DNA:n yhden emäksen verran eri kohdasta kuin mitä oletettiin, ja tämän seurauksena lukukehys säilyi. Menetelmä vaatii siis vielä optimointia, ja uusintayrityksiä tarvitaan solulinjojen muodostamiseksi, mutta perusta toimivan protokollan aikaansaamiseksi on olemassa.

Avainsanat: Eturauhassyöpä, *HOXB13*, CRISPR-Cas9

Master's thesis

Subject: Biology, Physiology and Genetics

Author: Janina Karttunen

Title: Generation of *HOXB13* knockout cellular prostate cancer models with CRISPR-cas9

Supervisors: Christoffer Löf, Johanna Schleutker, Christina Nokkala

Number of pages: 56 pages

Date: 7.6.2022

Prostate cancer is one of the most common type of cancer in men. For example age and ethnical background have an effect on the susceptibility of developing prostate cancer. Inherited factors also affect its development. One known susceptibility factor is G84E variant of *HOXB13*, which has been considered as a Finnish founder's mutation. Despite of research, the precise mechanism of cancer progression caused by the G84E variant remains elusive. The aim of this thesis was to develop a protocol and generate *HOXB13* knockout cellular prostate cancer models for research purposes using CRISPR-cas9. Two guide-RNAs were designed and by using these guides, a reading frame disrupting segment was supposed to be removed from the gene. Within the framework of the thesis generating usable cellular models was not successful. When analyzing the results, it was observed that one of the guides generated a cut differing one base pair from the target, which resulted in preservation of the reading frame. The protocol is thus in need of optimization and further attempts are needed to produce proper cellular models, but there is a solid foundation for generating a functional protocol.

Key words: Prostate cancer, *HOXB13*, CRISPR-Cas9

Sisällys

LYHENTEET	1
1. JOHDANTO	3
1.1 Eturauhassyöpä	4
1.1.1 Eturauhanen.....	4
1.1.2 Eturauhassyöpätyypit ja yleisimmät metastaatiokohteet.....	6
1.1.3 Oireet, diagnosointi ja hoito.....	6
1.1.4 Riskitekijät	7
1.2 Homeoboksin sisältävät geenit ja proteiinit, HOXB13	8
1.2.1 Homeoboksin sisältävät geenit ja proteiinit	8
1.2.2 <i>HOXB13</i>	10
1.3 HOXB13 ja eturauhassyöpä	12
1.4 CRISPR-Cas9	13
1.4.1 Historia.....	13
1.4.2 CRISPR-Cas-systeemit ja toiminta tiivistettynä, Cas9	14
1.4.3 Geneettinen muokkaus CRISPR-Cas9-menetelmällä	16
1.4.4 Poistogeenisten solujen tuotanto CRISPR-Cas9-menetelmällä	18
1.5 Tutkimusasetelma ja työn tarkoitus	19
2. AINEISTO JA MENETELMÄT	20
2.1 Poistogeeniplasimidikonstruktioiden luominen, kloonaukseen DH5α-bakteerisoluihin, kloonattujen plasmidien eristys ja sekvensointi	20
2.2 Solulinjat ja soluviljely	21
2.2.1 PC-3.....	21
2.2.2 LNCaP.....	22
2.3 PX459-plasimidikonstruktion transfektio PC-3- ja LNCaP-soluihin, transfektoituneiden solujen selektio, LNCaP-solujen PCR	22
2.4 PX459-plasimidikonstruktion transfektion optimoiminen PC-3-soluilla	24
2.5 PX458-plasimidikonstruktion transfektio PC-3-soluihin	24
2.6 PX459- ja PX458-transfektioitujen PC-3-solujen PCR	25
2.7 PX458-plasimidikonstruktion transfektio LNCaP-soluihin, solujen PCR	25
2.8 PX459-transfektioitujen PC-3-solujen yksittäissolujaottelu solukloonien muodostamiseksi, kloonien PCR	26
2.9 PX458-transfektioitujen PC-3-solujen yksittäissolujaottelu solukloonien muodostamiseksi	26
2.10 PX458-transfektioitujen LNCaP-solujen yksittäissolujaottelu solukloonien muodostamiseksi	27
2.11 DNA:n eristys ja PCR valmiille kloonille	28
2.12 Joidenkin PCR-tuotteiden eristys geeliltä ja sekvensointi, PC-3-kloonin 40 PCR:n uusiminen, PCR-tuotteen puhdistus sekä sekvensointi	29
2.13 Proteiinin eristys, proteiinkonsentraation määrittäminen ja western blot	29
2.14 CRISPR-Cas9-strategia tiivistettynä	31
3. TULOKSET	33
3.1 PCR-ajojen tulokset agarosigeelillä	33
3.2 Sekvensointitulokset	43
3.3 Western blot -analyysi	45
3.4 Tulosten yhteenveto	46
4. POHDINTA	47
LÄHTEET	51

LYHENTEET

BCA	Bisinkoniinihappo (engl. Bicinchonic acid)
BCHE	Pseudokoliiniesteraasi (engl. Pseudocholinesterase)
Bp	Emäspari (engl. Base pair)
BSA	Naudan seerumin albumiini (engl. Bovine serum albumin)
Cas	CRISPR:iin liittyvät (engl. CRISPR associated)
CRISPR	Säännöllisesti levittäytyneet lyhyet palindromiset toistojaksot (engl. Clustered regularly interspaced palindromic repeats)
crRNA	CRISPR RNA
DTT	Ditiotreitoli (engl. Dithiothreitol)
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
FACS	Fluoresenssiaktivoitu solujaottelu (engl. Fluorescence-activated cell sorting)
FBS	Naudan sikiön seerumi (engl. Fetal bovine serum)
GFP	Vihreä fluoresenssi proteiini (engl. Green fluorescent protein)
HDR	Homologiohjattu korjaus (engl. Homology directed repair)
HOX	Homeoboksi (engl. Homeobox)
LB	Engl. Lysogeny broth
MEM	Engl. Minimal Essential Medium
NHEJ	Ei-homologisten päiden yhdistäminen (engl. Nonhomologous end joining)
NP-40	Engl. Nonidet P-40
Opti-MEM	Optimoitu MEM (kts. MEM)
PAM	Protospacer-alueen viereinen alue (Engl. Protospacer adjacent motif)
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. Phosphate buffered saline)
PI	PAM:n kanssa interaktoiva (engl. PAM interacting) (kts. PAM)
PSA	Eturauhasspesifinen antigeeni (engl. Prostate specific antigen)
<i>RB</i>	Retinoblastooma geeni (engl. Retinoblastoma gene)

RIPA	Radioimmunopresipitaatioanalyysipuskuri Radioimmunoprecipitation assay buffer)	(engl.
RPMI	Engl. Roswell Park Memorial Institute (elatusaine)	
SDS	Natriumdodesyyilisulfaatti (engl. Sodium dodecyl sulfate)	
SOC	Engl. Super Optimal broth with Catabolite repression	
TALEN	Transkriptioaktivaattorin kaltainen efektorinukleaasi (engl. Transcription activator-like effector nuclease)	
TBS	Tris-puskuroitu suolaliuos (engl. Tris-buffered saline) (kts. Tris)	
TE	Tris-EDTA (kts. Tris ja EDTA)	
TNFSF	Tuumorinekroositekijä superperhe (engl. Tumor necrosis factor superfamily)	
tracrRNA	Transaktivoiva CRISPR RNA (engl. Trans-activating CRISPR RNA)	
Tris	Tris(hydroksimetyyli)aminometaani Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	(engl.

1. JOHDANTO

Syöpä on yleisnimitys erilaisille taudeille, joissa elimistön omat solut alkavat lisääntyä kontrolloimattomasti. Syöpiä voidaan luokitella muun muassa sen perusteella, mistä elimestä tai solutyypistä se saa alkunsa. Karsinooma on nimitys syöville, jotka saavat alkunsa epiteelisoluista. Karsinoomat jakautuvat edelleen sen perusteella, millaisesta epiteelikudoksesta on kyse: esimerkiksi adenokarsinooma on lähtöisin rauhasepiteelistä. Sarkoomat ovat syöpiä, jotka saavat alkunsa tukikudoksesta esimerkiksi lihaksista. Leukemia tarkoittaa syöpää, joka on lähtöisin luuytimen verta tuottavista soluista. Lymfoomat saavat alkunsa lymfosyyteistä. Näiden lisäksi on olemassa myös muita syöpätyyppejä. (Carbone 2020.)

Kun solu muuttuu syöpäsoluksi, siihen kertyy runsaasti erilaisia geneettisiä muutoksia, jotka antavat solulle syöväälle tyypillisiä, elinkykyä parantavia piirteitä. Hanahan ja Weinberg (2000) määrittelivät artikkelissaan syöville yleiset tuntomerkit (hallmarks of cancer). Nämä tuntomerkit ovat omavaraisuus kasvusignaaleille, piittaamattomuus kasvua rajoittavista signaaleista kohtaan, kyky vältellä apoptoosia, kyky tunkeutua kudoksiin ja metastoitua, rajoittamaton replikaatiopotentiaali sekä angiogeenin ylläpito. Tieteellinen syöpätutkimus keskittyy kaikkiin näihin syövän eri piirteisiin ja tutkimuksen kautta voidaan saada arvokasta tietoa eri mekanismien yksittäis- ja yhteisvaikutuksista.

Geneettiset muutokset, joita soluihin syövässä kertyy, saavat alkunsa proto-onkogeneista tai tuumorisuppressorigeeneistä. Proto-onkogeeni muuttuu syöpää aiheuttavaksi onkogeeniksi, kun siihen syntyy joku uusi kasvua edistävä (gain of function) mutaatio (Stehelin ym. 1976). Tällöin riittää, että vain toinen alleeli mutatoituu. Tuumorisuppressorit ovat geenejä, jotka säätelevät solun jakautumista. Kun niissä tapahtuu toiminnan tuhoava mutaatio (loss of function), voi solu alkaa jakautua kontrolloimattomasti. Yleensä tällöin molempien alleelien täytyy mutatoitua, jotta muutos näkyy solussa (Knudson 1971).

Syöpätutkimus on tärkeää sekä yksilön että yhteiskunnan kannalta. Lisääntynyt tietämys syövän kehityksen mekanismeista on johtanut erilaisten hoitokeinojen sekä diagnostisten menetelmien kehittämiseen, mikä on vuorostaan laskenut syövästä aiheutuvia kustannuksia (Torkki ym. 2018). Taloudellisten kustannusten lisäksi syöpä voi aiheuttaa

suuria kustannuksia yksilön elämänlaadulle, joten tutkimusten lisäämän tietämyksen kautta saavutettu parempi hoitovaste ja eloonjäämisodote voivat olla yksilölle mittaamattoman arvokkaita.

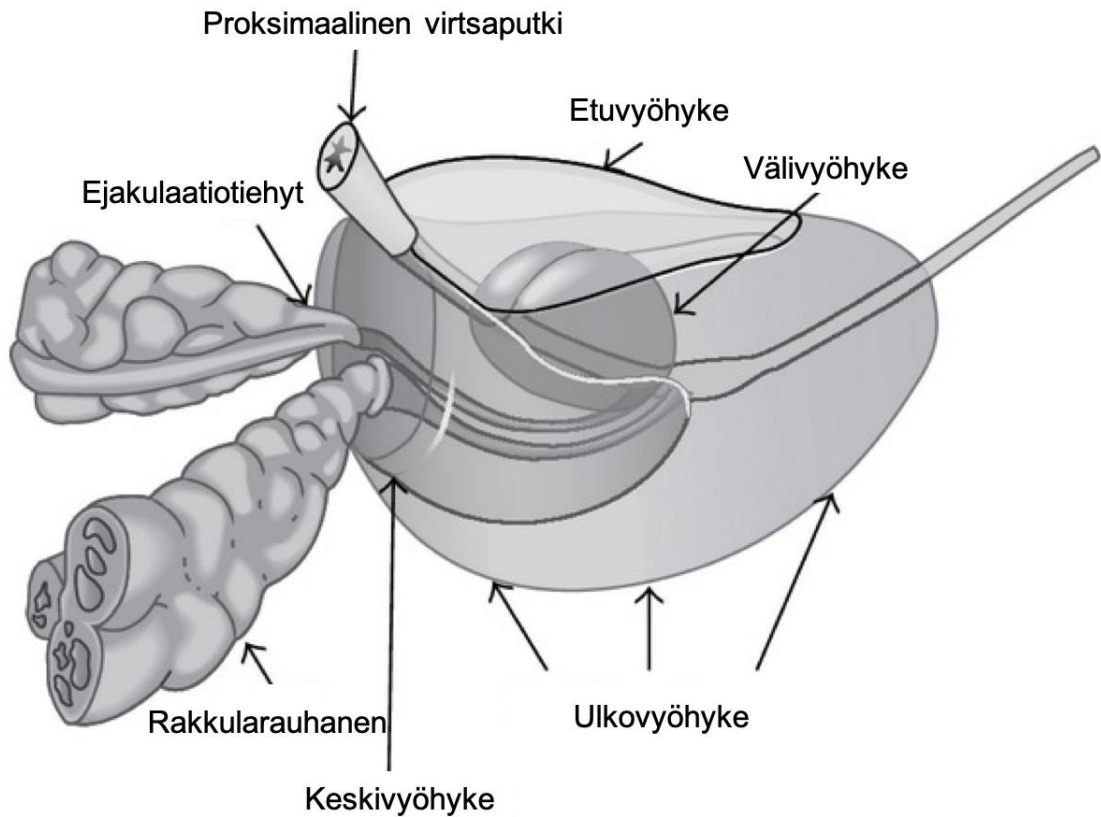
1.1 Eturauhassyöpä

1.1.1 Eturauhanen

Eturauhassyöpä on maailmanlaajuisesti miehillä toiseksi eniten esiintyvä syöpätyyppi ja Suomessa se on yleisin. Vuonna 2019 uusia tapauksia diagnosoitiin Suomessa noin 5200. Se on keuhko- ja henkitorvisyöpien jälkeen seuraavaksi eniten kuolemia aiheuttava syöpä ja vuoden 2019 tiedon mukaan eturauhassyöpäkuolemia oli 934 kappaletta. Eloonjäämisodote 5 vuotta toteamisen jälkeen on kuitenkin korkea, noin 93 %. (Suomen syöpärekisteri 2019).

Eturauhanen kuuluu miesten sukupuolirauhasiin. Yksilönkehityksessä eturauhanen saa alkunsa alkion urogenitaaliantelon epiteelikuroumasta. Sen kehitykseen vaikuttaa kiveksien tuottama testosteroni (Cunha ym. 2018). Eturauhasen kehitystä ohjaavat useat geenit, esimerkiksi Homeoboksi-geeniperheen geenit (Norris ym. 2009). Aikuisella eturauhanen sijaitsee virtsarakon alapuolella peräsuolen edessä ja kiveksistä tulevat siementiehyet yhdistyvät siellä virtsaputkeen. Eturauhasen tehtävä on tuottaa ja erittää emäksistä nestettä siemennesteeseen, joka tasapainottaa emättimen happamuutta näin parantaen siittiöiden elinkykyä (Zhou ym. 2015). Siittiöt saavat siemennesteestä myös ravintoa (Visconti 2012).

McNealin (1981) jaottelu jakaa eturauhasen neljään vyöhykkeeseen: etuvyöhyke (AFS, anterior fibromuscular stroma), keskivyöhyke (CZ, central zone), perifeerinen eli ulkovyöhyke (PZ, peripheral zone) sekä välivyöhyke (TZ, transition zone) (Kuva 1).



Kuva 1. Eturauhasen vyöhykkeet. (Muokattu Bhavsar & Verma 2014).

Etuvyöhykkeen paksu fibromuskulaarinen kudosis peittää koko eturauhasen anteriorisen puolen. Etuvyöhykkeessä ei ole rauhasrakenteita. Keskivyöhykkeen rakenteet muodostavat 25 % eturauhasen rauhasrakenteista. Sen tiehyet sijaitsevat proksimaalisesti ejakulaatitietiehyeen verrattuna ja levittäytyvät lateraalisesti eturauhasen kärkiosassa. Keskivyöhykkeen lateraalinen raja yhdistyy ulkovyöhykkeen lateraalirajaan. Ulkovyöhykkeessä sijaitsee noin 70 % eturauhasen rauhasrakenteista. Sen tiehyet levittäytyvät radiaalisesti virtsaputkesta. Lähes kaikki karsinomat saavat alkunsa ulkovyöhykkeestä. Välivyöhyke kuuluu periuretaalisiin tiehyisiin. Se on muita periuretaalisia tiehyitä kehittyneempi ja muodostaa vajaan 5 % eturauhasen rauhasrakenteista. Välivyöhyke on patologisesti merkittävä rakenne, sillä nodulaarinen hyperplasia on lähtöisin sieltä (McNeal 1981).

Veri tulee eturauhaseen pääasiassa sisäisestä suoliluun valtimosta haarautuvista eturauhasvaltimoista. Veri poistuu eturauhasen laskimoputkista, jotka yhdistyvät sisäisiin suoliluun laskimoihin (Lee 1953). Eturauhanen vastaanottaa sympaattista, parasympaattista ja sensorista hermotusta inferiorisen hypogastrisen hermopunoksen

kautta. Eturauhasen sileä lihas aktivoituu sympaattisen hermotoiminnan seurauksena ejakulaatiossa. Hermotoiminta muuttuu iän myötä (White ym. 2013).

1.1.2 Eturauhassyöpätyypit ja yleisimmät metastaatiokohteet

Lähes kaikki eturauhassyövät ovat adenokarsinomia eli kasvaimia, jotka saavat alkunsa rauhasepiteelistä. Valtaosa on lähtöisin asinussoluista (acini cells). Pieni osa adenokarsinoomista on lähtöisin eturauhasen tiehyitä linjaavista soluista. Jälkimmäinen tyyppi on näistä kahdesta aggressiivisempi. (Markman 2022a.) Muita eturauhassyöpätyyppejä ovat uroteelikarsinooma, neuroendokriiniset kasvaimet, pienisolukarsinooma, okasolukarsinooma ja eturauhasen sarkoomat. Nämä ovat adenokarsinoomiin verrattuna erittäin harvinaisia. Eturauhassyöpä lähettää etäpesäkkeitä yleisimmin luihin (80-90 %) ja imusolmukkeisiin (40-50 %). Myös maksan ja keuhkojen etäpesäkkeet ovat tyypillisiä (10-20 %). Etäpesäkkeiden sijainti vaikuttaa oirekuvaan.

1.1.3 Oireet, diagnosointi ja hoito

Eturauhassyöpä voi pysyä pitkään oireettomana, mikä saattaa myöhästyttää diagnoosia. Oirekuvaan voi kuulua virtsaamisvaikeus, virtsasuihkun paineettomuus, verivirtsaisuus, verinen siemenneste, luustosärky, tahaton painon lasku sekä erektio-ongelmat (Rannikko & Kataja 2022; Markman 2022b).

Eturauhassyöpää seulotaan tyypillisesti peräsuolen kautta tunnustelemalla sekä PSA-kokeilla. PSA tulee sanoista prostate-specific antigen eli eturauhas-spesifinen antigeeni. Terveillä miehillä PSA:ta on verinäytteessä jonkin verran, mutta suuri määrä voi viitata eturauhasen tautitilaan, kuten tulehdukseen tai syöpään. Diagnoosi voidaan varmistaa ultraääni- tai magneettikuvatutkimuksella ja ottamalla eturauhasesta kudoksenäyte. Kudoksenäytteen perusteella voidaan arvioida, kuinka aggressiivinen syöpä on kyseessä. Tähän voidaan hyödyntää gleasonin asteikkoa sekä genomista testausta. Genomisessa testauksessa näytteestä analysoidaan, mitä geneettisiä mutaatioita syöpäsoluissa esiintyy. Lisäksi syövän levinneisyyden tutkiminen voi vaatia lisäkokeita. (Mayo Clinic 2022a)

Eturauhassyövän hoito riippuu syövän aggressiivisuudesta ja sen vaikutuksista potilaan elämään. Lievissä tapauksissa hoitoa ei välttämättä aloiteta ollenkaan, vaan syövän tilaa

ainoastaan valvotaan aktiivisesti. Mikäli syöpä on rajoittunut ainoastaan eturauhaseen, voidaan hyödyntää eturauhasen poistoa. Eturauhassyöpää voidaan hoitaa sädehoidolla, kylmä- ja kuumaterapialla, hormoniterapialla, kemoterapialla, immunoterapialla sekä kohdennetulla lääkehoidolla. Sädehoidossa korkeaenerginen säteily tuhoaa solujen DNA:ta, jolloin solut kuolevat. Kemoterapiassa käytetyt lääkkeet tuhoavat nopeasti kasvavia soluja, joihin syöpäsolut lukeutuvat. Solut tuhoavaa kylmä- ja kuumaterapiaa voidaan hyödyntää paikallisesti pieniin eturauhassyöpiin. Eturauhassyöpä voi olla riippuvainen testosteronista ja hormonihoito perustuu siihen, että testosteroni ei pääse vaikuttamaan syöpäsoluihin. Hoidossa voidaan hyödyntää testosteronin tuottoa estäviä aineita tai aineita, jotka estävät testosteronin vaikutukset. Tarvittaessa voidaan myös poistaa kivekset, jolloin testosteronin määrä kehossa laskee huomattavasti. Immunoterapian tarkoituksena on edesauttaa elimistön immuunipuolustusta tuhoamaan syöpäsolut. Kohdennetussa lääkehoidossa hoito kohdennetaan johonkin tiettyyn syövän ominaisuuteen. Valinta voi olla riippuvainen jostain tietyistä mutaatiosta. (Mayo Clinic 2022b)

1.1.4 Riskitekijät

Eturauhassyövän kehityksen syitä ei täysin tunneta. Ikä on merkittävä riskitekijä sairastumiselle. Riski sairastua kasvaa runsaasti noin 50 ikävuoden jälkeen, ja diagnoosi saadaan Suomessa keskimäärin noin 71-vuotiaana (Suomen syöpärekisteri 2019). Etnisyydellä on havaittu olevan vaikutus eturauhassyöpäriskiin. Afroamerikkalaisilla miehillä on kaksinkertainen riski sairastua eturauhassyöpään Euroopan amerikkalaisiin verrattuna. Vielä isompi ero on Aasian amerikkalaisiin, joihin verrattaessa afroamerikkalaisten riski voi olla kolmesta neljään kertaa suurempi. Afroamerikkalaisilla taudinkuva on usein myös aggressiivisempi ja diagnoosihetkellä pidemmälle edennyt kuin Euroopan amerikkalaisilla. Hoitovaste on usein alhaisempi ja hoitoon liittyy enemmän sivuvaikutuksia. (Chornokur ym. 2011.)

Joissain tutkimuksissa lihavuuden on esitetty vaikuttavan eturauhassyövän riskiin. Lihavuus tutkimusaiheena on kuitenkin hyvin monimutkainen, ja lihavuudella on laaja vaikutus esimerkiksi hormonitoimintaan, minkä seurauksena tarkkoja syy-seuraussuhteita on erittäin hankala muodostaa. (Freedland & Aronson 2004.)

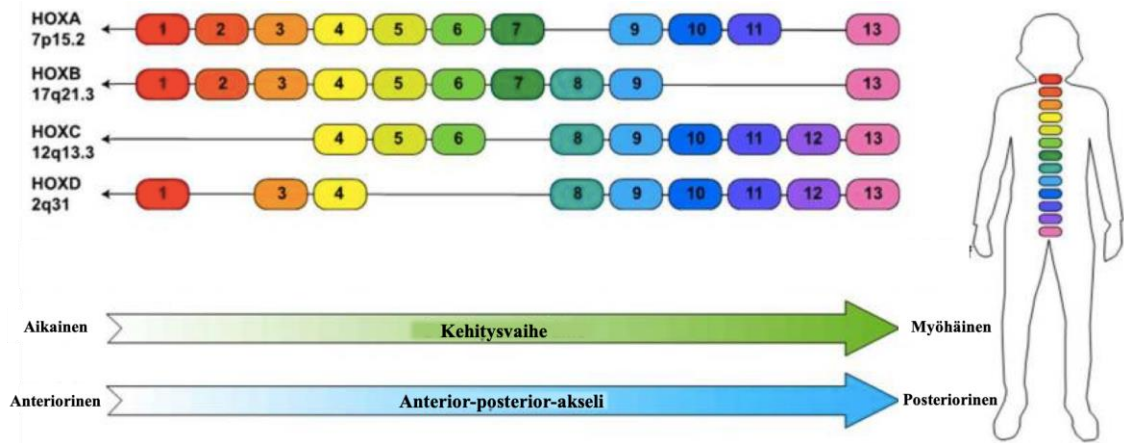
Perinnöllisyydellä on vaikutus eturauhassyövän riskiin. Eturauhassyöpätapauksista noin 5-10 % on arvioitu liittyvän perintötekijöihin (Bratt 2002). Tauti on usein sporadista eturauhassyöpää aggressiivisempi ja se puhkeaa tyypillisesti nuoremmalla iällä (Klein ym. 1998). Perinnöllistä eturauhassyöpää on syytä epäillä, mikäli eturauhassyöpää esiintyy vähintään kolmella ensimmäisen asteen sukulaisella tai kahdella alle 55-vuotiaalla ensimmäisen asteen sukulaisella (Käypä hoito -suositus 2014). Riskigeenit liittyvät tyypillisesti esimerkiksi DNA:n korjausmekanismeihin tai homologiseen rekombinaatioon liittyviin geeneihin (Carlson ym. 2020; Zhang ym. 2020). Yksi eturauhassyöpään liitetystä riskigeeneistä on *HOXB13*.

1.2 Homeoboksin sisältävät geenit ja proteiinit, *HOXB13*

1.2.1 Homeoboksin sisältävät geenit ja proteiinit

Homeoboksi on 180 emäsparin pituinen DNA-sekvenssi, joka löydettiin alun perin *Drosophila melanogaster* -banaanikärpäsen genomista, kun huomattiin, että mutaatiot geeneissä aiheuttavat erilaisia kehityshäiriöitä (McGinnis ym. 1984; Lewis 1992). Myöhemmin homeoboksin sisältäviä geenejä (*HOX*-geenejä) on osoitettu löytyvän kaikista kolmesta monisoluisen eliöiden kunnasta. *HOX*-geenit ovat hyvin laaja-alainen ryhmä. Ihmisillä kuvaillaan tyypillisesti olevan 39 *HOX*-geeniä, jotka jakautuvat kromosomaalisten sijaintien perusteella neljään eri klusteriin: HOXA, HOXB, HOXC ja HOXD. Klusterien kromosomaaliset sijainnit ovat: HOXA 7p15.2, HOXB 17q21.3, HOXC 12q13.3 ja HOXD 2q31 (Luo ym. 2019). *HOX*-geenit jakautuvat edelleen numeroituihin ryhmiin paralogien perusteella (esim. HOXA1, HOXB1 jne.). *HOX*-geeniryhmä saattaa kuitenkin olla vielä laajempi. Holland ym. (2007) kuvailivat 300 ihmisen todennäköistä *HOX*-lokusta, joista 65 he arvioivat pseudogeeneiksi.

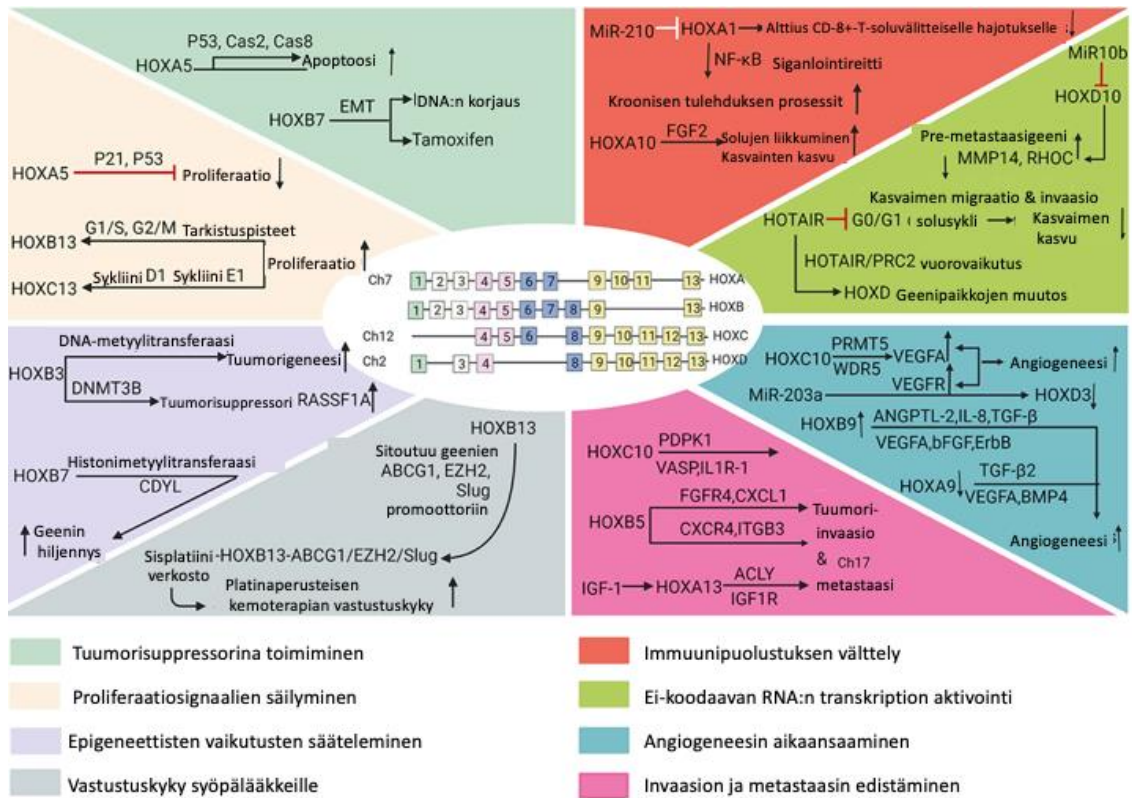
Paralogit sijoittuvat klusterissa siten, että yksilönkehityksessä 3' pään paralogit toimivat anteriorisesti ja aikaisemmin yksilönkehityksessä. Paralogien numerointi suurenee 5' suuntaan edetessä, ja loppupään geenit toimivat posteriorisemmin sekä myöhemmin yksilönkehityksen aikana (kuva 2).



Kuva 2. HOX-lokukset. Kuvassa näkyy HOX-paralogit jaettuna neljän klusterin mukaisesti (HOXA, HOXB, HOXC, HOXD). Nuolin on merkitty yksilönkehityksen aikainen transkriptiojärjestys ajallisesti ja sijainnillisesti. Oikeanpuoleiseen kaavakuvaan on värikoodein merkitty eri paralogien suhteelliset sijainnit ihmisen elimistössä yksilönkehityksen geeniekspression mukaan. (Muokattu Luo ym. 2019).

HOX-geenit koodaavat proteiineja, jotka toimivat spesifisinä transkriptiotekijöinä. Tiedetään, että niillä on tärkeä rooli yksilönkehityksen aikaisessa organogeneesissä sekä solujen erilaistumisessa etenkin anterior-posteriorisella akselilla (Rezsohazy ym. 2015). *HOX*-proteiinien molekyyli-tason toiminnan tuntemuksessa on kuitenkin paljon puutteita. *HOX*-proteiinit sisältävät 60 aminohapon kokoisen homeodomeenin, joka on tärkeä tekijä kohde-DNA:han kiinnittymisessä. On kuitenkin ollut epäselvyyttä siitä, miten keskenään hyvin samankaltaiset *HOX*-proteiinit tunnistavat kohteensa spesifisesti. On esitetty, että joissain tapauksissa spesifiseen tunnistamiseen vaaditaan kofaktoreita (Chan ym. 1994).

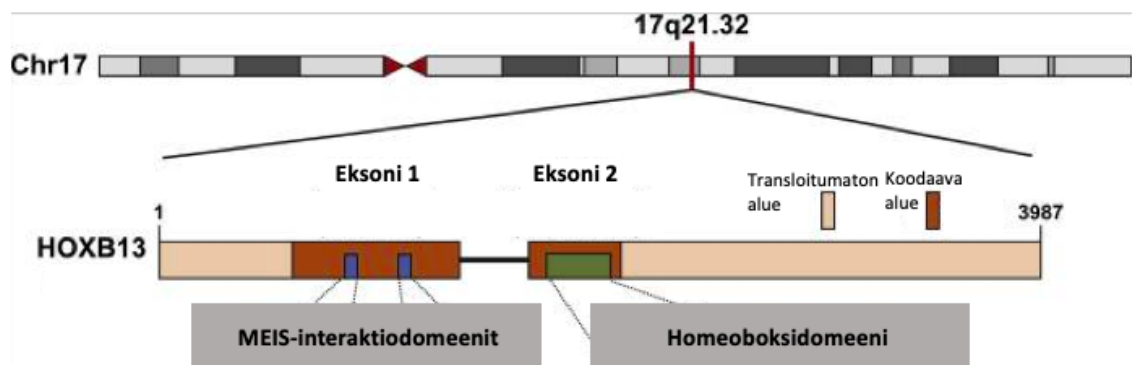
HOX-geneilla on havaittu olevan lukuisia rooleja syövän kehityksessä. *HOX*-geenit voivat olla sekä proto-onkogenejä että tuumorisuppressoreita. Lisäksi *HOX*-geenit vaikuttavat syövän kehitykseen myös epigeeneettisillä mekanismeilla. *HOX*-geenien rooleja syövässä on tiivistettynä kuvassa 3. (Feng ym. 2021.)



Kuva 3. HOX-geenien rooli syövässä luokiteltuna syövän eri tuntomerkkien mukaan. (Muokattu Feng ym. 2021).

1.2.2 HOXB13

HOXB13 on yksi homeoboksidomeenin sisältävistä geneistä. Sen kromosomaalinen sijainti on 17q21.32 ja se koostuu kahdesta eksonista. Homeoboksidomeenin lisäksi geeniin kuuluu kaksi MEIS-interaktiodomeenia (Kuva 4).



Kuva 4. HOXB13-geenin genomisen sijainti ja sen domeenit. Lyhenne Chr17 tarkoittaa kromosomia 17. (Muokattu Brechka ym. 2017).

HOXB13-geenin olemassaolon kuvailivat alun perin Zeltser ym. (1996). Tutkimuksessa kuvailtiin HOXB13-ekspression alkavan yksilönkehityksessä häntäkuromasta (tailbud)

ja leviävän kehityksen myötä selkäytimen, ruuansulatuselimistön sekä urogenitaalielimistön posteriorisiin osiin. HOXB13-proteiinin normaalia toimintaa on kuvailtu jyräjämalleilla. Huang ym. (2007) kuvailivat rottamalla käyttäen selkeän anterior-posteriorisen gradientin eturauhasen yksilönkehityksen aikaisessa *HOXB13*-ekspressiossa. Tutkimuksen mukaan ekspressio on korkeinta ventraalisen eturauhasen luminaalisissa epiteelisoluissa, keskivertoa lateraaliossa ja alhaista dorsaaliossa eturauhasessa. Ekspressiogradientti kuvailtiin myös kaikkien eturauhaslohkojen tiehyissä: korkein ekspressio havaittiin tiehyiden distaaliossa päissä, kun taas proksimaalisissa tiehyissä ekspressio oli rajoittunutta. Sreenath ym. (1999) näyttivät hiirimallilla, että aikuisen hiiren eturauhasessa *HOXB13*-ekspressio on androgeeneista riippumatonta. Economides ja Capecchi (2003) puolestaan esittivät, että *HOXB13*-ekspressiota vaaditaan eturauhasen normaaliin eritystoimintaan.

Solutasolla on näytetty *HOXB13*-ekspression vaikuttavan solusykliin. Hamid ym. (2014) tutkivat *HOXB13*-ekspression vaikutusta sekä yliekspressoimalla että hiljentämällä (knockdown) *HOXB13*-geeniä PC-3- sekä LNCaP-soluissa. Yliekspressio sai aikaan solujen pysähtymisen G1-vaiheeseen. HOXB13-proteiinin vaje puolestaan lisäsi solunjakautumista. HOXB13:n on osoitettu alentavan androgeenireseptorin hormonivälitteistä toimintaa annosriippuvaisesti. HOXB13:n yliekspressio vähentää androgeenistimuloitua PSA:n tuottoa, kun taas HOXB13:n supressio solussa stimuloi androgeenireseptorin transaktivaatiota (Jung ym. 2004).

HOXB13- ja *MEIS1*-geenejä ekspressoidaan eturauhas soluissa yhdessä. Yksi kahdesta HOXB13:n MEIS-interaktiodomeenista riittää normaaliin toimintaan. Molempien MEIS-interaktiodomeenien poisto ei kuitenkaan vaikuta HOXB13-proteiinin ja androgeenireseptorin vuorovaikutuskykyyn, ja HOXB13 pystyy MEIS-interaktiodomeenien puuttuessa vähentämään PSA:n tuottoa androgeenireseptorivälitteisesti. Tutkimuksissa on havaittu, että joko *MEIS1*-geenin tai *HOXB13*-geenin hiljentäminen (knockdown) vähentää myös toisen tuottoa osoittaen, että nämä kaksi transkriptiotekijää ohjaavat toistensa ekspressiota ja/tai vaikuttavat toistensa stabiiliuteen. On myös havaittu, että MEIS1 vaikuttaa yhdessä HOXB13-proteiinin kanssa sen säätelemien *BCHE*- ja *TNFSF10*-geenien ekspression, sillä *MEIS1*-geenin hiljentäminen (knockdown) lakkauttaa näiden ekspression. Lisäksi MEIS1 stabiloi HOXB13-proteiinia pidentäen sen puoliintumisaikaa. (Johng ym. 2019.)

1.3 *HOXB13* ja eturauhassyöpä

HOXB13-geenin rooli syövässä on monialainen. Sen on erinäisin mekanismein ehdotettu toimivan sekä potentiaalisena onkogeeninä että tuumorisuppressorina. Sen tiedetään muun muassa vähentävän syöpäsolujen jakautumista estämällä androgeenireseptorin toimintaa. (Jung ym. 2004.)

Ewing ym. (2012) kuvailivat tutkimuksessaan uuden perinnölliselle eturauhassyövälle altistavan *HOXB13*-geenivariantin. Kuvattu G84E-variantti sisältää missense-mutaation, joka muuttaa glysiinin proteiinin positiossa 84 glutamiinihapoksi. On havaittu, että variantti on yleisempi Pohjoismaissa kuin muualla maailmassa ja sen onkin ajateltu olevan suomalainen perustajamutaatio (Laitinen ym. 2013). Variantin löytymisestä huolimatta sen syöväälle altistava mekanismi jäi vielä epäselväksi. *HOXB13*-proteiinin roolia syövässä on tutkittu runsaasti viime vuosina.

Chen ym. (2018) kuvailivat artikkelissaan *HOXB13*:n ja androgeenireseptorin silmukointivariantti 7:n (AR-V7) yhteyden. Jälkimmäisellä on havaittu olevan tärkeä merkitys kastroatioresistentissä eturauhassyövässä. Tutkimuksessa huomattiin, että *HOXB13*-proteiinin suora fyysinen kontakti vaaditaan AR-V7:n kiinnittymiseen avoimeen kromatiiniin kastroatioresistentissä eturauhassyövässä ja se toimii siten yhteistyössä AR-V7:n kanssa aktivoitujen kohdeonkogeenejä. *HOXB13*:n ja AR-V7:n yhteisekspression olemassaolo saa todistavaa tukea potilasnäytteistä sekä siitä, että *HOXB13*-geenin hiljentäminen inhiboi AR-V7:n onkogeenistä toimintaa.

Yao ym. (2019) ehdottivat tutkimuksessaan *HOXB13*-proteiinin edistävän eturauhassyövän leviämistä ohjaamalla yhteisesti mitoitettujen kinaasien toimintaa sekä estämällä oletetun tuumorisuppressorin HSPB8:n toimintaa. Nerlakanti ym. (2018) puolestaan totesivat täydellisen *HOXB13*-delektion olevan letaali joillekin solulinjoille (mukaan lukien LNCaP). Yao ym. (2019) viittasivatkin kyseiseen tutkimukseen, esittäen näiden tulosten välillä olevan loogisen yhteyden. Hamidin ym. (2014) tutkimuksessa taas näytettiin, että syöpäsolulinjat PC-3 ja LNCaP proliferoituvat nopeammin *HOXB13*-vajeessa. Siten he esittivät, että vaikka *HOXB13*-geenin ekspressio on eturauhassyövässä korkealla tasolla, proteiinin puute, joka saa solut jakautumaan nopeammin. Jungin ym. (2004) saama tutkimustulos siitä, että *HOXB13* heikentää LNCaP-solujen jakautumista, tukee tätä havaintoa. Kim ym. (2010) puolestaan esittivät

tutkimuksessaan, että androgeenivapaassa ympäristössä korkea *HOXB13*-geenin ekspressio edesauttaa LNCaP-solujen proliferaatiota ja proteiinin vaje taas heikentää sitä. Mekanismina tälle he kuvailivat p21^{WAF}-tuumorisuppressorin inhiboinnin kautta tapahtuvan RB-E2F-signaalintien aktivaation.

HOXB13-proteiinin tuotannon rajoittaminen kerryttää soluihin lipidejä (Norris ym. 2009). Lu ym. (2022) kuvaavat tuoreessa tutkimuksessaan mekanismin liittyen *HOXB13*-geenin puutoksen aiheuttamaan lipidiakkumulaatioon ja eturauhassyöpään. Tutkimuksessa esitetään, että normaalitilassa HOXB13 vuorovaikuttaa histonideasetylaasi HDAC3:n kanssa, joka vuorostaan katalysoi histonin deasetylaatiota ja estää lipogeenisäätelijöitä, kuten rasvahapposyntaasia toimimasta. HOXB13-proteiinin puutos tai G84E-variantti häiritsee tätä yhteistyötä ja saa aikaan lipidien kertymisen eturauhassyöpäsoluihin, mikä puolestaan edesauttaa solujen liikkumiskykyä ja metastaasia. Saatu tulos on merkittävä, sillä se antaa viitteitä siitä, että lipogeenisten vuorovaikutusten inhibitio voisi olla lupaava hoitomenetelmä HOXB13-puutteisessa eturauhassyöpässä.

1.4 CRISPR-Cas9

1.4.1 Historia

CRISPR tulee sanoista clustered regularly interspaced short palindromic repeats eli karkeasti suomennettuna ryhmittyneet säännöllisesti levittäytyneet lyhyet palindromiset toistojaksot. Ensimmäinen CRISPR kuvattiin *Escherichia coli* -bakteerilla jo 1987 Ishinon ym. tutkimuksessa, joskin sen biologisesta toimintamekanismista ei ollut vielä tietoakaan. Mojica ym. (1993) kuvasivat CRISPR-jaksoja myös arkeilla, ja kun tämän jälkeen jaksoja kuvattiin yhä useammilla prokaryooteilla, jaksojen konservatiivisuus alkoi herättää ajatuksia niiden biologisten toimintojen tärkeydestä. Mojica ym. (2005) kuvailivat CRISPR-jaksojen olevan vastaavia kuin mitä löytyy esimerkiksi bakteriofaagien genomista ja huomasivat, että samankaltaiset jaksot bakteereilla estävät bakteriofaagia infektoimasta niitä. Tästä he tekivät johtopäätöksen, että CRISPR:llä on rooli bakteerien immunitetissa. Myös Pourcel ym. (2005) ja Bolotin ym. (2005) tulivat tutkimuksissaan samaan johtopäätökseen.

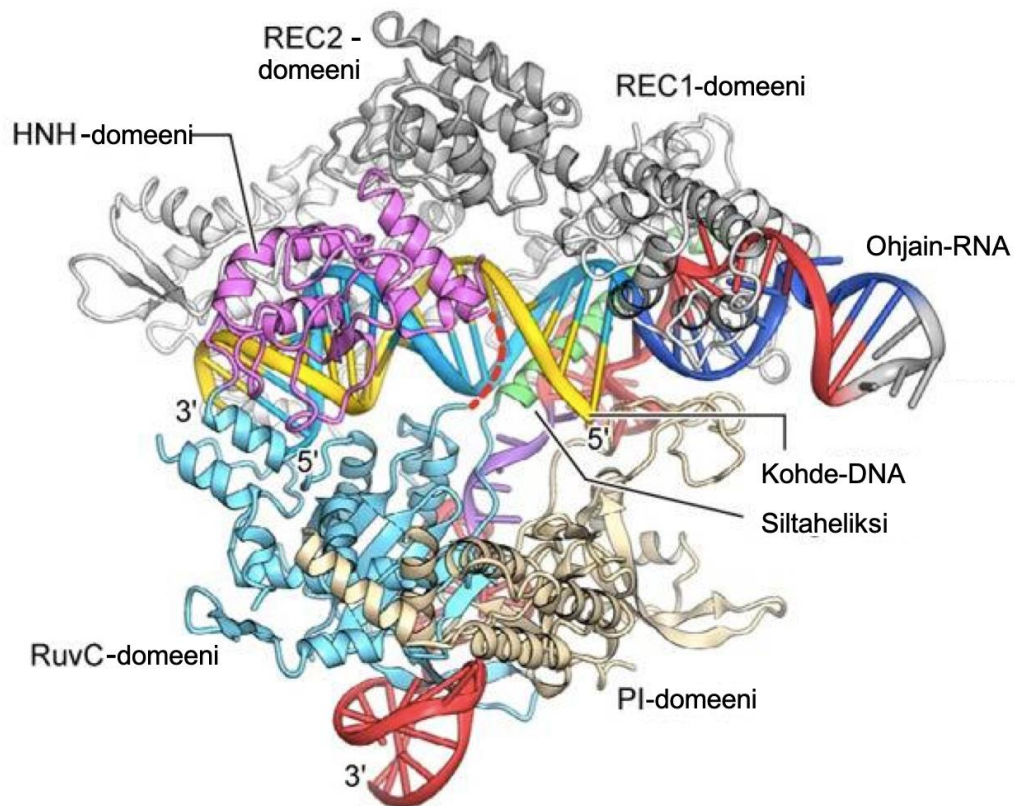
Jansen ym. (2002) kuvailivat geenejä, jotka toimivat yhdessä CRISPR:n kanssa ja nämä geenit saivat nimen *Cas* (CRISPR associated genes). Makarova ym. (2006) puolestaan lopulta kuvasivat CRISPR:n ja Cas-proteiinin toimivan yhdessä muodostaen prokaryoottisoluille adaptiivisen immunitetin viruksia ja plasmideja vastaan toimien vastaavasti kuin eukaryoottien RNA-interferenssi. Barrangou ym. (2007) kuvasivat, että viruksen kohtaamisen jälkeen bakteerit lisäävät uusia faagiperäisiä jaksoja genomiinsa. Jaksojen lisääminen ja poisto muokkaavat bakteerin kykyä vastustaa tiettyjä bakteriofaageja, joten immunitetti perustuu jakson ja bakteriofaagin sekvenssien yhteneväisyyteen. (Pääasiassa Ishino ym. 2018 kokooma-artikkelia mukaillen.)

1.4.2 CRISPR-Cas-systeemit ja toiminta tiivistettynä, Cas9

CRISPR-Cas-systeemit jakautuvat kahteen pääluokkaan. Luokan 1 CRISPR-Cas-systeemeissä on monialayksikköinen (multisubunit) crRNA-efektori-kompleksi. Luokkaan 1 kuuluvat tyypin I, III ja IV systeemit. Tyypit jakautuvat vielä alatyyppeihin efektoriproteiinien sekvenssiyhtenäisyyden, lokusorganisaatioiden ja toistojaksojen perusteella. Luokan 2 CRISPR-Cas-systeemeissä on yksialayksikköinen (single subunit) crRNA-efektorimoduuli. Luokkaan 2 kuuluvat tyypin II, V ja VI systeemit. Tyyppien jako alatyyppeihin luokassa 2 on hankalampaa, sillä efektoriproteiinit ovat niin samankaltaisia. Jako perustuu sekvenssien erilaisuuteen. (Makarova ym. 2011; Makarova ym. 2015; Makarova ym. 2020.)

CRISPR-Cas-systeemien toiminta voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen: adaptaatio, ekspressio ja interferenssi. Adaptaatioissa vierasperäisistä geneettisistä elementeistä otetaan lyhyitä jaksoja CRISPR-ryhmittymään (array). CRISPR-ryhmittymät koostuvat toistojaksoista, joiden väliin vierasperäiset geneettiset elementit integroituvat. Näitä kutsutaan spacereiksi. Ekspressiovaiheessa CRISPR transkriptoidaan ja prosessoidaan crRNA:ksi, joka puolestaan muodostaa ribonukleoproteiini-kompleksin Cas-proteiinien kanssa. Tyypin II systeemeissä crRNA:n maturaatioon tarvitaan myös tracrRNA (transactivating). Interferenssivaiheessa Cas-crRNA-kompleksi sitoutuu PAM-sekvenssin viereiseen komplementaariseen jaksoon vieraassa perimäaineessa (protospacer) ja vieras perimäaine hajotetaan Cas-nukleaasilla. Yksinkertaisin tämä mekanismi on tyypin II systeemeillä, joissa toimii Cas9. (Mojica ym. 2009; Deltcheva ym. 2011; Makarova ym. 2015; Staals ym. 2016.)

Nishimasun ym. (2014) kuvailema *Streptococcus pyogenes* -bakteerin Cas9:n rakenne on esitetty Kuvassa 5.



Kuva 5. *S. pyogenes* -bakteerin Cas9:n rakenteesta johdetun Cas9-ohjain-RNA-DNA-kompleksin rakenne. REC1- ja REC2-domeeni sekä siltaheliksi kuuluvat tunnistuslohkoon (REC). RuvC-, HNH- ja PI-domeenit puolestaan kuuluvat nukleaasilohkoon (NUC). (Muokattu Nishimasu ym. 2014).

Cas9 koostuu kahdesta lohkosta: tunnistuslohkosta REC (recognition lobe) ja nukleaasilohkosta NUC (nuclease lobe). REC-lohko voidaan jakaa kolmeen alueeseen: pitkään, siltaheliksiksi (Bridge helix) kutsuttuun α -heliksiin, REC1-domeeniin ja REC2-domeeniin. REC-lohko on Cas9:lle uniikki. Tutkimuksessa selvisi, että REC2-domeeni ei ole ehdottoman tärkeä DNA:n leikkaamisen onnistumiselle, mutta REC1-domeenin eheys puolestaan on kriittinen toiminnalle ja sen mutaatiot estävät leikkauksen. NUC-lohko puolestaan jakautuu RuvC-, HNH-, ja PI-domeeniin (PAM interacting domain). Kuten REC-lohko myös PI-domeeni on Cas9:lle uniikki. PI-domeenin puute estää DNA:n leikkauksen ja sillä on iso rooli PAM-spesifisyyden kannalta. Aiemmistä tutkimuksista tiedetään, että Cas9 leikkaa DNA:n molemmat juosteet siten, että HNH-domeeni leikkaa crRNA:lle komplementaarisen juosteen ja RuvC leikkaa ei-komplementaarisen juosteen (Gasiunas ym. 2012; Jinek ym. 2012). Nishimasun ym. (2014) tutkimuksen tulokset

antoivat tukea näille mekanismeille lisäten osaltaan tarkempaa tietoa toiminnasta. Mallissa ohjain-RNA:n ja kohde-DNA:n luoma 20 emäsparin mittainen heterodupleksi sijaitsee REC- ja NUC-lohkojen rajapinnalla olevassa positiivisesti varautuneessa uurteessa siten, että kohde-DNA on sijoittunut sopivasti HNH-leikkausta varten. Mallissa ei otettu huomioon ei-komplementaarista DNA:ta, mutta komplementaarisen juosteen sijainnin perusteella arvioitiin ei-komplementaarisen juosteen sijaitsevan sopivasti RuvC:n aktiivisen kohdan läheisyydessä.

1.4.3 Geneettinen muokkaus CRISPR-Cas9-menetelmällä

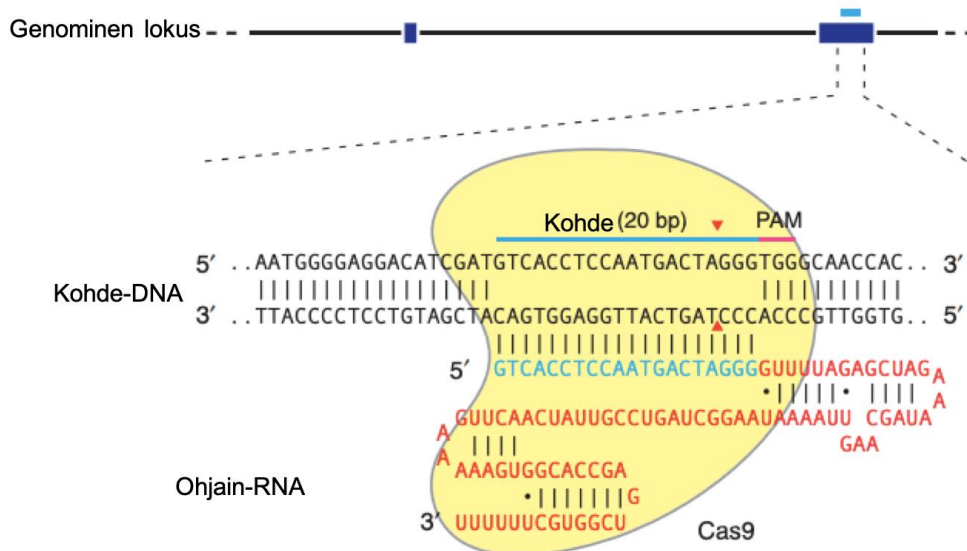
Charpentier ja Doudna (2012) kuvailivat CRISPR-Cas-systeemiin perustuvan geeninmuokkaustyökalun (Jinek ym. 2012). Tutkimuksessaan he kuvailevat, että tracrRNA ja crRNA voidaan yhdistää yhdeksi ohjain-RNA:ksi, joka ohjaa Cas9-nukleaasin genomiin ja luo kaksijuosteisen katkoksen. Muokkaamalla ohjain-RNA:n 20 emäsparin pituista sekvenssintunnistavaa osaa, voidaan leikkaus kohdentaa genomissa mihin tahansa kohtaan, jonka vierestä löytyy 5' NGG-PAM-sekvenssi. Cas-nukleaasin vaatima PAM-sekvenssi voi vaihdella sen perusteella, minkä prokaryootin genomista se on peräisin. Leikatussa kohdassa genomia voidaan muokata erinäisin menetelmin niin, että saadaan tuotettua haluttu genotyyppi.

Kun nukleaasi on leikannut juosteet, solu pyrkii korjaamaan syntyneen katkoksen joko hyödyntämällä homologi ohjattua korjausmekanismia (Homology directed repair, HDR) tai ei-homologisten päiden yhdistämistä (Non-homologous end joining, NHEJ). NHEJ tapahtuu solussa yleisemmin. Kaksijuosteinen katkos DNA:ssa on solun selviytymisen kannalta katastrofaalinen tila ja se yritetään korjata mahdollisimman nopeasti liittämällä leikatut päät yhteen. Tällöin syntyy helposti virheitä, kuten insertioita tai deleetioita. HDR puolestaan perustuu siihen, että solu ikään kuin ottaa mallia vastaavasta DNA-pätkästä korjaten katkoksen sen ”ohjeen” mukaisesti. Mekanismiin perustuen voidaan luoda tarkkoja muutoksia genomiin tuomalla soluun DNA-pätkä, joka on päistä samanlainen kuin leikattu DNA ja keskellä on pätkä, joka sisältää halutun muutoksen. Koska HDR tapahtuu lähinnä jakautuvissa soluissa ja on muutenkin NHEJ:ä harvinaisempi tapahtuma, on siihen perustuva genomien muokkaus verrattain hankalaa (Saleh-Gohari & Helleday 2004).

CRISPR-Cas9-tekniikan etuja on sen helppokäyttöisyys, spesifisyys ja tehokkuus verrattuna muihin geneettisiin muokkausmenetelmiin. CRISPR-Cas9 on huomattavasti helpompi kohdentaa haluttuun alueeseen verrattuna esimerkiksi TALEN-menetelmään, jossa joudutaan aina luomaan kaksi kokonaan uutta *TALEN*-geeniä. TALEN-menetelmässä leikkauskohdan spesifisyys vaihtelee muutamien emäksien välillä, kun taas esimerkiksi *S. pyogenes* -bakteerin Cas9 leikkaa juosteen tietystä kohtaa. Vaikka TALEN-menetelmä on myös tehokas geenimuokkaustyökalu, sitä ei voida kohdistaa useaan kohtaan genomia saman aikaisesti. CRISPR-Cas9-menetelmässä tämä onnistuu. (Ran ym. 2013.)

Menetelmän varjopuolena on sen taipumus kerryttää epätoivottuja insertioita ja deleetioita kaksijuosteisen katkoksen korjaamisen seurauksena. On myös mahdollista, että kohde-DNA:n lisäksi leikkautuu myös muita hyvin samankaltaisia sekvenssejä. Tämä voi pahimmillaan johtaa jopa kromosomitason muutoksiin. (Li ym. 2020.)

S. pyogenes -bakteerista peräisin oleva Cas9-nukleaasi tarvitsee toimiakseen NGG-PAM-sekvenssin, jossa N kuvastaa mitä tahansa emästä. Kohde-DNA:n täytyy olla genomissa juuri ennen 5'-NGG-PAM-sekvenssiä. Cas9 katkaisee kaksijuosteisen DNA:n kolme emäsparia ylävirtaan PAM-sekvenssistä (kuva 6).



Kuva 6. Kaavakuva *S. pyogenes* -bakteerin RNA-ohjatun Cas9-nukleaasin toiminnasta. 20 nukleotidin mittainen ohjain-RNA (sinisellä) ohjaa Cas9-nukleaasin (keltainen) kohde-DNA:n (sininen viiva) luo. Cas9 katkaisee kaksijuosteisen DNA:n kolme emäsparia ylävirtaan (punaiset nuolet) PAM-sekvenssistä (punainen viiva). (Muokattu Ran ym. 2013).

CRISPR-Cas9-menetelmää on hyödynnetty laajalti muuntogeenisten eliöiden tuottamiseen ja menetelmällä on potentiaalia myös erilaisten geneettisten sairauksien tutkimuksessa ja hoidossa. Menetelmää on yritetty valjastaa muun muassa sirppisoluanemian hoitoon (Frangoul ym. 2021). Erilaiset eettiset ja turvallisuuskysymykset asettavat rajoitteita menetelmän hyödyntämiseen geeniterapiassa (Uddin ym. 2020).

Menetelmää on myös muokattu siten, että on mahdollista tuottaa katkos vain toiseen DNA-juosteeseen. Tätä menetelmää hyödyntämällä voidaan saada aikaan hyvin tarkkoja muutoksia, kuten yhden emäksen vaihtoja. Näitä sovelluksia ei käsitellä tässä opinnäytetyössä tarkemmin.

1.4.4 Poistogeenisten solujen tuotanto CRISPR-Cas9-menetelmällä

Geenin toiminnan tutkimiseksi voi olla hyödyllistä selvittää, mitä solussa tapahtuu, kun geeni ei ole toiminnassa. Tätä tilannetta voidaan simuloida hyödyntämällä RNA-interferenssiä, jossa geenistä transkriptoitu lähetti-RNA hajotetaan ennen translaatiota proteiiniksi, hyödyntäen lyhyttä synteettistä kaksijuosteista RNA:ta. Tämä ei kuitenkaan ole pysyvä tila ja tutkimuskäyttöön voi joskus olla tarpeen luoda kokonaan poistogeeninen solulinja. Tähän voidaan hyödyntää CRISPR-Cas9-tekniikkaa.

Kuten luvussa 1.4.3 jo mainittiin, kaksijuosteisen katkoksen korjaamisessa NHEJ-mekanismeilla tapahtuu usein jo itsestään insertioita ja deleetioita. Mikäli nämä insertiot tai deleetiot aiheuttavat lukukehyksen muutoksen, voi koko geeni muuttua toimimattomaksi pelkästään yhden katkoksen vaikutuksesta. Vaihtoehtoisesti on mahdollista käyttää useampaa ohjain-RNA:ta, jolloin geenistä saadaan poistumaan isompi palanen tai palasia ja poistogeenisten solujen muodostuminen on varmempaa (Cong ym.2013).

Poistogeenisten solulinjojen tuotto voi olla silloin tällöin haasteellista. Solulinjojen muodostus vaatii, että solut yksittäissolujaotellaan, ja palautuminen tästä käsittelystä voi kestää pitkään, eivätkä solut välttämättä palaudu käsittelystä ollenkaan. Tutkimuskäytössä olevista solulinjoista monet ovat polyploideja, jolloin usein syntyy kohdegeenin osalta heterotsygoottisia soluja, kun CRISPR-Cas9-reaktio ei tapahdu

kaikissa kromosomeissa. Joissain tapauksissa proteiinin tuotanto ei pysähdykään kokonaan geenimuokkauksen myötä, vaan saattaa syntyä muuntunutta proteiinia esimerkiksi eksonihyppäyksien (exon skipping) tai nonsense-riippuvaisen vaihtoehdoisen silmukoinnin (non-sense associated alternative splicing) myötä. (Giuliano ym. 2019.)

1.5 Tutkimusasetelma ja työn tarkoitus

HOXB13-geenin rooli eturauhassyövän kehityksessä on edelleen epäselvä. Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää protokolla ja luoda *HOXB13*-poistogeenisiä eturauhassyöpäsolumalleja CRISPR-Cas9-tekniikalla. Tulevaisuuden tavoitteena on tutkia *HOXB13*-poistogeenisten solulinjojen toimintaa erilaisin menetelmin (RNA-seq, funktionaaliset tutkimukset jne.) rinnakkain tutkimusryhmässä aiemmin tuotettujen G84E-variantin sisältävien solulinjojen kanssa. Työssä käytettiin kahta ohjain-RNA:ta tarkoituksena poistaa geenistä alue ja samalla tuhota normaali lukukehys.

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Poistogeeniplasimidikonstruktioiden luominen, kloonaus *DH5 α* -bakteerisoluissa, kloonattujen plasmidien eristys ja sekvensointi

PspCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene plasmid # 62988) ja PspCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (addgene plasmid # 48138) -plasmidit olivat lahja Feng Zhangilta (Ran ym. 2013). Kumpaankin plasmidiin liitettiin gBlokki-geenipätkä, joka sisälsi kaksi työhön suunniteltua ohjain-RNA-sekvenssiä. Restriktio-ligaatio-reaktioita varten PCR-liuskoihin yhdistettiin 100 ng PX459-plasmidia tai 50 ng PX458-plasmidia, 3 μ l TE-puskuriin (Invitrogen) liuotettua gBlokkiä, 2 μ l 10-kertaista CutSmart-puskuria (New England Biolabs), 1 μ l 10 mM DTT:tä, 1 μ l 10 mM ATP:tä, 0,5 μ l BbsI-restriktioentsyymiä (New England Biolabs), 0,5 μ l T7 DNA-ligaasia (New England Biolabs) ja tilavuudet täytettiin 20 μ l:aan asti nukleaasivapaalla vedellä. Näytteitä käsiteltiin viisi kierrosta seuraavasti: 37 °C 5 min, 23 °C 5 min.

Bakteerikasvatuksia varten valmistettiin LB-agar-maljoja, joihin lisättiin 100 μ g/ml ampicilliinia transformoitujen bakteerien selektiota varten. PX459-konstruktin transformaatiota varten sulatettiin jäällä 50 μ l ja PX458-konstruktin transformaatiota varten 25 μ l *DH5 α* -kompetentteja *E. coli* -bakteerisoluja, minkä jälkeen ne siirrettiin 1,5 ml:n eppendorf-putkeen. Putkeen lisättiin 2 μ l PX459-plasimidikonstruktiota. Putkea naputeltiin 5 kertaa, minkä jälkeen sen annettiin inkuboitua jäällä 30 min. Inkubaation jälkeen soluja lämpökäsiteltiin 42 °C:ssa 30 s, jotta plasmidi saataisiin solujen sisään. Tämän jälkeen soluja inkuboitettiin jäällä 5 min. Putkeen lisättiin 950 μ l SOC-mediumia ja solujen annettiin palautua 60 min 37 °C:ssa ravisteluinkubaattorissa. Palautumisvaiheen jälkeen putkea naputeltiin ja käännettiin. Huoneenlämpöisille LB-agar-maljoille levitettiin laimentamatonta bakteeriliuosta sekä suhteessa 1:10 SOC-mediumiin laimennettua bakteeriliuosta. Jäljellä olevat solut pelletoitettiin, suurin osa supernatantista poistettiin, solut resuspensoitiin ja maljattiin. Yksi malja jätettiin käsittelemättä kontrollimaljaksi, jotta voitiin poissulkea kontaminaation mahdollisuus. Maljat laitettiin 37 °C:een yön yli. Seuraavana päivänä PX459-transformoiduista bakteereista tehtiin neljä ja PX458-transformoiduista bakteereista kolme 5 ml:n LB-nestekasvatusta (100 μ g/ml

ampisilliini). Kasvatuksiin valikoitiin maljoilta yksittäiset kloonit. Nestekasvatuksien annettiin olla 37 °C:ssa yön yli.

Jokaisesta nestekasvatuksesta varastoitettiin osa lisäämällä 60 % glyserolia 1:1. Näytteet säilöttiin -80 °C:ssa. Lopuista bakteerisoluista eristettiin plasmidi-DNA sekvensointia varten käyttäen NucleoSpin Plasmid EasyPure -kittiä (Macherey Nagel). Eristettyjen plasmidinäytteiden konsentraatio mitattiin NanoDrop-laitteella ja ne lähetettiin Sanger-sekvensoitavaksi ulkopuoliseen sekvensointipalveluun (EuroFins) käyttäen sekvensointialukkeena aluketta

U6-forward:

GAGGGCCTATTTCATGATTCC.

Sekvensointitulosten perusteella valittiin sopivat kloonit, varastoiduista näytteistä tehtiin LB-agar-maljakasvatukset yön yli, minkä jälkeen kahdesta PX459-kloonista ja yhdestä PX458-kloonista tehtiin 100 ml:n LB-nestekasvatukset yön yli ja seuraavana päivänä kasvatuksista eristettiin plasmidi-DNA NucleoBond Xtra Midi Plus -kitillä (Macherey Nagel). Plasmidi-DNA:n konsentraatiot mitattiin NanoDrop-laitteella ja lopulta valittiin kloonit transfektiota varten.

2.2 Solulinjat ja soluviljely

2.2.1 PC-3

PC-3-solulinja on peräisin eturauhasen adenokarsinooman luustoetäpesäkkeestä (levinneisyysaste IV). Solulinjan soluilla on 62 kromosomia ja se on siten lähes triploidi. Solut eivät ekspressoi androgeenireseptoria. PC-3-solujen elatusaineena käytettiin F-12K-elatusainetta (Gibco™, sisältää L-glutamiinia), johon lisättiin 10 % FBS:ää (Biowest) sekä 1 % penisilliini-streptomysiiniä (BioWhittaker™). Soluja kasvatettiin Corning® T75-pulloissa 37 °C:ssa 5 %:n CO₂-ympäristössä. Soluille vaihdettiin elatusaine pääasiassa kolme kertaa viikossa ja ne jaettiin tarvittaessa. Jaettaessa solut huuhdeltiin PBS:llä (Cytiva HyClone) ja irrotettiin 0,25 % trypsiini-EDTA:lla (Gibco™).

2.2.2 LNCaP

LNCaP-solulinja on peräisin eturauhasen levinyttä karsinoomaa sairastavan henkilön vasemman supraklavikulaarisen imusolmukkeen neulabiopsiasta. Solut ovat hypotetraploideja ja ekspressoivat androgeenireseptoria. LNCaP-solujen elatusaineena käytettiin RPMI-1640-elatusainetta (Gibco™, sisältää D-glukoosia, L-glutamiinia, natriumbikarbonaattia ja natriumpyruvaattia), johon lisättiin 10 % FBS:ää (Biowest) sekä 1 % penisilliini-streptomysiiniä (BioWhittaker™). Soluja kasvatettiin Corning® T75-pulloissa 37 °C:ssa 5 %:n CO₂-ympäristössä. Soluille vaihdettiin elatusaine pääasiassa kolme kertaa viikossa ja ne jaettiin tarvittaessa. Jaettaessa solut huuhdeltiin PBS:llä (Cytiva HyClone) ja irrotettiin 0,25 % trypsiini-EDTA:lla (Gibco™).

2.3 *PX459-plasmidikonstruktin transfektio PC-3- ja LNCaP-soluihin, transfektoituneiden solujen selektio, LNCaP-solujen PCR*

Sopiva puromysiinikonsentraatio PC-3-soluille testattiin 96-kuoppalevyllä jaetuilla soluilla. Testikonsentraatioina käytettiin 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml sekä 10 µg/ml. Testin perusteella varsinaisiin käsittelyihin valittiin 1 µg/ml konsentraatio.

Transfektiota varten 12-kuoppalevyn kuuteen kuoppaan jaettiin jokaiseen 100 000 solua. Kolmen kuopan solut transfektoitiin ja toiset kolme kuoppaa toimivat kontrollikaivoina. Transfektioiliuos valmistettiin lisäämällä yhteen eppendorf-putkeen 50 µl Opti-MEM-elatusainetta (Gibco™) ja 3 µl Lipofectamine 3000 -reagenssia (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) per transfektoitava kaivo. Toiseen putkeen lisättiin 50 µl Opti-MEM-elatusainetta, 1 µg plasmidi-DNA:ta sekä 2 µl P3000-reagenssia (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) per transfektoitava kaivo. Putket vorteksoitiin, jälkimmäinen putki yhdistettiin ensimmäiseen ja liuoksen annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 15 min, jotta plasmidi saataisiin siirtymään lipofektiokuplan sisään. Tämän jälkeen jokaiseen käsiteltävään kaivoon lisättiin 100 µl liuosta ja levy siirrettiin 37 °C:een yön yli, minkä jälkeen soluille vaihdettiin tuore elatusaine. Tästä seuraavana päivänä soluille vaihdettiin tuore elatusaine, joka sisälsi 1 µg/ml puromysiiniä. Puromysiinin annettiin vaikuttaa kolme vuorokautta, minkä jälkeen soluja hoidettiin normaalin protokollan mukaan. Solut eivät palautuneet käsittelyistä, ja noin kahden viikon päästä levy heitettiin pois.

Sopiva puromysiinikonsentraatio LNCaP-soluille oli tutkimusryhmässä selvitetty aiempia tutkimuksia varten, joten siitä ei tehty erillistä testiä. Käsittelyssä käytettiin 1 µg/ml puromysiiniä. Transfektio tehtiin kahden eri LNCaP-kloonin soluille vastaavalla tavalla kuin PC-3-soluille. Kahden viikon jälkeen transfektiosta toisen LNCaP-levyn solut irrotettiin, triplikaatit yhdistettiin ja osa soluista otettiin DNA:n eristykseen. Loput solut laitettiin takaisin kasvamaan. Kontrollinäyte otettiin vain yhdestä kaivosta.

DNA:n eristystä varten solut pelletoititiin ja supernatantti poistettiin, minkä jälkeen ne resuspensoitiin 20 µl:aan DNA Releasy ADVANCE -eristysliuosta (NIPPON Genetics). Tämän jälkeen niitä käsiteltiin ThermoCycler-koneessa seuraavalla tavalla: 65 °C 5 min, 96 °C 5 min, 20 °C 5 min.

PCR:ssä käytetyt alukkeet:

HOXB13_G84E_F1 CCATGGAGCCCGGCAATTAT

HOXB13_G84E_R1 GCCATAGGCTGGTAGGTTCC

PCR-reaktiota varten PCR-liuskaan yhdistettiin yhtä näytettä kohden 5 µl 10 x DreamTaq-puskuria (Thermo Fisher Scientific), 5 µl dNTP-sekoitusta (2 mM jokaista), 1,5 µl 10 µM forward-aluketta, 1,5 µl 10 µM reverse-aluketta, 0,25 µl DreamTaq-DNA-polymeraasia (Thermo Fisher Scientific), 34,75 µl nukleaasivapaata vettä ja 2 µl templaatti-DNA:ta. Yhteen kaivoon lisättiin templaatti-DNA:n sijasta 2 µl nukleaasivapaata vettä negatiiviseksi kontrolliksi. Tämän jälkeen näytteitä käsiteltiin ThermoCycler-koneessa seuraavasti: 95 °C 2 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 35, 72 °C 5 min.

PCR-reaktion onnistuminen tarkastettiin 50 ml:n 2,5 % agarosigeelillä (BioNordika), johon lisättiin 1,5 µl Midori Green Advance DNA Stain -väriainetta (NIPPON Genetics). Näytteisiin lisättiin 6-kertaista latauspuskuriä (Gel Loading Dye Purple 6X, New England BioLabs). Molekyylipainomarkkerina käytettiin 100 emäsparin markkeria (Quick-Load 100 bp DNA Ladder 50µg/ml, New England BioLabs). Näytteitä ajettiin 100 V 40 min, minkä jälkeen geeli kuvattiin ChemiDoc Imager -laitteella. Poistogeenisiä soluja ei ollut havaittavissa ja transfektoiduista LNCaP-soluista päätettiin luopua.

2.4 PX459-plasmidikonstruktion transfektion optimoiminen PC-3-soluilla

Transfektioprotokollaa yritettiin optimoida vähentämällä sekä plasmidin että transfektio-reagenssien määrää. Optimoinnissa käytettiin seitsemää eri yhdistelmää. Kolme reaktiota tehtiin alkuperäisillä reagenssimäärillä, mutta plasmidin määrää vähennettiin 0,75 µg:aan, 0,5 µg:aan sekä 0,25 µg:aan. Neljä reaktiota tehtiin puolittamalla Lipofectamine 3000 -reagenssin sekä P3000-reagenssin määrät ja käyttämällä 1 µg, 0,75 µg, 0,5 µg sekä 0,25 µg plasmidia. Kaikki reaktiot tehtiin duplikaatteina.

Noin kolmen viikon jälkeen solut päätettiin siirtää 96-kuoppalevyille palautumisen nopeuttamiseksi. Siirron yhteydessä duplikaatit yhdistettiin. Tästä noin viikon jälkeen solut irrotettiin ja pieni määrä soluja otettiin DNA:n eristykseen (luku 2.6). Loput solut laitettiin takaisin kasvamaan. Solujen jakauduttua tarpeeksi ne siirrettiin kasvamaan 12-kuoppalevyille.

Viikon päästä PCR-reaktion (luku 2.6) perusteella kaksi parhaiten transfektoitunutta populaatiota siirrettiin kasvamaan T25-pulloihin. Pullojen ollessa konfluentteja, molemmista klooneista 1/3 soluista siirrettiin kasvamaan yhteen T75-pulloon ja 2/3 toiseen T75-pulloon. Kasvatuksen jälkeen toiset pulloista pakastettiin, ja jäljelle jääneiden pullojen soluja hoidettiin normaaliin tapaan yksittäissolukloonien muodostamiseen asti.

2.5 PX458-plasmidikonstruktion transfektio PC-3-soluihin

Ensimmäistä transfektio testiä varten PC-3-soluja transfektoitiin vastaavasti kuin luvussa 2.3, tällä kertaa käyttämällä PX458-plasmidikonstruktiota. Kaksi päivää transfektion jälkeen solut irrotettiin ja pieni määrä soluja otettiin DNA:n eristykseen (luku 2.6). Varsinaista transfektiota varten PC-3-soluja jaettiin päivää aiemmin kasvamaan kaikkiin 12-kuoppalevyn kuoppiin 100 000 solua jokaiseen. Solut transfektoitiin vastaavasti kuin aiemmassa testissä. Transfektoiduille soluille vaihdettiin elatusaine päivää myöhemmin ja kaksi päivää myöhemmin 10 000 fluoresenssiposiitivista solua eroteltiin virtaussytometrillä. Tätä varten solut irrotettiin ja sentrifugoitiin asetuksilla 200 rcf 5 min. Supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin kylmään PBS:ään johon oli lisätty 2 %

FBS:ää. Solususpensio siirrettiin suodatinkorkin läpi FACS-putkeen ja laitettiin jälle kuljetuksen ajaksi. Solut eroteltiin 15 ml:n falcon-putkeen, jossa oli 1 ml elatusainetta, joka koostui kahdesta osasta FBS:ää ja yhdestä osasta tavallista PC-3-elatusainetta. Solut siirrettiin kasvamaan 24-kuoppalevyille, jonka jälkeen niitä hoidettiin normaaliin tapaan.

Solujen palauduttua (noin 2,5 viikkoa) solut irrotettiin, ja pieni määrä soluja otettiin DNA:n eristykseen (luku 2.6). Loput solut laitettiin uudelleen kasvamaan 24-kuoppalevyille. Tämän jälkeen solut siirrettiin aina tarvittaessa isommalle kasvatusalustalle. Kun soluja oli kasvatettu tarpeeksi, ne pakastettiin (nestetyppi).

2.6 PX459- ja PX458-transfektoitujen PC-3-solujen PCR

PCR:ssä käytetyt alukkeet:

HOXB13_G84E_F2: CCGGCAATTATGCCACCTTG

HOXB13_G84E_R2: CCTGGTGGGTTCTGTTCTCC

PC-3-soluista eristettiin DNA vastaavasti kuin LNCaP-soluista luvussa 2.3. PCR-reaktiota varten jokaista näytettä kohden yhdistettiin 10,5 µl nukleaasivapaata vettä, 12,5 µl AmpliTaq Gold™ 360 -mastermixiä (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), 0,5 µl 10 µM forward-aluketta, 0,5 µl 10 µM reverse-aluketta ja 1 µl templaatti-DNA:ta. Lisäksi tehtiin negatiivinen kontrolli lisäämällä yhteen reaktioon DNA:n sijasta 1 µl nukleaasivapaata vettä. Tämän jälkeen näytteitä käsiteltiin ThermoCycler-koneessa seuraavasti: 95 °C 10 min, (95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s) x 40, 72 °C 7 min. PCR-reaktion onnistuminen tarkastettiin agarosigeelillä vastaavasti kuin luvussa 2.3.

2.7 PX458-plasmidikonstruktin transfektio LNCaP-soluihin, solujen PCR

LNCaP-solut transfektoitiin vastaavasti kuin luvussa 2.3. käyttäen PX458-plasmidikonstruktia. Soluille vaihdettiin elatusaine transfektiota seuraavana päivänä ja kahden päivän jälkeen 20 000 fluoresenssiposiitivista solua eroteltiin virtaussytometrillä. Tätä varten solut irrotettiin ja sentrifugoitiin asetuksilla 200 rcf 5 min. Supernatantti poistettiin ja solut resuspensoitiin kylmään PBS:ään johon oli lisätty 2 % FBS:ää. Solususpensio siirrettiin suodatinkorkin läpi FACS-putkeen ja laitettiin jälle kuljetuksen

ajaksi. Solut eroteltiin 96-kuoppalevyn kuoppaan, jossa oli 200 µl elatusainetta, joka koostui kahdesta osasta FBS:ää ja yhdestä osasta tavallista LNCaP-elatusainetta. Solujen palauduttua ne siirrettiin aina tarvittaessa isommalle kasvatusalustalle. Siirron yhteydessä otettiin pieni määrä soluja DNA:n eristystä varten. Soluista eristettiin DNA vastaavasti kuin luvussa 2.3. PCR-reaktio tehtiin vastaavasti kuin luvussa 2.6 ja PCR-reaktion onnistuminen tarkastettiin agarosigeelillä vastaavasti kuin luvussa 2.3. Kun soluja oli kasvatettu tarpeeksi, ne pakastettiin kahdeksi viikoksi (talviloma).

2.8 PX459-transfektoitujen PC-3-solujen yksittäissolujaottelu solukloonien muodostamiseksi, kloonien PCR

Jaottelua varten solut irrotettiin ja sentrifugoitiin asetuksilla 200 rcf 5 min. Supernatantti poistettiin ja solupelletti resuspensoitiin 4 ml:aan kylmää PBS:ää, johon oli lisätty 2 % FBS:ää. Solususpensio siirrettiin suodatinkorkin läpi FACS-putkeen ja laitettiin jälle kuljetuksen ajaksi. Neljälle 96-kuoppalevylle jaettiin virtausytometrillä yksi solu jokaiseen kuoppaan. Kuopissa oli 100 µl elatusainetta, joka koostui kahdesta osasta FBS:ää ja yhdestä osasta tavallista PC-3-elatusainetta. Soluille lisättiin seuraavana päivänä 100 µl elatusainetta ja tämän jälkeen elatusaine vaihdettiin osittain kaksi kertaa viikossa. Vain neljä kloonia lähti kasvamaan ja näistä kaksi kloonia lähti kasvamaan kunnolla. Noin kolmen ja puolen viikon jälkeen nämä solukloonit siirrettiin 12-kuoppalevylle ja samalla otettiin pieni määrä soluja DNA:n eristystä varten. Soluista eristettiin DNA vastaavasti kuin luvussa 2.3. PCR-reaktio tehtiin vastaavasti kuin luvussa 2.6. PCR-reaktion onnistuminen tarkastettiin agarosigeelillä vastaavasti kuin luvussa 2.3. Poistogeenisiä klooneja ei ollut havaittavissa ja klooneista luovuttiin. Transfektoidut solut pakastettiin.

2.9 PX458-transfektoitujen PC-3-solujen yksittäissolujaottelu solukloonien muodostamiseksi

PX458-transfektoidut, GFP:n perusteella jaotellut PC-3-solut otettiin nestetyypisäilytyksestä kasvamaan kolme päivää ennen yksittäissolujaottelua. Jaottelua varten solut irrotettiin ja sentrifugoitiin asetuksilla 200 rcf 5 min. Supernatantti poistettiin ja solupelletti resuspensoitiin 2 ml:aan kylmää PBS:ää, johon oli lisätty 2 % FBS:ää. Solususpensio siirrettiin suodatinkorkin läpi FACS-putkeen ja laitettiin jälle kuljetuksen

ajaksi. Kuudelle 96-kuoppalevyllä jaettiin virtaussytometrillä yksi solu jokaiseen kuoppaan. Kuopissa oli 100 µl elatusainetta, joka koostui kahdesta osasta FBS:ää ja yhdestä osasta tavallista PC-3-elatusainetta. Soluille lisättiin seuraavana päivänä 100 µl elatusainetta ja tämän jälkeen elatusaine vaihdettiin osittain muutaman kerran viikossa. Soluja hoidettiin noin kuukauden verran, jonka jälkeen klooniin kasvun todettiin pysähtyneen. Klooneista luovuttiin ja yksittäissolujaottelu päätettiin suorittaa uudestaan.

Yksittäissolujaottelun uusimista varten soluja otettiin kasvamaan nestetyypisäilytyksestä kaksi päivää ennen jaottelua. Jaottelu toteutettiin vastaavasti kuin ensimmäisellä kerralla, mutta soluja jaettiin kahdeksalle 96-kuoppalevyllä ja niiden elatusaine vaihdettiin osittain vain kerran viikossa. Noin kahden viikon jälkeen klooneja alettiin siirtää uudelle 96-kuoppalevyllä. Uusien kuoppien ollessa konfluentteja, solut irrotettiin huuhtelemalla PBS:llä ja lisäämällä 30 µl trypsiini-EDTA:ta. Solujen irrottua trypsiini inaktivoitiin lisäämällä 100 µl elatusainetta. 100 µl siirrettiin 24-kuoppalevyllä ja loput siirrettiin uudelle 96-kuoppalevyllä DNA:n eristystä varten. Solujen jakautuessa ne siirrettiin 24-kuoppalevyllä 6-kuoppalevyllä, jossa niitä jaettiin tarpeen mukaan 1:6.

2.10 PX458-transfektoitujen LNCaP-solujen yksittäissolujaottelu solukloonien muodostamiseksi

PX458-transfektoidut, GFP:n perusteella jaotellut LNCaP-solut otettiin nestetyypisäilytyksestä kasvamaan samaan aikaan PX458-transfektoitujen, GFP:n perusteella jaoteltujen PC-3-solujen kanssa, mutta kahden päivän jälkeen huomattiin, että suurin osa soluista ei ollut kiinnittynyt kasvatusalustaan. Solujen pelastamiseksi elatusaine siirrettiin kokonaisuudessaan 15 ml:n falcon-putkeen, sentrifugoitiin asetuksilla 200 rcf 5min, elatusaine poistettiin ja pelletti resuspensoitiin 10 ml:aan tuoretta elatusainetta, siirrettiin uuteen pulloon ja laitettiin inkubaattoriin. Myös alkuperäiseen pulloon lisättiin 10 ml tuoretta elatusainetta ja laitettiin inkubaattoriin. Solut lähtivät onnistuneesti kasvamaan ja muutaman viikon päästä ne yksittäissolujaoteltiin. Jaottelua varten solut irrotettiin ja sentrifugoitiin asetuksilla 200 rcf 5 min. Supernatantti poistettiin ja solupelletti resuspensoitiin 2 ml:aan kylmää PBS:ää, johon oli lisätty 2 % FBS:ää. Solususpensio siirrettiin suodatinkorkin läpi FACS-putkeen ja laitettiin jäälle kuljetuksen ajaksi. Kuudelle 96-kuoppalevyllä jaettiin virtaussytometrillä yksi solu jokaiseen kuoppaan. Kuopissa oli 100 µl elatusainetta, joka

koostui kahdesta osasta FBS:ää ja yhdestä osasta tavallista LNCaP-elatusainetta. Soluille lisättiin seuraavana päivänä 100 µl elatusainetta ja tämän jälkeen elatusaine vaihdettiin osittain kerran viikossa. Noin kolmen viikon jälkeen klooneja alettiin siirtää uudelle 96-kuoppalevyille. Kuoppien ollessa konfluentteja, solut irrotettiin huuhtelemalla PBS:llä ja lisäämällä 30 µl trypsiiniä-EDTA:ta. Solujen irrottua trypsiini inaktivoitiin lisäämällä 100 µl elatusainetta. 100 µl siirrettiin 24-kuoppalevyille ja loput siirrettiin uudelle 96-kuoppalevyille DNA:n eristystä varten. Solujen jakautuessa ne siirrettiin 24-kuoppalevyiltä 6-kuoppalevyille, jossa niitä jaettiin tarpeen mukaan 1:6.

2.11 DNA:n eristys ja PCR valmiille klooneille

DNA eristettiin lisäämällä 96-kuoppalevyn kuoppiin 20 µl DNA Releasy ADVANCE -eristysliuosta, minkä seurauksena solut kuolivat ja irtosivat alustasta. Lysaatit siirrettiin PCR-liuskaan ja niitä käsiteltiin ThermoCycler-koneessa seuraavalla tavalla: 65 °C 5 min, 96 °C 5 min, 20 °C 5 min.

Ensimmäisessä PCR-ajossa ajettiin PC-3-kloonit 1-16 sekä LNCaP-kloonit 1-19. PCR tehtiin samalla protokollalla kuin luvussa 2.6. PCR-reaktion onnistuminen tarkastettiin agarosigeelillä vastaavasti kuin luvussa 2.3. PCR:n tulos haluttiin varmistaa ajamalla osa näytteistä uudelleen. Samalla ajettiin PC-3-villityypin DNA:ta sekä GFP-jaoteltujen LNCaP-solujen DNA:ta. PCR-reaktio tehtiin ja reaktion onnistuminen tarkastettiin muuten vastaavasti kuin aiemmin, mutta geelin annettiin ajautua 60 min. Agarosigeeliltä valittiin kolme PC-3-kloonia, joista eristettiin DNA (luku 2.12).

PC-3-klooneille 1-26 tehtiin PCR käyttämällä forward-aluketta (HOXB13_KO_F1: ATGGTTACTTTGGAGGCGGG), joka sijoittuu onnistuneen CRISPR-Cas9-reaktion seurauksena genomista oletettavasti poistuneelle alueelle. Reaktio tehtiin muuten samalla protokollalla kuin luvussa 2.6, mutta forward-aluke korvattiin tällä alukkeella. Samalla ajettiin normaalia protokollaa noudattava PCR LNCaP-klooneille 20-28.

DNA eristettiin lopulta vielä PC-3-klooneilta 27-48 sekä LNCaP-klooneilta 29-34. PC-3-kloonien 35-48 ja LNCaP-kloonien 29-34 kasvu oli pysähtynyt ja niistä saatiin vain DNA-näytteet. Näille näytteille ajettiin PCR luvun 2.6 protokollan mukaisesti. Agarosigeeli ajettiin vastaavasti kuin luvussa 2.3.

2.12 Joidenkin PCR-tuotteiden eristys geeliltä ja sekvensointi, PC-3-kloonin 40 PCR:n uusiminen, PCR-tuotteen puhdistus sekä sekvensointi

Geeliltä eristettiin PC-3-villityypin sekä kloonien 1, 3 ja 5 PCR-tuotteet käyttämällä NucleoSpin Gel and PCR clean-up -kittiä (Macherey Nagel). DNA-näytteistä mitattiin konsentraatio NanoDrop-laitteella ja ne lähetettiin Sanger-sekvensoitavaksi ulkopuoliseen sekvensointipalveluun (EuroFins). Sekvensointialukkeena käytettiin samaa forward-aluketta kuin luvussa 2.6 kuvatussa PCR-protokollassa.

PC-3-kloonille 40 tehtiin uusi PCR-reaktio ja PCR-tuote puhdistettiin käyttämällä NucleoSpin Gel and PCR clean-up -kittiä (Macherey Nagel). DNA-konsentraatio mitattiin NanoDrop-laitteella ja näyte lähetettiin Sanger-sekvensoitavaksi ulkopuoliseen sekvensointipalveluun (EuroFins). Sekvensointialukkeena käytettiin samaa forward-aluketta kuin luvussa 2.6 kuvatussa PCR-protokollassa.

2.13 Proteiinin eristys, proteiinikonsentraation määrittäminen ja western blot

Suurin osa PC-3-klooneista lopetti kasvamisen. Muutamalle hyvin kasvaneelle kloonille (1, 2, 5, 8, 12, ja 21) päätettiin tehdä western blot -analyysi. Analyysiin otettiin mukaan myös tutkimuksesta erillisiä villityypin soluja. Kloonit ja villityypin solut siirrettiin 6-kuoppalevyille kasvamaan ennen proteiinin eristystä. Eristys tehtiin käyttämällä RIPA-puskuria, jonka koostumus oli 50 mM Tris-Cl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 % NP-40 lyysispuskuria, 0,5 % natrium deoksikolaattia sekä 0,1 % SDS:ää. Puskuria tehtiin yhteensä 10 ml ja juuri ennen käyttöä siihen lisättiin vielä 200 µl liuotettua proteaasi-inhibiittoria (protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, 1 tabletti liuotettuna 1 ml:aan PBS:ää). Jäällä olevat solut pestiin kerran kylmällä PBS:llä, PBS poistettiin huolellisesti, ja sen jälkeen lisättiin 150 µl kylmää RIPA-puskuria. Solut irrotettiin kaapimalla, ja lysaatit siirrettiin eppendorf-putkiin, minkä jälkeen niitä inkuboitiin jäällä 30 min. Inkubaation jälkeen solut sentrifugoitiin asetuksilla 13 000 rcf, 20 min, +4 °C. Supernatantti siirrettiin uuteen putkeen, josta 40 µl otettiin proteiinikonsentraation määrittämistä varten ja loput pakastettiin.

Proteiinin konsentraatio määritettiin näytteistä käyttämällä BCA Protein Assay -kittiä (Pierce™). Näytteiden konsentraatio mitattiin sekä laimentamattomasta, että 1:5 laimennetusta proteiininäytteestä. Standardit ja näytteet tehtiin triplikaatteina. Jokaista standardia ja näytettä pipetoitiin 10 µl 96-kuoppalevyn kaivoon ja päälle lisättiin 200 µl kitin ohjeen mukaan sekoitettua reagenssin A ja B sekoitusta. Näytteitä inkuboitiin 30 min 37 °C:ssa, minkä jälkeen niistä mitattiin absorbanssi 570 nm:n aallonpituudella. Näytteiden konsentraatiot laskettiin standardisuoran avulla.

Western blot -analyysia varten proteiininäytteisiin lisättiin neljäsosatilavuus 4X Laemmli -puskuria, johon oli lisätty 10 % merkaptetaanolia (4X Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad; 2-mercaptoethanol for electrophoresis, Sigma) ja näytteitä keitettiin 95 °C:ssa 5 min. Tämän jälkeen näytteitä ladattiin 15 µg Bio-Radin Mini-PROTEAN® TGX™ 4-20 % -valmisgeelille. Markkerina käytettiin NIPPON Genetics BlueStar Plus Prestained Protein -markkeria. Näytteitä ajettiin ajopuskurissa (25 mM Tris, 190 mM glysiini, 0,1 % SDS) 120 V 1,5 tuntia. Immobilon® -P -membraani aktivoitiin metanolissa ja huuhdeltiin siirtopuskurissa (koostumus muuten sama kuin ajopuskurissa, mutta lisäksi 20 % EtOH:a) ennen käyttöä. Myös suodatinpaperit kasteltiin siirtopuskurissa. Siirto tehtiin kosteamenetelmällä (wet transfer) ja sitä varten kasattiin tiukasti yhteen siirtopuskurissa kasteltu sieni, suodatinpaperi, geeli, membraani, suodatinpaperi sekä siirtopuskurissa kasteltu sieni tässä järjestyksessä. Siirto tehtiin siirtopuskurissa 70 V 2,5 tuntia kylmähuoneessa. Siirron jälkeen membraani huuhdeltiin TBST:llä (1X TBS, jossa 0,1 % Tween 20, Bio-Rad) ja siirrettiin 50 ml:n falcon-putkeen, jossa sitä blokattiin huoneenlämmössä 60 min 5 % rasvattomassa maitoliuoksessa (PanReac AppliChem).

Primäärivasta-ainekäsittely tehtiin käyttämällä kanissa tuotettua monoklonaalista HOXB13-vasta-ainetta (Cell Signaling TECHNOLOGY) laimennoksessa 1:1000. Laimennos tehtiin 1 % BSA-TBST:hen. Primäärivasta-aineen annettiin vaikuttaa kylmähuoneessa yön yli. Tämän jälkeen membraania inkuboitiin TBST:ssä 3 x 5 min. Inkubaatioiden jälkeen tehtiin sekundaarivasta-ainekäsittely anti-kani-vasta-aineella (Goat pAb to Rb IgG (HRP), abcam) 5 % rasvattomaan maitoliuokseen tehdyllä 1:10 000 laimennoksella. Vasta-ainekäsittely tehtiin huoneenlämmössä 60 min. Käsittelyn jälkeen membraania inkuboitiin TBST:ssä 3x 5 min. Inkubointien jälkeen membraania käsiteltiin 2 min Advansta WesternBright™ -kemiluminesenssireagenssissa (komponenttia 1 ja 2 1:1 sekoitettuna). Membraani laitettiin kalvojen väliin ja kuvattiin ChemiDoc imager -laitteella.

Membranaa inkuboitii TBST:ssä 5 min. Latauskontrollia varten sitoutuneet vasta-aineet poistettiin membraanilta inkuboimalla 15 minuuttia Restore™ PLUS Western Blot Stripping -puskurilla (Thermo Scientific). Membranaa huuhdeltiin TBST:ssä 6 x 5 min, minkä jälkeen membraani blokattiin huoneenlämmössä 60 min 5 % rasvattomassa maitoliuoksessa. Primäärivasta-ainekäsittely tehtiin hiiressä tuotetulla monoklonaalisella beta-aktiini-vasta-aineella (Beta-Actin Mouse mAb, Cell Signaling TECHNOLOGY) laimennettuna 1:1000 1 % BSA-TBST:hen. Käsittely tehtiin yön yli kylmähuoneessa. Tämän jälkeen membraania inkuboitii TBST:ssä 3 x 5 min. Inkubaatioiden jälkeen tehtiin sekundaarivasta-ainekäsittely anti-hiiri-vasta-aineella (Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody, Cell Signaling TECHNOLOGY) 5 % rasvattomaan maitoliuokseen tehdyllä 1:10 000 laimennoksella. Vasta-ainekäsittely tehtiin huoneenlämmössä 60 min. Käsittelyn jälkeen membraania inkuboitii TBST:ssä 3 x 5 min. Inkubointien jälkeen membraania käsiteltiin 2 min Advansta WesternBright™ -kemiluminesenssireagenssissa (komponenttia 1 ja 2 1:1 sekoitettuna). Membraani laitettiin kalvojen väliin ja kuvattiin ChemiDoc Imager -laitteella.

2.14 CRISPR-Cas9-strategia tiivistettynä

Ohessa on esitetty tutkimukseen suunniteltu CRISPR-Cas9-strategia esitettynä osittaisen *HOXB13*-sekvenssin avulla (eksonista 1).

```

CCATGGAGCCCGGAATTATGCCACCTGGATGGAGCCAAGGATATCGAAG
GCTTGCTGGGAGCGGGAGGGGGCGGAATCTGGTCGCCCACTCCCCTCTGA
CCAGCCACCCAGCGGCGCCTACGCTGATGCCTGCTGTCAACTATGCCCCCTT
GGATCTGCCAGGCTCGGCGGAGCCGCCAAAGCAATGCCACCCATGCCCTGG
GGTGCCCCAGGGGACGTCCCCAGCTCCCGTGCCTTATGGTTACTTTGGAGGC
GGGTACTACTCCTGCCGAGTGTCCCGGAGCTCGCTGAAACCCTGTGCCAG
GCAGCCACCCTGGCCGCGTACCCCGGAGACTCCCACGGCCGGGGAAGAG
TACCCAGCCGCCCACTGAGTTTGCCTTCTATCCGGGATATCCGGGAACCT
ACCAGCCTATGGCCAGTTACCTGGACGTGTCTGTGGTGCAGACTCTGGGTGC
TCCTGGAGAACCGCGACATGACTCCCTGTTGCCTGTGGACAGTTACCAGTCT
TGGGCTCTCGCTGGTGGCTGGAACAGCCAGATGTGTTGCCAGGGAGAACAG
AACCCACCAGGTCCCTTTTGAAGGCAGCATTTCAG

```

PAM-sekvenssit (alleviivattu):

5'CCC (vastakkaisessa juosteessa 5'GGG)

5'CCG (vastakkaisessa juosteessa 5'CGG)

Ohjain-RNA:t (sitoutumiskohdat keltaisella yliviivauksella, leikkauskohdat merkitty nuolin):

TGGTAGGTTCCCGGATATCC

GCATCAGCGTAGGCGCCGCT

PCR-alukkeet (värikoodattu):

HOXB13_G84E_F1 **CCATGGAGCCCGGCAATTAT**

HOXB13_G84E_R1 **GCCATAGGCTGGTAGGTTCC**

VT-tuote 424 bp, oletettu KO-tuote 141 bp

HOXB13_G84E_F2: **CCGGCAATTATGCCACCTTG**

HOXB13_G84E_R2: **CCTGGTGGGTCTGTCTCC**

VT-tuote 568 bp, oletettu KO-tuote 285 bp

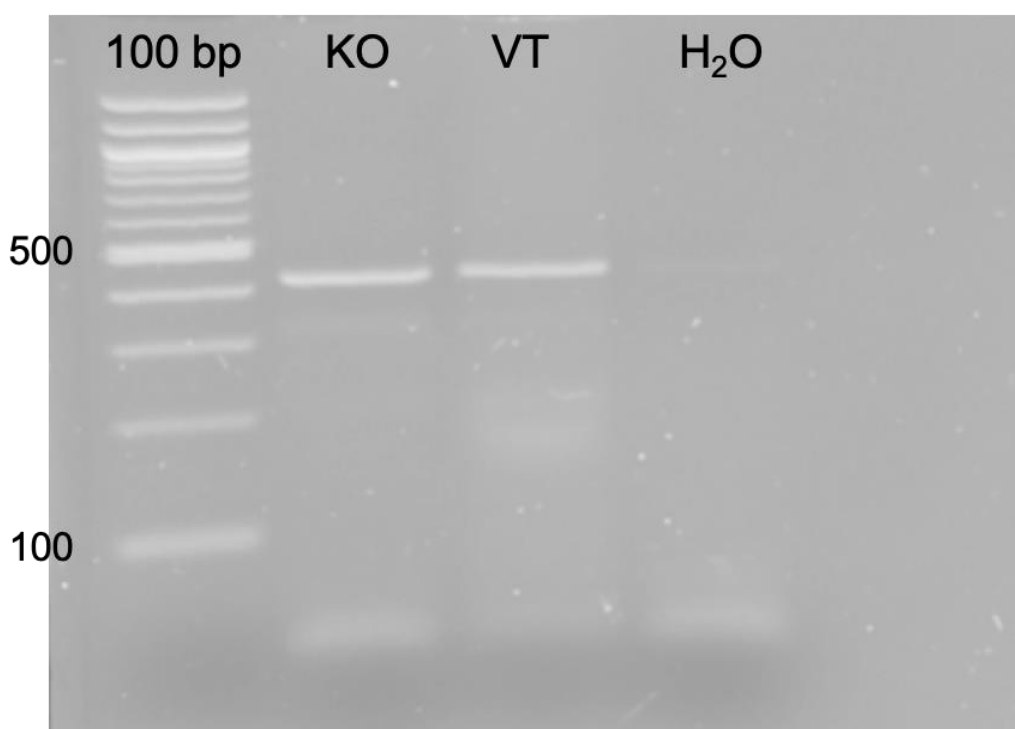
HOXB13_KO_F1: **ATGGTACTTTGGAGGCGGG**

VT-tuote yhdessä R2-alukkeen kanssa 337 bp, ei KO-tuotetta

3. TULOKSET

3.1 PCR-ajojen tulokset agarosigeelillä

Kuvassa 7 näkyy PX459-transfektoitujen LNCaP-solujen PCR:n tulos. Transfektoidut solut on merkitty kuvaan kirjainyhdistelmällä KO ja villityyppikontrolli VT. H₂O tarkoittaa negatiivista kontrollia, johon on templaatin sijasta lisätty nukleaasivapaata vettä. Kuvaan on merkitty molekyylipainomarkkerin 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. Molekyylipainomarkkeri on sama kaikissa PCR-kuvissa. Tuloksen perusteella populaatiossa ei ole poistogeenisiä soluja, sillä nähtävillä on ainoastaan villityypin 424 emäsparin kokoinen PCR-tuote.

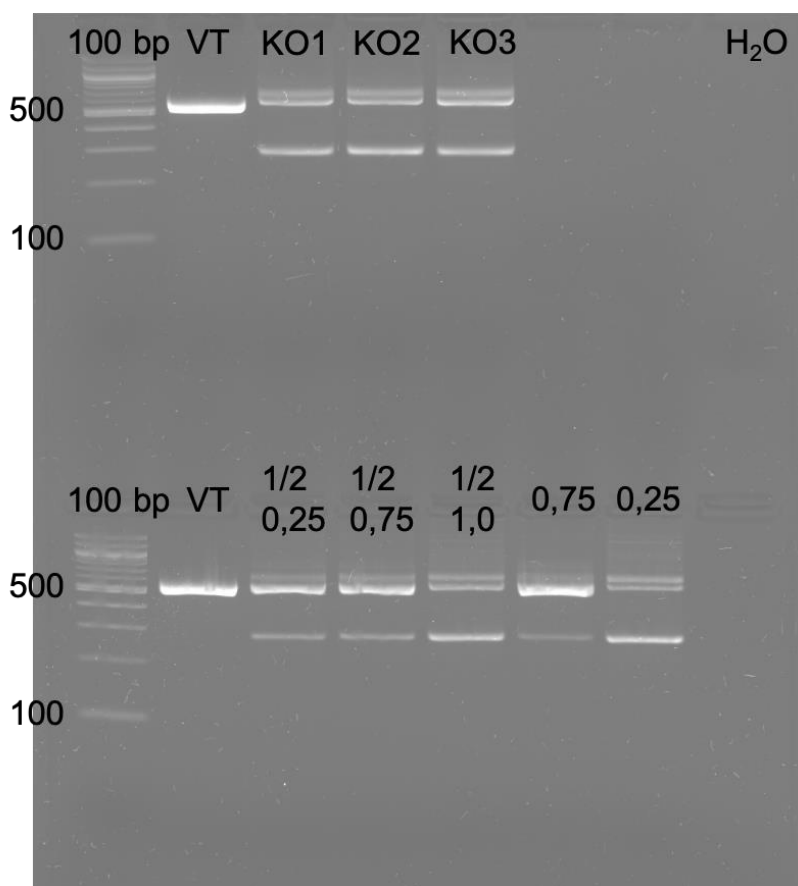


Kuva 7. PX459-transfektoitujen LNCaP-solujen PCR:n tulos. Populaatiossa ei ole poistogeenisiä soluja. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, KO = transfektoidut solut, VT = villityypin solut, H₂O = negatiivinen kontrolli.

PX458-transfektoitujen PC-3-solujen PCR:n tulos näkyy kuvan 8 ylärivillä. Transfektoidut solut on merkitty kuvaan kirjainyhdistelmällä KO ja villityyppikontrolli VT. H₂O tarkoittaa negatiivista kontrollia, johon on templaatin sijasta lisätty nukleaasivapaata vettä. CRISPR-Cas9-reaktio on onnistunut joissain soluissa, sillä

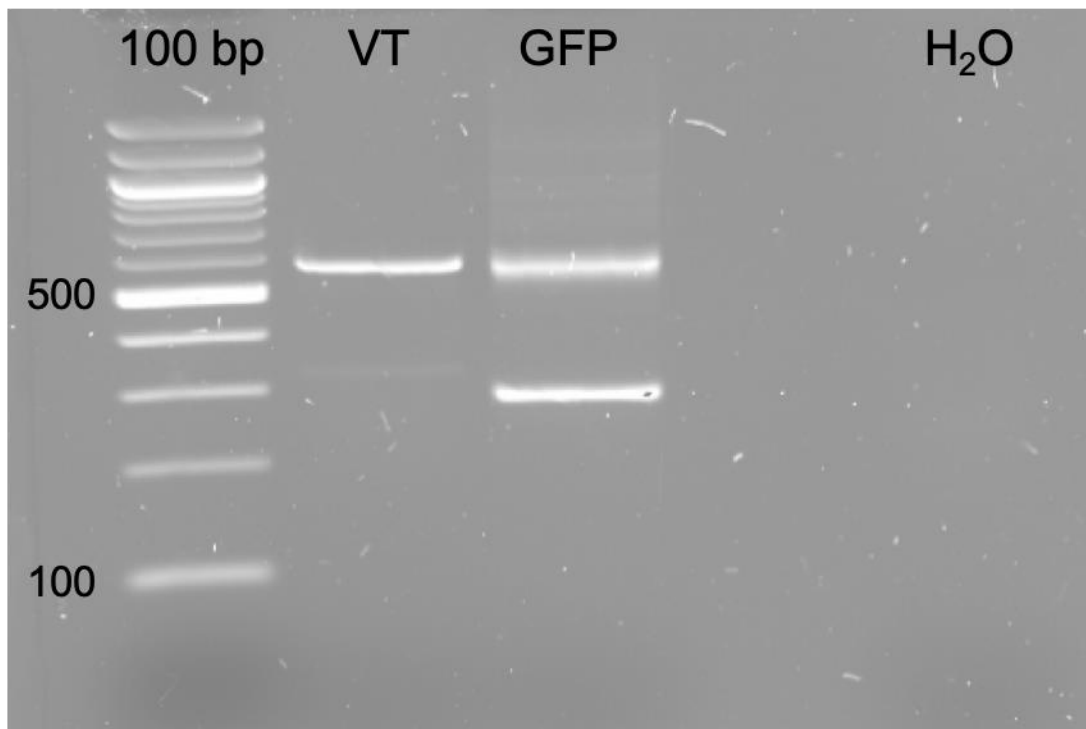
nähtävillä on sekä villityypin 568 emäsparin kokoinen PCR-tuote että poistogeenisten solujen 285 emäsparin kokoinen PCR-tuote.

Kuvan 8 alarivillä näkyy optimoidulla PX459-protokollalla transfektoitujen solujen PCR:n tulos. Merkintä 1/2 tarkoittaa populaatioita, joissa transfektointireagenssien määrä vähennettiin puoleen normaalista. 0,25, 0,75 ja 1,0 tarkoittavat plasmidin määrää mikrogrammoissa. VT tarkoittaa villityypin DNA:ta. CRISPR-Cas9-reaktio on onnistunut kaikissa populaatioissa, sillä nähtävillä on sekä villityypin 568 emäsparin kokoinen PCR-tuote, että poistogeenisen solun 285 emäsparin kokoinen PCR-tuote. Populaatioissa 1/2 + 1,0 sekä 0,25 transfektio on onnistunut hieman paremmin kuin muissa populaatioissa.



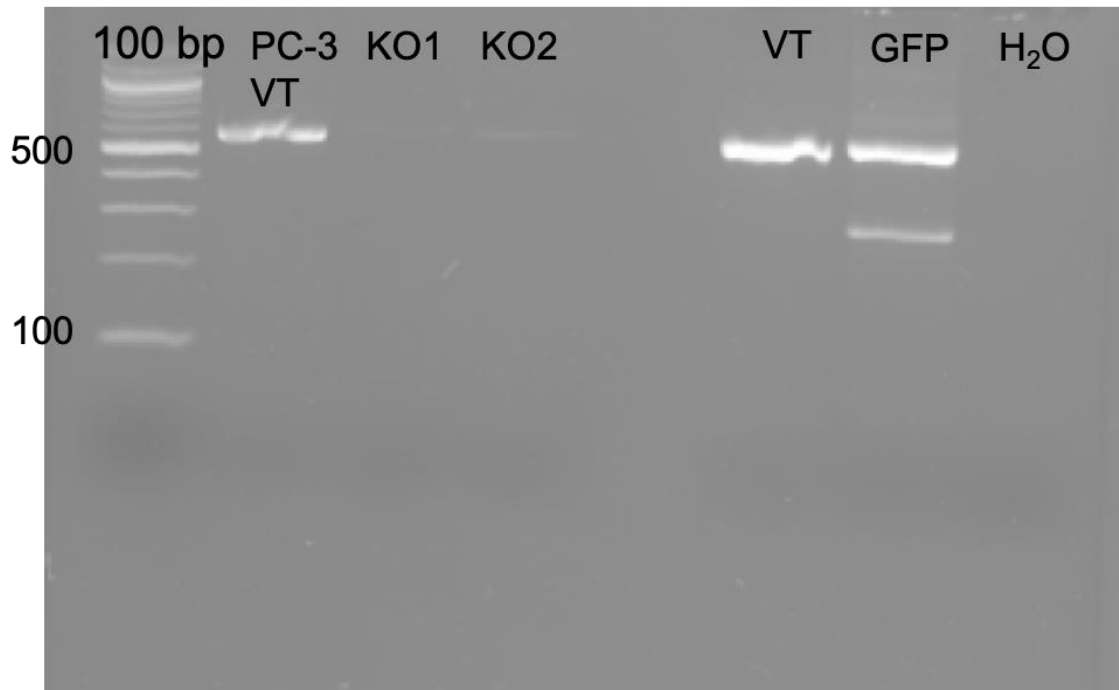
Kuva 8. PX458- ja PX459-transfektioitujen PC-3-solujen PCR:n tulos. Ylärivillä näkyvä PX458-transfektioitujen solut, joissa on havaittavissa sekä villityypin, että poistogeenisten solujen PCR-tuotteet. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, VT = villityyppi, KO = transfektoidut solut, H₂O = negatiivinen kontrolli. Alarivillä näkyy optimoidulla PX459-protokollalla transfektoitujen solujen PCR:n tulos. Kaikissa testipopulaatioissa transfektio on onnistunut. Populaatioissa 1/2 + 1,0 sekä 0,25 transfektio on onnistunut hieman paremmin kuin muissa. VT = villityyppi, 1/2 = transfektioireagenssien määrä vähennetty puoleen, 0,25/0,75/1 = transfektoidun plasmidin määrä mikrogrammoina.

Kuvassa 9 on nähtävillä GFP:n perusteella eroteltujen PX458-transfektoitujen PC-3-solujen PCR:n tulos. GFP:n perusteella erotellut solut on merkitty kuvaan kirjainyhdistelmällä GFP ja villityypin solut VT. H₂O tarkoittaa negatiivista kontrollia, johon on templaatin sijasta lisätty nukleasivapaata vettä. Tuloksen perusteella noin puolissa soluista CRISPR-Cas9-reaktio on onnistunut ja nähtävillä on villityypin lisäksi poistogeenisille soluille spesifinen 285 emäsparin kokoinen PCR-tuote.



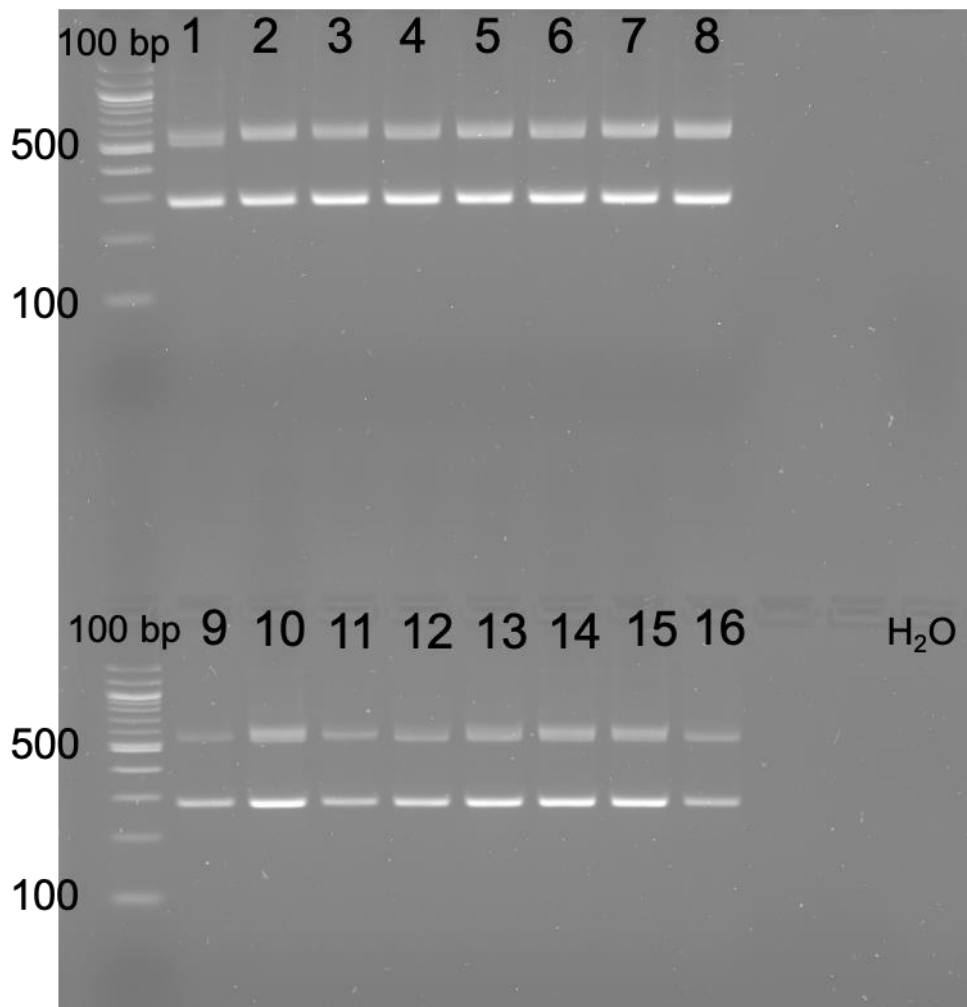
Kuva 9. GFP:n perusteella jaoteltujen PX458-transfektoitujen PC-3-solujen PCR:n tulos. CRISPR-Cas9-reaktio on onnistunut noin puolella populaation soluista, sillä nähtävillä on sekä villityyppinen PCR-tuote että poistogeeninen PCR-tuote. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, VT = villityyppi, GFP = transfektoidut solut, H₂O = negatiivinen kontrolli.

PX459-transfektoitujen yksittäissolujaottelusta selvinneiden kahden PC-3-kloonin PCR:n tulos näkyy kuvassa 10. Transfektoidut solut on merkitty kuvaan kirjainyhdistelmällä KO ja PC-3-villityyppi PC-3 VT. Havaittavissa on vain hyvin heikot villityypin DNA:ta vastaavat PCR-tuotteet. Kuvassa näkyy myös GFP:n perusteella jaoteltujen LNCaP-solujen PCR:n tulos. Kuvassa GFP tarkoittaa jaoteltuja soluja ja VT LNCaP-villityypin soluja. H₂O tarkoittaa negatiivista kontrollia, johon on templaatin sijasta lisätty nukleasivapaata vettä. Transfektio on onnistunut hieman heikommin verrattuna kuvan 9 PC-3-solujen transfektioon.



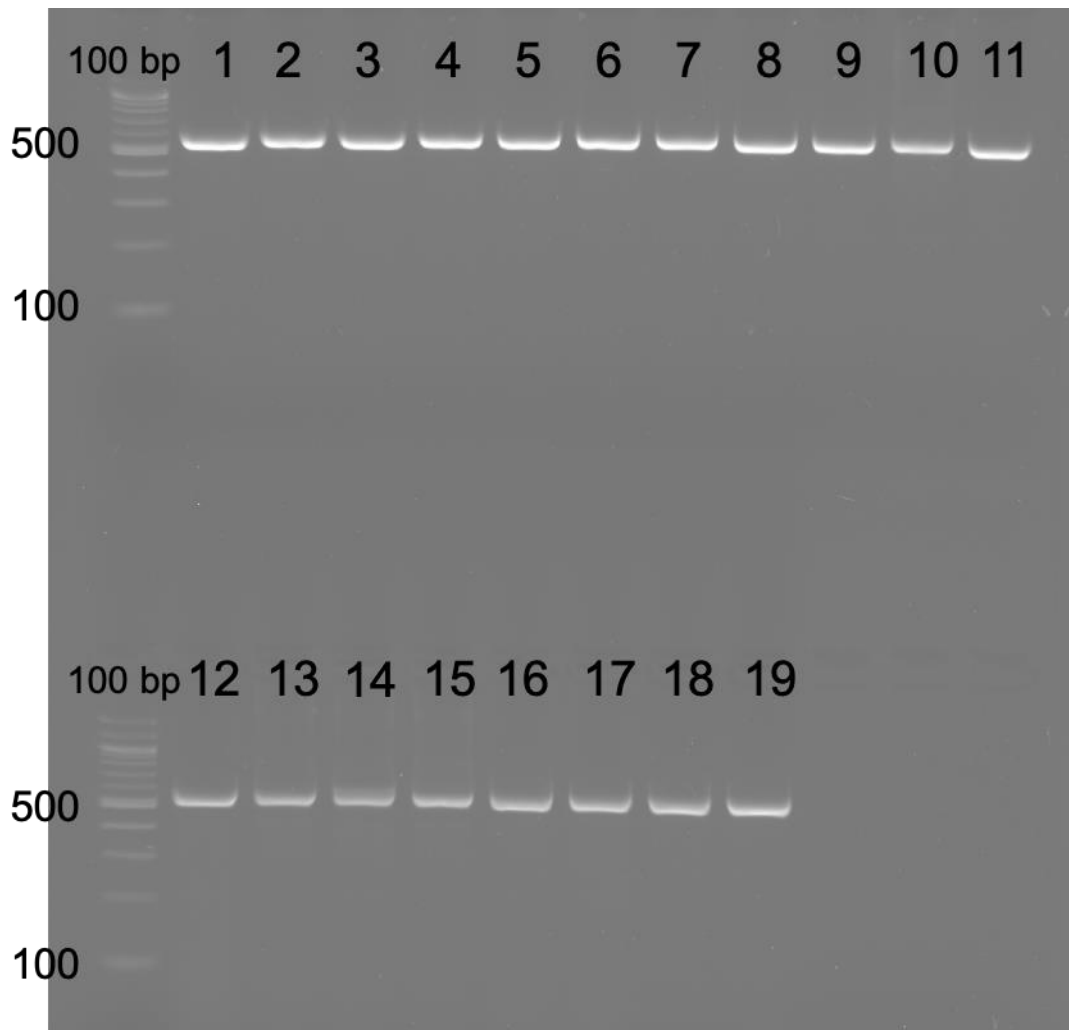
Kuva 10. Yksittäissolujaoteltujen PX459-transfektoitujen PC-3-solujen sekä GFP:n perusteella jaoteltujen PX458-transfektoitujen LNCaP-solujen PCR:n tulos. PC-3-solut ovat villityyppiä. LNCaP-soluissa CRISPR-Cas9-reaktio on toiminut selkeästi alle puolissa soluista. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, PC-3 VT = PC-3 villityyppi, KO = PX459-transfektoidut yksittäisjaotellut PC-3-solut, VT = LNCaP villityyppi, GFP = GFP:n perusteella jaotellut PX458-transfektoidut LNCaP-solut, H₂O = negatiivinen kontrolli.

Kuvassa 11 näkyy yksittäissolujaoteltujen PX458-transfektoitujen PC-3-kloonien PCR:n tulos. Kloonien nimeämisessä on käytetty juoksevaa numerointia. H₂O tarkoittaa negatiivista kontrollia, johon on templaatin sijasta lisätty nukleaasivapaata vettä. Kloonit 1-16 ovat kaikki heterotsygootteja *HOXB13*-geenin suhteen.



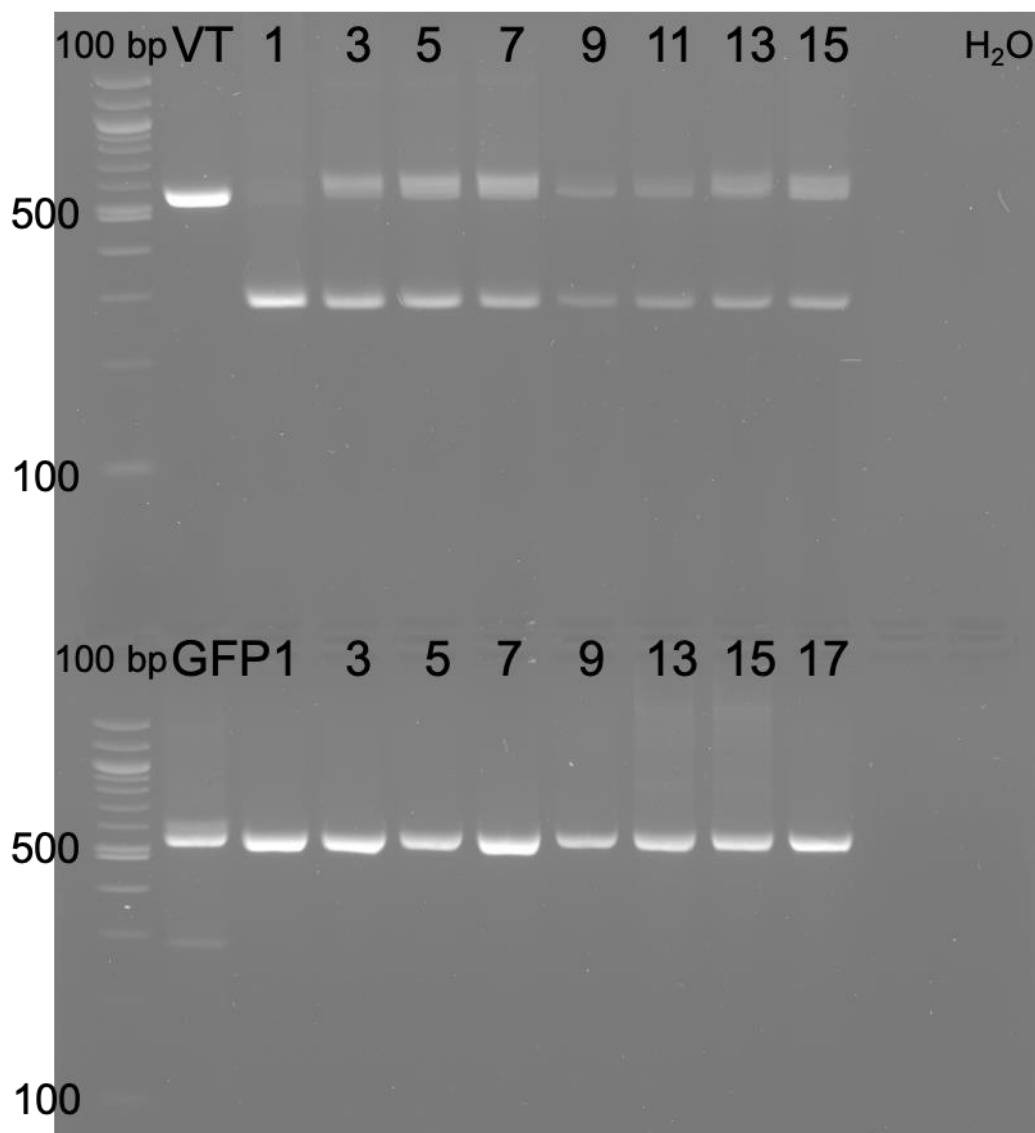
Kuva 11. Yksittäissolujaoteltujen PX458-transfektoitujen PC-3-solukloonien 1-16 PCR:n tulos. Kaikki kloonit ovat heterotsygoottisia *HOXB13*-geenin suhteen. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, H₂O = negatiivinen kontrolli.

Kuvassa 12 näkyy yksittäissolujaoteltujen PX458-transfektoitujen LNCaP-kloonien PCR:n tulos. Kloonien nimeämisessä on käytetty juoksevaa numerointia. H₂O tarkoittaa negatiivista kontrollia, johon on templaatin sijasta lisätty nukleaasivapaata vettä. Klooneissa 1-19 CRISPR-Cas9-reaktio ei ole onnistunut ja nähtävillä on ainoastaan villityypin PCR-tuote.



Kuva 12. Yksittäissolujaoteltujen PX458-transfektoitujen LNCaP-kloonien 1-19 PCR:n tulos. Kaikki solut ovat villityyppejä. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri.

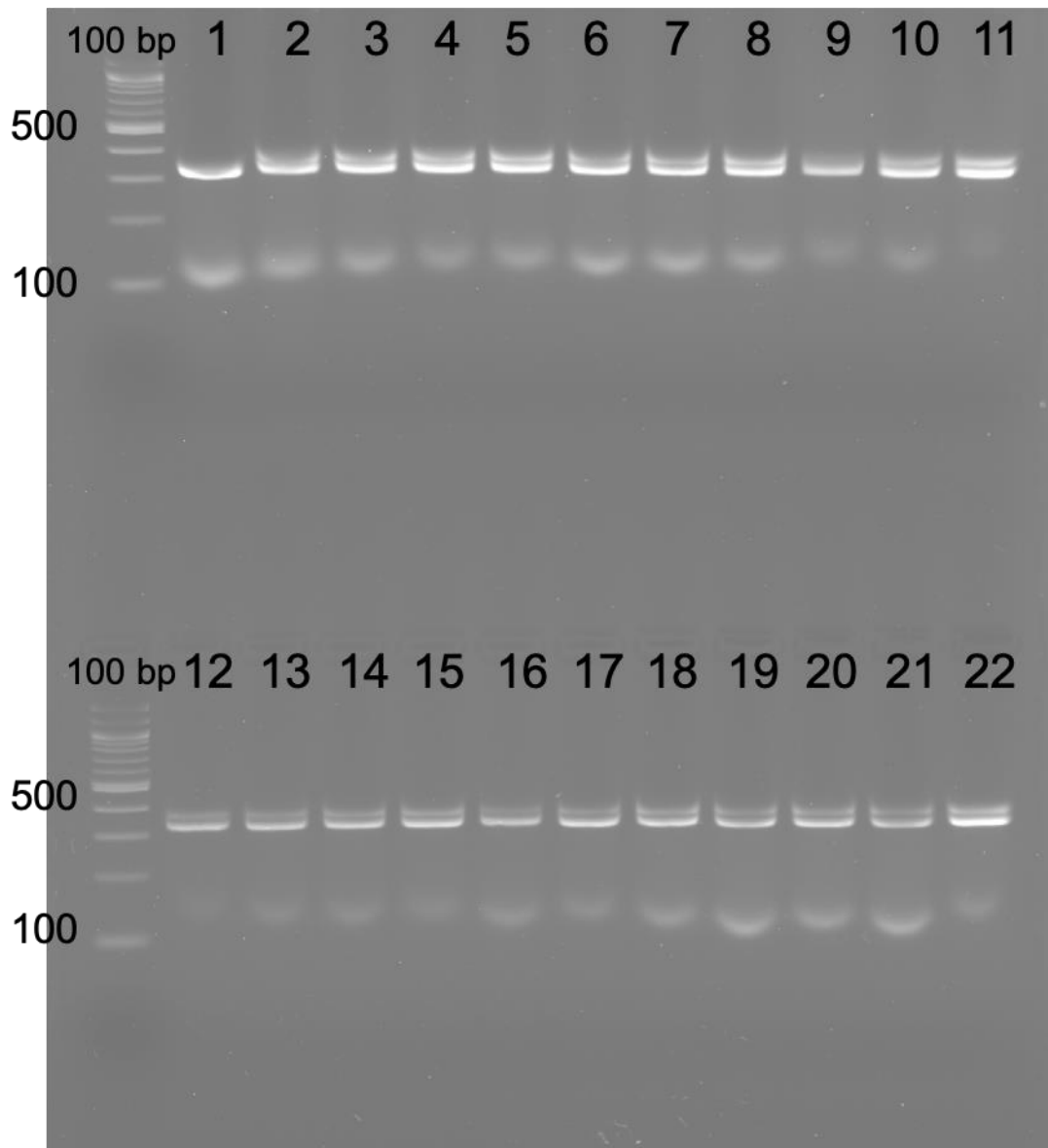
Joidenkin yksittäissolujaoteltujen PX458-transfektoitujen PC-3- sekä LNCaP-solukloonien uusinta-PCR:n tulos näkyy kuvassa 13 (juokseva numerointi). Lisäksi samaan PCR-ajoon otettiin PC-3-villityypin DNA:ta sekä GFP-jaoteltujen LNCaP-solujen DNA:ta, jotta voitiin varmistua siitä, että PCR-reaktio monistaa PC-3-villityypin DNA:ta sekä poistogeenisiä LNCaP-klooneja oletetulla tavalla. Tulokset vastaavat aiempia tuloksia muilta osin, mutta PC-3-kloonin 1 tulos uusinta-PCR:ssä poikkeaa merkittävästi aiemmasta tuloksesta, sillä villityypin tuote on huomattavasti heikompi kuin aiemmin.



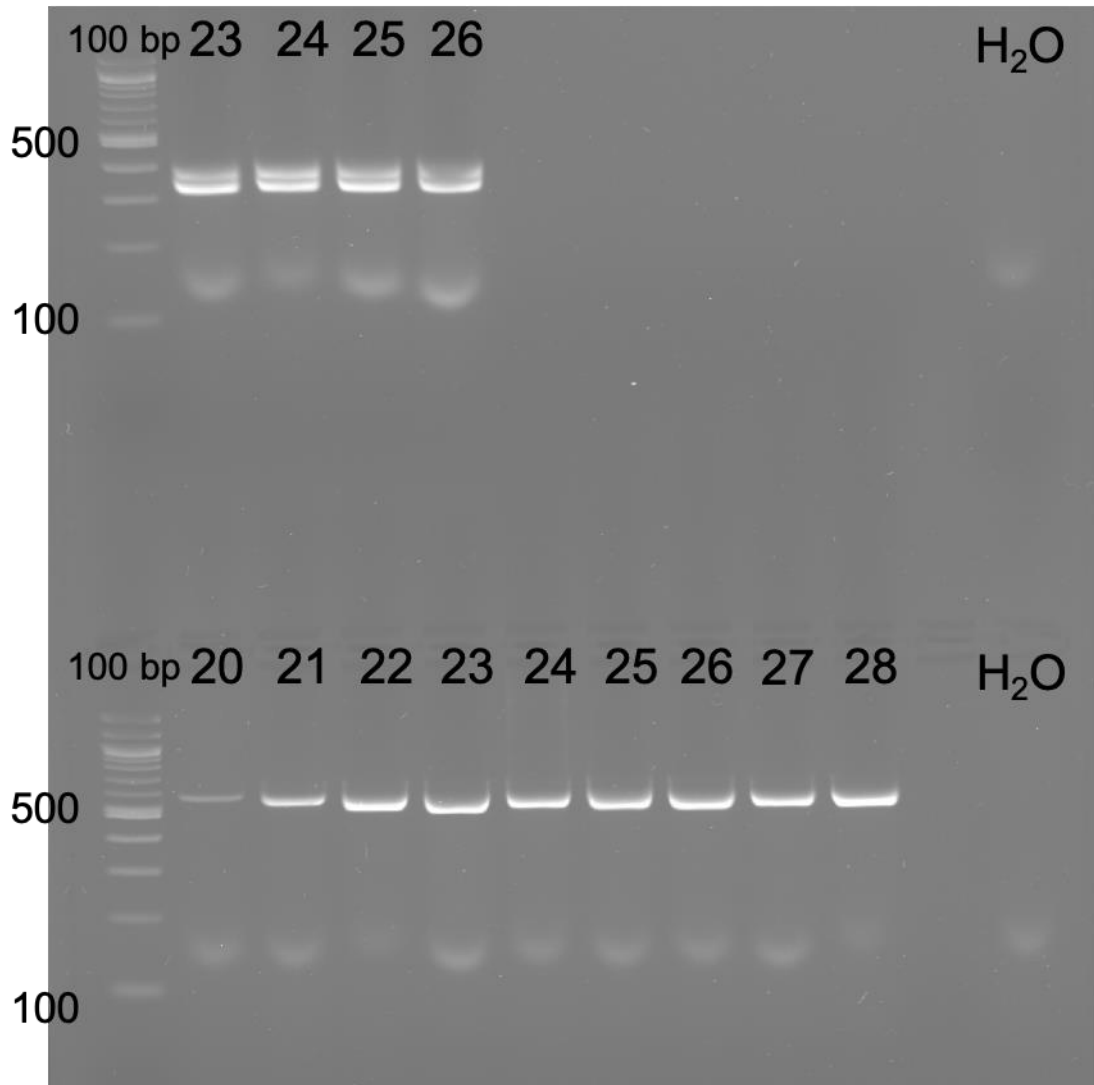
Kuva 13. Joidenkin yksittäissolujaoteltujen PX458-transfektoidujen PC-3- sekä LNCaP-solukloonien uusinta-PCR:n tulos. Ylärivillä näkyy PC-3-solut ja alarivillä LNCaP-solut. Kloonien lisäksi samassa ajossa on ajettu PC-3 villityypin sekä GFP-jaoteltujen LNCaP-solujen DNA:ta. Uusinta-PCR vastaa aiempia tuloksia muilta osin, mutta PC-3 kloonin 1 PCR-tuote poikkeaa huomattavasti aiemmasta ajosta. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, VT = PC-3 villityyppi, GFP = GFP:n perusteella jaotellut LNCaP-solut, H₂O = negatiivinen kontrolli.

Kuvassa 14 sekä kuvan 15 ylärivillä näkyy poistogeeni-forward-alukkeella monistettujen PC-3-kloonien 1-26 PCR:n tulos. Tuloksen perusteella kokonaan poistogeenisten solujen tuottaminen ei ole onnistunut, sillä tässä tapauksessa PCR-tuotetta ei pitäisi olla nähtävillä. Lisäksi kuvassa on nähtävillä oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita.

Kuvan 15 alarivillä näkyy LNCaP-kloonien 20-28 PCR:n tulos. Tuloksen perusteella CRISPR-Cas9-reaktio ei ole onnistunut, sillä nähtävillä on ainoastaan villityyppisiä PCR-tuotteita. Lisäksi kuvassa on nähtävillä oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita.

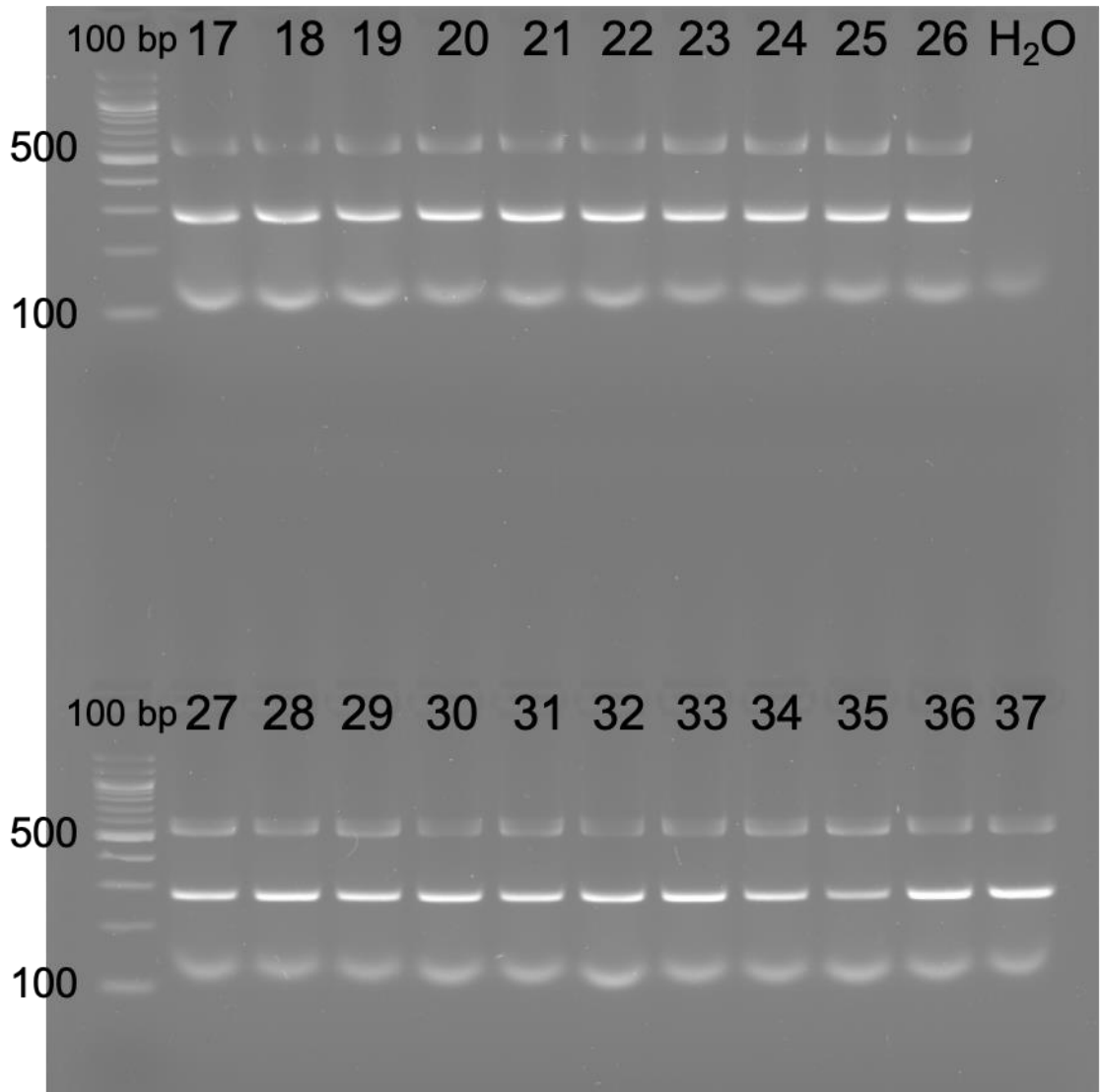


Kuva 14. Poistogeeni-forward-alukkeella monistettujen PC-3 kloonien 1-22 PCR:n tulos. Poistogeenisten solujen tuotto ei ole onnistunut, sillä tällöin PCR-tuotetta ei näkyisi ollenkaan. Lisäksi kuvassa näkyy oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri.



Kuva 15. Poistogeeni-forward-alukkeella monistettujen PC-3 kloonien 23-26 PCR:n tulos (ylärivillä) sekä LNCaP-kloonien 20-28 PCR:n tulos (alarivillä). Täysin poistogeenisten PC-3-solujen tuotto ei ole onnistunut, sillä tällöin PCR-tuotetta ei näkyisi ollenkaan. LNCaP-kloonit ovat kaikki villityyppejä. Lisäksi kuvassa näkyy oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, H₂O = negatiivinen kontrolli.

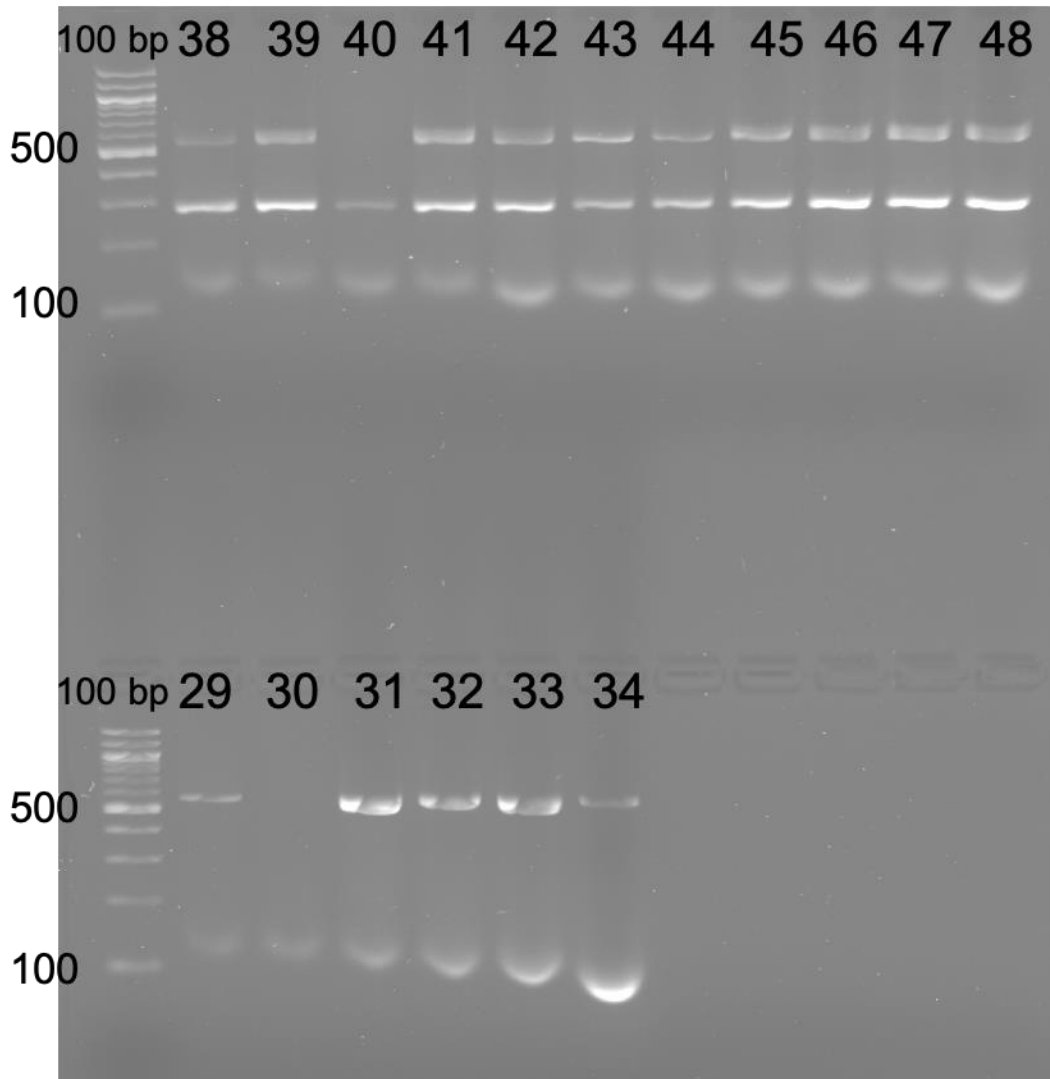
PC-3-kloonien 17-37 PCR:n tulos on nähtävillä kuvassa 16. Tulos on vastaava kuin klooneilla 1-16. Lisäksi kuvassa on nähtävillä oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita.



Kuva 16. Yksittäissolujaotellut PX458-transfektoitujen PC-3-solukloonien 17-37 PCR:n tulos. Kaikki kloonit ovat heterotsygoottisia *HOXB13*-geenin suhteen. Lisäksi kuvassa näkyy oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri, H₂O = negatiivinen kontrolli.

PC-3-kloonien 38-48 PCR:n tulos on nähtävillä kuvan 17 ylärivillä. Tulos on vastaava kuin klooneilla 1-37, paitsi kloonissa 40 on nähtävillä ainoastaan 285 emäsparin kokoinen poistogeeninen PCR-tuote. Lisäksi kuvassa on nähtävillä oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita.

Kuvan 17 alarivillä on nähtävissä LNCaP-kloonien 29-34 PCR:n tulos. Tulos on vastaava kuin muillakin LNCaP-klooneilla. Kloonin 30 PCR ei ole onnistunut. Lisäksi kuvassa on nähtävillä oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita.



Kuva 17. 10. Yksittäissolujaoteltujen PX458-transfektoitujen PC-3-solukloonien 38-48 (ylärivi) sekä LNCaP-solukloonien 29-34 (alarivi) PCR:n tulos. Kaikki PC-3-kloonit ovat heterotsygoottisia *HOXB13*-geenin suhteen, lukuun ottamatta kloonia 40, jossa on nähtävillä ainoastaan poistogeeninen PCR-tuote. LNCaP-kloonit ovat kaikki villityyppiä. Kloonin 30 PCR-reaktio ei ole toiminut. Lisäksi kuvassa on nähtävillä oletettavasti alukedimeereistä johtuvia lyhyitä PCR-tuotteita. Molekyylipainomarkkerista on merkitty 100:n ja 500:n emäsparin kokoiset alueet. 100 bp = 100 emäsparin molekyylipainomarkkeri.

3.2 Sekvensointitulokset

Ohessa on esitetty *HOXB13*-geenin proteiinia koodaava osuus jaettuna lukukehyksen mukaisesti kolmen nukleotidin pituisiin pätkiin. Tutkimuksessa käytettyjen ohjain-RNA-molekyylien sitoutumiskohdat on merkitty turkoosilla ja liilalla yliviiivauksella, PAM-sekvenssit on alleviivattu ja punaisena tekstinä näkyy osuus, joka pitäisi poistogeenisen DNA:n onnistuneen tuoton yhteydessä poistua.

ATG-GAG-CCC-GGC-AAT-TAT-GCC-ACC-TTG-GAT-GGA-GCC-AAG-GAT-
 ATC-GAA-GGC-TTG-CTG-GGA-GCG-GGA-GGG-GGG-CGG-AAT-CTG-GTC-
 GCC-CAC-TCC-CCT-CTG-ACC-AGC-CAC-CCA-GCG-GCG-CCT-ACG-CTG-
**ATG-CCT-GCT-GTC-AAC-TAT-GCC-CCC-TTG-GAT-CTG-CCA-GGC-TCG-GCG-
 GAG-CCG-CCA-AAG-CAA-TGC-CAC-CCA-TGC-CCT-GGG-GTG-CCC-CAG-
 GGG-ACG-TCC-CCA-GCT-CCC-GTG-CCT-TAT-GGT-TAC-TTT-GGA-GGC-
 GGG-TAC-TAC-TCC-TGC-CGA-GTG-TCC-CGG-AGC-TCG-CTG-AAA-CCC-
 TGT-GCC-CAG-GCA-GCC-ACC-CTG-GCC-GCG-TAC-CCC-GCG-GAG-ACT-
 CCC-ACG-GCC-GGG-GAA-GAG-TAC-CCC-AGC-CGC-CCC-ACT-GAG-TTT-
 GCC-TTC-TAT-CCG-GGA-TAT-CCG-GGA-ACC-TAC-CAG-CCT-ATG-GCC-
 AGT-TAC-CTG-GAC-GTG-TCT-GTG-GTG-CAG-ACT-CTG-GGT-GCT-CCT-
 GGA-GAA-CCG-CGA-CAT-GAC-TCC-CTG-TTG-CCT-GTG-GAC-AGT-TAC-
 CAG-TCT-TGG-GCT-CTC-GCT-GGT-GGC-TGG-AAC-AGC-CAG-ATG-TGT-
 TGC-CAG-GGA-GAA-CAG-AAC-CCA-CCA-GGT-CCC-TTT-TGG-AAG-GCA-
 GCA-TTT-GCA-GAC-TCC-AGC-GGG-CAG-CAC-CCT-CCT-GAC-GCC-TGC-
 GCC-TTT-CGT-CGC-GGC-CGC-AAG-AAA-CGC-ATT-CCG-TAC-AGC-AAG-
 GGG-CAG-TTG-CGG-GAG-CTG-GAG-CGG-GAG-TAT-GCG-GCT-AAC-AAG-
 TTC-ATC-ACC-AAG-GAC-AAG-AGG-CGC-AAG-ATC-TCG-GCA-GCC-ACC-
 AGC-CTC-TCG-GAG-CGC-CAG-ATT-ACC-ATC-TGG-TTT-CAG-AAC-CGC-
 CGG-GTC-AAA-GAG-AAG-AAG-GTT-CTC-GCC-AAG-GTG-AAG-AAC-AGC-
 GCT-ACC-CCT-**TAA****

Seuraavaksi on esitetty oletettu DNA-sekvenssi sen jälkeen, kun edellisen sekvenssin punaisella merkitty osuus on poistunut. PAM-sekvenssi on alleviivattu, jäljelle jäävät osat ohjain-RNA-molekyylien sitoutumiskohdista on merkitty turkoosilla ja liilalla yliviivauksella. Oranssilla tekstillä on merkitty kohta, josta ”uusi” DNA alkaa:

ATGGAGCCCGGCAATTATGCCACCTTGGATGGAGCCAAGGATATCGAAGGC
 TTGCTGGGAGCGGGAGGGGGGCGGAATCTGGTCGCCCACTCCCCTCTGACC
 AGCCACCC**AGCTATCCGGGAACCTACCA**GCCTATGGCCAGTTACCTGGACG
 TGTCTGTGGTGCAGACTCTGGGTGCTCCTGGAGAACCGCGACATGACTCCCT
 GTTGCCTGTGGACAGTTACCAGTCTTGGGCTCTCGCTGGTGGCTGGAACAGC
 CAGATGTGTTGCCAGGGAGAACAACAACCCACCAGGTCCCTTTTGGAAGGCA
 GCATTTGCAGACTCCAGCGGGCAGCACCCCTCCTGACGCCTTTCGTC
 GCGGCCGCAAGAAACAGAGGCGCAAGATCTCGGCAGCCACCAGCCTCTCGG
 AGCGCCAGATTACCATCTGGTTTCAGAACCGCCGGGTCAAAGAGAAGAAGG
 TTCTCGCCAAGG**TGA**AGAACAGCGCTACCCCT**TAA**

Ohessa on esitetty poistogeenisten PCR-tuotteiden sekvensoinnin tulokset. Kaikissa tuotteissa näkyy vihreällä tekstillä merkitty oletettuun DNA:han verrattuna ylimääräinen guaniini.

Klooni 1, geeliltä eristetty poistogeeninen tuote:

CCCAGC**GTATCCGGGAACCTACCAGCCTATGGCCAGTTACCTGGACGTGTCT
 GTGGTGCAGACTCTGGGTGCTCCTGGAGAACCGCGACATGACTCCCTGTTGC
 CTGTGGACAGTTACCAGTCTTGGGCTCTCGCTGGTGGCTGGAAC**

Klooni 3, geeliltä eristetty poistogeeninen tuote:

CCCAGCGTATCCGGGAACCTACCAGCCTATGGCCAGTTACCTGGACGTGTCT
GTGGTGCAGACTCTGGGTGCTCCTGGAGAACCGCGACATGACTCCCTGTTGC
CTGTGGACAGTTACCAGTCTTGGGCTCTCGCTGGTGGCTGGAAC

Klooni 5, geeliltä eristetty poistogeeninen tuote:

CCCAGCGTATCCGGGAACCTACCAGCCTATGGCCAGTTACCTGGACGTGTCT
GTGGTGCAGACTCTGGGTGCTCCTGGAGAACCGCGACATGACTCCCTGTTGC
CTGTGGACAGTTACCAGTCTTGGGCTCTCGCTGGTGGCTGGAAC

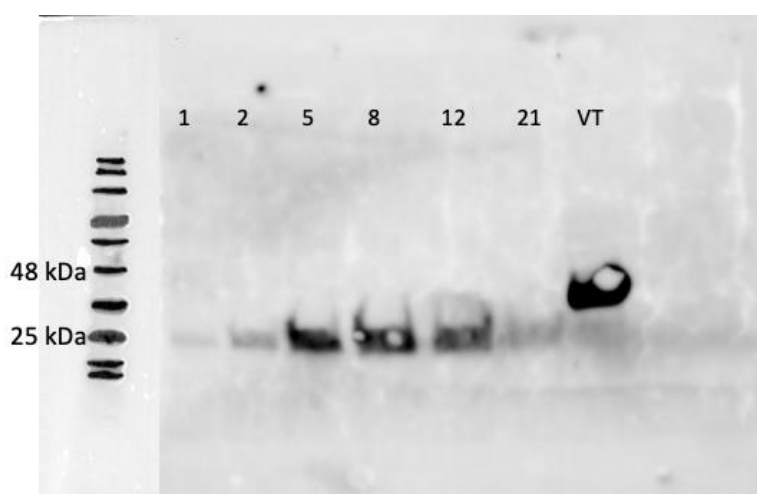
Klooni 40, koko PCR-tuotteen sekvensointi:

CCCAGCGTATCCGGGAACCTACCAGCCTATGGCCAGTTACCTGGACGTGTCT
GTGGTGCAGACTCTGGGTGCTCCTGGAGAACCGCGACATGACTCCCTGTTGC
CTGTGGACAGTTACCAGTCTTGGGCTCTCGCTGGTGGCTGGAAC

Geeliltä eristettyjen villityypin tuotteiden sekvensointitietoja ei esitetä tässä, sillä sekvensointipalvelusta saatujen kromatogrammien perusteella tulokset eivät olleet luotettavia.

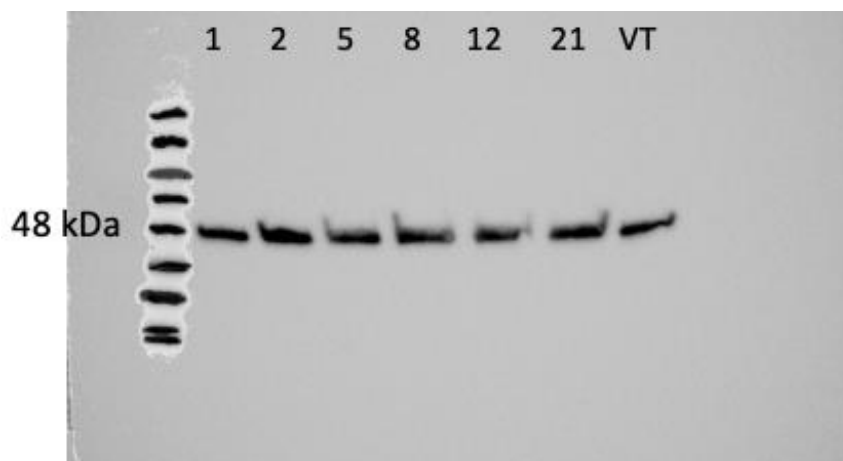
3.3 Western blot -analyysi

Kuvassa 18 on nähtävillä PC-3-kloonien 1, 2, 5, 8, 12 ja 21 sekä tutkimuksesta erillisten villityypin solujen western blot -analyysin tulos. Kaikkien kloonien proteiinit ovat villityypin proteiiniin nähden selkeästi lyhentyneet ja proteiinin määrä on huomattavasti vähäisempi, etenkin klooneissa 1, 2 ja 21.



Kuva 18. PC-3-kloonien 1, 2, 5, 8, 12 ja 21 sekä tutkimuksesta erillisten PC-3 villityypin solujen HOXB13-perusteinen western blot -analyysi. Kaikkien kloonien proteiinit ovat villityypin proteiiniin verrattuna selvästi lyhentyneet ja proteiinia on tuotettu huomattavasti vähemmän, etenkin klooneissa 1, 2 ja 21.

Kuvassa 19 on nähtävissä kloonien 1, 2, 5, 8, 12 ja 21 sekä tutkimuksesta erillisten villityypin solujen western blot -analyysin β -aktiiniperusteinen latauskontrolli. Proteiinit ovat kaikki samankokoisia ja niitä on lähestulkoon yhtä paljon.



Kuva 19. PC-3-kloonien 1, 2, 5, 8, 12 ja 21 sekä tutkimuksesta erillisten PC-3 villityypin solujen western blot -analyysin β -aktiini-perusteinen latauskontrolli. Proteiinit ovat samankokoisia ja niitä on tuotettu yhtä paljon.

3.4 Tulosten yhteenveto

Tutkimuksessa ei onnistuttu tuottamaan käyttökelpoisia solulinjoja. PC-3-soluista ei yksittäissolujaottelun jälkeen selviytynyt yhtään villityypin kloonina, joten kontrollisolujen puuttuessa soluja ei voida hyödyntää tutkimuskäyttöön. LNCaP-soluista ei yksittäissolujaottelun jälkeen selviytynyt muita kuin villityypin soluja.

Tutkimuksessa käytetyistä ohjain-RNA-sekvensseistä toinen toimi oletetulla tavalla. Toisen kohdalla leikkauskohta erosi yhden emäksen verran oletetusta, mikä sai aikaan lukukehyksen säilymisen. Western blot -analyysin tulos tukee tätä havaintoa.

4. POHDINTA

Työn tarkoituksena oli tuottaa *HOXB13*-poistogeenisiä solulinjoja tutkimuskäyttöön. Valitettavasti valmiita solulinjoja ei kuitenkaan saatu tämän opinnäytetyön puitteissa tehtyä. Lisäksi menetelmä ei toiminut täysin odotetulla tavalla. Vastoin oletuksia geenistä poistunut alue ei sekvensointitietojen perusteella tuhonnut normaalia lukukehystä ja tuloksena oli normaalia lyhyempi proteiini (kuva 18).

Tutkimuksessa käytettiin kahteen eri seulontamenetelmään perustuvaa plasmidia: puromysiiniresistenssin antavaa sekä GFP-perusteista plasmidia. Tarkoituksena oli alun perin kuitenkin käyttää ainoastaan soluille puromysiiniresistenssin antavaa plasmidia. Puromysiini estää proteiinisynteesin ja on siten soluille normaalisti toksinen. Tätä plasmidia käytettäessä solut kuitenkin kärsivät huomattavasti. Protokollaa yritettiin optimoida, mutta soluilla kesti silti suhteettoman kauan palautua transfektion jälkeen. On mahdollista, että transfektio ei toiminut erityisen tehokkaasti ja todella suuri osa soluista alkoi kuolla, ja transfektion valmiiksi väsyttäneiden solujen oli haasteellista repopuloida kasvatusalusta. Tätä havaintoa tukee se, että pienempikuoppaiselle levyllä siirtämisen jälkeen solut alkoivat palautua paremmin. Transfektion suorittaminen lähtökohtaisesti pienempikuoppaisella levyllä olisi voinut auttaa palautumisessa. Koska GFP-perusteinen menetelmä osoittautui kuitenkin toimivaksi, ei puromysiinimenetelmää lähdetty kehittämään enää eteenpäin.

PCR-reaktioissa oli jonkin verran havaittavissa epätasalaatuisuutta. PC-3 kloonin 1 PCR-tuote oli eri näköinen kahdessa eri ajossa. Lisäksi jossain kohtaa PCR-reaktioissa alkoi muodostua oletettavasti alukedimeerejä, jotka näkyvät agarosigeelillä lyhyinä pätkinä. Alukedimeerien muodostaminen voi heikentää spesifisen PCR-tuotteen monistumista. Näistä ongelmista voitaisiin päästä eroon optimoimalla PCR-reaktioita ja PCR-ohjelmaa (Lorenz 2012). Tämän opinnäytetyön puitteissa tulokset ovat kuitenkin tarpeeksi luotettavia.

Saadut solulinjat eivät olleet odotetunlaisia. Kaikki PC-3-kloonit olivat yhtä kokonaan poistogeenistä lukuun ottamatta heterotsygootteja *HOXB13*-geenin suhteen. Villityypin solujen puute aiheutti sen, että heterotsygoottisia solulinjojakaan ei voitu ottaa

tutkimuskäyttöön. Villityypikloonien puutteelle ei keksitty mitään selittävää tekijää. Teoreettisesti on mahdollista, että transfektio on toiminut PC-3-soluilla todella hyvin ja villityypin soluja on ollut populaatiossa huomattavasti vähemmän kuin heterotsygootteja. Jos haluttaisiin selvittää tätä tarkemmin, voitaisiin yksittäissolujaottelu toistaa yhä useammalle 96-kuoppalevyille ja katsoa millaisia klooneja näistä saataisiin kasvatettua. Toisaalta 48 kloonista ainoastaan yksi osoitti täysin poistogeenistä genotyyppiä. LNCaP-kloonit olivat kaikki *HOXB13*-villityyppejä. LNCaP-soluilla transfektio onnistui hieman huonommin kuin PC-3-soluilla jo silmämääräisesti fluoresenssimikroskoopilla arvioiden, ja sama on nähtävissä myös GFP-jaotellun jälkeisessä PCR:ssä (kuvat 9 ja 10). Lisäksi GFP-jaotellusta LNCaP-solupopulaatiosta suurin osa kuoli pakastusjakson jälkeen ja on mahdollista, että sen jäljiltä jäi henkiin lähinnä villityypin soluja. Tämä voitaisiin tarkistaa tekemällä PCR selviytyneille soluille. Joissakin tutkimuksissa (Kim ym. 2010; Nerlakanti ym. 2018), joissa *HOXB13*-geeni on hiljennetty, on kuitenkin osoitettu, että *HOXB13*-proteiinin puute heikentää solujen kasvua ja on mahdollista, että proteiini on liian tärkeä poistettavaksi soluista kokonaan. Ainoa tässä työssä saatu kokonaan poistogeeninen kloni (PC-3 kloni 40) lopetti kasvamisen hyvin varhaisessa vaiheessa ja siitä saatiin ainoastaan DNA-näyte, mikä tukee osaltaan tätä ajatusta. Toisaalta on myös esitetty, että *HOXB13*:n puute parantaa proliferaatiokykyä (Hamid ym. 2014; Lu ym. 2022).

Tutkimusmenetelmän kannalta oleellisin havainto on se, että toinen käytetyistä ohjain-RNA-molekyyleistä ei toiminut oletetulla tavalla. Tiedetään, että *S. pyogenes* -bakteerin Cas9, jota työssä käytettiin, katkaisee DNA:n spesifisesti 3 emäsparin päässä PAM-sekvenssistä (Ran ym. 2013). Sekvenssitulosten perusteella näyttäisi kuitenkin siltä, että katkaisu on tapahtunut 4 emäsparin päässä oletetusta PAM-sekvenssistä, jättäen DNA:han ylimääräisen guaniinin ja siten säilyttäen normaalin lukukehyksen, joskin geenistä poistui iso osa. Kysymyksiä herättää se, että käytetty PAM on muotoa GGG. Liekö mahdollista, että PAM-sekvenssinä on toiminut GGg eikä oletettu gGG. Tällöin kuitenkin yksi emäs PAM-sekvenssistä olisi myös osana kohdesekvenssissä. DNA:n korjauksessa muodostuu myös helposti insertioita. Koska ylimääräinen emäs on sama kaikissa neljässä sekvenssissä ja myös emäs, joka normaalissa DNA:ssa on kyseisessä kohtaa, on kuitenkin epätodennäköistä, että olisi kyse tästä, ja jatkoa ajatellen olisi turvallisinta vaihtaa toinen ohjain-RNA uuteen.

PCR:n perusteella näennäisesti heterotsygotit solulinjat tuottivat western blot -analyysin perusteella pelkästään lyhentynyttä proteiinia, vaikka PCR-tuloksen perusteella voitaisiin olettaa, että tuotettaisiin sekä villityypistä että lyhentynyttä proteiinia. Tässä voisi olla kyseessä dominantti negatiivinen vaikutus (dominant negative effect), jossa mutatoitunut proteiini estää normaalin proteiinin tuottamisen solussa (Veitia 2007). Lähes kaikkien tutkimuksessa saatujen solulinjojen kasvu oli heikkoa (suurimmasta osasta ei saatu proteiininäytettä ollenkaan eikä kaikista saatu edes DNA-näytettä), joten lienee mahdollista, että tuotettu lyhentynyt proteiini on jotenkin haitallinen soluille. Valitettavasti tätä ei voitu tutkia enempää, sillä kontrollisolujen puuttuessa tulokset olisivat olleet merkittömiä. Tuloksen selittäisi toisaalta myös se, että PCR:n perusteella näennäisesti villityyppinen DNA ei todellisuudessa olisikaan villityypistä. On mahdollista, että joissain kromosomeissa DNA leikkautui vain yhdestä kohtaa, ja yksittäisen katkoksen korjauksen yhteydessä syntyi lyhyt, lukukehysten rikkova insertio tai deleetio, jota ei PCR:n perusteella voitu havaita. Tätä voitaisiin tutkia tarkemmin sekvensoimalla.

Kaiken kaikkiaan tutkimuksessa ja tuloksien tulkinnassa on yhä paljon kontrolloimattomia muuttujia ja tulokset eivät olleet monelta osin odotetunlaisia. Koska varsinainen menetelmä ei toiminut täysin odotetulla tavalla, on hankala tehdä johtopäätöksiä siitä, onko kyse biologiasta vai menetelmällisestä ongelmasta. Menetelmä vaatii siis vielä optimointia ja uusintayrityksiä tarvitaan solulinjojen muodostamiseksi, mutta perusta toimivan protokollan aikaansaamiseksi on olemassa.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajaani Christoffer Löfiä tarkasta ja kärsivällisestä ohjauksesta. Ohjaajaani Christina Nokkalaa haluan kiittää kullanarvoisesta avusta gradun kirjoituksessa sekä tärkeimpänä koko opintojen aikaisesta kannustuksesta. Iso kiitos Johanna Schleutkerille graduprojektin mahdollistamisesta ja rahoituksesta sekä koko tutkimusryhmälle lämpimästä vastaanotosta ja avusta. Erityiskiitos Jukka Karhulle siitä, että jaksoit aina omien töidesi ohella ottaa aikaa ja pohtia jokaista pienintäkin pulmaa kanssani.

Lämmin kiitos kaikille läheisille, olen mitä onnekkain, että ympärilläni on suuri ja luotettava tukiverkko. En olisi tässä ilman teidän kaikkien tukea. Kiitos vielä koiralleni Hillalle siitä, että pakotit minut ulos hengähtämään aina hektisten opiskeluhetkien välillä.

LÄHTEET

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, *315*: 1709–1712.

Bhavsar, A., & Verma, S. (2014). Anatomic imaging of the prostate. *BioMed Research International*, *2014*.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, *151*: 2551–2561.

Bratt, O. (2002). Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *Journal of Urology*, *168*: 906–913.

Brechka, H., Bhanvadia, R. R., VanOpstall, C., & Vander Griend, D. J. (2017). HOXB13 mutations and binding partners in prostate development and cancer: Function, clinical significance, and future directions. *Genes and Diseases*, *4*: 75–87.

Carbone, A. (2020). Cancer classification at the crossroads. *Cancers*, *12*.

Carlson, A. S., Acevedo, R. I., Lim, D. M., Gulati, R., Gawne, A., Sokolova, A. O., Cheng, H. H., Nelson, P. S., Montgomery, R. B., Yu, E. Y., & Schweizer, M. T. (2020). Impact of mutations in homologous recombination repair genes on treatment outcomes for metastatic castration resistant prostate cancer. *PLoS ONE*, *15*.

Chan, S.-K., Jaffe, L., Capovilla, M., Botas, J., & Mann, R. S. (1994). The DNA binding specificity of Ultrabithorax is modulated by cooperative interactions with extradenticle, another homeoprotein. *Cell*, *78*: 603–615.

Chen, Z., Wu, D., Thomas-Ahner, J. M., Lu, C., Zhao, P., Zhang, Q., Geraghty, C., Yan, P. S., Hankey, W., Sunkel, B., Cheng, X., Antonarakis, E. S., Wang, Q. E., Liu, Z., Huang, T. H. M., Jin, V. X., Clinton, S. K., Luo, J., Huang, J., & Wang, Q. (2018). Diverse AR-V7 cistromes in castration-resistant prostate cancer are governed by HoxB13. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*: 6810–6815.

Chornokur, G., Dalton, K., Borysova, M. E., & Kumar, N. B. (2011). Disparities at presentation, diagnosis, treatment, and survival in African American men, affected by prostate cancer. *Prostate*, *71*: 985–997.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, *339*: 819–823.

Cunha, G. R., Vezina, C. M., Isaacson, D., Ricke, W. A., Timms, B. G., Cao, M., Franco, O., & Baskin, L. S. (2018). Development of the human prostate. *Differentiation*, *103*: 24–45.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*: 602–607.

Economides, K. D., & Capecchi, M. R. (2003). Hoxb13 is required for normal differentiation and secretory function of the ventral prostate. *Development*, *130*: 2061–2069.

Ewing, C. M., Ray, A. M., Lange, E. M., Zuhlke, K. A., Robbins, C. M., Tembe, W. D., Wiley, K. E., Isaacs, S. D., Johng, D., Wang, Y., Bizon, C., Yan, G., Gielzak, M., Partin, A. W., Shanmugam, V., Izatt, T., Sinari, S., Craig, D. W., Zheng, S. L., ... Cooney, K. A. (2012). Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *New England Journal of Medicine*, *366*: 141–149.

Feng, Y., Zhang, T., Wang, Y., Xie, M., Ji, X., Luo, X., Huang, W., & Xia, L. (2021). Homeobox genes in cancers: from carcinogenesis to recent therapeutic intervention. *Frontiers in Oncology*, *11*

Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernytsky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., ... Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia. *New England Journal of Medicine*, *384*: 252–260.

Freedland, S. J., & Aronson, W. J. (2004). Examining the relationship between obesity and prostate cancer. *Reviews in Urology*, *6*: 73–81.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*.

Giuliano, C. J., Lin, A., Girish, V., & Sheltzer, J. M. (2019). Generating single cell-derived knockout clones in mammalian cells with CRISPR/Cas9. *Current Protocols in Molecular Biology*, *128*.

Hamid, S. M., Cicek, S., Karamil, S., Ozturk, M. B., Debelec-Butuner, B., Erbaykent-Tepedelen, B., Varisli, L., Gonen-Korkmaz, C., Yorukoglu, K., & Korkmaz, K. S. (2014). HOXB13 contributes to G1/S and G2/M checkpoint controls in prostate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *383*: 38–47.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*: 57–70.

Holland, P. W. H., Booth, H. A. F., & Bruford, E. A. (2007). Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology*, *5*.

Huang, L., Pu, Y., Hepps, D., Danielpour, D., & Prins, G. S. (2007). Posterior Hox gene expression and differential androgen regulation in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology*, *148*: 1235–1245.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169: 5429–5433.

Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, 200.

Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43: 1565–1575.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816–821.

Johng, D., Torga, G., Ewing, C. M., Jin, K., Norris, J. D., McDonnell, D. P., & Isaacs, W. B. (2019). HOXB13 interaction with MEIS1 modifies proliferation and gene expression in prostate cancer. *Prostate*, 79: 414–424.

Jung, C., Kim, R.-S., Zhang, H.-J., Lee, S.-J., & Jeng, M.-H. (2004). HOXB13 induces growth suppression of prostate cancer cells as a repressor of hormone-activated androgen receptor signaling. *Cancer Research*, 64: 9185–9192.

Kim, Y.-R., Oh, K.-J., Park, R.-Y., Xuan, N. T., Kang, T.-W., Kwon, D.-D., Choi, C., Kim, M. S., Nam, K. Il, Ahn, K. Y., & Jung, C. (2010). HOXB13 promotes androgen independent growth of LNCaP prostate cancer cells by the activation of E2F signaling. *Molecular Cancer*, 9.

Klein, E., Kupelian, P., & Witte, J. (1998). Does a family history of prostate cancer result in more aggressive disease? *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 1: 297–300.

Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68: 820–823.

Käypä hoito -suositus (2014): Eturauhassyöpä. Kaypahoito.fi <<https://www.kaypahoito.fi/hoi11060>> (Luettu 20.5.2022)

Laitinen, V. H., Wahlfors, T., Saaristo, L., Rantapero, T., Pelttari, L. M., Kilpivaara, O., Laasanen, S. L., Kallioniemi, A., Nevanlinna, H., Aaltonen, L., Vessella, R. L., Auvinen, A., Visakorpi, T., Tammela, T. L. J., & Schleutker, J. (2013). HOXB13 G84E mutation in Finland: population-based analysis of prostate, breast, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 22: 452–460.

Lee, M. (1953). The blood supply to the prostate and its relationship to prostatectomy. *British Journal of Urology*, 25: 64–68.

Lewis, E. B. (1992). Clusters of master control genes regulate the development of higher organisms. *The Journal of the American Medical Association*, 267: 1524–1531.

Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. In *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5

Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63.

Lu, X., Fong, K., Gritsina, G., Wang, F., Baca, S. C., Brea, L. T., Berchuck, J. E., Spisak, S., Ross, J., Morrissey, C., Corey, E., Chandel, N. S., Catalona, W. J., Yang, X., Freedman, M. L., Zhao, J. C., & Yu, J. (2022). HOXB13 suppresses de novo lipogenesis through HDAC3-mediated epigenetic reprogramming in prostate cancer. *Nature Genetics*, 54: 670–683.

Luo, Z., Rhie, S. K., & Farnham, P. J. (2019). The enigmatic HOX genes: Can we crack their code? *Cancers*, 11.

Makarova, K. S., Grishin, N. V, Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1.

Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., Van Der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 467–477.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., Van Der Oost, J., ... Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13: 722–736.

Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., ... Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. In *Nature Reviews Microbiology*, 18: 67–83.

Markman, M. (Päivitetty 2022). Prostate cancer symptoms. Cancer Treatment Centers of America. <<https://www.cancercenter.com/cancer-types/prostate-cancer/symptoms>> (Luettu 20.5.2022)

Markman M. (Päivitetty 2022). Prostate cancer types. Cancer Treatment Centers of America. <<https://www.cancercenter.com/cancer-types/prostate-cancer/types>> (Luettu 20.5.2022)

Mayo Clinic: Prostate cancer. Mayoclinic.org <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/prostate-cancer/diagnosis-treatment/drc-20353093>> (Luettu 20.5.2022)

McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., & Gehring, W. J. (1984). A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature*, 308: 428–433.

- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2: 35–49.
- Mojica, F. J. M., Juez, G., & Rodriguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, 9: 613–621.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155: 733–740.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60: 174–182.
- Nerlakanti, N., Yao, J., Nguyen, D. T., Patel, A. K., Eroshkin, A. M., Lawrence, H. R., Ayaz, M., Kuenzi, B. M., Agarwal, N., Chen, Y., Gunawan, S., Karim, R. M., Berndt, N., Puskas, J., Magliocco, A. M., Coppola, D., Dhillon, J., Zhang, J., Shymalagovindarajan, S., ... Mahajan, K. (2018). Targeting the BRD4-HOXB13 coregulated transcriptional networks with bromodomain-kinase inhibitors to suppress metastatic castration-resistant prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17: 2796–2810.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156: 935–949.
- Norris, J. D., Chang, C. Y., Wittmann, B. M., Kunder, R. S., Cui, H., Fan, D., Joseph, J. D., & McDonnell, D. P. (2009). The homeodomain protein HOXB13 regulates the cellular response to androgens. *Molecular Cell*, 36: 405–416.
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 151: 653–663.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8: 2281–2308.
- Rannikko A., Kataja V. Kaikki syövästä: Eturauhassyöpä. <<https://www.kaikkisyovasta.fi/tietoa-syovasta/syopataudit/eturauhassyopa/>> (Luettu 20.5.2022)
- Rezsohazy, R., Saurin, A. J., Maurel-Zaffran, C., & Graba, Y. (2015). Cellular and molecular insights into Hox protein action. *Development (Cambridge)*, 142: 1212–1227.
- Saleh-Gohari, N., & Helleday, T. (2004). Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Research*, 32: 3683–3688.
- Sreenath, T., Orosz, A., Fujita, K., & Bieberich, C. J. (1999). Androgen-independent expression of hoxb-13 in the mouse prostate. *The Prostate*, 41: 203–207.

Staals, R. H. J., Jackson, S. A., Biswas, A., Brouns, S. J. J., Brown, C. M., & Fineran, P. C. (2016). Interference-driven spacer acquisition is dominant over naive and primed adaptation in a native CRISPR–Cas system. *Nature Communications*, 7.

Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., & Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260: 170–173.

Suomen Syöpärekisteri: Syöpätilastosovellus (2019). Syoparekisteri.fi <<https://syoparekisteri.fi/tilastot/tautitilastot/>> (Luettu 17.11.2021)

Torkki, P., Leskelä, R. L., Linna, M., Mäklin, S., Mecklin, J. P., Bono, P., Kataja, V., & Karjalainen, S. (2018). Cancer costs and outcomes in the Finnish population 2004–2014. *Acta Oncologica*, 57: 297–303.

Uddin, F., Rudin, C. M., & Sen, T. (2020). CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future. *Frontiers in Oncology*, 10.

Veitia, R. A. (2007). Exploring the molecular etiology of dominant-negative mutations. *Plant Cell*, 19: 3843–3851

Visconti, P. E. (2012). Sperm Bioenergetics in a Nutshell. *Biology of Reproduction*, 87.

White, C. W., Xie, J. H., & Ventura, S. (2013). Age-related changes in the innervation of the prostate gland. *Organogenesis*, 9: 206–215.

Yao, J., Chen, Y., Nguyen, D. T., Thompson, Z. J., Eroshkin, A. M., Nerlakanti, N., Patel, A. K., Agarwal, N., Teer, J. K., Dhillon, J., Coppola, D., Zhang, J., Perera, R., Kim, Y., & Mahajan, K. (2019). The homeobox gene, HOXB13, regulates a mitotic protein-kinase interaction network in metastatic prostate cancers. *Scientific Reports*, 9.

Zeltser, L., Desplan, C., & Heintz, N. (1996). Hoxb-13: a new Hox gene in a distant region of the HOXB cluster maintains colinearity. *Development*, 122: 2475–2484.

Zhang, W., van Gent, D. C., Incrocci, L., van Weerden, W. M., & Nonnekens, J. (2020). Role of the DNA damage response in prostate cancer formation, progression and treatment. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 23: 24–37.

Zhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H., Hong, Z., Xie, M., Chen, S., & Yao, B. (2015). The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PLOS ONE*, 10.