

Kaposin sarkooma herpesviruksen mikro-RNA:iden
kohdegeenien identifiointi endoteelisoluissa

Liisa Lappalainen

Jyväskylän Yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Alkusanat

Tämä pro gradu –tutkielma on tehty Helsingin yliopiston biolääketieteen laitoksella (Biomedicum Helsinki) Genomibiologian tutkimusohjelmaan kuuluvassa, dosentti Päivi Ojalan johtamassa Virustuumorigeneesi-ryhmässä. Ryhmä on osa Suomen Akatemian Genomitiedon hyödyntämisen huippuyksikköä. Ryhmän tutkimuskohteena on Kaposin sarkooma herpesvirus (KSHV) ja sen aiheuttamat syöpätyypit.

Haluan kiittää ohjaajiani Päivi Ojalaa ja Anne Lehosta työn ohjaamisesta ja kaikesta avusta työn aikana. Kiitokset myös kaikille muillekin ryhmän jäsenille: Grzegorz Sarekille, Fang Chengille, Johanna Viiliäiselle, Annika Järviluomalle, Simonas Laurinavičiukselle, Jenny Bärlundille, Pirita Pekkoselle ja Kirsi Siivolalle avusta, yhteisistä hetkistä sekä siitä innostavasta ilmapiiristä, joka kannustaa jatkamaan alalla.

Kiitokset myös tämän projektin yhteistyökumppaneille tutkimusmateriaalista ja avusta tämän tutkimuksen aikana.

Tutkimustyön rahoittamisesta kiitokset kuuluvat Sigrid Juseliuksen Säätiölle ja Syöpäjärjestölle.

Lisäksi haluan kiittää myös tärkeitä tukijoukkoja: kiitokset perheenjäsenille ja erityisesti avopuolisolleni sekä teknisestä että henkisestä tuesta ja kannustuksesta.

Tekijä:	Liisa Lappalainen	
Tutkielman nimi:	Kaposin sarkooma herpesviruksen mikro-RNA:iden kohdegeenien identifiointi endoteelisoluissa	
English title:	Identification of target genes for the Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs in endothelial cells	
Päivämäärä:	30.04.2008	Sivumäärä: 45
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Molekyylibiologia	
Tutkielman ohjaaja(t):	Dos. Päivi Ojala ja FT Anne Lehtonen	

Tiivistelmä:

Kaposin sarkooma herpesvirus (KSHV) -infektio on liitetty Kaposin sarkoomaan ja primaariseen effuusiolympfoomaan (PEL). Näitä syöpätyyppejä tavataan lähinnä immuniteetiltaan heikentyneillä yksilöillä, kuten AIDS-potilailla, elinsiirtopotilailla sekä Saharan eteläpuoleisessa Afrikassa, missä virus esiintyy endemisenä ja HIV-infektio on yleinen. Näihin melko harvinaisiin mutta aggressiivisiin syöpätyyppeihin ei ole olemassa tehokasta hoitoa. KSHV:n on koodaa genomissaan 12 mikro-RNA:ta (miRNA), joiden tehtävänä on hiljentää kohdegeeniensä ilmentymistä RNA-interferenssi -säätelystään kautta. Viruksen miRNA:iden vaikutus voi kohdistua sekä viruksen itsensä että isäntäsolun geeneihin. Tähän mennessä KSHV:n miRNA:iden kohdegeenejä on luotettavasti identifioitu vasta muutamia, joten niiden vaikutuksista viruksen infektoimisiin soluihin ja edellä mainittujen syöpien syntyyn tiedetään vasta hyvin vähän.

Tämän tutkielman tarkoituksena oli löytää KSHV:n miRNA:iden kohdegeenejä endoteelisoluista, joita KSHV luontaisesti infektoi. Tutkimuksen pohjana käytettiin mikrosiruanalyysin perusteella löydettyjä geenejä, joiden ilmentymistasot olivat alhaisempia miRNA:ita ilmentävissä endoteelisoluissa kontrollisoluihin verrattuna. Tutkimuksen kohteena olivat solusykliproteiineja koodaavat geenit, joilla on osittainen sekvenssi-homologia yhden tai useamman KSHV:n miRNA:n kanssa.

Tutkimuksessa käytettiin mallina KSHV:n miRNA:ita stabiilisti tai akuutisti ilmentäviä endoteelisoluja, joiden kontrollina käytettiin vastaavia, GFP:tä ilmentäviä soluja. Tutkimuksessa määritettiin solusykligeenien koodaamien proteiinien tasojen eroja miRNA:ita ilmentävien ja kontrollisolujen välillä ja pyrittiin tällä tavoin löytämään geenejä, joihin miRNA:iden vaikutus kohdistuu. Tulosten tukena käytettiin erilaisia toiminnallisia kokeita sekä antagonomiR-oligoja, jotka on suunniteltu sitoutumaan miRNA:ihin ja estämään niiden vaikutus kohdegeenien ilmentymiseen.

Saatujen tulosten perusteella identifiointiin kaksi geeniä, joiden koodaamien proteiinien tasot olivat alhaisempia miRNA:ita ilmentävissä soluissa kuin kontrollisoluisissa. Nämä proteiinit olivat solusyklin estäjä p27^{Kip1} ja p53-kasvunrajoiteproteiinin säätelijä MDM2. Molempien proteiinien tasot olivat alhaisempia sekä stabiilisti että akuutisti useita miRNA:ita ilmentävissä soluissa. Lisäksi miRNA:ta K2 vastaan suunniteltu antagonomiR-oligo palautti MDM2-proteiinin tason ennalleen. Tämä tulos viittaa siihen, että MDM2 olisi miRNA:n K2 suora kohdegeeni. Tuloksissa havaittiin kuitenkin jonkin verran vaihtelua, joka voi olla seurausta siitä, että miRNA:iden vaikutus proteiinitasoihin on yleisesti ottaen heikko. Tämän vuoksi tarvitaan vielä lisää kokeita sen todistamiseksi, että MDM2 olisi miRNA:n K2 kohteena. Lisäksi miRNA:iden vaikutusta p27^{Kip1}:een on syytä tutkia tarkemmin. Tulevaisuudessa tullaan tekemään kokeita myös muihin säätelystään kuuluvien geenien suhteen, jotta saataisiin selvempi käsitys siitä, kuinka KSHV:n koodaamat miRNA:t mahdollisesti liittyvät viruksen patogeneesiin ja siten edesauttavat syövän syntyä.

Author: Liisa Lappalainen
Title of thesis: Identification of target genes for the Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs in endothelial cells
Finnish title: Kaposin sarkooma herpesviruksen mikro-RNA:iden kohdegeenien identifiointi endoteelisoluissa
Date: 30.04.2008 **Pages:** 45
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular Biology
Supervisor(s): Doc. Päivi Ojala and PhD Anne Lehtonen

Abstract:

Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) is the causative agent of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma (PEL). These malignancies are the most common among immunosuppressed individuals such as AIDS patients. They are also very common in sub-Saharan Africa where the virus is endemic and prevalence of HIV is high. Currently there is no effective treatment for these rare but aggressive malignancies. KSHV was recently discovered to encode 12 microRNAs (miRNAs) in its genome. The function of miRNAs is to silence the expression of their target genes through RNA-interference pathway. The miRNAs can affect expression of genes encoded by the virus itself as well as host gene expression. So far little is known about the effects of KSHV miRNAs on cells and tumorigenesis, as only a few of the target genes have been identified.

The aim of this study was to find miRNA target genes from endothelial cells, which KSHV infects naturally. The study was based on genes identified in microarray analysis of endothelial cells expressing the miRNAs. The expression of these genes was downregulated in miRNA expressing cells compared to control cells. In this study we concentrated on specific cell cycle genes that encode cell cycle proteins which have a seed-match (partially complementary region) to some of the KSHV encoded miRNAs.

As a model system in this study we used endothelial cells expressing KSHV miRNAs stably or acutely. GFP expressing cells were used as a control. In order to find the genes that the miRNAs might target, the differences in protein levels of specifically chosen cell cycle proteins were determined between miRNA expressing cells and control cells. In addition to this, functional assays were done to support the results obtained. We also tested the effect of antagomiR-oligos on protein levels in miRNA expressing cells. These oligos are designed to specifically bind the miRNAs and inhibit their action, which leads to restoration of the target protein levels.

We were able to identify two proteins with lower expression levels in miRNA expressing cells than control cells. These proteins were cell cycle inhibitor p27^{Kip1} and MDM2, which negatively regulates tumor suppressor p53. Many of the cell lines expressing stably or acutely the miRNAs had less of these proteins compared to the control. In the case of MDM2, we were able to confirm the result with antagomiR-oligo designed against individual miRNA K2. This result implies that MDM2 gene is the direct target of KSHV miRNA K2. There was, however, some variation in results between experiments. This may be due to the fact that the overall effect of the miRNAs on target gene expression is relatively small. For this reason some further experiments need to be done to confirm the results in case of both MDM2 and p27^{Kip1}. In addition to these it will be worthwhile to look for and to validate also other putative target genes to get a better understanding of the function of the miRNAs and their role in KSHV tumorigenesis.

Keywords: KSHV, miRNA, cancer, endothelial cell, cell cycle

SISÄLLYSLUETTELO

1	Johdanto	8
1.1	Mikro-RNA:t (miRNA:t)	8
1.1.1	RNA-interferenssi (RNAi) –reitti	8
1.1.2	miRNA-analyysi ja kohdegeenien löytäminen	9
1.1.3	miRNA:t ja syöpä	10
1.1.4	Viraaliset miRNA:t	11
1.2	Solusykli	12
1.2.1	Mikro-RNA:iden rooli solusyklin säätelyssä.....	14
1.3	Virukset ja syöpä	15
1.3.1	p53:n toimintahäiriöt virusperäisissä syövässä	16
1.4	Kaposin sarkooma herpesvirus	17
1.4.1	Esiintyminen	17
1.4.2	Elinkierto ja virusgenomi.....	17
1.4.3	KSHV:n mikro-RNA:t.....	18
1.4.4	KSHV:n mikro-RNA:iden kohdegeenit.....	19
2	Työn tavoite ja lähestymistavat	20
3	Materiaalit ja menetelmät	21
3.1	Solut ja soluviljely	21
3.2	Lentivirusten tuottaminen ja akuutti transduktio soluihin	22
3.2.1	miRNA-plasmidien monistaminen	22
3.2.2	Lentivirustuotto 293 FT -soluissa	23
3.2.3	Akuutit transduktiot EA.hy926-soluihin.....	23
3.3	Proteiinimääritykset	24
3.3.1	Proteiinilysaattien valmistus ja proteiinipitoisuuksien määrittäminen	24
3.3.2	Immunoblottaus	24
3.4	Solujen kasvunopeuden mittaaminen.....	25
3.5	AntagomiR-koet.....	26
3.6	Fluoresenssimikroskopia	26
4	Tulokset	27
4.1	Solusykli-geenit KSHV:n miRNA:iden kohteena	27
4.1.1	Asynkronoidut miRNA-solulinjat.....	28
4.1.2	Synkronoidut miRNA-solulinjat.....	29
4.2	miRNA:t eivät vaikuta endoteelisolujen kasvunopeuteen merkittävästi	30
4.3	miRNA:iden akuutti ilmentäminen kohdegeenien validoinnissa	32
4.4	AntagomiR-koet vahvistaa MDM2:n miR-K2:n kohdegeeniksi	33
4.5	p53:n reaktivaatio MDM2:ta säätelevissä miRNA-soluissa	35
5	Tulosten tarkastelu	36
5.1	Solulinjojen synkronointi tutkittaessa solusykliproteiinien ilmentymistä endoteelisoluissa	36

5.1.1	Synkronoinnin vaikutus solusykliproteiinien tasoihin.....	36
5.1.2	Synkronoinnin vaikutus solujen kasvunopeuteen.....	38
5.2	Erot stabiilisti ja akuutisti miRNA:ita ilmentävien solulinjojen välillä.....	38
5.3	AntagomiR-oligojen toiminta ja kyky palauttaa MDM2- ja p27-proteiinitasot ennalleen	40
5.4	Yhteenveto	41
5.5	Tulevaisuuden näkymät	42
6	Lähdeluettelo	43

Käytetyt lyhenteet

KSHV/HHV-8	Kaposin sarkooma herpesvirus
KS	Kaposin sarkooma
PEL	primaarinen effuusiolympfooma
cDNA	komplementaarinen DNA
RNA	ribonukleiinihappo
mRNA	lähetti-RNA
miRNA	mikro-RNA
RNAi	RNA-interferenssi
pre-/pri-miRNA	miRNA:n esiaste
RISC	ribonukleoproteiini- <i>kompleksi</i>
3'UTR	mRNA:n 3' päässä sijaitseva alue (jota ei lueta proteiiniin)
p53	kasvunrajoiteproteiini
p27 ^{Kip1}	sykliinistä riippuvan kinaasin estäjäproteiini
p21 ^{Cip1}	sykliinistä riippuvan kinaasin estäjäproteiini
GFP	vihreää valoa fluoresoiva proteiini
ELB	EDTA:ta sisältävä hajotuspuskuri
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
PBST	fosfaattipuskuroitu natriumkloridi pesuliuos
HRP	piparjuuriperoksidaasi-entsyymi
ECL	voimistettu kemiluminesenssi
CDC6	solusykliissä DNA:n replikaation aloitukseen osallistuva proteiini (<i>cell division cycle 6</i>)
MDM2	<i>murine double minute 2</i> , proteiini, joka säätelee negatiivisesti p53:a

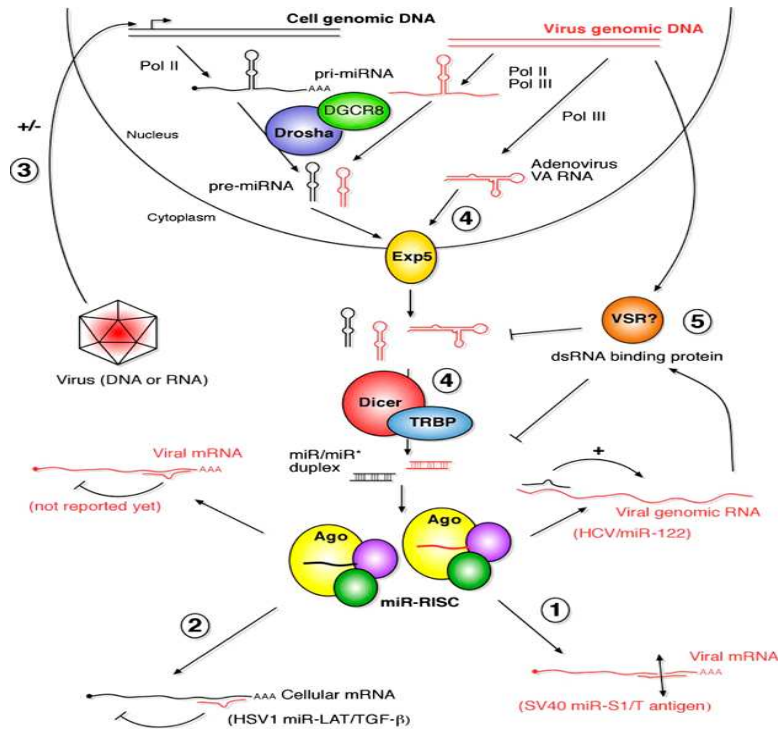
1 Johdanto

1.1 Mikro-RNA:t (miRNA:t)

Mikro-RNA:t eli miRNA:t ovat pieniä, keskimäärin 19 - 22 nukleotidin mittaisia RNA-molekyylejä, jotka toimivat transkription jälkeisinä geeninsäätelijöinä solussa. Ne vaikuttavat niin kutsutun RNA-interferenssi (RNAi) säätelyreitit kautta. Useimmat miRNA-geenit luetaan solussa vastaavalla tavalla kuin proteiineja koodaavat mRNA:t, joiden synteesistä vastaa RNA polymeraasi II -entsyymi. Mikro-RNA:t voidaan lukea yksittäin tai useamman miRNA:n rykelminä (klusterit), ja ne voivat sijaita geenien introneissa tai koodaamattomalla alueella genomissa (ks. yleiskatsaus Dykxhoorn, 2007).

1.1.1 RNA-interferenssi (RNAi) –reitti

Genomista luettavaa miRNA:n esiastetta kutsutaan primaarisiksi miRNA:ksi (pri-miRNA), joka sisältää lenkkimäisen rakenteen (Lee ym., 2002; Kim, 2005). Kypsät miRNA:t syntyvät peräkkäisten pilkkoutumisreaktioiden seurauksena (kuva 1). RNAasi III entsyymi *Drosha* pilkkoo tumassa pri-miRNA:n, jonka seurauksena syntyy pienempi, noin 60 nukleotidin mittainen miRNA:n esiaste (pre-miRNA), joka edelleen sisältää lenkkimäisen rakenteen. Tämän jälkeen eksportiini 5 –proteiini kuljettaa pre-miRNA:n tumasta solulimaan (Yi ym., 2003; Lund ym., 2004). Solulimassa *Dicer* –entsyymi tunnistaa ja pilkkoo sen lyhyeksi, kaksijuosteiseksi molekyyliseksi, joka sisältää varsinaisen miRNA:n sekä mukana tulevan vastinjuosteen. Vastinjuoste tuhoutuu ja kypsä miRNA–molekyylit yhdistyy RISC-ribonukleoproteiinikompleksiin, joka ohjaa miRNA:n löytämään kohdesekvenssinsä eli mRNA:n, joka sen on määrä inaktivoita. miRNAt tunnistavat spesifisesti osittaisen sekvenssihomologian kautta kohde-mRNA:nsa ja sitoutuvat sen 3'UTR-alueelle. Tämä voi johtaa kyseisen mRNA:n pilkkoutumiseen tai se voi inaktivoitua muulla tavoin. Seurauksena on joka tapauksessa translaation estyminen (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Meister ym., 2004). miRNA:n sitoutumisessa tärkeää, osittaista sekvenssihomologiaa miRNA:n ja mRNA:n välillä kutsutaan myös nimellä *seedmatch* (Pfeffer ym., 2005).



Kuva 1. miRNA-molekyylin kypsyminen solussa (Pfeffer & Voinnet, 2006).

1.1.2 miRNA-analyysi ja kohdegeenien löytäminen

Mahdollisten miRNA-kohdegeenien etsimiseen eri organismien genomeista on kehitetty erilaisia algoritmeja. Näillä ohjelmilla etsitään kohdegeenejä identifioimalla niiden 3'UTR-alueelta evolutionäärisesti konservoituneita alueita, jotka ovat osittain komplementaarisia (ts. niillä sanotaan olevan *seedmatch*) miRNA:iden kanssa. Samaan tarkoitukseen on mahdollista soveltaa myös ns. mikroarray ("mikrosiru")-analyysia, jolloin on mahdollista tutkia hyvin monien eri geenien ilmentymistä kerralla. Tämä tapahtuu siten, että miRNA:t sisältävistä soluista analysoidaan mRNA:iden määrät mikrosiruhybridisaation avulla. Tämän perusteella saadaan selville ne geenit, joiden ilmentyminen vähenee kontrollisoluihin verrattuna. Nämä geenit ovat mahdollisia miRNA-kohdegeenejä (ks. yleiskatsaus Miska, 2005).

Tutkittaessa onko miRNA:lla todellisuudessa vaikutusta tietyn geenin ekspressioon, käytetään yleisesti koetta, jossa tutkittavan kohdegeenin 3'UTR:n yhteyteen kloonataan joko fluoresoiva proteiini (GFP = *green fluorescent protein*) tai valoa tuottava lusiferaasi-

reportterigeeni. Tällöin spesifisen miRNA:n sitoutuminen 3'UTR-alueelle vähentää tuotetun fluoresenssisignaalin tai lusiferaasientsyymin määrää soluissa, joihin kyseinen reportterigeeni on transfektoitu. Tämä soluissa havaittava muutos on suora seuraus miRNA:n ja sen kohdegeenin välisestä sitoutumisesta (ks. yleiskatsaus Miska, 2005).

1.1.3 miRNA:t ja syöpä

Mikro-RNA-geenejä on viime vuosien aikana löydetty eri eliöiden, mukaan lukien ihmisen, genomista useita satoja. Niiden vaikutukset geenien ilmentymisen säätelijöinä ulottuvat laajalle alueelle, käsittäen monia tärkeitä prosesseja liittyen solujen erilaistumiseen, yksilönkehitykseen, aineenvaihdunta- ja muihin signaalintireitteihin.

Tutkimuksissa on löydetty viitteitä siitä, että miRNA:t voivat edesauttaa syövän kehityksessä. Tässä yhteydessä niistä on myös käytetty lyhennettä *onkomiR*. Ihmisen genomista tähän mennessä löydettyistä noin 500 miRNA:sta on monen ilmentymisen osoitettu olevan tavalla tai toisella häiriintynyttä useissa syöpämuodoissa. Monissa näistä miRNA:ista on todettu olevan mutaatioita. Ihmisen miRNA:iden on osoitettu säätelevän mm. solusykliä, apoptoosia ja angiogeneesia, jotka ovat kaikki hyvin kriittisiä syövän synnyn kannalta (ks. yleiskatsaus Blenkiron & Miska, 2007). Lisäksi monissa tutkimuksissa on todettu, että miRNA-geenit sijaitsevat hyvin usein sellaisilla genomien alueilla, joita ilmentetään joko liikaa tai puutteellisesti monissa nisäkkäiden syöpätyypeissä (Calin ym., 2004).

Ihmisen miRNA:ista monet voivat toimia onkogeeneinä. Esimerkiksi mir-17-92 -klusterin koodaamien miRNA:iden on todettu olevan monistuneita ainakin B-solulymfoomassa (Ota ym., 2004). Myös miRNA:iden 372 ja 373 on osoitettu olevan onkogeenisia. Niiden liiallinen ilmentyminen on liitetty ainakin kivessyöpään, jossa ne häiritsevät p53-säätelyreitin toimintaa (Voorhoeve ym., 2006).

Uusimpien tutkimustulosten mukaan miRNA:t voivat myös ehkäistä syöpää toimimalla kasvunrajoitegeenien tapaan. *Let-7*-perheeseen kuuluvat miRNA:t, joita nisäkkäiden genomissa on ainakin yhdeksän kappaletta, ovat tunnettuja kasvunsäätelijöitä. Niiden vaikutuksen on todettu kohdistuvan moniin tunnettuihin onkogeeneihin, kuten *Ras*-perheen gee-

neihin ja *c-Myc*-onkogeeniin (Johnson ym., 2005; Koscianska ym., 2007). *Let-7*-perheeseen kuuluvan *let-7g*:n on osoitettu toimivan kasvunrajoitegeeninä keuhkosyövässä. Todennäköistä on, että myös se vaikuttaa suurelta osin *Ras*-perheen geeneihin ja niiden hiljentämiseen (Kumar ym., 2008).

Edellä mainittujen onkogeenien lisäksi tutkimuksissa on löydetty viitteitä siitä, että miRNA:t osallistuvat myös genomien suojelejana tunnetun kasvunrajoiteproteiinin, p53:n, toiminnan säätelyyn. p53:n säätely tunnetaan hyvin monimutkaisena, ja monien säätelijäproteiinien lisäksi siis myös jotkut miRNA:t näyttäisivät osallistuvan tähän verkostoon. Esimerkiksi ihmisen miRNA:n miR-34 on osoitettu kuuluvan näihin säätelijöihin (He ym., 2007; Raver-Shapira ym., 2007).

1.1.4 Viraaliset miRNA:t

Myös useiden virusten on viime aikoina todettu koodaavan miRNA:ita, jotka voivat säädellä niin viruksen omien kuin sen infektoiman isäntäsolunkin geenien ilmentymistä. Molemmista toimintatavoista on eri viruksista löydetty esimerkkejä (ks. yleiskatsaus Pfeffer & Voinnet, 2006). Monet seikat puhuvat sen puolesta, miksi miRNA:t ovat nimenomaan viruksille edullisia säätelymolekyylejä: pienen kokonsa vuoksi ne mahtuvat helposti kooltaan rajallisiin virusgenomeihin, ne eivät saa isäntäorganismissa aikaan immuunivastetta ja lisäksi niiden vaikutukset voivat kohdistua useisiin eri geeneihin (sekä virus- että isäntägenomissa). Tästä luonnollisestikin seuraa, että miRNA:illa on myös hyvät mahdollisuudet vaikuttaa viruksen patogeneesiin (Lim ym., 2005).

Erityisen paljon miRNA:ita on löydetty herpesvirusten perheeseen kuuluvilta viruksilta, kuten hiiren gammaherpesvirukselta (MHV68), ihmisen sytomegalo- β -herpesvirukselta (CMV), Herpes Simplex 1 -virukselta (HSV1), sekä Epstein-Barrin virukselta (EBV) ja Kaposin sarkooma herpesvirukselta (KSHV) (ks. yleiskatsaus Pfeffer & Voinnet, 2006).

Monien virusten, joiden genomista miRNA-molekyylejä on löydetty, on todettu olevan onkogeenisia eli syöpää aiheuttavia. Viruksen koodaamien miRNA:iden syöpää aiheuttava vaikutus voi olla välillinen (ts. ne voivat olla yksi useista syöpää aiheuttavista tekijöistä) tai

ne voivat toimia suoraan syöpää aiheuttavina onkogeeneinä. Esimerkiksi KSHV:n kaposiini-geenin alueella sijaitsevilla miR-K10:llä ja miR-K12:lla voi olla vaikutusta siihen, että kaposiinin on todettu aiheuttavan syöpää mm. normaalin kasvunsäätelyn estymisen seurauksena (Kliche ym., 2001). Onkin arvioitu, että edellä mainitut miRNA:t osallistuvat ainakin osittain kaposiinin onkogeneesiin (Pfeffer & Voinnet, 2006). Myös EBV:n, joka oli ensimmäinen virus jonka genomista löydettiin miRNA:ita, miRNA:ille on löydetty joitakin kohdegeenejä. Yksi näistä on kemokiini CXCL-11/I-TAC, jonka on todettu olevan EBV:n miRNA:n BHRF1-3 kohteena. Tällä on todennäköisesti oma vaikutuksensa EBV:n aiheuttamien lymfoomien immuunivasteiden säätelyssä (Xia ym., 2008). Viruksen koodaamat miRNA:t voivat vaikuttaa myös solun miRNA:ihin, joiden ilmentyminen ja toiminta voivat virus-miRNA:iden vaikutuksesta häiriintyä (ks. yleiskatsaus Pfeffer & Voinnet, 2006).

Vain murto-osa viruksen koodaamien miRNA:iden kohdesekvensseistä viruksen tai solun genomissa tunnetaan, joten niiden mahdolliset vaikutukset myös syövän kehittymisen kannalta ovat toistaiseksi vielä pitkälti tuntemattomia.

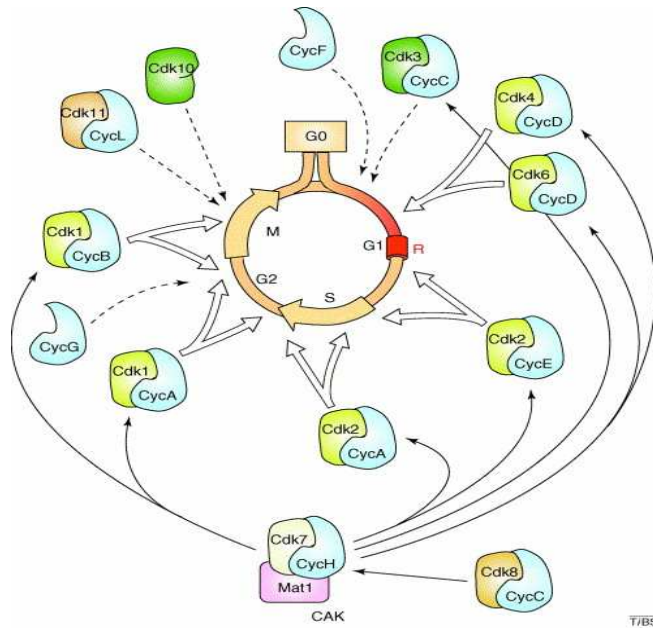
1.2 Solusykli

Solusykli on tarkoin säädelty tapahtuma, jonka aikana solun perimä kahdentuu ja mitoosin seurauksena syntyy kaksi tytärtumaa, joista edelleen kaksi tytärsolua. Solusyklin tärkeimpiä säätelijöitä ovat sykliinit ja sykliineistä riippuvat kinaasit (CDK:t). Sykliineille ominaista on se, että niiden määrät vaihtelevat syklistä sykliin eri vaiheissa. Tämän vuoksi kullekin vaiheelle on ominaista tietyn sykliinin (tai sykliinien) vallitsevuus ja vastaavasti toisen sykliinin (sykliinien) poikkeuksellisen pieni määrä. Katalyyttisesti aktiiviset sykliineistä riippuvat kinaasit muodostavat komplekseja niitä aktivoivien sykliinien kanssa (kuva 2). Nämä kompleksit säätelevät solusyklin eri vaiheita fosforyloimalla spesifisiä substraatteja solussa kulloinkin vallitsevan tilanteen mukaan (ks. yleiskatsaus Malumbres & Barbacid, 2005).

Solunjakautumisen seurauksena syntyneet solut joko jatkavat jakautumissykliään tai siirtyvät G0:ksi kutsuttuun lepotilaan, jolloin niiden jakautuminen pysähtyy. Jakautumissykliään jatkavat solut puolestaan siirtyvät vaiheeseen G1, jonka aikana solun tuleva jakautuminen

ja erilaistuminen määräytyvät. G1-vaiheen säätelijöistä tärkeimpiä ovat sykliineistä riippuvat kinaasit CDK2, CDK4 ja CDK6 sekä sykliinit D ja E, joiden kanssa CDK:t muodostavat komplekseja. G1-vaiheeseen kuuluu myös R-pisteeksi (restriction point) kutsuttu vaihe, jonka jälkeen solut eivät enää tarvitse mitogeenisia signaaleja jakautuakseen. G1-vaiheesta solut siirtyvät S-vaiheeseen ohitettuaan ensin DNA-vaurioiden tarkastuspisteen. S-vaiheessa solun DNA kahdentuu, ja pääsäätelijänä tässä vaiheessa on CDK2 yhdessä sykliinien E ja A (A1/A2) kanssa. Tämän jälkeen solut siirtyvät syklissä G2-vaiheeseen, jonka aikana solut valmistautuvat uuteen jakautumiseen. Tätä vaihetta säätelee CDK1 yhdessä sykliinien A ja B (B1/B2) kanssa. Tämän (sekä solusyklin tarkastuspisteiden ohittamisen) jälkeen solu on valmis mitooseen johtavaan M-vaiheeseen (ks. yleiskatsaus Malumbres & Barbacid, 2005).

Solusyklin säätelyn kannalta tärkeän osan muodostavat proteiinit, jotka estävät sykliini - CDK -kompleksien toimintaa. Näihin proteiineihin kuuluvat INK4-proteiinit (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} ja p19^{INK4D}), joiden vaikutus kohdistuu CDK4:n ja CDK6:n muodostamiin komplekseihin, sekä p21^{Cip1}, p27^{Kip1} ja p57^{Kip2}, jotka puolestaan estävät muiden sykliini - CDK -kompleksien toimintaa. INK4-proteiinit pystyvät sitoutumaan vain CDK-molekyyleihin, mutta Cip- ja Kip-ryhmän proteiinit kykenevät sitoutumaan sekä CDK:ihin että sykliineihin. Monet näistä proteiineista ovat tunnettuja kasvunrajoiteproteiineja, sillä niiden tehtävänä on estää solusyklin etenemistä ja niiden ilmentymisen on todettu olevan puutteellista monissa syöpätyypeissä (Weinberg, 2007).



Kuva 2. Solusykli ja sen eri vaiheissa vaikuttavat sykliini - CDK -kompleksit (Malumbres & Barbacid, 2005).

1.2.1 Mikro-RNA:iden rooli solusyklin säätelyssä

Mikro-RNA:t voivat osallistua solusyklin säätelyyn sekä suoraan että välillisesti. Suorassa säätelyssä miRNA hiljentää jonkin solusykliissä tärkeän geenin ilmentymistä, jonka seurauksena sen koodaaman proteiinin määrä solussa vähenee. Tällä voi olla erilaisia seurauksia; kuten esimerkiksi solujen kasvun kiihtyminen ja vaurioiden lisääntyminen solun perimässä. Esimerkkinä solusyklin säätelyyn vaikuttavista ihmisgenomin onkogeenisistä miRNA:ista ovat miR-221 ja miR-222, joiden liiallisen ilmentymisen on osoitettu aiheuttavan tärkeän kasvunrajoiteproteiinin, p27^{Kip1}:n, määrän vähenemistä solussa. p27^{Kip1}:n määrän vähenemisen on puolestaan todettu lisäävän syöpäsolujen kasvua ainakin joissain syöpätyypeissä, kuten esimerkiksi glioblastoomassa. Lisäksi p27^{Kip1}:n määrän väheneminen johtaa yleensä myös syövän aggressiivisuuden lisääntymiseen (le Sage ym., 2007).

Ihmisen genomista on tähän mennessä löydetty edellä mainitun kaltaisia miRNA:ita, jotka osallistuvat tavalla tai toisella solusyklin säätelyyn. Nämä miRNA:t voivat toimia joko kasvunrajoitegeenien tai onkogeenien tavoin puuttamalla tärkeiden solun kasvun säätelyreittien toimintaan (ks. yleiskatsaus Kent & Mendell, 2006). Edellä on kuvattu tarkempia

esimerkkejä siitä, kuinka miRNA:iden on todettu aiheuttavan syöpää (kappale 1.1.3 miRNA:t ja syöpä).

1.3 Virukset ja syöpä

Nykyisin tunnetaan useita viruksia, jotka ovat onkogeenisia eli aiheuttavat isäntäorganismissaan syöpää. Arvion mukaan 17 - 20 % ihmisen syöivistä on viruksen aiheuttamia. Yleisiä ihmisen syöpätyyppejä, jotka on liitetty virusinfektioihin, ovat mm. maksasyövät (hepatiitti B- ja C-virukset), lymfoomat eli verisolusyövät (Epstein-Barrin virus, Kaposin sarkooma herpesvirus ja ihmisen T-lymfotrooppinen virus 1) sekä kohdunkaulasyöpä (ihmisen papilloomavirus). Vaikka virukset ovatkin usein välttämätön tekijä kyseisten syöpätyyppien etiologiassa, tarvitaan syövän syntymiseen yleensä useita tekijöitä, joiden vaikutus kumuloiduu. Tässä prosessissa virukset toimivat usein muutoksia aikaansaavina ja aktiivivina tekijöinä. Tapahtumien lopputuloksena viruksen infektoiman solun normaalit säätelyreitit ja solusyklin tarkastuspisteet häiriintyvät, mikä mahdollistaa solun hallitsemattoman lisääntymisen ja ajan myötä syövän kehittymisen (ks. yleiskatsaus Butel, 2000).

Virusinfektiot johtavat syövän syntyyn erilaisten molekuläärisisten mekanismien välityksellä. Yleisesti voidaan sanoa, että niissä yhdistyvät joko virusten omien onkogeenien että solun proto-onkogeenien aktivaatio ja kasvunrajoitegeenien toiminnan estyminen. Useimmiten virukset häiritsevät apoptoosia eli ohjelmoitua solukuolemaa, DNA:n korjausmekanismeja, solusyklin tarkastuspisteiden toimintaa sekä välttävät immuunipuolustusta (ks. yleiskatsaus Butel, 2000).

Virusinfektion seurauksena syntyvien kasvaimien kehittyminen johtuu usein isäntäsolun genomissa tapahtuneiden mutaatioiden ja yksilön heikentyneen immuunipuolustuksen yhteisvaikutuksesta. Yleensä viruksen koodaamat onkogeenit parantavat viruksen lisääntymiskykyä ja elinkelpoisuutta. Tämä voi johtaa solun puolustusmekanismien heikentymiseen ja tätä kautta toimii lähtökohtana kasvainsolujen lisääntymiselle ja syövän kehittymiselle. Solusyklin tarkastuspisteiden toiminnan estyminen on myös syynä siihen, että solu ei kykene pysäyttämään ylikierroksilla tapahtuvaa solunjakautumista eivätkä DNA-virheitä (mutaatioita) sisältävät solut kuole apoptoosiin (Nevins, 2001).

1.3.1 p53:n toimintahäiriöt virusperäisissä syövässä

Genomin suojelejana tunnettu kasvunrajoiteproteiini p53 on avainasemassa monien syöpien synnyssä ja niiden kehityksen estäjänä. Jopa 50 %:ssa kaikista ihmisen syövästä p53-geenissä on mutaatio tai se toimii muuten puutteellisesti. Tämän vuoksi se onkin yleisin geeni, joka on mutatoitunut ihmisen syöpäsolujen genomissa (Weinberg, 2007). p53 toimii soluissa transkriptionaalisenä säätelijänä (ts. se aktivoi kohdegeeniensä transkriptiota), mutta se voi toimia myös tavoilla, jotka eivät liity transkription säätelyyn. Yksi tällainen mekanismi on mitokondrioiden ohjelmoitu solukuolema, jossa p53 toimii yhdessä mitokondrioiden apoptoottisten säätelijöiden kanssa (Fuster ym., 2007; yleiskatsaus Aylon & Oren, 2007).

p53:n säätely on hyvin monimutkainen. p53 vastaanottaa normaalisti ympäristöstään viestejä, jotka liittyvät solujen stressitilanteisiin kuten aineenvaihdunnallisiin häiriöihin tai vaurioihin niiden genomissa. Se vastaa tällaisten häiriöiden korjaamisesta joko ohjaamalla solun korjaamaan häiriön tai jos vahinko on solulle liian vakava, käynnistämällä apoptoosin. Apoptoosi on näissä tilanteissa organismille välttämätön, sillä se ehkäisee mutaatioiden kertymisen, solun transformoitumisen pahanlaatuiseksi ja sitä seuraavan syövän kehittymisen (Weinberg, 2007). p53:n tärkeä negatiivinen säätelijä on MDM2, joka sitoutessaan p53:een ohjaa sen proteasomien hajotettavaksi, jolloin solujen apoptoosi vähenee. MDM2:n yliaktiivisuus tai liiallinen ilmentyminen altistaa soluja mm. transformoitumiselle, koska vaurioituneet solut eivät kykene apoptoosin avulla eliminoimaan haitallisia muutoksia (Freedman ym., 1999; Michael & Oren, 2003).

p53 proteiini löydettiin alun perin tutkimalla *Simian virus 40*:llä (SV40) infektoituja hiiren soluja, joissa tietty virusproteiini (iso T antigeeni) sitoutui p53:een inaktivoimaan sen. Tämän jälkeen on löydetty useita muitakin viruksia (esim. KSHV, EBV ja ihmisen papilloomavirus), jotka koodaavat p53:n toimintaa estäviä proteiineja. Virusproteiinin sitoutuminen p53:een häiritsee sen normaalia toimintaa useilla eri tavoilla. Tämä on yksi tärkeimmistä mekanismeista, joilla onkogeneiset virukset aiheuttavat syöpää (Weinberg, 2007).

1.4 Kaposin sarkooma herpesvirus

1.4.1 Esiintyminen

Kaposin sarkooma herpesvirus (KSHV), toiselta nimeltään ihmisen herpesvirus 8 (HHV-8), kuuluu gammaherpesvirusten perheeseen. KSHV aiheuttaa Kaposin sarkooma (KS) verisuonikasvaimia sekä primaarista effuusiolympfoomaa (PEL), joka on B-solulympfooma. KSHV:n aiheuttamia syöpätyyppejä tavataan lähinnä immunitetiltään heikentyneillä yksilöillä, kuten AIDS-potilailla. HIV-infektioiden yleisyyden vuoksi Kaposin sarkooma onkin yleisin syöpätyyppi monissa Afrikan maissa (erityisesti Saharan eteläpuoleisessa osassa Afrikkaa, jossa KSHV esiintyy endeemisenä). Lisäksi KS:stä tunnetaan klassinen muoto, jota esiintyy yleisesti monissa Välimeren alueen maissa. Tämä tautimuoto ei ole kuitenkaan yhtä aggressiivinen kuin immunitetiltään heikentyneillä yksilöillä ilmenevät syövät (ks. yleiskatsaus Moore & Chang, 2003). Lisäksi taudista tunnetaan vielä ns. iatrogeeninen muoto, jota ilmenee elinsiirtojen yhteydessä hyljinnänestolääkityksen seurauksena (ks. yleiskatsaus Iscovich ym., 2000). KSHV-infektio löytyy kaikista Kaposin sarkooman kliinistä muodoista (ks. yleiskatsaus Moore & Chang, 2003).

1.4.2 Elinkierto ja virusgenomi

KSHV on suuri, genomissaan kaksijuosteista DNA:ta sisältävä virus. KSHV:n elinkierto on latenti ja lyyttinen vaihe. Latentissa vaiheessa virusgenomi on isäntäsolun tumassa rengasmaisena episomina, jossa se replikoituu isäntäsolun genomien mukana kromosomeihin kiinnittyneenä. Lyyttisessä elinkierron vaiheessa virusgenomi replikoituu ns. rolling circle –mekanismin avulla. Tämän seurauksena muodostuu uutta virus-DNA:ta, jotka pakataan lineaarisina molekyyleinä viruskapsideihin. KSHV:n genomista on löydetty yhteensä lähes 90 geeniä, joiden kaikkien transkriptit koodataan 145 kiloemäksen mittaiselta alueelta (Russo ym., 1996). KSHV (kuten monet muutkin herpesvirukset) on evoluutionsa aikana kaapannut cDNA:ta isäntäsolusta. Tämän cDNA:n geenituotteille yhteistä on se, että ne muistuttavat solun alkuperäisiä genejä. Suuri osa näistä on myös homologisia monien tärkeiden solun säätelygeenien kanssa. Virusproteiineille on kuitenkin tyypillistä, että ne pystyvät välttämään solun normaalia kasvun säätelyä. KSHV:n geenien kaskadimai-

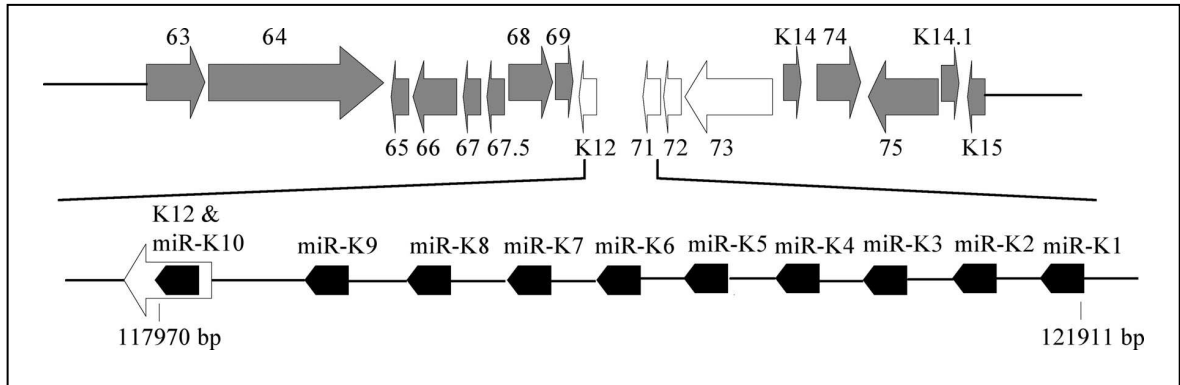
seen ilmentymiseen vaikuttavat viruksen elinkierron vaihe (latentti/lyyttinen) sekä isäntäsolu ympäristöineen (Sarid ym., 1998).

Yleisesti ajatellaan, että KSHV:n aiheuttamien syöpätyyppien syntyyn vaikuttavat lähinnä viruksen latentit proteiinit ja niitä koodaavien geenien ilmentyminen, sillä viruksen lyyttinen elinkierto ja uusien viruspartikkelien vapautuminen johtaa isäntäsolun kuolemaan eikä näin ollen voi johtaa kasvaimen muodostumiseen. Toisaalta on kuitenkin selvää, että myös viruksen lyyttinen sykli on välttämätön syövän syntymisen kannalta. Yleensä viruksella infektoituneista soluista onkin vain pieni osa lyyttisiä. KSHV:n geenituotteet voivat häiritä solun signaalireittejä, jotka liittyvät mm. immuunipuolustukseen, apoptoosiin sekä solusyklin säätelyyn (ks. yleiskatsaus Moore & Chang, 2003).

1.4.3 KSHV:n mikro-RNA:t

KSHV:n genomista koodataan 12 miRNA:ta, joiden geenit sijaitsevat yhtenäisellä, noin 5 kiloemäksen mittaisella alueella yhdessä viruksen latenttiin elinkiertoon liittyvien geenien kanssa (kuva 3). Vaikka miRNA:ita koodaavia geenejä on löydetty viruksen genomista 12, kypsyy niistä 17 erilaista miRNA:ta. Tämä johtuu siitä, että miRNA:iden esiasteita voidaan muokata solussa eri tavalla, jolloin niistä saadaan enemmän kypsiä tuotteita (Pfeffer ym., 2005). Samalla latenttiin elinkiertoon liittyvällä alueella sijaitsevat myös viruksen kaposiini (K12)-proteiinin eri isoformeja koodaavat geenit. Kaposiinia koodaavan geenin liiallisen ilmentymisen on osoitettu aiheuttavan muun muassa solujen transformoitumista eli muuttumista pahanlaatuisiksi (ks. yleiskatsaus Pfeffer & Voinnet, 2006).

Yksi KSHV:n miRNA:ista, miR-K10, sijaitsee kaposiinin primaarisen transkriptin alueella sekä yksi, miR-K12, saman transkriptin 3'UTR:n alueella. Loput 10 miRNA:ta ovat kaposiinin primaarisen transkriptin intronin alueella. KSHV:n miRNA:iden on todettu ilmentyvän sekä viruksella infektoituissa B-soluissa että endoteelisoluissa sekä latentin että lyyttisen virusinfektion aikana (Pearce ym., 2005).



Kuva 3. KSHV:n miRNA:iden sijainti viruksen genomissa, latenttiin elinkiertoön liitetyllä alueella.

1.4.4 KSHV:n mikro-RNA:iden kohdegeenit

Koska KSHV on syöpää aiheuttava virus, on hyvin todennäköistä, että sen miRNA:t osallistuvat jollain tavalla syövän kehittymiseen. Tämä voi tapahtua joko kohdistumalla suoraan miRNA:iden kohdegeeneihin tai välillisesti jonkin signaalireitin välityksellä.

KSHV:n miRNA:iden kohdegeenien löytämiseksi on tehty sekvenssiin perustuvia *in silico*-ennusteita. Nämä ennusteet on pääsääntöisesti tehty vertailemalla miRNA:iden sekvenssejä koko genomien mRNA:iden 3'UTR-sekvensseihin, keskittyen erityisesti sitoutumisen kannalta tärkeisiin *seedmatch*-alueisiin. Ennusteiden perusteella määritetyt mahdolliset kohdegeenit voidaan edelleen jakaa ryhmiin esimerkiksi sen mukaan, mihin aineenvaihduntareittiin ne kuuluvat.

Ensimmäiset KSHV:n miRNA:iden kohdegeenit on tunnistettu kuluneen vuoden aikana. Ensimmäinen näistä oli thrombospondiini 1 (THBS1) geeni, jonka on osoitettu olevan usean KSHV:n miRNA:n vaikutuksen kohteena. Yksittäisistä miRNA:ista ainakin miR-K1:n, -K3-3p:n, -K6-3p:n ja -K11:n on osoitettu vähentävän thrombospondiini-1:n ilmentymistä voimakkaasti. Thrombospondiini 1 on voimakkaasti kasvaimen syntyä sekä verisuonien muodostumista ehkäisevä proteiini, jonka pitoisuuden on jo aiemmin todettu olevan alhainen Kaposin sarkoomassa (Samols ym., 2007). Toinen vahvistettu kohdegeeni on transkriptionaalinen säätelijä BACH-1 (Btb ja CNC homologi 1), joka on yksittäisen KSHV:n miRNA:n K11 kohteena. Lisäksi KSHV:n miRNA:n K11 on osoitettu olevan homologinen

ihmisgenomin miRNA:n miR-155 kanssa. Kohdegeeni BACH-1:n tiedetään vaikuttavan mm. hemioksigenaasi-1 -geenin (HMOX1) säätelyyn, jonka puolestaan tiedetään ainakin ylläpitävän solujen elinkykyä ja edesauttavan niiden jakautumista (Skalsky ym., 2007; Gottwein ym., 2007).

2 Työn tavoite ja lähestymistavat

Tämän työn tavoitteena oli löytää isäntäsolun genomista kohdegeenejä, joiden ilmentymistä KSHV:n miRNA:t hiljentävät. KSHV:n luontaisia kohdesoluja ovat sekä endoteeli- että B-solut. Solumallina tässä tutkimuksessa käytettiin stabiilisti KSHV:n miRNA:ita ilmentäviä EA.hy926-endoteelisolulinjoja (Edgell ym., 1983), joiden kontrollina käytettiin vastavia GFP:tä ilmentäviä soluja. Nämä solulinjat on tuotettu lentivirustransduktion ja sitä seuraavan selektion avulla. Koska EA.hy926-endoteelisolujen tiedetään olevan vaikeasti transfektoitavia ja lentiviruksia käytettäessä ei yleensä ilmene voimakasta yliexpressiota, valittiin sekä stabiilien solulinjojen tuottamiseen että miRNA:iden akuuttiin ilmentämiseen EA.hy926-soluissa lentivirusvektorit. Stabiilit, miRNA:ita ilmentävät EA.hy926-solulinjat on tuotettu yhdistämällä selektiosta selvinneitä solupopulaatioita (eivät siis ole klooneja). Tämän vuoksi lentiviruksen integroitumispaikka solujen genomissa on todennäköisesti erilainen eikä sen tulisi vaikuttaa geenien ilmentymiseen merkittävästi.

Käytetyssä lentivirusvektorissa ei ole helposti havaittavaa markkerigeeniä (esim. fluoresoiva proteiini). Tämän vuoksi transduktion tehokkuutta voidaan tutkia vain kontrollina toimivan GFP:n tapauksessa mm. fluoresenssimikroskopian avulla. Tässä työssä käytetyistä, miRNA:ita stabiilisti ilmentävistä EA.hy926-solulinjoista on kuitenkin erikseen määritetty miRNA:iden ilmentymistasot, ja niiden on todettu olevan verrannollisia KSHV:n infektoimien PEL-solujen ilmentymistasoihin.

Tutkimuksen lähtökohtana oli kolmen tutkimusryhmän yhteistyönä tehty, koko genomin laajuinen mikrosiruanalyysi KSHV:n miRNA-klustereita (K10/12 tai K12/12) ilmentävistä EA.hy926-endoteelisolusta. Solujen mRNA-tasot analysoitiin, ja bioinformatiivisen analyysin perusteella valikoitiin lista geneistä, joilla oli *seedmatch* johonkin KSHV:n miR-

NA:ista. Nämä geenit kuuluivat solun eri aineenvaihdunta- ja signaalireitteihin ja kriteerinä oli se, että niiden mRNA-tasot olivat pienemmät miRNA:ita ilmentävissä soluissa verrattuna kontrollisoluihin. Tästä joukosta valikoitiin tutkimukseen tietyt solusykligeenit sisältämiensä *seedmatch*-alueiden perusteella, koska ne vaikuttivat hyviltä kandidaateilta miRNA:iden kohdegeeneiksi. Näiden mahdollisten kohdegeenien varmistamiseksi tutkittiin kyseisten geenien koodaamien proteiinien ilmentymistä soluissa ja tehtiin toiminnallisia kokeita.

Stabiilisti KSHV:n miRNA:ita ilmentävistä EA.hy926-solulinjoista tutkimukseen valittiin niitä yksittäisiä miRNA:ita ilmentävät linjat, joiden miRNA:illa oli todettu olevan eniten *seedmatchejä* valikoituihin, mahdollisiin kohdegeeneihin.

Mikrosiruanalyysistä saadun geenilistan lisäksi miRNA:iden vaikutusta testattiin myös joihinkin muihin solusykliin olennaisiin geeneihin. Näiden geenien koodaamien proteiini-tasot tutkittiin siksi, koska ne ovat tärkeitä tutkittujen kohdegeenien alavirran säätelijöitä. Toisaalta tiedetään, että *seedmatch* ei ole välttämätön edellytys miRNA:n vaikutukselle. Yhteistyötahojen tekemien kokeiden perusteella on saatu myös muita lupaavia kandidaatti-geenejä, jotka pyritään validoimaan.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Solut ja soluviljely

Solumallina kokeissa käytettiin EA.hy926-endoteelisoluja. EA.hy926 on fuusiosolulinja, joka on yhdistelmä A549 stabiilista keuhkokarsinomasolulinjasta sekä primäärisestä napanuoran endoteelisolulinjasta (HUVEC). Sekä miRNA:n (kontrollisolulinjassa GFP:n) että blastisidiini-resistenssigeenin sisältävä plasmidi on liitetty solujen genomiin lentivirus-transduktion avulla.

EA.hy926-endoteelisolut ja 293FT-solut, jotka ovat lentivirustuotossa käytettäviä, alkupe-
rältään ihmisen alkion munuaisesta eristettyjä soluja (sisältävät SV40-viruksen ison T-
antigeenin), kasvatettiin D-MEM -mediassa (Dulbecco's modified eagle's medium), johon
oli lisätty 10 % seerumi (FCS-500, PromoCell), glutamiini ja penisilliini-streptomysiini.
Solut kasvatettiin +37°C:ssa 5 %:n CO₂-pitoisuudessa. Stabiilisti miRNA:ita ja GFP:tä
ilmentävien solujen kasvatusmediaan lisättiin 3 µg/ml blastisidiinia. Soluille vaihdettiin
tuore media keskimäärin joka toinen päivä ja solut jaettiin 1:10 kaksi kertaa viikossa.

Solujen synkronoimiseen käytettiin nokodatsolia (75 ng/ml), joka pysäyttää solusyklin
mitoosin profaasiin estämällä mikrotubulusten polymerisaatiota. Soluja käsiteltiin nokodat-
solilla 20 h, jonka jälkeen solusykli käynnistettiin vaihtamalla soluille tuore media. Inku-
bointia jatkettiin 24 h.

Nutliini-3a -yhdisteen (Cayman chemical company), pitoisuus kasvatusmediassa oli 7 µM.
Yhdisteen annettiin vaikuttaa 24 h.

3.2 Lentivirusten tuottaminen ja akuutti transduktio soluihin

3.2.1 miRNA-plasmidien monistaminen

pLenti6V5-plasmidit, jotka sisälsivät yksittäiset miRNA:t tai KSHV:n kaikki miRNA:t
(K10/12, K12/12) saatiin yhteistyökumppanilta (Georg Malterer, Münchenin yliopisto).
Plasmidit transformoitiin kompetentteihin E. coli -soluihin lämpöshokki-menetelmällä.
Koska plasmidit sisälsivät ampisilliini-resistenssigeenin, käytettiin ampisilliinia (pitoisuu-
dessa 100 µg/ml) oikeiden bakteerikloonien selekoimiseen. Bakteerit kasvatettiin suurem-
paan tilavuuteen LB-mediassa, ja plasmidieristykset tehtiin Macherey-Nagel NucleoBond
Xtra Maxi -plasmidin eristyskitillä käyttäen low copy number -protokollaa, joka on tarkoi-
tettu erityisesti suurikokoisten plasmidien eristämiseen. Plasmidit liuotettiin steriiliin ve-
teen ja niiden DNA-pitoisuudet määritettiin NanoDrop-laitteella.

3.2.2 Lentivirustuotto 293 FT -soluissa

Lentivirukset tuotettiin 293 FT –soluissa (kts. kohta 3.1 Soluviljely). Virustuotossa käytettiin lentivirusvektorin (miRNA:n sisältävä plasmidi) lisäksi pLP1-, pLP2- ja pLP/VSVG-pakkausplasmideja. Haluttua tuottoplasmidia käytettiin 5 µg/reaktio ja pakkausplasmideja 2,83 µg (pLP1), 1,33 µg (pLP2) ja 1,84 µg (pLP/VSVG) yhteen reaktioon. Plasmidit transfektoitiin soluihin lipofektamiini-transfektioagenssilla (Invitrogen Lipofectamine2000 Reagent) Optimem-mediassa (Gibco). Yhtä virustuottoa varten 6×10^6 293 FT solua sekoitettiin 10 cm:n maljalla yhdessä median (D-MEM) ja plasmidit sisältävän transfektioseoksen kanssa. Soluja kasvatettiin +37°C:ssa 5 %:n CO₂-pitoisuudessa 72 h, jonka jälkeen viruksen sisältävä supernatantti kerättiin ja suodatettiin 0,45 µm:n filtlerin läpi. Virussupernatantit jaettiin 2 ml:n eriin (säilytys -80°C:ssa).

3.2.3 Akuutit transduktiot EA.hy926-soluihin

miRNA:iden akuutteja eli välittömiä vaikutuksia soluissa voidaan tutkia transdukoimalla solut miRNA:n sisältävillä lentiviruksilla, jotka kykenevät infektoimaan myös soluja, jotka eivät jakaudu. Tällaisessa koejärjestelyssä soluja ei selekoida antibiootilla, eikä niille myöskään anneta mahdollisuutta sopeutua miRNA:ihin ja niiden ilmentymisen aikaansaamiin muutoksiin solussa. Tällöin saadaan selville miRNA:n välitön vaikutus solussa. Transduktiota varten EA.hy926-endoteelisoluja kasvatettiin 6-kuoppalevyllä 150 000 – 180 000 solua/kuoppa. Virussupernatantteihin (tilavuus 2 ml) sekoitettiin 16 µg polybreeniä, joka tehostaa virusten kykyä infektoida soluja. Tämän jälkeen virukset pipetoitiin solujen päälle. Soluja inkuboitiin 10 min. +37°C:ssa, jonka jälkeen soluja sentrifugoitiin 30 min. 2500 rpm huoneenlämpötilassa (Heraeus multifuge 3S-R). Sentrifugoinnin jälkeen soluja inkuboitiin 1 h +37°C:ssa, jonka jälkeen media vaihdettiin (D-MEM). Seuraavana päivänä solut siirrettiin 6-kuoppalevyltä 10 cm:n maljoille ja annettiin kasvaa vielä 48 h, jonka jälkeen niistä kerättiin proteiinilysaatit. Transduktion tehokkuuden arvioimiseksi lisättiin EA.hy926-eGFP-kontrollisolimaljoille peitinlaseja, joista määritettiin eGFP-positiivisten solujen osuus.

3.3 Proteiininmääritykset

3.3.1 Proteiinilysaattien valmistus ja proteiinipitoisuuksien määrittäminen

Proteiinilysaatteja varten solut kerättiin maljoilta soluraaputtimella PBS-puskuriin ja sentrifugoitiin 5 min. 1300 rpm (Eppendorf 5804R sentrifuugi). Solupelletit hajotettiin 100 - 300 µl:aan ELB-puskuria (valmistusohje alla), johon oli lisätty proteinaasi-inhibiittorit (PMSF, DTT, leupeptiini, aprotiniini, pepstatiini ja natriumvanadaatti). Lysaatit sekoitettiin ja niitä pidettiin jäällä 10 - 15 min., jonka jälkeen ne homogenisoitiin vetämällä 5 kertaa 25G neulan läpi (DNA:n hajotus) ja sentrifugoitiin lopuksi 15 min. 13 000 rpm +4°C:ssa (Heraeus Fresco 17 sentrifuugi). Sentrifugoinnin jälkeen otettiin talteen proteiinit sisältävät supernatantit, jotka säilytettiin -80°C:ssa.

ELB-puskuri:

150 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4, 5 mM EDTA, 0,1% NP40

Lysaattien proteiinipitoisuudet määritettiin Bradfordin menetelmällä (Bio-Rad) mittaamalla näytteiden (1 µl näytettä/reaktio) absorbanssi 595 nm:ssä spektrofotometrisesti (Eppendorf biophotometer).

3.3.2 Immunoblottaus

10 - 30 µg proteiinia sisältävät näytteet, joihin oli lisätty LAEMLI-näytepuskuri, denaturoitiin 5 min. +100°C:ssa lämpöhauteessa ja ajettiin 12 %:ssa SDS-PAGE geelissä. Proteiinit siirrettiin nitroselluloosakalvolle (Whatman Schleicher&Schuell Protran Nitrocellulose Transfer Membrane) käyttäen ns. puolikuivaa (semi dry) blottausmenetelmää. Blottauksen jälkeen kalvoa pidettiin 20 min. 5 % rasvaton maitojauhe PBS-(0,05 %)Tween20 (PBST)-liuoksessa. Vasta-aineleimauksissa (käytetyt primaarivasta-aineet on esitetty taulukossa 1) kalvoa pidettiin 5 % maitoon tehdyssä vasta-ainelaimennoksessa keinuttajassa joko yön yli +4 °C:ssa tai 1 - 2 h huoneen lämpötilassa. Tämän jälkeen kalvo pestiin kolme kertaa (10 min/kerta) PBST:llä. Sekundäärivasta-aineena käytettiin joko HRP-konjugoitua anti-hiiri

tai anti-kani vasta-ainetta laimennettuna 1:2000 - 1:5000 5 % maitoon. Sekundäärivasta-aineessa kalvoa pidettiin yksi tunti, jonka jälkeen kalvo pestiin vielä kolme kertaa PBST:llä.

Taulukko 1. Työssä käytetyt vasta-aineet ja niiden valmistajat

vasta-aine	valmistaja	valmistajan koodi	käytetty laimennos
anti-Kip1/p27	BD Transduction Laboratories	610242	1:1000
anti-CDC6	Upstate cell signaling solutions	DCS-180	1:1000
anti-MDM2 (IF2, 2A10, SMP14) (Kurki ym., 2004)	vasta-aine erä saatu lahjoituksena		IF2: 1:1000, 2A10: 1:2500, SMP14: 1:1000
anti-p53 DO-1	vasta-aine erä saatu lahoituksena		1:2500
anti-p21	Santa Cruz Biotechnology	sc-397	1:1000
anti-cyclin A	Santa Cruz Biotechnology	sc-596	1:1000
anti- γ -tubulin	Sigma	GTU-88	1:1500

Kemiluminesenssi-signaalin detektoimiseen käytettiin ECL-reagenssia (Pierce SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate) laimennettuna PBS:ään ja signaali valotettiin filmille (Fuji medical X-ray film). Kemiluminesenssi-signaalin kvantitoimiseen käytettiin valopöytää, jossa on kemiluminesenssisuodatin ja FluorChem-tietokoneohjelmaa.

3.4 Solujen kasvunopeuden mittaaminen

MTT-kokeella mitataan solujen aineenvaihduntaa siten, että metabolisesti aktiiviset solut muuttavat väriltään keltaisen tetrazolium-suolan (MTT) violeteiksi formazan-kristalleiksi. Kokeessa solujen aineenvaihduntaa mitataan solujen lisääntymisnopeutta. MTT-koetta varten solut kasvatettiin 96-kuoppalevyllä (1500 - 2500 solua/kuoppa). Jokaisesta tutkittavasta solulinjasta tehtiin kolme rinnakkaismäärittystä. Reagenssilisäykset ja absorbanssimittaukset suoritettiin valmistajan ohjeen mukaan (Roche Cell proliferation Kit I) 24 - 96 h:n aikavälissä käyttäen 96-kuoppalevyn lukulaitetta (Thermo Labsystems Multiskan Ascent). Tuloksista piirrettiin Excel-kuvaajat.

3.5 AntagomiR-koe

AntagomiR-kokeessa tavoitteena on kumota miRNA:iden toiminta 2'O-metyyli-oligoilla, jotka ovat komplementaarisia miRNA:iden kanssa ja sitoutuvat niihin estäen niiden toiminnan. Oligot saatiin yhteistyökumppanilta (Sebastien Pfeffer, Strasbourgin yliopisto).

Transfektiota varten solut kasvatettiin 10 cm:n maljalla 70 % konfluenssiin, jonka jälkeen solut transfektoitiin oligoilla, joiden lopullinen pitoisuus solujen kasvatusmediassa oli 20 nM (laimennettu oligojen alkuperäisestä pitoisuudesta, joka oli 100 µM). Transfektiossa käytettiin Dharmaconin DharmaFECT 1 –transfektio-reagenssia, joka on optimoitu pienten RNA-oligoiden transfektoimiseen. Solut transfektoitiin käyttäen seerumitonta mediaa (D-MEM). Reagenssien suhde ja transfektio toteutettiin valmistajan ohjeen mukaisesti. Transfektio-reagenssin soluille aiheuttaman toksisuuden vuoksi media vaihdettiin seuraavana päivänä kokonaan uuteen (normaali D-MEM media). Transfektion jälkeen soluja inkuboitiin +37°C:ssa 72 h, jonka jälkeen niistä tehtiin proteiinilysaatit.

3.6 Fluoresenssimikroskopia

Kokeissa kontrollina käytettävän EA.hy926-eGFP-solulinjan GFP-ekspression (vihreä fluoresenssi) tarkasteluun käytettiin fluoresenssimikroskooppia (Zeiss Axioplan 2 epifluoresenssi mikroskooppi). Solut kasvatettiin peitinlasilla ja ne käsiteltiin 4 % paraformaldehydillä (solujen kiinnitys) 15 minuutin ajan, jonka jälkeen solut pestiin PBS:llä. Solut permeabilisoitiin 0,1 % Triton-X100:lla, jonka annettiin vaikuttaa 5 minuutin ajan. Tämän jälkeen solut pestiin PBS:llä ja niille tehtiin tumaväryys (Hoechst 33342), jonka vaikutusaika oli 5 minuuttia. Erityisesti akuuteissa transduktioissa transduktion tehokkuus oli tärkeää pystyä arvioimaan fluoresenssin voimakkuuden perusteella. Peitinlasilta laskettiin solujen tumaväryyksen perusteella solujen kokonaismäärä, jota verrattiin fluoresoivien solujen määrään (transduktiotehokkuus).

4 Tulokset

4.1 Solusykligeenit KSHV:n miRNA:iden kohteena

Taulukossa 2 on listattu bioinformatiivisen analyysin perusteella valikoidut solusykligeenit, joista tutkittavat geenit valittiin. Eroja proteiinitasoissa tutkittiin ensin sellaisten solusykliproteiinien osalta, joiden mRNA:issa oli *seedmatch* useiden yksittäisten miRNA:iden sekvenssiin. Stabiilisti miRNA:ita ilmentävistä EA.hy926-endoteelisolulinjoista valittiin tutkimuksiin yksittäisiä miRNA:ita K2, K3, K4, K9 ja K11 sekä klustereita K10/12 ja K12/12 ilmentävät solulinjat. Kontrollina kokeissa käytettiin vastaavaa GFP:tä ilmentävää solulinjaa.

Taulukko2. Lista tutkittuja solusykliproteiineja koodaavista geneistä.

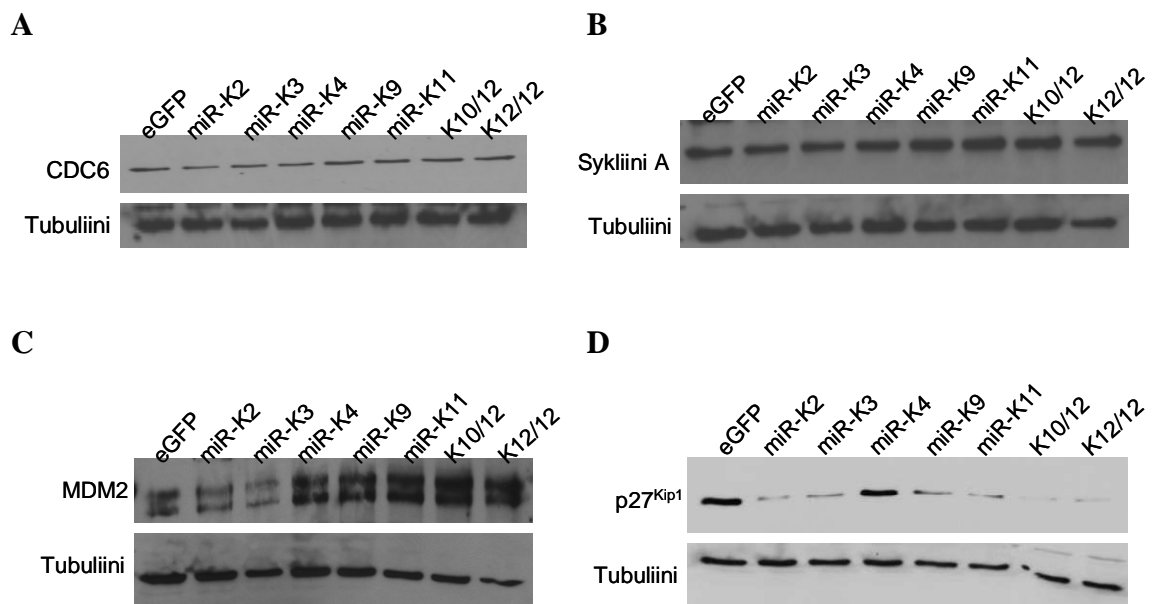
Geenin kuvaus	Lyhenne	Seedmatch
cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18)	CDKN2C	KSHV-miR-K2/K10b
ring-box 1	RBX1	KSHV-miR-K4-3p
CDC7 cell division cycle 7 (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC7	KSHV-miR-K2/K4-5p/K6-5p/K10a
CDC6 cell division cycle 6 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	CDC6	KSHV-miR-K2/K3/K9*/K11
cyclin A2	CCNA2	KSHV-miR-K3/K4/K6/K10b/K11/K12
SMAD, mothers against DPP homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	SMAD3	KSHV-miR-K3/K4/K6/K10b/K11/K12
cyclin-dependent kinase 2	CDK2	KSHV-miR-K4-3p
SMAD, mothers against DPP homolog 4 (<i>Drosophila</i>)	SMAD4	KSHV-miR-K2/K4-3p/K10a
cyclin B1	CCNB1	KSHV-miR-K3/K4
MDM2, transformed 3T3 cell double minute 2	MDM2	KSHV-miR-K2/K9
CDC2 cell division cycle 2	CDC2	KSHV-miR-K3/K4
cyclin D1	CCND1	KSHV-miR-K2/K3/K4-3p/K6-3p/K9*/K10a/K11

4.1.1 Asynkronoidut miRNA-solinjat

Aluksi proteiinitasojen eroja tutkittiin asynkronoiduissa solulinjoissa, joissa solut kasvavat eri solusyklin vaiheissa. Asynkronoiduista, stabiilisti miRNA:ita ilmentävistä soluista tehtiin kokosolulysaatit, jotka analysoitiin SDS-PAGE:lla ja immunoblottauksella käyttäen solusykliproteiineille spesifisiä vasta-aineita (taulukko 1).

CDC6:n ja sykliini A:n proteiinitasoissa ei asynkronoiduista solulinjoista tehdyissä määrittelyksissä nähty eroja miRNA- ja kontrollisolulinjojen välillä (kuvat 4a, b). MDM2:n kohdalla vaikutti siltä, että ainakin yksi miRNA (miR-K3) laskee proteiinitasoa, kun taas useammassa solulinjassa (miR-K4, -K9 ja -K11) proteiinitasot olivat selvästi korkeammalla (kuva 4c). Erot olivat selvimpiä kontrolliin nähden p27^{Kip1}:n proteiinitasoissa: useat miRNA:t (K2, K3, K9 ja K11) näyttivät laskevan proteiinitasoa huomattavasti (kuva 4d).

Asynkronoiduista solulinjoista määritettiin myös joidenkin muiden taulukossa 1 esitettyjen solusykliproteiinien tasoja (tuloksista ei kuvia).



Kuva 4. miRNA-kohdeproteiinien ilmentyminen miRNA:ita stabiilisti ilmentävissä asynkronoiduissa soluissa kontrolliin nähden. CDC6:n, sykliini A:n, MDM2:n ja p27^{Kip1}:n proteiinitasot miRNA:ita ilmentävissä EA.hy926-endoteelisolulinjoissa määritettiin immunoblottauksella käyttäen kuvaan merkittyjä vasta-aineita. Tubuliini toimii tasaisen proteiinimäärän kontrollina kussakin näytteessä.

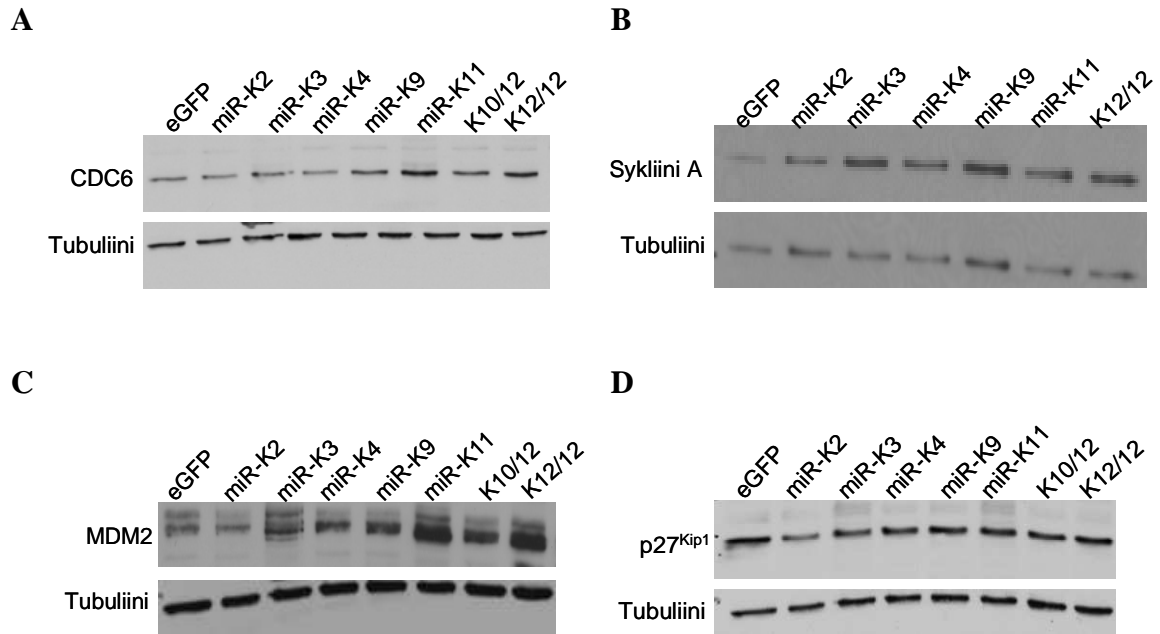
4.1.2 Synkronoidut miRNA-solulinjat

Koska tutkimuksen kohteena olevat proteiinit olivat solusykliproteiineja, voi miRNA:iden vaikutus peittyä proteiinitasojen luontaisen, solusyklin vaiheesta riippuvan vaihtelun alle. Esimerkiksi sykliinien proteiinitason tiedetään vaihtelevan voimakkaasti solusyklin eri vaiheissa. Tällöin solujen synkronointi eli saattaminen samaan solusyklin vaiheeseen on edellytys miRNA:iden vaikutuksen luotettavalle havainnoimiselle.

miRNA:ita ilmentävät solulinjat synkronoitiin nokodatsoli-kemikaalin avulla, joka pysäyttää solusyklin mitoosin esivaiheeseen estämällä solutukirangan mikrotubulusten polymerisaation. Nokodatsoli-käsittelyn jälkeen solujen media vaihdettiin ja niiden annettiin kasvaa vielä vuorokauden ajan. Tämän jälkeen näytteet analysoitiin vastaavalla tavalla kuin asynkronoiduista solulinjoista saadut näytteet.

Yleisesti voidaan sanoa, että synkronoiduilla solulinjoilla saadut tulokset olivat selkeämpiä ja johdonmukaisempia kuin asynkronoiduilla solulinjoilla saadut tulokset. Synkronoiduissa solulinjoissa CDC6:n proteiinitasot olivat miRNA:ita K9 ja K11 ilmentävissä solulinjoissa korkeampia verrattuna kontrolliin (kuva 5a). Sykliini A:n proteiinitasot olivat korkeammat kaikissa miRNA-solulinjoissa kontrolliin nähden (kuva 5b). MDM2:n proteiinitasot olivat niin ikään korkeammat useissa miRNA-solulinjoissa, mutta miR-K2 -solulinjassa havaittiin matalampi MDM2-proteiinitaso (kuva 5c). Vaihtelut p27^{Kip1}-proteiinin kohdalla olivat hyvin pieniä, mutta miR-K2:n ja mahdollisesti myös miR-K3:n kohdalla nähtiin matalampia proteiinitasoja kontrolliin verrattuna (kuva 5d). Koska CDC6:n ja sykliini A:n tasot miRNA-solulinjoissa nousivat, jätettiin nämä proteiinit jatkotutkimuksista pois, sillä miRNA:iden vaikutuksen seurauksena proteiinitasojen tulisi nimenomaan laskea.

Synkronoiduista solulinjoista määritettiin myös joidenkin muiden taulukossa 1 esitettyjen solusykliproteiinien tasoja, mutta tuloksissa ei havaittu toistettavia eroja (tuloksista ei kuvia).



Kuva 5. miRNA-kohdeproteiinien ilmentyminen miRNA:ita stabiilisti ilmentävissä synkronoiduissa solulinjoissa kontrolliin nähden. CDC6:n, sykliini A:n, MDM2:n ja p27^{Kip1}:n proteiinitasot miRNA:ita ilmentävissä EA.hy926-endoteelisolulinjoissa määritettiin immunoblottauksella käyttäen kuvaan merkittyjä vasta-aineita. Tubuliini kontrolloi tasaista proteiinimäärää kussakin näytteessä.

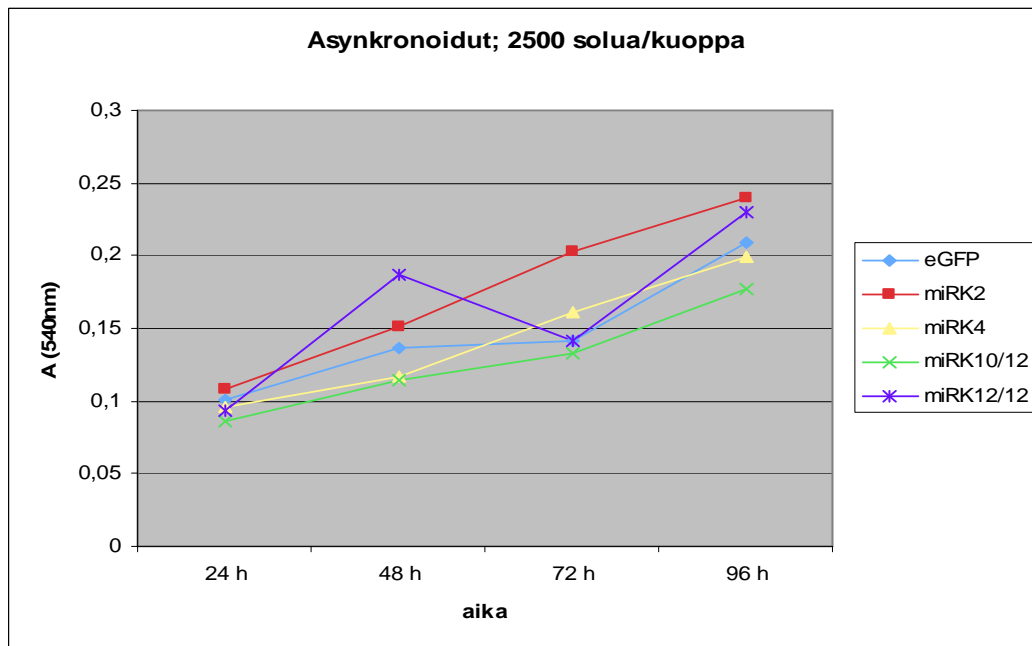
4.2 miRNA:t eivät vaikuta endoteelisolujen kasvunopeuteen merkittävästi

Stabiilisti miRNA:ita ilmentävien solulinjojen kasvunopeutta tutkittiin MTT-kokeen avulla. Optimaalisen solumäärän löytämiseksi koetta testattiin ensin usealla eri solumäärällä (1500/2000/2500 solua/kuoppa), joista valittiin sopivin varsinaiseen kokeeseen. MTT-koe tehtiin ensin asynkronoiduille solulinjoille, ja sen jälkeen synkronoiduille solulinjoille siten, että solut jaettiin 96-kuoppalevyille välittömästi nokodatsolin vaikutusajan jälkeen. Asynkronoiduille solulinjoille koe tehtiin lisäksi sekä selektion (3 µg/ml blastisidiini) kanssa että ilman selektiota.

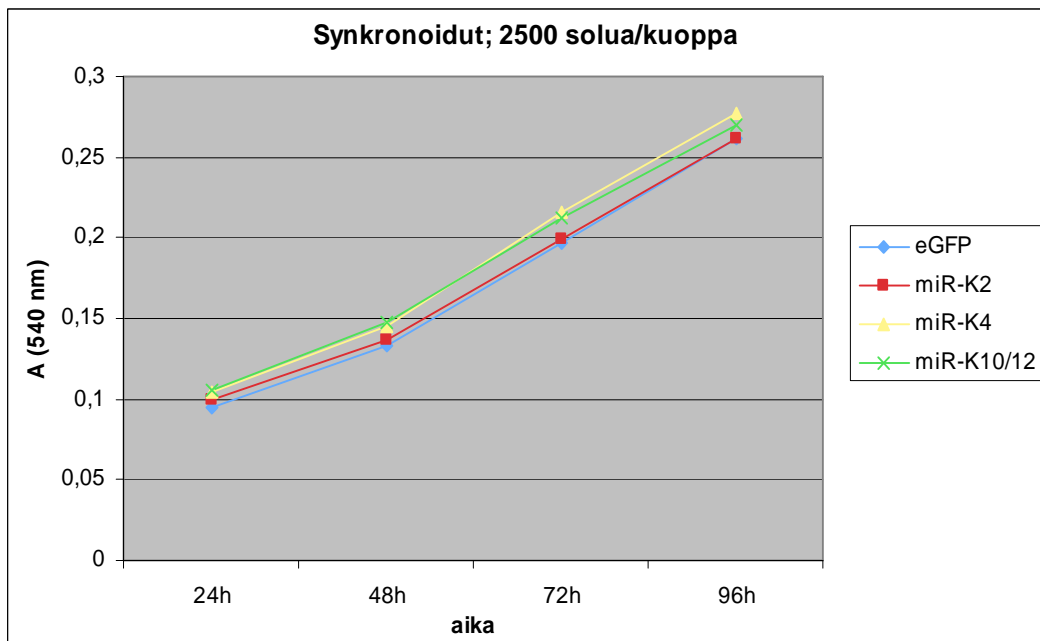
Asynkronoiduilla solulinjoilla saaduissa tuloksissa havaittiin paljon vaihtelua (kuva 6a). Solujen kasvunopeus ei ollut lineaarinen, kuten mitattaessa jakautuvien endoteelisolujen aineenvaihduntaa olisi odotettavissa. Lisäksi eri aikapisteiden välillä esiintyi huomattavaa vaihtelua. Myös antibioottiselektion käyttäminen kokeen aikana lisäsi tulosten vaihtelevuutta. Tulosten trendinä kuitenkin oli, että viimeisessä (96 h) aikapisteessä miRNA-

solulinjojen aineenvaihdunta oli vilkkaampaa kuin eGFP-kontrollisolulinjan. Synkronoiduilla solulinjoilla saadut tulokset olivat selkeämpiä ja satunnainen vaihtelu oli vähäistä (kuva 6b). Solujen kasvunopeus oli lineaarinen, ja miRNA-solulinjojen K4 ja K10/12 kasvunopeus oli hieman vilkkaampaa kuin eGFP-kontrollisolulinjalla. miRNA-solulinjan K2 kasvunopeus puolestaan oli samaa luokkaa kuin kontrollisoluilla.

A



B



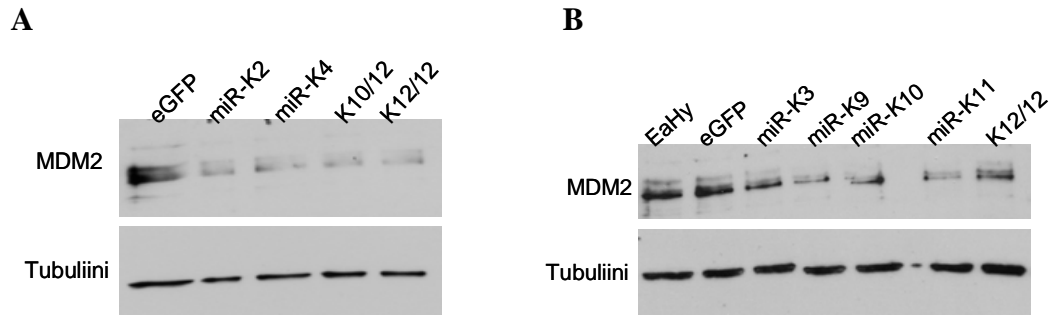
Kuva 6. MTT-koe miRNA:ita ilmentäville EA.hy926-solulinjoille. A. asynkronoitujen solujen (2500 solua/kuoppa) ja B. synkronoitujen solujen (2500 solua/kuoppa) kasvunopeus.

4.3 miRNA:iden akuutti ilmentäminen kohdegeenien validoinnissa

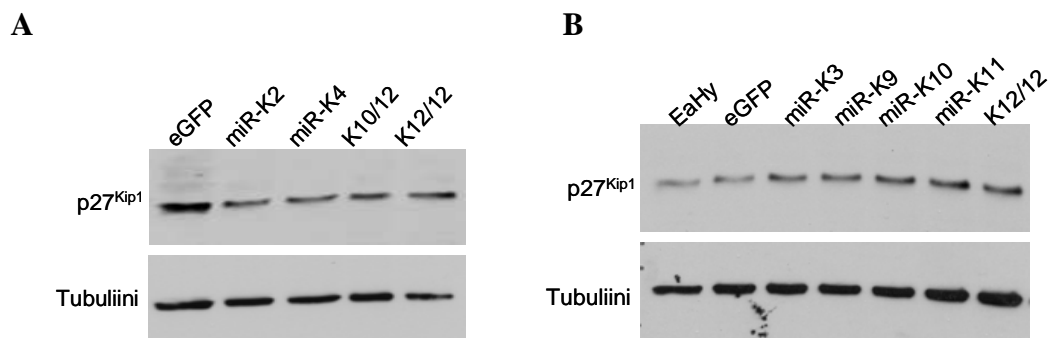
Stabiilisti miRNA:ita ilmentävät solulinjat saattavat ajan myötä sopeutua miRNA:iden vaikutukseen. Tämän vuoksi ne voivat muuttaa ja kompensoida geeniensä ilmentymistä miRNA:iden vaikutuksen mukaan. Transduoimalla miRNA:t soluihin akuutisti voidaan tämä tilanne välttää ja samalla nähdään, mikä on miRNA:iden välitön vaikutus solusykli-proteiinien tasoihin endoteelisoluissa.

Kokeessa transduoitiin EA.hy926-endoteelisoluja lentiviruksilla, jotka sisälsivät joko yksittäisen miRNA:n (miR-K2, -K3, -K4, -K9, -K10 ja -K11), miRNA-klusterin K10/12 tai K12/12 tai kontrollina eGFP:n. Tässä vaiheessa tutkimuksessa keskityttiin proteiineihin, joiden tasoissa oli havaittu miRNA:ista johtuvia eroja joko omissa tai yhteistyökumppaneiden tekemissä kokeissa. Virukset valittiin kohdegeenien sisältämien *seedmatchien* perusteella. Tutkittavista geeneistä MDM2:lla on *seedmatch* miRNA:ihin K2 ja K9 ja p27^{Kip1}:llä miRNA:ihin K10a ja K11.

miRNA-lentiviruksilla transduoitujen solujen proteiinitasoissa näkyi selviä eroja verrattaessa niitä kontrolleina käytettäviin EA.hy926-pLentiGFP- sekä transduoimattomiin EA.hy926-soluihin. Tämä ilmeni siten, että soluissa, joihin oli transduoitu jokin miRNA, oli vähemmän kyseistä proteiinia kuin kontrolleissa. MDM2-proteiinitasot olivat matalammat transduoitaessa kaikilla testatuilla miRNA-lentiviruksilla verrattuna GFP-kontrolliin (kuvat 7a, b). p27^{Kip1}-proteiinitasot olivat matalammat transduoitaessa miR-K2- ja miR-K4 -lentiviruksilla (kuva 8a), mutta muilla viruksilla ei ollut vastaavaa vaikutusta (kuva 8b).



Kuva 7. Akuuttien miRNA-lentivirustransduktioiden vaikutus MDM2-proteiinitasoihin. Kontrollina on käytetty sekä EA.hy926-soluja, joihin ei ole transduoitu mitään (kuva 6b) että EA.hy926-soluja, joihin on transduoitu eGFP (kuvat 6a ja 6b). Proteiinitasot määritettiin immunoblottauksella. Tubuliini toimii tasaisen proteiinin määrän kontrollina kussakin näytteessä.



Kuva 8. Akuuttien miRNA-lentivirustransduktioiden vaikutus p27^{Kip1}-proteiinitasoihin. Kontrollina on käytetty sekä EA.hy926-soluja, joihin ei ole transduoitu mitään (kuva 7b) että EA.hy926-soluja, joihin on transduoitu eGFP (kuvat 7a ja 7b). Proteiinitasot määritettiin immunoblottauksella. Tubuliini toimii tasaisen proteiinin määrän kontrollina kussakin näytteessä.

4.4 AntagomiR-koe vahvistaa MDM2:n miR-K2:n kohdegeeniksi

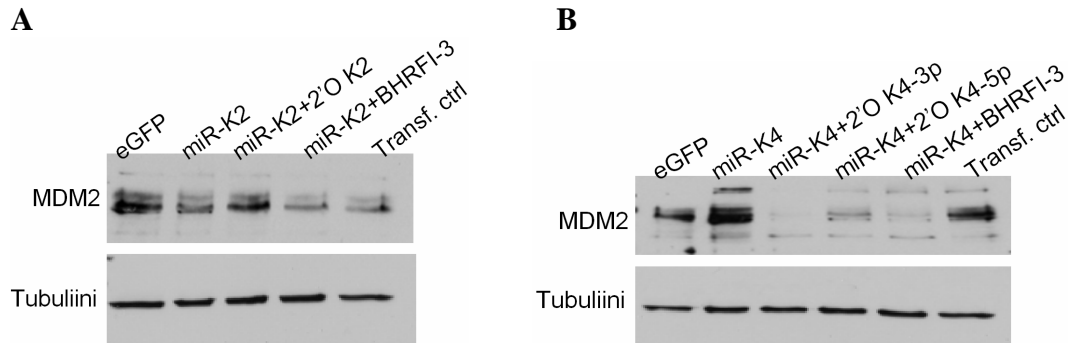
Koska useat yksittäiset miRNA:t näyttivät laskevan MDM2- ja p27^{Kip1}-proteiinien määrää endoteelisoluissa, tehtiin saatujen tulosten varmistamiseksi 2'O-metyyli(antagomiR)-oligo-koe miRNA-spesifiteetin varmistamiseksi. AntagomiR-oligot sitoutuvat spesifisesti sille komplementaariseen miRNA:han ja estävät sen toiminnan soluissa. Tällöin kyseisen proteiinin taso palautuu solussa ennalleen, mikäli kyseessä on miRNA:n suora kohdegeeni.

miRNA:ita K2 ja K4 ilmentävät EA.hy926-endoteelisolulinjat valittiin kokeeseen kohdeproteiinitasoissa näkyneiden erojen perusteella. Lisäksi miRNA:lla K2 on *seedmatch* MDM2-geenin 3'UTR-alueella, mikä vahvisti käsitystä siitä, että kyseessä voisi todella

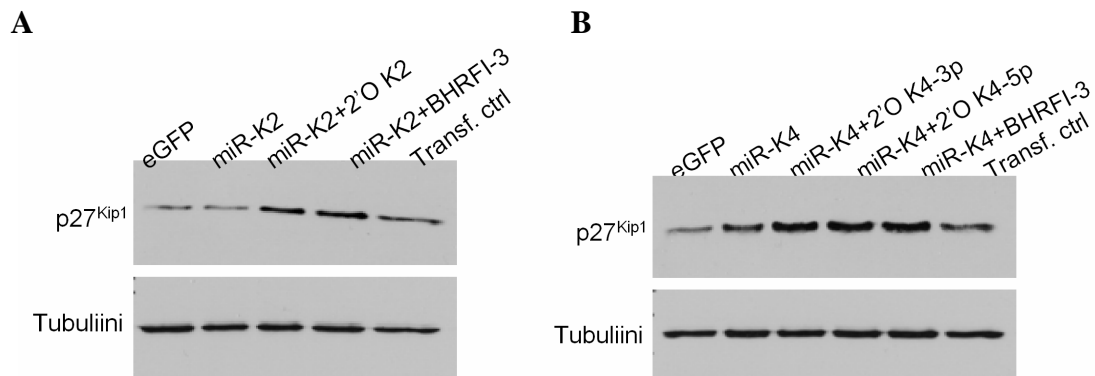
olla miR-K2:n kohdegeeni. EA.hy926-miR-K2 soluihin transfektoitiin antagomiR-K2-oligoja. Koska miR-K4 miRNA:ita muodostuu soluissa kahta eri muotoa (K4-3p ja K4-5p), transfektoitiin EA.hy926-miR-K4 soluihin molemmille kypsille miRNA:ille omat spesifiset oligot. Kontrolleina kokeissa käytettiin sekä KSHV:n miRNA:ille epäspesifistä Epstein-Barrin viruksen BHRF1-3 miRNA:ta että pelkkää transfektioreagenssia.

Immunoblottaus-analyysit osoittivat, että MDM2-proteiinitaso oli miR-K2-soluissa matalampi ja antagomiR-K2 oligo nosti proteiinitason entiselleen (kuva 9a). p27^{Kip1}:n kohdalla ero eGFP-kontrollin ja miR-K2-solujen välillä oli hyvin pieni, mutta tästä huolimatta antagomiR-oligo nosti proteiinitason jopa normaalia korkeammaksi. Toisaalta proteiinitasoa nosti myös solujen transfektoiminen epäspesifisellä oligolla (kuva 10a). Näiden proteiinien osalta miR-K4-soluissa vastaavaa ilmiötä ei näkynyt, sillä proteiinitasot olivat miR-K4-soluissa korkeammat kuin eGFP-kontrollissa (kuvat 9b ja 10b). MDM2:n kohdalla antagomiR-oligot laskivat proteiinitasoja huomattavasti kun taas p27^{Kip1}:n kohdalla antagomiR-oligot nostivat tasoja entisestään. Tulokset olivat miR-K4-soluissa siis hyvin ristiriitaisia, mikä viittaa siihen, että MDM2 ja p27^{Kip1} eivät todennäköisesti ole miR-K4:n kohdegeenejä.

Nämä tulokset osoittavat kuitenkin selvästi, että MDM2 olisi miRNA:n K2 kohdegeeni, sillä kyseiselle miRNA:lle spesifinen antagomiR-oligo nosti proteiinitason normaaliksi eikä epäspesifisillä oligoilla ollut vastaavaa vaikutusta.



Kuva 9. AntagomiR-oligojen vaikutus MDM2:n proteiinitasoihin miRNA:ita K2 ja K4 stabiilisti ilmentävissä EA.hy926-endoteelisoluissa. Soluihin on transfektoitu K2:lle/K4:lle spesifinen antagomiR-oligo, epäspesifinen oligo tai pelkkä transfektioreagenssi. Kontrollina on käytetty EA.hy926-eGFP-solulinjaa. Proteiinitasot määritettiin immunoblottauksella. Tubuliini toimii tasaisen proteiinimäärän kontrollina kussakin näytteessä.



Kuva 10. AntagomiR-oligojen vaikutus p27^{Kip1}:n proteiinitasoihin miRNA:ita K2 ja K4 stabiilisti ilmentävissä EA.hy926-endoteelisoluissa. Soluihin on transfektoitu K2:lle/K4:lle spesifinen antagomiR-oligo, epäspesifinen oligo tai pelkkä transfektioreagenssi. Kontrollina on käytetty EA.hy926-eGFP-solulinjaa. Proteiinitasot määritettiin immunoblottauksella. Tubuliini toimii tasaisen proteiinimäärän kontrollina kussakin näytteessä.

4.5 p53:n reaktivaatio MDM2:ta säätelevissä miRNA-soluissa

Aikaisemmissa kokeissa havaittiin vaihtelua MDM2-proteiinitasoissa useissa miRNA-solulinjoissa. Tämän vuoksi tutkittiin myös p53:n aktiivisuutta useissa miRNA:ita ilmentävissä solulinjoissa, sillä MDM2 liittyy tiiviisti p53-proteiiniin ja sen säätelyyn. Nutliini-3a on pienmolekyyliyhdiste, joka estää p53/MDM2 proteiini-proteiini –kompleksin muodostumisen sitoutumalla MDM2:een (Vassilev ym., 2004). Tästä seuraa p53:n määrän ja aktiivisuuden nouseminen ja tätä kautta myös apoptoosin lisääntyminen soluissa, koska MDM2 ei enää ohjaa p53:a proteasomaaliseen hajotukseen.

Kokeessa tutkittiin nutliini-3a:n vaikutusta p53:n sekä sen kohdegeenien MDM2:n ja p21:n proteiinitasoihin eri miRNA-solulinjoissa. p21 on solusyklin estäjäproteiini ja p53:n kohdegeeni (ks. yleiskatsaus Gartel & Radhakrishnan, 2005). Kokeessa käytettiin GFP-kontrollin lisäksi stabiileja EA.hy926-miR-K2- ja -K9-solulinjoja, joilla on *seedmatch* MDM2-geeniin, sekä negatiivisena kontrollina solulinjaa EA.hy926-miR-K3, jossa *seedmatchia* MDM2:een ei ole.

Kokeesta saadut tulokset p53-, MDM2- ja p21-proteiinien tasojen muutoksista nutliini-3a-käsittelyn vaikutuksesta eivät olleet toistettavia eivätkä ne juuri tukeneet aiempia tuloksia. Tämän perusteella pääteltiin, että kyseinen koe ei välttämättä sovellu toiminnalliseksi kokeeksi vahvistamaan aiempia tuloksia.

5 Tulosten tarkastelu

5.1 Solulinjojen synkronointi tutkittaessa solusykliproteiinien ilmentymistä endoteelisoluissa

5.1.1 Synkronoinnin vaikutus solusykliproteiinien tasoihin

Solusykliproteiinien määrät vaihtelevat hyvinkin voimakkaasti solusyklin vaiheesta riippuen. Tämän vuoksi on tärkeää, että solut ovat samassa solusyklin vaiheessa tutkittaessa eroja tällaisten proteiinien ilmentymisessä eri solulinjojen välillä. Tämä on tärkeää myös saman solulinjan solujen välillä, jotta nähtäisiin proteiinien todelliset tasot eivätkä solusyklin eri vaiheessa olevat solut vaikuttaisi tuloksiin. Tutkittaessa asynkronoituja solulinjoja ongelmana oli se, että saman solulinjan sisällä kukin solu on sattumanvaraisessa solusyklin vaiheessa. Tästä johtuen miRNA:n mahdollista vaikutusta ei välttämättä nähdä proteiinin korkeintaan ilmentymisvaiheen aikana, sillä syklin eri vaiheessa olevat solut pienentävät tätä vaikutusta. Tällöin on mahdotonta sanoa, ovatko vaihtelut miRNA:iden vaikutuksen tulos- ta, vai onko kyseessä ainoastaan solusyklistä johtuva vaihtelu. On todennäköistä, että tämän vuoksi asynkronoiduilla solulinjoilla ei pystytty saamaan toistettavia tuloksia.

Synkronoiduissa solulinjoissa nähtiin pieniä eroja monien analysoitujen proteiinien tasoissa verrattuna kontrolliin. Koska näitä eroja ei voitu toistuvasti havaita, pääteltiin niiden johtuvan pääasiallisesti normaalista variaatiosta eri toistokertojen välillä, eikä niinkään miRNA:iden vaikutuksesta proteiinitasoihin. Joidenkin proteiinien kohdalla kyse saattoi olla myös miRNA:iden vaikutuksesta, mutta tätä ei pystytty luotettavasti todentamaan. Lisäksi osassa tapauksista proteiinien määrät olivat suurempia miRNA:ita ilmentävissä soluissa kontrolliin verrattuna, mikä on ristiriidassa miRNA:iden tyypillisen toimintatavan kanssa. Tämä voi johtua siitä, että solujen kasvaessa soluviljelmässä liian suuressa tiheydessä miRNA:iden on osoitettu vaikuttavan kohdegeeniensä ilmentymiseen päinvastaisella tavalla kuin normaalisti. Tällöin ne lisäävät kohdegeeniensä ilmentymistä niiden hiljentämisen sijaan (Vasudevan ym., 2007). Tämän vuoksi miRNA:ita ilmentävien solujen ei tulisi antaa kasvaa liian tiheästi. Synkronoiduissa solulinjoissa havaitut, kontrolliin nähden korkeammat proteiinitasot miRNA:ita ilmentävissä solulinjoissa voivat myös johtua epäsuorasti miRNA:iden vaikutuksesta, jos miRNA:iden kohteena on esimerkiksi solusyklin estäjäproteiini. Tällöin, estäjäproteiinin määrän vähentyessä, voivat solusyklin etenemisestä vastaavien proteiinien tasot olla kohonneet.

Synkronoimalla solulinjat pystyttiin näkemään miRNA:iden todelliset vaikutukset tutkittaviin geeneihin. Toisaalta on myös todettava, että viimeistään solulinjojen synkronointi osoitti, että todellisia eroja proteiinitasoissa eri solulinjojen välillä on vain harvoissa tapauksissa. Tämän perusteella pystyttiin jättämään suuri osa testatuista geneistä pois joko sen vuoksi, että eroja proteiinitasoissa ei toistuvasti havaittu tai havaitut erot olivat päinvastaisia kuin oletettiin (ts. kontrollisoluihin verrattuna proteiinien määrät olivat suurempia miRNA:ita ilmentävissä solulinjoissa). Lisäksi havaittiin, että solujen toistuva jakaminen (passage) vaikutti tuloksiin siten, että vanhemmat solut kasvoivat hitaammin eikä niistä saatu luotettavia tuloksia.

Tutkittaessa synkronoituja solulinjoja kuitenkin havaittiin, että MDM2-proteiinitaso oli matalampi miRNA:ta K2 ilmentävissä soluissa ja p27^{Kip1}-proteiinitasot miRNA:ita K2 ja K3 ilmentävissä soluissa. Tämä viittaa siihen, että kyseiset geenit voivat olla näiden miRNA:iden suoria kohteita.

5.1.2 Synkronoinnin vaikutus solujen kasvunopeuteen

Asynkronoitujen solulinjojen kasvunopeuden mittaaminen MTT-kokeella antoi epäluotettavia tuloksia. Syynä tähän voi olla se, että lähtötilanteessa solujen määrissä on ollut laskemisesta huolimatta sen verran eroja, että ne näkyvät kasvukäyrissä. Synkronoitujen solulinjojen kasvukäyrät vaikuttivat asynkronoituja solulinjoja luotettavammilta. Tämän perusteella voitiin päätellä, että synkronointi on tarpeellista solujen kasvunopeutta mitattaessa. Tällöin ylimääräinen vaihtelu saadaan tuloksista pois ja solulinjojen kasvunopeuksien vertaileminen mahdollistuu.

miRNA:iden vaikutusten kohdeproteiinien tasoihin tiedetään olevan melko pieni, joten yksittäisten miRNA:iden vaikutuksen solujen kasvunopeuteen ei näin ollen voi olettaa olevan kovin suuri. Koska miRNA:t todennäköisesti toimivat KSHV:llä infektoidussa solussa yhteistyössä viruksen latenttien proteiinien kanssa, on miRNA:iden ja latenttien virusproteiinien välillä todellisuudessa varmasti yhteisvaikutusta myös solujen kasvua koskien. Tätä ei yksittäisiä miRNA:ita ilmentävistä solulinjoista nähdä, joka on todennäköinen syy siihen, miksi miRNA:ita ilmentävien solujen kasvunopeus ei merkittävästi poikkea kontrollisolujen kasvunopeudesta.

5.2 Erot stabiilisti ja akuutisti miRNA:ita ilmentävien solulinjojen välillä

Stabiileissa solulinjoissa solujen on mahdollista ajan myötä mukautua miRNA:iden vaikutuksiin. Tämä voi ilmetä siten, että solut voivat nostaa miRNA:iden kohdeproteiinien ilmentymistasoja tai vastaavasti kompensoida laskeneita proteiinitasoja muilla proteiineilla. Tämän vuoksi lähestymistavaksi otettiin myös akuutit miRNA-lentivirustransduktiot EA.hy926-endoteelisoluihin. Tällöin miRNA:t ilmentyvät soluissa ja tuloksia analysoidessa nähdään nimenomaan miRNA:iden välittömät vaikutukset kohdeproteiinien ilmentymistasoihin soluissa. Koska tulokset akuuteista transduktioista olivat hyvin pitkälti erilaisia kuin stabiileilla solulinjoilla saadut tulokset, viittaa tämä siihen, että stabiilisti miRNA:ita ilmentävät solut ovat todennäköisesti jossain määrin sopeutuneet miRNA:iden läsnäoloon.

Koska miRNA:t on transduoitu soluihin lentivirusten avulla, ei voida varmuudella tietää, minkälaisia vaikutuksia lentivirusten integroituminen solun genomiin aiheuttaa ja vaikuttaako itse lentivirusinfektio tämän tutkimuksen kannalta kriittisten geenien ilmentymiseen solussa. Koska stabiilit solulinjat on kuitenkin tuotettu eri solupopulaatioista (eikä tällöin kyseessä ole soluklooni), on lentiviruksen integroitumispaikka stabiilien solulinjojen soluissa erilainen eikä sen näin ollen pitäisi vaikuttaa näihin soluihin ja niiden geenien ilmentymiseen merkittävästi.

Lisäksi miRNA-lentivirustransduktioiden tehokkuudesta ei voida markkerigeenin puuttumisen vuoksi saada luotettavaa tietoa, vaan tehokkuutta voidaan arvioida vain kontrollina toimivan GFP:n ollessa kyseessä. Näissä kokeissa GFP:n ilmentymistä transduktiotehokkuuden arvioimiseksi yritettiin mitata fluoresenssimikroskopian avulla, mutta GFP:n heikon ilmentymistason vuoksi fluoresenssia ei varmuudella pystytty erottamaan taustasta. Tämä voi kertoa huonosta transduktiotehokkuudesta tai siitä, että 72 tunnin kuluttua transduktiosta GFP:tä ei ilmenny soluissa vielä tarpeeksi, jotta signaali erotettaisiin kunnolla. Tätä taustaa vasten on rohkaisevaa, että miRNA-lentiviruksilla transduoitujen solujen MDM2:n ja p27^{Kip1}:n proteiinitasot olivat hyvin usein matalammat kuin sekä transduoimattomien EA.hy926-solujen että EA.hy926-eGFP-solujen proteiinitasot. Tämä vahvistaa käsitystä siitä, että kyseiset proteiinit olisivat miRNA-säätelyn alaisia. Toisaalta akuuteissa transduktioissa nähtiin myös vaihtelua eri transduktiokertojen välillä esim. transduoitaessa miRNA-klustereita K10/12 ja K12/12 soluihin. Myös tämä voi olla seurausta transduktiotehokkuuden vaihtelusta sekä siitä, että kooltaan suurten klustereiden transduktio soluihin on yleisesti ottaen vaikeampaa kuin yksittäisten miRNA:iden. Koska transduktiotehokkuus voi vaihdella eri kokeissa, eikä siitä saada luotettavaa tietoa, pitää tähänkin lähestymistapaan suhtautua varauksella.

Saatujen tulosten perusteella (sekä lisäksi stabiileista solulinjoista saatujen tulosten perusteella) kuitenkin näyttää siltä, että MDM2 ja p27^{Kip1} ovat yhden tai useamman KSHV:n miRNA:n kohdegeenejä. Lisäksi voidaan todeta, että vaikka *seedmatch*-alueet ovat tärkeä kriteeri valitessa testattavia kohdegeenejä, niitä ei kannata pitää ainoana valintaperusteena. Tiedetään, että miRNA:t voivat vaikuttaa kohdegeeniensä ilmentymiseen muullakin tavoin kuin *seedmatch*-sitoutumisen kautta. Akuuteista transduktioista saadut tulokset osoittavat,

että laskeneita proteiinitasoja nähdään muitakin miRNA:ita ilmentävissä solulinjoissa kuin niissä, joissa on *seedmatch* kyseisen geenin ja miRNA:n välillä. Tämä osoittaa, että *seedmatch* ei ole välttämätön edellytys miRNA:n toiminnalle.

5.3 AntagomiR-oligojen toiminta ja kyky palauttaa MDM2- ja p27-proteiinitasot ennalleen

miRNA:iden K2 ja K4 vaikutus MDM2 ja p27^{Kip1} proteiinien ilmentymiseen EA.hy926-endoteelisoluissa haluttiin varmistaa käyttämällä kullekin miRNA:lle komplementaarista antagomiR-oligoa. Oligot transfektoitiin soluihin ja selvitettiin, palautuvatko MDM2- ja p27^{Kip1}-proteiinitasot ennalleen. Tämä vahvistaisi, että miRNA:iden ilmentäminen aikaansaa alentuneen proteiinitason, eikä se ole seurausta jostain epäspesifisestä solunsisäisestä tapahtumasta.

Saatujen tulosten mukaan MDM2-proteiinitaso nousi kontrollin kanssa samalle tasolle transfektoitaessa EA.hy926-miR-K2 -soluihin K2:lle komplementaarinen antagomiR-oligo. AntagomiR-oligo toimi odotetulla tavalla, joka vahvistaa tulosta, että MDM2 olisi miR-K2:n suora kohdegeeni. Tulosta tukee myös se, että käsiteltäessä solut pelkällä transfektioreagenssilla tai transfektoitaessa niihin epäspesifinen, EBV:n miRNA:lle komplementaarinen oligo, ei vastaavaa proteiinitason nousua soluissa nähdä. p27^{Kip1}:n tason nouseminen myös epäspesifisiä antagomiR-oligoja transfektoitaessa osoittaa, että sen proteiinitaso voi nousta myös muista syistä, eikä siihen välttämättä liity miRNA-säätelyä. Voi olla, että solujen käsittely niille toksisella transfektioreagenssilla aiheuttaa joidenkin solusykliproteiinien tasojen nousemista soluissa.

miRNA:ta K4 ilmentävissä soluissa sekä MDM2:n että p27^{Kip1}:n proteiinitasot olivat koholla, mikä on miRNA:n toiminnan kannalta päinvastainen tulos. Tässäkin tapauksessa on huomionarvoista, että solujen kasvaessa liian suuressa tiheydessä soluviljelmässä voivat miRNA:t lisätä kohdegeeniensä ilmentymistä niiden hiljentämisen sijaan (Vasudevan ym., 2007).

5.4 Yhteenveto

Lähtökohtana KSHV:n miRNA:iden kohdegeenien löytämiselle tässä työssä oli geenilista (taulukko 2), joka sisälsi 12 solusykliässä tärkeää proteiinia koodaavaa geeniä. Jokaisella näistä geneistä oli *seedmatch* eli osittain komplementaarinen alue yhteen tai useampaan KSHV:n miRNA:ista. Tältä geenilistalta löytyi yksi geeni, joka edellä kuvattujen kokeiden tulosten perusteella vaikuttaa vahvalta ehdokkaalta ainakin yhden KSHV:n miRNA:n, miR-K2:n, kohdegeeniksi. Tämä geeni on MDM2 (*murine double minute 2*), jonka koodaama proteiini säätelee negatiivisesti soluille tärkeän kasvunrajoiteproteiinin, p53:n, määrää soluissa. MDM2:n onkin todettu yliekspressoituneena olevan onkogeeninen eli syöpää aiheuttava, koska se estää solujen apoptoosin. Tässä työssä saadut tulokset osoittivat miR-K2:n laskevan MDM2-proteiinin määrää EA.hy926-endoteelisoluissa. Myös antagomiR-oligoilla saadut tulokset tukivat näitä tuloksia ja palauttivat MDM2-proteiinitasot ennalleen kontrollisolujen tasolle. Tämän perusteella on todennäköistä, että miR-K2:n vaikutus kohdistuu MDM2:een.

p53/MDM2-vuorovaikutuksen säätely soluissa on hyvin monimutkainen tapahtuma. Tämä asettaa omat hankaluutensa tulosten tulkintaan. p53:n stabiiliuden ja aktiivisuuden säätelyyn osallistuu MDM2:n lisäksi monia muitakin proteiineja, joilla on oma vaikutuksensa p53:een ja häiriötilanteissa myös syövän syntyyn. On vaikeaa arvioida, millä tavoin syöpää aiheuttava virus voisi hyötyä onkogeenisen MDM2-proteiinin vähentyneestä määrästä ja samalla genomien suojelijana tunnetun p53:n kasvaneesta tasosta. On mahdollista, että tähän liittyy ratkaisevasti vielä jokin muukin proteiini, joka niin ikään osallistuu p53:n säätelyyn solussa. Myös muilla, erityisesti viruksen latentin elinkierron aikana ilmentyvillä virusproteiineilla, voi olla osuutta tässä säätelyssä. Tällä hetkellä kokeista saadut tulokset vaikuttavat lupaavilta, mutta on kuitenkin selvää, että lisää kokeita tarvitaan näiden tulosten tueksi.

5.5 Tulevaisuuden näkymät

Tässä työssä identifioitiin kaksi lupaavaa ehdokasta KSHV:n miRNA:iden kohdegeeneiksi, MDM2 ja p27^{Kip1}. Tulevissa kokeissa on tarkoituksena tutkia ainakin kyseisten proteiinien tasoja myös muita KSHV:n miRNA:ita ilmentävissä stabiileissa solulinjoissa sekä KSHV:llä infektoiduissa soluissa. Lisäksi antagomiR-oligoilla tehtäviä kokeita, joiden avulla saadaan eniten olennaista tietoa kunkin miRNA:n spesifiteetistä, on tarkoitus laajentaa muihin miRNA:ihin. Tavoitteena on myös selvittää, minkälaiset vaikutukset miRNA:iden toimintaan on erilaisilla annoksilla käytettyjä oligoja. Tämä mahdollistaa optimaaliset olosuhteet antagomiR-kokeille.

Kahden edellä mainitun geenin lisäksi tulevaisuudessa on tarkoitus tutkia myös muihin kuin solusyklin säätelyyn kuuluvia geenejä ja miRNA:iden mahdollista osuutta näiden geenien säätelyssä. Nämäkin geenit on valittu bioinformatiivisen analyysin pohjalta, jolloin tärkein valintaperuste on todennäköisesti *seedmatch* miRNA:n ja geenin 3'UTR:n välillä. Tuleviin tutkimuskohteisiin vaikuttaa omalta osaltaan myös yhteistyökumppaneilta saadut tulokset, jotka pyritään validoimaan biologisessa systeemissä. Koska viraaliset miRNA:t voivat vaikuttaa isäntäsolun lisäksi myös viruksen omien geenien ilmentymiseen, olisi myös mielenkiintoista tietää, hyödyntääkö KSHV miRNA:itaan omien geeniensä ilmentymisen säätelijöinä.

Lisäksi aivan uudenlaisen tutkimusmahdollisuuden tarjoavat myös KSHV:n infektoimat B-solut, jotka ovat tässä tutkielmassa jätetty kokonaan tutkimuksen ulkopuolelle. Luonnollisesti olisi mielenkiintoista tutkia tilannetta myös B-soluissa ja mahdollisuuksien mukaan verrata tilannetta näiden kahden erilaisen solutyypin välillä.

On myös todennäköistä, että miRNA:t toimivat yhteistyössä latentissa elinkierron vaiheessa ilmentyvien virusproteiinien kanssa. Tämäkin solumalli tarjoaa tulevaisuudessa erinomaisen lähtökohdan tutkia, mikä on miRNA:iden todellinen osuus KSHV:n patogeneesissä.

6 Lähdeluettelo

- Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 431: 350 – 355.
- Aylon, Y. and Oren, M. 2007. Living with p53, dying of p53. *Cell*. 130: 597 – 600.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*. 116: 281 – 297.
- Blenkiron, C. and E.A. Miska. 2007. miRNAs in cancer: approaches. aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet*. 16: 106 – 113.
- Butel, J.S. 2000. Viral carcinogenesis: Revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis*. 21/3: 405 – 426.
- Calin, G.A et al. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 104: 8017 – 8022.
- Dykxhoorn, D.M. 2007. MicroRNAs in viral replication and pathogenesis. *DNA Cell Biol*. 26/4: 239 – 249.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C. and Graham, J.B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Nat Acad Sci*. 80/12: 3734 – 3737.
- Freedman, D.A., Wu, L. and Levine, A.J. 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life Sci*. 55: 96 – 107.
- Fuster, J.J., Sanz-Gonzalez, S.M., Moll, U.M. and Andres, V. 2007. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol. Med*. 13: 192 – 199.
- Gartel, A.L. and Radhakrishnan, S.K. 2005. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*. 65: 3980 – 3985.
- Gottwein, E., Mukherjee, N., Sachse, C., Frenzel, C., Majoros, W.H., Chi, J.T., Braich, R., Manoharan, M., Soutchek, J., Ohler, U. and Cullen, B.R. 2007. A Viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature*. 450: 1096 – 1099.
- He, L., X. He, L.P. Lim et al. 2007. A microRNA component of the p53 tumor suppressor network. *Nature*. 447: 1130 – 1134.
- Iscovich, J., P. Boffetta, S. Franceschi, E. Azizi and R. Sarid. 2000. Classic Kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer*. 88(3): 500 – 517.
- Johnson, S.M. et al. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 120: 635 – 647.
- Kent, O.A and J.T. Mendell. 2006. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*. 25: 6188 – 6196.
- Kim, V.N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 6: 376 – 385.
- Kliche, S., W. Nagel, E. Kremmer, C. Atzler, A. Ege, T. Knorr, U. Koszinowski, W. Kolanus and J. Haas. 2001. Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1. *Mol Cell*. 7: 833 - 843
- Koscianska, E. et al. 2007. Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs. *BMC Mol Biol*. 8:79.

- Kumar, M.S., S.J. Erkeland, R.E. Pester, C.Y. Chen, M.S. Ebert, P.A. Sharp and T. Jacks. 2008. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 105: 3903 – 3908.
- Kurki, S., K. Peltonen, L. Latonen, T.M. Kiviharju, P.M. Ojala, D. Meek and M. Laiho. 2004. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*. 5/5: 465 – 475.
- le Sage, C., R. Nagel, D.A. Egan, M. Schrier, E. Mesman, A. Mangiola, C. Anile, G. Maira, N. Mercatelli, S.A. Ciafre, M.G. Farace and R. Agami. 2007. Regulation of the p27^{Kip1} tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*. 26: 3699 – 3708.
- Lee, Y., K. Jeon, J.T. Lee, S. Kim and V.N. Kim. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 21: 4663 – 4670.
- Lim, L.P., N.C. Lau, P. Garrett-Engele, G.A. Grimson, J.M. Schelter, J. Castle et al. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433: 769 – 773.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg and U. Kutay. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 303: 95 – 98.
- Malumbres, M. and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 30/11: 630 – 640.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl. 2004. Human argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 15: 185 – 197.
- Michael, D. & Oren, M. 2003. The p53–MDM2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol*. 13: 49 – 58.
- Miska, E.A. 2005. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev.* 15: 563 – 568.
- Moore, P.S. and Y. Chang. 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Microbiol*. 57: 609 – 639.
- Nevins, J. 2001. Cell transformation by viruses. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 245 – 275.
- Ota, A., H. Tagawa, S. Karnan, S. Tsuzuki, A. Karpas, S. Kira, Y. Yoshida and M. Seto. 2004. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*. 64: 3087 – 3095.
- Pearce, M., S. Matsumura and A.C. Wilson. 2005. Transcripts encoding K12, v-FLIP, v-cyclin and the microRNA cluster of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus originate from a common promoter. *J Virol*. 79: 14457 – 14464.
- Pfeffer, S. and O. Voinnet. 2006. Viruses, microRNAs and cancer. *Oncogene*. 25: 6211 – 6219.
- Pfeffer, S., A. Sewer, M. Lagos-Quintana, R. Sheridan, C.Sander, F.A. Grässer, L.F. van Dyk, C. Kiong Ho, S. Shuman, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, G. Randall, B.D. Lindenbach, C.M. Rice, V. Simon, D.D. Ho, M. Zavolan and T. Tuschl. 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*. 2/4: 269 – 276.
- Raver-Shapira, N., E. Marciano, E. Meiri et al. 2007. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 26: 731 – 743.

- Russo, J.J., R.A. Bohenzky, M.C. Chien, J. Chen, M. Yan, et al. 1996. Nucleotide sequence of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 14862 – 67.
- Samols, M.A., R.L. Skalsky, A.M. Maldonado, A. Riva, M.C. Lopez, H.V. Baker and R. Renne. 2007. Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs. *PLoS Pathog*. 3/5.
- Sarid, R., O. Flore, R.A. Bohenzky, Y. Chang, and P.S. Moore. 1998. Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J. Virol*. 72: 1005 – 12.
- Skalsky, R.L., M.A. Samols, K.B. Plaisance, I.W. Boss, A. Riva, M.C. Lopez, H.V. Baker and R. Renne. 2007. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol*. 81/23.
- Vassilev, L.T, Vu, B.T, Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Konq, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N. and Liu, E.A. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 303: 844 – 848.
- Vasudevan, S., Tonq, Y. and Steitz, J.A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 318: 1931 – 1934.
- Voorhoeve, P.M. et al. 2006. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell cultures. *Cell*. 124: 1169 – 1181.
- Weinberg, R.A. 2007. *The Biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 796 pp.
- Xia, T., A. O'Hara, I. Araujo, J. Barreto, E. Carvalho, J.B. Sapucaia, J.C. Ramos, E. Luz, C. Pedroso, M. Manrique, N.L. Toomey, C. Brites, D.P. Dittmer and W.J. Harrington, Jr. 2008. EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by EBV-mir-BHRF1-3. *Cancer Res*. 68/5: 1436 – 1442.
- Yi, R., Y. Qin, I.G. Macara and B.R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 17: 3011 – 3016.