



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

**ANO7:n rs77559646-variantin aiheuttaman
silmukointivirheen korjaaminen muokatuilla
spliseosomaalisilla U1- ja U6-snRNA:illa**

Hilla Pellikka

Fysiologia ja genetiikka

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 30 op

12.12.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Pääaine: Biologia, Fysiologia ja genetiikka

Tekijä: Hilla Pellikka

Otsikko: *ANO7*:n rs77559646-variantin aiheuttaman silmukointivirheen korjaaminen muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snRNA:illa

Ohjaajat: Christoffer Löf, Johanna Schleutker ja Päivi Onkamo

Sivumäärä: 71 sivua + liitteet 3 sivua

Päivämäärä: 12.12.2025

Eturauhassyöpä on miesten toiseksi yleisin syöpä maailmalla ja yksi periytyvimmistä ihmisen syöivistä, koska noin 57 % riskistä selittyy geneettisillä tekijöillä. *ANO7*-geenin kromosomaalinen sijainti 2q37.3 on tunnistettu vahvaksi eturauhassyövän riskilokukseksi suomalaisilla. *ANO7*:n rs77559646-variantti on yhteydessä aggressiiviseen eturauhassyöpään. Variantin emäsmuutos G > A sijaitsee 5'-silmukointialueella viisi nukleotidia alavirtaan eksonista 4. Kyseisen silmukointikohdan mutaation on havaittu häiritsevän esiaste-RNA:n normaalia silmukointia ja johtavan eksonin 4 ohittamiseen sekä apikaalisen *ANO7*-proteiinin ilmentymisen menettämiseen eturauhasen luminaalisessa epiteelissä. *ANO7*:n lähetti-RNA:n on havaittu jäävän silmukoinnin jälkeen tumaan epiteelisolujen sisään, mikä voisi selittää proteiinin ilmentymisen menettämisen.

Tässä tutkielmassa tutkin, onko *ANO7*:n rs77559646-variantin aiheuttamaa silmukointivirhettä mahdollista korjata muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snRNA:illa, jotka sitoutuvat 5'-silmukointikohtaan ja osallistuvat esiaste-RNA:n silmukointiin. Tutkimusta varten valmistettiin muokatut spliseosomaaliset U1- ja U6-snRNA-plasmidit kohdennetun mutageneesin avulla tekemällä yksi mutaatio (U1 mut 1- ja U6 mut 1 -plasmidit) ja kaksi mutaatiota (U1 mut 2- ja U6 mut 2 -plasmidit). U1 mut 1- ja U6 mut 1 -plasmidit sisälsivät C > U emäsmuutoksen silmukointikohdassa +5. U1 mut 2 -plasmidi sisälsi lisäksi U > G emäsmuutoksen ja U6 mut 2 -plasmidi A > G emäsmuutoksen silmukointikohdassa +4.

Silmukoinnin korjaamista tutkittiin minigeenien silmukointianalyysillä (engl. minigene splicing assay). Plasmidit transfektoitiin COS-7-soluihin, RNA eristettiin ja muunnettiin käänteistranskriptaasi-polymeraasiketjureaktiolla cDNA:ksi. Lopuksi suoritettiin PCR *ANO7*-minigeenille spesifisillä alukkeilla ja PCR-tuotteet visualisoitiin agarosigeelielektroforeesilla.

Muokkaamalla spliseosomaalisia U1- ja U6-snRNA:ita pyrittiin lisäämään snRNA:iden komplementaarisuutta *ANO7*:n rs77559646-variantin kanssa. Sitä kautta yritettiin korjata variantin aiheuttamaa silmukointivirhettä. Silmukointianalyysi osoitti, että kahdella mutaatiolla muokattu spliseosomaalinen U1-snRNA korjasi osittain rs77559646-variantin silmukointia. Tulokset eivät tukeneet sitä, että muokatulla spliseosomaalisella U6-snRNA:lla olisi vaikutusta silmukointiin.

Avainsanat: eturauhassyöpä, *ANO7*, mutaatio, silmukointivirhe, muokattu spliseosomaalinen U1-snRNA, muokattu spliseosomaalinen U6-snRNA, minigeenien silmukointianalyysi

Master's thesis

Subject: Biology, Physiology and genetics

Author: Hilla Pellikka

Title: Correcting *ANO7* rs77559646 splicing defect with modified U1 and U6 snRNAs

Supervisors: Christoffer Löf, Johanna Schleutker and Päivi Onkamo

Number of pages: 71 pages + 3 appendix pages

Date: 12.12.2025

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer in men worldwide and it is one of the most heritable human cancers, genetic factors accounting for 57 % of the risk. The chromosomal region 2q37.3, which contains the *ANO7* gene, has been identified as a strong risk locus for prostate cancer. The *ANO7* rs77559646 variant is associated with aggressive prostate cancer. This variant causes a G > A transition located at the 5' splice region, five nucleotides downstream of exon 4. The change disrupts normal RNA splicing and causes skipping of exon 4, leading to loss of ANO7 protein expression in the prostate luminal epithelium. The aberrantly spliced *ANO7* mRNA is retained in the nucleus, which might explain the loss of ANO7 protein.

This thesis investigated whether the splicing defect caused by the *ANO7* rs77559646 could be corrected using modified U1 and U6 small nuclear RNAs (snRNAs), which are key components of the spliceosome. Modified U1 and U6 snRNA plasmids were generated through site-directed mutagenesis, introducing either a single mutation (U1 mut 1 and U6 mut 1) or two mutations (U1 mut 2 and U6 mut 2). The U1 mut 1 and U6 mut 1 plasmids contained a C > U substitution at the +5 position of the splice site. Additionally, the U1 mut 2 plasmid included a U > G substitution, while the U6 mut 2 plasmid carried an A > G substitution at the +4 position of the splice site.

Splicing efficacy was evaluated using a minigene splicing assay. Plasmids were transfected into COS-7 cells, followed by RNA isolation and reverse transcription into cDNA. PCR was then performed to amplify *ANO7* minigene transcripts representing exon 4 inclusion or skipping, and the products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

The modifications introduced into U1 and U6 snRNAs were designed to enhance their complementarity to the *ANO7* rs77559646 variant and thereby promote correction of the splicing defect caused by the mutation. Splicing analysis revealed that the U1 snRNA containing two specific mutations partially corrected the aberrant splicing associated with rs77559646 variant. In contrast, the modified U6 snRNA showed no detectable effect on splicing.

Key words: prostate cancer, *ANO7*, mutation, splicing defect, modified U1 snRNA, modified U6 snRNA, minigene splicing assay

Sisällys

1	Johdanto	1
1.1	Eturauhanen	1
1.2	Eturauhassyöpä	3
1.2.1	Epidemiologia.....	3
1.2.2	Karsinogeneesi.....	4
1.2.3	Riskitekijät.....	6
1.2.4	Diagnosointi.....	8
1.2.5	Hoitomuodot.....	9
1.3	ANO7	11
1.3.1	ANO7 ja TMEM16-proteiiniperhe.....	11
1.3.2	ANO7 ja eturauhassyöpä.....	12
1.3.3	ANO7:n rs77559646-variantti.....	14
1.4	Silmukointi	15
1.4.1	Esiaste-RNA:n silmukointi ja spliseosomaaliset snRNA:t.....	15
1.4.2	Vaihtoehtoinen silmukointi.....	19
1.4.3	Vaihtoehtoinen silmukointi, ANO7 ja rs77559646-variantti.....	20
1.5	Tutkimuksen tavoite ja hypoteesi	21
2	Aineisto ja menetelmät	22
2.1	Plasmidit	22
2.1.1	Valmiit plasmidit.....	22
2.1.2	Alukkeiden suunnittelu ja valmistus.....	23
2.1.3	U6-snRNA-plasmidin valmistus.....	24
2.1.4	Muokattujen U1- ja U6-snRNA-plasmidien valmistus.....	28
2.1.5	Midiprep-kasvatukset ja plasmidieristykset.....	30
2.2	Minigeenien silmukointianalyysi	31
2.2.1	COS-7-solut ja soluviljely.....	31
2.2.2	Solujen transfektio plasmideilla.....	32
2.2.3	RNA:n eristys.....	35
2.2.4	cDNA:n synteesi.....	35
2.2.5	PCR ja agarosigeelielektroforeesi.....	36
2.2.6	Tulosten analysointi.....	36
3	Tulokset	38

3.1	Transfektio	38
3.2	Silmukoinnin muuttaminen muokatulla U1-snrRNA:lla	38
3.3	Silmukoinnin korjaaminen muokatuilla U1- ja U6-snrRNA:illa.....	40
3.4	Silmukoinnin huonontaminen muokatuilla U1- ja U6-snrRNA:illa	45
4	<i>Pohdinta</i>	48
4.1	Silmukoinnin muuttaminen muokatuilla U1- ja U6-snrRNA:illa.....	48
4.1.1	ANO7:n rs77559646-variantin aiheuttaman silmukointivirheen korjaaminen	48
4.1.2	ANO7:n villityypin oikean silmukoinnin huonontaminen	52
4.2	Tutkimuksen virhelähteet ja rajoitteet	52
4.3	Jatkotutkimusaiheet	54
	<i>Kiitokset</i>	56
	<i>Lähteet</i>	57
	<i>Liitteet</i>	72

Lyhenteet

ANO7	Anoktamiini 7
ANO7-L	ANO7 pitkä isoformi
ANO7-S	ANO7 lyhyt isoformi
ANOVA	Varianssianalyysi
AR	Androgeenireseptori
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
BP	Emäspari
BPS	Haarautumiskohdan sekvenssi
cAMP	Syklinen adenosiinimonofosfaatti
cDNA	Komplementaarinen DNA
DDR	DNA-vauriovaste
DHT	Dihydrotestosteroni
DNase I	Deoksiribonukleaasi I
GFP	Vihreä fluoresoiva proteiini
GnRH	Gonadotropiineja vapauttava hormoni
GWAS	Genominlaajuinen assosiaatiotutkimus
HRR	Homologisen rekombinaation korjaus
MMR	DNA:n kahdentumisvirheiden korjaus
mRNA	Lähettiläis-RNA

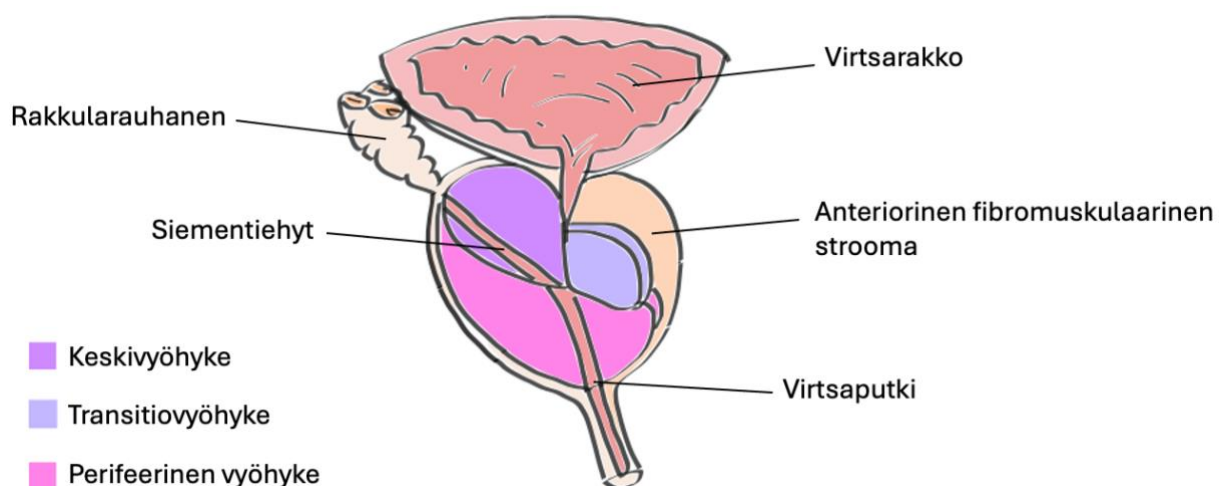
PARP	Poly(ADP-riboosi)-polymeraasi
PCa	Eturauhassyöpä
pre-mRNA	Esiaste-RNA
PSA	Prostataspesifinen antigeeni
PSMA	Prostataspesifinen solun pintakalvon proteiini
RT-PCR	Käänteistranskriptaasi-polymeraasiketjureaktio
SNP	Yhden nukleotidin polymorfismi
snRNA	Spliseosomaalinen snRNA, pieni tuman RNA-molekyyli
snRNP	Spliseosomaalinen snRNP, pieni tuman ribonukleoproteiini
TBE	Tris-boraatti-EDTA-puskuri
TMEM16	Transmembraaniproteiini 16
WT	Villityyppi

1 Johdanto

1.1 Eturauhanen

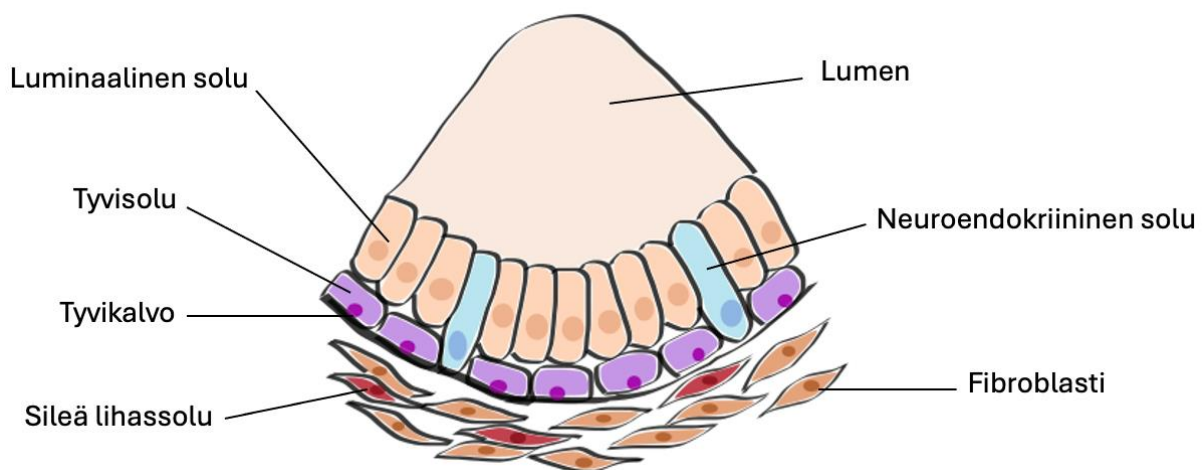
Eturauhanen (engl. prostate gland) on noin saksanpähkinän kokoinen lisäsukupuolirauhanen, joka sijaitsee miehillä virtsarakon alapuolella ja peräsuolen edessä (Oseni ym., 2023). Sen pääasiallinen tehtävä on tuottaa emäksistä siemennestettä, joka ravitsee ja suojaa siittiöitä. Eturauhanen tuottaa noin 30 % siemennesteen tilavuudesta (Zaichick, 2014). Lisäksi se edistää siittiöiden kulkeutumista kiveksistä virtsaputken kautta kohti munasolua ejakulaation aikana. Eturauhasen kehittymisen kannalta androgeenireseptorien (engl. androgen receptor, AR) stimulaatio androgeeneilla on välttämätöntä (Banerjee ym., 2018; Wilson, 2011). Eturauhasen biologisesti aktiivinen androgeeni, dihydrotestosteroni (DHT) pelkistyy testosteronista 5α -reduktaasientsyymin vaikutuksesta (Andersson ym., 1991).

Aikuisen eturauhasessa on kolme vyöhykettä: perifeerinen vyöhyke (engl. peripheral zone, PZ), keskivyöhyke (engl. central zone, CZ) sekä transiiovyöhyke (engl. transition zone, TZ) (kuva 1) (McNeal, 1981). Lisäksi anteriorinen fibromuskulaarinen strooma (engl. anterior fibromuscular stroma) muodostaa yhden erillisen alueen. Perifeerinen vyöhyke käsittää yli 70 % eturauhasen rauhaskudoksen tilavuudesta ja useimmat eturauhasen kasvaimet kehittyvät tälle alueelle. Keskivyöhyke muodostaa noin 25 % ja transiiovyöhyke vain noin 5 % rauhaskudoksen tilavuudesta. Keskivyöhyke ympäröi siementiehyitä (Figiel ym., 2023).



Kuva 1. Eturauhasen vyöhykkeellinen rakenne. Eturauhanen muodostuu perifeerisestä vyöhykkeestä, transiiovyöhykkeestä, keskivyöhykkeestä ja anteriorisesta fibromuskulaarisesta stroomasta. Siementiehyt ja virtsaputki kulkevat eturauhasen läpi. Virtsarakko sekä rakkularauhanen ovat yhteydessä eturauhaseen. Kuva tuotettu itse (Figiel ym., 2023) kuvan pohjalta Inkscape-ohjelmalla.

Eturauhasen epiteeli erilaistuu kolmeksi pääasialliseksi solutyypiksi: luminaalisiksi soluiksi (engl. luminal cells) (noin 60 %), tyvisoluiksi (engl. basal cells) (noin 40 %) ja neuroendokriinisiksi soluiksi (engl. neuroendocrine cells) (noin 1 %) (kuva 2) (Packer & Maitland, 2016). Luminaaliset solut vastaavat eritystoiminnasta, kun taas tyvisolut ovat kontaktissa suojaavan tyvikalvon kanssa (Figiel ym., 2023). Eturauhasen epiteelisolut erittävät useita proteiineja, kuten prostataspesifistä antigeeniä (engl. prostate-specific antigen, PSA) (Hayward & Cunha, 2000).



Kuva 2. Eturauhasen solutyypit. Eturauhasen epiteeli koostuu sisäkerroksen erittävistä luminaalisista soluista, niitä ympäröivistä tyvisoluista, jotka ovat kosketuksissa tyvikalvon kanssa, sekä harvinaisemmista neuroendokriinisista soluista. Kuva tuotettu itse (Figiel ym., 2023) kuvan pohjalta Inkscape-ohjelmalla.

Eturauhaseen liittyy kolme patologista tilaa: eturauhastulehdus (engl. prostatitis), eturauhasen liikakasvu (engl. benign prostatic hyperplasia, BPH) ja eturauhassyöpä (engl. prostate cancer, PCa), jotka aiheuttavat samankaltaisia oireita (Oseni ym., 2023). Eturauhastulehdus ja liikakasvu ovat eturauhasen hyvänlaatuisia tauteja, joista jälkimmäinen ilmenee yleensä vasta vanhemmalla iällä. Liikakasvu vaikuttaa pääosin eturauhasen transitiovyöhykkeeseen (Figiel ym., 2023). Eturauhassyöpä syntyy, kun eturauhasen solut muuttuvat pahanlaatuisiksi. Eturauhassyövästä katsotaan olevan periytyvä muoto (engl. hereditary/familial prostate cancer) ja ei-perinnöllinen muoto (engl. sporadic prostate cancer) (Alberti, 2010). Eturauhastulehduksen ja liikakasvun yhteydestä eturauhassyövän riskiin on olemassa ristiriitaista tutkimustietoa (Zhang ym., 2020).

1.2 Eturauhassyöpä

1.2.1 Epidemiologia

Eturauhassyöpä on miesten toiseksi yleisin syöpä maailmalla keuhkosityövän jälkeen ja se aiheuttaa viidenneksi eniten syöpäkuolemia miehillä (Bray ym., 2024). Vuonna 2022 eturauhassyöpä johti lähes 400 000 kuolemaan maailmalla ja uusia eturauhassyöpätapauksia todettiin 7,3 % kaikista uusista syöpätapauksista. Ennusteiden mukaan uusien eturauhassyöpätapauksien määrä tulee nousemaan vuoden 2020 noin 1,4 miljoonasta jopa 2,9 miljoonaan vuoteen 2040 mennessä (James ym., 2024). Suomi on yksi 118 maasta, joissa eturauhassyöpä on yleisimmin diagnosoitu syöpä (Bray ym., 2024). Suomessa diagnosoitiin 5631 uutta eturauhassyöpätapausta ja 1012 miestä kuoli eturauhassyöpään vuonna 2023 (Seppä ym., 2023).

Eturauhassyövän yleisyys vaihtelee huomattavasti eri maiden ja alueiden välillä (Bray ym., 2024). Korkeimmat ilmaantuvuusluvut havaitaan Pohjois- ja Länsi-Euroopassa, Australiassa ja Uudessa-Seelannissa, Karibiassa, Pohjois- ja Etelä-Amerikassa sekä eteläisessä Afrikassa. Aasiassa ja muualla Afrikassa eturauhassyöpää esiintyy jonkin verran vähemmän. Eturauhassyövän ilmaantuvuuslukujen alueellinen jakauma eroaa kuolleisuuslukujen jakaumasta. Korkeinta kuolleisuus on Karibiassa ja tietyissä Afrikan osissa, erityisesti Saharan eteläpuolisessa Afrikassa. Näiden maantieteellisten erojen taustalla vaikuttavat muun muassa väestöjen geneettiset tekijät, ympäristötekijät ja elämäntavat (Bergengren ym., 2023). Myös erot maiden välillä diagnostiikassa ja terveydenhuollossa selittävät eturauhassyövän ilmaantuvuuseroja (Zhou ym., 2016). Eturauhassyövän ilmaantuvuus kasvoi nopeasti 1980-luvun lopulta 1990-luvun alkuun monissa korkean tulotason maissa, kuten Pohjois-Amerikassa, Pohjoismaissa ja Australiassa, PSA-testauksen eli prostataspesifisen antigeeni-testauksen myötä (Center ym., 2012).

1.2.2 Karsinogeneesi

Eturauhassyövän synnyssä yhdeksi merkittäväksi tekijäksi on ehdotettu kroonista tulehdusta (Oseni ym., 2023; Shen & Abate-Shen, 2010). Arvellaan, että eturauhasen krooninen tulehdus johtaa DNA-vaurioihin ja heikentää solujen kykyä korjata DNA:ta, mikä voi aiheuttaa solujen hallitsematonta jakautumista. Tämä hallitsematon jakautuminen edistää pahanlaatuisten solujen muodostumista ja siten kasvaimen kehittymistä. Tulehduksen tarkkaa alkuperää ei tunneta, mutta sen on ehdotettu liittyvän esimerkiksi patogeeneihin, kemiallisiin ärsykkeisiin, ruokavalioon tai fyysisiin traumoihin (de Bono ym., 2020).

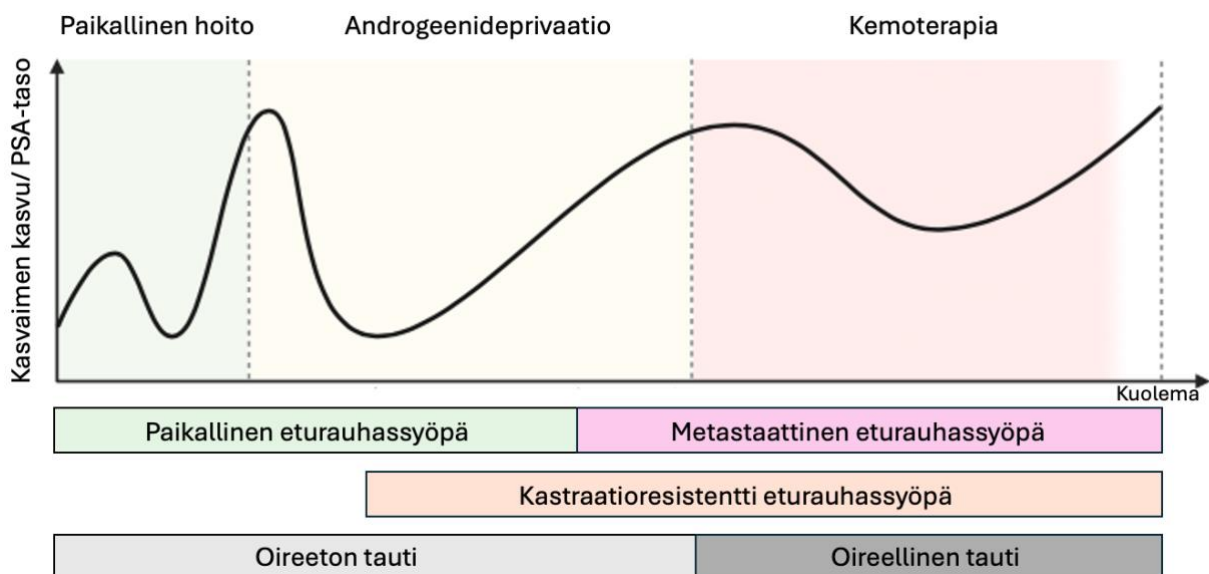
Eturauhassyövässä kasvunrajoitegeenit (engl. tumor suppressor genes), kuten *PTEN* ja *TP53*, sekä DNA:n korjausgeenit (engl. DNA repair genes) usein inaktivoituvat, kun taas onkogeenit, kuten *MYC*, voivat aktivoitua (de Bono ym., 2020). Nämä muutokset edistävät asteittaista kasvaimen kehittymistä. Eturauhassyövän kasvaimen kehitysvaiheet voidaan jakaa kolmeen ryhmään: intraepiteelinen neoplasia (engl. intraepithelial neoplasia), androgeeniriippuvainen adenokarsinooma (engl. androgen-dependent adenocarcinoma) ja androgeeniriippumaton eli kastraatioresistentti adenokarsinooma (engl. androgen-independent/castration-resistant adenocarcinoma) (Testa ym., 2019). Eturauhassyövästä noin 95 % on adenokarsinomia (Alizadeh & Alizadeh, 2014).

Eturauhassyöpä on kliinisesti ja geneettisesti heterogeeninen tauti (Haffner ym., 2020). Osalla potilaista eturauhassyöpä etenee hitaasti ja pysyy oireettomana pitkään, kun taas toisilla se ilmenee nopeasti etenevänä ja aggressiivisempänä. Paikallinen tai paikallisesti edennyt eturauhassyöpä voidaan luokitella matala- (engl. low-risk localised disease), keskivaikea- (engl. intermediate-risk localised disease) tai korkeariskiseksi taudiksi (engl. high-risk localised disease/locally advanced disease) (Cornford ym., 2024). Paikallinen eturauhassyöpä on yleensä aluksi oireeton (kuva 3), mutta taudin edetessä voi ilmetä alempien virtsateiden oireita (engl. lower urinary tract symptoms, LUTS), kuten tihentynyttä virtsaamisentarvetta, virtsaretenttiota tai pidätyskyvyttömyyttä. Muita mahdollisia oireita ovat kipu, erektiohäiriöt sekä verivirtsaisuus.

Androgeenireseptorien signaloinnilla on keskeinen merkitys eturauhassyövän synnyssä ja etenemisessä (Banerjee ym., 2018). Reseptorien aktiivisuutta voidaan vähentää ja androgeenien vaikutusta estää androgeenideprivaatiohoidolla (engl. androgen deprivation therapy, ADT),

joka antaa yleensä aluksi hyvän hoitovasteen (Dong ym., 2018). Vaikka androgeenitasot lasketaan kastratiotasolle, eturauhassyöpä etenee usein ajan myötä kastratioresistentiksi (engl. castration-resistant prostate cancer, CRPC). Kastratioresistentti eturauhassyöpä ei enää reagoi androgeenien puutteeseen, vaan kykenee etenemään matalista androgeenipitoisuuksista huolimatta.

Taudin edetessä metastaattiseksi syöpäsolut voivat levitä luustoon, imusolmukkeisiin tai elimiin (Shen & Abate-Shen, 2010). Metastaattisessa eturauhassyövässä esiintyy useimmiten luustoetäpesäkkeitä (engl. bone metastases), joihin liittyy voimakasta luukipua (Smith ym., 2022). Harvemmin etäpesäkkeitä havaitaan myös keuhkoissa tai maksassa (Shen & Abate-Shen, 2010). Pitkälle edenneessä eturauhassyövässä tehoavat hoitovaihtoehdot ovat rajallisia ja pääasiallinen hoitomuoto on kemoterapia. Ainoastaan pieni osa diagnosoiduista matalan riskin eturauhassyöpätapauksista johtaa kuolemaan (Damber & Aus, 2008). Koska eturauhassyöpä on tyypillisesti iäkkäiden miesten sairaus, potilaat kuolevat usein eturauhassyövän kanssa, mutta harvoin itse syöpään (Hamdy ym., 2023).



Kuva 3. Eturauhassyövän eteneminen. Eturauhassyöpä on usein aluksi paikallinen, mutta voi edetessään muuttua metastaattiseksi ja kastratioresistentiksi. Paikallinen eturauhassyöpä on yleensä oireeton, mutta taudin edetessä oireita alkaa ilmentua. Hoitostrategia määräytyy kasvaimen vaiheen ja taudin laajuuden mukaan. Eturauhassyöpä johtaa harvoin kuolemaan. Kuva muokattu (Biorender).

1.2.3 Riskitekijät

Eturauhassyövän suurimpia riskitekijöitä ovat korkea ikä, positiivinen perhetausta ja etninen tausta (Bergengren ym., 2023; Damber & Aus, 2008). Eturauhassyövän sairastumisriski kasvaa iän myötä (Godtman ym., 2022). Yhdysvaltojen syöpätalaston mukaan eturauhassyövän todennäköisyys nousee 60–69-vuotiaiden miesten 1,8 prosentista ≥ 70 -vuotiaiden miesten 8,2 prosenttiin (Siegel ym., 2022). Eturauhassyövän sairastumisriskiin vaikuttavat myös sairastuneiden sukulaisten määrä, lähisukulaisuus ja ikä sairastuessa tai kuollessa eturauhassyöpään sekä syövän vaikeusaste ja muut syövät (Bergengren ym., 2023). Miehillä on suurempi riski sairastua, jos eturauhassyöpää esiintyy ensimmäisen asteen sukulaisilla (Johns & Houlston, 2003; Zeegers ym., 2003). Riski on noin 2,5-kertainen, jos perheessä on yksi sairastunut ensimmäisen asteen sukulainen. Jos heitä on kaksi tai useampia, riski on jopa 5-kertainen. Lisäksi eturauhassyövän riski vaikuttaisi olevan hieman korkeampi miehillä, joilla on sairastunut veli verrattuna niihin, joilla on sairastunut isä (Hemminki & Czene, 2002; Zeegers ym., 2003).

Afrikkalaista ja afrokaribialaista syntyperää (engl. African Caribbean ancestry) olevilla miehillä on korkea riski sairastua eturauhassyöpään ja mahdollisesti aggressiivisempaan tautimuotoon nuorella iällä (McHugh ym., 2021; Rebbeck ym., 2013). Eturauhassyövän esiintyvyys ja sen aiheuttama kuolleisuus ovat korkeimmat afroamerikkalaisilla (engl. African American ancestry) ja afrokaribialaisilla (Rebbeck ym., 2013). Lisäksi eturauhassyövän aiheuttama kuolleisuus on korkea Saharan eteläpuolisessa Afrikassa, jossa tavataan myös korkeimmat eturauhassyövän kasvainvaiheet (engl. tumor stage) ja -asteet (engl. tumor grade).

Eturauhassyöpä on yksi periytyvimmistä syöivistä, koska noin 57 % riskistä selittyy geneettisillä tekijöillä (Mucci ym., 2016). Uusimman tutkimuksen mukaan tunnetaan 451 geneettistä varianttia, jotka liittyvät eturauhassyöpäriskiin (A. Wang ym., 2023). Riskivariantit on tunnistettu genomilaajuisilla assosiaatiotutkimuksilla (engl. genome-wide association studies, GWAS) ja meta-analyyseilla. Tutkituista 451 riskivariantista eurooppalaisilla esiintyy 429 (95 %), latinalaisamerikkalaisilla 424 (94 %), afrikkalaisilla 411 (91 %) ja aasialaisilla 377 (84 %). Vain pieni osa varianteista on väestökohtaisia. Ainoastaan eurooppalaisilla ilmentyviä riskivariantteja on yhdeksäntoista, afrikkalaisilla viisi ja aasialaisilla kolme.

Useilla eturauhassyöpöpotilailla on mutaatioita DNA-vauriovaste-geeneissä (engl. DNA damage response genes, DDR genes), kuten homologisen rekombinaation korjausgeeneissä (engl. homologous recombination repair genes, HRR genes) sekä DNA:n kahdentumisvirheiden korjausgeeneissä (engl. DNA mismatch repair genes, MMR genes) (Bugoye ym., 2023). Yhdessä tutkimuksessa havaittiin, että 11,8 %:lla metastaattista eturauhassyöpää sairastavista esiintyi perinnöllisiä ituratamutaatioita DNA:n korjausgeeneissä (engl. germline DNA repair genes), kuten mutaatioita HRR-geeneissä: *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* ja *RAD51D* (Pritchard ym., 2016). Paikallisessa eturauhassyövässä vastaavia mutaatioita esiintyi vähemmän 4,6 %:lla potilaista.

Tutkimuksien mukaan DNA:n korjausgeenien mutaatiot voivat liittyä aggressiivisempaan eturauhassyövän tautimuotoon ja korkeampaan kuolleisuuteen nuoremmalla iällä (Khan & Cheng, 2022). Esimerkiksi *BRCA1*- ja *BRCA2*-mutaation kantajilla on suurempi riski sairastua aggressiiviseen ja metastaattiseen eturauhassyöpään (Castro ym., 2013). *BRCA1*-mutaation kantajilla eturauhassyövän riski on noin 3,75-kertainen ja *BRCA2*-mutaation kantajilla jopa 8,6-kertainen 65 vuoden ikään mennessä (Kote-Jarai ym., 2011; Leongamornlert ym., 2012). MMR-geenien *MLH1*-, *MSH2*-, *MSH6*- ja *PMS2*-mutaatiot liittyvät myös kohonneeseen eturauhassyövän riskiin (Bugoye ym., 2023). Eturauhassyöpä voi olla yhteydessä myös Lynchin oireyhtymään (engl. Lynch syndrome) MMR-geenien mutaatioiden kautta (Khan & Cheng, 2022; Oka ym., 2023). Laajassa tutkimuksessa, jossa oli mukana 3607 eturauhassyöpöpotilasta, 17,2 %:lla havaittiin esiintyvän perinnöllisiä ituratamutaatioita (Nicolosi ym., 2019). Mutaatioista 24,3 % oli *BRCA2*-, 14,1 % *CHEK2*-, 9,6 % *ATM*-, 6,4 % *BRCA1*-, 4,5 % *HOXB13*-, 3,4 % *MSH2*-, 3,3 % *TP53*-, 2,7 % *PMS2*-, 2,5 % *PALB2*-, 2,2 % *MSH6*- sekä 0,6 % *RAD51D*- ja 0,3 % *MLH1*-mutaatioita.

Myös ympäristötekijöillä ja elämäntavoilla on merkitystä eturauhassyövän sairastumisriskissä. Tällaisia tekijöitä ovat muun muassa ylipaino ja metabolinen oireyhtymä, pituus, vähäinen fyysinen aktiivisuus, tupakointi, tietyt lääkkeet, karsinogeenit (kuten kemikaalit ja säteily), seksuaalinen aktiivisuus, infektiot ja tulehdukselliset sairaudet sekä ruokavalio. Runsas transrasvojen ja punaisen lihan käyttö tai tulehdusta edistävä ruokavalio (engl. proinflammatory diet) on yhdistetty kohonneeseen eturauhassyövän riskiin. (Benke ym., 2018; Bergengren ym., 2023; Brookman-May ym., 2019; Campi ym., 2019; Islami ym., 2014; Jian ym., 2018; Lophatananon ym., 2017; Michels ym., 2021; Mohseni ym., 2019; Motterle ym., 2022; Parra-Soto ym., 2022; Purcell ym., 2022; Rawla, 2019).

1.2.4 Diagnosointi

Eturauhassyöpää epäillessä alustavaan riskiarviointiin kuuluu PSA-testaus sekä tuseeraus eli eturauhasen tunnustelu (engl. rectal examination/digital rectal exam, DRE). Lisäksi kartoitetaan henkilökohtaiset riskitekijät (Cornford ym., 2024). Mikäli eturauhassyöpään viittaavia löydöksiä havaitaan, ohjataan potilas jatkotutkimuksiin, jotka voivat sisältää esimerkiksi magneettikuvauksen tai virtsatestin. Jos näiden tutkimusten perusteella syöpäepäily säilyy, ohjataan potilas koepalan ottoon. Tulosten perusteella saadaan selville syövän tyyppi ja levinneisyys sekä potilaan ennuste (James ym., 2024). Eturauhassyövän väestötason seulontaa oireettomille miehille ei nykyään suositella (Jackson ym., 2022).

Eturauhassyöpää seulotaan PSA-testin avulla, joka on merkittävä varhaisen eturauhassyövän indikaattori ja yleisesti käytetty biomarkkeri (Guo ym., 2021). PSA-testissä potilaalta otetaan verinäyte, josta määritetään eturauhasen tuottama PSA-proteiinin määrä (Sekhoacha ym., 2022). PSA-arvoa 4 µg/l pidetään yleisenä riskirajana eturauhassyövälle, vaikka selkeitä raja-arvoja terveiden miesten ja eturauhassyöpäpotilaiden välillä ei ole (Duffy, 2011). PSA-arvon ollessa 4–10 µg/l, arviolta noin 35–40 % testatuista miehistä sairastaa eturauhassyöpää. Vaikka PSA on nykyisin laajasti käytetty biomarkkeri maailmalla, se ei ole täydellinen (Guo ym., 2021). PSA-arvoon voivat vaikuttaa monet tekijät, kuten krooninen tulehdus, eturauhasen liikakasvu, lääkitys tai muut kasvaimet. Lisäksi joidenkin asiantuntijoiden mukaan PSA ei ole ihanteellinen markkeri eturauhassyövän alkuvaiheen havaitsemiseen, koska PSA-seulonta saattaa johtaa hitaasti etenevän syövän yli-diagnosointiin ja tarpeettomaan hoitoon (Duffy, 2011).

Eturauhassyövän havaitsemista ja seurantaan tehostaa moniparametrinen magneettikuvaus (engl. multiparametric magnetic resonance imaging, mpMRI) (Cornford ym., 2024; James ym., 2024). Magneettikuvaus yhdistettynä kohdennettuun PSA-testaukseen voi vähentää eturauhassyövän yli-diagnosointia. Kiertävä kasvain-DNA (engl. circulating tumor DNA, ctDNA) on myös käyttökelpoinen diagnostinen työkalu erityisesti pitkälle edenneen eturauhassyövän toteamisessa (Jayaram ym., 2021). Metastaattista eturauhassyöpää diagnosoidaan kuvantamismenetelmillä, kuten röntgenkuvauksella, tietokonetomografialla (TT), magneettikuvauksella (MRI) tai luuston gammakuvaus (engl. radionuclide bone scintigraphy/bone scan, BS) (James ym., 2024). PSMA eli prostataspesifinen solukalvon

proteiini (engl. prostate-specific membrane antigen, PSMA) on melko uusi merkkiaine, jota hyödynnetään PSMA-PET-TT-kuvauksessa (James ym., 2024; Sandhu ym., 2021).

Eturauhassyövän heterogeenisen luonteen vuoksi sen diagnosointi ja hoito voivat olla haastavia (Haffner ym., 2020). Hoito määräytyy tapauskohtaisesti muun muassa kasvaimen koon ja levinneisyyden, PSA-pitoisuuden, mahdollisten liitännäissairauksien sekä potilaan iän mukaan (James ym., 2024; Sekhoacha ym., 2022). Eturauhassyövän kasvaimen vaihe määritetään TNM-luokituksella (engl. TNM classification) ja Gleason-luokituksella (engl. Gleason grading). Gleason-luokitus on keskeinen työkalu eturauhassyövän riskin arvioinnissa, koska se mittaa eturauhassyöpäkudoksen erilaistumisen astetta (Sinnott ym., 2017).

Gleason-luokituksessa kasvaimen luokitteluryhmiä (engl. grade group) on viisi (Epstein ym., 2016; James ym., 2024). Ryhmä 1 kuvaa hyvin matalariskistä ja ennusteeltaan suotuisaa tautia, kun taas ryhmä 5 vastaa erittäin korkean riskin ja aggressiivisen eturauhassyövän tautimuotoa. Gleason-pisteytys (engl. gleason score) vaihtelee arvojen 6–10 välillä ja jakautuu seuraavasti: ryhmä 1: gleason-pisteet ≤ 6 , ryhmä 2: gleason-pisteet 7 (3 + 4), ryhmä 3: gleason-pisteet 7 (4 + 3), ryhmä 4: gleason-pisteet 8 (4 + 4, 3 + 5, 5 + 3) ja ryhmä 5: gleason-pisteet 9–10 (Epstein ym., 2016). Ensimmäinen luku gleason-pisteissä kuvaa solujen yleisintä kasvutapaa ja toinen luku toiseksi yleisintä kasvutapaa tai huonoimmin erilaistunutta komponenttia.

1.2.5 Hoitomuodot

Yleensä eturauhassyöpä todetaan vaiheessa, jossa kasvain on paikallinen. Tällöin hoitovaihtoehtoina ovat aktiivinen seuranta, radikaali prostatektomia eli eturauhasen poistoleikkaus (engl. radical prostatectomy), ulkoinen sädehoito tai brakyterapia eli sisäinen sädehoito (engl. brachytherapy) (Duffy, 2011; Hamdy ym., 2023). Matalariskistä eturauhassyöpää voidaan hoitaa aktiivisella seurannalla (Cornford ym., 2024). Tämä tarkoittaa säännöllistä seurantaa, jossa yhdistetään PSA-testaus, kuvantaminen ja kliininen tutkimus (James ym., 2024). Aktiivinen seuranta vähentää tarpeetonta hoitoa ja hoidosta mahdollisesti aiheutuvia haittavaikutuksia. Eturauhasen poistoleikkaus voidaan tehdä joko avoimena leikkauksena tai laparoskooppisesti eli vatsaontelon tähytysleikkauksena (Sekhoacha ym., 2022). Brakyterapiassa radioaktiiviset lähteet sijoitetaan suoraan eturauhaskudokseen tai sen läheisyyteen. Ulkoisessa sädehoidossa säteily kohdistetaan ulkopuolelta eturauhaseen.

Viimeaikaisen 15 vuoden seurantatutkimuksen mukaan paikallisen eturauhassyövän potilailla ei ollut merkittävää eroa eturauhassyöpäkuolleisuudessa eri hoitomuotojen (aktiivinen seuranta, eturauhasen poistoleikkaus tai sädehoito) välillä (Hamdy ym., 2023). Aktiivinen seuranta näyttää kuitenkin johtavan useammin taudin etenemiseen tai etäpesäkkeiden muodostumiseen. Jos paikallinen eturauhassyöpä on keskivaikea tai vaikea, aktiivisen seurannan rinnalle suositellaankin muita hoitokeinoja (Cornford ym., 2024). Yleisesti ottaen eturauhassyövän ennuste on hyvä, jos kasvain on paikallinen ja syöpäkudos on erilaistunut (Eggerer ym., 2010). Paikallisen eturauhassyövän potilailla, joilla on matala tai kohtalainen uusiutumiskiriski ja, joiden sairaus on havaittu ja hoidettu ajoissa, ennuste on erinomainen: noin 99 % on elossa 10 vuoden kuluttua (Rebello ym., 2021). Vaikka eturauhassyövän varhainen testaus ja hoitomenetelmät ovat kehittyneet, arviolta noin 20–40 % eturauhassyövästä uusiutuu (engl. biochemical recurrence) (Sandhu ym., 2021).

Mikäli eturauhassyöpä todetaan vasta myöhemmässä vaiheessa tai sairaus etenee, tarvitaan muita hoitomuotoja, kuten hormonihoito eli androgeenideprivaatiohoito (Damber & Aus, 2008; James ym., 2024). Tavallisia androgeenideprivaatiohoitoja ovat esimerkiksi GnRH-agonistit ja -antagonistit (engl. gonadotropin-releasing hormone agonists and antagonists) (Freedland & Abrahamsson, 2021) tai orkiektomia eli kivesten kirurginen poisto (engl. orchidectomy) (James ym., 2024). GnRH-agonistit ja -antagonistit alentavat follikkelia stimuloivan hormonin (FSH) ja luteinisoivan hormonin (LH) tasoja, mikä puolestaan vähentää testosteronin tuotantoa kastrootiasolle (Freedland & Abrahamsson, 2021). Eturauhassyövän hoitotulos on yleensä parempi, kun hormonihoito yhdistetään sädehoitoon (Rebello ym., 2021). Hormonihoito lieventää edenneen eturauhassyövän oireita 70–80 %:ssa tapauksista, mutta usein noin kahden vuoden kuluessa edennyt tauti etenee androgeeneista riippumattomaan tilaan (engl. androgen-independent state/androgen independent prostate cancer, AIPC) (Damber & Aus, 2008). Eturauhassyövän hoitokeinojen saatavuudessa on edelleen suuria eroja matalan ja korkean tulotason maiden välillä (James ym., 2024).

Metastaattisen eturauhassyövän toteamisen jälkeinen elinaika on noussut korkean tulotason maissa arviolta noin 2,5 vuodesta noin 5 vuoteen sen jälkeen, kun käyttöön otettiin uusia hormonaalisia valmisteita (engl. hormonal agents), kuten abirateroni ja entsalutamidi sekä radium-223-radioaktiivinen lääke ja solunsalpaajia, kuten dosetakseli ja kabatsitakseli (Davis ym., 2019; Gillessen ym., 2020; James ym., 2017, 2024; Rydzewska ym., 2017; Sweeney ym., 2015; Vale ym., 2016). Eturauhassyövän uusimpiin hoitomuotoihin kuuluu kohdennettu

radionuklidihoito (engl. targeted radioligand therapy, RLT), kuten Lutetium-177 (^{177}Lu)-PSMA-617, sekä PARP-estäjät (engl. PARP inhibitors) eli poly(ADP-riboosi)-polymeraasien estäjät. Nämä hoidot voivat olla tehokkaita erityisesti metastaattisen kastroatioresistentin eturauhassyövän (engl. metastatic castration-resistant prostate cancer, mCRPC) hoidossa (James ym., 2024; Longoria ym., 2024; Sartor ym., 2021). PARP-estäjien lupaavimpia kohteita ovat DDR-geenit, kuten *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM* ja *CHEK2* (James ym., 2024).

1.3 ANO7

1.3.1 ANO7 ja TMEM16-proteiiniperhe

Anoktamiini 7 (engl. Anoctamin 7) on transmembraaniproteiini, jota koodaa *ANO7*-geeni (Kunzelmann ym., 2019). Tämä geeni tunnetaan myös nimillä *TMEM16G* (engl. *Transmembrane protein 16G*), *NGEP* (engl. *New Gene Expressed in Prostate*) sekä *D-TMPP* (engl. *Dresden-transmembrane protein of the prostate*). *ANO7* kuuluu *TMEM16*-perheeseen, johon kuuluu kymmenen transmembraaniproteiinia (*ANO1-ANO10*). Anoktamiinit toimivat kalsiumaktivoituneina kloridikanavina (engl. Ca^{2+} -activated Cl^- channels) ja/tai fosfolipidien skramblaaseina (engl. phospholipid scramblase). Skramblaasit kuljettavat lipidejä kaksisuuntaisesti pitoisuusgradientin mukaisesti (Falzone ym., 2018).

Nimitys anoktamiini viittaa alkuperäiseen käsitykseen, että nämä proteiinit toimivat anioniselektiivisinä kanavina ja muodostuvat kahdeksanosaisesta transmembraanirakenteesta (Yang ym., 2008). Anoktamiinien on havaittu osallistuvan useisiin biologisiin prosesseihin, kuten kasvaimen muodostumiseen, sileän lihaksen supistumiseen, hermosolujen herkkyyden säätelyyn sekä epiteelisolujen eritystoimintaan (Benarroch, 2017). Vaikka *ANO7*:n tarkka toiminta eturauhaskudoksessa on vielä osin tuntematon (Guo ym., 2021), sen on havaittu toimivan skramblaasina (Suzuki ym., 2013). Tätä tukevat havainnot *ANO7*-proteiinin ja tiettyjen kalvorakkuloiden (engl. vesicles) kuljetusproteiinien välisestä vuorovaikutuksesta (Kaikkonen ym., 2020). Sen sijaan ei ole varmuutta siitä, toimiiko *ANO7* myös ionikanavana (Guo ym., 2021). Muiden anoktamiinien toiminta tunnetaan paremmin.

ANO1 ja *ANO2* toimivat pääasiassa Ca^{2+} -aktivoituina Cl^- -kanavina (Schroeder ym., 2008; Yang ym., 2008). *ANO6* toimii Ca^{2+} -riippuvaisena fosfolipidiskramblaasina (Suzuki ym., 2010) ja sillä on keskeinen tehtävä veren hyytymisen säätelyssä verenvuotosairaus Scottin

oireyhtymässä (engl. Scott syndrome) (Suzuki ym., 2010; Zwaal ym., 2004). ANO6 osallistuu myös muun muassa epiteelisolujen ja makrofagien solukuolemaan (Ousingsawat ym., 2019) sekä solunulkoisten kalvorakkuloiden (engl. extracellular vesicles, EVs) vapautumisen säätelyyn mahdollisesti skramblaasiaktiivisuuden avulla (Whitlock & Hartzell, 2017). ANO3, ANO4, ANO5 sekä ANO9 toimivat myös pääasiassa skramblaaseina (Gyobu ym., 2017; Suzuki ym., 2013). ANO9 on lisäksi kationikanava, jota aktivoi cAMP-riippuvainen proteiinikinaasi A (PKA) (Kim ym., 2018). Anoktamiiniperheen useiden jäsenten (ANO1, ANO5, ANO6, ANO7 ja ANO9) on havaittu olevan yhteydessä solujen lisääntymiseen (engl. cell proliferation) ja syövän kehittymiseen (Kunzelmann ym., 2019).

1.3.2 ANO7 ja eturauhassyöpä

ANO7-geenin kromosomaalinen sijainti 2q37.3 (Das ym., 2007) on tunnistettu vahvaksi eturauhassyövän riskilokukseksi suomalaisissa perinnöllisen eturauhassyövän suvuissa (engl. hereditary prostate cancer family, HPCa) (Cropp ym., 2011). *ANO7* on alun perin tunnistettu eturauhasspesifiseksi geeniksi (Bera ym., 2004) ja sen ilmentymistä havaitaan lähes yksinomaan eturauhaskudoksessa (normaalissa, benignissä ja syöpäkudoksessa) (Das ym., 2008; Mohsenzadegan ym., 2013). Das ym. (2008) tutkimuksessa *ANO7*-proteiinia ilmentyi 91 %:ssa tutkituista eturauhassyöpäsolunäytteistä ja Mohsenzadegan ym. (2013) mukaan kaikki tutkitut näytteet ilmensivät *ANO7*-proteiinia vaihtelevalla voimakkuudella. Tarkemmin katsottuna *ANO7*-geeni ja sen koodaama *ANO7*-proteiini ilmentyvät eturauhasen luminaalisten epiteelisolujen solukalvossa (Metsälä ym., 2023, 2025). Joidenkin tutkimusten mukaan *ANO7* ilmentyy myös tyvisoluissa (Marx ym., 2021; Wahlström ym., 2022). *ANO7*:n on havaittu ilmentyvän heikosti eturauhasen lisäksi joissakin muissa elimissä (Das ym., 2008). *ANO7* liittyy esimerkiksi rintasyövän kehittymiseen ja ennusteeseen (Li ym., 2015).

ANO7 vaikuttaa ilmentyvän voimakkaammin normaalissa ja benignissä eturauhasen kudoksessa kuin pahanlaatuisessa eturauhassyövässä (Mohsenzadegan ym., 2013). Useissa tutkimuksissa on havaittu molempien, *ANO7*:n lähetti-RNA:n (engl. messenger RNA, mRNA) (Jhun ym., 2017; Metsälä ym., 2023; Sinnott ym., 2017) ja proteiinin ilmentymisen (Marx ym., 2021; Metsälä ym., 2023; Mohsenzadegan ym., 2013) olevan heikentynyttä edenneessä eturauhassyövässä. Matala *ANO7*-ilmentymisen taso voikin ennustaa eturauhassyövän metastoittamista etenemistä (Chandran ym., 2007; Walker ym., 2017). *ANO7*-ilmentymisen tason

on havaittu korreloivan käänteisesti Gleason-luokituksen ja PSA-tason kanssa (Mohsenzadegan ym., 2015).

Toisaalta Das ym. (2008) eivät havainneet yhteyttä ANO7-ilmentymisen ja syövän asteen välillä. Kaikkosen ym. (2018) tutkimuksessa korkea *ANO7*:n lähetti-RNA:n ilmentyminen liittyi heikompaan eloonjäämisennusteeseen. Puolestaan Marx ym. (2021) raportoi, että ANO7-proteiinin heikentynyt ilmentyminen oli yhteydessä huonompaan ennusteeseen. Arvellaan, että *ANO7*:llä on merkitystä varsinkin eturauhassyövän varhaisessa vaiheessa ja benignissä eturauhaskudoksessa (Löf ym., 2025). Yleisesti voidaan todeta, että *ANO7* on mahdollinen eturauhassyövän alttiusgeeni (Kaikkonen ym., 2018).

ANO7 vaikuttaisi toimivan kasvunrajoitegeeninä eturauhasessa, jolloin sen heikentynyt ilmentyminen voisi edistää eturauhassyövän etenemistä (Wahlström ym., 2022). *ANO7*:n toimintaa kasvunrajoitegeeninä vahvistaa se, että *ANO7*:llä on huomattu olevan merkitystä lipidimetabolian säätelyssä ja androgeenireseptorien signaloinnissa eturauhasen luminaalisissa soluissa erityisesti matala-asteisessa syövässä (Metsälä ym., 2025). *ANO7*:n lähetti-RNA ilmentyy androgeeniriippuvaisissa eturauhassolulinjoissa (engl. androgen-dependent prostate cancer cell lines), kuten LNCaP, mutta ei androgeeniriippumattomissa solulinjoissa (engl. androgen-independent cell lines) PC-3 ja DU145 (Bera ym., 2004). Tämä viittaa siihen, että androgeenireseptorin signalointi (engl. androgen receptor signaling pathway) säätelee *ANO7*-geenin ilmentymistä. Lipidimetabolian säätelyn lisäksi *ANO7*:n uskotaan vaikuttavan mitokondrioiden toimintaan (Löf ym., 2025). Edenneessä eturauhassyövässä syöpäsolut vaikuttaisivat olevan metabolisesti joustavampia (Beltran ym., 2019; Wei ym., 2024), eivätkä näin ollen olisi yhtä riippuvaisia *ANO7*:n toiminnasta (Metsälä ym., 2025). *ANO7*-geenin tarkka toimintamekanismi on vielä selvittämättä.

ANO7-proteiini voisi tulevaisuudessa olla mahdollinen biomarkkeri matalan riskin eturauhassyöpöpotilaille (Guo ym., 2021) ja auttaa eturauhassyövän luokittelussa ja hoidon yksilöllistämässä. Lisäksi *ANO7* on lupaava kohde immunoterapialle, kuten vasta-ainehoidolle (engl. antibody-based immunotherapy) tai T-soluhoidolle (engl. T-cell-mediated immunotherapy). Monoklonaaliset vasta-aineet (engl. monoclonal antibody, mAb) voisivat muodostaa uuden hoitostrategian PSMA-vasta-ainepohjaisen immunoterapian rinnalle. T-soluhoido (rokote) on toinen mahdollinen tulevaisuuden hoitostrategia, sillä siinä *ANO7*:lle spesifiset T-solut kykenevät hajottamaan *ANO7*:ää ilmentäviä kasvainsoluja (Cereda ym.,

2010). Immunoterapiasta hyötyisivät todennäköisesti erityisesti varhaisen vaiheen eturauhassyöpäpotilaat, koska heillä *ANO7*:n ilmentyminen näyttäisi olevan kasvaimessa korkeampaa (Guo ym., 2021). Polygeeniset riskitestit (engl. polygenic risk scores, PRS) muutamille eturauhassyövän alttiuseeneille ovat todennäköisesti tehokkaampia eturauhassyövän toteamisessa kuin testit, jotka tutkivat yksittäisiä geenivariantteja (engl. monogenic risk scores) (James ym., 2024).

1.3.3 *ANO7*:n rs77559646-variantti

Eturauhassyöpään yhteydessä olevasta 451 riskivariantista neljä paikantuu *ANO7*-geeniin (A. Wang ym., 2023). *ANO7*:n riskivariantit ovat yhden nukleotidin polymorfismeja (engl. single nucleotide polymorphisms, SNPs). *ANO7*-geenin rs77559646-variantti on yhdistetty sekä kohonneeseen eturauhassyöpäriskiin että aggressiiviseen tautiin (Kaikkonen ym., 2018). Kaikkosen ym. (2018) tutkimuksessa tätä varianttia havaittiin 9,4 %:lla tutkituista suomalaisista kastroaatioreistenteistä eturauhassyöpäpotilaista. *ANO7*:n rs77559646-variantin emäsmuutos G > A sijaitsee 5'-silukointialueella (engl. splice region) viisi nukleotidia alavirtaan eksonista 4 (Wahlström ym., 2022). Kyseisen mutaation on havaittu johtavan eksonin 4 ohittamiseen silukoinnin aikana ja aiheuttavan apikaalisen *ANO7*-proteiinin ilmentymisen menettämisen eturauhasen luminaalisissa epiteelisoluissa. Homotsygooteilla rs77559646-variantin kantajilla *ANO7*-proteiinin ilmentyminen näyttäisi häviävän kokonaan.

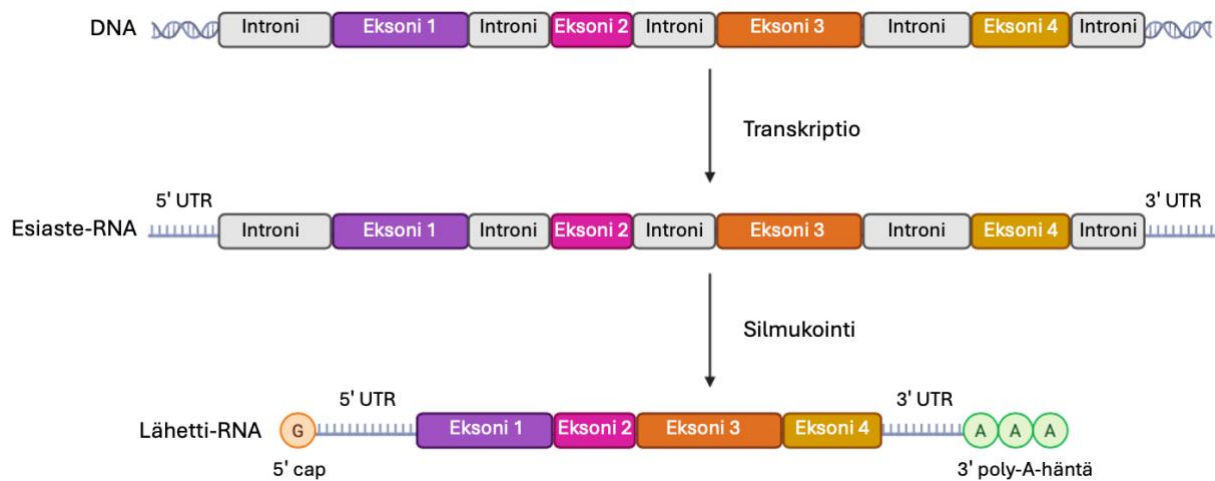
ANO7:n lähetti-RNA:n on havaittu jäävän silukoinnin jälkeen tumaan *ANO7*:ää ilmentävien epiteelisolujen sisälle, mikä voisi selittää proteiinin ilmentymisen menettämisen (Metsälä ym., 2023). Arviolta yli 70 %:ssa *ANO7*:n transkripteista tapahtuu tumaan jäämistä. Yleisesti ottaen stabiilin ja pitkän RNA:n odotetaan siirtyvän tumasta sytoplasmaan, ellei sillä ole jokin tumaan jäämistä edistävä tekijä (Palazzo & Lee, 2018). Yksi tällainen mekanismi voi olla intronin säilyttäminen (engl. intron retention) (Dvinge & Bradley, 2015; Yap ym., 2012). Rs77559646-variantin mutaation on havaittu aiheuttavan eksonin 4 ohituksen lisäksi intronien 3, 4 ja 5 säilyttämistä (Wahlström ym., 2022), mikä saattaa selittää RNA:n kertymistä tumaan. Kuitenkin tarkka *ANO7*:n lähetti-RNA:n tumaan jäämistä mekanismi ja sen biologinen merkitys ovat edelleen selvittämättä (Metsälä ym., 2023).

Rs77559646-variantti vaikuttaa olevan yhteydessä hyvään vasteeseen dosetakselihoidolle metastaatissa kastroatioresistentissä eturauhassyövässä (Kaikkonen ym., 2019). Mahdollinen selitys tälle havainnolle voi liittyä siihen, että *ANO7* olisi androgeenien säätelemä geeni (engl. androgen regulated gene, ARG) (Kiessling ym., 2005), koska dosetakselin ja muiden taksaanien vaikutuksen arvellaan perustuvan osittain androgeenireptorin tumaan kuljetukseen ja aktivaation estoon (Bai ym., 2019).

1.4 Silmukointi

1.4.1 Esiaste-RNA:n silmukointi ja spliseosomaaliset snRNA:t

Transkription jälkeisessä esiaste-RNA:n (engl. precursor messenger RNA, pre-mRNA) silmukointiprosessissa (engl. pre-mRNA splicing process) poistetaan proteiinia koodaamattomat alueet eli intronit ja liitetään koodaavat alueet eli eksonit yhteen (kuva 4) (Black, 2003). Valmis lähetti-RNA kuljetetaan sytoplasmaan ja muutetaan proteiiniksi translaatioissa. Silmukoinnin onnistumiseen vaikuttavat useat tekijät, kuten silmukointisignaalien voimakkuus sekä haarautumiskohdan (engl. branch point, BP) ja silmukointikohtien tunnistaminen. Silmukointikohtia ovat 5'-silmukointikohta eli luovuttajakohta (engl. splice donor/5' splice site, 5'ss) ja 3'-silmukointikohta eli vastaanottajakohta (engl. splice acceptor/3' splice site, 3'ss) (Baralle ym., 2009). Muita vaikuttavia tekijöitä ovat silmukointia säätelevät elementit (engl. splicing regulatory elements, SRE), RNA polymeraasi II, solunulkoinen signalointi, nonsense-välitteinen lähetti-RNA:n hajoaminen (engl. nonsense-mediated mRNA decay, NMD) sekä RNA:n sekundaarinen rakenne.



Kuva 4. RNA:n silmukointi. Transkription jälkeen esiaste-RNA:sta poistetaan intronit. Eksonit liitetään yhteen, jolloin muodostuu lähetti-RNA. Kuva muokattu (Biorender).

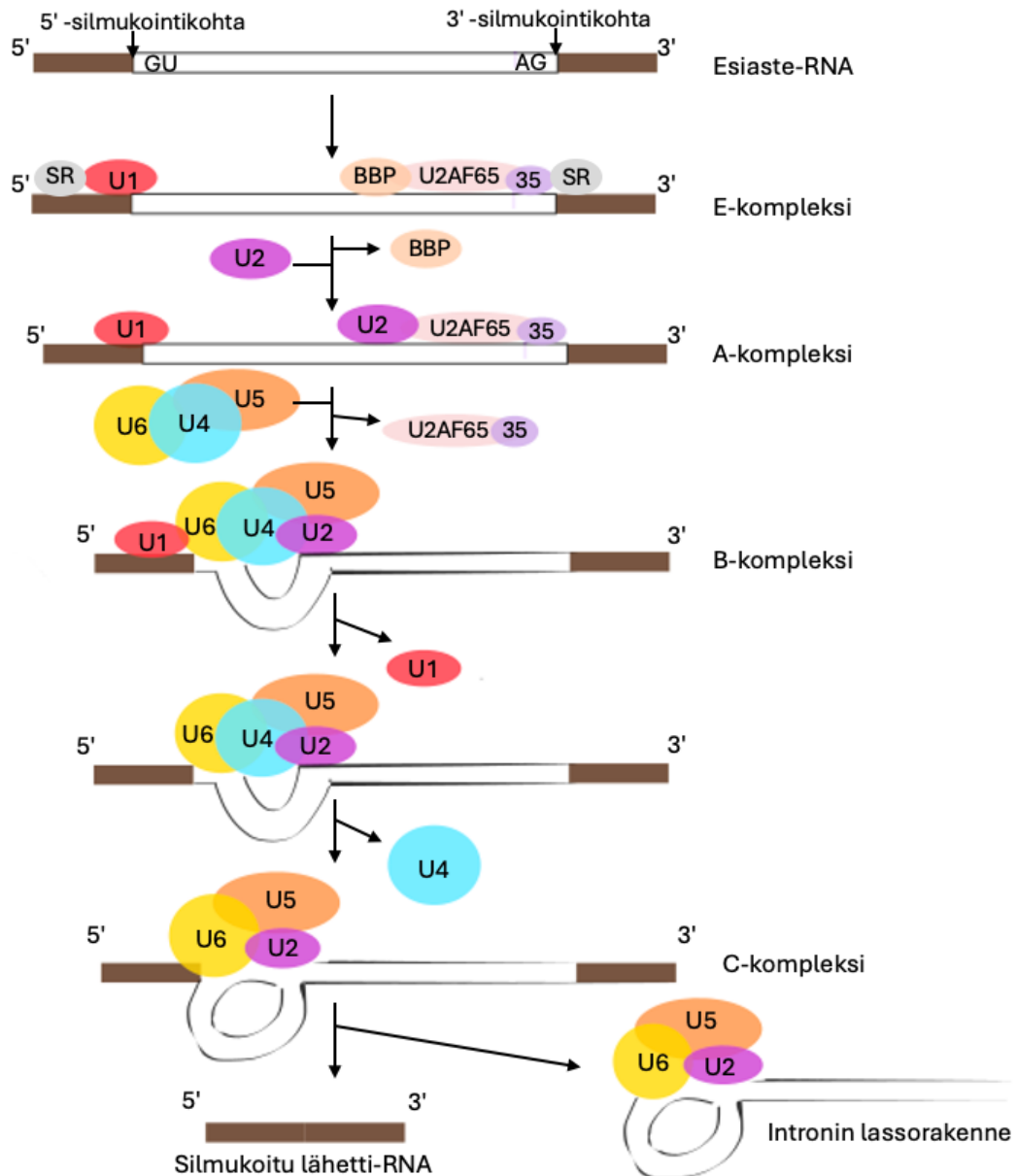
Jotta silmukointi onnistuisi, spliseosomin eli ribonukleoproteiini-kompleksin (engl. spliceosome) on tunnistettava eksonit ja intronit oikein ja poistettava intronit (De Conti ym., 2013). Spliseosomi koostuu uridiinipitoisista spliseosomaalisista ribonukleoproteiineista (engl. small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs), joita ovat U1, U2, U4/U6 ja U5 (kuva 5) (Wahl ym., 2009). Ribonukleoproteiinit sisältävät spliseosomaalisen snRNA-molekyylin (engl. small nuclear RNA, snRNA) ja vaihtelevan määrän proteiineja. U4/U6:ssa on kaksi snRNA-molekyyliä. Ihmisen spliseosomi sisältää noin 45 snRNA:ihin liittyvää proteiinia ja arviolta yli 200 muuta proteiinia (Hegele ym., 2012; Wahl ym., 2009). Spliseosomaalisten ribonukleoproteiinien ensimmäinen tehtävä on tunnistaa ja olla vuorovaikutuksessa 5'- ja 3'-silmukointikohtien kanssa (De Conti ym., 2013). Toisena tehtävänä on muodostaa silmukointikompleksi ja toteuttaa varsinainen silmukointireaktio.

Silmukointi alkaa, kun U1-snRNA:n 5'-pää pariutuu (engl. base pairing) 5'-silmukointikohdan kanssa, joka sijaitsee eksonin ja intronin liitosalueella välillä -3 ja +6 (De Conti ym., 2013; Horowitz & Krainer, 1994). Kolme ensimmäistä 5'-silmukointikohdan emästä kuuluu eksonille ja loput kuusi emästä intronille. SR-proteiineilla (engl. serine/arginine-rich proteins, SR proteins) on merkittävä rooli tässä vaiheessa, koska useimmat spliseosomin RNA-RNA-vuorovaikutukset ovat heikkoja ja tarvitsevat rinnalleen proteiineja (Wahl ym., 2009). Lisäksi silmukoinnin alkuvaiheessa SF1/BBP-silmukointitekijä (engl. splicing factor 1, SF1/branch point binding protein, BBP) ja U2AF-tekijän (engl. U2 auxiliary factor) U2AF65- ja U2AF35-alayksiköt sitoutuvat haarautumiskohdan sekvenssiin (engl. branch point sequence, BPS) ja

polypyrimidiinitalle (engl. polypyrimidine tract). Näiden vuorovaikutusten muodostama kompleksi tunnetaan nimellä E-kompleksi.

E-kompleksin muodostumisen jälkeen U2-snRNA sitoutuu haarautumiskohtaan ja muodostuu A-kompleksi (Wahl ym., 2009). Tämä vaihe vaatii ATP:tä. Seuraavaksi A-kompleksiin liittyy trimeeri U4/U6.U5, jolloin muodostuu B-kompleksi. U6-snRNA on keskeinen spliseosomin aktivoitumisessa, mutta tässä vaiheessa sen katalyyttisesti tärkeät alueet ovat vielä pariutuneina U4-snRNA:n kanssa. B-kompleksi siis sisältää kaikki snRNP:t, mutta spliseosomi on katalyyttisesti inaktiivinen ja vaatii rakennemuutoksia. Kun U1- ja U4-snRNP:t vapautuvat, muodostuu aktiivinen spliseosomi. U6-snRNA pääsee pariutumaan 5'-silmukointikohdan kanssa, kun U1-snRNP vapautuu. U4-snRNP:n poistuessa U6-snRNA pariutuu U2-snRNA:n kanssa ja nämä muodostavat katalyyttisesti aktiivisen kohdan. U4-snRNP:n irtoaminen säätelee siis spliseosomin siirtymistä aktiiviseen tilaan (Konarska ym., 2006). Samalla osa U6-snRNP:sta laskostuu hiuspinnimäiseksi rakenteeksi (engl. intramolecular stem loop, U6-ISL) (Wahl ym., 2009).

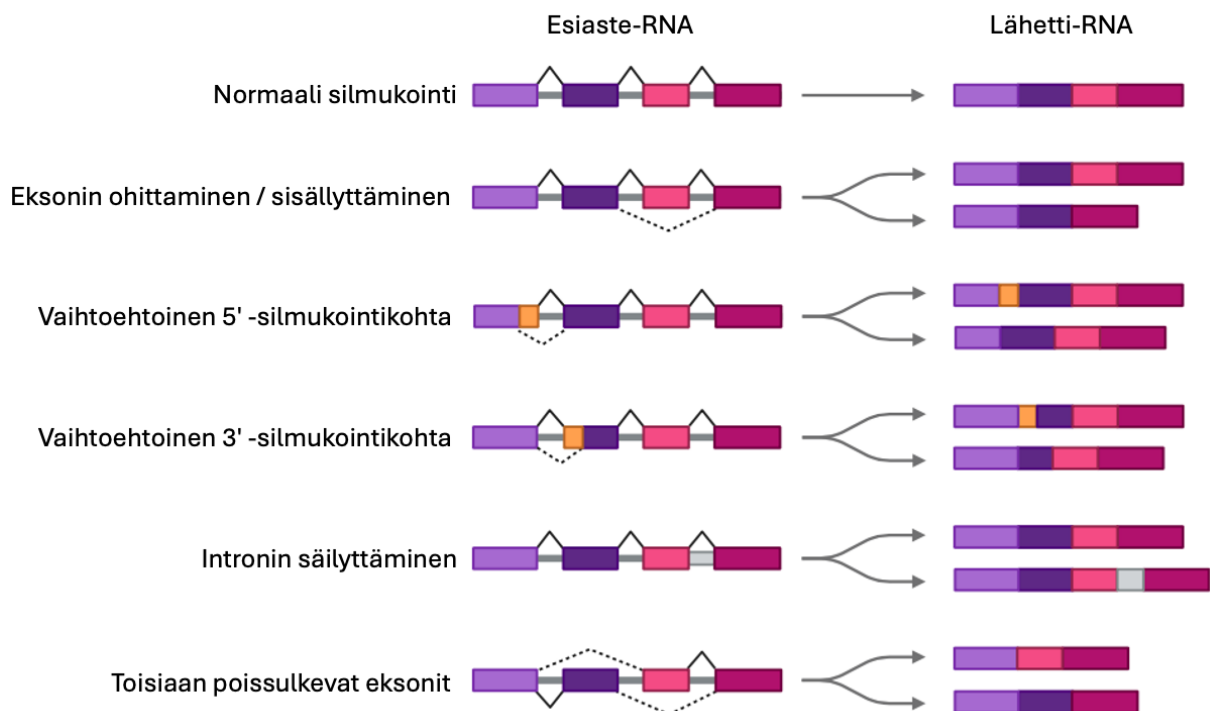
Aktiivinen spliseosomi käy läpi ensimmäisen katalyyttisen vaiheen ja vaihtoesteröinnin (engl. transesterification reaction), jolloin muodostuu C-kompleksi. Tässä vaiheessa haarautumiskohdan adeniinin 2'-hydroksyyli-ryhmä hyökkää 5'-silmukointikohdan fosfodiesterisidokseen intronissa ja muodostuu lassorakenne (engl. lariat). Lassorakenne syntyy 5'-silmukointikohdan katkaisun seurauksena, jolloin 5'-eksoni erkanee ja muodostuu introni-lasso-3'-eksoni -välituote (engl. intron lariat-3' exon intermediate). Ennen toista katalyyttistä vaihetta spliseosomi käy läpi konformaatiomuutoksia. Toisessa vaihtoesteröintireaktiossa 5'-eksonin 3'-hydroksyyli-ryhmä liitetään 3'-silmukointikohdan fosfodiesterisidokseen, jolloin introni poistuu ja eksonit liitetään yhteen. Lopuksi valmis lähetti-RNA vapautuu ja U2-, U5- ja U6-snRNP:t kierrätetään uudelleen. (Konarska ym., 2006; Wahl ym., 2009).



Kuva 5. Spliseosomin toiminta esiaste-RNA:n silmukoinnissa. Spliseosomi muodostuu viidestä snRNP:stä (U1, U2, U4/U6 ja U5). Ensin E-kompleksissa U1 sitoutuu 5'-silmukointikohtaan. Lisäksi 3'-silmukointikohdan läheisyyteen liitty useita proteiineja: haarautumiskohtaan SF1/BBP, polypyrimidiinitalle U2AF65 ja AG-dinukleotidiin U2AF35. A-kompleksi muodostuu, kun U2 sitoutuu haarautumiskohtaan. Seuraavaksi trimeeri U4/U6.U5 liittyy muodostaen B-kompleksin, jonka jälkeen U1 ja U4 vapautuvat. C-kompleksissa U6 liittyy 5'-silmukointikohtaan ja katalysoi U2:n kanssa intronin irtoamisen lassorakenteena ja eksonien ligaation. Eksoneista muodostuu valmis lähetti-RNA. Kuva tuotettu itse (Lai ym., 2021) kuvan pohjalta Inkscape-ohjelmalla.

1.4.2 Vaihtoehtoinen silmukointi

Vaihtoehtoinen silmukointi (engl. alternative splicing, AS) mahdollistaa sen, että yhdestä geenistä voidaan tuottaa useita proteiini-isoformeja vaihtoehtoisen intronin tai eksonin silmukoinnin seurauksena (Y. Wang ym., 2015). Vaihtoehtoinen silmukointi voidaan jakaa viiteen päätyyppiin (kuva 6) (Black, 2003). Eksoni voidaan joko sisällyttää tai ohittaa (engl. cassette exon/exon inclusion or exon exclusion). Vaihtoehtoiset 5'- ja 3'-silmukointikohtat muokkaavat eksonin pituutta. Introneita voidaan säilyttää lähetti-RNA:han. Toisiaan poissulkevat eksonit (engl. mutually exclusive exon, MXE) tarkoittavat sitä, että vierekkäisistä eksoneista sisällytetään vain toinen. Yhdessä esiaste-RNA:ssa voi esiintyä useita vaihtoehtoisen silmukoinnin kohtia, mikä lisää proteiinien monimuotoisuutta.



Kuva 6. Vaihtoehtoisen silmukoinnin tyypit. Vaihtoehtoisen esiaste-RNA:n silmukoinnin tuloksena syntyy erilaisia lähetti-RNA:n silmukointimuotoja. Kuva muokattu (Biorender).

Arvioidaan, että noin 95 %:lla ihmisen geneistä, jotka sisältävät useamman eksonin, esiintyy vaihtoehtoista silmukointia (Pan ym., 2008). Silmukoinnin säätelyn virheet sekä vaihtoehtoisen silmukoinnin poikkeavuudet on liitetty useisiin sairauksiin (Black, 2003), kuten syöpiin (Anczukow & Krainer, 2016). Eksonin ohittaminen muodostaa 50–60 % syöpien vaihtoehtoista silmukointitapahtumista ja on näin ollen yleisin vaihtoehtoisen silmukoinnin

muoto (Dvinge & Bradley, 2015). Syövässä havaitut silmukointimuutokset johtuvat tyypillisesti mutaatioista silmukointia säätelevissä elementeissä tai muutoksista silmukointikoneiston osissa (Anczukow & Krainer, 2016).

1.4.3 Vaihtoehtoinen silmukointi, *ANO7* ja rs77559646-variantti

ANO7-geenistä tunnetaan kaksi silmukointimuotoa, jotka syntyvät esiaste-RNA:n vaihtoehtoisen silmukoinnin seurauksena. Lyhyt muoto, *ANO7-S* (ENST00000402530.7) koostuu neljästä ensimmäisestä eksonista ja koodaa 179 aminohapon pituista solunsisäistä proteiinia. Pitkä muoto, *ANO7-L* (ENST00000274979.12) koostuu 25 eksonista ja koodaa 933 aminohapon pituista solukalvoproteiinia. *ANO7-S* muodostuu vaihtoehtoisen polyadenylaation (engl. alternative cleavage and polyadenylation) seurauksena intronissa 4, jolloin viimeisen eksonin koodaava alue ulottuu intronin puolelle. (Bera ym., 2004; Das ym., 2007).

ANO7:n rs77559646-variantilla on kaksoisvaikutus riippuen silmukointimuodosta (Wahlström ym., 2022). *ANO7-S* lyhyessä silmukointimuodossa variantti toimii missense-mutaationa, kun taas *ANO7-L* pitkässä muodossa se aiheuttaa silmukointikohdan mutaation. Rs77559646-variantin 5'-silmukointikohdan mutaatio G > A sijaitsee intronin 4 kohdassa +5 (Kaikkonen ym., 2018). *ANO7-L* rs77559646-variantin aiheuttama silmukointikohdan mutaatio johtaa eksonin 4 ohittamiseen ja *ANO7*-proteiinin ilmentymisen menettämiseen eturauhasen luminaalisessa epiteelissä.

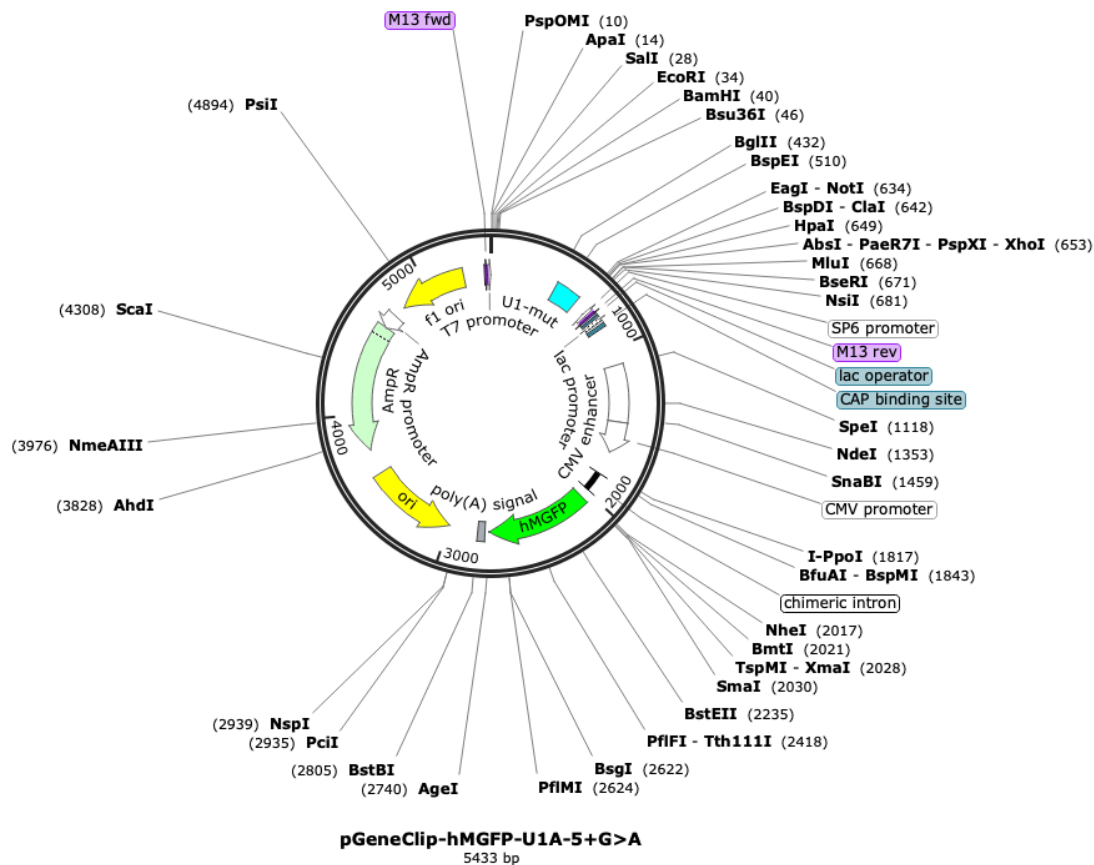
Silmukointikohdan mutaatiot ovat tunnetusti useiden sairauksien taustalla (Black, 2003). Kyseinen 5'-silmukointikohdan kohta (+5) on toiseksi yleisin silmukointia häiritsevä mutaatiokohta ihmisen periytyvissä sairauksissa (Buratti ym., 2007) ja kuuluu myös yleisiin somaattisten syöpämutaatioiden kohteisiin (Shiraishi ym., 2018). Eksonin 4 ohittaminen voidaan selittää eksonin määritelmäteorian (engl. exon definition theory) avulla. Teorian mukaan spliseosomaaliset ribonukleoproteiinit kokoontuvat eksonin molemmille puolille ja kommunikoivat keskenään, jotta oikea silmukointi suoritetaan (De Conti ym., 2013). *ANO7*:n rs77559646-variantin tapauksessa silmukointikohdan mutaatio häiritsee tätä vuorovaikutusta, mikä johtaa vaihtoehtoiseen silmukointiin.

Tarkka molekulaarinen mekanismi, jolla rs77559646-variantti aiheuttaa silmukointihäiriön, ei ole vielä täysin tunnettu. Selitykseksi on ehdotettu rs77559646-variantin komplementaarisuuden heikkenemistä spliseosomaalisen U1-snRNA:n kanssa 5'-silmukointikohdassa (Wahlström ym., 2022). *ANO7*:n villityypillä on yhteensopimaton emäs (engl. mismatch) A > C kohdassa +4 verrattuna konsensussekvenssiin 5'-silmukointikohdassa (engl. consensus 5' splice site), mutta tämä muutos ei vielä häiritse silmukointia. Rs77559646-variantilla on tämän lisäksi yksi ylimääräinen mutaatio G > A kohdassa +5. Kyseisen mutaation uskotaan heikentävän merkittävästi spliseosomaalisten U1- ja U6-snRNA:iden sitoutumista (Kandels-Lewis & Séraphin, 1993; Zhuang & Weiner, 1986) ja johtavan tätä kautta eksonin 4 ohittamiseen.

1.5 Tutkimuksen tavoite ja hypoteesi

ANO7-geenin tarkka toimintamekanismi eturauhassyövässä on ollut pitkään osittain tuntematon. Tutkimuksella pyritään ymmärtämään syvemmin *ANO7*-geenin rs77559646-variantin toimintaa. Variantin toiminnan selvittäminen voisi olla merkittävää aggressiivisen eturauhassyövän hoidon kannalta. *ANO7* ja sen variantti voisivat tulevaisuudessa toimia diagnostisina biomarkkereina sekä mahdollisina lääkekohteina. Eturauhassyövän hoidon suurimpia haasteita on erottaa aggressiiviset tapaukset lievemmistä varhaisessa vaiheessa, jotta hoitoa voidaan kohdentaa tarkemmin ja välttää hitaasti etenevissä tapauksissa tarpeetonta hoitoa.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on selvittää, voidaanko *ANO7*:n rs77559646-variantin aiheuttama silmukointivirhe korjata muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snRNA:illa. Spliseosomaalisiin U1- ja U6-snRNA:ihin tehdään kohdennettuja mutaatioita, joiden oletetaan parantavan niiden komplementaarisuutta rs77559646-variantin 5'-silmukointikohdan kanssa. Hypoteesina on, että silmukointivirhettä voitaisiin korjata muokatulla U1-snRNA:lla ja, että korjaus tehostuisi muokattujen U1- ja U6-snRNA:iden yhteisvaikutuksesta. Tätä lähestymistapaa ei ole tutkittu aikaisemmin *ANO7*:n rs77559646-variantin yhteydessä, joten tutkimus tarjoaa uutta tietoa variantin mahdollisesta soveltuvuudesta geeniterapian kohteeksi.



Kuva 8. U1 mut 1 -plasmidin (pGeneClip-hMGFP-U1A-5+G>A) plasmidikartta. Kuva tuotettu SnapGene Viewer -ohjelmalla.

2.1.2 Alukkeiden suunnittelu ja valmistus

Puuttuvia spliseosomaalisia snRNA-plasmideja (U1 mut 2, U6 WT, U6 mut 1 ja U6 mut 2) varten suunniteltiin ja tilattiin alukkeet. U1 mut 2 -plasmidin alukkeet suunniteltiin PrimerX-ohjelmalla (Bioinformatics). U1 mut 1 -plasmidin sekvenssistä kopioitiin pätkä GCAGAGGCCCAAGATCTCATATTACCTGGCAGGGGAGAT (liite 1) ja mutaation koodiksi laitettiin T23G, mikä tarkoitti, että T-emäs mutatoitiin G-emäkseksi kohdassa 23. U1 mut 2 -alukkeiksi valikoitui ensimmäinen ehdotettu alukepari (liite 2).

U6 WT -plasmidin alukkeet suunniteltiin In-Fusion Cloning Primer Design Tool -ohjelmalla (Takara Bio). Projektin tyypiksi valittiin kloonauksen ja koko U1 mut 1 -plasmidin sekvenssi kopioitiin kohdevektorin kenttään. Valittiin linearisointi PCR:llä ja merkittiin U1 mut 1 -sekvenssin mitaksi 438 bp–602 bp. Inertiksi laitettiin tulevan U6 WT -plasmidin sekvenssi

GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGAGAAGATTAGC
ATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT (liite
3). Tulokseksi saatiin kaksi alukeparia, pGeneClip ja U6_pGeneClip_InF (liite 2). Alukeparia
pGeneClip käytettäisiin U1 mut 1 -sekvenssin poistamiseen ja alukeparia U6_pGeneClip_InF
U6 WT -sekvenssin lisäämiseen (liite 3). U6 mut 1- ja U6 mut 2 -plasmidien alukkeet
suunnitteli Christoffer Löf (liite 2). Valmiit alukkeet saapuivat noin 25 nmol pitoisuuksina. Ne
laimennettiin ensin 100 µM pitoisuuteen nukleasivapaalla vedellä. Alukkeita vorteksoitiin 30
sekuntia, jonka jälkeen ne laimennettiin vielä 10 µM lopulliseen pitoisuuteen.

2.1.3 U6-snRNA-plasmidin valmistus

Plasmideista valmistettiin ensin spliseosomaalinen U6-snRNA-plasmidi (U6 WT -plasmidi).
U6 WT -plasmidin valmistus aloitettiin tekemällä erilliset CloneAmp HiFi PCR -reaktiot
alukkeille pGeneClip ja U6_pGeneClip_InF. Molempiin reaktioihin lisättiin 25 µl CloneAmp
HiFi PCR Premixiä (Takara Bio; vanhentunut 2.2020) ja 21,2 µl nukleasivapaata vettä.
CloneAmp HiFi PCR Premix sisälsi DNA-polymeraasin, puskurin ja
deoksiribonukleotiditriposfaatit eli dNTP:t. PGeneClip-reaktioon lisättiin 10 ng (1 µl) U1 mut
1 -plasmidia ja 1,4 µl molempia alukkeita pGeneClip_F (10 µM) ja pGeneClip_R (10 µM).
U6_pGeneClip_InF-reaktioon lisättiin 1 µl cDNA:ta (ANO7 rs77559646 + U1 mut 1) ja 1,4 µl
molempia alukkeita U6_pGeneClip_InF_F (10 µM) ja U6_pGeneClip_InF_R (10 µM).

Näytteet laitettiin omiin PCR-laitteisiin (Veriti Dx 96-well Thermal Cycler, Applied
Biosystems). Molempien PCR-ajojen denaturaatio oli 98 °C 10 sekuntia ja annealing 60 °C 15
sekuntia. PGeneClip ekstensio oli 72 °C 5 minuuttia ja U6_pGeneClip_InF 72 °C 15 sekuntia.
Ekstension ajat vaihtelivat PCR-tuotteen koon mukaan (1 min/kb). PGeneClip pitäisi antaa 5
kb PCR-tuote ja U6_pGeneClip_InF 100 bp tuote. Vaiheet toistettiin 35 kertaa ja ajon lopussa
näytteet jäädytettiin 10 °C:een.

PCR-tuotteiden spesifisyyttä tarkasteltiin agarosigeelielektroforeesilla. Ensin valmistettiin
10x TBE-puskuri eli Tris-boraatti-EDTA -puskuri, johon tuli 108 g
Tris(hydroksimetyyli)aminometaania, 55 g boorihappoa ja 9,3 g EDTAa
eli etyleenidiamiinitetraetikkahappoa ja mQ-vettä 1 litran tilavuuteen asti. Valmiista 10x TBE-
puskurista laimennettiin 1x käyttölaimekseen.

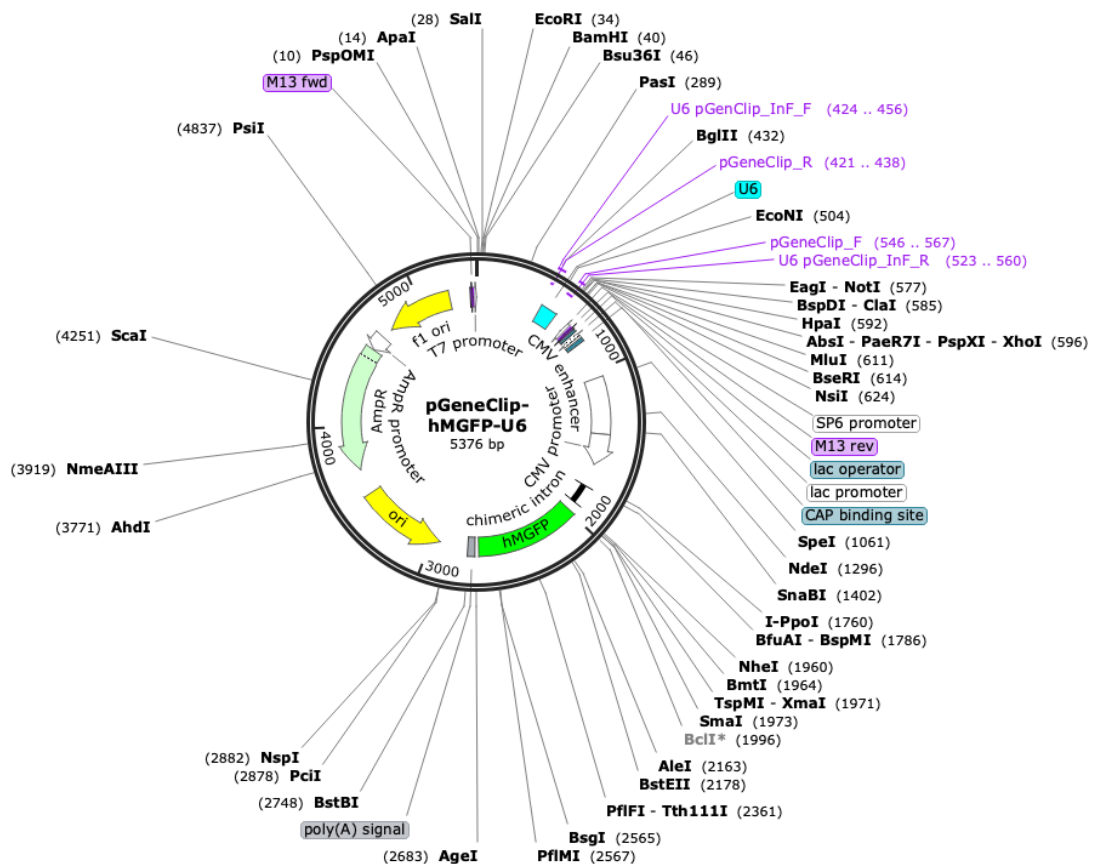
Agaroosigeelielektroforeesia varten valmistettiin 1 % agaroosigeeli. 1x TBE-puskuriin (50 ml) lisättiin 0,5 g Standard Agarose–Type LE -agaroosia (BioNordika; vanhentunut 1.2025). Agaroosi liuotettiin TBE-puskuriin mikrottamalla ja geelin jäähtyttyä lisättiin 2 µl Midori Green advance DNA stain -väriainetta (Nippon Genetics; vanhentunut 11.2024). DNA-näytteisiin (10 µl) lisättiin 2 µl Gel Loading Dye, Purple (6X) -latauspuskuria (New England BioLabs; vanhentunut 3.2024). Ajossa käytettiin Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder -molekyylipainomarkkerina (New England BioLabs; vanhentunut 2.2025). Molekyylipainomarkkeria ja näytteitä lisättiin geelille 12 µl. Näytteiden annettiin ajautua 100 V:n jännitellä 40 minuuttia, jonka jälkeen geeli kuvattiin ChemiDoc MP Imaging System -laitteella (Bio-Rad) asetuksilla nukleinihappo ja etidiumbromidi. U6_pGeneClip_InF antoi spesifisen 100 bp geelituotteen ja se voitiin puhdistaa suoraan PCR-tuotteesta. PGeneClip sen sijaan ei antanut spesifistä 5 kb PCR-tuotetta ja se tuli eristää geeliltä.

Jotta päästiin eroon epäpuhtauksista, kuten ylimääräisistä puskurin jäämistä, entsyymeistä, alukkeista ja nukleotideista, U6_pGeneClip_InF-PCR-tuote puhdistettiin NucleoSpin Gel and PCR Clean-up -kitillä (Macherey-Nagel). Otettiin 40 µl U6-pGeneClip_InF-PCR-tuotetta ja lisättiin NTI Binding -puskuriin suhteessa 1:2 eli 80 µl. Puskuri saosti DNA:n. Näyte siirrettiin NucleoSpin Gel and PCR Clean-up -pylvääseen ja näytettä sentrifugoitiin 11 000 x g 30 sekuntia. Sentrifugoinnin aikana DNA sitoutui pylvään kalvoon. Näytettä pestiin kaksi kertaa lisäämällä pylvääseen 700 µl NT3 Wash -puskuriin ja sentrifugoimalla 11 000 x g 30 sekuntia. Pesulla päästiin eroon epäpuhtauksista. Pylvään kalvo kuivatettiin sentrifugoimalla 11 000 x g 1 minuutin ajan. DNA irrotettiin pylvään kalvosta lisäämällä 15 µl 70 °C:sta NE Elution -puskuriin. Näytettä inkuboitiin huoneenlämmössä 5 minuuttia ja sentrifugoitiin 11 000 x g 1 minuutin ajan. Puhdistetun U6_pGeneClip_InF-näytteen konsentraatioksi mitattiin 40,1 ng/µl NanoDrop One -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific).

PGeneClip-PCR-tuote puhdistettiin 1 % agaroosigeeliltä, koska näyte ei antanut spesifistä PCR-tuotetta geelillä. PGeneClip-PCR-tuotteeseen (30 µl) lisättiin 6 µl Gel Loading Dye Purple (6X) -latauspuskuria. Näytteiden annettiin ajautua geelillä noin 40 minuuttia 100 V:n jännitteellä. DNA-fragmentit leikattiin agaroosigeeliltä puhtaalla skalpellilla. Fragmentit eristettiin mahdollisimman nopeasti Benchtop UV Transilluminator (Daigger Scientific) -leikkausalustan avulla, jotta UV-valo ei ehtinyt vahingoittaa DNA:ta. Geeliltä irrotetut fragmentit punnittiin ja jokaista 100 mg kohden lisättiin 200 µl NTI Binding -puskuriin. Inkuboitiin 9 minuuttia 50 °C:ssa ja vorteksoitiin jokaisen 2 minuutin kohdalla, kunnes kaikki

geeli oli liennut puskuriin. PCR-tuotteen puhdistus tehtiin loppuun NucleoSpin Gel and PCR Clean-up -kitillä. Näytteen konsentraatioksi mitattiin 10 ng/µl.

Kun PCR-tuotteet oli puhdistettu, voitiin U6-insertti (U6_pGeneClip_InF) kloonata U6-vektoriin (pGeneClip) In-Fusion HD Cloning -kitillä (Takara Bio). Reaktiossa valmistettiin U6 WT -plasmidi (kuva 9). Vektori (pGeneClip) linearisoi plasmidin ja poisti U1 mut 1 -sekvenssin plasmidista (liite 3). Insertti (U6_pGeneClip_InF) lisäsi U6 WT -sekvenssin. Vektoria (pGeneClip) otettiin reaktioon 70 ng ja inserttiä (U6_pGeneClip_InF) 3,7 ng. Suhde laskettiin In-Fusion molar ratio calculator -laskurin (Takara Bio) tulosta (192 ng vektoria ja 8 ng inserttiä) soveltamalla, koska vektoria ei ollut tarpeeksi. Reaktioon lisättiin 2 µl 5X In-Fusion Snap Assembly Mastermixiä (Takara Bio) ja näytettä inkuboitettiin 15 minuuttia 50 °C:ssa. 5X In-Fusion Snap Assembly Mastermix sisälsi muun muassa DNA-polymeraasin, jolla oli 3'-5' -eksonukleasiaktiivisuus. DNA-polymeraasi oli tärkeä ligation onnistumisen kannalta, koska se poisti nukleotideja DNA-sekvenssien päistä, jolloin vektorin ja insertin sekvenssit pääsivät kiinnittymään 15 emäsparin päällekkäisyyden kautta.



Kuva 9. U6 WT -plasmidin (pGeneClip-hMGFP-U6) plasmidikartta. Kuva tuotettu SnapGene Viewer -ohjelmalla.

U6 WT -plasmidi transformoitiin Stellar Competent -soluihin (Takara Bio; vanhentunut 7.2019). Soluja lisättiin 50 µl ja U6 WT -plasmidia 2,5 µl. Näyte laitettiin jäälle 30 minuutiksi. Näytteelle tehtiin lämpöshokki viemällä se 45 sekunniksi 42 °C:een vesihauteeseen, jonka jälkeen se siirrettiin jäälle 1,5 minuutiksi. Lisättiin 447,5 µl 37 °C:sta SOC Outgrowth Mediumia (BioLabs; vanhentunut 6.2024) ja näytettä inkuboitiin tunti ravistelijalla 37 °C:ssa 300 rpm, jotta solujen kasvu saatiin alkuun.

Plasmidien ligaation onnistuminen bakteereihin varmistettiin Luria-Bertani (LB)-agar-maljoilla, joissa oli mukana ampicilliini (100 µg/ml). Plasmidit sisälsivät ampicilliini resistenssigeenin. Yhdelle maljalle levitettiin 100 µl laimentamatonta transformaatioseosta ja toiselle maljalle 100 µl 1:10 SOC-mediumilla laimennettua seosta. Transformaatioseosta sentrifugoitiin 5000 x g 3 minuuttia ja pelletti resuspensoitiin 100 µl SOC-mediumiin. Seosta lisättiin 100 µl kolmannelle maljalle. Maljat laitettiin yön yli ylösalaisin kasvatuskaapiin 37 °C:een. Seuraavana päivänä tarkistettiin, että maljoilla kasvoi pesäkkeitä. Kaikilla muilla maljoilla paitsi 1:10 laimennetulla maljalla kasvoi pesäkkeitä.

U6 WT -miniprep-kasvatuksia varten valmistettiin LB-kasvatusliuos, jossa oli mukana ampicilliini (100 µg/ml). Viiteen kasvatusputkeen lisättiin 5 ml valmistettua kasvatusliuosta. Yhteen kasvatukseen poimittiin aina yksi bakteeripesäke. Näytteet laitettiin ravistelevaan inkubaattoriin 37 °C:een 250 rpm yön yli. Seuraavana päivänä valmistettiin glyserolinäytteet lisäämällä 500 µl 50 % steriiliä glyserolia ja 500 µl miniprep-kasvatusta. Glyserolinäytteet pakastettiin -80 °C:een.

U6 WT -miniprep-kasvatuksista eristettiin plasmidia NucleoSpin Plasmid Transfection-grade -kitin (Macherey-Nagel) avulla. Ensin U6 WT -kasvatuksia sentrifugoitiin 11 000 x g 30 sekuntia. Lisättiin 250 µl A1 Resuspension -puskuria ja 250 µl A2 Lysis -puskuria. Näytteitä käännettiin kahdeksan kertaa. Lysis-puskuri hajotti solut. Lisättiin vielä 300 µl A3 Neutralization -puskuria ja käännettiin putkia niin kauan, että Lysis-puskurin sininen väri hävisi kokonaan ja valkoinen saostuma alkoi muodostua. Neutralization-puskuri neutraloi DNA:n, jotta DNA sitoutuisi pylvääseen. Näytteitä sentrifugoitiin 13 000 x g 10 minuuttia ja supernatantit siirrettiin NucleoSpin Plasmid TG -pylväisiin. Sentrifugoitiin 11 000 x g 1 minuutti. Näytteet pestiin kaksi kertaa. Ensimmäisessä pesussa lisättiin 700 µl ERB Detoxification -puskuria ja toisessa pesussa 650 µl AQ Wash -puskuria ja sentrifugoitiin 11 000

x g 1 minuutti. Näytteet sentrifugoitiin uudelleen, jotta pylvään kalvo saatiin täysin kuivaksi. Lopuksi lisättiin 50 µl AE Elution -puskuria, joka irrotti DNA:n pylvään kalvosta. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä noin 1 minuutin ajan ja sentrifugoitiin 11 000 x g 1 minuutti. Näytteiden konsentraatiot mitattiin.

U6 WT -näytteet valmisteltiin Sangerin sekvensointia varten. Sekvensointialuke T7_F 5'-TAATACGACTCACTATAGGG2-3' laimennettiin 25 nmol pitoisuudesta 10 µM pitoisuuteen. Sekvensointiputkiin lisättiin 2,5 µl (10 µM) aluketta, 500 ng plasmista DNA:ta ja nukleasivapaata vettä 10 µl lopputilavuuteen asti. Näytteisiin lisättiin viivakoodilliset barcode-laput ja ne lähetettiin sekvensoitaviksi LightRun Tube Sequencing Service -sekvensointipalveluun (Eurofins Genomics). Sekvensointituloksien saavuttua kloonien sekvenssit tarkistettiin SnapGene Viewer -ohjelmalla. U6 WT -klooneista oikea sekvenssi oli klooneilla 2, 3 ja 5. Virheellisiä klooneja olivat kloonit 1 ja 4, ja ne hävitettiin.

2.1.4 Muokattujen U1- ja U6-snRNA-plasmidien valmistus

Muokatut spliseosomaaliset U1- ja U6-snRNA-plasmidit (U1 mut 2, U6 mut 1 ja U6 mut 2) valmistettiin kohdennetun mutageneesin avulla. U1 mut 2 -plasmidi valmistettiin mutatoimalla U1 mut 1 -plasmidiin emäsmuutos U > G silmukointikohtaan +4. U6 mut 1 -plasmidi valmistettiin mutatoimalla U6 WT -plasmidiin emäsmuutos C > U silmukointikohtaan +5. U6 mut 2 -plasmidiin tehtiin lisäksi muutos A > G kohtaan +4.

Muokattujen U1- ja U6-snRNA-plasmidien valmistus aloitettiin CloneAmp HiFi PCR -reaktioilla. U1 mut 2 -reaktioon lisättiin 25 µl CloneAmp HiFi PCR Premixiä, 22 µl nukleasivapaata vettä, 10 ng (1 µl) U1 mut 1 -plasmidia sekä 1 µl molempia alukkeita U1_mut2_F (10 µM) ja U1_mut2_R (10 µM). U6 mut 1- ja U6 mut 2 -reaktiot toteutettiin puolet pienemmillä tilavuuksilla, koska Premix loppui kesken. Reaktioihin lisättiin 12,5 µl CloneAmp HiFi Premixiä, 9,5 µl nukleasivapaata vettä ja 0,5 µl molempia alukkeita: toiseen reaktioon U6_mut1_F (10 µM) ja U6_mut1_R (10 µM) ja toiseen U6_mut2_F (10 µM) ja U6_mut2_R (10 µM). Plasmidiksi lisättiin 5 ng U6 WT -plasmidin kloonin 2. Reaktioseokset laitettiin PCR-laitteeseen: denaturaatio 98 °C 10 sekuntia, annealing 65 °C 15 sekuntia ja elongaatio 68 °C 5 minuuttia. Vaiheet toistettiin 18 kertaa ja ajon lopussa näytteet jäädytettiin 4 °C:een. PCR-tuotteet ajettiin 1 % agarosigeelillä. Kaikki PCR-tuotteet antoivat yhden spesifisen 5 kb geelituotteen, jolloin puhdistus voitiin tehdä suoraan PCR-tuotteista.

Plasmidien PCR-tuotteet puhdistettiin NucleoSpin Gel and PCR Clean-up -kitillä. Otettiin 40 µl U1 mut 2 -PCR-tuotetta ja lisättiin NTI Binding -puskuria suhteessa 1:2 eli 80 µl. U6 mut 1- ja U6 mut 2 -PCR-tuotteita oli vain 15 µl, joten näytteisiin lisättiin ensin 35 µl nukleasivapaata vettä ja sitten NTI Binding -puskuria 100 µl. Loput vaiheet tehtiin samalla tavalla kuin aikaisemmin, mutta lopuksi lisättiin 20 µl NE Elution -puskuria. Näytteiden konsentraatiot mitattiin. U1 mut 2 -näytteen konsentraatio oli 52,5 ng/µl, U6 mut 1 konsentraatio 25,7 ng/µl ja U6 mut 2 konsentraatio 43,3 ng/µl.

Alkuperäiset villityyppiplasmidit eli U1 WT ja U6 WT poistettiin plasmideista DpnI-käsittelyllä. DpnI-käsittelyä varten haluttiin 1 µg puhdistettua mutatoitua plasmidia. U1 mut 2 -plasmidia saatiin 1 µg, mutta U6 mut 1- ja U6 mut 2 -plasmideja ei riittänyt haluttuun määrään ja niitä lisättiin vähemmän. U6 mut 1 -plasmidia lisättiin noin 0,4 µg ja U6 mut 2 -plasmidia noin 0,8 µg. Plasmidien lisäksi lisättiin 5 µl 10X CutSmart -puskuria (BioLabs; vanhentunut 12.2021) ja 1 µl DpnI-entsyymiä (BioLabs; vanhentunut 1.2021). DpnI-entsyymi pilkkoi WT -plasmidin. Nukleasivapaata vettä lisättiin 50 µl lopputilavuuteen asti. Näytteitä inkuboitiin 37 °C:ssa 60 minuuttia. DpnI-käsittelyn jälkeen plasmidit puhdistettiin NucleoSpin Gel and PCR Clean-up -kitillä. NTI Binding -puskuria lisättiin 100 µl.

Plasmidit transformoitiin NEB 5-alpha Competent *E. Coli* -soluihin (C2987H) (BioLabs; vanhentunut 7.2023). Lisättiin 50 µl soluja ja 1 µl plasmideja (U1 mut 2, U6 mut 1 ja U6 mut 2). Näytteet laitettiin jäälle 30 minuutiksi. Näytteille tehtiin lämpöshokki viemällä ne 30 sekunniksi 42 °C:een vesihauteeseen, jonka jälkeen ne siirrettiin takaisin jäälle 5 minuutiksi. Lisättiin 950 µl 37 °C:sta SOC-mediumia ja näytteitä inkuboitiin tunti ravistelijalla 37 °C:ssa 300 rpm.

Kaikille plasmideille otettiin kolme LB-agar-maljaa, joissa oli mukana ampicilliini (100 µg/ml). Kahdelle maljalle levitettiin 100 µl laimentamatonta transformaatioseosta. Transformaatioseosta sentrifugoitiin 5000 x g 3 minuuttia ja pelletti resuspensoitiin 100 µl SOC-mediumiin. Seosta lisättiin viimeisille maljoille. Maljat laitettiin yön yli kasvatuskaapiin ja seuraavana päivänä tarkistettiin, että maljoilla kasvoi pesäkkeitä.

Jokaiselle plasmidille tehtiin kolme miniprep-kasvatusta. Seuraavana päivänä valmistettiin kasvatuksista glyserolinäytteet, jotka pakastettiin -80 °C:een. Miniprep-kasvatuksista eristettiin plasmidia NucleoSpin Plasmid Transfection-grade -kitin avulla. Näytteet lähetettiin lopuksi

sekvensointipalveluun sekvensoitaviksi. Sekvensointituloksien saavuttua kloonien sekvenssit tarkistettiin SnapGene Viewer -ohjelmalla. U1 mut 2- ja U6 mut 1 -klooneista kaikilla klooneilla oli oikea sekvenssi. U6 mut 2 -klooneista oikeat sekvenssit olivat klooneilla 1 ja 3. Virheellinen klooni 2 hävitettiin.

2.1.5 Midiprep-kasvatukset ja plasmidieristykset

Jotta lopullinen plasmidi olisi peräisin vain yhdestä bakteeripesäkkeestä, miniprep-kasvatuksista maljattiin puhtasviljelmät. Levitettiin jokaisesta plasmidista (U1 mut 2 klooni 1, U6 WT klooni 2, U6 mut 1 klooni 1 ja U6 mut 2 klooni 1) glyserolinäytettä siksak-kuvioon LB-agar-maljalle, jossa oli mukana ampisilliini (100 µg/ml). Maljat laitettiin yön yli kasvatuskaappiin.

Midiprep-kasvatukseen poimittiin maljoilta yksi bakteeripesäke yhteen 100 ml LB-kasvatusliuokseen, jossa oli mukana ampisilliini (100 µg/ml). Näytteet laitettiin ravistelevaan inkubaattoriin 37 °C:een 250 rpm yön yli. Midiprep-kasvatuksista kolme oli kasvanut hyvin (U1 mut 2, U6 WT, U6 mut 2). U6 mut 1 -plasmidin kasvatus ei ollut kasvanut. U6 mut 1 -maljalta poimittiin uusi bakteeripesäke 1 ml LB-kasvatusliuokseen ravistelevaan inkubaattoriin ja esikasvatus siirrettiin myöhemmin 100 ml kasvatusliuokseen yön yli.

Midiprep-kasvatuksista eristettiin plasmidia NucleoBond Xtra Plasmid purification -kitillä (Macherey-Nagel). Kasvatuksia sentrifugoitiin 5000 x g 10 minuuttia 4 °C:ssa. Lisättiin 8 ml RES Resuspension -puskuria ja LYS Lysis -puskuria. Näytteitä käänneltiin 5 kertaa ja inkuboitiin huoneenlämmössä 5 minuuttia. Lisättiin NucleoBond Xtra -pylvääseen filteri ja kostutettiin se lisäämällä 12 ml EQU Equilibration -puskuria filterin reunalle. Näytteisiin lisättiin 8 ml NEU Neutralization -puskuria. Niitä käänneltiin, kunnes sininen väri muuttui värittömäksi. Näytteet kaadettiin rauhallisesti NucleoBond Xtra -pylväiden filteriin. DNA kiinnittyi pylvääseen ja epäpuhtaudet filteriin. Ensimmäisessä pesussa lisättiin 5 ml EQU Equilibration -puskuria filterien reunalle. Filterit poistettiin ennen toista pesua, jossa pylväisiin lisättiin 8 ml WASH Wash -puskuria. Lopuksi lisättiin 5 ml ELU Elution -puskuria. Plasmidien konsentraatiot mitattiin NanoDrop-laitteella. U1 mut 2 -plasmidin konsentraatio oli 142 ng/µl, U6 WT -plasmidin konsentraatio 200 ng/µl, U6 mut 1 -plasmidin konsentraatio 85 ng/µl ja U6 mut 2 -plasmidin konsentraatio 204 ng/µl.

Näytteisiin lisättiin 3,5 ml huoneenlämpöistä isopropanolia ja inkuboitiin huoneenlämmössä 2 minuuttia. Plasmideille otettiin omat Nucleobond Finalizer -filtterit ja kiinnitettiin ne 30 ml ruiskuihin. Näytteet kaadettiin ruiskuihin ja niiden annettiin valua filtterin läpi rauhallisesti. DNA sitoutui filtteriin. Lisättiin 2 ml 70 % etanolia ja pesun jälkeen kuivausvaihe toistettiin 8 kertaa. Kuivauksella päästiin lopuista etanolin jäämistä eroon. Lopuksi filtterit siirrettiin 1 ml ruiskuihin. U1 mut 2-, U6 WT- ja U6 mut 2 -plasmidien ruiskuihin lisättiin 400 µl TRIS Redissolving -puskuria ja U6 mut 1 -plasmidin ruiskuun 300 µl puskuria konsentraatioiden perusteella. TRIS irrotti DNA:n filtteristä. Läpi mennyt neste filtteröitiin uudestaan. Plasmidien viimeiset DNA konsentraatiot mitattiin ja ne vaihtelivat 1 µg/µl ja 2 µg/µl välillä. Kaikkien plasmidien puhtausarvot olivat hyvät.

2.2 Minigeenien silmukointianalyysi

Minigeenien silmukointianalyysi (engl. minigene splicing assay) on menetelmä, jolla voidaan tutkia halutun minigeenin silmukointia. Minigeeni, kuten eksoni ja sitä ympäröivät intronit, monistetaan ja kloonataan plasmidiin. Valmis plasmidi transfektoidaan sopivaan solulinjaan, jossa RNA-polymeraasi II transkriptoi sen. Transkription tuloksena syntyneestä esiaste-RNA:sta silmukoidaan lähetti-RNA. Lähetti-RNA muutetaan RT-PCR:n eli käänteistranskriptaasi-polymeraasiketjureaktion (engl. reverse transcription-polymerase chain reaction) avulla cDNA:ksi. Lopuksi cDNA monistetaan minigeenille spesifisillä alukkeilla ja PCR-tuotteet visualisoidaan agarosigeelillä. (Baralle ym., 2009).

2.2.1 COS-7-solut ja soluviljely

COS-7-solulinja on Afrikan vihreän apinan munuaisen fibroblasteja muistuttava solulinja (Thermo Fisher Scientific, 2025a). Solut ovat mykoplasma-negatiivisia soluja ja ne sopivat hyvin transfektioon. COS-7-soluja kasvatettiin DMEM-kasvatusmediumissa (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco; vanhentunut 9.2023), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (FBS) (Biowest; vanhentunut 11.2023) sekä penisilliiniä 100 U/ml ja streptomysiiniä 100 µg/ml (Gibco). Soluja kasvatettiin T75-kasvatuspulloissa kasvatuskaapissa 37 °C:ssa, 5 % CO₂-pitoisuudessa. Solut jaettiin kahdesti tai kolmesti viikossa ja käytettiin 16 jaon aikana sulattamisesta.

COS-7-solujen jakovaiheessa kaadettiin vanha kasvatusmedium ensin pois ja pestiin solut PBS-puskurilla (Gibco), jotta päästiin eroon kuolleista soluista ja trypsiini-inhibiittorin jäämistä. Pesun jälkeen lisättiin 3 ml 0,25 % Trypsiini-EDTA-liuosta (Gibco) ja solut laitettiin noin 5 minuutiksi kasvatuskaappiin. Trypsiini irrotti solut kasvatuspullon pohjasta. Pulloon lisättiin 9 ml tuoretta kasvatusmediumia. Soluja siirrettiin uuteen kasvatuspulloon halutun jakosuhteen verran ja kasvatusmediumia lisättiin 10 ml kokonaistilavuuteen asti.

2.2.2 Solujen transfektio plasmideilla

COS-7-solut siirrettiin kuoppalevyille transfektiota varten. Solujen konfluenssi oli kasvatuspulloissa noin 80 %. Solumäärä laskettiin solulaskurilla (TC20 automated cell counter, Bio-Rad). Testitransfektiossa, jossa kokeiltiin plasmidien pitoisuuksia, 12-kuoppalevyille siirrettiin 5×10^4 solua 1 ml DMEM-kasvatusmediumissa. Muissa transfektioissa 6-kuoppalevyille siirrettiin 1×10^5 solua 2 ml kasvatusmediumissa. Kuoppalevyt laitettiin kasvatuskaappiin yön yli ja transfektio suoritettiin seuraavana päivänä.

COS-7-solujen transfektiossa käytettiin Lipofectamine 3000 -transfektioireagensseja (Invitrogen; vanhentunut 1.2024). Solujen konfluenssi oli transfektion alussa kuoppalevyillä noin 85 %. Tutkimuksessa suoritettiin neljä erilaista transfektiota. Ensimmäiseksi tehtiin testitransfektio, jossa solut transfektoitiin *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidilla ja yhdellä emäsmuutoksella muokatulla spliseosomaalisella U1-snRNA-plasmidilla (U1 mut 1). Testitransfektiossa haluttiin testata, kuinka alas *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin määrä täytyi viedä, jotta U1 mut 1 -plasmidin aikaansaamaa silmukointivirheen korjaamista havaittiin. Tästä syystä *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidilla testattiin neljää määrää: 50 ng, 20 ng, 10 ng ja 1 ng. U1 mut 1 -plasmidin määrä oli aina 1000 ng.

Transfektiota varten valmistettiin transfektioseokset, joihin lisättiin ensin 50 μ l Opti-MEM-mediumia. Ensimmäisiin reaktioseoksiin lisättiin 3 μ l lipofectamine 3000 -reagenssia ja toisiin seoksiin 2 μ l P3000-reagenssia. Reaktioseokset yhdistettiin ja annettiin inkuboitua huoneenlämmössä 15 minuuttia. Transfektioseoksia lisättiin kuoppalevyille 100 μ l/kuoppa ja kuoppalevy laitettiin kasvatuskaappiin yön yli. Transfektion onnistuminen tarkistettiin seuraavana päivänä kuvantamislaitteella (EVOS M5000 Imaging System, Invitrogen).

Testitransfektio tehtiin kerran ja näytteet valmistettiin duplikaatteina, jolloin plasmidien ja reagenssien määrät tuplattiin.

Toisessa transfektiossa COS-7-soluja transfektoitiin *ANO7*:n villityyppiplasmidilla tai *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidilla ja pEGFP-plasmidilla (Clontech/TaKaRa) tai U1 mut 1 -plasmidilla (taulukko 1). PEGFP-plasmidi ilmentää vihreää fluoresoivaa proteiinia (engl. green fluorescent protein, GFP) ja sitä lisättiin kontrollikäsittelyihin U1 mut 1 -plasmidin sijasta. Transfektion tarkoituksena oli nähdä, korjaantuuko *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin aiheuttama silmukointivirhe U1 mut 1 -plasmidilla ja huonontuuko *ANO7*:n villityyppiplasmidin oikea silmukointi U1 mut 1 -plasmidilla. Testikierroksen perusteella *ANO7*:n villityyppi- ja *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidien määräksi valikoitui 125 ng. PEGFP- ja U1 mut 1 -plasmidien määräksi valikoitui 3750 ng. Opti-MEM-mediumia lisättiin molempiin reaktioihin 125 µl, lipofectamine 3000 -reagenssia 11,25 µl ja P3000-reagenssia 7,5 µl. Transfektioseoksia lisättiin kuoppalevyille 250 µl/kuoppa. Reagenssien määriä kasvatettiin testikierroksesta, koska transfektio tehtiin 6-kuoppalevyllä oleville soluille ja, koska plasmidien määrää lisättiin. Transfektioista tehtiin kolme toistoa ja näytteet valmistettiin duplikaatteina.

Taulukko 1. Toisen transfektion käsittelyt.

<i>ANO7</i> WT + GFP
<i>ANO7</i> rs77559646 + GFP
<i>ANO7</i> WT + U1 mut 1
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 mut 1

Kolmas transfektio suoritettiin muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snrRNA-plasmideilla plasmidien (U1 mut 2, U6 mut 1 ja U6 mut 2) valmistuksen jälkeen. COS-7-soluja transfektoitiin *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidilla ja kaikilla erilaisilla muokatuilla spliseosomaalisilla U1 ja U6-snrRNA-plasmidien yhdistelmillä (taulukko 2). Transfektion tarkoituksena oli nähdä, korjaavatko erilaiset muokatut snrRNA-plasmidien yhdistelmät *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin silmukointivirhettä. Jokaisessa reaktiossa oli mukana kolme erilaista plasmidia, joista jokaista lisättiin 1,33 µg. Plasmideja lisättiin yhtä paljon, koska (Schmid ym., 2013) tutkimuksessa oli saatu hyviä tuloksia plasmidien määrän ollessa sama. Transfektioseoksia lisättiin saman verran kuin aikaisemmalla kierroksella. Transfektioista tehtiin kolme toistoa. Näytteistä ei valmistettu duplikaatteja suuren näytemäärän vuoksi.

Taulukko 2. Kolmannen transfektion käsittelyt.

<i>ANO7</i> WT + U1 WT + U6 WT
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 WT + U6 WT
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 mut 1 + U6 WT
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 mut 2 + U6 WT
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 WT + U6 mut 1
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 WT + U6 mut 2
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 mut 1 + U6 mut 1
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 1
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 mut 1 + U6 mut 2
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 2

Viimeisessä eli neljännessä transfektiossa COS-7-soluja transfektoitiin *ANO7*:n villityyppiplasmidilla ja kaikilla erilaisilla muokatuilla spliseosomaalisilla U1 ja U6-snRNA-plasmidien yhdistelmillä (taulukko 3). Transfektiossa haluttiin kokeilla, huonontavatko erilaiset muokatut snRNA-plasmidien yhdistelmät *ANO7*:n villityyppiplasmidin oikeaa silmukointia. Jokaista plasmidia lisättiin 1,33 µg. Transfektioista tehtiin yksi toisto, koska jo yhdestä toistosta näki selvän tuloksen. Näytteistä ei valmistettu duplikaatteja.

Taulukko 3. Neljännen transfektion käsittelyt.

<i>ANO7</i> WT + U1 WT + U6 WT
<i>ANO7</i> rs77559646 + U1 WT + U6 WT
<i>ANO7</i> WT + U1 mut 1 + U6 WT
<i>ANO7</i> WT + U1 mut 2 + U6 WT
<i>ANO7</i> WT + U1 WT + U6 mut 1
<i>ANO7</i> WT + U1 WT + U6 mut 2
<i>ANO7</i> WT + U1 mut 1 + U6 mut 1
<i>ANO7</i> WT + U1 mut 2 + U6 mut 1
<i>ANO7</i> WT + U1 mut 1 + U6 mut 2
<i>ANO7</i> WT + U1 mut 2 + U6 mut 2

2.2.3 RNA:n eristys

RNA eristettiin TRIsure-reagenssilla (Meridian Bioscience). Ensin kasvatusmedium poistettiin ja TRIsure-reagenssia lisättiin 1 ml COS-7-solujen päälle. Solut kerättiin ja niitä inkuboitiin huoneenlämmössä 5 minuuttia. Lisättiin 200 µl kloroformia ja sekoitettiin hyvin. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 3 minuuttia, jonka jälkeen sentrifugoitiin 1200 x g 15 minuuttia 4 °C:ssa. RNA erottui vesifaasiin eli ylimpään tasoon. Proteiinit ja DNA jäivät alempaa fenoli-kloroformifaasiin. RNA:n eristyksessä vältettiin koskemasta putken reunoille tai fenoli-kloroformifaasiin epäpuhtauksien välttämiseksi. RNA:n eristysvaihe toistettiin, jonka jälkeen lisättiin 500 µl jääkylmää isopropanolia. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia, jonka jälkeen sentrifugoitiin 1200 x g 10 minuuttia 4 °C:ssa. RNA erottui pieneksi pelletiksi. Pellettiä pestiin 1 ml 75 % etanolilla ja sentrifugoitiin 7500 x g 5 minuuttia 4 °C:ssa. Pesuvaihe toistettiin yhteensä kolme kertaa. Viimeisen pesun jälkeen etanoli poistettiin pipetoimalla ja pellettiä kuivatettiin lämpöblokkissa 55 °C:ssa noin 5 minuuttia. RNA liuotettiin resuspensoimalla 15-20 µl nukleaasivapaaseen veteen pelletin suuruuden mukaan. Näytteet laitettiin vielä lämpöblokkiin 55 °C:een noin 5 minuutiksi, jotta RNA liukeni kunnolla. Näytteiden konsentraatiot mitattiin NanoDrop-laitteella ja näytteet siirrettiin säilytykseen -80 °C:een.

2.2.4 cDNA:n synteesi

Ennen cDNA:n synteisiä eli komplementaarisen DNA:n valmistusta RNA-näytteet käsiteltiin deoksiribonukleaasi I (DNase I) -entsyymillä. Deoksiribonukleaasi I pilkkoo yksi- ja kaksijuosteista DNA:ta ja näin ollen poistaa DNA:n (Thermo Fisher Scientific, 2025b). Deoksiribonukleaasi I -käsittelyyn käytettiin DNase I, Amplification Grade -kittiä (Invitrogen; vanhentunut 3.2023). Yhden näytteen reaktioon tarvittiin 1 µg RNA:ta, 1 µl 10X DNase I -reaktiopuskuria ja 1 µl DNase I, Amp Grade (1 U/µl) -entsyymiä sekä nukleaasivapaata vettä 10 µl lopputilavuuteen asti. Näytteet nostettiin jäältä huoneenlämpöön inkubointiin 15 minuutiksi. Lisättiin 1 µl 25 mM EDTA-liuosta ja näytteet siirrettiin lämpöblokkiin 10 minuutiksi 65 °C:een, jolloin entsyymi inaktivoitui.

CDNA:n synteisissä valmistettiin RNA-templaattista RT-PCR:n eli käänteistranskriptaasi-polymeraasiketjureaktion avulla komplementaarinen DNA eli yksiketjuinen DNA-molekyylä (Bio-Rad, 2025). CDNA:n synteisiin käytettiin iScript Select cDNA Synthesis -kittiä (Bio-Rad,

vanhentunut 4.2024). Yhden näytteen reaktioon tarvittiin 3 µl nukleasivapaata vettä, 4 µl 5X iScript select -reaktioseosta, 2 µl Oligo(dT)₂₀ -aluketta ja 1 µl iScript reverse transcriptase -entsyymiä eli käänteistranskriptaasia. RNA:ta lisättiin yhteen reaktioon 10 µl. Negatiiviseen vesi kontrolliin lisättiin RNA-näytteen tilalle 10 µl nukleasivapaata vettä. Näytteet laitettiin PCR-ajoon. Näytteitä inkuboitiin ensin 42 °C:ssa 60 minuuttia ja sen jälkeen 85 °C:ssa 5 minuuttia, jolloin käänteistranskriptaasi-entsyymi inaktivoitui. Lopuksi näytteet jäähdytettiin 4 °C:een ja siirryttiin suoraan PCR-reaktioon.

2.2.5 PCR ja agarosigeelielektroforeesi

PCR-ajoa varten laimennettiin *ANO7*-minigeenille spesifiset alukkeet dUSD2 5'-CCTGCACCTGAGGAGTGAAT-3' ja dUSA4 5'-GCTCACAAATACCACTGAGAT-3' (Wahlström ym., 2022) 10 µM pitoisuuteen. Laimennettuja alukkeita käytettiin molempia 0,5 µl yhteen reaktioon. Lisättiin 12,5 µl AmpliTaq Gold 360 Master Mixiä (Applied Biosystems), 9,5 µl nukleasivapaata vettä ja 2 µl cDNA-näytettä. Negatiiviseen kontrolliin lisättiin cDNA:n tilalle 2 µl nukleasivapaata vettä. Näytteet laitettiin PCR-ajoon: alkudenaturaatio 95 °C 10 minuuttia, 40 sykliä: denaturaatio 95 °C 30 sekuntia, annealing 60 °C 30 sekuntia, ekstensio 72 °C 30 sekuntia sekä viimeiseksi loppuekstensio 72 °C 7 minuuttia ja jäähdytys 4 °C.

Valmistettiin 2 % agarosigeeli. 1x TBE-puskuriin (200 ml) lisättiin 4 g Standard Agarose–Type LE -agarosia (BioNordika; vanhentunut 1.2025) ja 8 µl Midori Green advance DNA stain -väriainetta (Nippon Genetics; vanhentunut 11.2024). DNA-näytteisiin (25 µl) lisättiin 5 µl Gel Loading Dye, Purple (6X) -latauspuskuria (New England BioLabs; vanhentunut 3.2024). Ajossa käytettiin Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder -molekyylipainomarkkeria (New England BioLabs; vanhentunut 2.2025). Molekyylipainomarkkeria ja näytteitä lisättiin geelille 30 µl. Näytteiden annettiin ajautua 100 V:n jännitteellä noin tunnin ajan, jonka jälkeen geeli kuvattiin ChemiDoc-laitteella.

2.2.6 Tulosten analysointi

Minigeenien silmukointianalyysin fragmenttien voimakkuuksia mitattiin ImageJ-ohjelmalla agarosigeelielektroforeesikuvista. Ensin plasmidikäsittelyiden fragmentit rajattiin manuaalisesti yksitellen. ImageJ antoi fragmenteille niiden voimakkuutta vastaavat arvot, joista

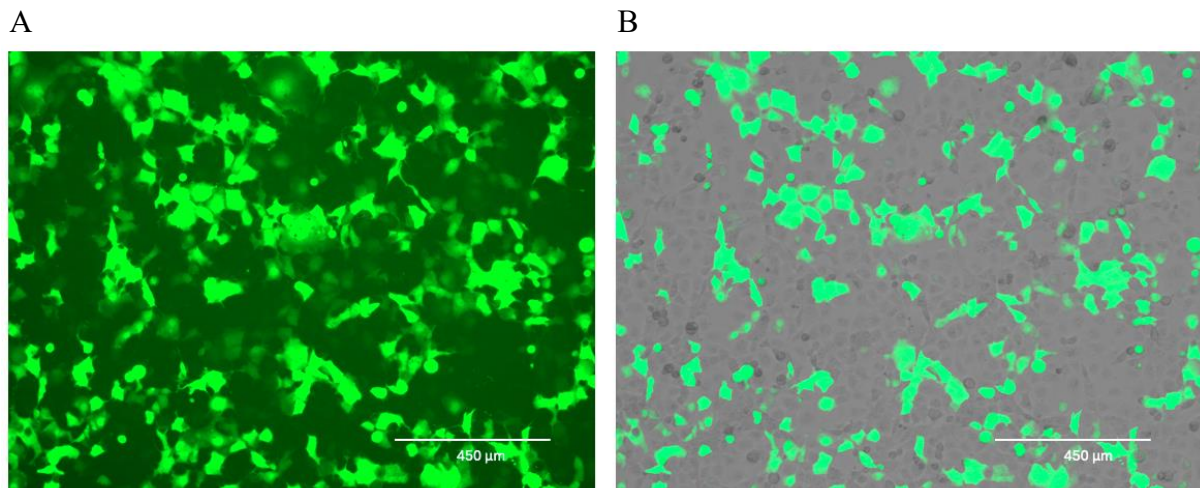
tehtiin diagrammikuvat Excel-ohjelmalla. Käsittelyiden fragmenttien voimakkuutta voitiin havainnollistaa kahdella tavalla Excel-ohjelmalla. Ensimmäisessä tavassa selvitettiin käsittelyiden fragmenttien ilmentymisen taso molempien fragmenttien eli ylä- ja alafragmenttien arvojen avulla. Fragmenttien arvot normalisointiin villityyppikäsittelyn (*ANO7* WT + U1 WT + U6 WT) yläfragmentin arvon avulla. Fragmenteille laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat ja niistä tehtiin diagrammikuvat. Toisessa havainnollistamistavassa jaettiin käsittelyiden yläfragmentin arvo alafragmentilla. Arvot normalisoitiin villityyppikäsittelyn (*ANO7* WT + U1 WT + U6 WT) fragmenttien suhdearvolla.

Fragmenttien voimakkuuksien keskiarvojen tilastollista eroa tarkasteltiin IBM SPSS statistics -ohjelmalla yksisuuntaisella varianssianalyysillä (engl. One-Way ANOVA) ja Dunnetin (post hoc) -testillä. Muiden käsittelyiden arvoja verrattiin varianttikäsittelyn (*ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 WT) arvoihin. Tulos oli tilastollisesti merkitsevä, jos $P < 0,05$. Tällöin eri käsittelyiden fragmenttien välillä oli tilastollista eroa eksonin 4 sisällyttämisessä eli silmukoinnin korjaamisessa. Silmukoinnin huonontamisen fragmenteille ei voitu tehdä tilastollista tarkastelua, koska toistokierroksia oli vain yksi.

3 Tulokset

3.1 Transfektio

COS-7-solujen transfektion onnistuminen oli ratkaisevaa minigeenien silmukointianalyysin onnistumisen kannalta. Onnistuneessa transfektiossa suurin osa soluista ilmensi vihreää fluoresoivaa proteiinia (kuva 10), koska plasmidit sisälsivät GFP-proteiinia koodaavan geenin.

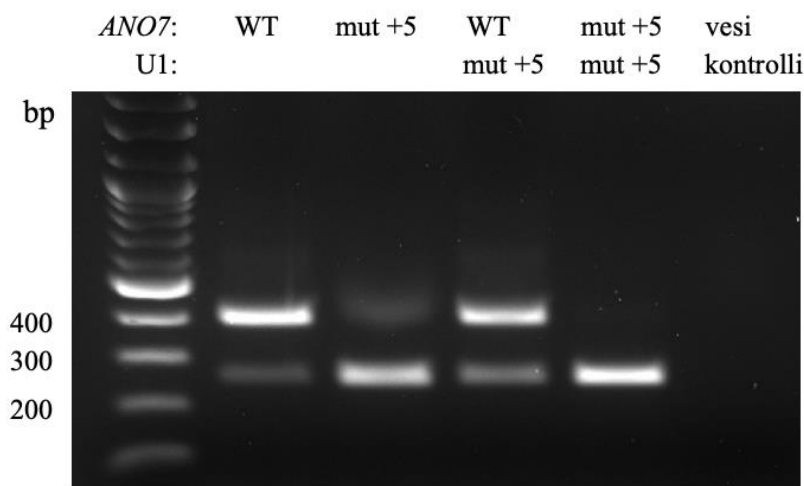


Kuva 10. COS-7-solujen transfektio plasmideilla. Kuvassa yksi käsittely (*ANO7* WT + GFP) yhdeltä toistokierrokselta. Kuvat otettu EVOS M5000 -kuvantamislaitteella mikroskoopin 10x objektiivilla. Kuva A otettu GFP:n vihreän fluoresenssin havaitsemiseen tarkoitetulla filterillä. Kuvassa B yhdistyy faasikontrastikuva ja filterikuva. Transfektion onnistuessa COS-7-solut ilmensivät GFP:tä.

3.2 Silmukoinnin muuttaminen muokatulla U1-snrRNA:lla

Minigeenien silmukointianalyysin avulla voitiin tarkastella *ANO7*:n villityypin ja *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukointia. *ANO7*:n villityyppiplasmidi kantoi G-alleelia ja rs77559646-varianttiplasmidi kantoi A-alleelia 5'-silmukointikohdassa intronin 4 kohdassa +5. RT-PCR-tuotteita visualisoidessa agarosegeelillä voitiin nähdä *ANO7*:n villityypin ja rs77559646-variantin (*ANO7* mut +5) kaksi fragmenttia, 404 bp ja 261 bp (kuva 11). Ylempi fragmentti, 404 bp edusti eksonin 4 oikeaa silmukointia eli eksonin sisällyttämistä. Alempi fragmentti, 261 bp edusti eksonin 4 ohittamista. G-alleelia kantavassa *ANO7*:n villityyppiplasmidissa yläfragmentti 404 bp ilmentyi alafragmenttia 261 bp selkeästi voimakkaampana, jolloin pääosin eksoni 4 sisällytettiin. Puolestaan *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidissa alafragmentti 261 bp ilmentyi yläfragmenttia 404 bp voimakkaampana, jolloin pääosin eksoni 4 ohitettiin.

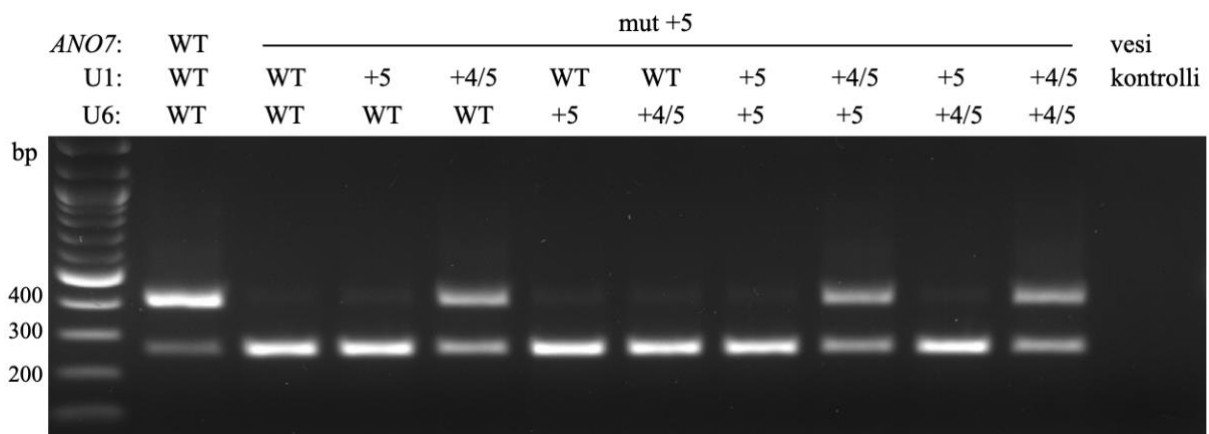
Minigeenien silmukointianalyysillä haluttiin selvittää, onko *ANO7*:n rs77559646-variantin aiheuttamaa virheellistä eksonin 4 silmukointia mahdollista korjata eli, onko eksonin 4 ohittaminen mahdollista estää muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snRNA:illa. Aluksi selvitettiin, pystyikö U1 mut 1 -plasmidi (U1 mut +5), jossa oli yksi mutaatio silmukointikohdassa +5, korjaamaan yksin *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin (*ANO7* mut +5) virheellistä silmukointia tai pystyikö U1 mut 1 -plasmidi huonontamaan *ANO7*:n villityyppiplasmidin oikeaa silmukointia (kuva 11). *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin yläfragmentti ei voimistunut eli U1 mut 1 -plasmidi ei korjannut virheellistä silmukointia. Sen sijaan näytti, että *ANO7*:n villityyppiplasmidin alafragmentti voimistui vähän, mikä viittasi siihen, että U1 mut 1 -plasmidi saattoi huonontaa oikeaa silmukointia. Kuitenkin fragmenttien voimakkuuksissa oli eroa toistokierroksilla ja välillä näytti, ettei U1 mut 1 -plasmidilla olisi silmukointia huonontavaa vaikutusta.



Kuva 11. Minigeenien silmukointianalyysin toisen transfektion RT-PCR-tuotteet visualisoituna 2 % agarosigeelillä. Agarosigeelissä käytettiin 1 kb molekyylipainomarkkeria. *ANO7* WT + GFP (*ANO7* WT) oli villityyppikäsittely ja kantoi G-alleelia. *ANO7* rs77559646 + GFP (*ANO7* mut +5) oli varianttikäsittely ja kantoi A-alleelia. Yläfragmentti 404 bp tarkoitti eksonin 4 oikeaa silmukointia. Alafragmentti 261 bp tarkoitti eksonin 4 ohittamista. Selvitettiin, korjasiko silmukointikohdasta +5 muokattu spliseosomaalinen U1-snRNA-plasmidi (U1 mut +5) *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin (*ANO7* mut +5) virheellistä silmukointia. Selvitettiin myös, huononsiko muokattu spliseosomaalinen U1-snRNA-plasmidi (U1 mut +5) *ANO7*:n villityyppiplasmidin (*ANO7* WT) oikeaa silmukointia. Agarosigeelillä viimeisenä negatiivinen vesi kontrolli. Tulos toistettiin kolme kertaa.

3.3 Silmukoinnin korjaaminen muokatuilla U1- ja U6-snrRNA:illa

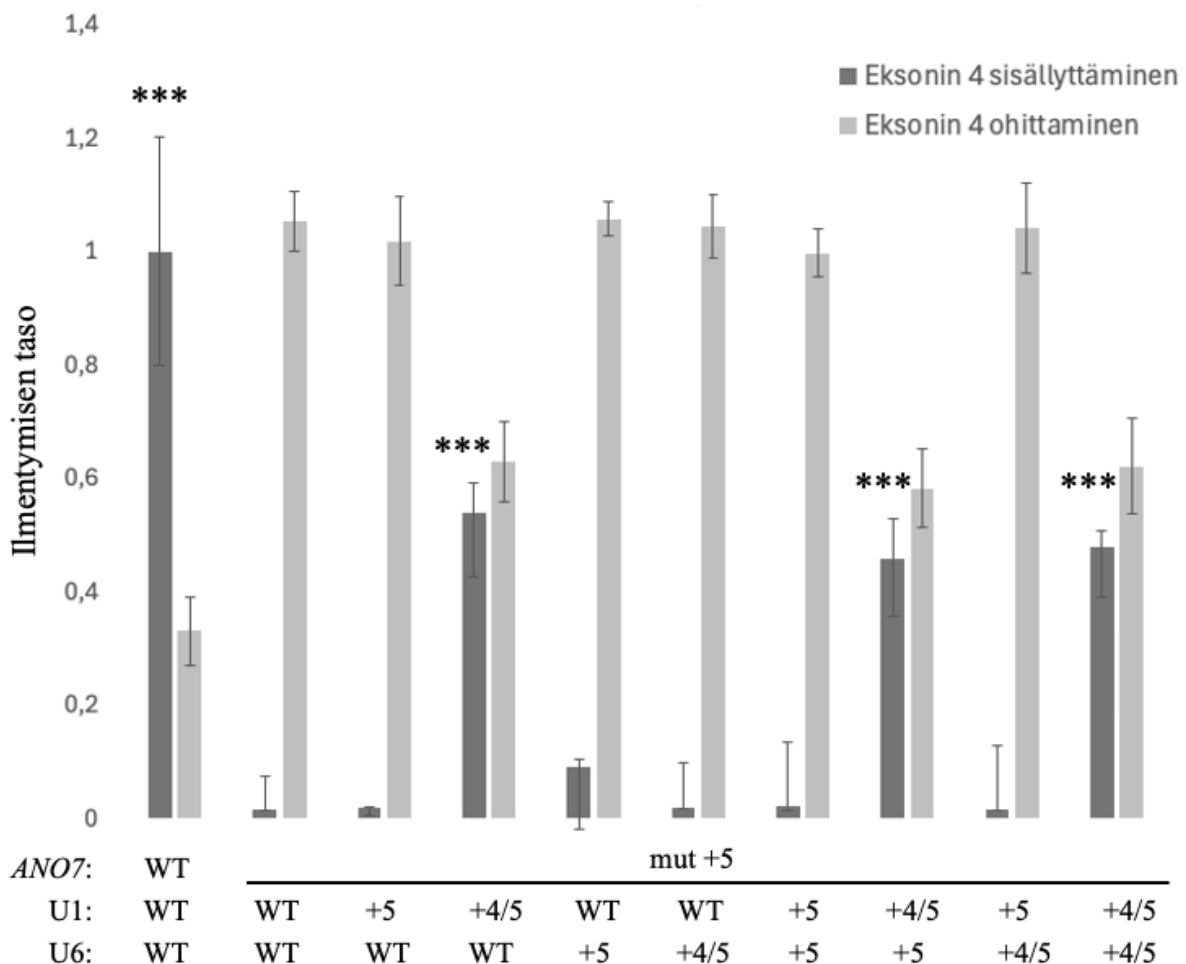
ANO7:n rs77559646-varianttiplasmidin (*ANO7* mut +5) eksonin 4 silmukoinnin korjaamista tutkittiin U1 mut 1 -plasmidin lisäksi toisilla muokatuilla U1- ja U6-snrRNA-plasmideilla ja niiden yhdistelmillä. U1 mut 2 -plasmidissa oli kaksi mutaatiota kohdissa +4/5, U6 mut 1 -plasmidissa yksi mutaatio kohdassa +5 ja U6 mut 2 -plasmidissa kaksi mutaatiota kohdissa +4/5 silmukointikohdassa. RT-PCR-tuotteista nähtiin, että yläfragmentti 404 bp voimistui kolmessa käsittelyssä: *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 WT, *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 1 sekä *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 2 (kuva 12). Kuitenkaan kyseisten käsittelyiden kohdalla yläfragmentin voimakkuus ei yltänyt villityyppikäsittelyn (*ANO7* WT + U1 WT + U6 WT) tasolle. Lisäksi käsittelyssä *ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 mut 1 näkyi yhdellä toistokierroksella hieman voimistunut yläfragmentti. Muissa käsittelyissä yläfragmentin voimistumista eli eksonin 4 silmukoinnin korjaamista ei havaittu.



Kuva 12. Minigeenien silmukointianalyysin kolmannen transfektion RT-PCR-tuotteet visualisoituna 2 % agarosigeelillä. Agarosigeelissä käytettiin 1 kb molekyylipainomarkkeria. *ANO7* WT + U1 WT + U6 WT oli villityyppikäsittely. *ANO7* rs77559646 (mut +5) + U1 WT + U6 WT oli varianttikäsittely. Selvitettiin, korjasivatko erilaiset yhdistelmät muokattuja spliseosomaalisia U1- ja U6-snrRNA-plasmideja (U1 mut 1 (+5), U1 mut 2 (+4/5), U6 mut 1 (+5) ja U6 mut 2 (+4/5)) *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin (*ANO7* mut +5) virheellistä silmukointia. Agarosigeelillä viimeisenä negatiivinen vesi kontrolli. Tulos toistettiin kolme kertaa.

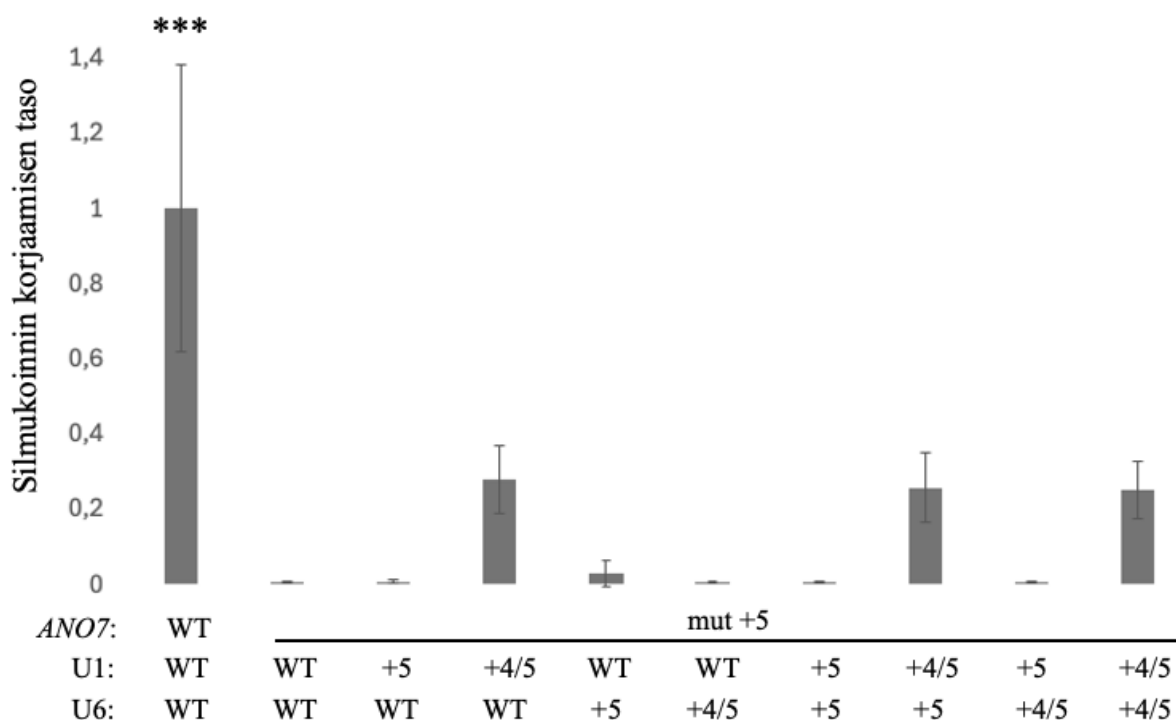
Kuvan 12 havainnot voitiin todentaa fragmenttien voimakkuuksien tarkemmassa tarkastelussa (kuva 13). *ANO7*:n rs77559646-variantin eksonin 4 sisällyttämisen taso oli voimistunut kolmen käsittelyn kohdalla: *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 WT (0,54), *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 1 (0,46) ja *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 2 (0,48). Eli silmukointi korjaantui näissä kolmessa käsittelyssä osittain. Lisäksi käsittelyssä *ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 mut 1 näkyi heikko eksonin 4 sisällyttämisen taso (0,09). Muissa käsittelyissä eksonin

4 sisällyttämisen taso oli olematon (noin 0,02). Tilastollisella testillä varmistettiin päätelmät. Dunnetin-testillä verrattiin kaikkien muiden käsittelyiden eksonin 4 sisällyttämisen tasoa *ANO7*:n rs77559646-varianttikäsittelyn (*ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 WT) tasoon. Mikäli tulos oli merkitsevä, käsittelyiden välillä oli eroa. Kolmen käsittelyn tulokset olivat erittäin merkitseviä ($P = <0,001$) *** villityyppikäsittelyn lisäksi.



Kuva 13. Pylväsdiagrammi *ANO7*:n rs77559646-variantin eksonin 4 silmukoinnin korjaamisesta muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snrRNA-plasmideilla. Selvitettiin, korjaavatko erilaiset yhdistelmät muokattuja U1- ja U6-snrRNA-plasmideja (U1 mut 1 (+5), U1 mut 2 (+4/5), U6 mut 1 (+5) ja U6 mut 2 (+4/5)) *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin (*ANO7* mut +5) virheellistä silmukointia. X-akselilla käsittelyt ja Y-akselilla ilmentymisen taso. Diagrammissa näkyvillä kunkin käsittelyn eksonin 4 sisällyttämisen ja ohittamisen tason keskiarvot ja keskihajonnat kolmelta toistokierrokselta. Villityyppikäsittelyn (*ANO7* WT + U1 WT + U6 WT) eksonin 4 sisällyttämisen tason arvo oli 1 ja kaikkien muiden käsittelyiden tasot normalisoitiin sillä. Silmukoinnin korjaamista tarkasteltiin tilastollisesti Dunnetin-testillä vertaamalla käsittelyiden eksonin 4 sisällyttämisen tasoa *ANO7*:n rs77559646-varianttikäsittelyn (*ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 WT) tasoon. Diagrammissa näkyvissä käsittelyiden merkitsevyys: *** erittäin merkitsevä tulos, $P = <0,001$.

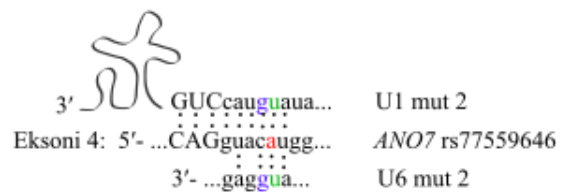
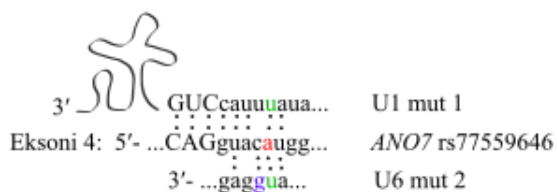
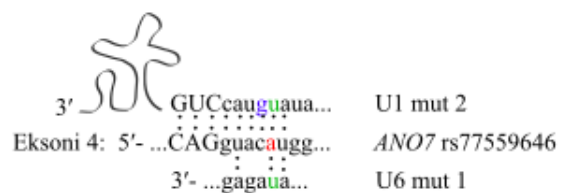
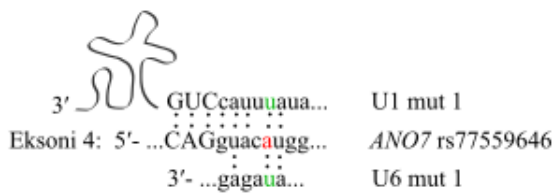
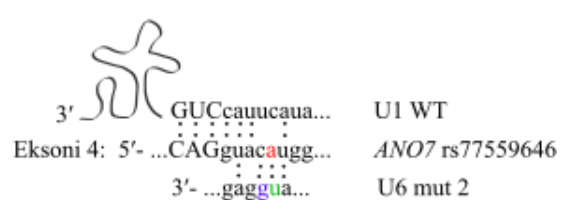
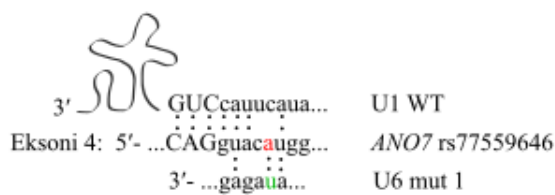
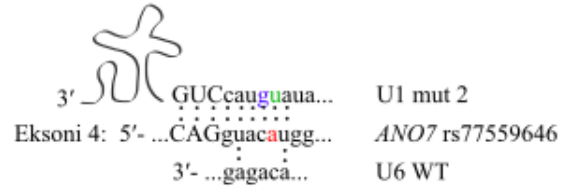
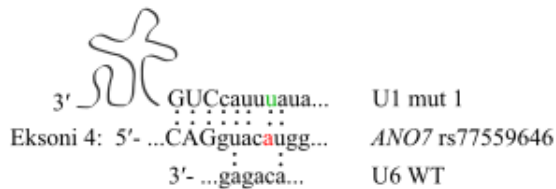
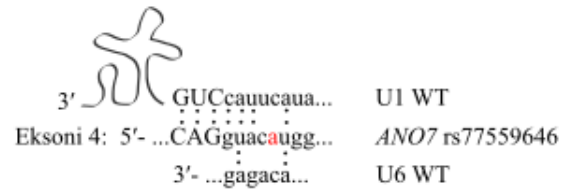
ANO7:n rs77559646-variantin eksonin 4 silmukoinnin korjaamisen tasoa voitiin tarkastella myös toisella diagrammilla, jossa yläfragmentin 404 bp voimakkuus oli jaettu alafragmentin 261 bp voimakkuudella (kuva 14). Diagrammin päätelmät olivat samansuuntaisia kuvan 13 kanssa, mutta eksonin 4 silmukoinnin korjaamisen taso oli käsittelyissä lähes puolet pienempi: *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 WT (0,28), *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 1 (0,26) ja *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 2 (0,25). Käsittelyn *ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 mut 1 silmukoinnin korjaamisen taso oli hyvin pieni (0,03). Tämä viittaisi siihen, että kyseinen käsittely ei korjannut silmukointia. Muut käsittelyt eivät korjanneet eksonin 4 silmukointia, koska korjaamisen taso oli lähellä nollaa (<0,01). Tilastollisella testillä varmistettiin päätelmät. Dunnetin-testillä verrattiin kaikkien muiden käsittelyiden silmukoinnin korjaamisen tasoa varianttikäsittelyn (*ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 WT) tasoon. Kolmen käsittelyn tulokset olivat lähes merkitseviä: *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 WT ($P = 0,055$), *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 1 ($P = 0,078$) ja *ANO7* rs77559646 + U1 mut 2 + U6 mut 2 ($P = 0,089$). Ainut erittäin merkitsevä tulos ($P = <0,001$) *** oli villityyppikäsittelyllä.



Kuva 14. Pylväsdiagrammi *ANO7*:n rs77559646-variantin eksonin 4 silmukoinnin korjaamisesta muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snrRNA-plasmideilla. Selvitettiin, korjaavatko erilaiset yhdistelmät muokattuja U1- ja U6-snrRNA-plasmideja (U1 mut 1 (+5), U1 mut 2 (+4/5), U6 mut 1 (+5) ja U6 mut 2 (+4/5)) *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin (*ANO7* mut +5) virheellistä silmukointia. X-akselilla käsittelyt, joissa yläfragmentin 404 bp voimakkuus oli jaettu alafragmentin 261 bp

voimakkuudella. Y-akselilla silmukoinnin korjaamisen taso. Diagrammissa näkyvillä kunkin käsittelyn silmukoinnin korjaamisen tason keskiarvot ja keskihajonnat kolmelta toistokierrokselta. Villityypikäsittelyn (*ANO7* WT + U1 WT + U6 WT) silmukoinnin korjaamisen tason arvo oli 1 ja kaikkien muiden käsittelyiden tasot normalisoitiin sillä. Silmukoinnin korjaamista tarkasteltiin tilastollisesti Dunnetin-testillä vertaamalla käsittelyiden silmukoinnin korjaamisen tasoa *ANO7*:n rs77559646-varianttikäsittelyn (*ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 WT) tasoon. Diagrammissa näkyvissä käsittelyiden merkitsevyys: *** erittäin merkitsevä tulos $P = <0,001$.

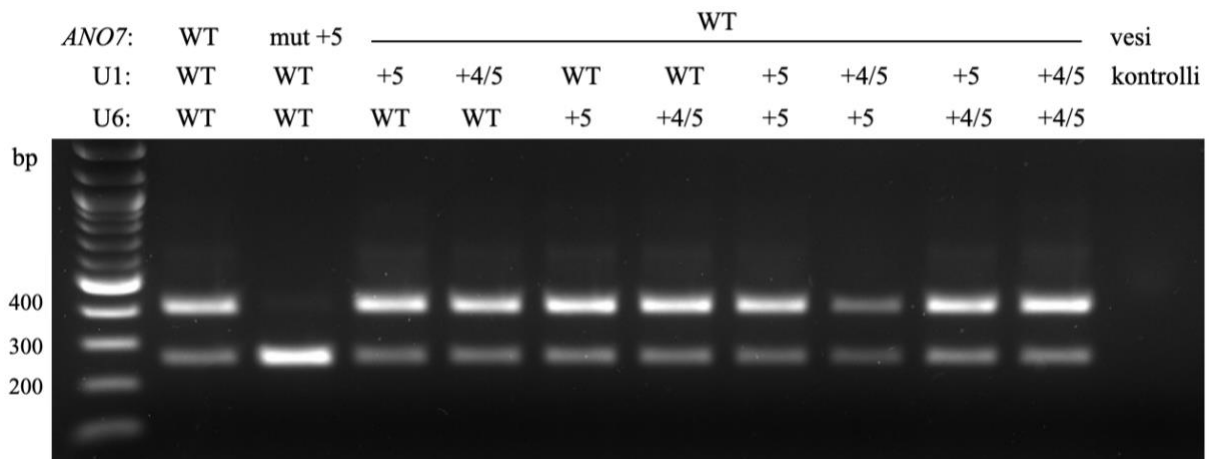
Silmukoinnin korjaamisen tulosta voitiin selittää plasmidikäsittelyiden emäspariutumisten perusteella (kuva 15). *ANO7*:n villityypillä oli 5'-silmukointikohdassa G-alleeli intronin 4 kohdassa +5 ja *ANO7*:n rs77559646-variantilla mutaatio G > A samassa kohtaa. Muokattujen spliseosomaalisten U1- ja U6-snrRNA:iden emäkset pariutuivat *ANO7*:n rs77559646-variantin 5'-silmukointikohdan emäksien kanssa. Yhdellä emäsmuutoksella muokatut snRNA-plasmidit, U1 mut 1 ja U6 mut 1 sisälsivät silmukointikohdan mutaation C > U kohdassa +5. Kahdella emäsmuutoksella muokattu U1 mut 2 -plasmidi sisälsi lisäksi silmukointikohdan mutaation U > G ja U6 mut 2 -plasmidi mutaation A > G kohdassa +4. Käsittelyiden komplementaarisuudet vaihtelivat emäspariutumisten perusteella. Lisätessä mutaatioita U1- ja U6-snrRNA:hin komplementaarisuus *ANO7*:n rs77559646-variantin sekvenssin kanssa lisääntyi. U1 mut 2 oli täysin komplementaarinen *ANO7*:n rs77559646-variantin kanssa, mikä tuki sitä näkemystä, että U1 mut 2 -plasmidi korjaisi silmukointia. U6 mut 1- tai U6 mut 2 -plasmideilla ei havaittu olevan vaikutusta silmukoinnin korjaamiseen, vaikka komplementaarisuus lisääntyi myös niiden kohdalla.



Kuva 15. Kolmannen transfektion plasmidikäsittelyiden emäpariutumiset. Lisätessä mutaatioita U1- ja U6-snrRNA:hin komplementaarisuus *ANO7*:n rs77559646-variantin sekvenssin kanssa lisääntyi silmukointikohdassa. *ANO7*:n rs77559646-variantin emäsmuutos G > A (punaisella) sijaisi 5'-silmukointikohdassa intronin 4 kohdassa +5. U1 mut 1 ja U6 mut 1 sisälsivät silmukointikohdan mutaation C > U (vihreällä) kohdassa +5. U1 mut 2 ja U6 mut 2 sisältävät lisäksi silmukointikohdan mutaation U/A > G (sinisellä) kohdassa +4. Kuva tuotettu Inkscape-ohjelmalla.

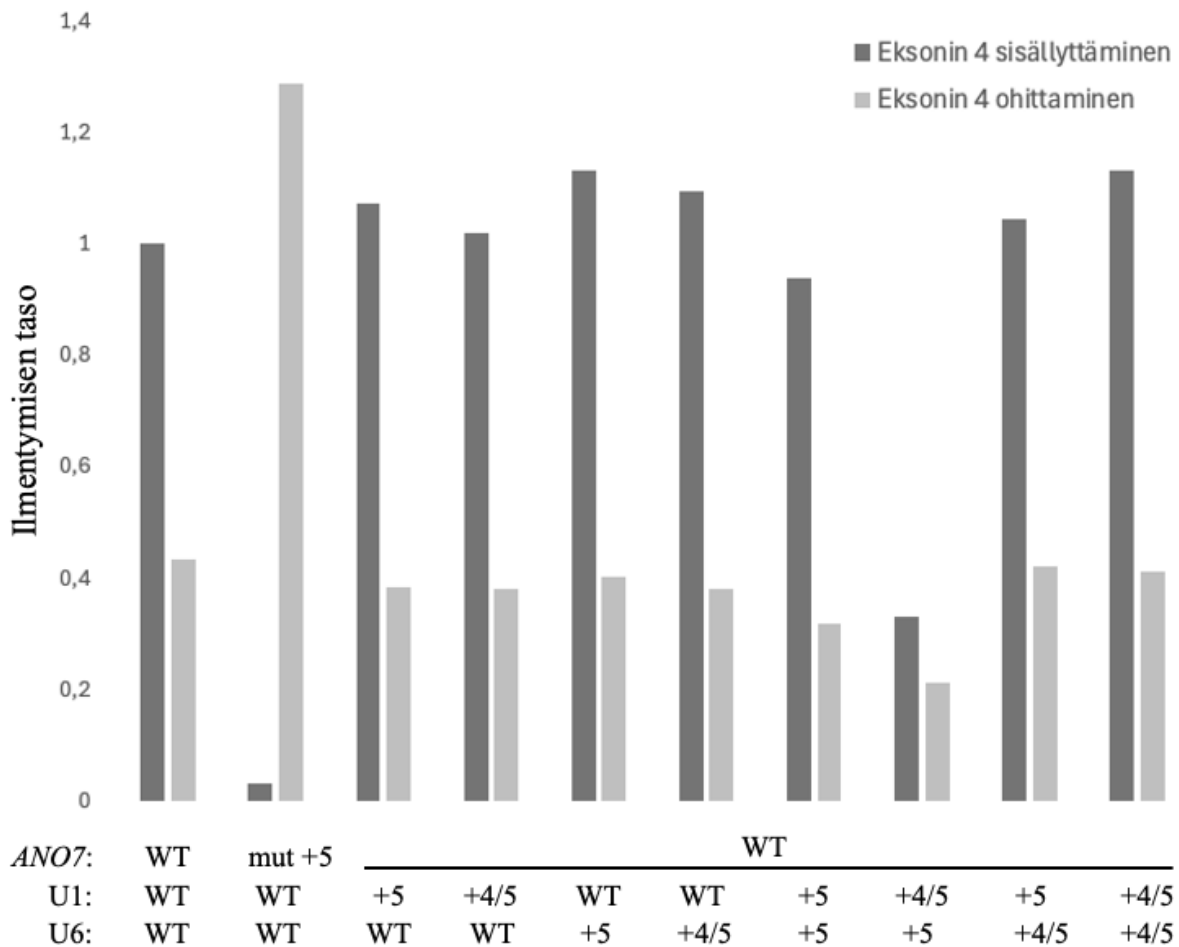
3.4 Silmukoinnin huonontaminen muokatuilla U1- ja U6-snRNA:illa

ANO7:n rs77559646-variantin eksonin 4 silmukoinnin korjaamisen lisäksi haluttiin tutkia, huononeeko *ANO7*:n villityypin eksonin 4 oikeaa silmukointia. Silmukoinnin huonontamista tutkittiin muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snRNA-plasmideilla ja niiden yhdistelmillä. RT-PCR-tuotteista ei nähty silmukoinnin huononemista eli alafragmentin 261 bp voimistumista, vaan fragmenttien voimakkuus pysyi villityyppikäsittelyn (*ANO7* WT + U1 WT + U6 WT) tasolla (kuva 16). Tästä voitaisiin päätellä, että muokatut spliseosomaaliset U1- ja U6-snRNA-plasmidit eivät huonontaneet *ANO7*:n villityypin eksonin 4 oikeaa silmukointia. Yhden käsittelyn, *ANO7* WT + U1 mut 2 + U6 mut 1 fragmentit näkyivät agarosigeelillä muita käsittelyitä heikommin, jolloin ylä- ja alafragmenttien voimakkuudet näyttivät virheellisesti lähes yhtä voimakkailta.



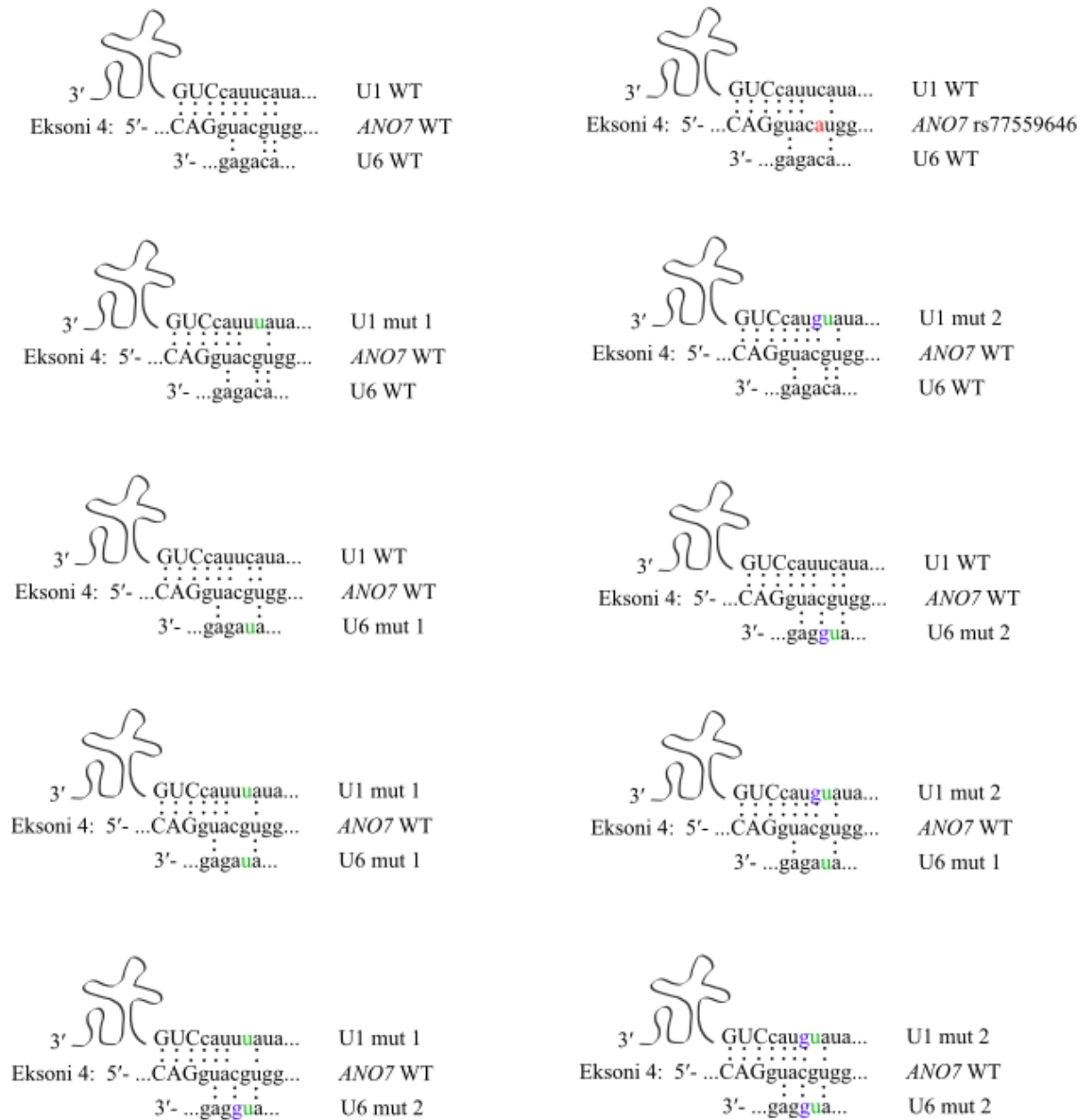
Kuva 16. Minigeenien silmukointianalyysin neljännen transfektion RT-PCR-tuotteet visualisoituna 2 % agarosigeelillä. Agarosigeelissä käytettiin 1 kb molekyylipainomarkkeria. *ANO7* WT + U1 WT + U6 WT oli villityyppikäsittely. *ANO7* rs77559646 (mut +5) + U1 WT + U6 WT oli varianttikäsittely. Selvitettiin, huonontavatko erilaiset yhdistelmät muokattuja spliseosomaalisia U1- ja U6-snRNA-plasmideja (U1 mut 1 (+5), U1 mut 2 (+4/5), U6 mut 1 (+5) ja U6 mut 2 (+4/5)) *ANO7*:n villityyppiplasmidin oikeaa silmukointia. Agarosigeelillä viimeisenä negatiivinen vesi kontrolli. Tulosta ei toistettu.

Kuvan 16 havainnot voitiin todentaa fragmenttien voimakkuuksien tarkemmassa tarkastelussa (kuva 17). Huomattiin, että kaikkien käsittelyiden eksonin 4 ohittamisen tasot olivat villityyppikäsittelyn tasoa (0,43) pienempiä tai yhtä suuria. Tämä tarkoitti sitä, että muokatut spliseosomaaliset U1- ja U6-snRNA-plasmidit eivät huonontaneet *ANO7*:n villityyppiplasmidin oikeaa silmukointia. Käsittelyn *ANO7* WT + U1 mut 2 + U6 mut 1 fragmentit näkyivät agarosigeelillä muita käsittelyitä heikommin (kuva 16), mikä oli nähtävissä myös diagrammissa matalampina arvoina (kuva 17).



Kuva 17. Pylväsdiagrammi *ANO7*:n villityypin eksonin 4 silmukoinnin huonontamisesta muokatuilla spliseosomaalisilla U1- ja U6-snRNA-plasmideilla. Selvitettiin, huonontavatko erilaiset yhdistelmät muokattuja U1- ja U6-snRNA-plasmideja (U1 mut 1 (+5), U1 mut 2 (+4/5), U6 mut 1 (+5) ja U6 mut 2 (+4/5)) *ANO7*:n villityyppiplasmidin eksonin 4 oikeaa silmukointia. X-akselilla käsittelyt ja Y-akselilla ilmentymisen taso. Diagrammissa näkyvillä kunkin käsittelyn eksonin 4 sisällyttämisen ja ohittamisen tasot. Villityyppikäsittelyn *ANO7* WT + U1 WT + U6 WT eksonin 4 sisällyttämisen tason arvo oli 1 ja kaikkien muiden käsittelyiden tasot normalisoitiin sillä. Tulosta ei toistettu.

Silmukoinnin huonontamisen tulosta voitiin selittää plasmidikäsittelyiden emäspariutumisten perusteella (kuva 18). Muokattujen spliseosomaalisten U1- ja U6-snRNA:iden emäkset pariutuivat *ANO7*:n villityypin 5'-silmukointikohdan emäksien kanssa vaihtelevalla komplementaarisuudella. Muokattujen U1- ja U6-snRNA:iden komplementaarisuus *ANO7*:n villityypin sekvenssin kanssa näytti pysyvän suunnilleen samana tai huononevan lisättäessä mutaatioita U1- ja U6-snRNA:ihin. Tämä selittäisi tulosta, ettei silmukointi huonontunut.



Kuva 18. Neljännän transfektion plasmidikäsittelyiden emäspariutumiset. Muokatut spliseosomaaliset U1- ja U6-snrRNA:iden emäkset pariutuivat *ANO7*:n villityypin 5'-silmukointikohdan emäksien kanssa vaihtelevalla komplementaarisuudella. U1 mut 1 ja U6 mut 1 sisälsivät silmukointikohdan mutaation C > U (vihreällä) kohdassa +5. U1 mut 2 ja U6 mut 2 sisälsivät lisäksi silmukointikohdan mutaation U/A > G (sinisellä) kohdassa +4. Kuva tuotettu Inkscape-ohjelmalla.

4 Pohdinta

4.1 Silmukoinnin muuttaminen muokatuilla U1- ja U6-snRNA:illa

4.1.1 *ANO7*:n rs77559646-variantin aiheuttaman silmukointivirheen korjaaminen

Tutkielman tarkoituksena oli selvittää, korjaavatko muokatut spliseosomaaliset U1- ja U6-snRNA:t *ANO7*:n rs77559646-variantin aiheuttamaa silmukointivirhettä. *ANO7*:n rs77559646-variantilla on 5'-silmukointialueen mutaatio G > A intronin 4 kohdassa +5, joka johtaa eksonin 4 ohittamiseen (Wahlström ym., 2022). Variantti on yhteydessä aggressiiviseen eturauhassyöpään (Kaikkonen ym., 2018). U1- ja U6-snRNA:t sitoutuvat 5'-silmukointikohtaan (Wahl ym., 2009). Sitoutuminen perustuu emäspariutumisiin (Buratti & Baralle, 2010). Todennäköisesti *ANO7*:n rs77559646-variantin mutaatio aiheuttaa komplementaarisuuden vähenemistä U1-snRNA:n ja U6-snRNA:n kanssa 5'-silmukointikohdassa (Kandels-Lewis & Séraphin, 1993; Zhuang & Weiner, 1986), mikä johtaa virheelliseen silmukointiin.

Minigeenien silmukointianalyysillä havaittiin, että rs77559646-variantin silmukointivirhettä korjaa kahdella mutaatiolla muokattu U1-snRNA eli U1 mut 2 -plasmidi, joka sisältää emäsmuutoksen C > U silmukointikohdassa +5 ja toisen muutoksen U > G kohdassa +4. Kahden mutaation U1-snRNA ei kuitenkaan korjaa silmukointia *ANO7*:n villityypin tasolle eli silmukoinnin korjaaminen ei ole täydellistä. Muokatuilla spliseosomaalisilla U6-snRNA:illa ei ole vaikutusta rs77559646-variantin silmukointiin. Silmukoinnin korjaaminen näyttäisi vaativan 5'-silmukointikohdassa *ANO7*:n rs77559646-variantin ja U1-snRNA:n välillä täydellisen komplementaarisuuden. U6-snRNA:n kohdalla ei havaittu silmukoinnin korjaamista komplementaarisuuden lisääntyessä.

Freund ym. (2005) selvitti, voisiko ylemmillä eukaryooteilla U1-snRNA:n täysi komplementaarisuus 5'-silmukointikohdan kanssa johtaa liialliseen stabiloitumiseen (engl. hyperstabilization) ja estää 5'-silmukointikohdassa U1-snRNA:n korvautumisen U6-snRNA:illa. Tätä tapahtuu hiivalla. Tutkimuksessa havaittiin, että U1-snRNA:n ja 5'-silmukointikohdan komplementaarisuus ei heikentänyt silmukointitehokkuutta. Se päinvastoin lisäsi tehokkuutta ja silmukointikohdan tunnistusta. Puolestaan U6-snRNA:n komplementaarisuuden 5'-silmukointikohdan kanssa ei havaittu vaikuttavan merkittävästi

silmukointiin. Ajatellaankin, että ylemmillä eukaryooteilla liiallinen U1-snRNA:n stabiloituminen lisää oikeaa silmukointia. (Freund ym., 2005).

Schmid ym. (2013) teki mutaatioita *BBS1* (Bardet-Biedl-oireyhtymä 1) -minigeeniin 5'-silmukointikohtaan ja huomasi, että mutaatioiden aiheuttamat silmukointivirheet korjaantuivat muokatuilla U1- ja U6-snRNA:illa. Muokattu U1-snRNA korjasi 5'-silmukointikohdan kohdan +5 mutaation aiheuttaman silmukointivirheen vain osittain, mikä on yhtenevä tulos tämän tutkielman kanssa. Muokattu U6-snRNA ei korjannut silmukointivirhettä esiintyessään yksin, mikä pitää myös paikkaansa tässä tutkielmassa. Muokatun U1-snRNA:n ja U6-snRNA:n molempien läsnä ollessa silmukointivirhe korjattiin lähes kokonaan, mikä taas erosi tämän tutkielman tuloksista. Olisi mielenkiintoista tietää, olisiko silmukointivirheen korjaus voimakkaampaa, jos *ANO7*:n rs77559646-varianttiplasmidin määrää olisi vähennetty suhteessa muokattuihin U1- ja U6-snRNA-plasmideihin. Tätä kokeiltiin tutkielmassa ainoastaan yhdellä mutaatiolla muokatulla U1-snRNA:lla, jolla ei ollut vaikutusta silmukointiin.

On havaittu, että usein viisi tai kuusi yhteensopivaa emäsparia U1-snRNA:n ja 5'-silmukointikohdan välillä riittää oikeanlaiseen silmukointiin (Ketterling ym., 1999). Tässä tutkielmassa *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukoinnin korjaaminen vaati U1-snRNA:n täydellisen komplementaarisuuden eksonin ja intronin liitosalueella välillä -3 ja +6. Tutkimuksissa on huomattu, että silmukoinnin kannalta on myös oleellista U6-snRNA:n ja 5'-silmukointikohdan välinen komplementaarisuus kolmesta kohtaa (+4, +5 ja +6) (Kandels-Lewis & Séraphin, 1993; Lesser & Guthrie, 1993). Tässä tutkielmassa kahdella mutaatiolla muokattu U6-snRNA sisältää kyseiset komplementaariset kohdat, mutta silmukointi ei parantunut tästä huolimatta. Pohdin, voisiko muokatun U6-snRNA:n tehon puuttuminen johtua siitä, että *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukoinnin korjaaminen vaatisi vielä paremman komplementaarisuuden U6-snRNA:n kanssa (kohdat +1 ja +3). Schmid ym. (2013) tutki, olisiko muilla U6-snRNA:n sitoutumiskohdilla kuin +4, +5 ja +6 vaikutusta silmukoinnin korjaamiseen, eikä havainnut muilla kohdilla olevan vaikutusta.

Tämän tutkielman eriävä tulos Schmid ym. (2013) tutkimuksen kanssa voi liittyä myös rs77559646-variantin mutaation vaikutuskohteeseen silmukonnissa. Mutaatio näyttäisi häiritsevän silmukoinnin alkuvaihetta, jossa U1-snRNA tunnistaa 5'-silmukointikohdan ja sitoutuu siihen (Wahl ym., 2009). Myöhemmin U6-snRNA korvaa U1-snRNA:n ja muodostaa katalyyttisesti aktiivisen kohdan. U6-snRNA:n ajatellaan katalysoivan molempia

vaihtoesteröintireaktioita (Valadkhan, 2010). Koska kahdella mutaatiolla muokattu U1-snRNA:n korjasi silmukointivirhettä ja muokattu U6-snRNA ei, rs77559646-variantin mutaation vaikutus näyttäisi kohdistuvan enemmän silmukoinnin alkuun.

Kaikista ihmisen geneettisiä sairauksia aiheuttavista pistemutaatioista noin 15 % sijaitsee silmukointikohdissa ja johtaa lähetti-RNA:n silmukointivirheeseen (Krawczak ym., 1992). Vaihtoehtoiseen silmukointiin johtavat 5'-silmukointikohdan mutaatiot kohdassa +5 ovat melko yleisiä (Buratti ym., 2007). Muokattujen U1-snRNA:iden tehoa on tutkittu muutamissa sairauksissa, joissa on taustalla 5'-silmukointikohdan mutaatio kohdassa +5 (Gonçalves ym., 2023).

Esimerkkinä tällaisesta sairaudesta on synnynnäinen ja perinnöllinen verenvuototauti, joka johtuu hyytymistekijä VII:n (FVII) puutteesta. Taudin 5'-silmukointikohdan mutaatio G > A sijaitsee intronin 7 kohdassa +5 ja se aiheuttaa eksonin 7 ohittamisen ja FVII-puutoksen. Mutaatio on siis hyvin samantapainen *ANO7*:n rs77559646-variantin aiheuttaman mutaation kanssa. Tutkimuksessa suunniteltiin komplementaarisia U1-snRNA:ita ja ainoastaan täysin komplementaariseksi muokattu U1-snRNA paransi 5'-silmukointikohdan sitoutumista ja korjasi silmukointia parhaimmillaan 50 %. Tulos oli annoksesta riippuva. Plasmidien suhteen ollessa sama silmukointi korjaantui noin 25 % teholla. Kun taas muokattua U1-snRNA-plasmidia lisättiin 1,5-kertaisessa suhteessa tai enemmän, silmukointi korjaantui noin 50 % teholla. Tutkimus osoitti, että FVII-puutoksen takana oli heikentynyt U1-snRNA:n komplementaarisuus. Tutkimuksen tulos oli samantapainen tämän tutkielman kanssa ja osoitti muokatun U1-snRNA:n suhteella olevan merkitystä silmukoinnin korjaantumisessa. (Pinotti ym., 2008).

Muokattujen U1- ja U6-snRNA:iden yhteisvaikutusta silmukointivirheen korjaamiseen on tutkittu eläinmalleilla harvoissa sairauksissa, kuten eräässä vakavassa silmänsairaudessa, joka johtuu *OPAI*-geenin 5'-silmukointikohdan mutaatiosta G > A intronin 10 kohdassa +5. Mutaatio aiheuttaa eksonin 10 ohittamisen ja johtaa 27 aminohapon menettämiseen *OPA1*-proteiinissa. Tutkimuksessa tutkittiin, korjaavatko täysin komplementaariseksi muokatut U1- ja U6-snRNA:t mutaation aiheuttaman silmukointivirheen hiirimalleissa subretinaalisella antoreitillä. Molemmilla, pelkällä komplementaarisella U1-snRNA:lla sekä U1- ja U6-snRNA:illa yhdessä havaittiin samanlainen silmukointia korjaava vaikutus. Lisäksi *OPA1*-proteiinin ilmentymisen huomattiin voimistuvan. Tutkimuksen tulos oli siinä mielessä yhtenevä

tämän tutkielman kanssa, että muokatulla U6-snrRNA:lla ei havaittu olevan silmukointia korjaavaa vaikutusta. On siis mahdollista, että edes täysin komplementaariseksi muokattu U6-snrRNA ei korjaisi *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukointivirhettä. (Swirski ym., 2023).

Vaikuttaisi siltä, että silmukoinnin korjaus vaatii muokattujen U1- ja U6-snrRNA:iden lisäksi muita muutoksia silmukointikoneistossa. Uskotaan, että esiaste-RNA:n silmukointia katalysoivat ennemmin snRNA:t kuin proteiinit (Sawa & Shimura, 1992). Kuitenkin arvellaan, että proteiineilla, kuten U1-C-polypeptidillä, PRPF8-proteiinilla (engl. pre-mRNA processing factor 8) sekä SR- ja hnRNP-proteiiniperheiden (engl. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) jäsenillä olisi vaikutusta 5'-silmukointikohdan tunnistamisessa (Roca ym., 2008). Tässä tutkielmassa keskityttiin vain U1- ja U6-snrRNA:iden vaikutuksien tutkimiseen, mutta voisi olla mielenkiintoista tarkastella myös esimerkiksi U5-snrRNA:ta, koska U5-snrRNA vaikuttaa U6-snrRNA:n läheisyydessä silmukoinnin loppuun asti (Wahl ym., 2009). Tarvittaisiin lisää tutkimusta, jotta saataisiin tietoon muita tekijöitä, jotka osallistuvat silmukointivirheen korjaamiseen.

Tutkielma antaa varovaista näyttöä siitä, että *ANO7*:n rs77559646-variantti voisi mahdollisesti soveltua geeniterapian kohteeksi tulevaisuudessa. Mahdollisesti kahden mutaation sisältävää U1-snrRNA:ta voitaisiin käyttää *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukointivirheen osittaiseen korjaamiseen. Kuitenkin lisää tutkimusta tarvitaan aiheesta. Jos *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukointivirhe olisi mahdollista korjata, tarkoittaisi se sitä, että *ANO7*:n esiaste-RNA:n normaali silmukointi palautuisi. Tämä voisi johtaa *ANO7*-geenin normaaliin toimintaan ja proteiinituotteen, mikä voisi puolestaan vähentää aggressiivisen eturauhassyövän riskiä. Tämän tutkimuksen tulokset voivat antaa viitteitä siitä, että vastaavanlaisia silmukointihäiriöitä voitaisiin mahdollisesti korjata myös muissa sairauksissa muokatun U1-snrRNA:n avulla.

Tutkimus ei ainoastaan kerro *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukointivirheen korjaamisesta, vaan myös selittää molekulaarista mekanismia rs77559646-variantin silmukointivirheen taustalla. Koska muokattu U1-snrRNA korjaa osan silmukointivirheestä, todennäköisesti *ANO7*:n rs77559646-variantin virheellinen silmukointi johtuu myös osittain U1-snrRNA:n komplementaarisuuden heikkenemisestä 5'-silmukointikohdassa.

4.1.2 *ANO7*:n villityypin oikean silmukoinnin huonontaminen

ANO7:n rs77559646-variantin silmukointivirheen korjaamisen lisäksi tarkasteltiin *ANO7*:n villityypin eksonin 4 oikean silmukoinnin huonontamista, jotta saataisiin parempi käsitys snRNA:iden toiminnasta. *ANO7*:n villityypillä on 5'-silmukointialueella G-alleeli intronin 4 kohdassa +5 (Wahlström ym., 2022). *ANO7*:n villityypin komplementaarisuus U1-snRNA:n ja U6-snRNA:n kanssa 5'-silmukointikohdassa on rs77559646-variantin komplementaarisuutta parempi, mikä johtaa oikeaan silmukointiin.

Minigeenien silmukointianalyysillä havaittiin, että muokatut spliseosomaaliset U1- ja U6-snRNA:t eivät huononna *ANO7*:n villityypin oikeaa silmukointia. Ainoastaan toisen transfektion yhdellä mutaatiolla muokattu U1-snRNA vaikutti huonontavan vähän *ANO7*:n villityypin silmukointia. Tämä voi johtua esimerkiksi siitä, että kyseisessä transfektiossa muokattua U1-snRNA-plasmidia lisättiin *ANO7*:n villityyppiplasmidia moninkertaisesti enemmän. Muuten silmukoinnin huonontamista ei havaittu, kun snRNA-plasmidien ja *ANO7*:n villityyppiplasmidin suhde oli sama. Tällöin tulos johtuu todennäköisesti komplementaarisuudesta, sillä muokatessa U1- ja U6-snRNA:ita komplementaarisuus *ANO7*:n villityypin 5'-silmukointikohdan kanssa pysyy samana tai huononee.

Neljännän transfektion yhdessä käsittelyssä (*ANO7* WT + U1 mut 2 + U6 mut 1) fragmentit näkyivät heikommin ja fragmenttien voimakkuuksien tasot jäivät muita käsittelyitä matalammaksi. Verratessa kyseisen käsittelyn fragmenttien suhteellisia voimakkuuksia villityyppikäsittelyyn näytti siltä, että käsittely voisi huonontaa silmukointia hieman. Kuitenkin tämä tulos on todennäköisesti vääristynyt heikommin näkyvien fragmenttien vuoksi.

4.2 Tutkimuksen virhelähteet ja rajoitteet

Vaikka tutkimus onnistui kokonaisuudessaan hyvin, on siinä muutamia virhelähteitä. Yksi virhelähde on transfektiotehokkuus, sillä transfektiotehokkuus vaihteli hieman kierroksien välillä. Toinen virhelähde on RNA:n eristämisen onnistuminen minigeenien silmukointianalyysissä. RNA-näytteistä suurimmalla osalla oli hyvä puhtausarvo. Muutaman näytteen laatu oli heikompi johtuen todennäköisesti faasierotuksen herkkydestä eli fenoli-kloroformifaasiin jäämistä tai riittämättömästä pesuvaiheesta. Yhden silmukoinnin huonontamisen käsittelyn (*ANO7* WT + U1 mut 2 + U6 mut 1) fragmentit näkyivät muita

käsittelyitä heikommin agarosigeelillä. Tähän on voinut vaikuttaa edellä mainitsemat syyt tai esimerkiksi häiriö PCR:ssä tuntemattomasta syystä. Osa käyttämistäni reagensseista oli vanhentuneita, millä on voinut olla myös vaikutusta.

Minigeenien silmukointianalyysi toistettiin kolme kertaa tarkastellessa *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukoinnin korjaamista ja vain kerran tarkastellessa *ANO7*:n villityypin silmukoinnin huonontamista resurssikohtaisista syistä. Kolmella toistolla saatiin merkitseviä tuloksia, mutta toistomäärää kasvattamalla tilastollista tehoa saataisiin vielä lisättyä. Joidenkin toistojen välillä esiintyi suurehkoja keskihajontoja, kuten villityyppikäsittelyn (*ANO7* WT + U1 WT + U6 WT) kohdalla. Keskiarvon keskivirhe pienenisi toistoja lisättäessä. *ANO7*:n villityypin silmukoinnin huonontamisesta ei tehty toistoja, koska silmukoinnin huonontumista ei havaittu minkään käsittelyn kohdalla. Ajateltiin, että olisi turhaa käyttää resursseja ja aikaa toistokierroksiin. Vaikka tulos oli selvä, olisi toistoja lisäämällä voitu tulos varmentaa vielä tilastollisesti.

Yksi virhelähde liittyy tuloksien analysointiin ImageJ-ohjelmalla. Silmukointianalyysin fragmenttien voimakkuuksien tulkintaan vaikuttaa muun muassa manuaalinen fragmenttien rajaus ja agarosigeelikuvien asetukset, kuten valotus ja kontrasti. Vertailuun valittiin mahdollisimman samankaltaiset kuvat ja fragmentit rajattiin mahdollisimman tarkasti. Tilastolliseksi testiksi valikoitui yksisuuntainen varianssianalyysi (One-Way ANOVA) ja Dunnetin (post hoc) -testi, koska haluttiin verrata varianttikäsittelyä (*ANO7* rs77559646 + U1 WT + U6 WT) kaikkiin muihin käsittelyihin. Dunnetin-testin antamat merkitsevyydet vaikuttavat järkeviltä, mutta käsittelyryhmien keskihajonnat erosivat jonkin verran toisistaan, mikä voi vaikuttaa testin merkittävien erojen havaitsemiseen.

Tutkimuksen rajoitteet liittyvät lähinnä *in vitro* -toteutukseen COS-7-soluilla ja menetelmän turvallisuuden arviointiin. Ei ole täyttä varmuutta, toimisiko tutkimus samalla tavalla esimerkiksi 22Rv1-solulinjassa. 22Rv1 on ihmisen eturauhaskarsinoma-solulinja, jossa *ANO7*:n rs77559646-variantti esiintyy luonnostaan. Siirryttäessä *in vivo* -tutkimukseen tulisi menetelmää arvioida turvallisuuden puolesta ja varmistaa, ettei U1- ja U6-snrRNA:iden muokkaaminen häiritse kohteen ulkopuolisten esiaste-RNA:iden silmukointia (engl. off-target pre-mRNA splicing) (Schmid ym., 2013).

Kohteen ulkopuoliset vaikutukset ovat mahdollisia erityisesti muokattujen U1-snRNA:iden kohdalla, joissa on yksi emäsmuutos luonnolliseen U1-snRNA:han verrattaessa. Tällöin muokattu U1-snRNA voi olla liian samankaltainen luonnollisen U1-snRNA:n kanssa, jolloin se saattaa aktivoida normaalisti piileviä 5'-silmukointikohtia (engl. cryptic 5' splice site), mikä voi johtaa poikkeavaan silmukointiin ei halutuissa geneeissä. Tällaisia sivuvaikutuksia voi olla vaikeaa ennustaa. Ratkaisuna olisi esimerkiksi eksonispesifisen U1-snRNA:n suunnittelu (engl. exon-specific U1 snRNA, ExSpeU1). Eksonispesifinen U1-snRNA ei sitoudu suoraan 5'-silmukointikohtaan, vaan alavirran introniin, joka on yhteydessä spesifiin eksoniin. (Pinotti ym., 2011).

4.3 Jatkotutkimusaiheet

Tutkielmassa tutkittiin *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukointivirheen korjaamista *in vitro* -tasolla COS-7-soluilla. Seuraava vaihe olisi plasmidien vienti ihmisen eturauhaskarsinooma-solulinjaan 22Rv1, jotta nähtäisiin, onko muokattujen U1- ja U6-snRNA:iden vaikutus sama kuin tässä tutkimuksessa. On mahdollista, että muokatut U1- ja U6-snRNA:t käyttäytyisivät eri tavalla ihmisen solulinjassa, eikä samoja vaikutuksia välttämättä havaittaisi. Siirryttäessä ihmisen solulinjaan tulee arvioida menetelmän turvallisuus, erityisesti kohteen ulkopuolisen esiaste-RNA:n silmukoinnin mahdollisuus.

Kun menetelmän toimivuus ja turvallisuus olisi arvioitu 22Rv1-solulinjassa, voitaisiin paremmin arvioida, olisiko menetelmää mahdollista käyttää tulevaisuudessa *ANO7*:n rs77559646-variantin silmukointivirheen korjaamiseen tai voisiko muokattuja U1-snRNA:ita hyödyntää aggressiivisen eturauhassyövän hoidossa. Lisäksi tarvittaisiin enemmän tutkimusta, jotta silmukointivirhe voitaisiin korjata kokonaan. *ANO7*:n rs77559646-varianttia esiintyy 9,4 %:lla tutkituista suomalaisista kastroatioresistenteistä eturauhassyöpäpotilaista (Kaikkonen ym., 2018). Tulisikin arvioida tarkasti, onko variantti tarpeeksi yleinen, että siihen kannattaisi kehittää kohdennettua geeniterapiaa.

Aggressiivisen eturauhassyövän alttiusgeenit, kuten *ANO7*-geeni, eivät ole tällä hetkellä laajasti kliinisessä käytössä biomarkkerina tai geenitestin kohteena. Tutkielman tulos vahvistaa näkemystä siitä, että *ANO7*-geeni tai rs77559646-variantti voisivat soveltua tulevaisuudessa

biomarkkereiksi. Kuitenkin lisää tutkimusta tarvitaan, jotta *ANO7*-geenin ja rs77559646-variantin toimintamekanismit eturauhassyövässä ymmärrettäisiin kokonaan.

Kiitokset

Haluaisin lämpimästi kiittää Johanna Schleutkeria mielenkiintoisen gradupaikan mahdollistamisesta Genetic cancer predisposition -tutkimusryhmässä eturauhassyövän parissa ja asiantuntevasta ohjauksesta. Erityiskiitos ohjaajalleni Christoffer Löfille johdonmukaisesta ja kattavasta ohjauksesta koko graduprosessini ajan. Laboratoriotyöskentelyyn saamani ohjaus ja kirjoitusprosessin aikaiset neuvot olivat korvaamattomia ja auttoivat minua kehittymään tutkimuksen tekemisessä. Lisäksi haluan kiittää muita tutkimusryhmän jäseniä, jotka ovat auttaneet graduprosessini aikana. Päivi Onkamo kiitän ohjauksesta biologian laitoksen puolelta. Lopuksi haluan kiittää perhettäni ja ystäviäni kannustuksesta ja saamastani tuesta.

Lähteet

- Alberti, C. (2010). Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features. *Pharmacological Sciences*, *14*, 31–41.
- Alizadeh, M., & Alizadeh, S. (2014). Survey of Clinical and Pathological Characteristics and Outcomes of Patients With Prostate Cancer. *Global Journal of Health Science*, *6*(7), 49. <https://doi.org/10.5539/GJHS.V6N7P49>
- Anczukow, O., & Krainer, A. R. (2016). Splicing-factor alterations in cancers. *RNA*, *22*(9), 1285. <https://doi.org/10.1261/RNA.057919.116>
- Andersson, S., Berman, D. M., Jenkins, E. P., & Russell, D. W. (1991). Deletion of steroid 5 α -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* *1991* *354*:6349, *354*(6349), 159–161. <https://doi.org/10.1038/354159A0>
- Bai, S., Zhang, B., & Dong, Y. (2019). Impact of taxanes on androgen receptor signaling. *Asian Journal of Andrology*, *21*(3), 249–252. https://doi.org/10.4103/AJA.AJA_37_18
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). Androgen action in prostate function and disease. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, *6*(2), 62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5902724/>
- Baralle, D., Lucassen, A., & Buratti, E. (2009). Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice. *EMBO Reports*, *10*(8), 810. <https://doi.org/10.1038/EMBOR.2009.170>
- Beltran, H., Hruszkewycz, A., Scher, H. I., Hildesheim, J., Isaacs, J., Yu, E. Y., Kelly, K., Lin, D., Dicker, A., Arnold, J., Hecht, T., Wicha, M., Sears, R., Rowley, D., White, R., Gulley, J. L., Lee, J., Meco, M. D., Small, E. J., ... Nelson, P. S. (2019). The role of lineage plasticity in prostate cancer therapy resistance. *Clinical Cancer Research*, *25*(23), 6916–6924. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1423>
- Benarroch, E. E. (2017). Anoctamins (TMEM16 proteins): Functions and involvement in neurologic disease. *Neurology*, *89*(7), 722–729. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004246>
- Benke, I. N., Leitzmann, M. F., Behrens, G., & Schmid, D. (2018). Physical activity in relation to risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*, *29*(5), 1154–1179. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDY073>
- Bera, T. K., Das, S., Maeda, H., Beers, R., Wolfgang, C. D., Kumar, V., Hahn, Y., Lee, B., & Pastan, I. (2004). NGEF, a gene encoding a membrane protein detected only in prostate cancer and normal prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3059–3064. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308746101>
- Bergengren, O., Pekala, K. R., Matsoukas, K., Fainberg, J., Mungovan, S. F., Bratt, O., Bray, F., Brawley, O., Luckenbaugh, A. N., Mucci, L., Morgan, T. M., & Carlsson, S. V. (2023). 2022

- Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors—A Systematic Review. *European Urology*, 84(2), 191–206. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2023.04.021>
- Bio-Rad. (2025). *iScript Select cDNA Synthesis Kit*. <<https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001023.pdf>> [Luettu 5.10.2025]
- Black, D. L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 72(Volume 72, 2003), 291–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>
- Brookman-May, S. D., Campi, R., Henríquez, J. D. S., Klatte, T., Langenhuijsen, J. F., Brausi, M., Linares-Espinós, E., Volpe, A., Marszalek, M., Akdoğan, B., Roll, C., Stief, C. G., Rodriguez-Faba, O., & Minervini, A. (2019). Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of Oncological Urology (ESOU). *European Urology Focus*, 5(5), 756–787. <https://doi.org/10.1016/J.EUF.2018.02.007>
- Bugoye, F. C., Torrorey-Sawe, R., Biegon, R., Dharsee, N., Mafumiko, F. M. S., Patel, K., & Mining, S. K. (2023). Mutational spectrum of DNA damage and mismatch repair genes in prostate cancer. *Frontiers in Genetics*, 14, 1231536. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2023.1231536>
- Buratti, E., & Baralle, D. (2010). Novel roles of U1 snRNP in alternative splicing regulation. *RNA biology*, 7(4), 412–419. <https://doi.org/10.4161/RNA.7.4.12153>
- Buratti, E., Chivers, M., Královičová, J., Romano, M., Baralle, M., Krainer, A. R., & Vořechovský, I. (2007). Aberrant 5' splice sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4250–4263. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKM402>
- Campi, R., Brookman-May, S. D., Subiela Henríquez, J. D., Akdoğan, B., Brausi, M., Klatte, T., Langenhuijsen, J. F., Linares-Espinos, E., Marszalek, M., Roupert, M., Stief, C. G., Volpe, A., Minervini, A., & Rodriguez-Faba, O. (2019). Impact of Metabolic Diseases, Drugs, and Dietary Factors on Prostate Cancer Risk, Recurrence, and Survival: A Systematic Review by the European Association of Urology Section of Oncological Urology. *European Urology Focus*, 5(6), 1029–1057. <https://doi.org/10.1016/J.EUF.2018.04.001>
- Castro, E., Goh, C., Olmos, D., Saunders, E., Leongamornlert, D., Tymrakiewicz, M., Mahmud, N., Dadaev, T., Govindasami, K., Guy, M., Sawyer, E., Wilkinson, R., Ardern-Jones, A., Ellis, S., Frost, D., Peock, S., Evans, D. G., Tischkowitz, M., Cole, T., ... Eeles, R. (2013). Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and

- poor survival outcomes in prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(14), 1748–1757. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.1882>
- Center, M. M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., & Bray, F. (2012). International Variation in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *European Urology*, 61(6), 1079–1092. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2012.02.054>
- Cereda, V., Poole, D. J., Palena, C., Das, S., Bera, T. K., Remondo, C., Gulley, J. L., Arlen, P. M., Yokokawa, J., Pastan, I., Schlom, J., & Tsang, K. Y. (2010). New gene expressed in prostate: A potential target for T cell-mediated prostate cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0723-6>
- Chandran, U. R., Ma, C., Dhir, R., Bisceglia, M., Lyons-Weiler, M., Liang, W., Michalopoulos, G., Becich, M., & Monzon, F. A. (2007). Gene expression profiles of prostate cancer reveal involvement of multiple molecular pathways in the metastatic process. *BMC Cancer*, 7(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-64>
- Cornford, P., van den Bergh, R. C. N., Briers, E., Van den Broeck, T., Brunckhorst, O., Darragh, J., Eberli, D., De Meerleer, G., De Santis, M., Farolfi, A., Gandaglia, G., Gillessen, S., Grivas, N., Henry, A. M., Lardas, M., van Leenders, G. J. L. H., Liew, M., Linares Espinos, E., Oldenburg, J., ... Tilki, D. (2024). EAU-EANM-ESTRO-ESUR-ISUP-SIOG Guidelines on Prostate Cancer—2024 Update. Part I: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology*, 86(2), 148–163. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2024.03.027>
- Cropp, C. D., Simpson, C. L., Wahlfors, T., Ha, N., George, A., Jones, M. S., Harper, U., Ponciano-Jackson, D., Green, T. A., Tammela, T. L. J., Bailey-Wilson, J., & Schleutker, J. (2011). Genome-wide linkage scan for prostate cancer susceptibility in Finland: Evidence for a novel locus on 2q37.3 and confirmation of signal on 17q21-q22. *International Journal of Cancer*, 129(10), 2400–2407. <https://doi.org/10.1002/IJC.25906>
- Damber, J. E., & Aus, G. (2008). Prostate cancer. *The Lancet*, 371(9625), 1710–1721. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60729-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60729-1)
- Das, S., Hahn, Y., Nagata, S., Willingham, M. C., Bera, T. K., Lee, B., & Pastan, I. (2007). NGEP, a Prostate-Specific Plasma Membrane Protein that Promotes the Association of LNCaP Cells. *Cancer Research*, 67(4), 1594–1601. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2673>
- Das, S., Hahn, Y., Walker, D. A., Nagata, S., Willingham, M. C., Peehl, D. M., Bera, T. K., Lee, B., & Pastan, I. (2008). Topology of NGEP, a Prostate-Specific Cell:Cell Junction Protein Widely Expressed in Many Cancers of Different Grade Level. *Cancer Research*, 68(15), 6306–6312. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0870>
- Davis, I. D., Martin, A. J., Stockler, M. R., Begbie, S., Chi, K. N., Chowdhury, S., Coskinas, X., Frydenberg, M., Hague, W. E., Horvath, L. G., Joshua, A. M., Lawrence, N. J., Marx, G., McCaffrey, J., McDermott, R., McJannett, M., North, S. A., Parnis, F., Parulekar, W., ... Sweeney, C. J. (2019). Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate

- Cancer. *New England Journal of Medicine*, 381(2), 121–131.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903835>
- de Bono, J. S., Guo, C., Gurel, B., De Marzo, A. M., Sfanos, K. S., Mani, R. S., Gil, J., Drake, C. G., & Alimonti, A. (2020). Prostate carcinogenesis: inflammatory storms. *Nature Reviews Cancer* 2020 20:8, 20(8), 455–469. <https://doi.org/10.1038/S41568-020-0267-9>
- De Conti, L., Baralle, M., & Buratti, E. (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(1), 49–60. <https://doi.org/10.1002/WRNA.1140>
- Dong, L., Zieren, R. C., Xue, W., de Reijke, T. M., & Pienta, K. J. (2018). Metastatic prostate cancer remains incurable, why? *Asian Journal of Urology*, 6(1), 26.
<https://doi.org/10.1016/J.AJUR.2018.11.005>
- Duffy, M. J. (2011). Prostate-specific antigen: does the current evidence support its use in prostate cancer screening? *Annals of Clinical Biochemistry*, 48(4), 310–316.
<https://doi.org/10.1258/ACB.2011.010273>
- Dvinge, H., & Bradley, R. K. (2015). Widespread intron retention diversifies most cancer transcriptomes. *Genome Medicine*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0168-9>
- Eggerer, S., Salomon, G., Scardino, P. T., De la Rosette, J., Polascik, T. J., & Brewster, S. (2010). Focal Therapy for Prostate Cancer: Possibilities and Limitations. *European Urology*, 58(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2010.03.034>
- Epstein, J. I., Egevad, L., Amin, M. B., Delahunt, B., Srigley, J. R., Humphrey, P. A., Al-Hussain, T., Algaba, F., Aron, M., Berman, D., Berney, D., Brimo, F., Cao, D., Chevillet, J., Clouston, D., Colecchia, M., Comperat, E., Da Cunha, I. W., De Marzo, A., ... Rodrigues, G. (2016). The 2014 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma definition of grading patterns and proposal for a new grading system. *American Journal of Surgical Pathology*, 40(2), 244–252.
<https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000530>
- Falzone, M. E., Malvezzi, M., Lee, B. C., & Accardi, A. (2018). Known structures and unknown mechanisms of TMEM16 scramblases and channels. *The Journal of General Physiology*, 150(7), 933. <https://doi.org/10.1085/JGP.201711957>
- Figiel, S., Cancel-Tassin, G., Mills, I. G., Lamb, A. D., Fromont, G., & Cussenot, O. (2023). Molecular Anatomy of Prostate Cancer and Its Implications in Active Surveillance and Early Intervention Strategies. *Anatomia 2023, Vol. 2, Pages 300-319*, 2(4), 300–319.
<https://doi.org/10.3390/ANATOMIA2040027>
- Freedland, S., & Abrahamsson, P. A. (2021). Androgen deprivation therapy and side effects: Are GnRH antagonists safer? *Asian Journal of Andrology*, 23(1), 3–10.
https://doi.org/10.4103/AJA.AJA_22_20
- Freund, M., Hicks, M. J., Konermann, C., Otte, M., Hertel, K. J., & Schaal, H. (2005). Extended base pair complementarity between U1 snRNA and the 5' splice site does not inhibit splicing in higher

- eukaryotes, but rather increases 5' splice site recognition. *Nucleic Acids Research*, 33(16), 5112–5119. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI824>
- Gillesen, S., Attard, G., Beer, T. M., Beltran, H., Bjartell, A., Bossi, A., Briganti, A., Bristow, R. G., Chi, K. N., Clarke, N., Davis, I. D., de Bono, J., Drake, C. G., Duran, I., Eeles, R., Efstathiou, E., Evans, C. P., Fanti, S., Feng, F. Y., ... Omlin, A. (2020). Management of Patients with Advanced Prostate Cancer: Report of the Advanced Prostate Cancer Consensus Conference 2019. *European Urology*, 77(4), 508–547. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2020.01.012>
- Godtman, R. A., Kollberg, K. S., Pihl, C. G., Månsson, M., & Hugosson, J. (2022). The Association Between Age, Prostate Cancer Risk, and Higher Gleason Score in a Long-term Screening Program: Results from the Göteborg-1 Prostate Cancer Screening Trial. *European Urology*, 82(3), 311–317. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2022.01.018>
- Gonçalves, M., Santos, J. I., Coutinho, M. F., Matos, L., & Alves, S. (2023). Development of Engineered-U1 snRNA Therapies: Current Status. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14617. <https://doi.org/10.3390/IJMS241914617>
- Guo, J., Wang, D., Dong, Y., Gao, X., Tong, H., Liu, W., Zhang, L., & Sun, M. (2021). ANO7: Insights into topology, function, and potential applications as a biomarker and immunotherapy target. *Tissue and Cell*, 72, 101546. <https://doi.org/10.1016/J.TICE.2021.101546>
- Gyobu, S., Ishihara, K., Suzuki, J., Segawa, K., & Nagata, S. (2017). Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(24), 6274–6279. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1703391114>
- Haffner, M. C., Zwart, W., Roudier, M. P., True, L. D., Nelson, W. G., Epstein, J. I., De Marzo, A. M., Nelson, P. S., & Yegnasubramanian, S. (2020). Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 2020 18:2, 18(2), 79–92. <https://doi.org/10.1038/S41585-020-00400-W>
- Hamdy, F. C., Donovan, J. L., Lane, J. A., Metcalfe, C., Davis, M., Turner, E. L., Martin, R. M., Young, G. J., Walsh, E. I., Bryant, R. J., Bollina, P., Doble, A., Doherty, A., Gillatt, D., Gnanaprasagam, V., Hughes, O., Kockelbergh, R., Kynaston, H., Paul, A., ... Neal, D. E. (2023). Fifteen-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 388(17), 1547–1558. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2214122>
- Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000). THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. *Radiologic Clinics of North America*, 38(1), 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0033-8389\(05\)70146-9](https://doi.org/10.1016/S0033-8389(05)70146-9)
- Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., Weimann, M., Will, C. L., Pena, V., Lührmann, R., & Stelzl, U. (2012). Dynamic Protein-Protein Interaction Wiring of the Human Spliceosome. *Molecular Cell*, 45(4), 567–580. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2011.12.034>

- Hemminki, K., & Czene, K. (2002). Age specific and attributable risks of familial prostate carcinoma from the family-cancer database. *Cancer*, *95*(6), 1346–1353.
<https://doi.org/10.1002/CNCR.10819>
- Horowitz, D. S., & Krainer, A. R. (1994). Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends in Genetics*, *10*(3), 100–106. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90233-X](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90233-X)
- Islami, F., Moreira, D. M., Boffetta, P., & Freedland, S. J. (2014). A Systematic Review and Meta-analysis of Tobacco Use and Prostate Cancer Mortality and Incidence in Prospective Cohort Studies. *European Urology*, *66*(6), 1054–1064. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2014.08.059>
- Jackson, S. D., de la Rue, M. R., Greenslade, T. P. L., John, A. M., Wahid, S., Martin, R. M., Williams, N. J., & Turner, E. L. (2022). Screening asymptomatic men for prostate cancer: A comparison of international guidelines on prostate-specific antigen testing. *Journal of Medical Screening*, *29*(4), 268. <https://doi.org/10.1177/09691413221119238>
- James, N. D., de Bono, J. S., Spears, M. R., Clarke, N. W., Mason, M. D., Dearnaley, D. P., Ritchie, A. W. S., Amos, C. L., Gilson, C., Jones, R. J., Matheson, D., Millman, R., Attard, G., Chowdhury, S., Cross, W. R., Gillessen, S., Parker, C. C., Russell, J. M., Berthold, D. R., ... Sydes, M. R. (2017). Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *New England Journal of Medicine*, *377*(4), 338–351.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702900>
- James, N. D., Tannock, I., N'Dow, J., Feng, F., Gillessen, S., Ali, S. A., Trujillo, B., Al-Lazikani, B., Attard, G., Bray, F., Comp erat, E., Eeles, R., Fatiregun, O., Grist, E., Halabi, S., Haran,  ., Herchenhorn, D., Hofman, M. S., Jalloh, M., ... Xie, L. P. (2024). The Lancet Commission on prostate cancer: planning for the surge in cases. *The Lancet*, *403*(10437), 1683–1722.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)00651-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)00651-2)
- Jayaram, A., Wingate, A., Wetterskog, D., Wheeler, G., Sternberg, C. N., Jones, R., Berruti, A., Lefresne, F., Lahaye, M., Thomas, S., Gormley, M., Meacham, F., Garg, K., Lim, L. P., Merseburger, A. S., Tombal, B., Ricci, D., & Attard, G. (2021). Plasma tumor gene conversions after one cycle abiraterone acetate for metastatic castration-resistant prostate cancer: a biomarker analysis of a multicenter international trial. *Annals of Oncology*, *32*(6), 726–735.
<https://doi.org/10.1016/J.ANNONC.2021.03.196>
- Jhun, M. A., Geybels, M. S., Wright, J. L., Kolb, S., April, C., Bibikova, M., Ostrander, E. A., Fan, J. B., Feng, Z., & Stanford, J. L. (2017). Gene expression signature of Gleason score is associated with prostate cancer outcomes in a radical prostatectomy cohort. *Oncotarget*, *8*(26), 43035–43047. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17428>
- Jian, Z., Ye, D., Chen, Y., Li, H., & Wang, K. (2018). Sexual Activity and Risk of Prostate Cancer: A Dose–Response Meta-Analysis. *The Journal of Sexual Medicine*, *15*(9), 1300–1309.
<https://doi.org/10.1016/J.JSXM.2018.07.004>

- Johns, L. E., & Houlston, R. S. (2003). A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU International*, *91*(9), 789–794. <https://doi.org/10.1046/J.1464-410X.2003.04232.X>
- Kaikkonen, E., Ettala, O., Nikulainen, I., Taimen, P., Lehtinen, I., Boström, P. J., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., & Schleutker, J. (2019). ANO7 rs77559646 Is Associated With First-line Docetaxel Treatment Response in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *Anticancer Research*, *39*(10), 5353–5359. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.13728>
- Kaikkonen, E., Rantapero, T., Zhang, Q., Taimen, P., Laitinen, V., Kallajoki, M., Jambulingam, D., Ettala, O., Knaapila, J., Boström, P. J., Wahlström, G., Sipeky, C., Pursiheimo, J. P., Tammela, T., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Fey, V., Maehle, L., Wiklund, F., Wei, G. H., & Schleutker, J. (2018). ANO7 is associated with aggressive prostate cancer. *International Journal of Cancer*, *143*(10), 2479–2487. <https://doi.org/10.1002/IJC.31746>
- Kaikkonen, E., Takala, A., Pursiheimo, J.-P., Wahlström, G., & Schleutker, J. (2020). The interactome of the prostate-specific protein Anoctamin 7. *Cancer Biomarkers*, *28*, 91–100. <https://doi.org/10.3233/CBM-190993>
- Kandels-Lewis, S., & Séraphin, B. (1993). Involvement of U6 snRNA in 5' Splice Site Selection. *Science*, *262*(5142), 2035–2039. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8266100>
- Ketterling, R. P., Drost, J. B., Scaringe, W. A., Liao, D.-Z., Liu, J.-Z., Kasper, C. K., & Sommer, S. S. (1999). Reported In Vivo Splice-Site Mutations in the Factor IX Gene: Severity of Splicing Defects and a Hypothesis for Predicting Deleterious Splice Donor Mutations. *HUMAN MUTATION*, *13*, 221–231. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)13:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)13:3)
- Khan, H. M., & Cheng, H. H. (2022). Germline genetics of prostate cancer. *The Prostate*, *82*(S1), S3–S12. <https://doi.org/10.1002/PROS.24340>
- Kiessling, A., Weigle, B., Fuessel, S., Ebner, R., Meye, A., Rieger, M. A., Schmitz, M., Temme, A., Bachmann, M., Wirth, M. P., & Rieber, E. P. (2005). D-TMPP: A novel androgen-regulated gene preferentially expressed in prostate and prostate cancer that is the first characterized member of an eukaryotic gene family. *The Prostate*, *64*(4), 387–400. <https://doi.org/10.1002/PROS.20250>
- Kim, H., Kim, H., Lee, J., Lee, B., Kim, H. R., Jung, J., Lee, M. O., & Oh, U. (2018). Anoctamin 9/TMEM16J is a cation channel activated by cAMP/PKA signal. *Cell Calcium*, *71*, 75–85. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2017.12.003>
- Konarska, M. M., Vilardeell, J., & Query, C. C. (2006). Repositioning of the Reaction Intermediate within the Catalytic Center of the Spliceosome. *Molecular Cell*, *21*(4), 543–553. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2006.01.017>
- Kote-Jarai, Z., Leongamornlert, D., Saunders, E., Tymrakiewicz, M., Castro, E., Mahmud, N., Guy, M., Edwards, S., O'Brien, L., Sawyer, E., Hall, A., Wilkinson, R., Dadaev, T., Goh, C., Easton, D., Goldgar, D., & Eeles, R. (2011). BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to

- young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. *British Journal of Cancer* 2011 105:8, 105(8), 1230–1234. <https://doi.org/10.1038/BJC.2011.383>
- Krawczak, M., Reiss, J., & Cooper, D. N. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human genetics*, 90(1–2), 41–54. <https://doi.org/10.1007/BF00210743>
- Kunzelmann, K., Ousingsawat, J., Benedetto, R., Cabrita, I., & Schreiber, R. (2019). Contribution of Anoctamins to Cell Survival and Cell Death. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 382, 11(3), 382. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11030382>
- Lai, H. C., Ho, U. Y., James, A., De Souza, P., & Roberts, T. L. (2021). RNA metabolism and links to inflammatory regulation and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2021 79:1, 79(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S00018-021-04073-5>
- Leongamornlert, D., Mahmud, N., Tymrakiewicz, M., Saunders, E., Dadaev, T., Castro, E., Goh, C., Govindasami, K., Guy, M., O'Brien, L., Sawyer, E., Hall, A., Wilkinson, R., Easton, D., Goldgar, D., Eeles, R., & Kote-Jarai, Z. (2012). Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *British Journal of Cancer* 2012 106:10, 106(10), 1697–1701. <https://doi.org/10.1038/BJC.2012.146>
- Lesser, C. F., & Guthrie, C. (1993). Mutations in U6 snRNA that alter splice site specificity: Implications for the active site. *Science*, 262(5142), 1982–1988. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8266093>
- Li, Y., Wang, X., Vural, S., Mishra, N. K., Cowan, K. H., & Guda, C. (2015). Exome analysis reveals differentially mutated gene signatures of stage, grade and subtype in breast cancers. *PLoS ONE*, 10(3), e0119383. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0119383>
- Longoria, O., Beije, N., & de Bono, J. S. (2024). PARP inhibitors for prostate cancer. *Seminars in Oncology*, 51(1–2), 25–35. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2023.09.003>
- Lophatananon, A., Stewart-Brown, S., Kote-Jarai, Z., Olama, A. A. Al, Garcia, S. B., Neal, D. E., Hamdy, F. C., Donovan, J. L., Giles, G. G., Fitzgerald, L. M., Southey, M. C., Pharoah, P., Pashayan, N., Gronberg, H., Aly, M., Stanford, J. L., Brenner, H., Dieffenbach, A. K., Arndt, V., ... Lose, F. (2017). Height, selected genetic markers and prostate cancer risk: results from the PRACTICAL consortium. *British journal of cancer*, 117(5), 734–743. <https://doi.org/10.1038/BJC.2017.231>
- Löf, C., Sultana, N., Goel, N., Heron, S., Wahlström, G., House, A., Holopainen, M., Käkelä, R., & Schleutker, J. (2025). ANO7 expression in the prostate modulates mitochondrial function and lipid metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 23(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02081-7>
- Marx, A., Koopmann, L., Höflmayer, D., Büscheck, F., Hube-Magg, C., Steurer, S., Eichenauer, T., Clauditz, T. S., Wilczak, W., Simon, R., Sauter, G., Izbiccki, J. R., Huland, H., Heinzer, H., Graefen, M., Haese, A., Schlomm, T., Bernreuther, C., Lebok, P., & Bonk, S. (2021). Reduced

- anoctamin 7 (ANO7) expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Biology & Medicine*, 18(1), 245–255.
<https://doi.org/10.20892/J.ISSN.2095-3941.2019.0324>
- McHugh, J., Saunders, E. J., Dadaev, T., McGrowder, E., Bancroft, E., Kote-Jarai, Z., & Eeles, R. (2021). Prostate cancer risk in men of differing genetic ancestry and approaches to disease screening and management in these groups. *British Journal of Cancer* 2021 126:10, 126(10), 1366–1373. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01669-3>
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2(1), 35–49.
<https://doi.org/10.1002/PROS.2990020105>
- Metsälä, O., Wahlström, G., Goel, N., Miihkinen, M., Taimen, P., & Schleutker, J. (2025). Spatial profiling of ANO7 in prostate tissue: links to AR-signalling-associated lipid metabolism and inflammation. *The Journal of Pathology*, 265(4), 518–531. <https://doi.org/10.1002/PATH.6405>
- Metsälä, O., Wahlström, G., Taimen, P., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., & Schleutker, J. (2023). Transcripts of the Prostate Cancer-Associated Gene ANO7 Are Retained in the Nuclei of Prostatic Epithelial Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1052.
<https://doi.org/10.3390/ijms24021052>
- Michels, N., Specht, I. O., Heitmann, B. L., Chajès, V., & Huybrechts, I. (2021). Dietary trans-fatty acid intake in relation to cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 79(7), 758–776. <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUAA061>
- Mohseni, R., Abbasi, S., Mohseni, F., Rahimi, F., & Alizadeh, S. (2019). Association between Dietary Inflammatory Index and the Risk of Prostate Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrition and cancer*, 71(3), 359–366. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1516787>
- Mohsenzadegan, M., Madjd, Z., Asgari, M., Abolhasani, M., Shekarabi, M., Taeb, J., & Shariftabrizi, A. (2013). Reduced expression of NGEF is associated with high-grade prostate cancers: a tissue microarray analysis. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 62(10), 1609–1618.
<https://doi.org/10.1007/S00262-013-1463-1>
- Mohsenzadegan, M., Shekarabi, M., Madjd, Z., Asgari, M., Abolhasani, M., Tajik, N., & Farajollahi, M. M. (2015). Study of NGEF expression pattern in cancerous tissues provides novel insights into prognostic marker in prostate cancer. *Biomarkers in medicine*, 9(4), 391–401.
<https://doi.org/10.2217/BMM.14.106>
- Motterle, G., de Zorzi, L., Zecchini, G., Mandato, F. G., Ferraioli, G., Bianco, M., & Zanovello, N. (2022). Metabolic syndrome and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Panminerva medica*, 64(3), 337–343. <https://doi.org/10.23736/S0031-0808.21.04507-9>
- Mucci, L. A., Hjelmborg, J. B., Harris, J. R., Czene, K., Havelick, D. J., Scheike, T., Graff, R. E., Holst, K., Möller, S., Unger, R. H., McIntosh, C., Nuttall, E., Brandt, I., Penney, K. L., Hartman, M., Kraft, P., Parmigiani, G., Christensen, K., Koskenvuo, M., ... Halekoh, U. (2016). Familial

- Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*, 315(1), 68–76.
<https://doi.org/10.1001/JAMA.2015.17703>
- Nicolosi, P., Ledet, E., Yang, S., Michalski, S., Freschi, B., O’Leary, E., Esplin, E. D., Nussbaum, R. L., & Sartor, O. (2019). Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. *JAMA Oncology*, 5(4), 523–528.
<https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2018.6760>
- Oka, S., Urakami, S., Hagiwara, K., Hayashida, M., Sakaguchi, K., Miura, Y., Inoshita, N., & Arai, M. (2023). The prevalence of lynch syndrome (DNA mismatch repair protein deficiency) in patients with primary localized prostate cancer using immunohistochemistry screening. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 21(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13053-023-00265-1>
- Oseni, S. O., Naar, C., Pavlović, M., Asghar, W., Hartmann, J. X., Fields, G. B., Esiobu, N., & Kumi-Diaka, J. (2023). The Molecular Basis and Clinical Consequences of Chronic Inflammation in Prostatic Diseases: Prostatitis, Benign Prostatic Hyperplasia, and Prostate Cancer. *Cancers 2023, Vol. 15, Page 3110*, 15(12), 3110. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15123110>
- Ousingsawat, J., Schreiber, R., & Kunzelmann, K. (2019). TMEM16F/anoctamin 6 in ferroptotic cell death. *Cancers*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/CANCERS11050625>
- Packer, J. R., & Maitland, N. J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1238–1260.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.02.016>
- Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2018). Sequence determinants for nuclear retention and cytoplasmic export of mRNAs and lncRNAs. *Frontiers in Genetics*, 9(OCT), 417907.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00440>
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J., & Blencowe, B. J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics* 2008 40:12, 40(12), 1413–1415. <https://doi.org/10.1038/NG.259>
- Parra-Soto, S., Ahumada, D., Petermann-Rocha, F., Boonpoor, J., Gallegos, J. L., Anderson, J., Sharp, L., Malcomson, F. C., Livingstone, K. M., Mathers, J. C., Pell, J. P., Ho, F. K., & Celis-Morales, C. (2022). Association of meat, vegetarian, pescatarian and fish-poultry diets with risk of 19 cancer sites and all cancer: findings from the UK Biobank prospective cohort study and meta-analysis. *BMC medicine*, 20(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02257-9>
- Pinotti, M., Bernardi, F., Dal Mas, A., & Pagani, F. (2011). RNA-based therapeutic approaches for coagulation factor deficiencies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(11), 2143–2152.
<https://doi.org/10.1111/J.1538-7836.2011.04481.X>
- Pinotti, M., Rizzotto, L., Balestra, D., Lewandowska, M. A., Cavallari, N., Marchetti, G., Bernardi, F., & Pagani, F. (2008). *UI-snRNA-mediated rescue of mRNA processing in severe factor VII deficiency*. 111, 2681–2684. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-117440>

- Pritchard, C. C., Mateo, J., Walsh, M. F., De Sarkar, N., Abida, W., Beltran, H., Garofalo, A., Gulati, R., Carreira, S., Eeles, R., Elemento, O., Rubin, M. A., Robinson, D., Lonigro, R., Hussain, M., Chinnaiyan, A., Vinson, J., Filipenko, J., Garraway, L., ... Nelson, P. S. (2016). Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(5), 443–453. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1603144>
- Purcell, S. A., Oliveira, C. L. P., Mackenzie, M., Robson, P., Lewis, J. D., & Prado, C. M. (2022). Body Composition and Prostate Cancer Risk: A Systematic Review of Observational Studies. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 13(4), 1118–1130. <https://doi.org/10.1093/ADVANCES/NMAB153>
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), 63. <https://doi.org/10.14740/WJON1191>
- Rebbeck, T. R., Devesa, S. S., Chang, B.-L., Bunker, C. H., Cheng, I., Cooney, K., Eeles, R., Fernandez, P., Giri, V. N., Gueye, S. M., Haiman, C. A., Henderson, B. E., Heyns, C. F., Hu, J. J., Ingles, S. A., Isaacs, W., Jalloh, M., John, E. M., Kibel, A. S., ... Zeigler-Johnson, C. M. (2013). Global Patterns of Prostate Cancer Incidence, Aggressiveness, and Mortality in Men of African Descent. *Prostate Cancer*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/560857>
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillessen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers* 2021 7:1, 7(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Roca, X., Olson, A. J., Rao, A. R., Enerly, E., Kristensen, V. N., Børresen-Dale, A. L., Andresen, B. S., Krainer, A. R., & Sachidanandam, R. (2008). Features of 5'-splice-site efficiency derived from disease-causing mutations and comparative genomics. *Genome Research*, 18(1), 77. <https://doi.org/10.1101/GR.6859308>
- Rydzewska, L. H. M., Burdett, S., Vale, C. L., Clarke, N. W., Fizazi, K., Kheoh, T., Mason, M. D., Miladinovic, B., James, N. D., Parmar, M. K. B., Spears, M. R., Sweeney, C. J., Sydes, M. R., Tran, N. P., & Tierney, J. F. (2017). Adding abiraterone to androgen deprivation therapy in men with metastatic hormone-sensitive prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 84, 88–101. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2017.07.003>
- Sandhu, S., Moore, C. M., Chiong, E., Beltran, H., Bristow, R. G., & Williams, S. G. (2021). Prostate cancer. *The Lancet*, 398(10305), 1075–1090. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00950-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00950-8)
- Sartor, O., de Bono, J., Chi, K. N., Fizazi, K., Herrmann, K., Rahbar, K., Tagawa, S. T., Nordquist, L. T., Vaishampayan, N., El-Haddad, G., Park, C. H., Beer, T. M., Armour, A., Pérez-Contreras, W. J., DeSilvio, M., Kpamegan, E., Gericke, G., Messmann, R. A., Morris, M. J., & Krause, B. J. (2021). Lutetium-177-PSMA-617 for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*, 385(12), 1091–1103. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107322>

- Sawa, H., & Shimura, Y. (1992). Association of U6 snRNA with the 5'-splice site region of pre-mRNA in the spliceosome. *Genes & development*, 6(2), 244–254.
<https://doi.org/10.1101/GAD.6.2.244>
- Schmid, F., Hiller, T., Korner, G., Glaus, E., Berger, W., & Neidhardt, J. (2013). A gene therapeutic approach to correct splice defects with modified U1 and U6 snRNPs. *Human Gene Therapy*, 24(1), 97–104. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.110>
- Schroeder, B. C., Cheng, T., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2008). Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*, 134(6), 1019–1029.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.09.003>
- Sekhoacha, M., Riet, K., Motloun, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*, 27(17), 5730. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27175730>
- Seppä, K., Lappi-Heikkinen, S., Johansson, S., Malila, N., & Pitkaniemi, J. (2023). CANCER IN FINLAND 2023. *Finnish Cancer Registry*, 19–23.
https://syoparekisteri.fi/assets/files/2025/06/Syopa_2023_en.pdf
- Shen, M. M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*, 24(18), 1967. <https://doi.org/10.1101/GAD.1965810>
- Shiraishi, Y., Kataoka, K., Chiba, K., Okada, A., Kogure, Y., Tanaka, H., Ogawa, S., & Miyano, S. (2018). A comprehensive characterization of cis-acting splicing-associated variants in human cancer. *Genome Research*, 28(8), 1111–1125. <https://doi.org/10.1101/gr.231951.117>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21708>
- Sinnott, J. A., Peisch, S. F., Tyekucheva, S., Gerke, T., Lis, R., Rider, J. R., Fiorentino, M., Stampfer, M. J., Mucci, L. A., Loda, M., & Penney, K. L. (2017). Prognostic utility of a new mRNA expression signature of gleason score. *Clinical Cancer Research*, 23(1), 81–87.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1245>
- Smith, A. E., Muralidharan, A., & Smith, M. T. (2022). Prostate cancer induced bone pain: pathobiology, current treatments and pain responses from recent clinical trials. *Discover. Oncology*, 13(1), 108. <https://doi.org/10.1007/S12672-022-00569-Z>
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., & Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM 16 protein family members. *Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13305–13316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457937>
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J., & Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010 468:7325, 468(7325), 834–838.
<https://doi.org/10.1038/NATURE09583>
- Sweeney, C. J., Chen, Y.-H., Carducci, M., Liu, G., Jarrard, D. F., Eisenberger, M., Wong, Y.-N., Hahn, N., Kohli, M., Cooney, M. M., Dreicer, R., Vogelzang, N. J., Picus, J., Shevrin, D.,

- Hussain, M., Garcia, J. A., & DiPaola, R. S. (2015). Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(8), 737–746. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503747>
- Swirski, S., May, O., Ahlers, M., Wissinger, B., Greschner, M., Jüschke, C., & Neidhardt, J. (2023). In Vivo Efficacy and Safety Evaluations of Therapeutic Splicing Correction Using U1 snRNA in the Mouse Retina. *Cells*, 12(6), 955. <https://doi.org/10.3390/cells12060955>
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2019). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines 2019, Vol. 6, Page 82*, 6(3), 82. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES6030082>
- Thermo Fisher Scientific. (2025a). *COS-7 Cells* .
<<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/technical-resources/cell-lines/c/cell-lines-detail-5.html>> [Luettu 4.10.2025]
- Thermo Fisher Scientific. (2025b). *DNase I, Amplification Grade* .
<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18068015>> [Luettu 5.10.2025]
- Valadkhan, S. (2010). Role of the snRNAs in spliceosomal active site. *RNA biology*, 7(3). <https://doi.org/10.4161/RNA.7.3.12089>
- Vale, C. L., Burdett, S., Rydzewska, L. H. M., Albiges, L., Clarke, N. W., Fisher, D., Fizazi, K., Gravis, G., James, N. D., Mason, M. D., Parmar, M. K. B., Sweeney, C. J., Sydes, M. R., Tombal, B., & Tierney, J. F. (2016). Addition of docetaxel or bisphosphonates to standard of care in men with localised or metastatic, hormone-sensitive prostate cancer: a systematic review and meta-analyses of aggregate data. *The Lancet Oncology*, 17(2), 243–256. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00489-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00489-1)
- Verbeeren, J., Niemelä, E. H., Turunen, J. J., Will, C. L., Ravantti, J. J., Lührmann, R., & Frilander, M. J. (2010). An Ancient Mechanism for Splicing Control: U11 snRNP as an Activator of Alternative Splicing. *Molecular Cell*, 37(6), 821–833. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.02.014>
- Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, 136(4), 701–718. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.02.009>
- Wahlström, G., Heron, S., Knuutila, M., Kaikkonen, E., Tulonen, N., Metsälä, O., Löf, C., Ettala, O., Boström, P. J., Taimen, P., Poutanen, M., & Schleutker, J. (2022). The variant rs77559646 associated with aggressive prostate cancer disrupts ANO7 mRNA splicing and protein expression. *Human Molecular Genetics*, 31(12), 2063–2077. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDAC012>
- Walker, S. M., Knight, L. A., McCavigan, A. M., Logan, G. E., Berge, V., Sherif, A., Pandha, H., Warren, A. Y., Davidson, C., Uprichard, A., Blayney, J. K., Price, B., Jellema, G. L., Steele, C. J., Svindland, A., McDade, S. S., Eden, C. G., Foster, C., Mills, I. G., ... Kennedy, R. D. (2017).

- Molecular Subgroup of Primary Prostate Cancer Presenting with Metastatic Biology. *European Urology*, 72(4), 509–518. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2017.03.027>
- Wang, A., Shen, J., Rodriguez, A. A., Saunders, E. J., Chen, F., Janivara, R., Darst, B. F., Sheng, X., Xu, Y., Chou, A. J., Benlloch, S., Dadaev, T., Brook, M. N., Plym, A., Sahimi, A., Hoffman, T. J., Takahashi, A., Matsuda, K., Momozawa, Y., ... Haiman, C. A. (2023). Characterizing prostate cancer risk through multi-ancestry genome-wide discovery of 187 novel risk variants. *Nature genetics*, 55(12), 2065. <https://doi.org/10.1038/S41588-023-01534-4>
- Wang, Y., Liu, J., Huang, B., Xu, Y.-M., Li, J., Huang, L.-F., Lin, J., Zhang, J., Min, Q.-H., Yang, W.-M., & Wang, X.-Z. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*, 3(2), 152–158. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>
- Wei, G., Zhu, H., Zhou, Y., Pan, Y., Yi, B., & Bai, Y. (2024). Single-cell sequencing revealed metabolic reprogramming and its transcription factor regulatory network in prostate cancer. *Translational Oncology*, 44, 101925. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2024.101925>
- Whitlock, J. M., & Hartzell, H. C. (2017). Anoctamins/TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles. *Annual Review of Physiology*, 79(Volume 79, 2017), 119–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034031>
- Wilson, J. D. (2011). The Critical Role of Androgens in Prostate Development. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 577–590. <https://doi.org/10.1016/J.ECL.2011.05.003>
- Yang, Y. D., Cho, H., Koo, J. Y., Tak, M. H., Cho, Y., Shim, W. S., Park, S. P., Lee, J., Lee, B., Kim, B. M., Raouf, R., Shin, Y. K., & Oh, U. (2008). TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 2008 455:7217, 455(7217), 1210–1215. <https://doi.org/10.1038/NATURE07313>
- Yap, K., Lim, Z. Q., Khandelia, P., Friedman, B., & Makeyev, E. V. (2012). Coordinated regulation of neuronal mRNA steady-state levels through developmentally controlled intron retention. *Genes & Development*, 26(11), 1209–1223. <https://doi.org/10.1101/GAD.188037.112>
- Zaichick, V. (2014). The prostatic urethra as a Venturi effect urine-jet pump to drain prostatic fluid. *Medical Hypotheses*, 83(1), 65–68. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2014.04.006>
- Zeegers, M. P. A., Jellema, A., & Ostrer, H. (2003). Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 97(8), 1894–1903. <https://doi.org/10.1002/CNCR.11262>
- Zhang, L., Wang, Y., Qin, Z., Gao, X., Xing, Q., Li, R., Wang, W., Song, N., & Zhang, W. (2020). Correlation between Prostatitis, Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: A systematic review and Meta-analysis. *Journal of Cancer*, 11(1), 177. <https://doi.org/10.7150/JCA.37235>
- Zhou, C. K., Check, D. P., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., Ferlay, J., Bray, F., Cook, M. B., & Devesa, S. S. (2016). Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An

analysis of time trends overall and by age group. *International Journal of Cancer*, 138(6), 1388–1400. <https://doi.org/10.1002/IJC.29894>

Zhuang, Y., & Weiner, A. M. (1986). A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell*, 46(6), 827–835. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90064-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90064-4)

Zwaal, R. F. A., Comfurius, P., & Bevers, E. M. (2004). Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1636(2–3), 119–128. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2003.07.003>

Liitteet

Liite 1 – U1 mut 2 -plasmidin alukkeiden suunnittelussa käytetty templaatti-DNA:n sekvenssi

Templaatti-DNA:n sekvenssi (keltaisella) oli peräisin U1 mut 1 -plasmidista. Punaisella kohta, johon mutaatio (T > G) sijoittui. Kuva tuotettu SnapGene Viewer -ohjelmalla.



Liite 2 – Plasmidien alukkeet

U1_mut2_F: 5' CCAAGATCTCATATGTACCTGGCAGGGG 3'

U1_mut2_R: 5' CCCCTGCCAGGTACATATGAGATCTTGG 3'

pGeneClip_F: 5' CTGCAGTCTGGAGTTTCAAAAG 3'

pGeneClip_R: 5' GAGATCTTGGCCTCTGC 3'

U6_pGenClip_InF_F: 5' GAGGCCCAAGATCTCGTGCTCGCTTCGGCAGCA 3'

U6_pGeneClip_InF_R: 5' AACTCCAGACTGCAGAAAAATATGGAACGCTTCACGAA 3'

U6mut1_F: 5' CTAAAATTGGAACGATATAGAGAAGATTAGCATGG 3'

U6mut1_R: 5' CCATGCTAATCTTCTCTATATCGTTCCAATTTTAG 3'

U6mut2_F: 5' CTAAAATTGGAACGATATGGAGAAGATTAGCATGGCC 3'

U6mut2_R: 5' GGCCATGCTAATCTTCTCCATATCGTTCCAATTTTAG 3'

