



Supertehostajien säätelemät pitkät ei-koodaavat RNA:t ihon okasolusyövässä

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Solubiologia

Toukokuu 2023

Josefiina Haalisto

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

TURUN YLIOPISTO

Kliininen laitos

JOSEFIINA HAALISTO: Supertehostajien säätelemät pitkät ei-koodaavat RNA:t ihon okasolusyövässä

Pro gradu -tutkielma, 82 s.

Iho- ja sukupuolitautioppi

Toukokuu 2023

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

Ihon levyepiteelikarsinooma eli okasolusyöpä on keratinosyyttiperäinen syöpä, joka usein johtuu pitkittyneelle auringon UV-säteilylle altistumisesta. Pieni osa ihon okasolusyövästä metastasoi, eli muodostaa etäpesäkkeitä. Tällöin ennuste on hyvin huono, koska spesifistä hoitoa ei toistaiseksi ole saatavilla. Tutkimuksen tavoitteena olikin löytää uusia potentiaalisia terapeuttisia kohteita tälle yleistyvälle ihosyöväälle pyrkien vaikuttamaan sen kasvuun ja leviämiseen.

Eri ihon okasolusyöpäsoluminjojen osalta on aiemmissa tutkimuksissa osoitettu, että pitkällä ei-koodaavilla RNA-molekyyleillä (lncRNA) on rooli kyseisen syövän muodostumisessa, ja että ne vaikuttavat ihon okasolusyöpäsolumien kasvuun ja leviämiseen. Tässä tutkimuksessa näytettiin, että supertehostajat (engl. *super enhancers*, SEs) puolestaan säätelevät pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien ilmentymistä ihon okasolusyöpäsoluissa, mikä osoitettiin käyttämällä tutkimuksissa supertehostaja-inhibiittoreita THZ1:tä ja JQ1:tä, jolloin huomattiin estävä vaikutus kohdeproteiineissa CDK7 ja BRD4 ja sitä kautta koko supertehostajakompleksin toiminnassa.

Tutkimusten kohteena olivat ihon okasolusyövässä yli-ilmennetyt pitkät ei-koodaavat RNA:t LINC7, PICSAR, PRECSIT ja SERLOC. Selvisi, että THZ1 ja JQ1 inhiboivat merkittävästi pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien ilmentymistä ihon okasolusyöpäsoluissa. Tulokset saatiin RT-qPCR-tutkimusmenetelmällä, jolla selvitettiin pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien ilmentämistä halutuissa ihon okasolusyöpäsoluminjoissa, ja tutkittiin, miten inhibiittorit THZ1 ja JQ1 vaikuttivat ilmentämisen tasoon solulinjakohtaisesti. Solujen kasvua mittaavissa kokeissa ja viabiliteettikokeissa puolestaan havaittiin, että erityisesti THZ1 inhiboi merkittävästi ihon okasolusyöpäsolumien kasvua ja elinkykyisyyttä, ja inhibition voimakkuus kasvoi suhteessa inhibiittorin pitoisuuden suuruuteen. Myös JQ1:n havaittiin vaikuttavan heikentävästi ihon okasolusyöpäsolumien kasvuun myöhemmissä aikapisteissä, ja vaikutus oli merkittävä erityisesti metastoittavien eli etäpesäkkeitä muodostavien solulinjojen osalta. Tutkimusten valossa supertehostajat voisivat olla hyviä mahdollisia terapeuttisia kohteita ihon okasolusyövän hoidossa.

Asiasanat: Ihosyöpä, Okasolusyöpä, UV-säteily, Pitkä ei-koodaava RNA, Supertehostaja, Inhibiittori

Haluan kiittää professori Veli-Matti Kähäriä tutkimukseni mahdollistamisesta osana hänen tutkimusryhmäänsä, koko tutkimusryhmää kaikesta avusta, sekä ohjaajaani dosentti Liisa Nissistä suuresta avusta, tuesta ja ohjauksesta.

Sisältö

Lyhenteet.....	4
1 Kirjallisuuskatsaus	7
1.1 Ihon okasolusyöpä	7
1.1.1 Epidemiologia ja riskitekijät	7
1.1.2 Patogeneesi.....	7
1.1.3 Kliininen kuva ja diagnostiikka	11
1.1.4 Hoito.....	11
1.2 Supertehostajat	13
1.2.1 Supertehostajat ja välittäjäkompleksit.....	13
1.2.2 Supertehostajaestäjät	18
1.3 Pitkät ei-koodaavat RNA:t	25
1.3.1 Yhteys supertehostajien kanssa.....	27
1.3.2 Pitkät ei-koodaavat RNA:t ihon okasolusyövässä	28
2 Työn tavoitteet	31
3 Materiaalit ja menetelmät	32
3.1 Ihon okasolusyöpäsolulinjat ja soluviljely	33
3.1.1 Töissä käytettävät inhibiittorit.....	33
3.2 Western blot	34
3.2.1 Solujen jakaminen kuoppalevyille	34
3.2.2 Inhibiittorilaimennosten lisäys kuoppalevyille	34
3.2.3 Solujen harvestointi ja lysaattinäytteiden tekeminen.....	34
3.2.4 Western blot-geeliajo ja -siirto.....	35
3.3 BRD4-siRNA-transfektio	37
3.4 Solujen kasvua mittaava koe	38
3.5 Viabiliteettikoe	39
3.6 RT-qPCR-koe.....	40

3.6.1	Solujen jakaminen kuoppalevyille	40
3.6.2	Inhibiittorilaimennosten lisäys kuoppalevyille	41
3.6.3	Solujen harvestointi ja RNA:n eristys.....	41
3.6.4	DNaasi-käsittely	42
3.6.5	cDNA-synteesi	42
3.6.6	RT-qPCR/Taqman	42
3.7	Tilastolliset menetelmät	44
4	Tulokset	45
4.1	BRD4-siRNA-transfektiolla varmistettiin spesifi BRD4-bandi.....	45
4.2	Ihon okasolusyöpäsoluista todistettiin löytyvän SE-inhibiittorien kohdeproteiinit BRD4 ja CDK7, ja SE-inhibiittorien havaittiin vähentävän RNAP II:n seriinien fosforylaatiota	46
4.3	THZ1 vähensi kaikkien tutkittujen ihon okasolusyöpäsolujen kasvua annosvasteisesti, ja JQ1:n kasvua hillitsevä vaikutus näkyi myöhemmissä aikapisteissä.....	48
4.4	THZ1 ja JQ1 heikensivät ihon okasolusyöpäsolujen elinkykyisyyttä.....	51
4.5	Supertehostajaestäjät vähensivät pitkien ei-koodaavien RNA:iden ilmentämistä ihon okasolusyöpäsoluissa	54
5	Tulosten tarkastelu.....	60
5.1	Tulosten perusteella spesifi BRD4-bandi on noin 100 kDa ihon okasolusyöpäsolulinjoissa	60
5.2	Ihon okasolusyöpäsoluista osoitettiin löytyvän SE-inhibiittorien kohdeproteiinit BRD4 ja CDK7, ja supertehostajainhibiittorien havaittiin vähentävän RNAP II:n seriinien fosforylaatiota	61
5.3	THZ1 vähensi kaikkien tutkittujen ihon okasolusyöpäsolujen kasvua annosvasteisesti, ja JQ1:n kasvua hillitsevä vaikutus näkyi myöhemmissä aikapisteissä.....	62
5.4	THZ1 ja JQ1 vähensivät ihon okasolusyöpäsolujen elinkykyisyyttä.....	64

5.5	Pitkien ei-koodaavien RNA:iden ilmentäminen väheni SE-inhibiittorien vaikutuksesta kaikissa ihon okasolusyöpäsolinjoissa	65
5.6	Yhteenveto tuloksista	67
6	Päätelmät ja tulevaisuuden näkymät.....	68
7	Kirjallisuus.....	69

Lyhenteet

AK	Aurinkokeratoosi
BET	Proteiiniperhe, (<i>bromodomain and extraterminal domain</i>) joka pitää sisällään BRD2–4-proteiinit
BHQ	Leima-aine, joka vaientaa fluoresenssia
BRD4	Bromodomeenin sisältävä proteiini 4
BT	Bowenin tauti
CAK	CDK:ta aktivoiva kinaasi
CDK	Sykliiniriippuvaisten kinaasien ryhmä
CDK7	Sykliiniriippuvainen kinaasi 7
CDKN2A	Sykliiniriippuvaisen kinaasin estäjä 2A
cSCC	Ihon okasolusyöpä
CTD	RNA-polymeraasin C-terminaalinen pää
DMEM	Solujen kasvatusliuos, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DRB	5,6-dikloori-1-p-D-ribofuranosyylibentsimidatsoli
DSIF	DRB-herkkyyttä edistävä tekijä
DUSP6	Kaksoisspesifinen fosfataasi 6
ECM	Soluväliaine
EGFR	Epidermaalisen kasvutekijän reseptori
ERK	Solunulkoisen signaalin säätelemä kinaasi
ESCC	Ruokatorven okasolusyöpä

FAM	Fluorofori, leima-aine
FBS	Naudan sikiön seerumi
GDP	Guanosiinidifosfaatti
GTF	Yleinen transkriptiotekijä
GTP	Guanosiinitrifosfaatti
HNSCC	Pään ja kaulan okasolusyöpä
JQ1	BRD4-inhibiittori
LINC	Pitkä intergeeninen ei-koodaava
LINC7	Pitkä ei-koodaava RNA 7
lncRNA	Pitkä ei-koodaava RNA
MAPK	Mitogeeniaktivoitu proteiinikinaasi
miRNA	Mikro-RNA
MMP	Matriksimetalloproteinaasi
MPF	Solun kypsymistä edistävä tekijä
mRNA	Lähetti-RNA
NELF	Transkription pidennysvaihetta estävä tekijä
PBS	Fosfaattipuskuroitu saliini eli suolaliuos
PD-1	Ohjelmoidun solukuoleman proteiini-1
PD-L1/-L2	Ohjelmoidun solukuoleman ligandi 1/-2
PIC	Ennen transkriptiota muodostuva kompleksi
PICSAR	LINC00162 (<i>P38 Inhibited Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Associated LincRNA</i>)
PRECSIT	LINC00346 (<i>P53 Regulated Carcinoma Associated Stat3 Activating Long Intergenic Non-Protein Coding Transcript</i>)

P-TEFb	Transkription pidennysvaihetta edistävä tekijä b
RNAP II	RNA-polymeraasi II
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
SE	Supertehostaja (<i>Super enhancer</i>)
SEi	Supertehostajainhibiittori
SERLOC	LINC00094 (<i>Super enhancer and ERK1/2-Regulated Long Intergenic non-protein-coding transcript Overexpressed in Carcinomas</i>)
siRNA	Pieni häiritsevä RNA (<i>small interfering RNA</i>)
STAT3	Signaalitunnistin ja transkriptioaktivaattori
TBS	Tris-puskuroitu saliini eli suolaliuos
TBST	Tris-puskuroitu saliini, johon lisätty Tween-20:iä
TFIIH	Transkriptiotekijä II H
THZ1	CDK7-inhibiittori
UV	Ultraviolettisäteily
VEGF	Verisuonten endoteelikasvutekijä

1 Kirjallisuuskatsaus

1.1 Ihon okasolusyöpä

Ihon okasolusyöpä (engl. *cutaneous squamous cell carcinoma*, cSCC) on keratinosyytti- eli sarveissoluperäinen syöpä, joka usein johtuu pitkittyneelle UV-säteilylle altistumisesta ja siitä seuraavista DNA-vaurioista. Orvaskeden keratinosyytit muuntuvat UV-säteilyn vaikutuksesta asteittain syöpäsoluiksi, ja ne voivat muuttua invasiivisiksi eli tunkeutua tyvikalvon läpi kudoksiin. Noin 3–5 % ihon okasolusyövistä metastasoivat eli lähettävät etäpesäkkeitä kudoksista verenkierron kautta muualle elimistöön, kuten paikallisiin imusolmukkeisiin. (Knuutila ja muut 2020; Nagarajan ja muut 2019). Metastasointiaste vaihtelee sen mukaan, missä ihon SCC esiintyy – poikkeuksellisen herkästi metastasoivat kasvaimet esiintyvät yleensä korvanlehtien, otsan tai huulten alueella, jossa 10 % niistä lähettää etäpesäkkeitä (Knuutila ja muut 2020; Rowe ja muut 1992). Metastaattinen ihon okasolusyöpä on hyvin vaikea hoitaa, ja yli 70 %:lla tapauksista se johtaa potilaan kuolemaan kolmen vuoden sisällä (Knuutila ja muut 2020; Nagarajan ja muut 2019).

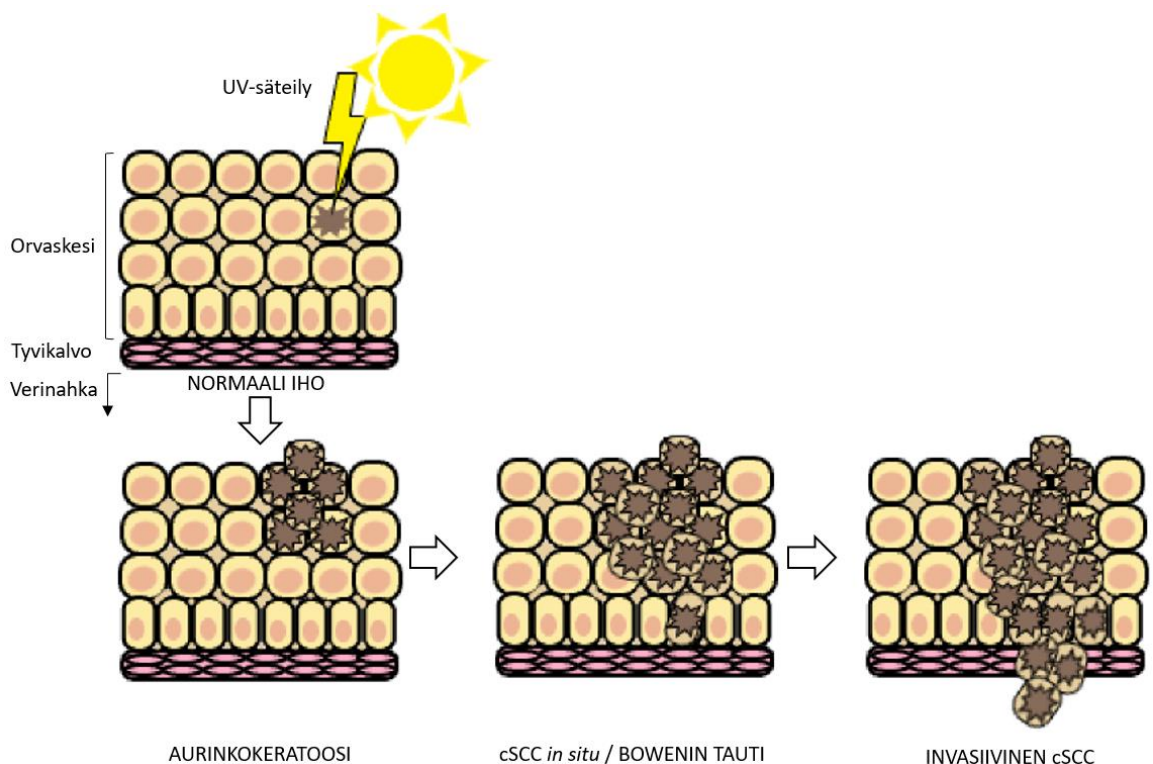
1.1.1 Epidemiologia ja riskitekijät

Ihon okasolusyövän yleisyys on kaksinkertaistunut Suomessa 10 vuoden aikana (Suomen Syöpärekisteri 2023), ja se on maailmanlaajuisesti yleisin metastasoiva ihosyöpä (Z.C. Venables ja muut 2019; Zoë C. Venables ja muut 2019). UV-säteilyaltistuksen aiheuttamien DNA-vaurioiden lisäksi muita potentiaalisia riskitekijöitä ovat korkea ikä, vaalea ihonväri, krooniset haavaumat, papilloomaviruksen aiheuttama tulehdustila, miessukupuoli ja immunosuppressio, eli elimistön heikentynyt immuunivaste esimerkiksi lääkityksen vuoksi (Corchado-Cobos ja muut 2020; Ratushny ja muut 2012). Elinsiirtopotilailla sairastumisriski on erityisen suuri, jolloin taudinkuva on aggressiivisempi, sekä metastaasien muodostuminen on todennäköisempää (Lanz ja muut 2019).

1.1.2 Patogeneesi

Ihon keratinosyyttien mutaatiot eivät heti johda ihon okasolusyövän muodostumiseen, vaan kehittyminen tapahtuu vaiheittain, ja se on riippuvaista useista eri tekijöistä (Biao ja muut 2022). Muutosten aiheuttama ihon epidermiksen keratinosyyttien atypia ja sen laajuus erottavat ihon okasolusyövän ja sen esiasteet toisistaan (Kuva 1). Hoitamattomat esiasteet puolestaan lisäävät riskiä invasiivisen ihon okasolusyövän muodostumiseen. (Hedberg ja muut 2022). Ihon okasolusyövän esiasteena pidetty aurinkokeratoosi (engl.

actinic keratosis, AK) saa alkunsa, kun UVB-säteily aiheuttaa *TP53*-kasvunrajoitegeenin inaktivaation, ja solusykliäätely häiriintyy *TP53*-geenin pohjalta valmistetun p53-proteiinin puutteen vuoksi. P53 toimii soluissa transkriptiotekijänä ja se on tärkeä nukleotidien poistokorjausreitin säätelijä. Nukleotidien poistokorjaus (engl. *nucleotide excision repair*, NER) on tärkeä nisäkkäillä esiintyvä suurten DNA-leesioiden poistoon tarvittava DNA:n korjausmekanismi. (Sengupta ja Harris 2005). P53 huolehtii myös solujen jakautumistiheydestä, ja sen normaali toiminta ehkäisee solujen hallitsematonta kasvua. Mutaatiot onkogeneissa altistavat lisäksi solujen uudiskasvulle, mikä voi johtaa kasvaimen ja metastaattisen SCC:n muodostumiseen. Ihon okasolusyövän muodostumisen kannalta oleellisia mutaatioita on tunnistettu *EGFR*-, *NOTCH1*- ja *NOTCH2* -geneissa, joiden toiminta on kytköksissä sekä solujen jakaantumiseen että erilaistumiseen, eli siihen, mikä on kunkin solun lopullinen solutyyppe. Mutaatiot solujen jakaantumiseen liittyvissä geneissa eivät kuitenkaan suoraan johda syövän esiasteiden muodostukseen, koska jotta terve epiteeli kehittyä invasiiviseksi syöpäkudokseksi, tarvitaan neljästä kuuteen geneettistä mutaatiota. Normaaleissa, auringonvalolle altistuneissa ihon keratinosyyteissä voidaan jo havaita näitä samoja mutaatioita (Y. Y. Li ja muut 2015; Martincorena ja muut 2015; Pickering ja muut 2014).



Kuva 1. Normaalin ihon asteittainen kehittyminen invasiiviseksi ihon okasolusyöväksi (engl. *cutaneous squamous cell carcinoma*, cSCC). Auringon UV-säteily saa aikaan onkogeneenisia eli kasvaimia aiheuttavia mutaatioita ihon pintakerroksen soluissa, keratinosyyteissä. Ihon

okasolusyövän esiaste, aurinkokeratoosi, on premaligni muutos, ja vielä siitä pidemmälle edennyttä ihomuutosta kutsutaan Bowenin taudiksi (cSCC in situ). Kun ihomuutoksen keratinosyytit invasoivat tyvikalvon läpi ihon syvempiin kerroksiin, muutos on pahalaatuinen ja vaikeammin hoidettavissa. Invasiivinen cSCC voi metastasoida eli lähettää etäpesäkkeitä verenkierron ja imusuoniston kautta muualle elimistöön, kuten paikallisiin imusolmukkeisiin.

Notch-perheeseen kuuluvat geenit koodaavat neljää transmembraanista Notch reseptoria (Notch1–4), jotka toimivat solukalvolla läpäisten sen lipidikaksoiskerroksen, ja osallistuen solusignaalointiin solunulkoisella ja -sisäisellä domeenilla. Notch-signalointireittiin kohdistuvia mutaatioita havaitaan 60–80 %:ssa cSCC-tapauksista (South ja muut 2014). Sillä on merkittävä rooli invasiivisen cSCC:n kehittymiselle, sillä Notch -signalointireitin toiminta solujen välisessä viestinnässä kattaa pitkälti kudosten homeostasian kehittymisen ja ylläpidon, taaten ihon normaalin toiminnan. Notch-signalointireitti osallistuu epidermaalisen erilaistumisen säätelyyn keratinosyyteissä, vaikuttaen niiden lopulliseen erilaistumiseen. (Watt ja muut 2008). *NOTCH1*- ja *NOTCH2* -geenien mutaatiot ovat merkittävä tekijä ihon SCC:n muodostumisen alkuvaiheissa, sillä mutaatiot aiheuttavat Notch-signalointireitin häiriötä. Notch1 ylläpitää ihon ulkoisten kerrosten normaalia toimintaa, sekä säätelee cSCC:n tuumorigeneesiä muokaten mikroympäristöä ja tulehdusreaktioita. P53 kontrolloi *NOTCH1*-geenin toimintaa keratinosyyteissä, joissa kyseinen geeni toimii solujen kasvun ja erilaistumisen estäjänä. Notch1 estää myös tuumorien muodostumista edistävien MRCK α - ja ROCK1/2-kinaasien toimintaa, ja edistää kasvunrajoiteproteiini p21:n ilmentymistä p53:n kautta, mikä puolestaan johtaa solujen kasvun estymiseen. (Lefort ja muut 2007). Notch-signaloinnin puute johtaa ihon ulkoisten kerrosten normaalin toiminnan heikkenemiseen ja edesauttaa kroonisen haavauman muodostumista (Demehri ja muut 2009). Erityisesti Notch1- ja Notch2 -signaloinnin puutteen on havaittu aiheuttavan keratinosyyttien karsinogeneesiä, mikä puolestaan johtaa normaalin ihon muuttumista premaligniksi aurinkokeratoosiksi, ja siitä edelleen kohti invasiivista cSCC:tä (Martincorena ja muut 2015; Pickering ja muut 2014).

Ihon SCC:ssä havaitaan Src-perheen kinaasin, Fyn:in, sekä ErbB-perheeseen kuuluvan epidermaalisen kasvutekijäreseptorin EGFR:n poikkeavan aktiivista toimintaa. Ne alentavat c-Jun-välitteisesti p53:n proteiini- ja mRNA-tasoa vaikuttaen p53:n toimintaan. (Kolev ja muut 2008; Zhao ja muut 2009). C-Jun on transkriptiotekijä, jonka toiminta perustuu geenien transkription säätelyyn, ja sitä kautta se säätelee myös solujen

apoptoosia, onkogeneista transformaatiota ja proliferaatiota (Mechta-Grigoriou ja muut 2003). Muita aurinkokeratoosin muodostumiseen johtavia muutoksia ovat SFK:n (Src-perheen kinaasit), ATF-3:n ja Myc:in lisääntyneet aktiivisuustasot (Kim ja muut 2011; Lentini ja muut 2006; A. Toll ja muut 2009; Agustí Toll ja muut 2010). Lisäksi havaitaan inositolipolyfosfaatti-5'-fosfataasin vähenemistä, mikä voi puolestaan johtaa lisääntyneeseen PI3K/Akt-signalointiin, joka edistää proliferaatiota ja aineenvaihduntaa (Sekulic ja muut 2010).

RAS-proteiini toimii tiedonsiirtäjänä solujen välisessä viestinnässä. Sen geenialueella esiintyy mutaatioita useiden syöpien osalta, mukaan lukien cSCC:ssä. (Campos ja muut 2020). RAS-proteiinit kuuluvat GTP-sitojaproteiinien perheeseen, eli ne kytkeytyvät päälle sitoessaan guanosiinitrifosfaattia (GTP), ja pois päältä sitoessaan guanosiinidifosfaattia (GDP) (Ryan ja Corcoran 2018). Aktiivinen RAS-geenialueen mutaatio voi aikaansaada onkogeenisen aktivaation sekä Raf/MEK/ERK1/ERK2-kinaasireitillä että fosfoinositidi 3-kinaasi–proteiinikinaasi B (PI3K-AKT) -reitillä (Fruman ja muut 2017; Tervonen ja muut 2021). Tämä edistää proliferaation myötä syövän etenemistä, sillä Raf/MEK/ERK-signaalivälitysreitti kontrolloi matriksimetalloproteiinaasien (engl. *matrix metalloproteinases*, MMPs) ilmentymistä (Riihilä ja muut 2021). MMP:t ovat sinkistä riippuvaisia endopeptidaaseja, joilla on kyky hajottaa soluväliaineen (engl. *extracellular matrix*, ECM) komponentteja (Cabral-Pacheco ja muut 2020). MMP:iden rooli on merkittävä cSCC:n leviämisen kannalta, sillä niillä on kyky pilkkoa ihon tyvikalvon ja verinahan rakenteita edesauttaen syöpäsoluja invasoitumaan eli leviämään tyvikalvon lävitse. (Riihilä ja muut 2021).

CDKN2A (engl. *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) koodaa kasvunrajoitegeenejä p16 (INK4a) ja p14 (ARF), joiden toiminnan tiedetään estyvän cSCC:ssä. Sekä p16 että p14 toimivat solusyklin säätelijöinä vaikuttaen solusyklille oleellisiin p53- ja RB-reitteihin. *CDKN2A*:n promoottorialueen metylaatiolla on suurin rooli kasvunrajoitegeenien p16 ja p14 toiminnan estymisessä, joka puolestaan mahdollistaa solujen hallitsemattoman kasvun solusyklin häiriintyessä. (Brown ja muut 2004).

Oikeanlaisella mikroympäristöllä on mutaatioiden ohella oleellinen vaikutus sille, että aurinkokeratoosi kehittyy invasiiviseksi ja edelleen metastaattiseksi ihon okasolusyöväksi. Mikroympäristön pitää muuttua syövän kehitystä tukevaksi, ja tämä on havaittavissa tyvikalvon ja ihon ekstrasellulaarisen matriisin koostumuksen muutoksina. Mikrobirakenteiden läsnäolo houkuttelee paikalle tulehdussoluja, mikä puolestaan lisää proteaasien erittymistä, sekä sytokiinien, kasvutekijöiden ja kemokiinien saatavuutta.

Tämä osaltaan edistää cSCC:n kasvua ja kykyä invasoida. (Nissinen ja muut 2016). Lisäksi muutokset erityisesti kollageenityyppien osalta edistävät selkeästi cSCC:n etenemistä ja ovat siihen osallisina. Normaalissa ihossa tyvikalvolla ilmennetään kollageenityyppejä XV ja XVIII, mutta cSCC:n tuumorigeneesin alkuvaiheissa nämä hajotetaan orvaskedeltä ja tyvikalvolta, ja siten transformoituneet solut pääsevät etenemään. CSCC:n tuumorigeneesin edetessä pidemmälle stroomassa makrofagit ja fibroblastit alkavat ekspressoida kollageenityyppejä XV, ja kasvainsolut puolestaan alkavat ilmentää kollageenityyppejä XVIII tunkeutuessaan tyvikalvon läpi kohti stroomaa. (Karppinen ja muut 2016). Kollageenityyppi XV toimii normaalisti kasvua rajoittavana tukirakenteena tyvikalvolla, ja kollageenityyppi XVIII puolestaan huolehtii tyvikalvon pinnan eheydestä (Bretaud ja muut 2020; Heljasvaara ja muut 2017).

1.1.3 Kliininen kuva ja diagnostiikka

Ihon okasolusyöpää esiintyy eniten pään ja niskan seudulla, erityisesti kasvojen ja korvien alueella. Myös kyynärvarsissa ja kädenselissä tavataan ihon SCC:tä, koska ne altistuvat yleisesti paljon UV-säteilylle. (Reinehr ja Bakos 2019). Ihomuutokset etenevät nopeasti parin kuukauden kuluessa alkaen aurinkokeratoosista (AK), yhdestä tai useammasta punoittavasta laikusta, joka vähitellen muuttuu tarkkarajaisemmaksi hilseileväksi ja mahdollisesti rusehtavaksi ihomuutokseksi. Aristava ja ympäristöltään punoittava AK kielii vaikeampihoitoisesta inflammatorisesta muodosta, ja toinen vaikeammin hoidettava muoto on nopeasti kasvava, läpimitaltaan yli senttimetrin kokoinen proliferatiivinen AK. Molemmissa muodoissa hoitoennuste on varhaisvaiheen aurinkokeratoosia heikompi, sillä ne uusiutuvat ja etenevät maligneiksi eli pahalaatuisiksi herkemmin. Kyhmyn muodostuminen ja haavautuva ihomuutos antaa viitteitä invasiivisesta kasvusta. Bowenin tauti (engl. *Bowen disease*, BT, *cutaneous squamous cell carcinoma in situ*, cSCCIS) puolestaan esiintyy iholla plakkimaisena, rupeutuvana ja hilseilevänä ihomuutoksena yleensä iäkkäämmän ihmisen iholla. Ihon okasolusyöpää esiintyy harvoin terveen näköisellä iholla, vaan se kehittyy aurinkokeratoosista tai Bowenin taudista. cSCC:n tunnistettavimpiin piirteisiin lukeutuu syylämäinen haavautuva kyhmy, joka voi kutista, poltella ja vuotaa verta. (Ratushny ja muut 2012).

1.1.4 Hoito

Ihon keratinosyyteissä kehittyneiden ei-invasiivisten ihomuutosten kuten aurinkokeratoosin (AK) ja Bowenin taudin (BT, cSCC *in situ*) hoitaminen on helpompaa verrattuna invasiiviseen ihon okasolusyöpään (cSCC), ja hoitomuotoja on useita eri vaihtoehtoja riippuen ihomuutoksen koosta ja sijainnista. Yleisimpiin hoitomuotoihin

lukeutuu fotodynaaminen hoito, jossa sarveistunut kudokset poistetaan, ihoalue käsitellään aminolevuliinihappoa tai metyyliaminolevulinaattia sisältävällä voiteella, jonka jälkeen alue suojataan kelmulla ja annetaan vaikuttaa. Lääkeaine sitoutuu tehokkaasti poikkeaviin soluihin ja muuttuu porfyriiniksi, joka aktivoituu valohoidon aikana tuhoten kohdesolut. Toinen ihon pintakerroksen muutoksiin käytettävä hoitomuoto on kryo- eli jäädytyshoito, jossa haluttu ihoalue käsitellään -196 °C:lla nestetyyppellä. Jäädytyshoito kiteyttää soluliman tuhoten ihon orvaskeden okasolut ja ihon muuntuneet solut, ja ihon sulamisen jälkeen tehtävä uusintakäsittely parantaa hoitotehoa. Lisäksi AK:n hoidossa käytetään imikimodia tai 5-fluorourasiilia sisältävää voidetta, tulehduskipulääkkeenä tunnettua diklofenaakkia ulkoisesti käytettävän geelin muodossa, sekä hiilidioksidilaserkäsittelyä. Bowenin taudin ihomuutokset poistetaan toisinaan kirurgisesti, ja ennaltaehkäiseväksi hoidoksi voidaan suositella tretinoiinivoiteiden käyttöä. (Ferrandiz ja muut 2012; Morton ja muut 2019; Patel ja muut 2006).

Tuumoria ei voida poistaa pelkästään kirurgisesti, jos se on invasoinut tyvikalvon lävitse 2–6 millimetriä, se on edennyt hermoa ympäröivään tilaan, tai jos se on metastasoinut eli lähettänyt etäpesäkkeitä. Tällaisissa tilanteissa leikkaus pyritään yhdistämään toiseen hoitomuotoon kuten kemoterapiaan, jossa solusalpaajalääkkeitä käytetään syöpäsolujen tuhoamiseksi, tai sädehoitoon, jossa ionisoivaa säteilyä hyödynnetään syöpäsoluja vastaan. (Brantsch ja muut 2008; Haisma ja muut 2016).

Hoitomuodot ovat hyvin rajalliset pitkälle edenneen cSCC:n osalta, ja jos kirurginen poisto tai sädehoitojen yhdistäminen kemoterapiaan ei ole mahdollista, ainoa systeeminen eli verenkierron välityksellä tehoava lääke on monoklonaalinen vasta-aine, semiplimabi. Sen vaikutus perustuu sen kykyyn sitoutua PD-1:n (ohjelmoitu solukuolemaproteiini-1, engl. *programmed cell death protein*) reseptoriin sen sijasta, että PD-L1- ja PD-L2 (ohjelmoidun solukuolemaproteiinin ligandit 1 ja 2) sitoutuisivat siihen. Ligandien ominaisuus sitoutua immuunisolujen PD-1-reseptoreihin saa T-lymfosyytit lamaantumaa, eivätkä ne kykene hyökkäämään syöpäsoluja vastaan. Semiplimabin sitoutuminen PD-1-reseptoriin saa immuunijärjestelmän T-lymfosyytit hyökkäämään syöpäsoluja vastaan, kun vuorovaikutusta reseptorin ja ligandien välillä ei synny. Epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR) estäjänä toimivaa setuksimabia voidaan myös käyttää edenneen cSCC:n hoitoon, jossa toimivin keino on yhdistää systeeminen hoito sädehoidon tai kemoterapian kanssa. Setuksimabin käytön haittana on mahdollisen lääkeresistenssin kehittyminen syöpäsoluille. (Migden ja muut 2018; Stratigos ja muut 2020).

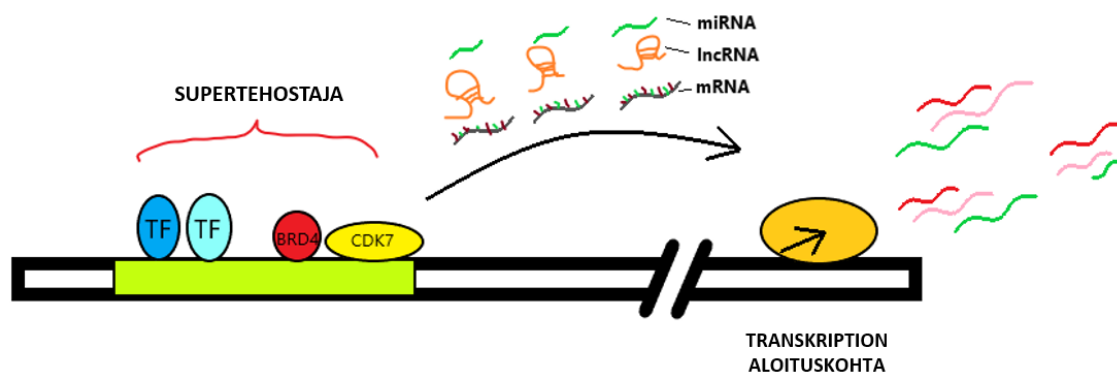
1.2 Supertehostajat

Supertehostajat (engl. *super enhancers*, SE) ovat genomialueita, joissa on useiden tehostajien (engl. *enhancers*) muodostama kompleksi (Kuva 2) (Xiao ja muut 2021; Zheng ja muut 2020). Syöpäsolujen genomialueisiin muodostuu supertehostaja-alueita tapahtumasarjojen kuten nukleotidien poiston, lisäyksen, uudelleenjärjestelyn ja translokaation yhteydessä. Supertehostajat aiheuttavat lisääntyntä onkogeenein kuten mikro-RNA:n (miRNA), lähetti-RNA:n (engl. *messenger RNA*, mRNA) ja pitkien eikoodaavien RNA-molekyylien (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA) ilmentymistä tuumorigeneesin aikana. Mutaatioiden on lisäksi huomattu esiintyvän useimmin supertehostajarikkailla alueilla, mikä tekee niistä mielenkiintoiset tutkimuskohteet. (Zheng ja muut 2020).

1.2.1 Supertehostajat ja välittäjäkompleksit

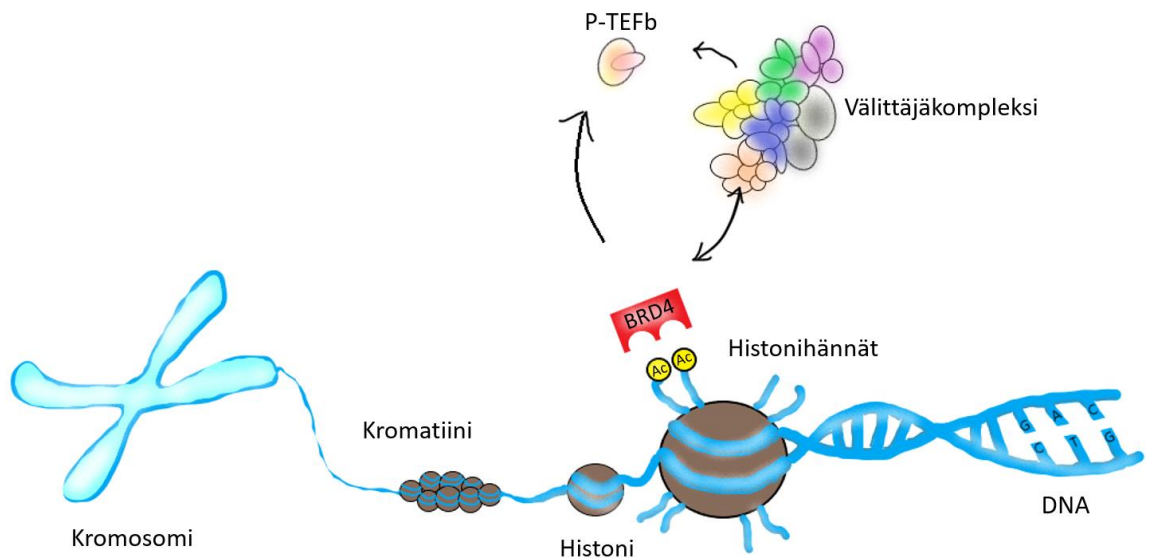
Supertehostajakompleksit koostuvat tehostajista, niihin tiukasti toisiinsa pakkautuneista transkriptiotekijöistä, välittäjäkomplekseista ja kromatiinisäätelijöistä. Lisäksi alueella esiintyy kofaktoreita ja histonien muokkaukseen liittyviä merkkiaineita. Välittäjäkompleksit kuten bromodomeenin sisältävä proteiini 4 (engl. *bromodomain containing protein 4*, BRD4) ja sykliiniriippuvainen kinaasi 7 (engl. *cyclin dependent kinase 7*, CDK7) yhdistetään erityisesti supertehostajien onkogeeneeseen transkriptioon, eli haitallisen tehokkaaseen prosessiin, jossa RNA-polymeraasi kopioi DNA:n geneettistä koodia muodostaen siitä RNA:ta. (Zheng ja muut 2020).

Tavallisista tehostajista poiketen supertehostajat mahdollistavat poikkeuksellisen aktiivisen onkogeenein transkription solujen tumassa (Kuva 2). Onkogeeneisesta käyttäytymisestä puhutaan, kun esimerkiksi geenien säätelyyn osallistuvia mikro-RNA-molekyyliä (miRNA) ilmennetään ylimäärin. Koska miRNA:illa on tärkeitä solujen jakaantumiseen, erilaistumiseen ja apoptoosin keskittyviä tehtäviä, niiden ilmentäminen on tarkasti säätelyn alaista. Yliaktiivinen ilmentäminen kuitenkin on mahdollista esimerkiksi supertehostajakompleksin avulla, mikä on puolestaan syövän kehittymiselle ja leviämiselle edullista, koska tällöin solujen jakaantumisesta ja kasvusta tulee hallitsematonta. (Wahid ja muut 2010; Zheng ja muut 2020).



Kuva 2. Supertehostajan toiminta yksinkertaistettuna. Supertehostajakompleksi (SE) koostuu useammasta tehostajasta, mikä näkyy poikkeavan tehokkaana onkogeenisenä transkriptiona. Kompleksiin kuuluvat myös välittäjäkompleksit BRD4 ja CDK7, jotka tukevat sen toimintaa. SE lisää merkittävästi mRNA:n ilmentymistä, sekä miRNA:n ja pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien tuottoa, mikä mahdollistaa yliaktiivisen geeniekspression. TF: transkriptiotekijä, miRNA: mikroRNA, lncRNA: pitkä ei-koodaava RNA, mRNA: lähetti-RNA, BRD4: Bromodomeenin sisältävä proteiini 4, CDK7: Sykliiniriippuvainen kinaasi 7.

BRD4 kuuluu BET- (engl. *Bromodomain and Extraterminal*) proteiiniperheeseen, jonka proteiineilla, kuten myös BRD4:llä, on ratkaiseva rooli geenien transkription säätelyssä, kun bromodomeenit ja asetyloituneet histonit ovat epigeneettisesti vuorovaikutuksessa keskenään solujen erilaistumisen ja lisääntymisen aikana (Taniguchi 2016). Histonien asetylaatio tehostaa osaltaan transkriptiota, sillä histonin lysiiniin liitetty asetyyliryhmä neutraloi histonin positiivisen varauksen johtaen DNA:n ja histonin välisen sitoutumisen heikkenemiseen. Tällöin tiukasti pakattu rakenne avautuu, jolloin DNA on paremmin transkriptiokoneiston saatavilla, ja transkriptio voi käynnistyä. (Ali ja muut 2018). BRD4 sitoutuu näihin asetyloituihin histonihäntiin bromodomeenien BD1 ja BD2 avulla ja muodostaa kompleksin transkription pidennysvaihetta edistävän tekijä b:n (engl. *positive transcription-elongation factor b*, P-TEFb) kanssa. P-TEFb säätelee osaltaan RNA-polymeraasi II:n fosforylaatiota, ja BRD4:n kanssa muodostettu yhteys saa P-TEFb:n stimuloimaan transkription elongaatiovaihetta (Jung ja muut 2014). BRD4:n sitoutuminen asetyloituihin histonihäntiin aikaansaa transkriptiota säätelevien proteiinien kokoontumista välittäjäkompleksiksi, joka puolestaan muodostaa sillan supertehostajan ja promoottorin välille edesauttaen RNA-polymeraasi II:n sitoutumista (Donati ja muut 2018; Taniguchi 2016). (Kuva 3).

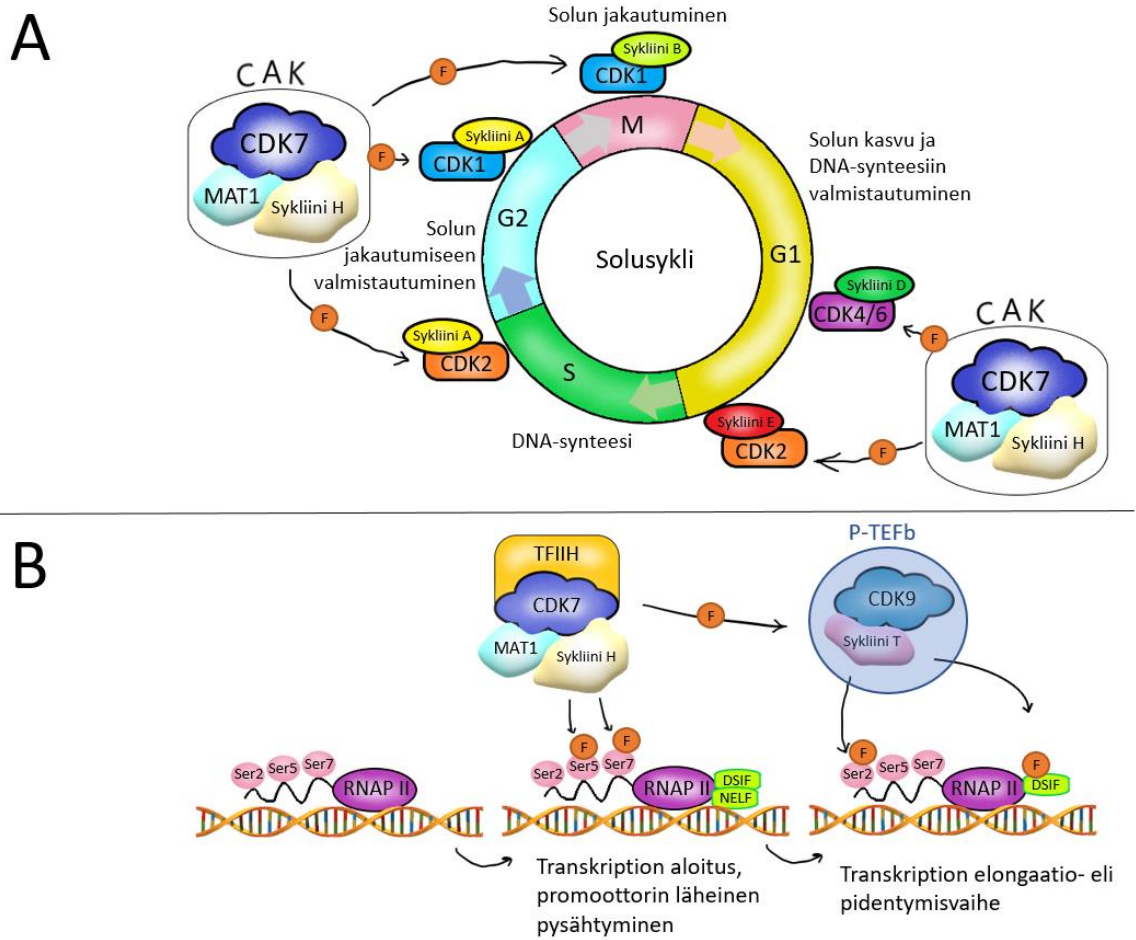


Kuva 3. BRD4:n sitoutuminen asetyloituihin (Ac) histonihäntiin vaikuttaa transkriptiota edistäviin tekijöihin. BRD4:n sitoutuminen houkuttelee transkriptiota säätelevät proteiinit kokoontumaan välittäjäkompleksiksi, ja yhdessä ne muodostavat sillan supertehostajan ja promoottorin välille stabiloimaan RNA-polymeraasi II:n sitoutumista, mikä mahdollistaa transkription. BRD4 muodostaa lisäksi kompleksin P-TEFb:n kanssa, mikä aktivoi P-TEFb:n ja saa sen stimuloimaan transkription elongaatiovaihetta. BRD4: bromodomeenin sisältävä proteiini 4, P-TEFb: transkription pidennysvaihetta edistävä tekijä b.

CDK7 puolestaan kuuluu sykliiniriippuvaisiin kinaaseihin (engl. *cyclin-dependent kinase*, CDK), jotka ovat seriini/treoniiniproteiinkinaaseja, joten niiden toiminta perustuu seriinien tai treoniinien aminohappotähteiden OH-ryhmän fosforylointiin. CDK:iden aktiivisuutta säätelevät sekä sykliinit että CDK-inhibiittorit, ja vain spesifisiin sykliiniproteiineihin sitoutumalla ne voivat muodostaa aktiivisen kompleksin, ja vasta tällöin ne voivat fosforyloida kohdemolekyylejään. (Ding ja muut 2020). CDK:iden merkitys korostuu transkriptiosäätelyssä, sillä niiden rooli muun muassa transkriptiokoneiston osasten fosforylaatioissa on tärkeä transkription edistämisen kannalta, CDK7 toimii yleisen transkriptiotekijä II H:n (engl. *transcription factor II H*, TFIIH) alayksikkönä transkriptiossa (Riedl ja Egly 2001), ja samalla CDK:t toimivat myös osana supertehostajaa (Zheng ja muut 2020). CDK7:n määrä on todistetusti koholla useissa eri syövissä normaaliin kudokseen verrattuna, mikä osoittaa sen yhteyden syövän kehittymiseen (Sava ja muut 2020). Lisäksi on havaittu yhteys huonon ennusteen suun limakalvoilla esiintyvän okasolusyövän ja CDK7:n yli-ilmentymisen välillä (L. Jiang ja muut 2019), mikä voisi viitata CDK7:n mahdolliseen kykyyn toimia merkkiaineena

syöpien ennusteen arvioinnissa, kuten on jo osoitettu ei-pienisoluisen keuhkosyövän osalta (Kuempers ja muut 2022).

CDK7 muodostaa sykliini H:n ja MAT1-proteiinin kanssa heterotrimeerisen CAK-kompleksin (engl. *CDK-activating kinase*, CAK), joka on sekä solusykliisäätelylle että transkriptiolle erittäin tärkeä (Kuva 4). Sen vuorovaikutus TFIIH:n kanssa saa aikaan RNA-polymeraasi II:n C-terminaalisen osan hyperfosforylaation, mikä puolestaan aktivoi RNA-polymeraasi II:n toiminnan transkriptiossa. TFIIH:n puuttuessa tämä trimeerinen kompleksi fosforyloi CDK:iden T-silmukan lisäten sen kompleksiaktiivisuutta, ja tämä T-silmukan fosforylointi vaaditaan, jotta solusykliin osallistuvat CDK:t 1, 2, 4 ja 6 aktivoituvat, mikä puolestaan johtaa solusyklin etenemiseen. (Fisher 2019; Peissert ja muut 2020; Sava ja muut 2020). CAK-kompleksi vastaa muun muassa solusyklin M-vaiheessa CDK1:n ja sykliini B:n muodostaman kinaasin aktivaatiosta. CDK1/sykliini B tunnetaan myös solun kypsymistä edistävänä tekijänä (engl. *maturation promoting factor*, MPF) joka huolehtii monilla eukaryooteilla mitoosista, joten CAK on oleellinen kompleksi solujen jakaantumisen osalta. (Larochelle ja muut 2007; Sava ja muut 2020).



Kuva 4. CDK7:n rooli sekä solusyklin (A.) että transkription (B.) säätelijänä. A: CDK7, MAT1 ja sykliini H muodostavat CAK-kompleksin (engl. CDK-activating kinase), joka huolehtii solusykliin osallistuvien CDK:iden fosforylaatiosta. CDK:iden aktivaatio on riippuvaista spesifisen sykliinin kanssa muodostetusta vuorovaikutuksesta, ja eri CDK-sykliini-variaatioilla on roolinsa solusyklissä. G1: solusyklin pisin vaihe, jolloin solun tilavuus sekä sen proteiini- ja RNA-määrät kasvavat. Kromosomisto on kaksinkertainen. S: DNA-synteesivaihe, jolloin DNA-kahdentuu, ja kromosomisto on nelinkertainen. G2: DNA:n eheys varmistetaan, ja solu valmistautuu jakautumisvaiheeseen. M: jakautumisvaihe, jossa CDK1/sykliini B, joka tunnetaan myös solun kypsymistä edistävänä tekijänä (engl. maturation promoting factor, MPF) aktivoituu fosforyloinnin seurauksena ja aloittaa jakautumisvaiheen. Jakautumisvaihe päättyy, kun sykliini B hajotetaan ubiquitiiniproteasomijärjestelmän avulla. **B:** CAK-kompleksi toimii vuorovaikutuksessa GTF:ksi (engl. general transcription factor) luokitellun transkriptiotekijä II H:n (engl. transcription factor II H, TFIIH) kanssa, joka mahdollistaa RNA-polymeraasi II:n C-terminaalisen osan (CTD) seriinien 5 ja 7 fosforylaation. DSIF (5,6-dikloori-1-p-D-ribofuranosyylibentsimidatsoli (DRB) -herkkyttä edistävä tekijä) ja NELF (engl. negative elongation factor) toimivat hidastavina tekijöinä RNA-polymeraasi II:n etenemiselle aiheuttaen taukoja transkriptioon. Kun CDK9/sykliini T (pidennysvaihetta edistävä tekijä b, P-TEFb) fosforyloidaan TFIIH/CAK:n toimesta, se fosforyloi DSIF:n ja NELF:n muuttaen DSIF:n

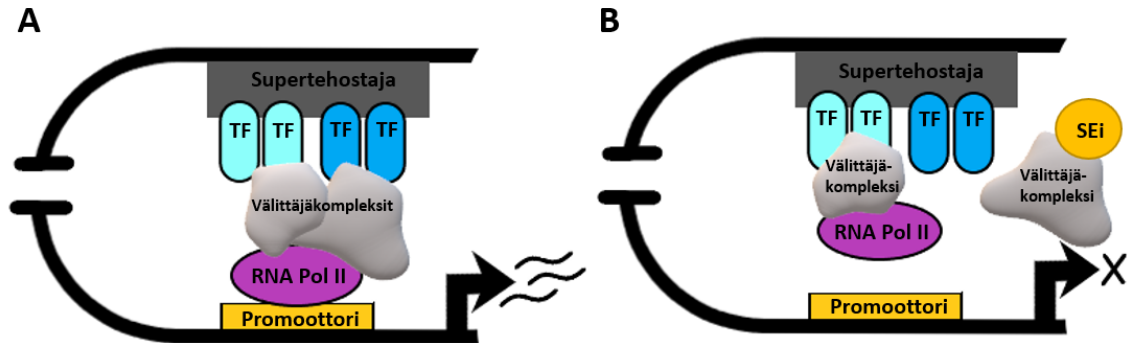
pidennysvaihetta edistäväksi tekijäksi, jotta pidentymisvaihe voi alkaa, ja NELF puolestaan hajoaa fosforyloinnin seurauksena. Tämän jälkeen se fosforyloi RNA-polymeraasi II:n CTD:n seriini 2:n. RNAPII: RNA-polymeraasi II, CDK: sykliiniriippuvainen kinaasi.

CDK7:lla ja BRD4:llä on molemmilla tärkeä rooli RNA-polymeraasi II:n C-terminaalisen osan (engl. *carboxy-terminal domain*, CTD) seriinien 2, 5 ja 7 fosforyloinnissa. Ensimmäisestään CDK7 fosforyloi seriinit 5 ja 7, ja CDK7:n avulla CDK9 fosforyloi seriini 2:n (Kuva 4), mutta on myös näyttöä BRD4:n roolista epätyypillisenä seriini 2:n fosforylaation aiheuttajana. (Devaiah ja muut 2012; Ebmeier ja muut 2017). Transkription etenemisen kannalta tämä on oleellista, sillä CTD:n fosforylointi ohjaa useita tumassa tapahtuvia prosesseja, ja se toimii säätelymekanismina transkriptioon osallistuvien tekijöiden houkuttelemiselle ja hylkäämiselle. CTD on RNA-polymeraasi II:n suurin alayksikkö, joka osallistuu DNA transkription aloitukseen sekä RNA:n modifikaatioon kuten cappingiin, jossa juuri transkriptoidun mRNA:n 5'-päähän liitetään 7-metyyliguanosiini, joka suojaa mRNA:ta nukleasien hajotukselta, sekä auttaa komplekseja tunnistamaan sen jatkokprosesseja kuten kuljetusta ja translaatiota varten. Lisäksi CTD osallistuu silmukointiin, jossa spliseosomi poistaa esi-mRNA:sta koodaamattomat jaksot, intronit, joilla ei ole vaikutusta proteiinin sekvenssiin. Jäljelle jäävät siten eksonit, jotka edustavat geenin koodaavia jaksoja. (Phatnani ja Greenleaf 2006). CTD:n fosforylointi ei ole aivan ehdotonta transkription aloituksen osalta ainakaan *in vitro*-kokeissa (Riedl ja Egly 2001), vaikka fosforylaatio onkin tärkeä säätelijä prosessien taustalla. Kinaasit kuten CDK7 ja CDK8 ovat keskeisessä osassa transkription säätelyä, sillä ne vastaavat CTD:n fosforylaation lisäksi myös muista transkriptiokoneiston osien fosforylaatiosta, jotka ovat mukana ohjaamassa transkription aloitusta ja etenemistä. (Riedl ja Egly 2001).

1.2.2 Supertehostajaestäjät

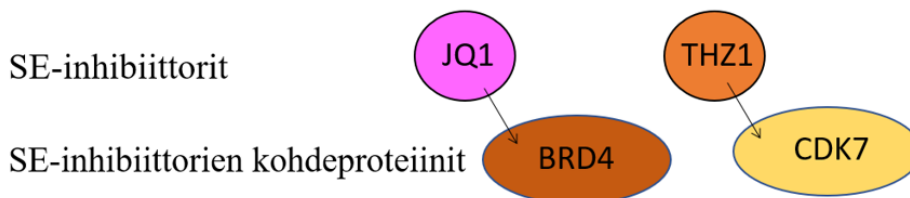
Transkriptio on yleisesti tapahtuva biologinen prosessi, jonka kokonaisvaltainen estäminen on mahdotonta, joten tarvitaan spesifinen kliininen antitumoraalinen eli syövän kasvua hillitsevä hoito, jonka tehon tulisi kohdistua supertehostajakompleksissa esiintyvään kohteeseen. Supertehostajan rakenteessa olevista mahdollisista kohteista kofaktoreilla, oleellisilla transkriptiotekijöillä ja histonien muokkauksen merkkiaineilla vaikutusalat ovat hyvin laajat, mikä tekee niistä vaikeat kohteet. Sen sijasta, supertehostajakompleksin rakenteelle olennaiset välittäjäkompleksit ovat kiinnostavat terapeuttiset kohteet ihon okasolusyövän hoitomahdollisuuksien kehittämisessä, sillä

niillä vaikuttaa olevan tärkeä rooli koko supertehostajan toiminnan kannalta (Kuva 5 A), ja niiden toimiala on rajatumpi. Supertehostajakompleksin rakenteen muuttaminen ja sitä kautta sen toiminnan estäminen on supertehostajainhibiittorin toimintamekanismi (Kuva 5 B). (Pelish ja muut 2015; Zheng ja muut 2020).



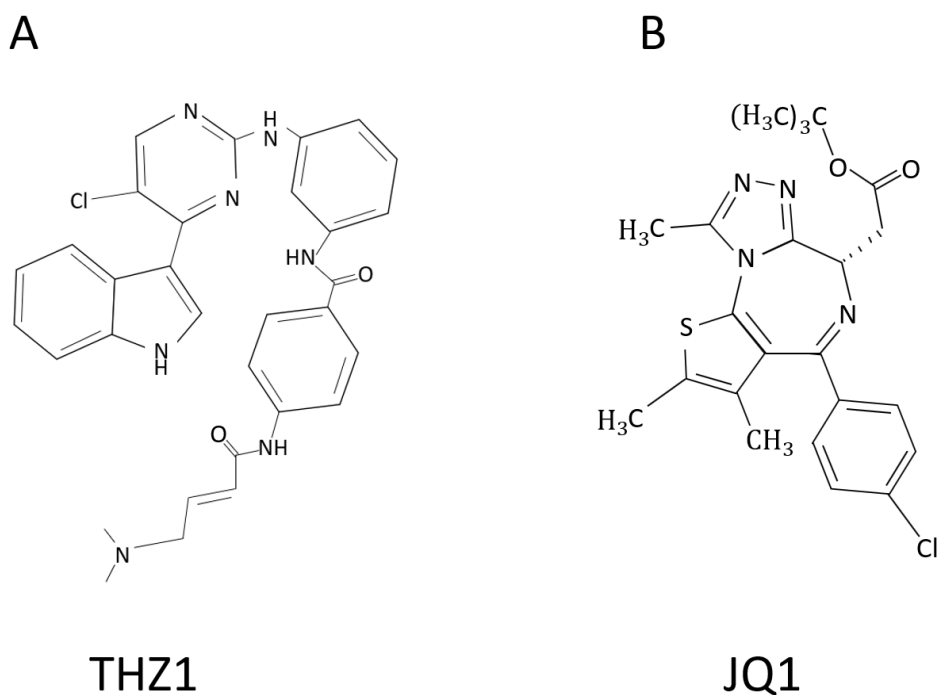
Kuva 5. A. Supertehostajan toiminta yksinkertaistettuna. Supertehostajakompleksissa (SE) transkriptiotekijät ja välittäjäkompleksit muodostavat sillan RNA-polymeraasi II:lle, joka sitoutuu promoottoriin mahdollistaen tehokkaan geeniekspression. **B. Ehdotettu seuraus supertehostajainhibiittorin toiminnalle.** Supertehostajainhibiittori sitoutuu välittäjäkompleksiin tai muulla tavoin vaikuttaa sen toimintaan estäen sillan muodostumisen, jolloin transkriptio estyy eikä geeniä ilmennetä. TF: transkriptiotekijä, RNA Pol II: RNA-polymeraasi II, SEi: supertehostajainhibiittori.

Supertehostajat säätelevät syöpäsoluille tärkeiden onkogeenien toimintaa, mikä on osoitettu käyttämällä tutkimuksissa supertehostajainhibiittoreita THZ1:tä ja JQ1:tä (Kuva 6; Kuva 7), jolloin on huomattu inhiboiva vaikutus niiden kohdeproteiineissa CDK7:ssa ja BRD4:ssä ja sitä kautta koko supertehostajakompleksin toiminnassa. (Zheng ja muut 2020).



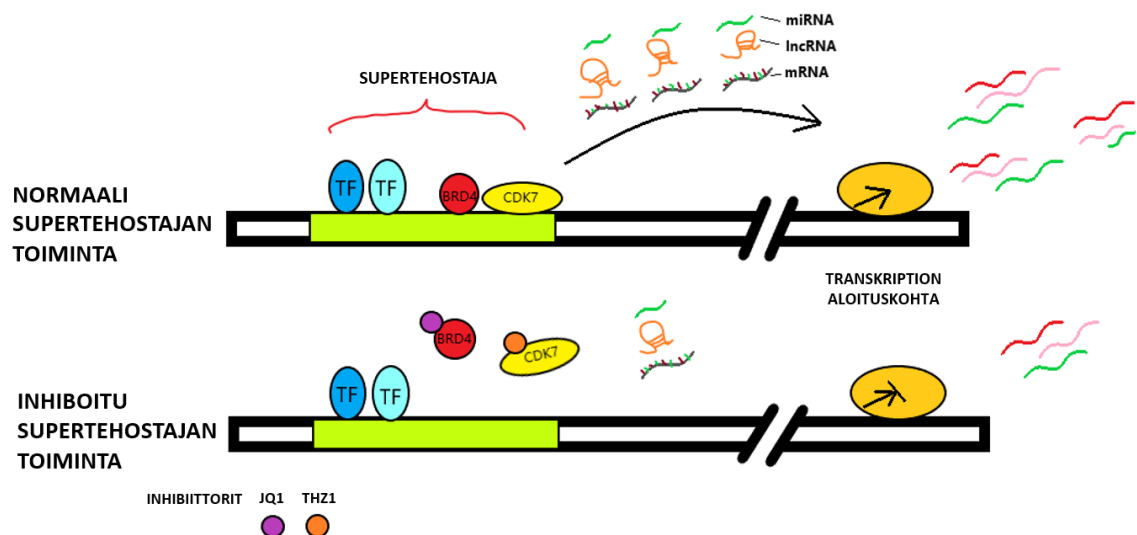
Kuva 6. Supertehostaja- (engl. super enhancer, SE) inhibiittorit JQ1 ja THZ1 sitoutuvat välittäjäkompleksiproteiineihin BRD4:ään ja CDK7:aan estäen niiden toimintaa transkription yhteydessä. JQ1 heikentää BRD4:n sitoutumista hyperasetyloituneisiin kromatiinialueisiin, mikä hajottaa SE:n ja promoottorin välisen vuorovaikutuksen estäen samalla SE:n muodostamien onkogeenien ilmentymistä. THZ1 alentaa SE-alueella toimivien onkogeenisten

transkriptiotekijöiden toimintaa. BRD4: Bromodomeenin sisältävä proteiini 4, CDK7: Sykliiniriippuvainen kinaasi 7.



Kuva 7. A. Supertehostajainhibiittori-THZ1:n rakennekaava. B. Supertehostajainhibiittori-JQ1:n rakennekaava.

Prekliinisissä tutkimuksissa välittäjäkompleksien BRD4:n ja CDK7:n inhibointi JQ1:llä ja THZ1:llä on vaikuttanut syöpäsolujen kasvun heikentymiseen, mikä osoittaa välittäjäkompleksien tarpeellisuuden syöpäsolujen menestymisen kannalta. Inhiboinnilla estetään välittäjäkompleksin kiinnittyminen tai vaikuttaminen sille ominaisessa paikassa, jolloin supertehostajakompleksin toiminta häiriintyy (Kuva 8). Tästä syystä menetelmän inhibiittoreita kutsutaan supertehostajainhibiittoreiksi (engl. *super enhancer inhibitor*, SEi). (Zheng ja muut 2020).

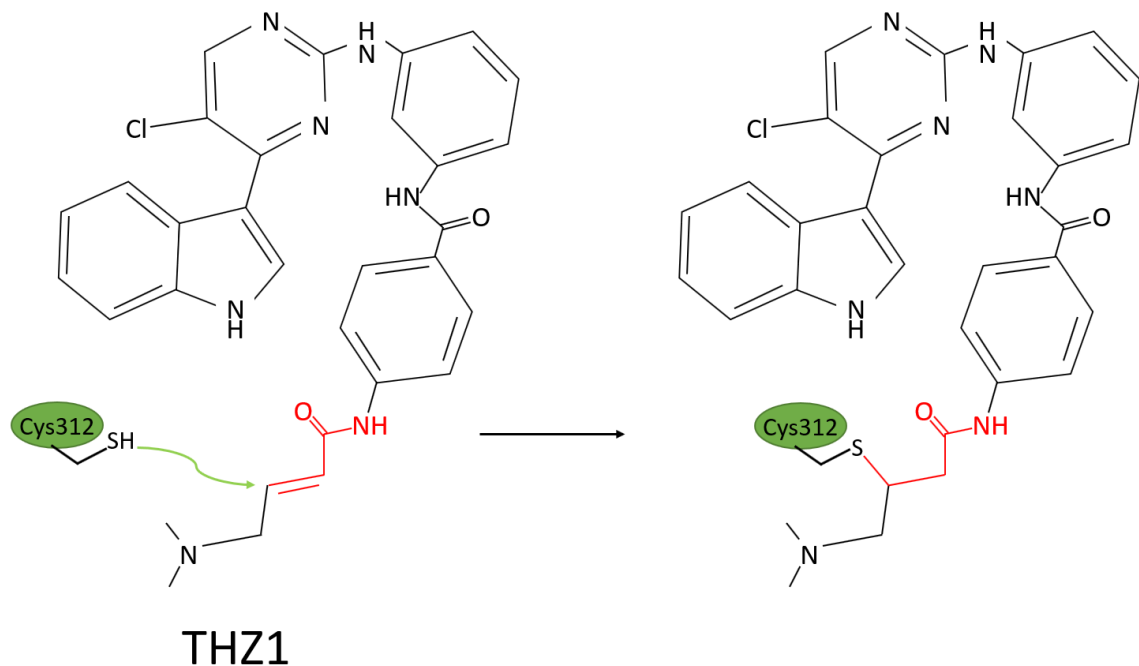


Kuva 8. Ehdotettu supertehostajan toiminta ennen ja jälkeen inhibition. Supertehostaja-inhibiittorit (SEi:t) *JQ1* ja *THZ1* kiinnittyvät kohdeproteiineihin supertehostaja-alueella muuttaen kompleksin toimintaa, jolloin onkogeenin transkriptio vähenee. *JQ1* heikentää *BRD4*:n sitoutumista, mikä estää onkogeenien ilmentymistä, ja *THZ1* alentaa SE-alueella toimivien onkogeenisten transkriptiotekijöiden toimintaa. TF: transkriptiotekijä, miRNA: mikroRNA, lncRNA: pitkä ei-koodaava RNA, mRNA: lähetti-RNA, *BRD4*: Bromodomeenin sisältävä proteiini 4, *CDK7*: Sykliiniriippuvainen kinaasi 7.

Välittäjäkompleksin tai sen osasten inhibointi vaikuttaa tehokkaalta menetelmältä, sillä sen olemassaolo on välttämätön RNA-polymeraasi II:n transkriptiolle, vaikkakin ennen transkriptiota muodostuva PIC-kompleksi (engl. *preinitiation complex*) ei vielä tarvitse välittäjäkompleksia. Välittäjäkompleksit toimivat säätelykeskuksina toiminnallisten geenien transkriptiossa. (Petrenko ja muut 2017).

THZ1 on kovalenttinen, selektiivinen ja hyvin *CDK7*-spesifinen inhibiittori, jonka spesifisyys perustuu sen kykyyn sitoutua *CDK7*:n ulkopuolella sijaitsevaan kysteinitähde C312:een reaktiivisen akryyliamidiryhmänsä avulla (Kuva 9). Reaktiota kutsutaan Michael-additioksi, ja tutkimuksissa kysteinitähde-yhteys sitoutumiselle varmistettiin mutaatiolla, jolla saatiin aikaan sen muuttuminen seriiniksi. Tällöin *THZ1* ei vaikuttanut *CDK7*:n toimintaan heikentävästi, eikä RNA-polymeraasi II:n aktivaatio estynyt transkriptiossa. Myös reaktiivisen akryyliamidiryhmän tarpeellisuutta sitoutumiselle tutkittiin, ja sen rakennetta muuttamalla havaittiin *THZ1*:n tehon heikkeneminen *CDK7*-inhibiittorina. (Kwiatkowski ja muut 2014). Muihin *CDK*-

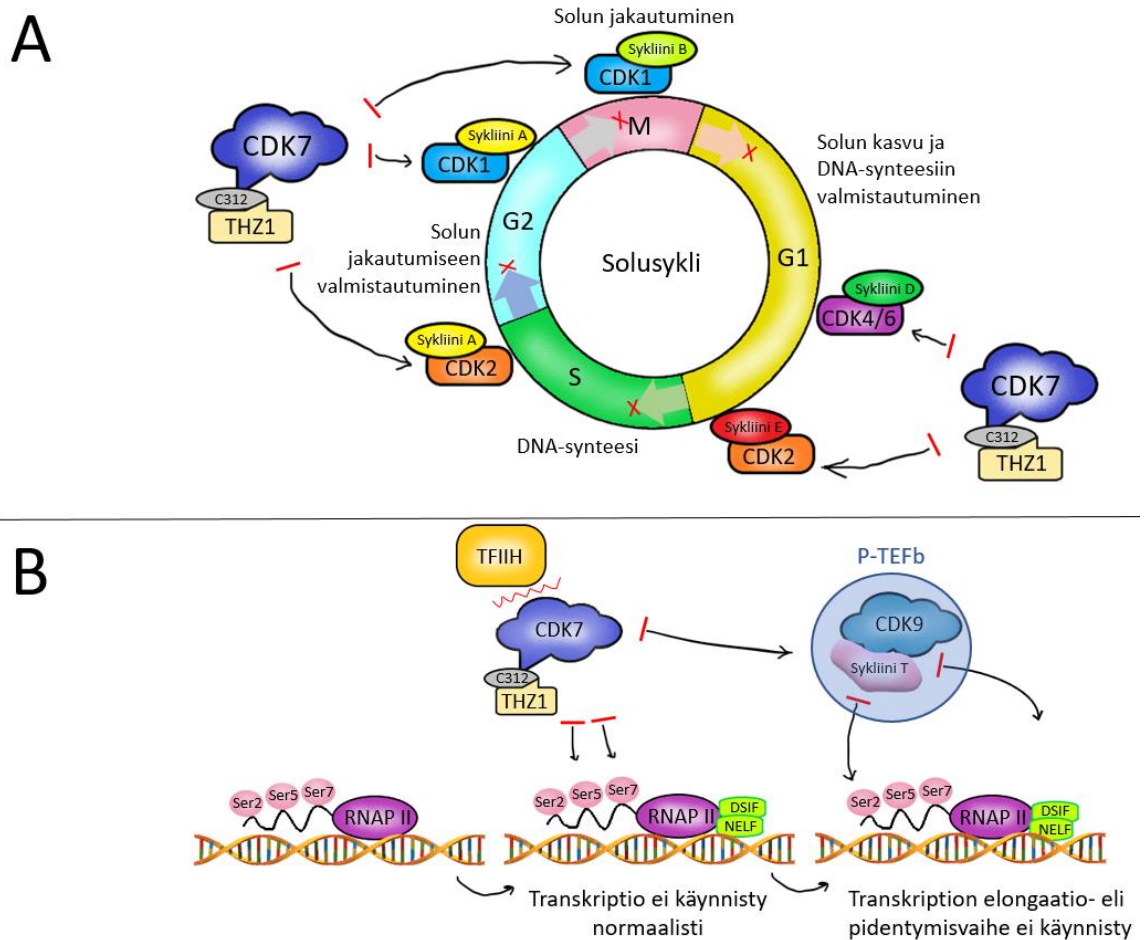
inhibiittoreihin verrattuna THZ1 sitoutuu kovalenttisesti ja harvinaisen selektiivisesti tähän spesifiseen ulkopuoliseen kysteinitähteeseen (B. Li ja muut 2019).



Kuva 9. CDK7-inhibiittorin, THZ1:n sitoutuminen CDK7:n C312-kysteinitähteeseen. THZ1:n sitoutumiskohta, kysteinitähde C312, sijaitsee CDK7:n kinaasidomeenin ulkopuolella. Kuvassa punaisella on sitoutumiseen vaadittava akryyliamidiryhmä, johon kysteinitähde sitoutuu Michael-additioreaktiolla. THZ1:n sitoutuminen CDK7:aan aiheuttaa estymistä sekä solusyklin että transkription toiminnassa, sillä ne ovat pitkälti CDK7:n toiminnan säätelemiä.

THZ1:n on osoitettu *in vitro*-tutkimuksissa inhihoivan kaiken välttämättömän fosorylaation RNA-polymeraasi II:n CTD:n osalta. THZ1 erityisesti inhihoi transkriptien cappingia, ja se tutkimuksissa esti RNA-polymeraasi II:n pysähtymisprosessin inhihoimalla 5,6-dikloori-1-β-D-ribofuranosyylibentsimidatsolin (DRB) herkkyyttä edistävän tekijän (DSIF) aiheuttaen samalla transkription pidentymisvaihetta estävän tekijän (NELF) kuormituksen. Lisäksi THZ1 vähensi myös P-TEFb:stä riippuvaista transkription pidentymisvaiheeseen siirtymistä. (Nilson ja muut 2015). THZ1:n vaikutukset kohdistuvat juuri CDK7:n säätelemiin transkriptionaalisiin prosesseihin sekä solusykli säätelyn inhihointiin, sillä estämällä CDK7:aa muodostamasta CAK-kompleksia solun mitoosille välttämättömät CDK:t eivät aktivoidu, ja koska CDK7:n inhihoinnilla nähdään alentunutta onkogeenista transkriptiota supertehostaja-alueilla. Tehokkaat ja laaja-alaiset solun jakautumiseen ja transkription estoon keskittyvät ominaisuudet tekevät THZ1:sestä lupaavan erityisesti solujen kasvua heikentävän

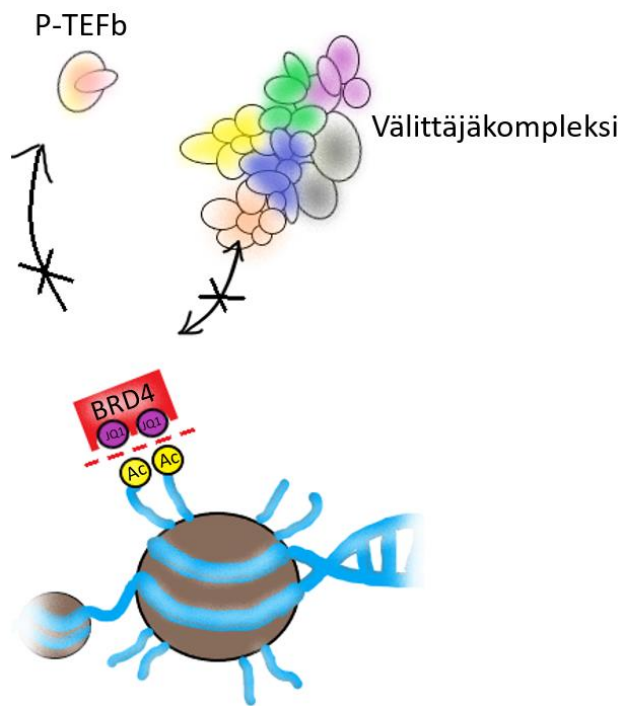
vaikuttajan (Kuva 10). (Fisher 2019; B. Li ja muut 2019; Ma ja muut 2018; Nilson ja muut 2015). Suurilla THZ1 pitoisuuksilla (>250 nM) on saavutettu inhibitiota CDK7:n lisäksi myös CDK12/13:n osalta, mikä selittyy osittain samankaltaisella kinaasirakenteella CDK7:n ja CDK12/13:n välillä (Kwiatkowski ja muut 2014; Zeng ja muut 2018).



Kuva 10. CDK7:n inhibition vaikutus sekä solusyklin (A.) että transkription (B.) osalta. A: THZ1:n sitoutuminen CDK7:aan estää CDK7:aa muodostamasta muiden CDK:iden aktivoinnista vastaavaa CAK-kompleksia. Koska CAK-kompleksin muodostuminen estyy ja solusykliin osallistuvien CDK/sykliini-kompleksien fosforylaatiota ei tapahdu, CDK7:n toiminnasta riippuvaiset osat solusyklissä eivät toimi. Tämä näkyy solun jakaantumisen heikentymisenä. **B:** Koska CDK7 ei muodosta CAK-kompleksia THZ1:n inhiboimana, vuorovaikutus TFIIF:n kanssa ei toteudu, jolloin RNA-polymeraasi II:n CTD:n seriinit eivät fosforyloidu, eikä transkriptio käynnisty normaalisti. THZ1:n vaikutuksesta RNA-polymeraasi II:n pysähtymisprosessia ei tapahdu DSIF:n inhiboinnin seurauksena, ja puolestaan NELF:iä ei

hajoteta. Pidentymisvaiheeseen siirtyminen hidastuu, sillä P-TEFb ei aktivoidu fosforylaation puuttuessa. C312: kysteinitähde, CDKt: sykliiniriippuvaiset kinaasit, DSIF: 5,6-dikloori-1-p-D-ribofuranosyylibentsimi-datsoli (DRB)-herkkyttä edistävä tekijä, NELF: transkription pidentymisvaihetta estävä tekijä, P-TEFb: transkription pidennysvaihetta edistävä tekijä b, RNAP II: RNA-polymeraasi II.

JQ1:n, BET-proteiiniperheen inhibiittorin toimintamekanismi perustuu sen kykyyn sitoutua BRD4:ään estäen sitä kiinnittymästä asetyloituihin histonihäntiin, mikä estää supertehostajan ja RNA-polymeraasi II:n vuorovaikutusta, ja heikentää onkogeenista transkriptiota (Kuva 11) (Bhagwat ja muut 2016; Donati ja muut 2018).



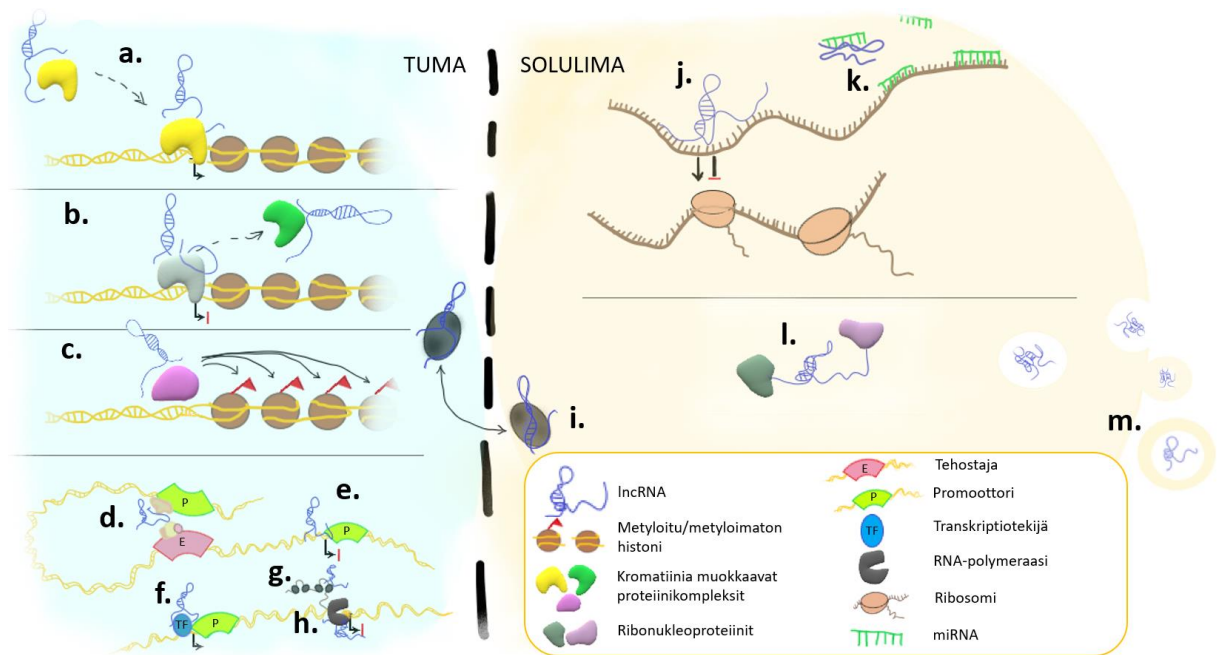
Kuva 11. BET-inhibiittori JQ1 kilpailee BRD4:ään sitoutumisesta asetyloituneiden (Ac) histonihäntien kanssa. Kun BRD4 ei pääse sitoutumaan asetyloituneisiin histonihäntiin, kompleksi P-TEFb:n kanssa ei muodostu, eivätkä transkriptiota säätelevät proteiinit aktivoidu muodostamaan välittäjäkompleksia. Tämä heikentää transkriptiokoneiston muodostumista ja onkogeenien ilmentämistä. BRD4: bromodomeenin sisältävä proteiini 4, P-TEFb: transkription pidennysvaihetta edistävä tekijä b.

JQ1:llä vaikuttaisi lisäksi olevan kyky vaikuttaa solujen angiogeneesiin heikentävästi, eli siihen, miten syöpäsolut stimuloivat verisuonten kasvua kasvaimen tehokkaan kasvun

mahdollistamiseksi. Solujen hypoksia eli hapenpuute aktivoi solut tuottamaan verisuonten endoteelikasvutekijää (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), joka saa aikaan angiogeneesin. VEGF aktivoi angiogeneesin lisäksi myös esimerkiksi luiden muodostumista ja haavojen paranemista edesauttavia toimintoja. Tutkimusten mukaan JQ1 vähentää VEGF-A:n ekspressiota, josta seuraa uusien verisuonten kasvun stimulaation vähenemistä. (da Motta ja muut 2017; Duffy ja muut 2004). Kun angiogeneesi vähenee, mahdollisuudet syövän kasvulle heikentyvät, sillä hapen ja ravinteiden kuljetus syöpäsoluille on avainasemassa niiden selviämisen kannalta. Muiden syöpien ohella angiogeneesiä tapahtuu myös ihosyövässä, kuten ihon okasolusyövässä. Keratinosyytit muiden solujen kuten makrofagien ja syöpäsolujen tavoin tuottavat VEGF:ää, ja VEGF-A aktivoi endoteelisolujen ja makrofagien kemotaksiksen, eli kulkeutumisen paikalle. (Duffy ja muut 2004; Johnson ja Wilgus 2012; Riabov ja muut 2014).

1.3 Pitkät ei-koodaavat RNA:t

Pitkät ei-koodaavat RNA:t (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA) ovat yleensä yli 200 nukleotidin mittaisia geenien transkripteja, joista ei tuoteta proteiinia. Ne toimivat kuitenkin esimerkiksi epigeneettisinä säätelijöinä, eli ne muokkaavat kohdegeeniensä perimää muuttamatta DNA:n emäsjärjestystä. (Piipponen, Nissinen, ja Kähäri 2020). Tällaisia epigeneettisiä muutoksia seuraa esimerkiksi DNA:n muokkauksesta kuten metylaatiosta, joka ei muuta emäsjärjestystä, sekä kromatiinirihman ja histonien muokkauksesta (L. Zhang ja muut 2020). LncRNA:iden tehtäviin epigeneettisen säätelyn lisäksi lukeutuukin muun muassa geenien transkriptio ja transkriptiotekijöiden säätely solun tumassa, ja solulimassa ne osallistuvat transkription jälkeisiin prosesseihin. (Kuva 12) (Piipponen, Nissinen, ja Kähäri 2020).



Kuva 12. Pitkien ei-koodaavien RNA:iden (lncRNA) molekulaariset toiminnot. Tumassa lncRNA:t voivat toimia epigeneettisinä säätelijöinä joko ohjaamalla kromatiinia muokkaavia komplekseja tiettyihin genomien lokuksiin (a) tai houkuttelemalla niitä sieltä pois (b) saaden tällöin aikaan joko geenien aktivoimisen tai tukahduttamisen. Ohjaamalla komplekseja tiettyyn lokukseen ne voivat saada aikaan histonien metylaation (c). LncRNA:t voivat muodostaa kromosomaalisen silmukan (d), sitomalla DNA:ta sitovia proteiineja ja niiden kofaktoreita, ja tuomalla niillä samanaikaisesti genomiset lokukset lähelle toisiaan. Tällä voi olla sekä transkription aktivaatioon että repression kohdistuvia vaikutuksia. LncRNA voi inhiboida transkriptiota sitoutumalla DNA:han ja tukkimalla transkriptiotekijän sitoutumiskohdan (e). LncRNA:t voivat ajoittain joko inhiboida tai aktivoida geenien transkription ohjaamalla transkriptiotekijän (TF) paikalle tai houkuttelemalla sen pois (f). Vaihtoehtoinen silmukointi voi olla lncRNA:iden aikaansaamaa niiden sitoutuessa mRNA:han ja tukkiessa silmukointikohdan. Ne voivat myös ohjailla silmukointitekijöitä transkriptiokohtiin. (g). LncRNA voi sitoutua RNA-polymeraasiin ja estää tällä tavoin transkription (h). Proteiineja sitovat lncRNA:t voivat kuljettaa proteiineja solunsisäisesti tuman ja soluliman välillä (i). Solulimassa lncRNA:t voivat osallistua mRNA:n stabiilisuuden säätelyyn joko suoraan sitoutumalla mRNA:han (j) tai epäsuorasti sitoutumalla miRNA:ihin komplementaarisen emäspariutumisen avulla (k). LncRNA:t voivat toimia rakennusvälikappaleina edistäen aktiivisten ribonukleoproteiini-kompleksien muodostumista (l). LncRNA:ita voidaan lisäksi erittää myös solunulkoisiin rakkuloihin eli vesikkeleihin tai eksosomeihin, jolloin ne kykenevät välittämään solujen välistä signalointia.

LncRNA:illa on kyky muodostaa monipuolisesti sekundaarisia ja tertiäärisiä rakenteita, mikä auttaa niitä olemaan vuorovaikutuksessa proteiinien, DNA:n ja muiden RNA:iden kanssa säädellen moniproteiini-kompleksien aktiivisuutta, kohteita tai niiden kanssa vuorovaikutuksessa olevia tekijöitä. Rakenteen säilyminen on välttämätöntä

lncRNA:iden toiminnan kannalta, kun taas 3D-rakennetta muuttamattomat nukleotidisekvenssin muutokset eivät haittaa niiden toimintaa. (Graf ja Kretz 2020; Zampetaki ja muut 2018).

UVA- ja UVB-säteilyllä on kyky säädellä eri lncRNA:iden ilmentämistä keratinosyyteissä (Yo ja Rünger 2017), mikä korostaa UV-säteilyn merkitystä solutason muutoksia kohtaan. Toisaalta, auringonvalolle altistuminen on ihon tärkein lähde D-vitamiinin saamiseksi, ja D-vitamiinin on puolestaan todettu olevan suojaava tekijä syövän muodostumiselta (Reichrath ja muut 2017). D-vitamiinin signaloinnin tiedetään lisäksi vaikuttavan myös lncRNA:iden ilmentämiseen keratinosyyteissä, joissa vähäinen D-vitamiinireseptorien määrä implikoi selkeästi lisääntyneitä onkogeenisten lncRNA:iden ilmentymistä ja vähentyneitä tuumorisuppressiivisten, eli kasvaimen muodostusta ehkäisevien lncRNA:iden ilmentymistä. Tällaisia D-vitamiinireseptorin säätelmiä ihmisen eri syöpätyyppeihin liitettäviä onkogeeneja kuten *SRA-1/SRA*, *MALAT1* ja *HOTAIR* on tunnistettu ekspressoituvan hiirten keratinosyyteissä. (Y. J. Jiang ja Bikle 2014).

1.3.1 Yhteys supertehostajien kanssa

Supertehostajien merkitys ihon okasolusyövän lisäksi muissa syövässä on merkittävä, sillä ne mahdollistavat onkogeenien kuten pitkien ei-koodaavien RNA:iden yliexpression, eli liiallisen ilmentämisen syövän yhteydessä, mikä puolestaan tehostaa syöpäsolujen kykyä jakaantua hallitsemattomasti, sekä edesauttaa niitä levittymään ympäröiviin kudoksiin (Tang ja muut 2020). Kun lncRNA:iden yli- tai aliekpression ja supertehostajien toiminnan yhteys syövässä havaittiin, aihetta on tutkittu eri syöpien osalta päämääränä selvittää eri lncRNA:iden toimintamekanismit ja säätelymenetelmät. Supertehostajien säätelmiä lncRNA:ita on osoitettu löytyvän muun muassa peräsuolen syövästä, *RP11-569A11.1* (H. Chen ja muut 2021) ja virtsarakon syövästä, PICSAR (X. Wang ja muut 2020). Lisäksi on tunnistettu SE-säädely lncRNA, *LINC01004*, jota yliexpressoidaan maksasolusyövässä, ja sitä voidaan pitää kyseisessä syövässä huonon ennusteen markkerina (J. Li ja muut 2023).

Myös muissa levyepiteelisyövässä kuin cSCC:ssä on tehty löydöksiä supertehostajien säätelystä lncRNA:ista kuten *LINC01503*:sta, joka on huomattavasti yliexpressoitu ruokatorven, sekä pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövässä, se on supertehostajan säätelmä, ja sillä on vaikutusta solujen kasvun, migraation, pesäkkeiden muodostuksen ja invaasion lisääntymisen osalta (J.-J. Xie ja muut 2018). Ruokatorven SCC:ssä esiintyvänä supertehostajasäätelyn alaiseksi lncRNA:ksi on tunnistettu lisäksi

LINC00094 (Q. Wang ja muut 2020), jonka on myöhemmin osoitettu ilmentyvän myös ihon SCC:ssä supertehostajan säätelmänä (Piipponen ja muut 2022). Supertehostajien kyky säädellä pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien toimintaa on osoitettu käyttämällä tutkimuksissa supertehostajainhibiittoreita, jolloin on huomattu inhiboiva vaikutus supertehostajakompleksin toiminnassa onkogeenisen transkription vähentyessä (Zheng ja muut 2020).

1.3.2 Pitkät ei-koodaavat RNA:t ihon okasolusyövässä

Eri cSCC-solulinjoja tutkittaessa on kyetty osoittamaan, että lncRNA:illa on rooli ihon okasolusyövän muodostumisessa, ja niiden yli- tai aliekspressiolla on vaikutusta cSCC:n etenemiselle (Piipponen, Nissinen, ja Kähäri 2020). Jo edellä mainittujen D-vitamiinireseptorien vähäisen määrän indusoimat lncRNA:t, *MALAT1*:n ja *HOTAIR*:n on todistettu yliekspressoituvan myös cSCC:ssä (J. Chen ja muut 2022; Y. Zhang ja muut 2019). *MALAT1*:n toiminta cSCC:n etenemisen säätelyssä perustuu sen kykyyn vaikuttaa EGFR-signalointiin, ja cSCC:n yhteydessä *MALAT1*:n ekspression inhiboinnilla on havaittu vähentynyttä EGFR-proteiinin tuottoa (Y. Zhang ja muut 2019). *HOTAIR* puolestaan edistää cSCC:n kasvua aiheuttamalla Sp1-proteiinin yliekspressiota, joka johtaa miR-199a:n transkription estymiseen. *HOTAIR*:n ekspression on lisäksi havaittu korreloivan huonon ennusteen cSCC:n kanssa. (J. Chen ja muut 2022). LncRNA *NEAT1*:n on todistettu yliekspressoituvan cSCC:ssä, ja sen ekspressiomäärän muutokset cSCC-kudoksissa implikoivat tutkimusten mukaan imusolmukkeissa esiintyviä etäpesäkkeitä ja kaukaisia etäpesäkkeitä. *NEAT1*:n ekspression inhiboinnilla on puolestaan cSCC-solujen invaasioon ja proliferaatioon vähentävä vaikutus, ja sen hiljennyksellä on havaittu matriksimetalloproteinaasien MMP-2:n ja MMP-9:n, sekä vimentiniin ja N-kadheriinin määrän vähenemistä cSCC-soluissa. (Gong ja muut 2022). Normaalisissa ihossa puolestaan ilmennetään *TINCR* ja *SMRT-2* lncRNA:ita, jotka edistävät keratinosyyttien erilaistumista. cSCC:ssä näiden lncRNA:iden on huomattu alieksspressoituvan, minkä uskotaan edesauttavan huonosti erilaistuneen cSCC:n kasvun tehostumista ja huonon ennusteen cSCC:n kehittymistä. (Kretz ja muut 2013; Lee ja muut 2018). Normaaleihin keratinosyytteihin verrattuna cSCC-soluissa yliekspressoituaan lisäksi tässä tutkimuksessa kohteena olevia lncRNA:ita PICSAR:ia, SERLOC:ia, PRECSIT:iä ja LINC7:aa. PICSAR (*P38 Inhibited Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Associated LincRNA*) edistää cSCC:n kasvua (Piipponen ja muut 2016), PRECSIT (*P53 Regulated Carcinoma Associated Stat3 Activating Long Intergenic Non-Protein Coding Transcript*) säätelee cSCC-solujen invaasiota (Piipponen, Nissinen, Riihilä, ja muut

2020), ja SERLOC (*Super enhancer and ERK1/2-Regulated Long Intergenic non-protein coding transcript Overexpressed in Carcinomas*) edistää cSCC-solujen invaasiota (Piipponen ja muut 2022). Huomioitavaa on, että suuri osa cSCC:n muodostumiseen ja etenemiseen osallistuvista lncRNA:ista on kuitenkin vielä tunnistamatta.

PICSAR, *LINC00162*, on lncRNA, joka edistää cSCC:n kasvua säätelemällä ERK1/2 (engl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*) -signalointireitin aktiivisuutta, joka puolestaan on tiiviisti linkitettyinä cSCC-solujen proliferaatiokykyyn. PICSAR:ia ilmennetään ylimäärin cSCC-soluissa estämällä p38 α - ja p38 δ -mitogeeniaktivoituja proteiinikinaaseja (MAPKs), jotka reagoivat sytokiineihin, lämpösokkiin ja muihin stressiärsykkeisiin, ja jotka osallistuvat solujen erilaistumiseen ja apoptoosiin. Tutkimusten mukaan PICSAR osallistuu oleellisesti cSCC-solujen kasvun edistämiseen, sillä sen hiljennys aiheuttaa cSCC-solujen kasvun ja migraation heikkenemistä, sekä ERK1/2-reitin inaktivaatiota ja kaksoisspesifisen fosfataasi 6 (engl. *dual specificity phosphatase 6*, DUSP6) -geenin yli-ilmentymistä. DUSP6 toimii tuumorisuppressorina, jolloin sen tuotto ylimäärin on eduksi syövän kasvun ehkäisyssä. (Piipponen ja muut 2016). Tutkimusten mukaan PICSAR säätelee myös integriinien eli soluväliaineresptorien määrää cSCC-soluissa, ja sillä on vaikutusta solujen liikkumiseen. PICSAR:n hiljennys lisää integriinien $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\beta 1$ ilmentämistä cSCC-solujen pinnalla, mikä puolestaan edistää soluadheesion muodostumista soluväliaineen fibronektiinin ja kollageeni I:n kanssa vähentäen solujen liikkumista. PICSAR:n yliekspressio cSCC-soluissa puolestaan vähentää kyseisten integriinien ilmentymistä ja edistää solujen kykyä liikkua. (Piipponen ja muut 2018).

PRECSIT, *LINC00346*, on lncRNA, jota yliekspressoitetaan myös cSCC-soluissa, ja sen kyky edistää cSCC-solujen invaasiota perustuu signaalitunnistin- ja transkriptioaktivaattori 3- (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) signalointireitin säätelyyn. STAT3-reitti osallistuu moniin soluprosesseihin kuten solujen kasvuun, migraatioon ja apoptoosiin, ja PRECSIT aktivoi sitä. Tutkimusten valossa PRECSIT:n hiljennys vähentää cSCC-solujen invaasiota, STAT3-reitin aktiivisuutta, ja samalla se myös heikentää matriksimetalloproteinaasien 1, -3, -10 ja -13 (MMP:t) ilmentymistä cSCC-soluissa. (Piipponen, Nissinen, Riihilä, ja muut 2020). P53-tuumorisuppressorigeenillä on lisäksi havaittu olevan PRECSIT:n ekspressiota hillitsevä vaikutus (Piipponen, Nissinen, Riihilä, ja muut 2020).

SERLOC, *BRD3OS/LINC00094*, on sekä supertehostajan että ERK1/2-signalointireitin säätelemä lncRNA, jota yliekspressoitetaan cSCC-kasvainsoluissa sekä niiden

etäpesäkkeissä. Metastaattisten cSCC-solujen osalta SERLOC:n ekspressio on korkeampaa verrattuna ei-metastaattisiin cSCC-soluihin, mikä tekee SERLOC:sta hyödyllisen ennusteen arvioinnissa edenneen cSCC:n osalta. SERLOC edistää cSCC-solujen invaasiota. Tutkimusten mukaan SERLOC:n ilmentyminen heikkenee supertehostajainhibiittoreita THZ1:tä ja JQ1:tä käyttämällä sekä MEK1/ERK1/2-reittiä aktivoimalla. Tällöin MEK1-aktivaation ja MAPK-signaalintireitin estäjän käyttö lisää merkittävästi SERLOC:n ilmentymistä, mikä todistaa MEK1/ERK1/2-signaalintireittien osallisuuden SERLOC:n säätelyssä. Myös supertehostajainhibiittorien vaikutus SERLOC:n ekspression vähentämisessä kertoo, että SERLOC on supertehostajasäädely. Tutkimuksissa SERLOC:n hiljennys saa lisäksi aikaan invaasioon vahvasti liitettyjen MMP-1- ja MMP-13-geenien vähentyntä tuottoa, sekä se myös heikentää cSCC-solujen invaasiota kollageeni I:n läpi. (Piipponen ja muut 2022).

LINC7:n tiedetään lisäksi yliekspressoituvan cSCC-soluissa, sillä se nousee esille cSCC-solulinjoille toteutetun transkriptomi-analyysin saaduissa tuloksissa, joiden mukaan LINC7:n havaitaan yliekspressoituvan niin primaareilla ei-metastaattisilla kuin metastaattisillakin solulinjoilla normaaleihin keratinosyytteihin verrattuna (Piipponen ja muut 2016). LINC7:sta on myös näyttöä keuhkojen levyepiteelisyövässä, jossa sen yli-ilmentyminen aiheuttaa lisääntyntä solujen proliferaatiota ja invaasiota. Keuhkojen SCC:ssä LINC7:n uskotaan toimivan vuorovaikutuksessa miR-185-5p:n kanssa yliekspressoiden *NFIX*-geeniä, ja pahentavan kyseisen syövän etenemistä toimimalla kilpailevana endogeenisenä RNA:na. LINC7:n hiljennys saa puolestaan apoptoosin kautta aikaan solujen kasvun ja invaasion vähenemisen keuhkojen SCC-soluissa. (Gu ja Lin 2022).

2 Työn tavoitteet

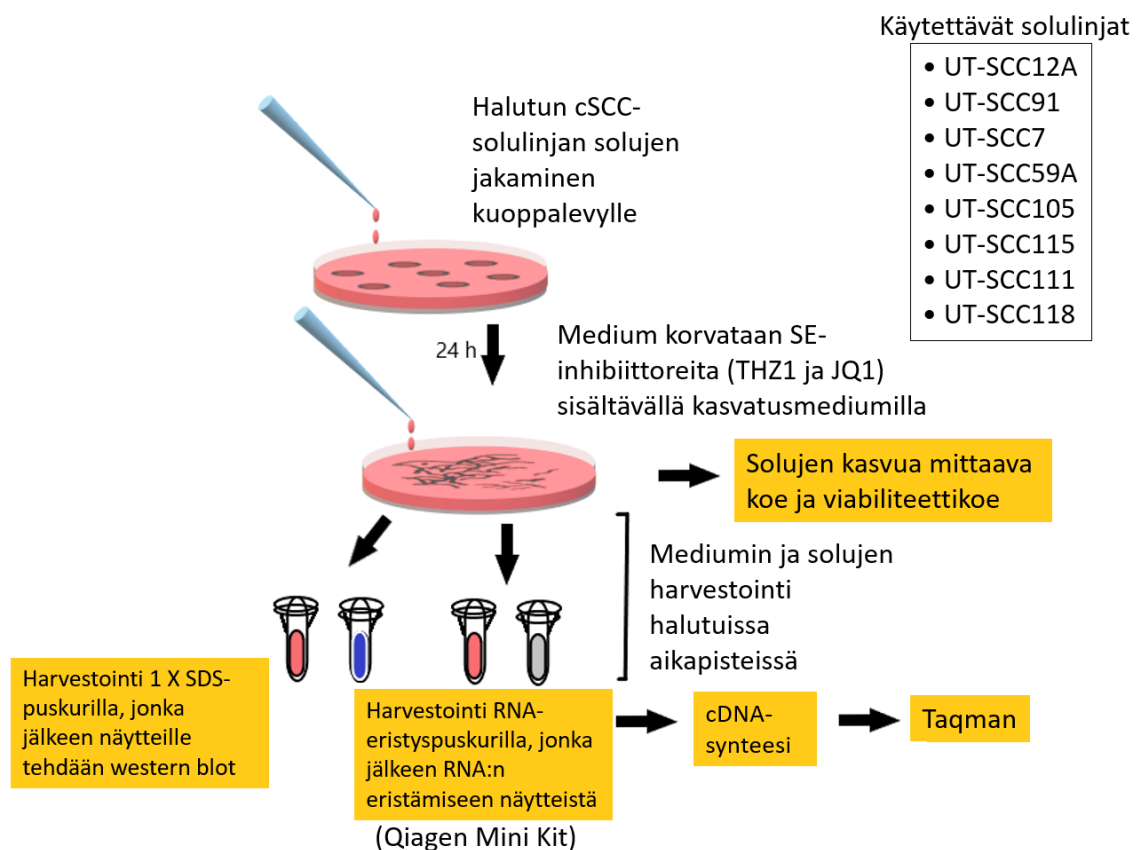
cSCC:n esiintyvyys on kasvussa, eikä sille ole toistaiseksi olemassa olevaa täsmähoitoa. Metastaattiseen vaiheeseen edennyttä ihon okasolusyöpää on vaikea hoitaa enää kirurgisilla toimenpiteillä, vaan tarvitaan muita keinoja. Tutkimuksen tärkeimpänä tavoitteena oli löytää uusia potentiaalisia terapeuttisia kohteita kyseisen syövän hoitoon.

Työn osatavoitteet:

1. Varmistetaan, että tutkittavissa cSCC-soluissa on käytettävän SE-inhibiittorin sitoutumiselle spesifinen proteiini.
2. Tutkitaan, miten SE-inhibiittorit vaikuttavat cSCC-solujen kasvuun ja elinkykyisyyteen eri pitoisuuksissaan.
3. Selvitetään, eroaako pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien ekspresion säätely eri cSCC-solulinjojen välillä, ja millainen vaikutus SE-inhibiittoreilla on pitkien ei-koodaavien RNA-molekyylien ekspressioon cSCC-soluissa.

3 Materiaalit ja menetelmät

Tarkoituksena oli toteuttaa neljänlaisia supertehostajainhibiittorikokeita kahdeksalle ihon okasolusyöpätuumorista eristetyille UT-SCC-solulinjalle. Kaikkien kokeiden peruspohjana oli solujen hoito ja niiden jakaminen kuoppalevyille halutunlaisesti – solujen määrä kuoppalevyillä riippui toteutettavan kokeen luonteesta, ja kuoppien määrä riippui menetelmästä (esimerkiksi 6- tai 96-kuoppalevy). Solut jaettiin kuoppalevyille, niitä kasvatettiin + 37 °C lämpötilassa noin vuorokausi, jonka jälkeen kasvatusmedium vaihdettiin inhibiittoreita (THZ1 ja JQ1, MedChemExpress) sisältäväksi seerumittomaksi mediumiksi. Kokeita joko jatkettiin kuoppalevyillä toteutettaviin solujen kasvua mittaaviin kokeisiin (tehtiin käyttämällä IncuCyte® S3:ea (Live-Cell Analysis System, Sartorius)) tai elinkykyisyyttä mittaaviin viabiliteettikokeisiin (tehtiin käyttämällä Victor²-laitetta (Multilabel counter, WALLAC)) ja CCK-reagenssia (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories), tai solut ja medium kerättiin kuoppalevyiltä tiettyjen aikapisteiden kohdalla, jolloin näytteillä jatkettiin joko western blot:iin, tai RNA:n eristämisen (Qiagen miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini Kit) ja cDNA-synteesin kautta reaaliaikaiseen kvantitatiiviseen polymeraasiketjureaktioon (RT-qPCR, Taqman). (Kuva 13).



Kuva 13. Menetelmät kokeiden toteuttamiselle.

3.1 Ihon okasolusyöpäsolulinjat ja soluviljely

Töissä käytettiin kahdeksaa eri cSCC-solulinjaa, joista viisi oli primaarisia ei-metastaattisia: UT-SCC12A, UT-SCC91, UT-SCC-105, UT-SCC111 ja UT-SCC118, ja kolme metastaattisia solulinjoja: UT-SCC7, UT-SCC-59A ja UT-SCC-115. Soluja kasvatettiin T75-filtteripulloissa (Greiner), ja kasvatusmediumina käytettiin 10 %:sta DMEM:iä (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma), johon oli lisätty kymmenesosa naudan sikiön seerumia (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Gibco), 100 IU/ml penisilliiniä (Lonza), 100 µl/ml streptomysiiniä (Lonza), 6 mmol/l L-glutamiinia (Lonza), 0,2 % Fungizonea (Gibco) ja 1 % NEAA (engl. *non-essential amino acids*) (Gibco).

SCC-solujen kasvua T75-pulloissa seurattiin ja niiden määrää sekä harvennettiin pulloissa että niitä jaettiin myös kuoppalevyille eri töitä aloitettaessa. Tällöin kasvatusmedium poistettiin, ja solut pestiin fosfaattipuskuroidulla suolaliuksella, (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (Sigma) jotta pullo saatiin kunnolla huuhdottua kasvatusmediumista. PBS pipetoitiin pois, ja solut käsiteltiin sen jälkeen trypsiinillä (0,25 % Trypsin EDTA (1 X), Gibco), jonka annettiin vaikuttaa soluihin inkuboimalla + 37 °C lämpökaapissa noin 5 minuuttia. Trypsinin toiminta perustuu proteiineja hajottavaan vaikutukseen, ja työssä sitä tarvittiin irrottamaan solut pullon pohjasta. Solujen irtoaminen varmistettiin mikroskoopin avulla.

Trypsiini inaktivoitiin lämpimällä mediumilla (10 % DMEM) sekoittamalla huolellisesti ja täydentämällä sitä 10 ml lopputilavuuden saavuttamiseksi. Jos solut haluttiin vain jakaa pullossa, tässä kohtaa osa solususpensiosta korvattiin 10 %:lla DMEM:llä, ja siirrettiin pullo lämpökaappiin (+ 37 °C). Jos soluja tarvittiin koetta varten, solususpensio sekoitettiin hyvin, ja pieni määrä solususpensiota pipetoitiin laskentakammioon solumäärän mittausta varten. Kokeeseen tarvittava solususpensiomäärä laskettiin saadun solumäärän (soluja/ml) perusteella, ja täydentämällä määrä 10 %:lla DMEM:llä tehtiin välisuspensio, josta lopulta pipetoitiin solususpensio kuoppalevy(i)lle. Tämän jälkeen kuoppalevy(t) siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C).

3.1.1 Töissä käytettävät inhibiittorit

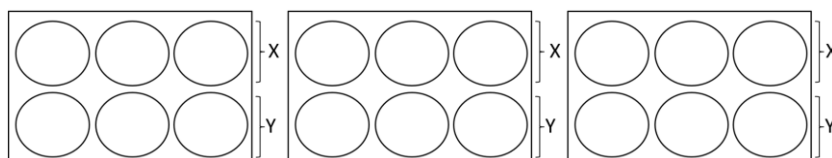
Töissä käytettiin kahta supertehostajainhibiittoria: THZ1:stä (HY-80013, stokki 10 mM) ja JQ1:stä (HY-13030, stokki 10 mM) (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA). Supertehostajainhibiittorikokeissa inhibiittoreita käytettiin 0 % DMEM:in kanssa, joka sisälsi kaiken muun lukuun ottamatta FBS:ää, ja kontrollina kokeissa toimi dimetyylisulfoksidi (DMSO, Fisher), koska inhibiittorit oli käyttöä varten laimennettu

DMSO:hon. JQ1:n stokkiliuosta käytettiin suoraan, mutta THZ1:n stokkiliuos laimennettiin 0,2 mM:ksi DMSO:lla ennen töiden aloittamista.

3.2 Western blot

3.2.1 Solujen jakaminen kuoppalevyille

Western blot-kokeessa haluttujen SCC-solulinjojen solut jaettiin 6-kuoppalevyille (Greiner) siten, että jokaista aikapistettä vastasi kolme kuoppaa/solulinja, ja SCC-soluja tuli 600 000/kuoppa, eli 300 000 solua/ml. Western blot:ia varten haluttiin kolme aikapistettä; 6 h, 24 h ja 48 h. (Kuva 14). Solut suspensoitiin 10 %:een DMEM:iin.

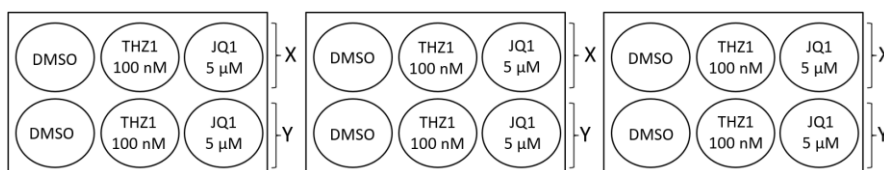


Kuva 14. Western blot-menetelmää varten SCC-soluja jaettiin 6-kuoppalevyille; 600 000 solua/kuoppa, 1 kuoppalevy/aikapiste. X ja Y merkitsevät eri solulinjoja.

Tämän jälkeen kuoppalevyt siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C) noin 24 tunnin ajaksi, jonka jälkeen inhibiittorilaimennokset lisättiin.

3.2.2 Inhibiittorilaimennosten lisäys kuoppalevyille

Kun solut olivat 70–95 % konfluentit, kuopista poistettiin vanha medium, ja tilalle vaihdettiin inhibiittorilaimennokset. Inhibiittorilaimennokset tehtiin 0 % DMEM:iin eli seerumittomaan mediumiin. THZ1:n testattava pitoisuus oli 100 nM ja JQ1:n 5 µM. DMSO:a lisättiin kontrollikuoppien laimennoksiin saman tilavuuden verran inhibiittoreihin verrattuna. (Kuva 15). Mediumien vaihdon jälkeen kuoppalevyt siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C).



Kuva 15. Inhibiittorilaimennosten pitoisuudet 6-kuoppalevyillä. DMSO:a tuli kuoppiin inhibiittorien kanssa vastaava tilavuus. X ja Y merkitsevät eri solulinjoja.

3.2.3 Solujen harvestointi ja lyaattinäytteiden tekeminen

Kuuden tunnin kuluttua inhibiittorien lisäyksestä medium kerättiin talteen ensimmäisen kuoppalevyn kuopista. Kuopat pestiin PBS:llä, jotta mahdollisista mediumjäämistä päästiin eroon. Kuoppien solut lysoitiin tämän jälkeen jäällä 100 µl:lla 1 X SDS-puskuria

(62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 10 % glyseroli, 50 mM DTT (Ditiotreitoli); 0,1 % bromifenolisininen). Jäillä harvestoiminen ehkäisee näytteissä olevien proteiinien hajoamista ja defosforylaatiota, ja puskuri auttaa solujen hajotuksessa ja irrotuksessa kuopan pohjasta. Raaputtimella raavittiin kuopan pohjaa kauttaaltaan, jotta lysoidut solut saatiin mahdollisimman hyvin harvestoitua. Sekä medium- että lyaattinäytteet säilöttiin pakastimeen (-20 °C).

24 h aikapisteen kohdalla 48 h aikapisteen kuoppalevyn medium-inhibiittorilaimennokset vaihdettiin uusiin kuten alkutilanteessa, ja 24 h kuoppalevyn solut harvestoitiin kuten edellä. Työvaiheet toistettiin myös 48 h aikapisteen kuoppalevylle vuorokauden kuluttua.

3.2.4 Western blot-geelija ja -siirto

Geelijaissa käytettiin 7,5 % geeliä (7,5 % Acryl:Bis (30:0,8) (1610158, BioRad) suurempia proteiineja (~250 kb) tarkasteltaessa, ja 10 % geeliä (10 % Acryl:Bis (30:0,8) (1610158, BioRad) pienempiä proteiineja (39–110 kb) tarkasteltaessa. Ylägeelit 4 % (4 % Acryl:Bis (30:0,8) (1610158, BioRad).

Lyaattinäytteitä lämmitettiin lämpöblokillä (95–100 °C) noin viisi minuuttia, jonka jälkeen näytteet spinnattiin ja pipetoitiin geelin kaivoihin, 25 µl näytettä/kaivo. Kokostandardina näytteiden proteiinien koon määrittämiseksi käytettiin BlueStar Plus Prestained Protein-markkeria (MWPO4, Nippon). Geelijaissa käytettiin BioRad Mini-Protean® 3 –laitteistoa ja Tris-glysiini-SDS-ajopuskuria (50 mM Tris, 0,38 M Glysiini, 2 mM EDTA; 0,1 % SDS). Geelijaon jännitteenä käytettiin 70 V kunnes sininen väririntama saavutti alageelin (~45 min.). Tämän jälkeen jännitettä nostettiin 100 V:iin ja ajoa jatkettiin, kunnes väririntama oli saavuttanut ajolaitteen alareunan (~1,5 h).

Geelijaon jälkeen geeli poistettiin ajolaitteesta, ja ylägeeli ja sininen väririntama leikattiin siitä irti. Sininen väri voi aiheuttaa taustasignaalia skannauksen yhteydessä, joten se on suositeltavaa poistaa. Siirto toteutettiin BioRad Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell –laitteistolla, jolla proteiinit siirrettiin akryyliamidigeeliltä nitroselluloosamembraanille. Siirtopuskurina käytettiin Tris-glysiinipuskuria (26 mM Tris, 0,2 M Glysiini, 20 % etanoli), ja siirrossa käytettävä sähkövirta oli 0,35 A. Isompia proteiineja (~250 kb) siirrettiin 1h 45 min, ja kooltaan pienempiä proteiineja (39–110 kb) siirrettiin 1,5 h.

Siirron jälkeen nitroselluloosamembraani pestiin nopeasti TBST:llä (20 nM Tris, 0,14 M NaCl; 0,1 % Tween-20 (Fisher Scientific)) ja siirrettiin blokkipuskuriin (Immobilon®

Block - FL Fluorescent Blocker, WBAVDFL01, Millipore, Burlington MA, USA) huoneenlämpöön tunniksi pyörittäjään, jonka jälkeen membraania pidettiin kylmässä (+ 4 °C) yön yli pyörittäjässä primäärivasta-aineen vaikuttaessa, 1:1000 kaikki muut paitsi β -aktiini 1:4000 (Taulukko 1). Primäärivasta-ainelaimennokset tehtiin 5 % BSA-TBST:hen ((5 % BSA, 20 nM Tris, 0,14 M NaCl; 0,1 % Tween-20) + 0,05 % Natriumatsidi). Natriumatsidi lisättiin pidentämään laimennoksen säilyvyyttä, sitä ei lisätty sekundäärivasta-ainelaimennokseen.

Taulukko 1. Töissä käytetyt primäärivasta-aineet. a=anti.

Vasta-aine	Valmistaja	Kataloginnumero	Käytettävä pitoisuus	Proteiinin koko	Sekundääri-vasta-aine
β -Aktiini, (AC-15)	Sigma	A-1978	1:4000	42 kDa	Hiiri (a-mouse)
BRD4	Abcam	ab128874	1:1000	150 kDa	Kani (a-rabbit)
CDK7	Abcam	ab256787	1:1000	39 kDa	Kani (a-rabbit)
RNP2	BioSite	A300-653A-T	1:1000	260 kDa	Kani (a-rabbit)
RNP2pS2	BioSite	A300-654A-T	1:1000	260 kDa	Kani (a-rabbit)
RNP2pS5	BioSite	A304-408A-T	1:1000	260 kDa	Kani (a-rabbit)
RNP2pS7, klooni 4E12	Millipore	04-1570	1:1000	220 kDa	Rotta (a-rat)

Yön jälkeen membraani pestiin TBST:llä kolme kertaa 10 min., jotta päästiin eroon membraaniin sitoutumattomista proteiineista. Sen jälkeen membraani siirrettiin tummaan falconputkeen isäntälajia vastaavaan sekundäärivasta-aineeseen (1:15000) (Taulukko 2). Licor-sekundäärivasta-ainelaimennokset tehtiin myös 5 % BSA-TBST:hen (5 % BSA, 20 nM Tris, 0,14 M NaCl; 0,1 % Tween-20).

Taulukko 2. Töissä käytetyt LiCor-2. vasta-aineet.

Sekundäärivasta-aine	Valmistaja	Kataloginnumero
680 RD Donkey Anti-Mouse AB	LiCor	925-68072
Donkey Anti-Rabbit 800 CW	LiCor	925-32213
Goat Anti-Rat 800 CW	LiCor	926-32219

Sekundäärivasta-aineen annettiin vaikuttaa 1–1,5 h huoneenlämmössä pyörittäjässä, jonka jälkeen membraani pestiin TBST:llä (3×10 min.) ja lopuksi TBS:llä (20 nM Tris, 0,14 M NaCl) nopeasti. Membraani skannattiin Li-Cor Odyssey® CLx Imager -laitteella. Skannauksen jälkeen membraani pestiin TBST:llä, ja vasta-aineet irrotettiin

membraanista käsittelemällä se strippauspuskurilla (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, 46430, Thermo Scientific, USA) (RT, 10 min, pyörittäjä), jonka jälkeen membraani pestiin TBST:llä (3×10 min.) ja siirrettiin se blokkipuskuriin (RT, 1 h, pyörittäjä) tummassa falconputkessa. Tämän jälkeen membraani joko pestiin ja kuivatettiin, tai se blotattiin uudelleen kuten edellä.

3.3 BRD4-siRNA-transfektio

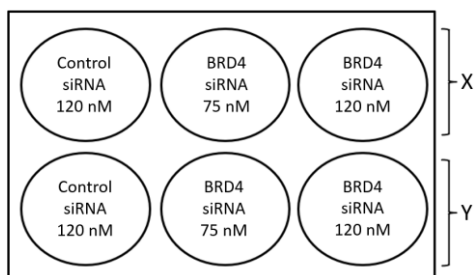
Haluttujen solulinjojen solut jaettiin yhdelle 6-kuoppalevylle (Greiner), 3 kuoppaa/solulinja. Kuoppiin jaettiin 300 000 solua/kuoppalevyn kuoppa, eli 150 000 solua/ml, solususpensio valmistettiin 10 % DMEM:iin. Tämän jälkeen kuoppalevy siirrettiin noin vuorokaudeksi lämpökaappiin (+ 37 °C). BRD4-siRNA:t (1 nmol, Qiagen) (Taulukko 3) valmisteltiin liuottamalla ne pakkauksen mukana tulleella vedellä loppukonsentraatioon 20 µM, ja siirrettiin pakastimeen (- 20 °C).

Seuraavana päivänä soluille vaihdettiin tuore lämmitetty 10 % DMEM, ja soluja inkuboitettiin lämpökaapissa (+ 37 °C) 15 min. BRD4-siRNA:t (Taulukko 3) poolattiin eli sekoitettiin yhteen. SiRNA-poolia käytettäessä saavutettiin tehokkaampi hiljennysteho, kun hiljennys kohdistettiin saman mRNA:n neljään kohtaan samanaikaisesti.

Taulukko 3. BRD4-siRNA-transfektiossa käytetyt siRNA:t ja niiden kohdesekvenssit.

siRNA	Kataloginnumero	Kohdesekvenssi
Hs_BRD4_6	SI03190845	CCG GCC TGT GAA ACC TCC AAA
Hs_BRD4_7	SI03238361	TGG CGT TTC CAC GGT ACC AAA
Hs_BRD4_8	SI04235812	AAG AGG ACA AGT GCA AGC CTA
Hs_BRD4_9	SI04307009	ATG GAC TAG AAA CTT CCC AAA
AllStars Neg. Control siRNA	1027281	AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT

SiRNA-transfektioareagenssit valmistettiin erillisissä kovamuovisissa putkissa käyttämällä L-glutamiini-DMEM:iä ja SilentFect:iä (1703361, BioRad). BRD4-siRNA-pooleja käytettiin kahdessa eri pitoisuudessaan, 75 nM ja 120 nM. Kontrolli-siRNA:n (AllStars Neg. Control siRNA, 1027281, Qiagen) pitoisuudeksi valittiin myös 120 nM. Inkuboitettiin 20 min. RT. ja tämän jälkeen lisättiin tippa kerrallaan kuoppalevyn kuoppiin soluille (Kuva 16).



Kuva 16. SiRNA-laimennosten pitoisuudet 6-kuoppalevyllä. X ja Y merkitsevät eri solulinjoja.

Kuoppalevy siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C) kuuden tunnin ajaksi, jonka jälkeen medium vaihdettiin 10 % DMEM:iin, ja levy siirrettiin takaisin lämpökaappiin. Pidempiaikainen SilentFect-altistus on haitallista soluille.

Kahden vuorokauden jälkeen kasvatusmedium vaihdettiin 0 % DMEM:iin, ja tästä vuorokauden kuluttua kuoppalevyn solut harvestoitiin 1 X SDS-puskurilla, ja näytteet säilöttiin pakastimeen (- 20 °C)

Näytteille tehtiin western blot 10 % geelillä (10 % Acryl:Bis (30:0,8) (1610158, BioRad), ajopuskurina Tris-glysiini-SDS-puskuri ja siirtopuskurina Tris-glysiinipuskuri. Membraani blotattiin BRD4-vasta-aineen lisäksi β -aktiinilla, joka toimii latauskontrollina näytteille.

3.4 Solujen kasvua mittaava koe

Halutun solulinjan solut jaettiin 96-kuoppalevyille (Greiner), 7500 solua/kuoppa, koko levy. Mahdollisimman tasaisen solumäärän saavuttamiseksi soluista tehtiin välisuspensio 10 % DMEM:iin, ja se pipetoitiin kuoppiin haravapipetillä, 100 μ l/kuoppa. Kuoppalevy siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C) vuorokaudeksi. Vuorokauden jälkeen inhibiittorilaimennokset valmistettiin 0 % DMEM:iin, ja inhibiittoreista testattiin eri pitoisuuksia (THZ1: 100 nM, 50 nM ja 20 nM, JQ1: 5 μ M; 2,5 μ M ja 1 μ M). DMSO toimi kokeessa kontrollina, ja laimeampiin inhibiittoripitoisuuksiin tasoitettiin volyyymi korkeampien pitoisuuksien kanssa yhtäläiseksi DMSO:lla. DMSO:a tuli kontrollilaimennokseen sama tilavuus verrattuna inhibiittoreihin. Kuoppalevyn kuopat tyhjennettiin haravapipetillä sarakkeittain varovasti, ja tilalle solujen päälle pipetoitiin 100 μ l/kuoppa haluttua inhibiittorilaimennosta (Taulukko 4). Välttämällä kuoppalevyn reuna-alueita pyrittiin ehkäisemään haihtumisesta johtuvia ongelmia.

Taulukko 4. Kaavio inhibiittorilaimennosten järjestyksestä 96-kuoppalevyllä.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	DMSO	THZ1	THZ1	THZ1	JQ1	JQ1	JQ1				
		100nM	50nM	20nM	5µM	2,5µM	1µM				

Kuoppalevy siirrettiin IncuCyte® S3-kuvantamislaitteeseen (Live-Cell Analysis System, Sartorius), joka ylläpitää lämpötilaa + 37 °C ja ottaa kuvia kuoppalevyjen kuopista asetetun ohjelman mukaisesti. Asetukseksi valittiin 4 kuvaa/kuoppa, ja laite aikataulutettiin ottamaan kuvia joka toinen tunti. Kolmen vuorokauden jälkeen levy poistettiin väliaikaisesti IncuCyte-laitteesta, ja inhibiittorimediumit vaihdettiin tuoreisiin varovasti poistamalla vanha ja pipetoimalla tilalle uudet laimennokset Taulukon 4 mukaisesti. Koetta jatkettiin IncuCytella vielä kolme vuorokautta, jonka jälkeen koe lopetettiin, mediumit kerättiin talteen pakastimeen (- 20 °C), ja IncuCyte-analyysi aloitettiin. IncuCyte-analyysissa sen ohjelmaa opetetaan tulkitsemaan kuvia halutunlaisesti, jonka seurauksena se käy läpi otetut kuvat, ja muodostaa tiedoista numeraalista dataa käsiteltäväksi solujen konfluenssin määrittämiseksi.

3.5 Viabiliteettikoe

Halutun solulinjan solut jaettiin 96-kuoppalevyille (Greiner), 10 000 solua/kuoppa, neljä aikapistettä: 0 h, 24 h, 48 h ja 72 h (1 levy/aikapiste), 96-kuoppalevyistä soluja jaettiin vain sarakkeisiin 2.–8. Mahdollisimman tasaisen solumäärän saavuttamiseksi soluista tehtiin välisuspensio 10 % DMEM:iin, ja se pipetoitiin kuoppiin haravapipetillä, 100 µl/kuoppa. Kuoppalevy siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C) vuorokaudeksi.

Vuorokauden jälkeen ensimmäiselle kuoppalevyille (0 h aikapiste) lisättiin kontrollikuoppa (100 µl, 10 % DMEM), ja jokaiseen soluja sisältävään kuoppaan sekä kontrollikuoppaan lisättiin 10 µl CCK-reagenssia (CK04-13, Cell Counting Kit-8, WST, Dojindo Laboratories) automaattipipetillä. CCK-reagenssin tetratsoliumsuola pelkistyy kohdatessaan solujen dehydrogenaasiaktiivisuuden, ja tämän seurauksena kuoppalevyn kuoppaan muodostuu keltainen formatsaaniväri. Väri määrä on suoraan verrannollinen solujen elinkykyisyyteen, joten mitä suurempi absorbanssi on, sitä enemmän elinkykyisiä soluja kuopassa on. Kuoppalevy siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C). Kahden tunnin

inkubaation jälkeen kuoppien absorbanssi mitattiin Victor²-laitteella (Multilabel counter, WALLAC) aallonpituudella 450 nm.

Muiden aikapisteiden kuoppalevyjä varten valmistettiin inhibiittorilaimennokset 0 % DMEM:iin eri pitoisuuksissaan (THZ1: 100 nM, 50 nM ja 20 nM, JQ1: 5 µM; 2,5 µM ja 1 µM). DMSO toimi kokeessa kontrollina, ja laimeampiin inhibiittoripitoisuuksiin tasoitettiin volyymi korkeampien pitoisuuksien kanssa yhtäläiseksi DMSO:lla. DMSO:a tuli kontrollilaimennukseen sama tilavuus verrattuna inhibiittoreihin. Kuoppalevyjen kuopat tyhjennettiin haravapipetillä sarakkeittain varovasti, ja tilalle solujen päälle pipetoitiin 100 µl/kuoppa haluttua inhibiittorilaimennosta (Taulukko 5).

Kuoppalevyille lisättiin kontrollikuopat (100 µl 0 % DMEM), jonka jälkeen ne siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C).

Taulukko 5. Viabiliteettikokeen inhibiittorilaimennokset. *K merkitsee kontrollikuoppaa, joka 0 h aikapisteen kuoppalevyllä oli 10 % DMEM:iä, ja muiden aikapisteiden kuoppalevyillä 0 % DMEM:iä. Kontrollikuopan tarkoituksena vertailussa oli osoittaa mediumin aiheuttama tausta. DMSO toimi kokeen näytteiden kontrollina.*

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	DMSO	THZ1	THZ1	THZ1	JQ1	JQ1	JQ1				
		100nM	50nM	20nM	5µM	2,5µM	1µM				
K											

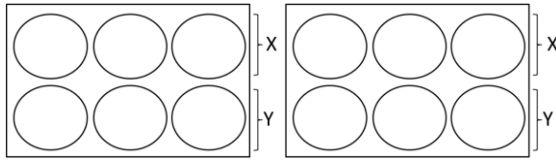
× 3

Vuorokauden kuluttua 24 h aikapisteen kuoppalevyn näytekuoppiin ja kontrollikuoppaan lisättiin 10 µl CCK-reagenssia automaattipipetillä. Mittaus suoritettiin kahden tunnin inkuboinnin (+ 37 °C) jälkeen. 48 h ja 72 h kuoppalevyille toteutettiin sama aikapisteissään.

3.6 RT-qPCR-koe

3.6.1 Solujen jakaminen kuoppalevyille

Haluttujen SCC-solulinjojen solut jaettiin 6-kuoppalevyille (Greiner) siten, että jokaista aikapistettä vastasi kolme kuoppaa/solulinja, ja SCC-soluja tuli 600 000/kuoppa, eli 300 000 solua/ml. Western blot:ia varten haluttiin kaksi aikapistettä; 24 h ja 48 h. (Kuva 17). Solut suspensoitiin 10 %:een DMEM:iin.

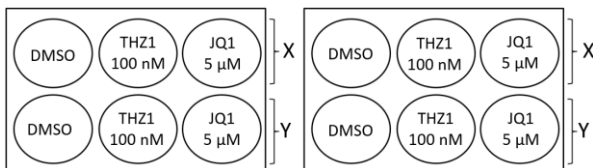


Kuva 17. RT-qPCR-menetelmää varten SCC-soluja jaettiin 6-kuoppalevyille; 600 000 solua/kuoppa, 1 kuoppalevy/aikapiste. X ja Y merkitsevät eri solulinjoja.

Tämän jälkeen kuoppalevyt siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C) noin 24 tunnin ajaksi, jonka jälkeen inhibiittorilaimennokset lisättiin.

3.6.2 Inhibiittorilaimennosten lisäys kuoppalevyille

Kun solut olivat 70–95 % konfluentit, kuopista poistettiin vanha medium, ja tilalle vaihdettiin inhibiittorilaimennokset. Inhibiittorilaimennokset tehtiin 0 % DMEM:iin eli seerumittomaan mediumiin. THZ1:n testattava pitoisuus oli 100 nM ja JQ1:n 5 µM. DMSO:a lisättiin kontrollikuoppien laimennoksiin saman tilavuuden verran inhibiittoreihin verrattuna. (Kuva 18). Mediumien vaihdon jälkeen kuoppalevyt siirrettiin lämpökaappiin (+ 37 °C).



Kuva 18. Inhibiittorilaimennosten pitoisuudet 6-kuoppalevyillä. DMSO:a tuli kuoppiin inhibiittorien kanssa vastaava tilavuus. X ja Y merkitsevät eri solulinjoja.

3.6.3 Solujen harvestointi ja RNA:n eristys

24 tunnin kuluttua ensimmäisen kuoppalevyn kuopista kerättiin medium talteen. Kuopat pestiin PBS:llä, jotta mahdollisista mediumjäämistä päästiin eroon. Jokaiseen kuoppaan tuli tämän jälkeen 450 µl RNA-eristyspuskuriä (RLT Buffer, 217604, Qiagen miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini Kit (Hilden, Saksa)). Eristyspuskuri auttaa solujen lysoinnissa ja irrotuksessa kuopan pohjasta. Raaputtimella raavittiin kuopan pohjaa kauttaaltaan, jotta solut saatiin mahdollisimman hyvin harvestoitua. Sekä medium- että solunäytteet säilöttiin pakastimeen (-20 °C).

48 h aikapisteen kuoppalevyille toteutettiin samat työvaiheet seuraavana päivänä. Sekä medium- että solunäytteet säilöttiin pakastimeen (-20 °C). Kahden tunnin jälkeen viimeisten solujen harvestoinnista näytteiden RNA eristettiin käyttämällä Qiagen Mini-eristyskittiä (217604, Qiagen miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini Kit (Hilden, Saksa)) sen ohjeiden mukaan. RNA-näytteet säilöttiin pakastimeen (-20 °C).

Seuraavana päivänä näytteiden RNA-konsentraatiot mitattiin NanoDrop-laitteella (Thermo Scientific).

3.6.4 DNAasi-käsittely

Koska Qiagenin RNA:n eristyskitti ei sisällä DNAasivaihetta, se piti tehdä erikseen näytteille ennen cDNA-synteesiä. DNAasi-käsittelyllä näytteistä pilkotaan pois mahdollinen kontaminoiva DNA, jonka jälkeen näytteet sisältävät vain RNA:ta.

Jokaisen näytteen konsentraation perusteella laskettiin jatkonäytteisiin tulevan RNA:n määrä (1 µg). Tilavuus täydennettiin 13 µl:aan DEPC-H₂O:lla. Jokaiseen jatkonäytteeseen tuli tämän lisäksi 10 X Buffer:ia (Promega M198A) ja 0,5 U RQ1 DNase:a (Promega M610A) jotta jokaisen näytteen lopputilavuudeksi tuli 15 µl. Näytteitä inkuboitiiin lämpöblokillä (+ 37 °C) 30 min, jonka jälkeen ne siirrettiin jäille. Tämän jälkeen jokaisen näytteen joukkoon sekoitettiin 1,25 mM RQ1 DNase Stop Solutionia (Promega M199A), inkuboitiiin lämpöblokillä (+65–70 °C) 10 minuuttia, spinnattiin näytehöyrystymät pois korkeista ja siirrettiin taas jäille.

3.6.5 cDNA-synteesi

CDNA-synteesissä RNA transkriptoidaan käänteisesti käänteiskopioijaentsyymillä, jotta saadaan yksiketjuista DNA:ta. Jokaiseen näytteeseen lisättiin 10 µg/ml sattumanvaraisia alukkeita (Promega C118A), inkuboitiiin lämpöblokillä (+ 65–70 °C) 5 minuuttia, spinnattiin ja siirrettiin taas jäille. Näytteisiin lisättiin tämän jälkeen cDNA-synteesiin vaadittavat komponentit seoksen muodossa (5 X M-MLV RT Buffer (Promega M531A), 2,4 mM dNTP's (Finnzymes F-550L), 200 U M-MLV RT RNase H⁻ polymerase (Promega M368B)). Täydennettiin näytteiden kokonaislopputilavuuteen (25 µl) DEPC-H₂O:lla.

cDNA-synteesi toteutettiin lämpöblokkiohjelmalla (R.T. 10 min, 42 °C 50 min, 70 °C 15 min, 4 °C pito). Tämän jälkeen näytteiden cDNA:n konsentraatio oli 40 ng/µl. Näytteistä tehtiin 1:20 laimennokset, jotka säilöttiin pakastimeen (-20 °C). Näytteistä tehtiin myös standardinäytteitä varten laimennossarja A: 10 ng/µl, B: 1 ng/µl, C: 0,1 ng/µl ja D: 0,01 ng/µl. Standardinäytteet tehtiin käyttäen kaikkia cDNA-näytteitä, ja laimennuksessa käytettiin DEPC-H₂O:ta. Myös standardinäytteet säilöttiin pakastimeen (-20 °C).

3.6.6 RT-qPCR/Taqman

Ei-koodaavien RNA:iden ekspressiota cSCC-soluissa ja supertehostajainhibiittorien vaikutusta ekspressioon tutkittiin Taqman RT-qPCR-menetelmän avulla. Menetelmän toiminta perustuu Taq-polymeraasin 5'-3'-eksonukleaasiaktiivisuuden havaitsemiseen.

Menetelmässä käytettävät koettimet ovat kaksoisleimattuja, eli ne sisältävät sekä FAM:n (fluorofori), joka sitoutuu 5'-päähän kovalentisti, ja 3'-päähän sitoutuvasta BHQ:sta (fluoresenssin vaimentaja, engl. *black hole quencher*). Taq-polymeraasin eksonukleaasiaktiivisuus saa aikaan koettimen pilkkoutumisen alukkeilla (Taulukko 6) rajatusta DNA-templaattista. Tämä pilkkoutuminen erottaa leimat toisistaan, ja havaittu fluoresenssi kuvastaa vapautuvan fluoroforin ja spesifisen DNA-templaatin määrää suoraan verrannollisesti.

Taulukko 6. Lista RT-qPCR-kokeissa käytettyjen alukkeiden ja koettimien sekvensseistä. *ACTB*, β -Aktiini.

Geeni/RNA	Sekvenssi	
<i>SERLOC</i>	Forward-aluke	5'-CCG GCC CAC TTC ATG CCT T-3'
	Reverse-aluke	5'-CAA CCT GGA TGC TGT CAC TGT-3'
	Koetin	5'-FAM-ACC TCT GAC TCG CAG CTC TCC CG-BHQ1-3'
<i>PICSAR</i>	Forward-aluke	5'-TGCCTGGACTTTCAAGAGGTAA-3'
	Reverse-aluke	5'-GCTCTCAGTCAGCAGACACTT-3'
	Koetin	5'-FAM-CCGAGCTCTGCTCTGAGGCCT-BHQ1-3'
<i>LINC7</i>	Forward-aluke	5'-CCT GCT TCC CAA TGG ACT CTT-3'
	Reverse-aluke	5'-TGT GGG CCT GGA GGG TAT-3'
	Koetin	5'-FAM-AGG CCA GGC TCA TGC CTT ACG-BHQ1-3'
<i>PRECSIT</i>	Forward-aluke	5'-CGAGGGTTGAACATTGTTGTGAC-3'
	Reverse-aluke	5'-CCACAGCTCCACCACTAGAC-3'
	Koetin	5'-FAM-AAGCAACTTAAGTGCCATCTGTGGGA-BHQ1-3'
<i>ACTB</i>	Forward-aluke	5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGC-3'
	Reverse-aluke	5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3'
	Koetin	5'-FAM-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-BHQ1-3'

Näytteistä käytettiin 1:20 cDNA-laimennoksia (2 ng/ μ l), jotka pipetoitiin 384-kuoppalevyille (FrameStar®, 4titude, 4TI-0384/C) alukkeiden (0,3 μ M; Oligomer, Helsinki, Suomi), koettimien (0,2 μ M; Oligomer, Helsinki, Suomi) ja KAPA-mix:n (2X, KK4718/PFLRKB, Roche) kanssa kokonaistilavuudessaan 10 μ l. RT-qPCR-reaktiot suoritettiin QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific) -järjestelmällä Turussa Funktionaalisen genomiikan keskuksessa. Kaikille näytteille tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä, ja lisäksi ajoissa oli mukana negatiivinen kontrolli, jossa templaatin

tilalla oli DEPC-H₂O:ta. Tulokset normalisoitiin β -aktiinin mRNA:lla (Taulukko 6), ja ne käsiteltiin Excel-tilastointiohjelmalla.

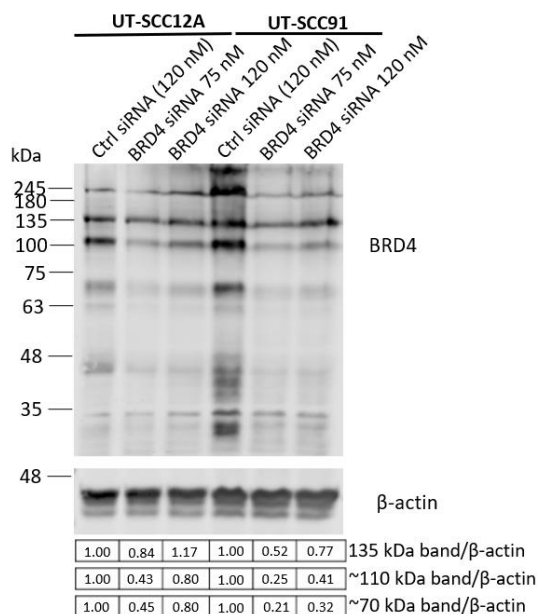
3.7 Tilastolliset menetelmät

Tulosten analysoimisessa, sekä niiden tilastollisten arvojen tarkastelussa ja merkitsevyyksien laskemisessa käytettiin Excel-tilastointiohjelmaa. Tilastolliset merkitsevyydet laskettiin Studentin t-testillä, ja tilastollisesti merkitsevä vaikutus ilmoitettiin p-arvon ollessa alle 0,05.

4 Tulokset

4.1 BRD4-siRNA-transfektioilla varmistettiin spesifi BRD4-bandi

UT-SCC12A- ja UT-SCC91-solulinjojen soluille tehtiin BRD4-siRNA-transfektio, ja kahden eri BRD4-siRNA-pitoisuuksien (75 nM ja 120 nM) vaikutuksia verrattiin 120 nM kontrolli-siRNA:aan (AllStars Neg. Control siRNA, 1027281, Qiagen). BRD4-vasta-aine (Abcam, ab128874) tunnistaa western blot:ssa membraanille useita bandeja, joten tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, mitä bandia voidaan pitää spesifinä. Kahdella cSCC-solulinjalla saatujen tulosten perusteella nähtiin, että kontrolli-siRNA:aan verrattuna useiden bandien signaali väheni. Tutkituista bandeista noin 100 kDa:n bandissa havaittiin β -aktiiniin verrattaessa suurin BRD4:n hiljentyminen UT-SCC12A-soluilla (57 % väheneminen 75 nM BRD4-siRNA:lla), ja BRD4:n hiljentyminen oli suurin puolestaan noin 70 kDa:n bandissa UT-SCC91-soluilla (79 % väheneminen 75 nM BRD4-siRNA:lla). Erot olivat verrattain vähäiset näiden kahden bandin välillä, 75 nM BRD4-siRNA:lla kahden bandin signaalin ero oli UT-SCC12A-solulinjalla 0,02 ja UT-SCC91-solulinjalla 0,04. Noin 100 kDa:n bandia voidaan pitää spesifinä BRD4:lle, sillä se on eniten hiljentyneistä bandeista lisäksi lähimpänä BRD4:n teoreettista kokoa (150 kDa). Käytetyistä siRNA-pitoisuuksista 75 nM toimi koeasetelmassa parhaiten. (Kuva 19).

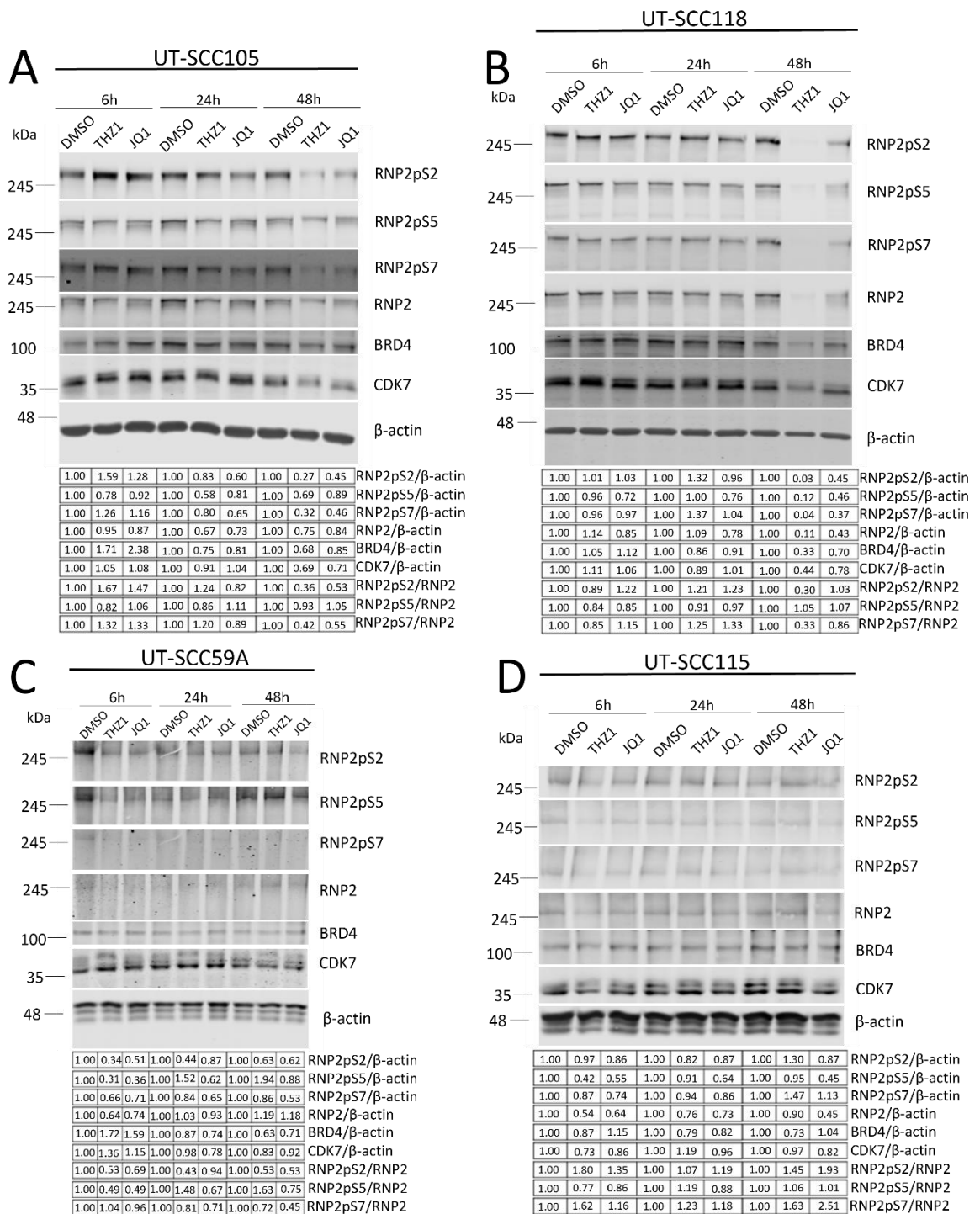


Kuva 19. BRD4-siRNA-transfektio cSCC-solulinjoilla. cSCC-solut transfektoitiin joko kontrolli-siRNA:lla tai BRD4-siRNA:n eri pitoisuuksilla ja solut harvestoitiin 72 h aikapisteessä. Kontrolli-siRNA:aan verrattuna ja lähimpänä teoreettista kokoa (150 kDa) vastaavana bandina suurin

hiljentyminen tapahtui ~110 kDa:n bandissa. β -aktiini toimi kokeessa latauskontrollina. Kokomarkkerina BlueStar Plus Prestained Protein.

4.2 Ihon okasolusyöpäsoluista todistettiin löytyvän SE-inhibiittorien kohdeproteiinit BRD4 ja CDK7, ja SE-inhibiittorien havaittiin vähentävän RNAP II:n seriinien fosforylaatiota

Eri cSCC-solulinjojen soluille tehtiin supertehostajainhibiittorikokeita käsittelemällä soluja inhibiittoreilla THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μ M) seerumittomassa kasvatusmediumissa 6, 24 ja 48 tuntia, ja näytteitä tutkittiin western blot:illa. Kokeilla pyrittiin selvittämään inhibiittorikäsittelyjen vaikutus soluissa tapahtuvaan RNA-polymeraasi II:n C-terminaalisen osan (CTD) seriinien fosforylaatioon, ja varmistamaan, että tutkittavissa cSCC-soluissa ilmennetään inhibiittorien kohdeproteiineja CDK7:aa ja BRD4:ää. CDK7 vaikuttaa seriinien 5 ja 7 fosforylointiin (Ebmeier ja muut 2017), ja BRD4:ää pidetään epätavallisena seriini 2:n fosforylaation aiheuttajana (Devaiah ja muut 2012), joten odotuksena oli havaita kyseisten seriinien fosforylaation esto SE-inhibiittorin vaikuttaessa fosforylaation mahdollistavaan kohdeproteiiniin. Kaikista tutkittavista cSCC-solulinjoista löydettiin inhibiittorien kohdeproteiinit, ja molemmilla inhibiittoreilla nähtiin vaihteleva inhiboiva vaikutus kaikilla solulinjoilla seriinien fosforylaatioon – JQ1 (BRD4-inhibiittori) ja THZ1 (CDK7-inhibiittori) inhiboivat tulosten perusteella molemmat kaikkien seriinien fosforylaatiota. Sekä JQ1:lla että THZ1:llä vaikutus primaaristen ei-metastaattisten cSCC-solulinjojen UT-SCC105 ja UT-SCC118 seriinien fosforylaation estoon oli tehokkainta 48 h aikapisteessä, kun taas metastaattisten solulinjojen UT-SCC59A ja UT-SCC115 kohdalla suurin inhibitiivoikutus nähtiin jo 6 h aikapisteessä. (Kuva 20).

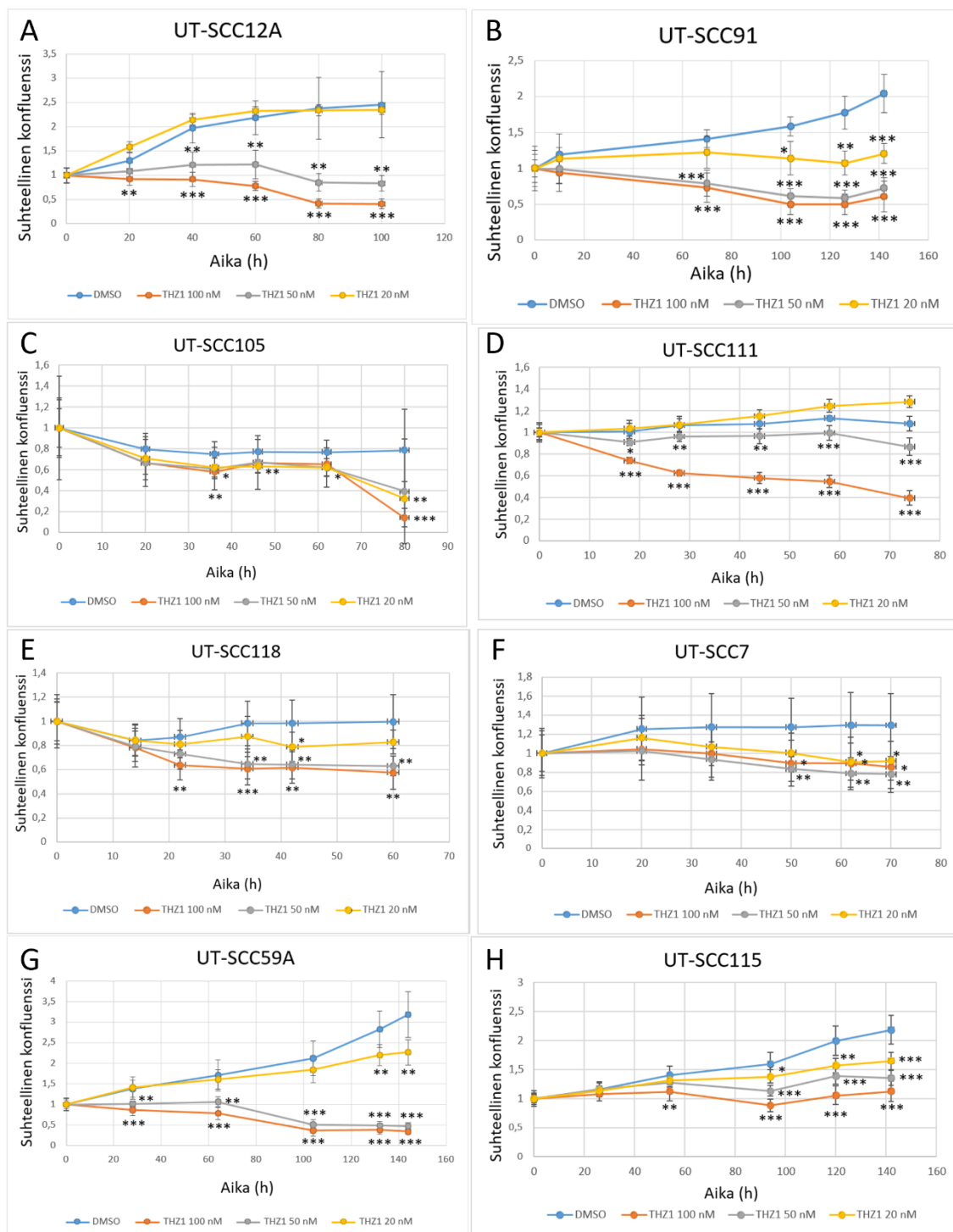


Kuva 20. Supertehostajainhibiittorien THZ1:n ja JQ1:n vaikutus RNA-polymeraasi II:n C-terminaalisen osan seriinien 2, 5 ja 7 fosforylaation inhibitioon eri cSCC-solulinjoilla (A-D) eri aikapisteissä. Solut käsiteltiin inhibiittorilaimennoksilla (THZ1 100 nM, JQ1 5 μM) tai DMSO:lla, joka toimi kokeessa näytekontrollina. 48 h aikapisteen inhibiittorilaimennokset vaihdettiin uusiin 24 h kohdalla. Kokeessa varmistettiin myös BRD4- ja CDK7-proteiinien ilmentyminen soluissa. Kaikkia tuloksia verrattiin β-aktiiniin, joka toimi näytteiden latauskontrollina, ja seriinien fosforylaation tasoa verrattiin lisäksi RNA-polymeraasin kokonaismäärään. Kokomarkkerina BlueStar Plus Prestained Protein.

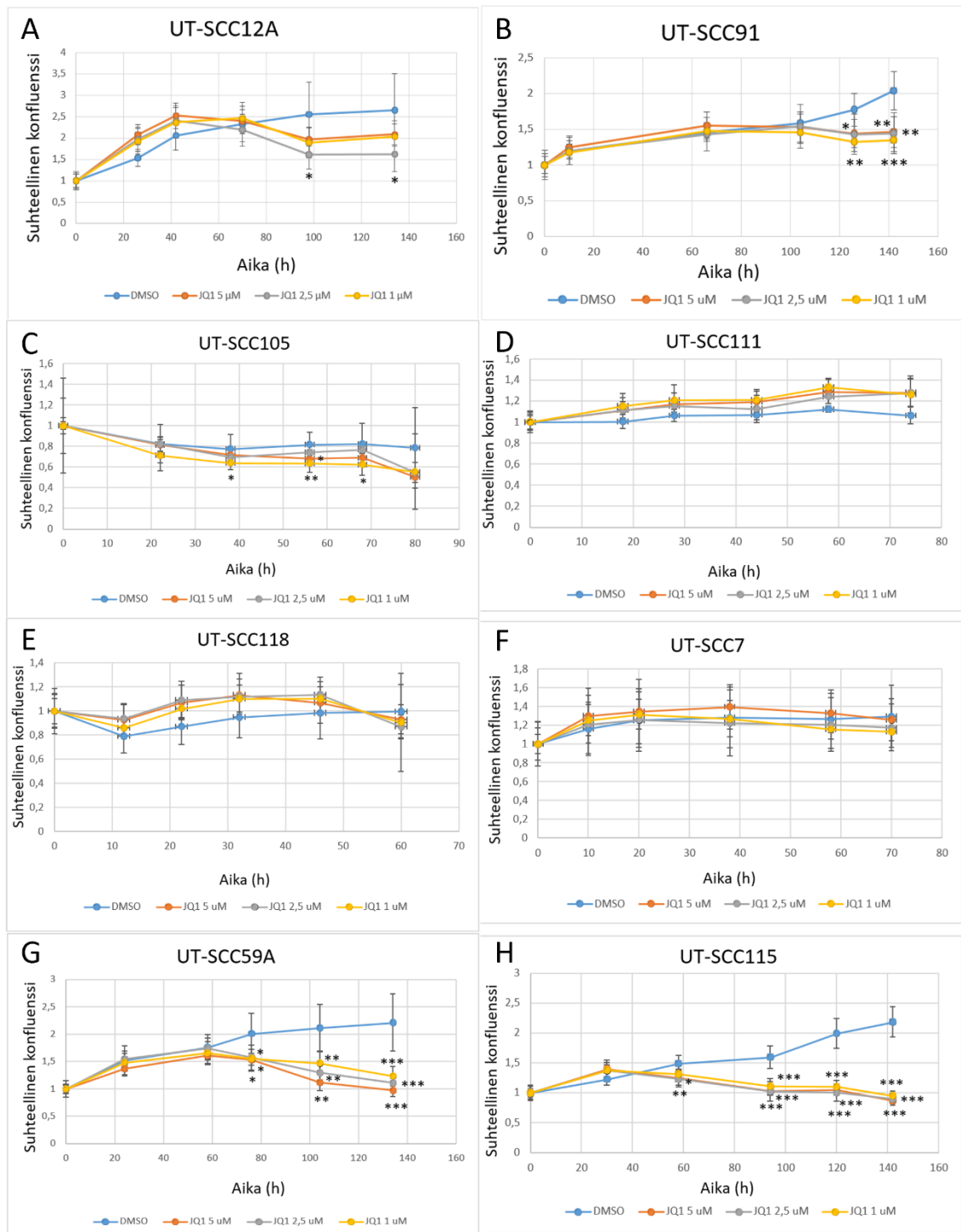
4.3 THZ1 vähensi kaikkien tutkittujen ihon okasolusyöpäsolujen kasvua annosvasteisesti, ja JQ1:n kasvua hillitsevä vaikutus näkyi myöhemmissä aikapisteissä

Supertehostajainhibiittorien vaikutusta UT-SCC-solujen kasvuun tutkittiin IncuCyte® S3-kvantamislaitteella (Live-Cell Analysis System, Sartorius). SE-inhibiittorilaimennosten yhteydessä soluille vaihdettiin seerumiton kasvatusmedium. Uudet inhibiittorilaimennokset vaihdettiin kuoppalevyille kolmen vuorokauden jälkeen kokeen aloittamisesta, ja koetta jatkettiin vielä kolmen vuorokauden ajan. Inhibiittoreilla käsiteltyjä soluja verrattiin DMSO:lla käsiteltyihin soluihin.

THZ1-supertehostajainhibiittorilla nähtiin annosvasteinen vaikutus cSCC-solujen kasvuun pitoisuuksilla 20 nM, 50 nM ja 100 nM. Merkitsevä vaikutus havaittiin kaikilla tutkituilla cSCC-solulinjoilla. (Kuva 21). Supertehostajainhibiittori-JQ1:lla tutkittiin pitoisuuksia 1 µM; 2,5 µM ja 5 µM. Merkitsevä inhibiitiovaikutus havaittiin solulinjoilla UT-SCC12A, UT-SCC91, UT-SCC105, UT-SCC59A, ja UT-SCC115. Kasvun inhibiitio tapahtui myöhemmissä aikapisteissä, ja THZ1:een verrattuna vaikutus oli useilla cSCC-solulinjoilla heikompi. (Kuva 22).



Kuva 21. Supertehostajainhibiittori-THZ1:n vaikutus cSCC-solujen (A-H) kasvuun eri pitoisuuksissaan. Solut käsiteltiin inhibiittorilaimennoksilla tai DMSO:lla, joka toimi kokeessa näytekontrollina, ja inhibiittorilaimennokset vaihdettiin uusiin kolmen vuorokauden kohdalla. Kokeen etenemistä seurattiin IncuCyte® S3-kuvantamislaitteella (Live-Cell Analysis System, Sartorius). $N=4-8$. Tilastolliset merkitsevyydet * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (Studentin t -testi).

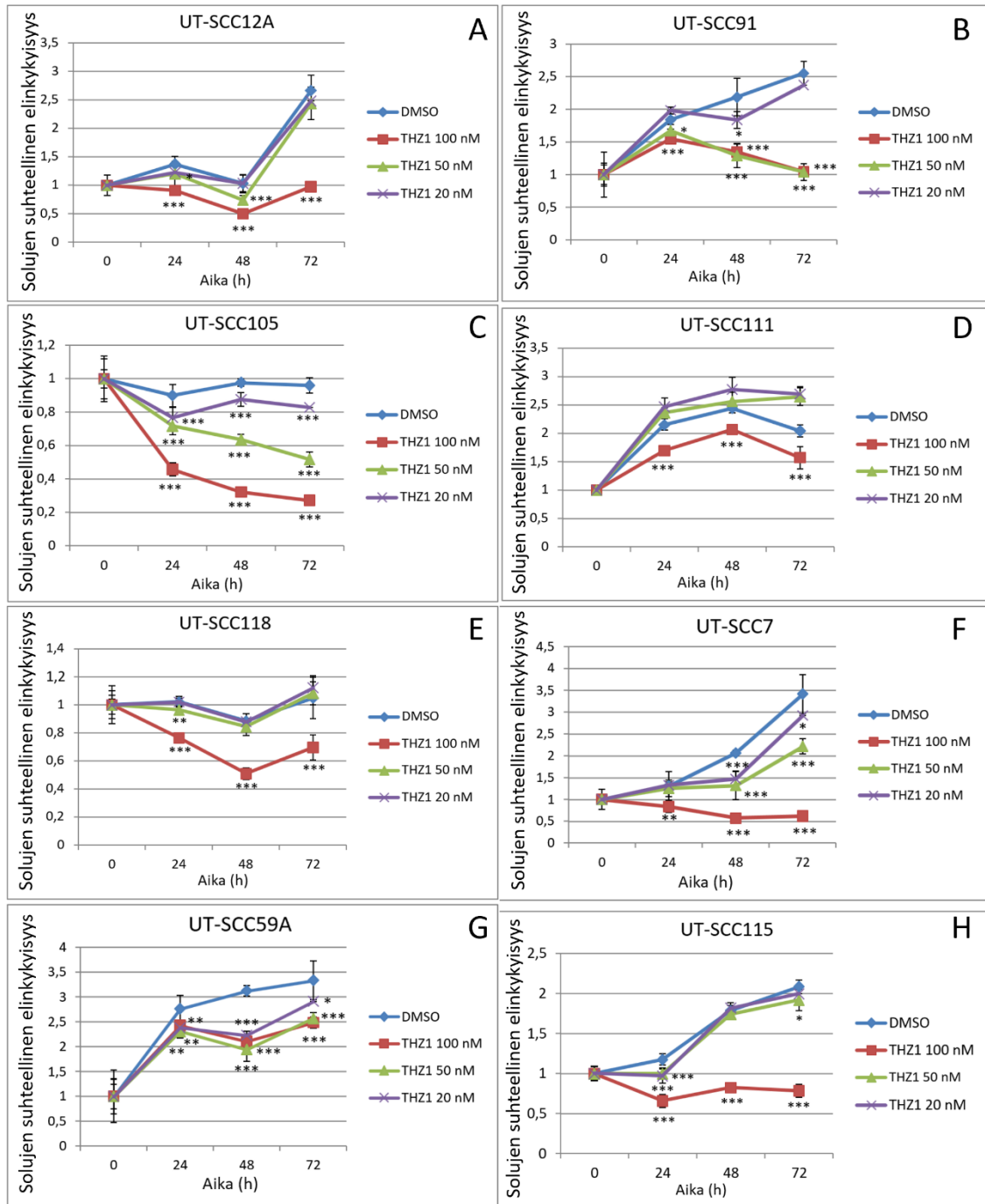


Kuva 22. Supertehostajainhibiittori-JQ1:n vaikutus cSCC-solujen (A-H) kasvuun eri pitoisuuksissaan. Solut käsiteltiin inhibiittorilaimennoksilla tai DMSO:lla, joka toimi kokeessa näytekontrollina, ja inhibiittorilaimennokset vaihdettiin uusiin kolmen vuorokauden kohdalla. Kokeen etenemistä seurattiin IncuCyte® S3-kuvantamislaitteella (Live-Cell Analysis System, Sartorius). $N=4-8$. Tilastolliset merkitsevyydet * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ (Studentin t -testi).

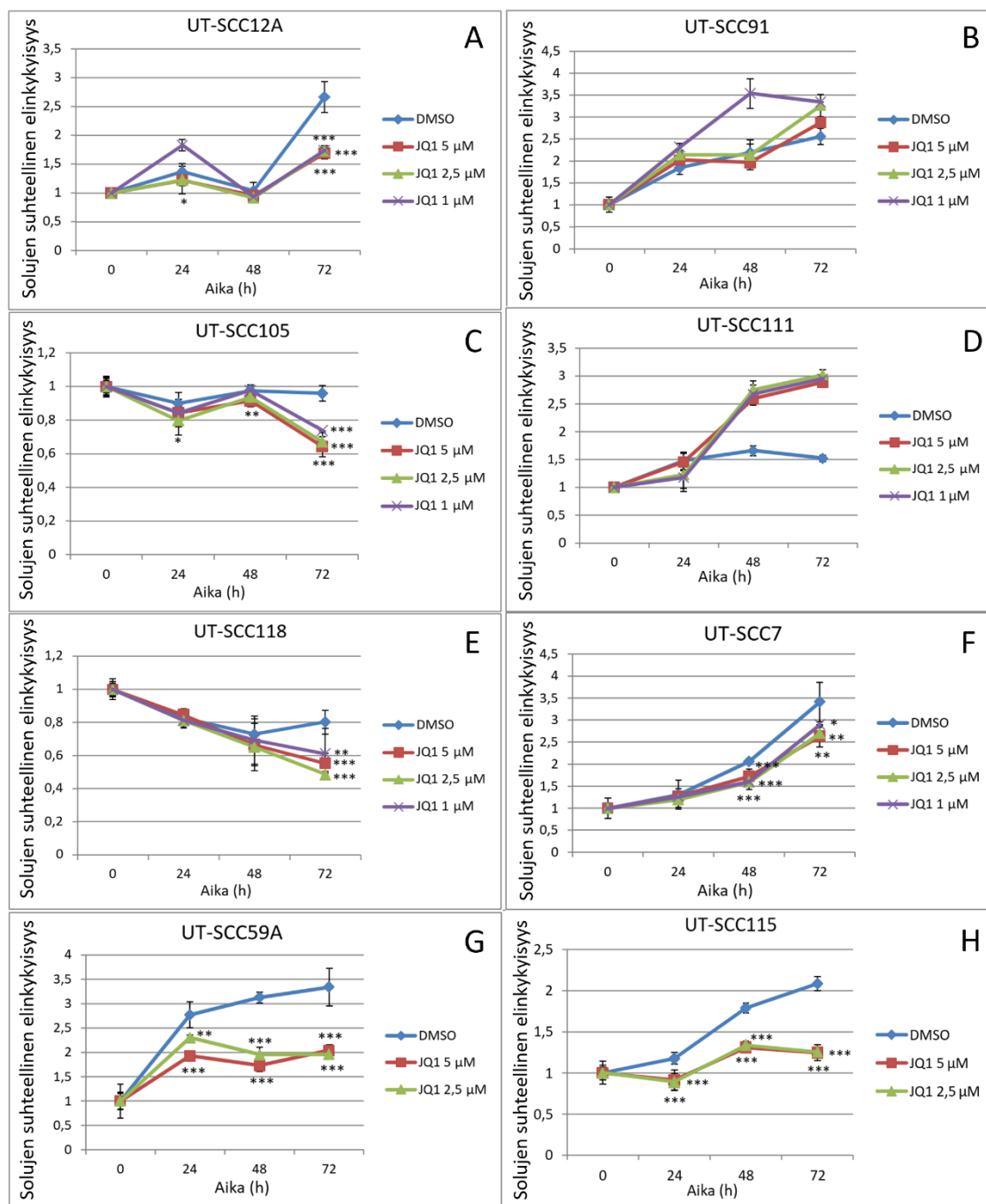
4.4 THZ1 ja JQ1 heikensivät ihon okasolusyöpsösolujen elinkykyisyyttä

Supertehostajainhibiittoreiden vaikutusta UT-SCC-solulinjojen solujen elinkykyisyyteen tutkittiin käsittelemällä soluja SE-inhibiittoreilla eri pitoisuuksissaan. SE-inhibiittorilaimennosten yhteydessä soluille vaihdettiin seerumiton kasvatusmedium, CCK-reagenssi lisättiin, ja absorbanssi mitattiin Victor²-laitteella aallonpituudella 450 nm. Inhibiittoreilla käsiteltyjä cSCC-soluja verrattiin DMSO:lla käsiteltyihin soluihin.

Tuloksissa THZ1:n osalta havaittiin useiden cSCC-solulinjojen kohdalla annosvasteista elinkykyisyyden heikentymistä, ja vaikutus oli tilastollisesti merkitsevä jokaisella tutkitulla solulinjalla (Kuva 23). JQ1:llä ei puolestaan ollut vaikutusta UT-SCC91- ja UT-SCC111-solulinjojen solujen elinkykyisyyteen, mutta solulinjoilla UT-SCC12A, UT-SCC105, UT-SCC118, UT-SCC7, UT-SCC59A ja UT-SCC115 inhibition vaikutukset olivat tilastollisesti merkitsevät. JQ1:n vaikutus elinkykyisyyden estoon oli korkein 48 h:n ja 72 h:n aikapisteissä tutkituilla cSCC-soluilla, ja metastaattisten solulinjojen UT-SCC59A ja UT-SCC-115 osalta inhibiatiovaikutus havaittiin jo 24 h aikapisteen kohdalla. (Kuva 24).



Kuva 23. Supertehostajainhibiittori-THZ1:n vaikutus cSCC-solujen (A-H) elinkykyisyyteen eri pitoisuuksissaan. Solut käsiteltiin inhibiittorilaimennoksilla tai DMSO:lla, joka toimi kokeessa näytekontrollina. Tutkimuksessa käytettiin CCK-reagenssia (CK04-13, Cell Counting Kit-8, WST, Dojindo Laboratories), ja absorbanssi mitattiin Victor²-laitteella (Multilabel counter, WALLAC) aallonpituudella 450 nm. N=8. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Studentin t-testi).

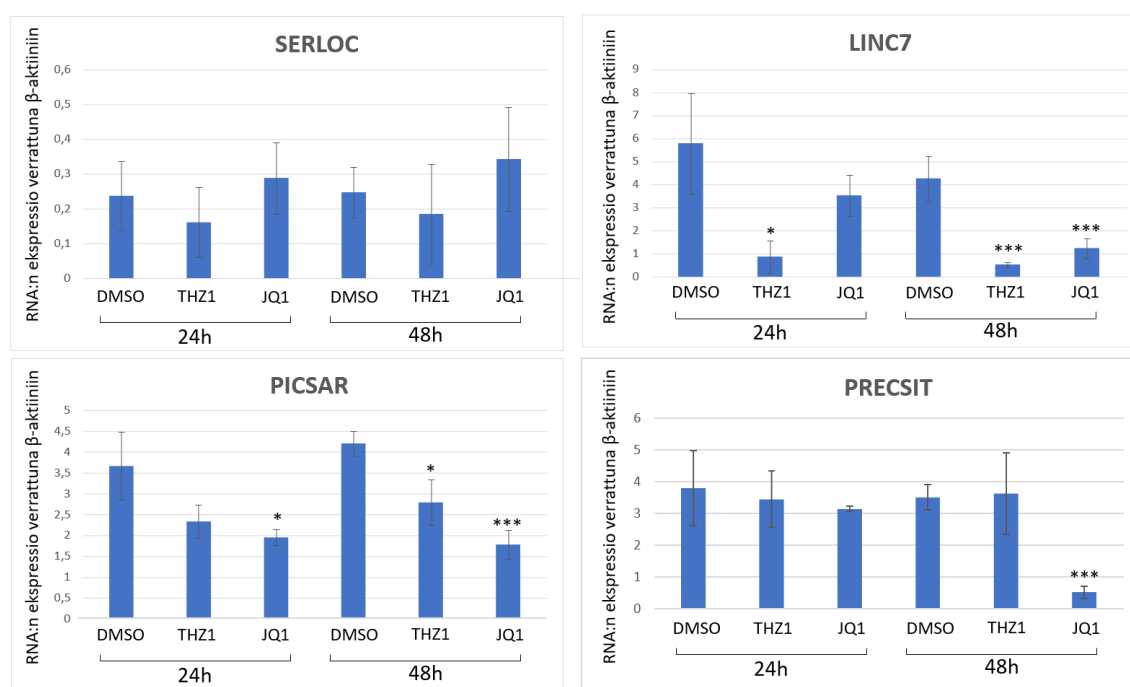


Kuva 24. Supertehostajainhibiittori-JQ1:n vaikutus cSCC-solujen (A-H) elinkykyisyyteen eri pitoisuuksissaan. Solut käsiteltiin inhibiittorilaimennoksilla tai DMSO:lla, joka toimi kokeessa näytekontrollina. Tutkimuksessa käytettiin CCK-reagenssia (CK04-13, Cell Counting Kit-8, WST, Dojindo Laboratories), ja absorbanssi mitattiin Victor²-laitteella (Multilabel counter, WALLAC) aallonpituudella 450 nm. N=8. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Studentin t-testi).

4.5 Supertehostajaestäjät vähensivät pitkien ei-koodaavien RNA:iden ilmentämistä ihon okasolusyöpäsoluissa

RT-qPCR:llä tutkittiin cSCC-solulinjoissa ilmennettävien tutkimuksen kohteena olevien lncRNA:iden ekspressiotasoa, ja supertehostajainhibiittorien vaikutusta ekspressiotasoihin tutkittiin kahdessa aikapisteessä (24 h ja 48 h). Tulokset normalisoitiin β -aktiinilla, ja kaikkia näytteitä oli kolme rinnakkaista.

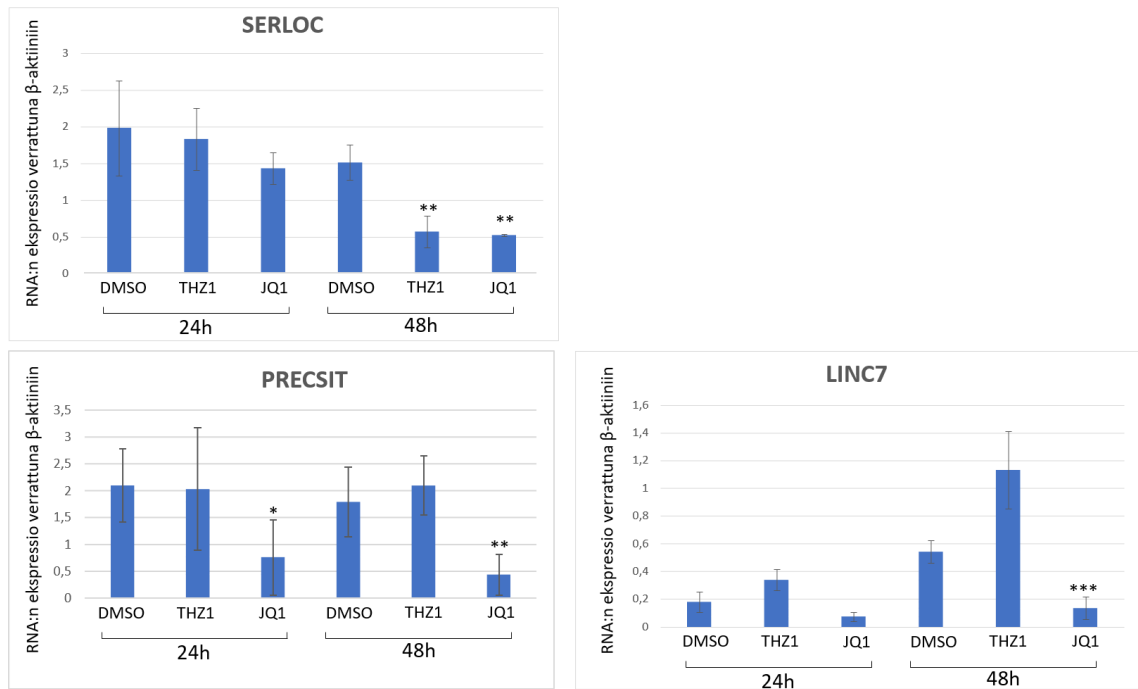
UT-SCC12A-solulinjan soluissa ilmenetään kaikkia tutkittuja lncRNA:ita, mutta SERLOC:n osalta ekspressiotasot olivat matalammat, ja SE-inhibiittoreilla ei havaittu merkitsevää vaikutusta ekspression vähenemiseen. THZ1 vähensi LINC7:n ekspressiota molemmissa aikapisteissä merkitsevästi, ja JQ1:n merkitsevä vaikutus näkyi 48 h aikapisteessä. JQ1 vähensi PICSAR:n ilmentymistä molemmissa aikapisteissä merkitsevästi, ja THZ1:n merkitsevä inhibiitiovaikutus näkyi 48 h aikapisteessä. PRECSIT:n ekspressio väheni merkitsevästi JQ1:n vaikutuksesta 48 h aikapisteessä. (Kuva 25).



Kuva 25. UT-SCC12A-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μ M) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimi näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, näytteiden ekspressiotasoa verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).

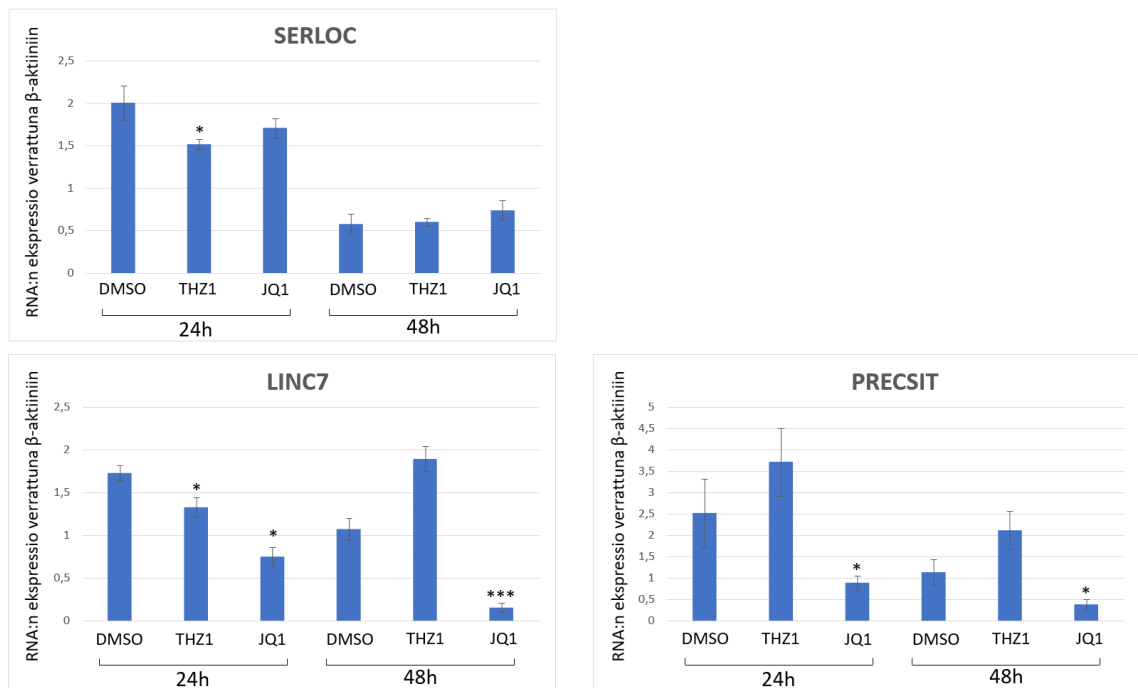
UT-SCC91-solulinjan soluissa ilmenetään SERLOC:ia, PRECSIT:iä ja LINC7:aa. SERLOC:n ekspressio väheni molempien SE-inhibiittorien vaikutuksesta 48 h aikapisteessä. JQ1 inhiboi PRECSIT:n ekspressiota molemmissa aikapisteissä

merkitsevästi, ja LINC7:n ekspressio väheni JQ1:n vaikutuksesta molemmissa aikapisteissä, joista merkitsevä vaikutus havaittiin 48 h aikapisteessä. (Kuva 26).



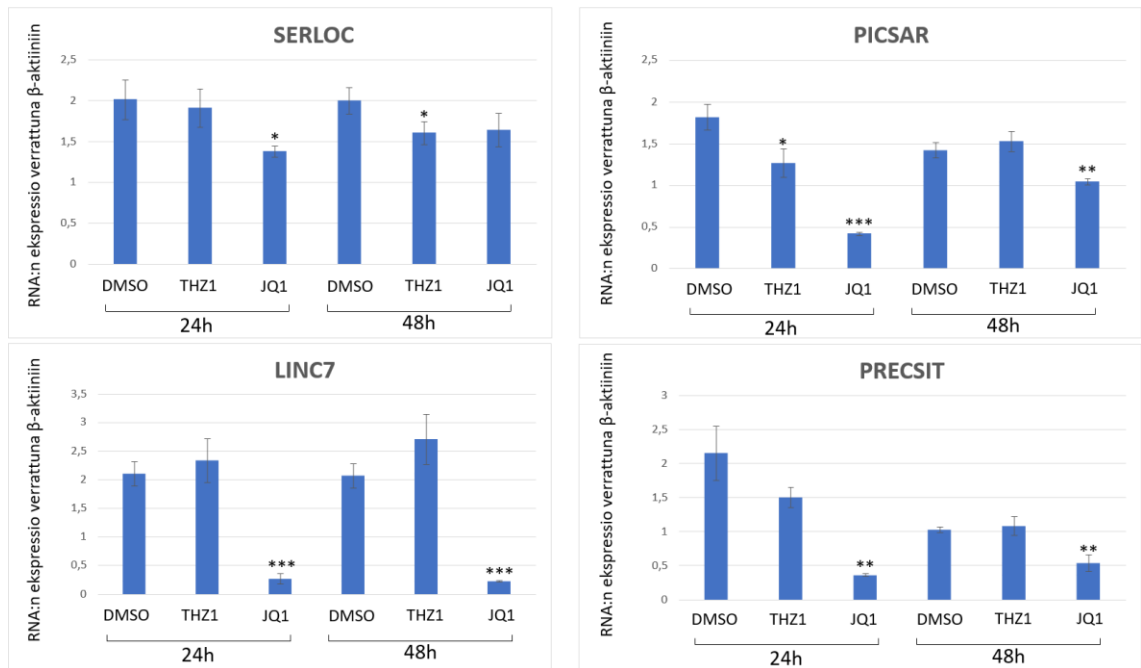
Kuva 26. *UT-SCC91-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μM) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimi näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, näytteiden ekspressiotasoja verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).*

UT-SCC105-solulinjan soluissa ekspressoidaan SERLOC:ia, LINC7:aa ja PRECSIT:iä. SERLOC:n ekspressio väheni merkitsevästi THZ1:n vaikutuksesta 24 h aikapisteessä, ja 48 h aikapisteessä sillä ei ollut vaikutusta ekspressioon DMSO:hon verrattuna. LINC7:n ekspressio väheni molemmilla SE-inhibiittoreilla 24 h aikapisteessä, ja 48 h aikapisteessä JQ1 inhiboi sen ekspressiota merkitsevästi. PRECSIT:n ekspressio väheni JQ1:n vaikutuksesta merkitsevästi molemmissa aikapisteissä. (Kuva 27).



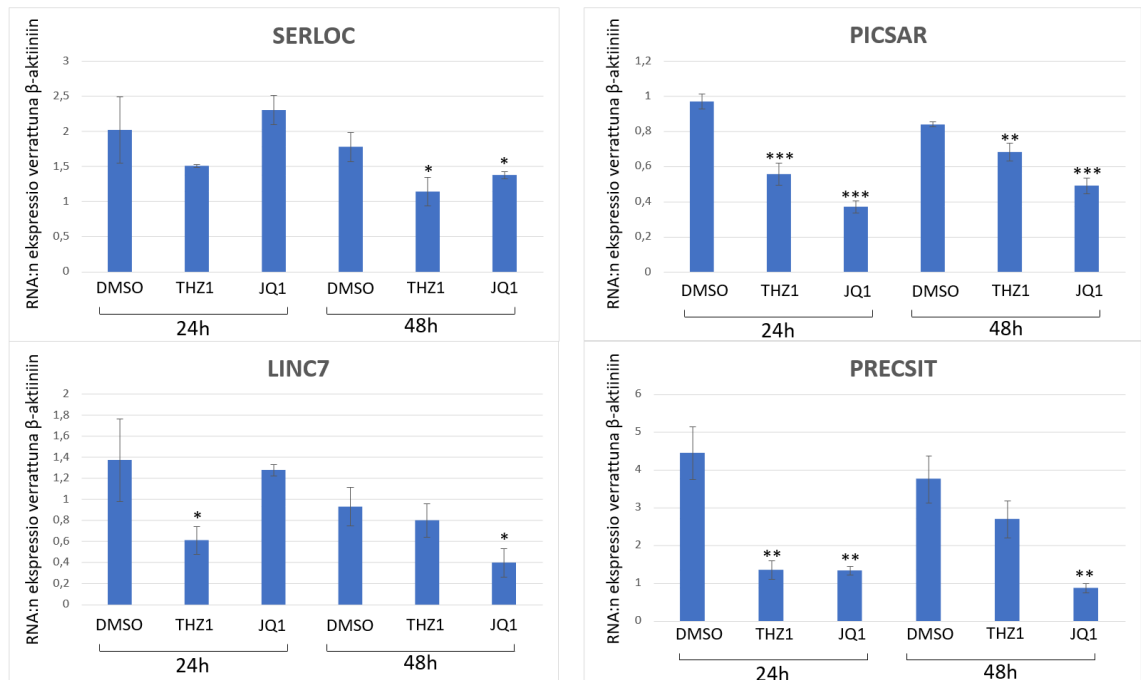
Kuva 27. UT-SCC105-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μ M) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimi näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$, näytteiden ekspressiotasoa verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).**

UT-SCC111-solinjan soluissa ilmennetään kaikkia tutkittuja lncRNA:ita. SERLOC:n ekspressio väheni merkitsevästi JQ1:llä 24 h aikapisteessä, ja THZ1:llä 48 h aikapisteessä. PICSAR:n ekspressiotasojen lasku havaittiin 24 h aikapisteessä THZ1:n vaikutuksesta, ja JQ1:llä oli vaikutusta molempien aikapisteiden osalta ekspression vähenemiseen. Sekä LINC7:n ja PRECSIT:n ekspressio väheni merkitsevästi JQ1:n vaikutuksesta molemmissa aikapisteissä. (Kuva 28).



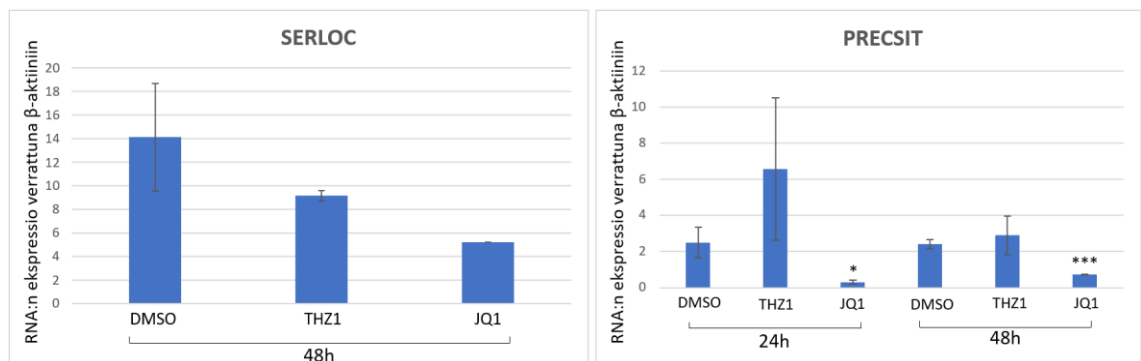
Kuva 28. *UT-SCC111-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μ M) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimi näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001, näytteiden ekspressiotasoja verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).*

UT-SCC118-solulinjan soluissa ilmennetään kaikkia tutkittuja lncRNA:ita. SERLOC:n ekspressio väheni 48 h aikapisteessä merkitsevästi molempien SE-inhibiittorien vaikutuksesta. PICSAR:n ekspressiotaso oli UT-SCC118-solulinjalla matalampi muihin lncRNA:ihin verrattuna, ja se väheni molemmissa aikapisteissä molempien SE-inhibiittorien vaikutuksesta merkitsevästi. LINC7:n ekspressio väheni merkitsevästi THZ1:n vaikutuksesta 24 h aikapisteessä, ja JQ1:n vaikutuksesta 48 h aikapisteessä. PRECSIT:n ekspressio väheni merkitsevästi molemmilla SE-inhibiittoreilla 24 h aikapisteessä, ja 48 h aikapisteessä molemmat SE-inhibiittorit laskivat ekspressiota, JQ1 merkitsevästi. (Kuva 29).



Kuva 29. *UT-SCC118-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μM) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimi näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, näytteiden ekspressiotasoja verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).*

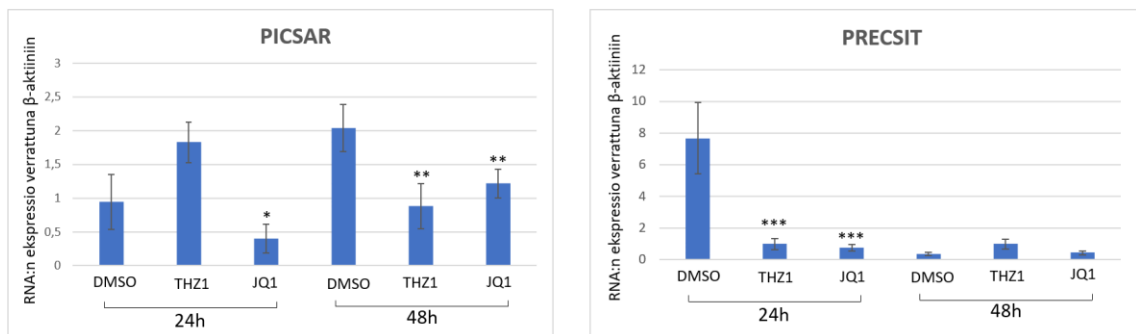
UT-SCC7-solulinjan soluissa ilmennetään tutkimustulosten mukaan SERLOC:ia ja PRECSIT:iä. SERLOC:n ekspression väheneminen näkyi 48 h aikapisteessä molemmilla SE-inhibiittoreilla, mutta erot eivät olleet merkitsevät. JQ1 vähensi PRECSIT:n ekspressiota merkitsevästi molemmissa aikapisteissä. (Kuva 30).



Kuva 30. *UT-SCC7-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μM) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimi näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, näytteiden ekspressiotasoja verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).*

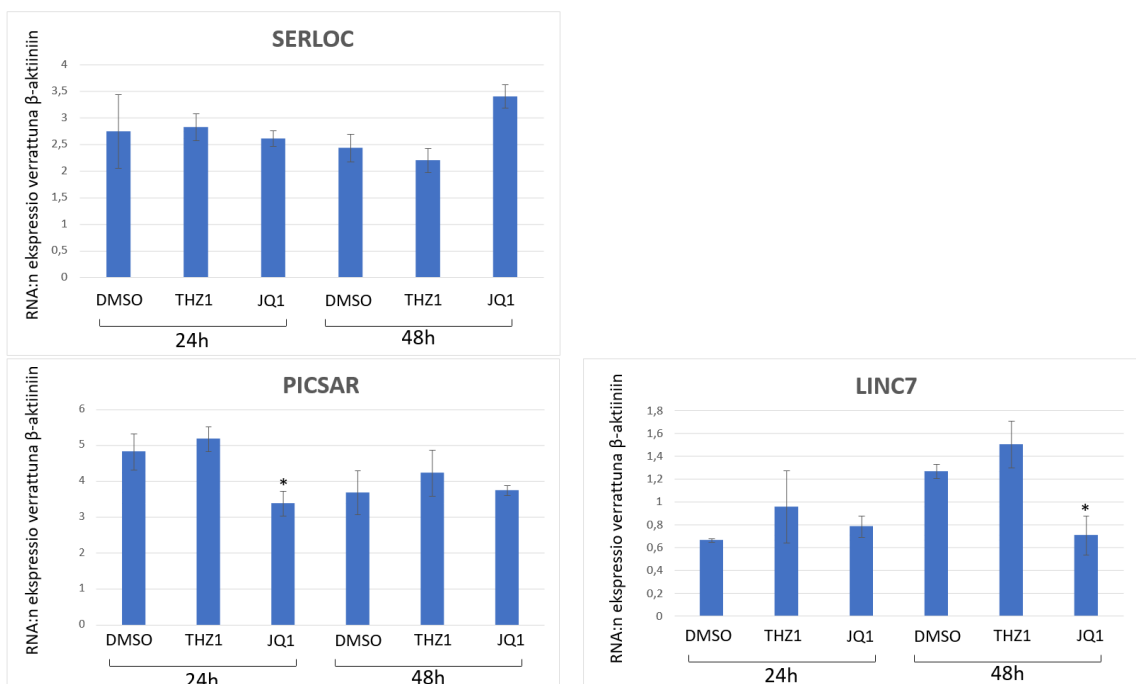
UT-SCC59A-solulinjan soluissa ilmennetään PICSAR:ia ja PRECSIT:iä. PICSAR:n ekspressio väheni merkitsevästi 24 h aikapisteessä JQ1:n vaikutuksesta, ja 48 h aikapisteessä molemmat SE-inhibiittorit vaikuttivat ekspression vähenemiseen

merkitsevästi. PRECSIT:n ekspressiotasot laskivat merkitsevästi molempien SE-inhibiittorien vaikutuksesta 24 h aikapisteessä, ja 48 h aikapisteessä merkitsevyyksiä ei saavutettu vertailuarvon lähestyessä nollaa. (Kuva 31).



Kuva 31. *UT-SCC59A-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μM) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimii näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, näytteiden ekspressiotasoja verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).*

UT-SCC115-solulinjan soluissa ilmennetään SERLOC:ia, PICSAR:ia ja LINC7:aa. PICSAR:n ekspressiotaso laski merkitsevästi 24 h aikapisteessä JQ1:n vaikutuksesta, ja JQ1 vähensi myös LINC7:n ekspressiota merkitsevästi 48 h aikapisteessä. (Kuva 32).



Kuva 32. *UT-SCC115-soluissa ekspressoituvat lncRNA:t ja supertehostajainhibiittorien THZ1 (100 nM) ja JQ1 (5 μM) vaikutus niiden ekspressiotasoihin eri aikapisteissä. DMSO toimii näytteiden kontrollina. N=3. Tilastolliset merkitsevyydet * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, näytteiden ekspressiotasoja verrattu saman aikapisteen DMSO:hon. (Studentin t-testi).*

5 Tulosten tarkastelu

Käytettäville cSCC-solulinjojen soluille tehtiin tutkimuksia etsien niistä onkogeenista transkriptiota mahdollistavia supertehostaja-alueita, jolloin supertehostajainhibiittoreilla voitaisiin nähdä solujen kasvua hillitsevä vaikutus. Western blot:illa tutkittiin supertehostaja-alueiden välittäjäkompleksien CDK7:n ja BRD4:n ilmentymistä cSCC-soluissa, sekä THZ1:n ja JQ1:n estävää vaikutusta RNA-polymeraasi II:n seriinien fosforylaatiota kohtaan. Taqman-analyysillä saavutettiin tuloksia siitä, että pitkiä ei-koodaavia RNA-molekyylejä ekspressoidaan tutkituissa cSCC-solulinjoissa, ja voitiin tehdä yhteenvetoa siitä, miten voimakkaasti mitään pitkää ei-koodaavaa RNA-molekyyliä ekspressoidaan missäkin cSCC-solulinjassa, ja miten SE-inhibiittorit säätelevät kyseenomaisia pitkiä ei-koodaavia RNA:ita. Solujen kasvua mittaavissa kokeissa ja elinkykyisyyttä mittaavissa viabiliteetikokeissa nähtiin annosvasteista ihon okasolusyöpäsolujen kasvun vähenemistä ja elinkykyisyyden heikkenemistä supertehostajainhibiittorien käytön yhteydessä.

5.1 Tulosten perusteella spesifi BRD4-bandi on noin 100 kDa ihon okasolusyöpäsolulinjoissa

BRD4-siRNA-transfektiokokoon tarkoituksena oli ensisijaisesti varmistaa siRNA:n toimivuus, jotta sitä voisi käyttää myös jatkossa inhibiittorikokeiden yhteydessä varmistamaan SE-inhibition spesifisyyttä. Tavoitteena oli myös selvittää, mikä western blotissa BRD4-vasta-aineella saatavista monista bandeista kuvastaa todella BRD4:ää. Tuloksena saatiin selkeästi heikompi signaali vähän yli 100 kilodaltonin (kDa) bandissa verrattuna kontrolli-siRNA:lla käsiteltyyn näytteeseen, mikä indikoi sen bandin olevan yhteydessä BRD4:ään. Tämä tulos oli jatkotutkimusten kannalta merkittävä, koska käytetyn BRD4-vasta-aineen useat bandit membraanilla ovat aiheuttaneet tuloksissa tulkinnanvaraa, ja koska BRD4:n proteiinikoon on ilmoitettu olevan 150 kDa, mutta näissä cSCC-soluilla tehtävissä tutkimuksissa vähän yli 100 kDa:n bandi on usein antanut parhaimman signaalin muihin bandeihin verrattuna. Mielenkiintoista lisäksi on, että pienempien proteiinien osalta on myös selkeästi nähtävissä vähenemistä BRD4-siRNA:lla käsitellyissä näytteissä verrattuna kontrolli-siRNA:an, mikä kertoo myös niiden osallisuudesta BRD4:n rakenteessa. Lisäksi huomioitavaa oli, että BRD4:n hiljennys ei toteutunut käytetyillä soluilla (UT-SCC12A ja UT-SCC91) samanlaisesti, eikä hiljennys ollut kokonaisvaltainen kummassakaan solulinjan soluissa. Käytetyistä siRNA-pitoisuuksista 75 nM vaikutti tuottavan parhaimman tuloksen, joten sitä voidaan käyttää jatkossakin.

5.2 Ihon okasolusyöpäsoluista osoitettiin löytyvän SE-inhibiittorien kohdeproteiinit BRD4 ja CDK7, ja supertehostajainhibiittorien havaittiin vähentävän RNAP II:n seriinien fosforylaatiota

Kokeen tarkoituksena oli varmistaa, että UT-SCC-solulinjojen soluissa ilmennetään BRD4- ja CDK7-proteiineja, jotka toimivat tärkeänä osana transkription säätelyä, ja joihin supertehostajainhibiittorit JQ1 ja THZ1 vaikuttavat. Kokeessa tutkittiin myös SE-inhibiittorien kykyä vaikuttaa RNA-polymeraasi II:n C-terminaalisen osan seriinien 2, 5 ja 7 fosforylaation estoon. CDK7:n pitäisi vaikuttaa seriinien 5 ja 7 fosforylaatioon, ja CDK7:n avulla CDK9 puolestaan fosforyloi seriini 2:n (Ebmeier ja muut 2017). Lisäksi on näyttöä siitä, että BRD4 toimisi epätyypillisenä kinaasina fosforyloidien seriini 2:n (Devaiah ja muut 2012).

Kokeissa saatujen tulosten mukaan kaikissa tutkituissa cSCC-solulinjoissa ilmennetään BRD4- ja CDK7-proteiineja, joihin käytettävät SE-inhibiittorit voisivat vaikuttaa. Kokeessa havaittiin myös selkeää RNA-polymeraasi II:n seriinien fosforylaation estymistä molempien SE-inhibiittorien osalta. Oli mielenkiintoista, että saatujen western blot-tulosten mukaan JQ1 (BRD4-inhibiittori) vaikutti seriini 2:n lisäksi myös muiden seriinien fosforylaation estoon cSCC-soluissa, mikä puolestaan viittaa BRD4:n osallisuuteen myös muiden seriinien fosforylaatiossa. JQ1 estää BRD4:n vuorovaikutusta p-TEFb:n kanssa (Jung ja muut 2014), joka aktivoituna fosforyloi seriini 2:n (Fisher 2019). Tämän vuorovaikutuksen estäminen voisi siis lisäksi toimia mekanismina seriini 2:n fosforylaation estossa, mutta ongelmaksi kuitenkin muodostuu CDK7:n muodostaman CAK-kompleksin ja TFIIH:n yhdessä mahdollistama p-TEFb:n aktivointi (Fisher 2019), jonka vaikutuksesta seriini 2 fosforyloituu, ja toimii siten JQ1:tä vastaan, mikä voisi selittää tuloksissa ilmennyt JQ1:n osittaista tehottomuutta seriini 2:n fosforylaation estossa. THZ1:llä (CDK7-inhibiittori) puolestaan olisi teoriassa mahdollisuus vaikuttaa kaikkien kolmen seriinin fosforylaation estoon (Ebmeier ja muut 2017), mutta BRD4:n fosforyloidissa samanaikaisesti seriini 2:tä joko suoraan kuten on näytetty (Devaiah ja muut 2012) tai p-TEFb:n aktivoimisen kautta, seriini 2:n osalta fosforylointi tapahtuu THZ1:tä vastaan. 48 h aikapisteissä kuitenkin nähdään tehokas inhibitio vastavaikutuksista huolimatta kaikkien seriinien fosforylaatiossa primaarisilla ei-metastaattisilla solulinjoilla UT-SCC105:lla ja UT-SCC118:lla, mikä viittaa SE-inhibiittorien solujen kasvua ja elinkykyisyyttä heikentäviin vaikutuksiin ja transkriptiokoneiston toiminnan merkityksellisyyteen. Metastaattisilla solulinjoilla UT-SCC59A:lla ja UT-SCC115:lla puolestaan inhibitiovaikutukset ovat merkittävimmät

kauttaaltaan 6 h aikapisteessä, ja vaikutus näyttää heikkenevän ajan edetessä. Olisi mielenkiintoista tutkia inhibiittorien toimintaa yhdessä, jolloin odotuksena olisi havaita tehokas seriinien fosforylaation esto, sillä kumpikaan komplekseista ei tällöin pääsisi vaikuttamaan taustalla fosforylaatioon toisen inhibiittorin estävää vaikutusta vastaan.

Kokeessa RNA-polymeraasin seriinien fosforylaatiota ja tutkittujen BRD4- ja CDK7-proteiinien signaalia verrattiin β -aktiiniin, joka toimi näytteiden latauskontrollina. Seriinien fosforylaatiota verrattiin myös totaali-RNA-polymeraasiin, joka koetulosten perusteella on myös SE-inhibiittoreiden säätelemä. Tästä syystä totaali-RNA-polymeraasi ei toimi tässä koeasetelmassa halutunlaisena vertailukohteenä, ja saadut tulokset tukevat BRD4:n ja CDK7:n odotettuja toimintamekanismeja seriinien fosforylaation osalta myös cSCC-soluissa, ja sitä kautta ne myös vahvistavat SE-inhibiittorien merkityksen cSCC:n hoitomahdollisuuksien kehittämisessä (Devaiah ja muut 2012; Ebmeier ja muut 2017).

5.3 THZ1 vähensi kaikkien tutkittujen ihon okasolusyöpäsolujen kasvua annosvasteisesti, ja JQ1:n kasvua hillitsevä vaikutus näkyi myöhemmissä aikapisteissä

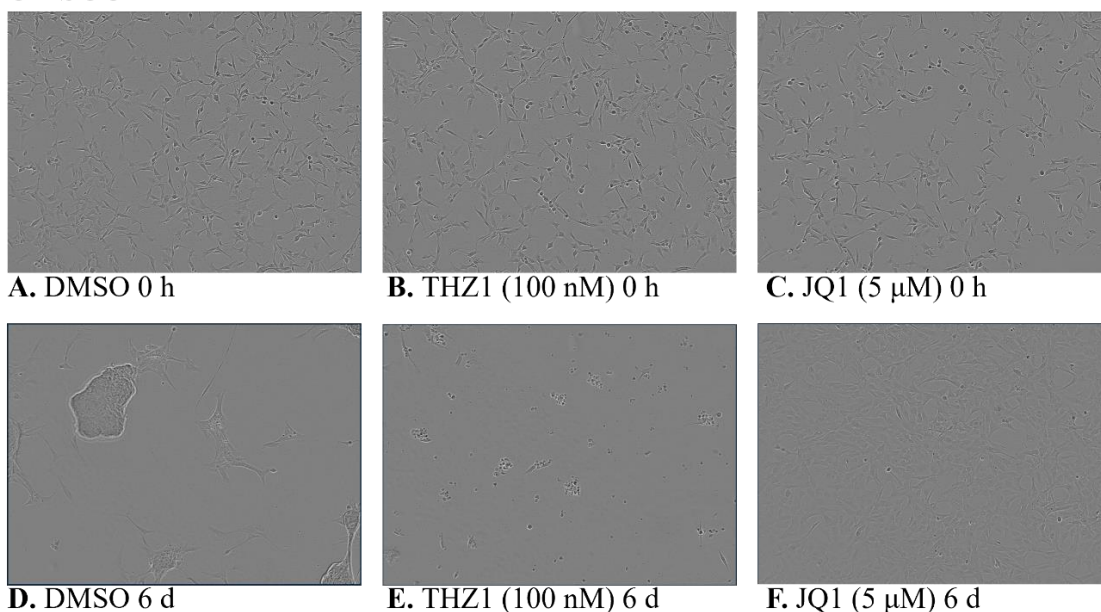
Keskeisenä ongelmana solujen kasvua mittaavien kokeiden suorittamisessa oli solujen kasvuun liittyvät ongelmat, sillä monen solulinjan kontrollisoluilla (DMSO:lla käsitellyt solut) ei havaittu kasvua, mutta koska selkeää laskua solujen määrässä ei nähty, tulosta voitiin pitää positiivisena varsinkin THZ1:n osalta kaikilla tutkituilla cSCC-solulinjoilla. THZ1:llä käsitellyissä cSCC-soluissa nähtiin tehokas annosvasteinen vaikutus solujen kasvun heikkenemiseen, mikä tukee pään ja kaulan alueen SCC:ssä (HNSCC) saatuja tuloksia (Ge ja muut 2022), joissa THZ1 vähensi p53-mutatoituneiden HNSCC-solujen kasvua, invaasiota ja liikkumista. Lisäksi ei-pienisoluisen keuhkosyövän osalta on näytetty THZ1:n edistävän solujen apoptoosia ja tukahduttavan solujen kasvua (J. Wang ja muut 2020), mikä tukee myös näissä kokeissa saatuja tuloksia.

JQ1:llä käsiteltyjen solujen osalta kaikilla cSCC-solulinjoilla ei näiden tutkimustulosten osalta havaittu vaikutusta solujen kasvuun, ja yleisesti inhibitio näkyi vasta myöhemmissä aikapisteissä. Erityisen hyvä inhibitio JQ1:llä havaittiin metastaattisilla solulinjoilla UT-SCC59A ja UT-SCC115, mikä oli kiinnostavaa. On näyttöä JQ1:n toiminnasta ruokatorven SCC:ssä (ESCC), jossa BRD4:n eston havaittiin vähentävän proliferaatiota, mutta edistävän myös voimakkaasti solujen liikkumista epiteelimesenkymaalista siirtymää lisäten, ja samassa tutkimuksessa havaittiin JQ1:n tehostavan

ESCC-solujen autofagiaa (Yang ja muut 2022). Lisäksi hiirimalleilla on näytetty autofagian inhiboinnin puolestaan hillitsevän olemassa olevien tuumoreiden kasvua ja lisäävän syövän hoidon vastetta (Amaravadi ja muut 2019). On mahdollista, että myös cSCC-soluissa BRD4:n inhibointi JQ1:llä edistää autofagiaa, joka osaltaan voi olla soluille haitallista etenkin myöhemmissä aikapisteissä, ja osaltaan tehostaa cSCC:n aggressiivisuutta erityisesti primaarisilla ei-metastaattisilla cSCC-soluilla, kuten lisääntyneen autofagian on osoitettu cSCC:ssä aiheuttavan (Sivridis ja muut 2011). Tulosten perusteella olisi viitteitä uskoa BRD4:n olevan kriittinen erityisesti metastaattisten solulinjojen kuten UT-SCC59A:n ja UT-SCC115:n soluille.

Huomioitavaa on, että IncuCyte ei ole optimaalisin menetelmä varsinkaan tutkittaessa päällekkäin kasvavia soluja. IncuCyte mittaa vain kuopan peittyneitä pinta-alaa, joten se ei huomioi morfologisia muutoksia tai korkeutta kasvavia solurykelmiä, joissa soluja voi olla hyvin paljon suhteessa peittyneeseen pinta-alaan. Kiinnostava huomio on lisäksi se, että myös DMSO häiritsee cSCC-solujen kasvua ja se voi muuttaa solujen morfologiaa (Kuva 33), jolloin käsiteltyjä soluja voisi olla hyödyllistä verrata jatkossa myös käsittelemättömiin soluihin. Saatujen tutkimustulosten mukaan kaikki cSCC-solulinjat eivät ole kuitenkaan yhtä herkkiä DMSO:n vaikutukselle. Lisäksi seerumittoman mediumin aikaansaamat kasvuolosuhteet voivat olla epäsuotuisimmat hitaammin kasvaville cSCC-solulinjoille.

UT-SCC111



Kuva 33. Solujen kasvua mittaavassa kokeessa UT-SCC111-solut lähtötilanteessa (A-C) ja kuuden vuorokauden kohdalla (D-F). THZ1 häiritsee solujen kasvua ja saa ne irtoamaan kuoppalevyn pohjasta. DMSO:lla käsitellyt solut muodostavat tiiviitä korkeutta kasvavia

solurykelmiä, joiden solumäärää IncuCyte:lla ei voida havaita, ja tyhjää pinta-alaa on paljon suhteessa JQ1:llä käsiteltyihin soluihin.

Tuloksissa on huomioitava myös, että kolmen vuorokauden kohdalla toteutetun inhibiittorilaimennosten vaihdon yhteydessä irronneet solut poistettiin vanhan mediumin mukana kuoppalevyiltä, mikä näkyi selkeänä pudotuksena solujen määrässä. Tämä osoittaa, että IncuCyte huomioi kaikki kuoppien kiinnittyneet solut huolimatta siitä, ovatko ne oikeasti enää elinkykyisiä. Koska SE-inhibiittorit vaikuttivat cSCC-solujen kasvuun, voidaan olettaa solujen kasvun olevan supertehostajien säätelemää cSCC-soluilla.

5.4 THZ1 ja JQ1 vähensivät ihon okasolusyöpäsolujen elinkykyisyyttä

Supertehostajainhibiittorien vaikutusta eri UT-SCC-solulinjojen solujen elinkykyisyyteen tutkittiin vertaamalla supertehostajainhibiittori-käsiteltyjä soluja DMSO:lla käsiteltyihin soluihin, ja THZ1:llä havaittiin selkeä annosvasteinen vaikutus kaikissa tutkituissa cSCC-soluissa. JQ1:llä inhibiatiovaikutus näkyi jälleen selkeämmin myöhemmissä aikapisteissä, ja metastaattisilla UT-SCC59A- ja UT-SCC115-soluilla vaikutus oli huomattava. Viabiliteettikokeissakin tekniset ongelmat kohdistuivat solujen kasvun ongelmiin kuoppalevyllä, ja vaikka solujen jakaminen kuoppalevyille tapahtui huolellisesti sekoitetun solususpension kautta, solumäärät kuoppien välillä vaihtelivat hieman. Jokaista näytettä oli kahdeksan rinnakkaista, mikä puolestaan tuki tulosten luotettavuutta.

Solujen kasvua ja elinkykyisyyttä mittaavissa kokeissa THZ1 vaikutti selkeästi cSCC-solujen toiminnan heikentymiseen, mikä viittaa CDK7:n merkittävään osallisuuteen solusyklin ja transkription säätelijänä. *In vitro*-kokeiden tulokset vahvistavat CDK7:n inhibition toimivan muiden syöpien kuten maksasolusyövän (G. Xie ja muut 2022) ja munasarjasyövän (Zeng ja muut 2018) osalta myös cSCC-soluissa kasvua ja elinkykyisyyttä heikentävänä tekijänä. JQ1:n toiminta puolestaan perustuu sen kykyyn hillitä syövän kasvua ja invaasiota edistävien geenien ekspressiota, mikä selittäisi kasvun ja elinkykyisyyden heikentymisen myöhemmissä aikapisteissä. On näyttöä JQ1:n toiminnasta eturauhassyövän invaasion estäjänä (L. Wang ja muut 2020), ja saadut tulokset cSCC-solujen osalta vaikuttavat lupaavilta erityisesti metastaattisten solulinjojen suhteen.

5.5 Pitkien ei-koodaavien RNA:iden ilmentäminen väheni SE-inhibiittorien vaikutuksesta kaikissa ihon okasolusyöpäsolulinjoissa

RT-qPCR:llä tutkittiin supertehostajainhibiittoreiden THZ1:n (CDK7-inhibiittori) ja JQ1:n (BRD4-inhibiittori) vaikutuksia pitkien ei-koodaavien RNA:iden, SERLOC:n, PICSAR:n, PRECSIT:n ja LINC7:n ekspressiotasoihin valituissa cSCC-solulinjoissa, sillä niiden on aiemmin näytetty yliekspressoituvan cSCC-soluissa, ja on viitteitä niiden mahdollisesta hyödyntämisestä terapeuttisina kohteina cSCC:n hoidossa (Piipponen ja muut 2016, 2022; Piipponen, Nissinen, Riihilä, ja muut 2020). Tuloksena havaittiin lncRNA:iden ilmentymisen vähenemistä eri cSCC-solulinjojen soluissa niille toteutettavan SE-inhibiittorikäsittelyn seurauksena. Erityisesti JQ1 vaikutti lncRNA:iden ilmentymisen estoon tehokkaasti kaikkien lncRNA:iden osalta lukuun ottamatta SERLOC:ia, jonka ekspressio kuitenkin väheni kolmella solulinjalla, UT-SCC91:llä, UT-SCC111:llä ja UT-SCC118:lla. PRECSIT:n osalta inhibitio oli JQ1:llä merkitsevä jokaisessa sitä ekspressoivassa cSCC-solulinjassa, ja erityisesti metastaatilla solulinjoilla UT-SCC7 ja UT-SCC59A inhibitiivaikutus oli huomattava. JQ1:n vaikutus LINC7:n ekspression vähentämisessä oli kaikilla sitä ekspressoivilla solulinjoilla merkitsevä, ja erityisesti primaarisilla ei-metastaattisilla cSCC-solulinjoilla UT-SCC12A, UT-SCC91, UT-SCC105 ja UT-SCC111 teho oli huomattava. Kuten on näytetty akuutin myelooisen leukemian osalta (Bhagwat ja muut 2016), voidaan tulosten valossa vahvasti olettaa, että myös cSCC:ssä BRD4:n vuorovaikutus välittäjäkompleksin kanssa häiriintyy JQ1:n vaikutuksesta, jolloin geenispesifinen transkription aktivoituminen estyy, ja onkogeenien ekspressio vähenee.

THZ1:n vaikutus lncRNA:iden ekspression vähentämisessä oli JQ1:een verrattuna heikompi kauttaaltaan cSCC-solulinjoissa, mutta SERLOC:n osalta sen ilmentämistä vähentävä vaikutus oli JQ1:n kanssa tasavertainen, ja SERLOC:n ekspressio väheni THZ1:n vaikutuksesta merkitsevästi myös UT-SCC105-solulinjalla. Oli mielenkiintoista huomata, että THZ1:n vaikutuksesta PICSAR:n ekspressio kasvoi aikapisteiden välillä kaikilla primaarisilla ei-metastaattisilla cSCC-solulinjoilla, joissa sitä ekspressoitiin (UT-SCC12A, UT-SCC111 ja UT-SCC118) mutta laski kaikilla metastaatilla cSCC-solulinjoilla, joissa sitä ekspressoitiin (UT-SCC59A ja UT-SCC115). Tämä havainto voisi olla selitettävissä mahdollisesti sillä, että THZ1:n on havaittu aiheuttavan p38 α :n vähentynyttä ekspressiota, ja sitä kautta vähentävän MYC:n transkription aktiivisuutta, jolla on puolestaan solukasvua vähentävä vaikutus ei-pienisoluisessa keuhkosyöpässä (J. Wang ja muut 2020). PICSAR puolestaan yliekspressoituu cSCC-soluissa vähentyneen

p38 α :n seurauksena (Piipponen ja muut 2016), joten on loogista, että THZ1 vaikuttaa PICSAR:n ekspressioon näin. Samankaltainen vaikutus THZ1:llä havaittiin myös LINC7:n osalta, mutta erot eivät rajoittuneet metastasointiasteeseen, vaan aikapisteiden välillä kasvanutta ekspressiota havaittiin kaikilla LINC7:aa ekspressoivilla solulinjoilla paitsi UT-SCC12A:lla, jossa LINC7:n ekspressiotasot olivat myös muita solulinjoja korkeammat. DMSO:lla käsiteltyihin soluihin verrattuna THZ1:llä oli kuitenkin merkitsevää inhibiatiovaikutusta sekä PICSAR:n että LINC7:n ekspressioon, mikä vahvistaa CDK7:n merkityksen onkogeeniselle transkriptiolle myös cSCC:ssä, kuten aiemmin on osoitettu akuutin lymfaattisen leukemian osalta (Kwiatkowski ja muut 2014). Molempien SE-inhibiittoreiden lncRNA:iden ekspressiota vähentävä vaikutus cSCC-soluissa havaittiin, joten tulokset ovat johdonmukaisia verrattuna artikkelissa (Zheng ja muut 2020) esitettyyn malliin pienimolekyylisten inhibiittoreiden hyödyntämisessä onkogeenisien transkription mahdollistavien välittäjäkompleksien estämisessä.

Supertehostajasäädelyjä lncRNA:ita on tutkittu eri syövissä, ja tutkimuksen kohteena olevien lncRNA:iden, PICSAR:n ja SERLOC:n on aiemmin osoitettu olevan supertehostajasäädelyjä. PICSAR:n on näytetty olevan supertehostajan säätelmä ja toimivan edistävänä tekijänä virtsarakon syövässä ja sen kehitymisessä (X. Wang ja muut 2020), ja SERLOC:n on puolestaan näytetty olevan supertehostajasäädely ruokatorven SCC:ssä (Q. Wang ja muut 2020) ja ihon SCC:ssä (Piipponen ja muut 2022). SERLOC:n on havaittu edistävän cSCC:n invaasiota lisäämällä matriksimetalloproteiinaasien 1 ja 13 tuottoa cSCC-soluissa (Piipponen ja muut 2022), ja kuten kyseisessä tutkimuksessa osoitettiin, myös tämän tutkimuksen tulosten osalta voidaan sanoa SERLOC:n ekspressoituvan voimakkaammin metastaattisilla solulinjoilla UT-SCC7 ja UT-SCC115, mikä viittaa SERLOC:n olevan oleellinen tekijä cSCC:n kehitymisessä.

Koska supertehostajainhibiittorit JQ1 ja THZ1 vaikuttivat pitkien ei-koodaavien RNA:iden ilmentymisen vähenemiseen ihon okasolusyöpäsoluissa, voidaan sanoa tutkimuksen kohteena olleiden pitkien ei-koodaavien RNA:iden, PICSAR:n, PRECSIT:n, SERLOC:n ja LINC7:n olevan supertehostajien säätelyn alaisia – SERLOC vahvistetusti ihon SCC:ssä kuten aiemmin on näytetty (Piipponen ja muut 2022), PICSAR ihon SCC:ssä virtsarakon syövän (X. Wang ja muut 2020) lisäksi, ja sekä PRECSIT että LINC7 uusina löydöksinä supertehostajasäädelyinä lncRNA:ina ihon okasolusyövässä. Tulosten perusteella voidaan myös osoittaa, että eri lncRNA:iden

ilmentymisen tasot vaihtelevat cSCC-solulinjakohtaisesti, ja kaikissa cSCC-solulinjoissa ei ilmennetä samoja lncRNA:ita.

5.6 Yhteenveto tuloksista

UT-SCC-solulinjoilla toteutettujen kokeiden perusteella voidaan sanoa, että cSCC-soluissa ilmennettävät CDK7- ja BRD4-proteiinit ovat oleellisia cSCC-solujen toiminnan kannalta, sillä niiden inhibiointi johtaa solujen kasvun heikkenemiseen ja elinkykyisyyden menettämiseen. Tulosten perusteella nähdään kuitenkin myös, miten erilaisia cSCC-solulinjat ovat keskenään, ja toistaiseksi on vaikeaa yhdistää tiettyä tekijää, joka vaikuttaisi soluissa THZ1- tai JQ1-herkkyyteen. THZ1 heikentää jokaisella tutkitulla solulinjalla kasvua ja elinkykyisyyttä, kun taas JQ1 inhiboi niitä vaihtelevasti. JQ1 puolestaan estää lncRNA:iden ekspressiota tehokkaasti, kun THZ1:n vaikutus on siinä vaihtelevampi. Kaikissa cSCC-solulinjoissa ei ilmennetä samoja lncRNA:ita, ja eri cSCC-solulinjojen soluissa ilmennettävien lncRNA:iden tasot vaihtelevat. Koska supertehostajainhibiittorit vaikuttivat tutkittujen pitkien ei-koodaavien RNA:iden ilmentymisen vähenemiseen ihon okasolusyöpäsoluissa, voidaan sanoa, että näiden jo aiemmin supertehostajasäädellyiksi näytettyjen lncRNA:iden, SERLOC:n (Piipponen ja muut 2022) ja PICSAR:n (X. Wang ja muut 2020) lisäksi myös PRECSIT ja LINC7 ovat tämän työn tulosten perusteella supertehostajien säätelyn alaisia. (Kuva 34).

THZ1							
	RNP2 fosforylaatio	Solujen kasvu	Viabiliteetti	SERLOC	LINC7	PICSAR	PRECSIT
UT-SCC12A	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC91	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Ei expr.	Inhibitio
UT-SCC105	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Ei expr.	Inhibitio
UT-SCC111	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC118	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC7	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Ei expr.	Ei expr.	Inhibitio
UT-SCC59A	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Ei expr.	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC115	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Inhibitio	Ei expr.

JQ1							
	RNP2 fosforylaatio	Solujen kasvu	Viabiliteetti	SERLOC	LINC7	PICSAR	PRECSIT
UT-SCC12A	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC91	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Inhibitio	Ei expr.	Inhibitio
UT-SCC105	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Ei expr.	Inhibitio
UT-SCC111	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC118	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC7	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Ei inhibitiota	Ei expr.	Ei expr.	Inhibitio
UT-SCC59A	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Ei expr.	Inhibitio	Inhibitio
UT-SCC115	Inhibitio	Inhibitio	Inhibitio	Ei inhibitiota	Inhibitio	Inhibitio	Ei expr.

Inhibitio	Ei inhibitiota
-----------	----------------

Kuva 34. Yhteenveto saaduista tuloksista. Tulokset on eritelty inhibiittorikohtaisesti. Värit edustavat havaittua inhibiitotehoa solulinja- ja koeasetelmakohtaisesti. Ei expr.=kyseistä lncRNA:ta ei saatujen tulosten mukaan ilmennetty kyseisen solulinjan soluissa.

6 Päätelmät ja tulevaisuuden näkymät

Tutkimustulosten perusteella supertehostajat osallistuvat tutkittujen lncRNA:iden ekspression säätelyyn cSCC-soluissa. CDK7- ja BRD4-proteiinit sekä supertehostajat kokonaisuutenaan ovat kiinnostavat ja potentiaaliset terapeuttiset kohteet ihon okasolusyövän hoidon kannalta, ja niiden inhibointi vaikuttaa selkeästi solujen kasvuun ja lncRNA:iden ilmentymiseen. Tulevaisuudessa kokeita olisi mielenkiintoista jatkaa tutkimalla SE-inhibiittoreiden JQ1:n ja THZ1:n yhteisvaikutusta, sillä on näyttöä niiden synergisen toiminnallisuuden aiheuttamasta tehokkaammasta kohdeproteiinien inhibitiosta ja apoptoosin edistämisestä (Durbin ja muut 2018). Lisäksi olisi hyödyllistä myös tutkia SE-inhibiittoreiden mahdollisuutta ihon okasolusyövän esiasteiden, aurinkokeratoosin ja Bowenin taudin hoitomuotona.

BRD4:n inhiboinnin haitoista on näyttöä hiiri- ja rottamalleissa, joissa inhibointi aiheutti neuroinflammaatiota ja siitä seuraavaa muistin heikentymistä (Korb ja muut 2015; W. Wang ja muut 2021). Aurinkokeratoosin ja Bowenin taudin hoidossa inhibiittoreita voisi mahdollisesti kuitenkin käyttää paikallisesti esimerkiksi voiteena, mikäli inhibiittorit niihin tehoavat. Tämä puolestaan laskee mahdollisten neurologisten haittavaikutusten riskiä. Paikallisesti käytettynä vaikutus kohdistuu myös suoraan hoidettavalle alueelle, mikä tehostaa vaikutusta ja maksimoi lääkkeen hyödyn. Koska voide imeytyy iholta paikallisesti ja vaikutus toisiin elimiin on systeemiseen hoitoon verrattuna matalampi, hyödyn voisi tällöin yhdistää helpommin myös mahdollisiin muihin hoitomuotoihin. Ihon okasolusyövän osalta paikallista hoitoa tehokkaampi ja realistisempi vaihtoehto voisi olla inhibiittorien systeeminen kulkeutuminen suoraan haluttuihin kohdekudoksiin lääkeaineen muodossa, jolloin muihin elimiin kohdistuvat sivuvaikutukset olisivat vähäisempiä, ja samalla hoidossa saavutettava hyöty olisi mahdollisimman tuloksellinen.

7 Kirjallisuus

Ali, I., Conrad, R. J., Verdin, E. & Ott, M. (2018) Lysine Acetylation Goes Global:

From Epigenetics to Metabolism and Therapeutics. *Chem Rev* **118**:1216–1252.

Amaravadi, R. K., Kimmelman, A. C. & Debnath, J. (2019) Targeting Autophagy in

Cancer: Recent Advances and Future Directions. *Cancer Discovery* **9**:1167–1181.

Bhagwat, A. S., Roe, J.-S., Mok, B. Y. L., Hohmann, A. F., Shi, J. & Vakoc, C. R.

(2016) BET Bromodomain Inhibition Releases the Mediator Complex from Select cis -Regulatory Elements. *Cell Reports* **15**:519–530.

Biao, T., Cai-feng, H., Xiao-hong, L., Xiao-li, C., Wen-bei, L., Jun, W., ... Tao, Y.

(2022) From Bowen disease to cutaneous squamous cell carcinoma: Eight markers were verified from transcriptomic and proteomic analyses. *J Transl Med* **20**:416.

Brantsch, K. D., Meisner, C., Schönfish, B., Trilling, B., Wehner-Caroli, J., Röcken,

M. & Breuninger, H. (2008) Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: A prospective study. *The Lancet Oncology* **9**:713–720.

Bretau, S., Guillon, E., Karppinen, S.-M., Pihlajaniemi, T. & Ruggiero, F. (2020)

Collagen XV, a multifaceted multiplexin present across tissues and species. *Matrix Biology Plus* **6–7**:100023.

Brown, V. L., Harwood, C. A., Crook, T., Cronin, J. G., Kelsell, D. P. & Proby, C. M.

(2004) P16INK4a and p14ARF Tumor Suppressor Genes Are Commonly Inactivated in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* **122**:1284–1292.

Cabral-Pacheco, G. A., Garza-Veloz, I., Castruita-De la Rosa, C., Ramirez-Acuña, J.

M., Perez-Romero, B. A., Guerrero-Rodriguez, J. F., ... Martinez-Fierro, M. L.

- (2020) The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *IJMS* **21**:9739.
- Campos, M. A., Macedo, S., Fernandes, M. S., Pestana, A., Pardal, J., Batista, R., ... Soares, P. (2020) Prognostic Significance of RAS Mutations and P53 Expression in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Genes* **11**:751.
- Chen, H., Zheng, J., Yan, L., Zhou, X., Jiang, P. & Yan, F. (2021) Super-enhancer-associated long noncoding RNA RP11-569A11.1 inhibited cell progression and metastasis by regulating IFIT2 in colorectal cancer. *J Clin Lab Anal* **35**.
- Chen, J., Hou, S.-F., Tang, F.-J., Liu, D.-S., Chen, Z.-Z., Zhang, H.-L. & Wang, S.-H. (2022) HOTAIR/Sp1/miR-199a critically regulates cancer stemness and malignant progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *Oncogene* **41**:99–111.
- Corchado-Cobos, R., García-Sancha, N., González-Sarmiento, R., Pérez-Losada, J. & Cañueto, J. (2020) Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Biology to Therapy. *IJMS* **21**:2956.
- da Motta, L. L., Ledaki, I., Purshouse, K., Haider, S., De Bastiani, M. A., Baban, D., ... McIntyre, A. (2017) The BET inhibitor JQ1 selectively impairs tumour response to hypoxia and downregulates CA9 and angiogenesis in triple negative breast cancer. *Oncogene* **36**:122–132.
- Demehri, S., Turkoz, A. & Kopan, R. (2009) Epidermal Notch1 Loss Promotes Skin Tumorigenesis by Impacting the Stromal Microenvironment. *Cancer Cell* **16**:55–66.
- Devaiah, B. N., Lewis, B. A., Cherman, N., Hewitt, M. C., Albrecht, B. K., Robey, P. G., ... Singer, D. S. (2012) BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:6927–6932.

- Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., ... Cui, Q. (2020) The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *IJMS* **21**:1960.
- Donati, B., Lorenzini, E. & Ciarrocchi, A. (2018) BRD4 and Cancer: Going beyond transcriptional regulation. *Mol Cancer* **17**:164.
- Duffy, A. M., Bouchier-Hayes, D. J. & Harmey, J. H. (2004) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. Teoksessa J. H. Harmey, *VEGF and Cancer* (ss. 133–144). Boston, MA: Springer US.
- Durbin, A. D., Zimmerman, M. W., Dharia, N. V., Abraham, B. J., Iniguez, A. B., Weichert-Leahey, N., ... Stegmaier, K. (2018) Selective gene dependencies in MYCN-amplified neuroblastoma include the core transcriptional regulatory circuitry. *Nat Genet* **50**:1240–1246.
- Ebmeier, C. C., Erickson, B., Allen, B. L., Allen, M. A., Kim, H., Fong, N., ... Taatjes, D. J. (2017) Human TFIIH Kinase CDK7 Regulates Transcription-Associated Chromatin Modifications. *Cell Reports* **20**:1173–1186.
- Ferrandiz, L., Ruiz-de-Casas, A., Trakatelli, M., de Vries, E., Ulrich, M., Aquilina, S., ... on behalf of the EPIDERM Group (2012) Assessing physicians' preferences on skin cancer treatment in Europe: Skin cancer treatment in Europe. *British Journal of Dermatology* **167**:29–35.
- Fisher, R. P. (2019) Cdk7: A kinase at the core of transcription and in the crosshairs of cancer drug discovery. *Transcription* **10**:47–56.
- Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C. & Abraham, R. T. (2017) The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **170**:605–635.

- Ge, H., Yao, Y., Jiang, Y., Wu, X. & Wang, Y. (2022) Pharmacological inhibition of CDK7 by THZ1 impairs tumor growth in p53-mutated HNSCC. *Oral Diseases* **28**:611–620.
- Gong, Z., Shen, G., Huang, C., Zhang, J. & Ji, J. (2022) Downregulation of lncRNA NEAT1 inhibits the proliferation of human cutaneous squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. *Ann Transl Med* **10**:79–79.
- Graf, J. & Kretz, M. (2020) From structure to function: Route to understanding lncRNA mechanism. *BioEssays* **42**:2000027.
- Gu, P. & Lin, L. (2022) Long Intergenic Nonprotein Coding RNA 00174 Aggravates Lung Squamous Cell Carcinoma Progression via MicroRNA-185-5p/Nuclear Factor IX axis. *BioMed Research International* **2022**:1–12.
- Haisma, M. S., Plaat, B. E. C., Bijl, H. P., Roodenburg, J. L. N., Diercks, G. F. H., Romeijn, T. R. & Terra, J. B. (2016) Multivariate analysis of potential risk factors for lymph node metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of the American Academy of Dermatology* **75**:722–730.
- Hedberg, M. L., Berry, C. T., Moshiri, A. S., Xiang, Y., Yeh, C. J., Attilasoy, C., ... Seykora, J. T. (2022) Molecular Mechanisms of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *IJMS* **23**:3478.
- Heljasvaara, R., Aikio, M., Ruotsalainen, H. & Pihlajaniemi, T. (2017) Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation—Lessons learned from model organisms and human patients. *Matrix Biology* **57–58**:55–75.
- Jiang, L., Huang, R., Wu, Y., Diao, P., Zhang, W., Li, J., ... Yang, J. (2019) Overexpression of CDK7 is associated with unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Pathology* **51**:74–80.

- Jiang, Y. J. & Bikle, D. D. (2014) LncRNA: A new player in $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ vitamin D(3) /VDR protection against skin cancer formation. *Exp Dermatol* **23**:147–150.
- Johnson, K. E. & Wilgus, T. A. (2012) Multiple Roles for VEGF in Non-Melanoma Skin Cancer: Angiogenesis and Beyond. *Journal of Skin Cancer* **2012**:1–6.
- Jung, M., Philpott, M., Müller, S., Schulze, J., Badock, V., Eberspächer, U., ... Haendler, B. (2014) Affinity Map of Bromodomain Protein 4 (BRD4) Interactions with the Histone H4 Tail and the Small Molecule Inhibitor JQ1. *Journal of Biological Chemistry* **289**:9304–9319.
- Karppinen, S.-M., Honkanen, H.-K., Heljasvaara, R., Riihilä, P., Autio-Harmanen, H., Sormunen, R., ... Pihlajaniemi, T. (2016) Collagens XV and XVIII show different expression and localisation in cutaneous squamous cell carcinoma: Type XV appears in tumor stroma, while XVIII becomes upregulated in tumor cells and lost from microvessels. *Exp Dermatol* **25**:348–354.
- Kim, M. S., In, S. G., Park, O. J., Won, C. H., Lee, M. W., Choi, J. H., ... Chang, S. (2011) Increased expression of activating transcription factor 3 is related to the biologic behavior of cutaneous squamous cell carcinomas. *Human Pathology* **42**:954–959.
- Knuutila, J., Riihilä, P., Kurki, S., Nissinen, L. & Kähäri, V. (2020) Risk Factors and Prognosis for Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Cohort Study. *Acta Derm Venereol* **100**:adv00266.
- Kolev, V., Mandinova, A., Guinea-Viniegra, J., Hu, B., Lefort, K., Lambertini, C., ... Dotto, G. P. (2008) EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol* **10**:902–911.

- Korb, E., Herre, M., Zucker-Scharff, I., Darnell, R. B. & Allis, C. D. (2015) BET protein Brd4 activates transcription in neurons and BET inhibitor Jq1 blocks memory in mice. *Nat Neurosci* **18**:1464–1473.
- Kretz, M., Siprashvili, Z., Chu, C., Webster, D. E., Zehnder, A., Qu, K., ... Khavari, P. A. (2013) Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature* **493**:231–235.
- Kuempers, C., Jagomast, T., Heidel, C., Paulsen, F.-O., Bohnet, S., Schierholz, S., ... Perner, S. (2022) CDK7 is a prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Front Oncol* **12**:927140.
- Kwiatkowski, N., Zhang, T., Rahl, P. B., Abraham, B. J., Reddy, J., Ficarro, S. B., ... Gray, N. S. (2014) Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* **511**:616–620.
- Lanz, J., Bouwes Bavinck, J. N., Westhuis, M., Quint, K. D., Harwood, C. A., Nasir, S., ... Hofbauer, G. F. L. (2019) Aggressive Squamous Cell Carcinoma in Organ Transplant Recipients. *JAMA Dermatol* **155**:66.
- Larochelle, S., Merrick, K. A., Terret, M.-E., Wohlbold, L., Barboza, N. M., Zhang, C., ... Fisher, R. P. (2007) Requirements for Cdk7 in the Assembly of Cdk1/Cyclin B and Activation of Cdk2 Revealed by Chemical Genetics in Human Cells. *Molecular Cell* **25**:839–850.
- Lee, C. S., Mah, A., Aros, C. J., Lopez-Pajares, V., Bhaduri, A., Webster, D. E., ... Khavari, P. A. (2018) Cancer-Associated Long Noncoding RNA SMRT-2 Controls Epidermal Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* **138**:1445–1449.
- Lefort, K., Mandinova, A., Ostano, P., Kolev, V., Calpini, V., Kolfschoten, I., ... Dotto, G. P. (2007) Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor

suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCK α kinases.

Genes Dev **21**:562–577.

Lentini, M., Schepis, C., Cuppari, D. A. & Batolo, D. (2006) Tenascin expression in actinic keratosis. *J Cutan Pathol* **33**:716–720.

Li, B., Wang, B., Zhu, C., Tang, D., Pang, J., Zhao, J., ... Qian, Z. (2019) Cyclin-dependent kinase 7 inhibitor THZ1 in cancer therapy. *Chronic Diseases and Translational Medicine* **5**:155–169.

Li, J., Wang, J., Wang, Y., Zhao, X. & Su, T. (2023) E2F1 combined with LINC01004 super-enhancer to promote hepatocellular carcinoma cell proliferation and metastasis. *Clin Epigenet* **15**:17.

Li, Y. Y., Hanna, G. J., Laga, A. C., Haddad, R. I., Lorch, J. H. & Hammerman, P. S. (2015) Genomic Analysis of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **21**:1447–1456.

Ma, X., Kuang, X., Xia, Q., Huang, Z., Fan, Y., Ning, J., ... Long, C. (2018) Covalent CDK7 Inhibitor THZ1 Inhibits Myogenic Differentiation. *J Cancer* **9**:3149–3155.

Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., ... Campbell, P. J. (2015) High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* **348**:880–886.

Mechta-Grigoriou, F., Giudicelli, F., Pujades, C., Charnay, P. & Yaniv, M. (2003) C-jun regulation and function in the developing hindbrain. *Developmental Biology* **258**:419–431.

Migden, M. R., Rischin, D., Schmults, C. D., Guminski, A., Hauschild, A., Lewis, K. D., ... Fury, M. G. (2018) PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **379**:341–351.

- Morton, C. A., Szeimies, R. -M., Basset-Seguin, N., Calzavara-Pinton, P., Gilaberte, Y., Hædersdal, M., ... Braathen, L. R. (2019) European Dermatology Forum guidelines on topical photodynamic therapy 2019 Part 1: Treatment delivery and established indications – actinic keratoses, Bowen’s disease and basal cell carcinomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **33**:2225–2238.
- Nagarajan, P., Asgari, M. M., Green, A. C., Guhan, S. M., Arron, S. T., Proby, C. M., ... Toland, A. E. (2019) Keratinocyte Carcinomas: Current Concepts and Future Research Priorities. *Clinical Cancer Research* **25**:2379–2391.
- Nilson, K. A., Guo, J., Turek, M. E., Brogie, J. E., Delaney, E., Luse, D. S. & Price, D. H. (2015) THZ1 Reveals Roles for Cdk7 in Co-transcriptional Capping and Pausing. *Molecular Cell* **59**:576–587.
- Nissinen, L., Farshchian, M., Riihilä, P. & Kähäri, V.-M. (2016) New perspectives on role of tumor microenvironment in progression of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell Tissue Res* **365**:691–702.
- Patel, G. K., Goodwin, R., Chawla, M., Laidler, P., Price, P. E., Finlay, A. Y. & Motley, R. J. (2006) Imiquimod 5% cream monotherapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ (Bowen’s disease): A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Academy of Dermatology* **54**:1025–1032.
- Peissert, S., Schlosser, A., Kendel, R., Kuper, J. & Kisker, C. (2020) Structural basis for CDK7 activation by MAT1 and Cyclin H. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**:26739–26748.
- Pelish, H. E., Liao, B. B., Nitulescu, I. I., Tangpeerachaikul, A., Poss, Z. C., Da Silva, D. H., ... Shair, M. D. (2015) Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature* **526**:273–276.

- Petrenko, N., Jin, Y., Wong, K. H. & Struhl, K. (2017) Evidence that Mediator is essential for Pol II transcription, but is not a required component of the preinitiation complex in vivo. *ELife* **6**:e28447.
- Phatnani, H. P. & Greenleaf, A. L. (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* **20**:2922–2936.
- Pickering, C. R., Zhou, J. H., Lee, J. J., Drummond, J. A., Peng, S. A., Saade, R. E., ... Frederick, M. J. (2014) Mutational Landscape of Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **20**:6582–6592.
- Piipponen, M., Heino, J., Kähäri, V.-M. & Nissinen, L. (2018) Long non-coding RNA PICSAR decreases adhesion and promotes migration of squamous carcinoma cells by downregulating $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin expression. *Biology Open* **7**:bio037044.
- Piipponen, M., Nissinen, L., Farshchian, M., Riihilä, P., Kivisaari, A., Kallajoki, M., ... Kähäri, V.-M. (2016) Long Noncoding RNA PICSAR Promotes Growth of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma by Regulating ERK1/2 Activity. *Journal of Investigative Dermatology* **136**:1701–1710.
- Piipponen, M., Nissinen, L. & Kähäri, V.-M. (2020) Long non-coding RNAs in cutaneous biology and keratinocyte carcinomas. *Cell Mol Life Sci* **77**:4601–4614.
- Piipponen, M., Nissinen, L., Riihilä, P., Farshchian, M., Kallajoki, M., Peltonen, J., ... Kähäri, V.-M. (2020) P53-Regulated Long Noncoding RNA PRECSIT Promotes Progression of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma via STAT3 Signaling. *The American Journal of Pathology* **190**:503–517.
- Piipponen, M., Riihilä, P., Knuutila, J. S., Kallajoki, M., Kähäri, V.-M. & Nissinen, L. (2022) Super Enhancer-Regulated LINC00094 (SERLOC) Upregulates the

- Expression of MMP-1 and MMP-13 and Promotes Invasion of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancers* **14**:3980.
- Ratushny, V., Gober, M. D., Hick, R., Ridky, T. W. & Seykora, J. T. (2012) From keratinocyte to cancer: The pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* **122**:464–472.
- Reichrath, J., Saternus, R. & Vogt, T. (2017) Endocrine actions of vitamin D in skin: Relevance for photocarcinogenesis of non-melanoma skin cancer, and beyond. *Molecular and Cellular Endocrinology* **453**:96–102.
- Reinehr, C. P. H. & Bakos, R. M. (2019) Actinic keratoses: Review of clinical, dermoscopic, and therapeutic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **94**:637–657.
- Riabov, V., Gudima, A., Wang, N., Mickley, A., Orekhov, A. & Kzhyshkowska, J. (2014) Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol* **5**.
- Riedl, T. & Egly, J.-M. (2001) Phosphorylation in Transcription: The CTD and More. *Gene Expr* **9**:3–13.
- Riihilä, P., Nissinen, L. & Kähäri, V. (2021) Matrix metalloproteinases in keratinocyte carcinomas. *Exp Dermatol* **30**:50–61.
- Rowe, D. E., Carroll, R. J. & Day, C. L. (1992) Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. *Journal of the American Academy of Dermatology* **26**:976–990.
- Ryan, M. B. & Corcoran, R. B. (2018) Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat Rev Clin Oncol* **15**:709–720.
- Sava, G. P., Fan, H., Coombes, R. C., Buluwela, L. & Ali, S. (2020) CDK7 inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* **39**:805–823.

- Sekulic, A., Kim, S. Y., Hostetter, G., Savage, S., Einspahr, J. G., Prasad, A., ...
Bittner, M. (2010) Loss of Inositol Polyphosphate 5-Phosphatase Is an Early Event in Development of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Prevention Research* **3**:1277–1283.
- Sengupta, S. & Harris, C. C. (2005) p53: Traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:44–55.
- Sivridis, E., Giatromanolaki, A., Karpathiou, G., Karpouzis, A., Kouskoukis, C. & Koukourakis, M. I. (2011) LC3A-Positive “Stone-Like” Structures in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *The American Journal of Dermatopathology* **33**:285–290.
- South, A. P., Purdie, K. J., Watt, S. A., Haldenby, S., den Breems, N. Y., Dimon, M., ... Leigh, I. M. (2014) NOTCH1 Mutations Occur Early during Cutaneous Squamous Cell Carcinogenesis. *Journal of Investigative Dermatology* **134**:2630–2638.
- Stratigos, A. J., Garbe, C., Dessinioti, C., Lebbe, C., Bataille, V., Bastholt, L., ... Grob, J.-J. (2020) European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin: Part 2. Treatment. *European Journal of Cancer* **128**:83–102.
- Suomen Syöpärekisteri. Syöpärekisterin vuorovaikutteinen tilastosovellus, 1953–2020. <<https://syoparekisteri.fi/tilastot/tautitilastot/>> (Luettu 25.1.2023).
- Tang, F., Yang, Z., Tan, Y. & Li, Y. (2020) Super-enhancer function and its application in cancer targeted therapy. *Npj Precis Onc* **4**:2.
- Taniguchi, Y. (2016) The Bromodomain and Extra-Terminal Domain (BET) Family: Functional Anatomy of BET Paralogous Proteins. *IJMS* **17**:1849.
- Tervonen, T. A., Pant, S. M., Belitškin, D., Englund, J. I., Närhi, K., Haglund, C., ... Klefström, J. (2021) Oncogenic Ras Disrupts Epithelial Integrity by Activating the Transmembrane Serine Protease Hepsin. *Cancer Research* **81**:1513–1527.

- Toll, A., Salgado, R., Yébenes, M., Martín-Ezquerria, G., Gilaberte, M., Baró, T., ... Pujol, R. M. (2009) MYC gene numerical aberrations in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* **161**:1112–1118.
- Toll, Agustí, Salgado, R., Yébenes, M., Martín-Ezquerria, G., Gilaberte, M., Baró, T., ... Pujol, R. M. (2010) Epidermal growth factor receptor gene numerical aberrations are frequent events in actinic keratoses and invasive cutaneous squamous cell carcinomas. *Experimental Dermatology* **19**:151–153.
- Venables, Z.C., Nijsten, T., Wong, K. F., Autier, P., Broggio, J., Deas, A., ... Leigh, I. M. (2019) Epidemiology of basal and cutaneous squamous cell carcinoma in the U.K. 2013–15: A cohort study. *Br J Dermatol* **181**:474–482.
- Venables, Zoë C., Autier, P., Nijsten, T., Wong, K. F., Langan, S. M., Rous, B., ... Leigh, I. M. (2019) Nationwide Incidence of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in England. *JAMA Dermatol* **155**:298.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T. & Kim, Y. Y. (2010) MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**:1231–1243.
- Wang, J., Zhang, R., Lin, Z., Zhang, S., Chen, Y., Tang, J., ... Wu, G. (2020) CDK7 inhibitor THZ1 enhances antiPD-1 therapy efficacy via the p38 α /MYC/PD-L1 signaling in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* **13**:99.
- Wang, L., Xu, M., Kao, C.-Y., Tsai, S. Y. & Tsai, M.-J. (2020) Small molecule JQ1 promotes prostate cancer invasion via BET-independent inactivation of FOXA1. *Journal of Clinical Investigation* **130**:1782–1792.
- Wang, Q., Peng, L., Chen, Y., Liao, L., Chen, J., Li, M., ... Li, E. (2020) Characterization of super-enhancer-associated functional lncRNAs acting as ceRNAs in ESCC. *Mol Oncol* **14**:2203–2230.

- Wang, W., Wang, R., Jiang, Z., Li, H., Zhu, Z., Khalid, A., ... Pan, F. (2021) Inhibiting Brd4 alleviated PTSD-like behaviors and fear memory through regulating immediate early genes expression and neuroinflammation in rats. *J Neurochem* **158**:912–927.
- Wang, X., Zhang, R., Wu, S., Shen, L., Ke, M., Ouyang, Y., ... Nan, A. (2020) Super-Enhancer LncRNA LINC00162 Promotes Progression of Bladder Cancer. *IScience* **23**:101857.
- Watt, F. M., Estrach, S. & Ambler, C. A. (2008) Epidermal Notch signalling: Differentiation, cancer and adhesion. *Current Opinion in Cell Biology* **20**:171–179.
- Xiao, S., Huang, Q., Ren, H. & Yang, M. (2021) The mechanism and function of super enhancer RNA. *Genesis* **59**.
- Xie, G., Zhu, A. & Gu, X. (2022) Converged DNA Damage Response Renders Human Hepatocellular Carcinoma Sensitive to CDK7 Inhibition. *Cancers* **14**:1714.
- Xie, J.-J., Jiang, Y.-Y., Jiang, Y., Li, C.-Q., Lim, M.-C., An, O., ... Koeffler, H. P. (2018) Super-Enhancer-Driven Long Non-Coding RNA LINC01503, Regulated by TP63, Is Over-Expressed and Oncogenic in Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology* **154**:2137-2151.e1.
- Yang, W.-Q., Liang, R., Gao, M.-Q., Liu, Y.-Z., Qi, B. & Zhao, B.-S. (2022) Inhibition of bromodomain-containing protein 4 enhances the migration of esophageal squamous cell carcinoma cells by inducing cell autophagy. *World J Gastrointest Oncol* **14**:2340–2352.
- Yo, K. & Rünger, T. M. (2017) UVA and UVB Induce Different Sets of Long Noncoding RNAs. *Journal of Investigative Dermatology* **137**:769–772.
- Zampetaki, A., Albrecht, A. & Steinhofel, K. (2018) Long Non-coding RNA Structure and Function: Is There a Link? *Front Physiol* **9**:1201.

- Zeng, M., Kwiatkowski, N. P., Zhang, T., Nabet, B., Xu, M., Liang, Y., ... Gray, N. S. (2018) Targeting MYC dependency in ovarian cancer through inhibition of CDK7 and CDK12/13. *ELife* **7**:e39030.
- Zhang, L., Lu, Q. & Chang, C. (2020) Epigenetics in Health and Disease. Teoksessa C. Chang & Q. Lu (Toim.), *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity* (Vsk. 1253, ss. 3–55). Singapore: Springer Singapore.
- Zhang, Y., Gao, L., Ma, S., Ma, J., Wang, Y., Li, S., ... Ding, Z. (2019) MALAT1-KTN1-EGFR regulatory axis promotes the development of cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell Death Differ* **26**:2061–2073.
- Zhao, L., Li, W., Marshall, C., Griffin, T., Hanson, M., Hick, R., ... Seykora, J. T. (2009) Srcasm Inhibits Fyn-Induced Cutaneous Carcinogenesis with Modulation of Notch1 and p53. *Cancer Research* **69**:9439–9447.
- Zheng, C., Liu, M. & Fan, H. (2020) Targeting complexes of super-enhancers is a promising strategy for cancer therapy (Review). *Oncol Lett* **20**:2557–2566.