



Turun yliopisto
University of Turku

**CAMP:N SÄÄTELEMÄ FOSFOPROTEIINI 19
TOIMINTA AKUUTISSA MYELOOISESSA
LEUKEMIASSA**

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Biokemian laitos
Biokemian tutkinto-ohjelma
Joulukuu 2019

Taru Varila

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

TURUN YLIOPISTO

Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta

Biokemian laitos

VARILA, TARU: cAMP:n säätelemä fosfoproteiini 19 toiminta akuutissa myelooisessa leukemiassa

Pro gradu -tutkielma, 51 s., 1 liites.

Joulukuu 2019

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

Akuutti myeloinen leukemia (AML) on aggressiivinen veri- ja luuydinsyöpä. AML jaetaan useisiin alaryhmiin syöpäsolujen ilmiäsun, erilaistumisasteen ja sytogenetiikan mukaan. Todellinen tämänhetkinen hoidollinen haaste AML:n taudinkuvassa on taudin uusiutuminen eli relapsi standardihoitojen jälkeen. Proteiinifosfataasi 2A (PP2A) on kasvunestäjäproteiini, jonka toiminnan estämisen on osoitettu olevan yksi syöpäsolujen syntymisen edellytyksistä. PP2A:n esto syöpäsoluissa tapahtuu useimmiten erityisten PP2A:n aktiivisuutta estävien inhibiittoriproteiinien toimesta. Yksi näistä on cAMP:n säätelemä fosfoproteiini 19 (ARPP19), ja sen on erityisesti osoitettu edistävän solujakautumista eli mitoosia. Aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että diagnoosivaiheen korkeampi ARPP19 ilmentymistaso ennustaa AML-potilaan taudin uusiutumista. Tästä jatkona, erikoistyössäni pyrin selvittämään ARPP19 molekyyliä toimintaa leukemiasoluissa.

Tutkimuksessa käytettiin neljää keskenään ilmiäsun, erilaistumisasteen ja sytogenetiikan mukaan mahdollisimman erilaista AML-solulinjaa. ARPP19 ilmentymisen solulinjoissa estettiin lentivirus transduktoiduilla shRNA:illa sekä Nucleofector™ teknologian avulla siirrostetuilla siRNA:illa. Western blottauksella todennettiin AML-solulinjojen ARPP19 hiljentymisen ja sen vaikutukset muiden proteiinien ilmentymistasoihin. ARPP19 hiljennetyt solulinjat aineenvaihdunnallista aktiivisuutta seurattiin luminesenssiin perustuvalla CellTiter-Glo® -menetelmällä, jota käytettiin myös tutkittaessa AML-solulinjojen vastetta PP2A:n reaktivaattori molekyyliin (SMAPs) ja Greatwall kinaasi inhibiittori 1 (GKI-1), sekä kahdeksaan, anagrelidini, tretinoiini, tacrolimus, abirateroni, lenalidomidi, dasatinibi, selumetinibi ja XAV-939, muuhun lääkeaineeseen.

Tehdyissä tutkimuksissa todettiin ARPP19 vaikuttavan AML-solulinjojen elinkykyisyyteen. Kun ARPP19 toimintaa tarkasteltiin proteiinitasolla, havaittiin ARPP19 vaikuttavan c-MYC:n, CIP2A:n ja Greatwall-kinaasin toimintaan, mikä pystyttiin näkemään sekä ARPP19 akuutisti, että pitkäaikaisesti poistetuista solulinjoista. Lisäksi joissakin tapauksissa ARPP19 havaittiin vaikuttavan Cdk1-kinaasin toimintaan. ARPP19 proteiinin toiminnan merkitystä AML-soluissa pystyttiin lopulta tarkentamaan, kun ARPP19 ilmentymistason osoitettiin vaikuttavan AML:n solujen lääkeaineeseen dasatinibiä kohtaan. Solulinjat, joiden ARPP19-proteiinitason ilmentyminen oli korkea, olivat vastustuskykyisiä annettavalle lääkeaineelle.

Asiasanat: ARPP19, AML, relapsi, PP2A ja mitoosi

SISÄLLYS

LYHENTEET	3
I KIRJALLISUUSKATSAUS	4
1 SYÖVÄN SYNTY	4
1.1 Verisyöpä	4
1.1.1 Hematopoiesi	5
1.2 Verisyövän luokittelu	5
1.2.1 AML:n alaluokat	6
2 AKUUTTI MYELOOINEN LEUKEMIA	8
2.1 AML tänään	9
2.1.1 Riskiluokitusjärjestelmä	10
2.1.2 Diagnostiikka	11
2.1.3 Hoitokeinot	12
2.2 AML:n patogeneesi	14
2.2.1 Klonaalinen evoluutio	15
2.2.2 Taudin uusiutuminen	15
2.2.3 ARPP19 ja leukemian kantasolut	17
2.3 Lasten ja aikuisten AML	18
3 PP2A ja ARPP19	20
3.1 PP2A:n rakenne	20
3.1.1 PP2A-B55 ilmentyminen	22
3.2 PP2A:n toiminnan säätely	22
3.2.1 Post-translacionaaliset muutokset	22
3.2.2 Endogeeniset inhibiittorit	23
3.2.3 ARPP19 toiminta mitoosissa	24
3.3 PP2A syövän synnyssä	25
3.3.1 ARPP19 ja syöpä	26
3.4 PP2A kohdennettu hoito	26
II KOKEELLINEN OSA	28
4 TYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	28
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	29
5.1 AML-solulinjojen soluviljely	29
5.2 Proteiininäytteiden valmistus, SDS-PAGE ja western blot	29
5.3 RNA:n eristys, cDNA:n synteesi ja RQ-PCR	30
5.4 Solujen elinkelpoisuuden määrittäminen	31
5.5 siARPP19 transfektiot	31

5.6 Lentivirus-shARPP19 transduktiot	31
5.7 GKI-1 -lääkeainetestaus	32
5.8 SMAPs -lääkeainetestaus	32
5.9 Kahdeksan lääkeaineen seulonta.....	33
5.10 Tilastollinen analytiikka.....	33
6 TULOKSET	34
6.1 ARPP19 ilmentyminen AML-solulinjoissa	34
6.2 ARPP19 vaikutus solujen endogeenisiin proteiineihin	34
6.2.1 siARPP19 transfektoidut AML-solulinjan solut	34
6.2.2 shARPP19 transduktoidut AML-solulinjan solut	36
6.3 Lääkeainevaste AML-solulinjoissa.....	37
6.3.1 GKI-1 vaste	37
6.3.2 SMAPs vaste	38
6.3.3 Lääkeaineseulonta	39
7 TULOSTEN TARKASTELO	40
8 POHDINTA	43
LÄHTEET.....	44
LIITTEET	52

LYHENTEET

AML	Akuutti myeloinen leukemia
ARPP19	cAMP:n säätelemä fosfoproteiini 19
cAMP	Syklinen adenosinimonofosfaatti
Cdk1	Sykliini riippuvainen kinaasi 1
cDNA	Komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo
CIP2A	PP2A:n pahanlaatuinen inhibiittori
DMSO	Dimetyylisulfoksidi
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
dPCR	Digitaalinen polymeraasiketjureaktio
FAB	ranskalais-amerikkalais-englantilainen –luokitusjärjestelmä
FISH	Fluoresenssi <i>in situ</i> –hybridisatio
FBS	Naudan sikiön seerumi
GAPDH	Glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi
GKI-1	Greatwall kinaasi inhibiittori I
Gwl	Proteiinikinaasi Greatwall
HSC	Hematopoieettinen kantasolu
LCMT	Leusiini-karboksyli-metyylitransferaasi
MDS	Myelodysplastinen oireyhtymä
MPN	Myeloproliferoiva neoplasma
MRD	Jäännöstauti
mRNA	Lähetti-RNA
NGS	Seuraavan sukupolven sekvensointi
OS	Yleinen selviytyminen
PKB tai AKT	Proteiinikinaasi B
PME-1	PP2A:n metyyliesteri 1
PP1	Proteiinifosfataasi 1
PP2A	Proteiinifosfataasi 2A
PVDF	Polyvinyylididifluoridimembraani
RFS	Relapsi vapaa selviytyminen
RNA	Ribonukleiinihappo
RQ-PCR	Kvantitatiivinen reaaliaikainen polymeraasiketjureaktio
SDS-PAGE	Natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesi
siRNA	Pienet vaikuttavat RNA:t
shRNA	Lyhyet hairpin RNA:t
SMAP	Pieni PP2A aktivoiva molekyyli
Transduktio	Geneettisen materiaalin siirtäminen eläinsoluun viruksilla
Transfektio	Geneettisen materiaalin siirtäminen eläinsoluun
TRM	Hoitoon liittyvä kuolleisuus
WHO	Maailman terveysjärjestö

I KIRJALLISUUSKATSAUS

1 SYÖVÄN SYNTY

Syöpä on heterogeenisten sairauksien joukko, joiden luonne ja ilmentyminen voivat poiketa toisistaan merkittävästi. Se saa alkunsa, kun elimistön solut alkavat jakautumaan hallitsemattomasti muodostaen kasvaimia, jotka voivat olla hyvänlaatuisia tai pahanlaatuisia (maligneja). Pahanlaatuiset kasvaimet jatkavat kasvuaan, ja voivat levitä paikallisen kasvaimen lisäksi etäpesäkkeinä (metastaaseina) ympäröivään kudokseen ja muihin elimiin veri- tai imusuonien kautta. (WHO 2019.)

Syöpäsolujen hallitsematon kasvu saa yleensä alkunsa, kun onkogeeneissä, jotka ohjaavat solujen normaalia kasvua tai kasvunrajoitegeeneissä (tuumorisuppressorigeeneissä), jotka hidastavat epänormaalia solujen kasvua, tapahtuu DNA:n sekvenssiin tai DNA:n epigeneettiseen säätelyyn kohdistuvia muutoksia (Golemis ja muut 2018). Muutoksia vie eteenpäin solunsisäisten tekijöiden, kuten DNA:n virheellisen replikoitumisen ja DNA:n korjaussysteemien virheellisen toiminnan, lisäksi solun ulkoiset (karsinogeeniset) tekijät, kuten säteily, tupakan sisältämät haitalliset aineet, kuten nikotiinin johdokset, kemialliset yhdisteet, kuten bentseeni, fenoli ja asbesti (Greinert ja muut 2015; Huang ja Chen 2011; Andreotti 2017). Lisäksi tiedetään joidenkin mikrobien, kuten kohdunkaulan syövässä papilloomaviruksen ja mahalaukun syövässä helikobakteerin, lisäävän syöpään sairastumisen riskiä (Li ja Xu 2017; Noto ja Peek 2017).

Onkogeeneissä tai kasvunrajoitegeeneissä tapahtuneiden muutosten lisäksi syöpäsoluissa tapahtuu täydentäviä syöpää ajavia muutoksia, minkä johdosta solut poistuvat normaalin kasvun säätelyn, ohjelmoidun solukuoleman ja immuunipuolustusjärjestelmän valvonnan piiristä (Golemis ja muut 2018). Lisäksi pahanlaatuiset kasvaimet lisäävät kasvuaan muokkaamalla uudelleen mikroympäristöään saamalla esimerkiksi elimistön lisäämään kasvaimen ympäristöön uusia verisuonia (Zuazo-Gaztelu 2018).

1.1 Verisyöpä

Verisyöpä eli leukemia on verisolujen syöpäsairaus, jossa ei muodostu kiinteää kasvainta. Leukemiassa pahanlaatuiseksi muuntuneet verisolujen esiasteet jakautuvat hallitsemattomasti luuytimessä, mistä ne voivat kulkeutua myös verenkiertoon ja sen

kautta muihin elimiin, kuten imusolmukkeisiin ja pernaan. Lopulta syöpäsolut syrjäyttävät luuytimessä ja verenkierrossa normaalit verisolut, estäen normaaleja elintoimintoja, mikä lopulta johtaa verenvuotoon, anemiaan ja toistuviin tartuntatauteihin. (Siegel ja muut 2016.)

1.1.1 Hematopoieesi

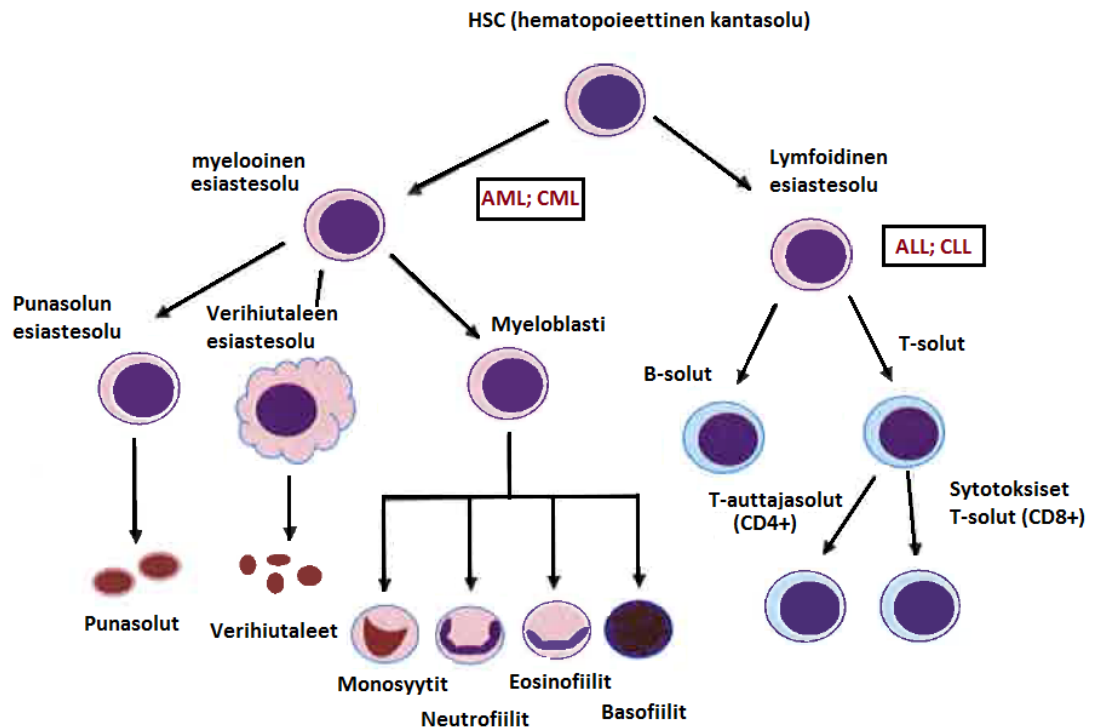
Leukemia saa alkunsa, kun normaali hematopoieesi häiriintyy ja hematopoieettiset esiastesolut eivät erilaistu kunnolla verisolueiksi (Siegel ja muut 2016). Hematopoieesissä kaikki verisolut kehittyvät pluripotenttisistä hematopoieettisistä kantasoluista (engl. *hematopoietic stem cells*, HSCs) epäsymmetrisessä solujakautumisessa, mitä tapahtuu aikuisilla ainoastaan tietyillä luuytimen alueilla, pääkallossa, selkänikamassa, lantiossa ja rintalastassa. Hematopoieettiset esiastesolut erilaistuvat hormonien ja sytokiinien ohjauksessa joko myelooisen linjan soluiksi, granulocyteiksi, makrofaageiksi, punasoluiksi tai verihiutaleiksi tai lymfoidisen linjan soluiksi, T- tai B-soluiksi (kuva 1). (Hoffbrand & Moss 2015.)

1.2 Verisyövän luokittelu

Leukemia voidaan jakaa kahteen ryhmään, akuuttiin ja krooniseen, sen perusteella, kuinka nopeasti sairaus kehittyy. Akuutit leukemiat etenevät nopeasti, mikä on seurausta siitä, että ne kehittyvät yleensä kypsyttömistä varhaisvaiheen esiastesoluista, jotka eivät kykene suorittamaan normaaleja verisolujen toimintoja. Tämän vuoksi akuutti leukemia voi hoitamattomana johtaa kuolemaan muutamassa viikossa. Krooninen leukemia sen sijaan etenee huomattavasti paljon hitaammin. Krooninen leukemia saa alkunsa yleensä kehittyneemmistä verisolueista, jotka kykenevät edelleen suorittamaan verisolujen normaaleja toimintoja. (Zhao ja muut 2018.)

Lisäksi leukemia voidaan erottaa kahteen ryhmään, myelooiseen ja lymfaattiseen, sen perusteella kummasta solunkehityksen linjasta syöpäsolun kehitys on lähtöisin. Näin leukemia voidaan jakaa karkeasti neljään pääluokkaan, akuuttiin myelooiseen leukemiaan (engl. *acute myeloid leukemia*, AML), krooniseen myelooiseen leukemiaan (engl. *chronic myeloid leukemia*, CML), akuuttiin lymfaattiseen leukemiaan (engl. *acute lymphoblastic leukemia*, ALL) ja krooniseen lymfaattiseen leukemiaan (engl. *chronic*

lymphoblastic leukemia, CLL) (kuva 1). Näiden kahden jaottelutyypin lisäksi leukemiat voidaan erottaa esimerkiksi lasten ja aikuisten leukemioiksi. (Zhao ja muut 2018.)



Kuva 1. Verisolujen kehittyminen hematopoiesissä. Hematopoieettiset esiastesolut voivat erilaistua joko myelooisen tai lymfoidisen linjan soluiksi. Leukemian päätyypit voidaan erottaa näiden kehityslinjojen mukaisesti myelooiseen tai lymfaattiseen leukemiaan. (Kuusanmäki 2018.)

1.2.1 AML:n alaluokat

AML voidaan edelleen jakaa kahdeksaan alaluokkaan, M0-M7, sen perusteella, mistä esiastevaiheen solusta leukemia on saanut alkunsa (kuva 2). Ranskalais-amerikkalais-englantilaisessa (engl. *French-American-British*, FAB) -luokitusjärjestelmässä M0- ja M1-alaluokkaan kuuluvat syöpäsolut ovat kehittyneet hyvin varhaisen vaiheen myelooisen linjan esiastesoluista. M4- ja M5-alaluokkaan kuuluvat ovat kehittyneet myelomonosyyteistä tai monosyyteistä. M6-alaluokkaan kuuluvat leukemiasolut ovat saaneet alkunsa kypsymättömistä punasolujen esiastesoluista ja M7-alaluokan leukemiasolut verihiutaleiden esiastesoluista, megakaryoblasteista. Maailman terveysjärjestön (engl. *world health organization*, WHO) luoma luokittelujärjestelmä täydentää FAB-luokitusjärjestelmää ottamalla huomioon merkittävimpiä AML:ssä esiintyviä sytogeneettisiä poikkeavuuksia ja mutaatioita. (Arber ja muut 2016; Bennett ja

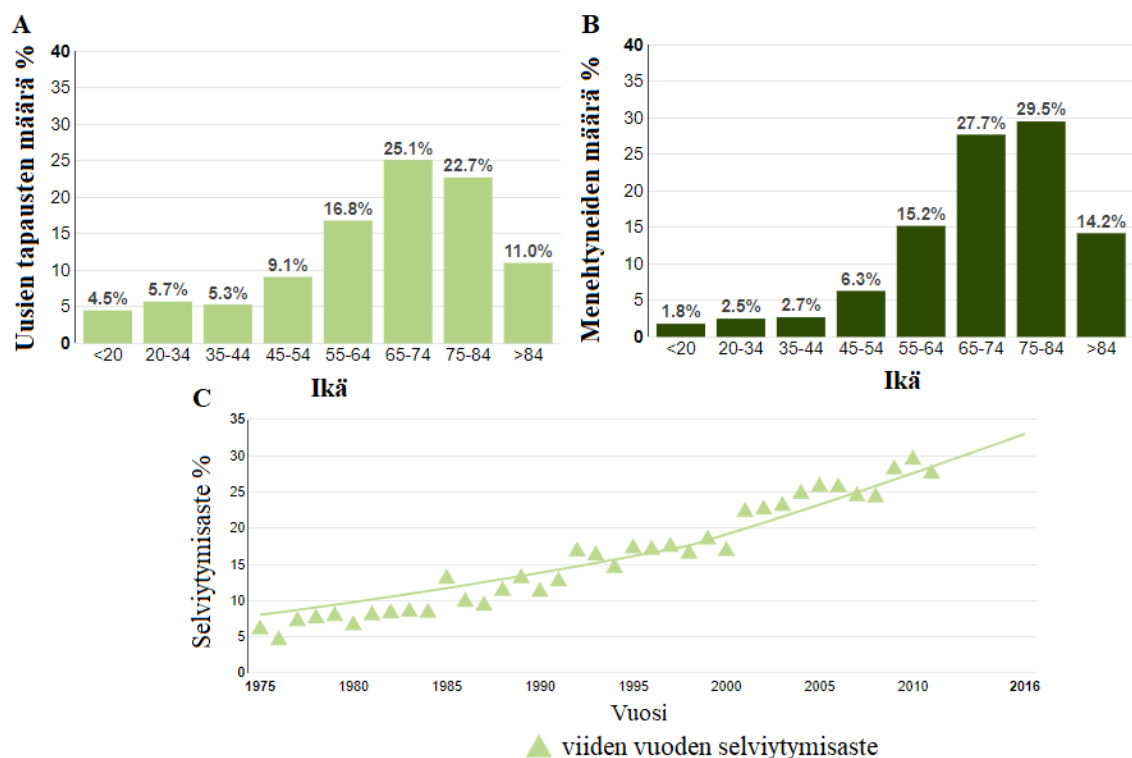
muut 1991.) Kumpaakin luokitusjärjestelmää päivitetään ja tarkennetaan uusien tutkimustulosten pohjalta säännöllisin väliajoin.

FAB-luokitusjärjestelmä		WHO:n luokitusjärjestelmä		
Luokka	Alaluokan nimi		Inversio ja/tai translokaatio	Geeni
M0	Erilaistumaton myeloblastinen leukemia	AML:ssä toistuvasti esiintyvät geneettiset poikkeavuudet		
M1	myeloblastinen leukemia kypsymättömillä verisoluilla	AML	t(8;21)(q22;q22.1)	<i>RUNX1-RUNX1T1</i>
M2	myeloblastinen leukemia kypsillä verisoluilla	AML	inv(16)(p13.1;q22) tai t(16;16)(p13.1;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>
M3	promyeloosyyttinen leukemia (APL)	APL	t(15;17)	<i>PML-RARA</i>
M4	myelomonosyyttinen leukemia	AML	t(9;11)(p21.2;q23.3)	<i>MLLT3-KMT2A</i>
M4 eos	myeloosyyttinen leukemia eosinophilian kanssa	AML	t(6;9)(p23;q34.1)	<i>DEK-NUP214</i>
M5	monosyytti leukemia	AML	inv(3)(q21.3;q26.2) tai t(3;3)(q21.3;q26.2)	<i>GATA2, MECOM</i>
M6	erytroidinen leukemia	AML (megakaryoplastinen)	t(1;22)(p13.3;q13.3)	<i>RBM15-MKL1</i>
M7	megakaryoblastinen leukemia	AML		mutatoitunut <i>NPM1</i>
		AML		Bialleelliset mutaatiot <i>CEBPA</i>
		Myelodysplasiaan liittyvät muutokset		
		Terapiaan liittyvät myeloidit neoplasmat		
		Myeloinen sarkooma		
		Myeloinen kehittyminen, joka liittyy Downin syndroomaan		
		Blastisten plasmasytoosi dendriittisten solujen neoplasma		
		Ambiguous linjan akuutti leukemia		
		Akuutti erilaistumaton leukemia		
	Sekoittunut fenotyyppi (MPAL)		t(9;22)(q34.1;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>
	MPAL		t(v;11q23.3)	<i>KMT2A</i> uudelleenjärjestäytynyt
	MPAL, B/myeloinen, NOS			
	MPAL, T/myeloinen, NOS			

Kuva 2. AML jaetaan alaluokkiin A) FAB-luokitusjärjestelmän ja B) WHO:n luokitusjärjestelmän avulla (Arber ja muut 2016).

2 AKUUTTI MYELOOINEN LEUKEMIA

On arvioitu, että vuonna 2019 Yhdysvalloissa ilmenee noin 21 000 uutta AML-tapausta, mikä on 1,2 % kaikista ilmentyneistä syövistä. Lisäksi arvellaan noin 11 000 henkilön menehtyvän tautiin, mikä on 1,8 % kaikista syöpään menehtyneistä. Yhdysvalloissa aikuisten AML-diagnoosin saaneista viiden vuoden (engl. *overall survival*, OS) jälkeen vain 28 % on elossa (SEER 18 2009-2015), kun lapsilla vastaava luku on 76 % (Rasche ja muut 2018). Kehitystä OS:n suhteen on kuitenkin tapahtunut, sillä vuodesta 1975 lähtien viiden vuoden OS on saatu nousemaan alle 10 %:sta yli 25 %:iin vuoteen 2011 mennessä (kuva 3) (SEER 9 1975-2011). (SEER Statistics 2019.)



Kuva 3. AML:n statistisia tietoja. A) Eri ikäluokissa esiintyvien uusien AML-tapausten määrä prosentteina. B) Eri ikäluokissa menehtyneiden AML-tapausten määrä prosentteina. C) Viiden vuoden selviytymisasteen kehitys vuodesta 1975 vuoteen 2011. (SEER Statistics 2019.)

AML on vanhempien ihmisten sairaus, mikä diagnosoidaan useimmin 65-74 -vuotiailla (SEER 21 2012-2016). Kuolleisuus on myös suurinta yli 65 vuotta täyttäneillä potilailla (kuva 3) (SEER 21 2012-2016), mikä johtuu siitä, ettei vanhemmat potilaat usein sovellu intensiiviseen kemoterapiaan. (SEER Statistics 2019.) Vanhempia potilaita hoidetaan hypometyloivilla aineilla, mitkä eivät yleensä johda parantumiseen, ja vain 5-15 % potilaista, jotka ovat yli 60-vuotiaita, parantuvat (Rowe ja Tallman 2010).

Potilaista, jotka ovat alle 60 vuotiaita, 85 % saavuttaa taudinelpymisvaiheen eli remission. Kuitenkin näistä potilaista vain 35-40 % parantuu täysin, ja muilla potilailla tauti uusiutuu eli relapoituu 18 kuukauden sisällä (Petersdorf ja muut 2013). Allogeenisen kantasolusiirron avulla tällaisten potilaiden pitkäaikaisempaa selviytymistä voidaan lisätä. Kuitenkin potilaista, jotka hoidetaan allogeenisella kantasolusiirrolla, 50 %:lla tauti uusiutuu. Jos potilaan tauti uusiutuu allogeenisen kantasolusiirron jälkeen, on potilaan ennuste erittäin huono, ja kahden vuoden jälkeen elossa on 20 %. (Rautenberg ja muut 2019.) Todellinen tämänhetkinen hoidollinen haaste AML:n taudinkuvassa onkin taudin uusiutuminen standardihoitojen jälkeen.

2.1 AML tänään

Potilaan merkittävin selviytymisennusteeseen vaikuttava tekijä on kasvanut ikä. Ikä vaikuttaa potilaan yleiseen terveydentilaan ja sairauksien yhteisesiintymiseen, siten heikentäen potilaan kestävyttä hoitoa kohtaan. Ikä ei kuitenkaan saa olla hoitoa pois sulkeva tekijä, sillä potilaan ennusteeseen vaikuttavat myös muut tekijät. Potilaan selviytymisennusteeseen vaikuttaa esimerkiksi merkittävästi myös aikaisemmin sairastettu myelodysplastinen oireyhtymä (engl. *myelodysplastic syndrome*, MDS) ja krooninen myelomonosyyttinen leukemia sekä, myeloproliferoiva neoplasma (engl. *myeloproliferative neoplasm*, MPN) ja *de novo* AML. Lisäksi aikaisemmin saatu sytotoksinen hoito ja potilaan sairastama jäännöstauti (engl. *minimal residual disease*, MRD) lisäävät hoitoon liittyvää resistenssiä ja kuolleisuutta. (Döhner ja muut 2017; Döhner ja muut 2010.)

Toinen merkittävä potilaan selviytymisennusteeseen vaikuttava tekijä on AML-kloonissa esiintyvä geneettinen poikkeavuus, mikä selittää kaksikolmasosaa potilaalle annettavasta ennusteesta (Döhner ja muut 2017). AML-sairauteen vaikuttavat ennustavat tekijät voidaankin jakaa kahteen ryhmään. Ensimmäiseen ryhmään kuuluvat sellaiset ominaisuudet, mitkä liittyvät potilaan ominaisuuksiin, kuten potilaan yleiseen terveyden tilaan ja aikaisemmin sairastettuihin tauteihin. Toiseen ryhmään kuuluvat sellaiset ominaisuudet, mitkä liittyvät AML-kloonin ominaisuuksiin ja molekulaariseen genetiikkaan. Ensimmäiseen ryhmään kuuluvat tekijät ennustavat yleensä hoitoon liittyvää kuolleisuutta (engl. *treatment-related mortality*, TRM), kun taas toiseen

ryhmään kuuluvat tekijät, ennustavat yleensä AML-taudin resistanssia perinteistä hoitoa kohtaan. (Döhner ja muut 2010.)

2.1.1 Riskiluokitusjärjestelmä

Potilaan selviytymisennusteeseen vaikuttavista AML-kloonissa esiintyvistä geneettisistä poikkeavuuksista on luotu geneettinen riskiluokitusjärjestelmä, mikä on jaettu kolmeen ryhmään, pienen riskin, keskiriskin ja suuren riskin (kuva 4) (Döhner ja muut 2017). Riskiluokitusjärjestelmässä on pyritty ottamaan huomioon eri tekijöiden asiayhteys riippuvaisuus, sillä lopullinen ennuste muodostuu tietyn poikkeavuuden ja toisen poikkeavuuden tai vaikuttavan tekijän läsnä- tai poissaolosta (Papaemmanuil ja muut 2016). Yksinkertainen esimerkki tällaisesta ennusteeseen vaikuttavasta asiayhteydestä liittyy geenien väliseen vuorovaikutukseen, jossa hyvän ennusteen saavassa tilanteessa potilaalla ilmenee *NPM1*-mutaatio ilman *FLT3*-ITD -mutaatiota (ryhmä I) ja huonon ennusteen saavassa tilanteessa, missä potilaalla ilmenee sekä *ASXL1*- että *RUNX1*-mutaatio (ryhmä III) (Döhner ja muut 2017).

Pieni riski (ryhmä I)	
Karyotyypipoikkeavuudet	Ilmentyvät mutaatiot
t(8;21)(q22;q22.1) [RUNX1-RUNX1T1]	NPM1 ilman FLT3-IDT
inv16(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22) [CBFB-MYH11]	Kaksoismutatoitunut CEBPA ilman FLT3-IDT
Keskiriski (ryhmä II)	
Karyotyypipoikkeavuudet	Ilmentyvät mutaatiot
t(9;11)(p21.3;q23.3) [MLL2-KMT2A]	Korkean alleelikuorman FLT3-IDT ja NPMI
Muut ryhmään I ja II kuulumattomat poikkeavuudet	Matalan alleelikuorman FLT3-IDT ilman NPMI
	Normaali karyotyyppi ilman FLT3-IDT ja NPMI
Suuri riski (ryhmä III)	
Karyotyypipoikkeavuudet	Ilmentyvät mutaatiot
t(6;9)(p23;q34.1) [DEK-NUP214]	Korkean alleelikuorman FLT3-IDT ilman NPMI
t(v;11q23.3) [KMT2A lukuunottamatta muutosta t(9;11)]	RUNX1 (ei pienen riskin muutoksiin yhdistettynä)
t(9;22)(q34.1;q11.2) [BCR-ABL1]	ASXL1 (ei pienen riskin muutoksiin yhdistettynä)
inv(3)(q21.3;q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2) [GATA2, EVI1]	TP53 (kompleksisen tai monosomaalisen karyotyypin kanssa)
;-5, 5q-, -7, -17/poikkeava 17p	
Samaan aikaan kolme tai useampi poikkeavuus	
monosomaalinen karyotyyppi	

Kuva 4. AML:n geneettisessä riskiluokituksessa otetaan huomioon sekä ilmentyvät karyotyypipoikkeavuudet että esiintyvät mutaatiot (Kytölä ja Suomen Hematologiyhdistys 2018).

2.1.2 Diagnostiikka

AML:n diagnostiikassa tehtävien tutkimusten avulla pyritään selvittämään potilaan AML-kloonin ilmiäsu, karyotyypin poikkeavuudet ja kloonissa ilmentyvät mutaatiot. Lisäksi pyritään tunnistamaan jäännöstitä ennustavat markkerit. Näiden tutkimusten avulla potilaan sairaus luokitellaan ja asetetaan geneettisen riskiluokitusjärjestelmän riskiryhmään. (Arber ja muut 2016.)

AML diagnosoidaan ensisijaisesti veri- ja luuydinaspiraationäytteistä. Ensimmäisenä diagnoosissa lähdetään tutkimaan verenkuvaa, minkä tarkoituksena on saada ensimmäinen vihje leukemiasta. Leukemiaa aletaan epäilemään, kun verinäytteestä pystytään laskemaan vähintään 200 valkosolua ja luuydinaspiraationäytteestä 500 tumallista solua. Näiden lisäksi veressä ilmentyvien kypsyttömien verisolujen määrä tulee olla yli 20 %. Jos verokuva antaa viitettä leukemiasta, lähdetään selvittämään, mistä verisolusta sairaus on saanut alkunsa. Solut tunnistetaan immunohistokemiallisessa ja virtausytometrisessä tutkimuksessa, missä markkereiden avulla leukemiasolujen pinnalla tai sytoplasmassa olevat antigeenit tunnistetaan (kuva 5). (Döhner 2017.)

AML:n diagnosointi markkerit	
Esiastesolut	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Granulosyytti	CD65, sytoplasminen MPO
Monosyytti	CD14, CD36, CD64
Megakaryosyytti	CD41, CD61
Punasolu	CD235A, CD36

Kuva 5. AML:n immunohistokemiallisessa ja virtausytometrisessä tutkimuksessa käytettäviä markkereita (Döhner 2017).

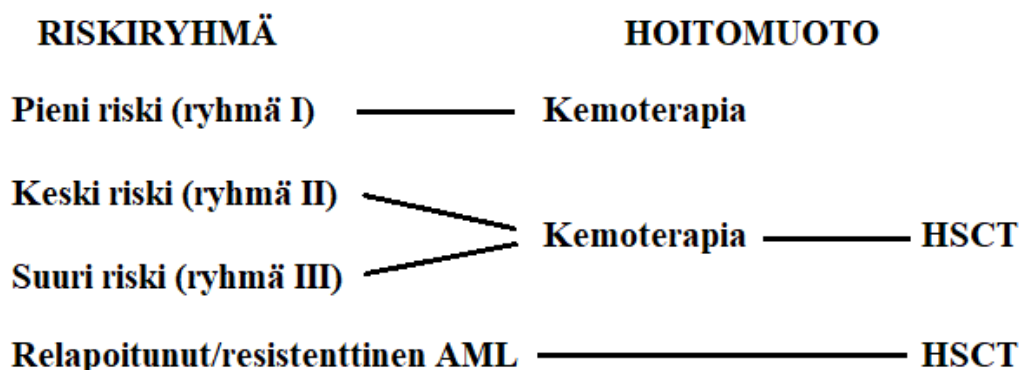
Kun AML-kloonin ilmiäsu on saatu selville, lähdetään selvittämään verisolujen kromosomeissa tapahtuneita muutoksia, muun muassa niiden lukumäärää, kokoa, muotoa ja uudelleenjärjestäytymisiä. Sytogeneettisiä muutoksia tarkastellaan mikroskoopin avulla. Apuna voidaan käyttää myös fluoresenssi *in situ* -hybridisaatiota (engl. *Fluorescence in situ hybridization*, FISH), millä voidaan tunnistaa geenin uudelleenjärjestäytymisiä, kuten *RUNX1-RUNX1T1* ja *KMT2A* tai kromosomipuutoksia, kuten 5q ja 7q. (Döhner 2017.) Sytogeneettisten tutkimusten jälkeen selvitetään AML-kloonissa ilmentyvät mutaatiot polymeraasiketjureaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), Sanger sekvensoinnin ja/tai seuraavan sukupolven sekvensoinnin (engl. *next-generation sequencing*, NGS) avulla (Shumilov ja muut 2018). Tutkimuksissa tulisi

selvittää ainakin *NPML*-, *CEBPA*- ja *RUNX1*-mutaatiot, *FLT3*-mutaatiot ja mutaatiot *TP53*- ja *ASXL1*-geeneissä (Döhner 2017).

Vaikka AML:n molekulaarista toimintaa on opittu ymmärtämään viimeisten vuosikymmenten aikana paljon, vielä ei täysin pystytä ennustamaan, koska potilaan AML-sairaus uusiutuu. Tämän vuoksi tulisi löytää ja kehittää uusia AML:n jäännöstautimarkkereita, minkä avulla voitaisiin jo potilaan sairauden diagnosointivaiheessa arvioida paremmin taudin uusiutumisen todennäköisyyttä. Uusien jäännöstautia ennustavien markkereiden lisäksi tulisi kehittää jäännöstautidiagnostiikassa käytettäviä teknologioita, joiden avulla voitaisiin havaita aikaisemmin taudin eteneminen. Grimwade ja muut (2016) ehdottavatkin, että potilaan täydellisen remission diagnosoimiseksi käytettäisiin nykyisten menetelmien lisäksi herkempiä menetelmiä, kuten digitaalista polymeerasiketjureaktiota (engl. *digital polymerase chain reaction*, dPCR), minkä avulla taudin uusiutumisen todennäköisyys voitaisiin saada selville.

2.1.3 Hoitokeinot

Kun potilaan AML-sairaus on diagnoosin perusteella tunnistettu ja asetettu riskiluokitusjärjestelmän riskiryhmään (katso sivu 10, 2.1.1 Riskiluokitusjärjestelmä), valitaan potilaalle AML:n standardihoidon mukainen hoitopolku (kuva 6), mitä tarkennetaan säännöllisin väliajoin tehtävien tutkimusten avulla. AML:n standardihoito jakautuu kahteen hoitomuotoon, intensiiviseen kemoterapiaan ja allogeeniseen kantasolusiirtoon (engl. *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) (Döhner ja muut 2017).



Kuva 6. Potilaalle valitaan hoitopolku riskiluokitusjärjestelmän suositusten mukaisesti.

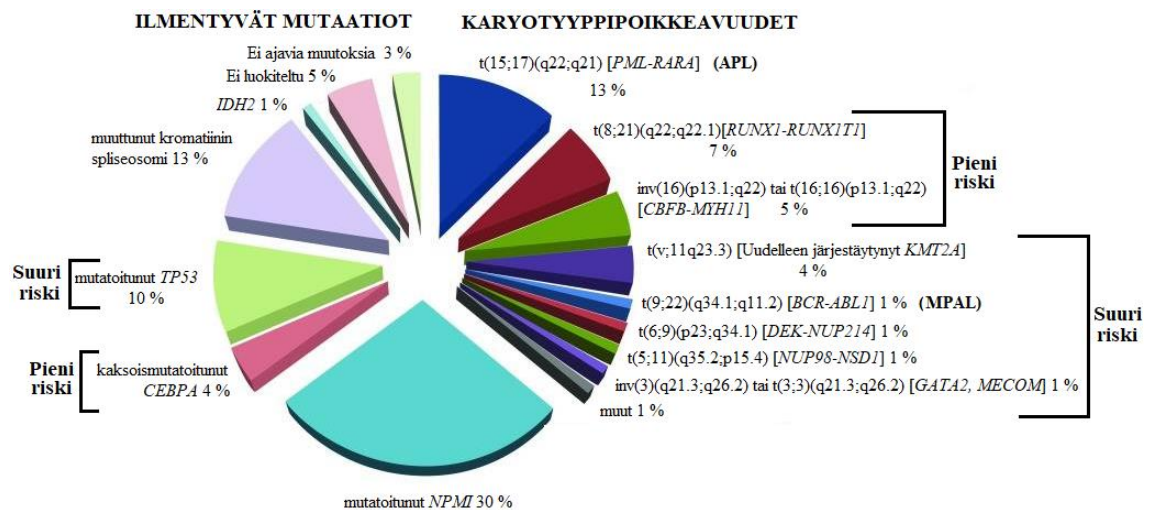
Kemoterapia voidaan jakaa induktio- ja konsolidaatiohoitoihin, mitkä valitaan potilaalle ELN-riskiluokituksessa osoitettujen suositusten mukaisesti. Induktiohoidolla potilas pyritään saamaan täydelliseen remissioon (engl. *complete remission*, CR) (luuytimessä olevien kypsyttömien verisolujen määrä <5 %), mikä koostuu kolmen päivän antrasykliini-hoidosta (idarubisiini tai daunorubisiini) ja seitsemän päivän sytarabiini-hoidosta. (Döhner ja muut 2010; Döhner ja muut 2017.) Remissio saavutetaan noin 80 %:lla AML-potilaista, joista noin 25 %:a tarvitsee toisen induktiohoidon remissioon pääsemiseksi (Dombret ja Gardin 2016). Kun potilaat saavuttavat täydellisen remission, etenevät he konsolidaatiohoitoihin eli taudin elpymisvaiheen ylläpitohoitoihin (Döhner ja muut 2015).

Allogeeninen kantasolusiirto on toinen AML:n hoidossa käytettävä intensiivinen hoitomuoto, mihin potilas siirtyy vasta, kun sairaus on saatu remissioon (Rautenberg ja muut 2019). Jos potilaalle suunnitellaan allogeenista kantasolujen siirtoa, pyritään hoitoon siirtymään mahdollisimman nopeasti jo yhden tai kahden konsolidaatiohoitajakson jälkeen (Döhner ja muut 2017). Allogeenista kantasolusiirtoa käytetään keskiriskin ja suuren riskin ryhmään kuuluvien potilaiden standardihoitona sekä pelastushoitona niille potilaille, joiden AML-sairaus on uusiutunut tai, joiden sairaus on vastustuskykyinen annettavalle hoidolle (Rautenberg ja muut 2019).

Allogeeninen kantasolujen siirtohoito voidaan jakaa esihoittoon ja kantasolujen siirtohoitoon. Esihoitona käytetään solunsalpaajia ja mahdollisesti sädehoitoa. Esihoidon avulla pyritään vähentämään potilaan tautimassaa ja lamaanuttamaan potilaan immuunipuolustusjärjestelmä. Tämän jälkeen voidaan verensiirron tapaan infusoida luovuttajalta kerätty kantasolusiirre potilaalle. Allogeeniseen kantasolujen siirtoon liittyy kuitenkin riskejä. Koska potilaan immuunipuolustusjärjestelmä on lamaanutettu, on potilaan infektioalttius suuri ennen kuin veriarvot korjaantuvat. Infektioalttiuden lisäksi hoidon aikana voi esiintyä vaikeita komplikaatioita, kuten kantasolusiirteestä aiheutuvat käännteishyljintäreaktiot ja siirron jälkeen esiintyvät virusinfektiot. Veritaudin uusiutuminen on myös mahdollista. (Turun yliopistollinen keskussairaala 2019.)

2.2 AML:n patogeneesi

AML on hyvin heterogeeninen sairaus, mikä on seurausta perimässä tapahtuvista sytogeneettisistä ja geneettisistä muutoksista. Nykyisin tunnetaan monia AML:ssä vaikuttavia sytogeneettisiä poikkeavuuksia, mitkä liittyvät esimerkiksi kromosomin alueiden kääntymään tai siirtymään ja geenien mutaatioita, mitkä johtavat taudin etenemiseen. Nämä yleisimmät karyotyypipoikkeavuudet ja geneeissä ilmentyvät mutaatiot on jaettu eri luokkiin, mihin myös WHO:n AML:n luokittelujärjestelmä perustuu (katso sivu 6, 1.2.1 AML:n alaluokat) (kuva 7). (Grimwade ja muut 2016.) Lisäksi biologiset luokat voidaan jakaa ennustettavuudellisesti erilaisiin ryhmiin (katso sivu 10, 2.1.1 Riskiluokitusjärjestelmä).



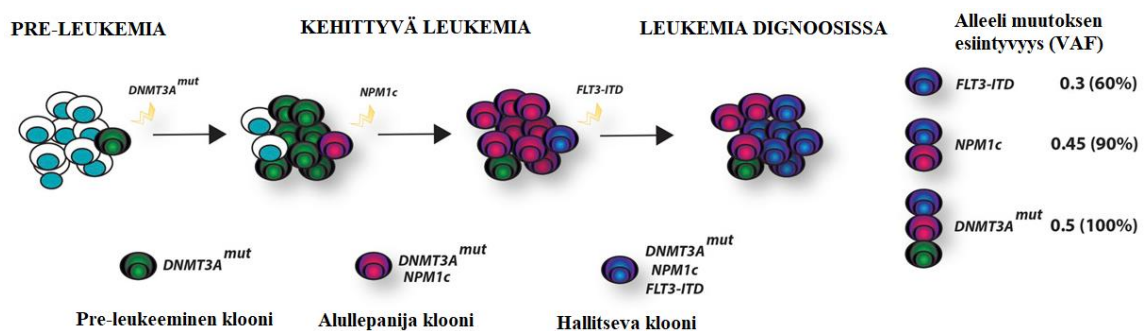
Kuva 7. AML:n taudinkuvassa yleisimmin esiintyvät karyotyypipoikkeavuudet ja mutaatiot (ikävuoteen ~65 asti). Esiintyvät muutokset voidaan jakaa erilaisiin taudin ennusteluokkiin. (Shiba ja muut 2016; Grimwade ja muut 2016, muokattu.)

Tautia ilmentävät yleensä sellaiset sytogeneettiset muutokset, mitkä johtavat sellaisten geenien mutaatioihin, mitkä koodaavat hematopoeesin transkriptiofaktoreita, kuten *RARA* (APL), *RUNX1* ja *CBFB*, epigeneettisiä säätelijöitä, kuten *KTM2A* ja *NSD1* tai tuman huokosen komponentteja, kuten *NUP214* ja *NUP98*. Nykyisin tunnetaan myös sellaisia tautia ilmentäviä mutaatioita, kuten *NPM1* ja kaksoismutatoitunut *CEBPA* (engl. *biallelically mutated CEBPA*, biCEBPA), mitkä esiintyvät normaalin karyotyypin kanssa. Näiden lisäksi on tunnistettu monia muita geneeissä tapahtuneita muutoksia, mitkä on yhdistetty sekä normaaliin että muuttuneeseen karyotyypiin. Karkeasti jaoteltuna sekä karyotyypipoikkeavuudet, että *NPM1*- ja biCEBPA-geeneissä tapahtuneet mutaatiot selittävät molemmat yhden kolmasosan esiintyvistä sairauksista. Loppuosa selittyy mutatoituneella *TP53*:lla, mikä liittyy kompleksiseen karyotyypiin, ja kromatiinin

spliseosomin muodostumiseen osallistuvissa geneeissä tapahtuneilla mutaatioilla sekä muilla tunnistamattomilla mutaatioilla. (Grimwade ja muut 2016.)

2.2.1 Klonaalinen evoluutio

AML:n heterogeenisuus ilmenee myös yksilötasolla, mikä on seurausta potilaan AML-kloonissa tapahtuvasta asteittaisesta evoluutiosta. Asteittaisessa evoluutiosta AML-kloonin alulle saaneen muutoksen rinnalle ilmestyvät uudet muutokset kehittävät lopulta esileukeemisesta solusta syöpäsolun. Syöpäsoluista muodostunut primäärisyöpä koostuu aina siten useammasta erilaisesta kloonista, esileukeemisesta hallitsevaan klooniiin. Tämä primäärisyövässä tapahtunut asteittainen evoluutio on mahdollista jäljittää selvittämällä primaarisyövälle alleeli muutoksen esiintyvyyttä –arvot (engl. *variant allele frequency*, VAF), missä selvitetään kunkin tarkasteltavan geenin alleelien ilmentyminen primäärisyövän genomissa (kuva 8). (Grimwade ja muut 2016.)



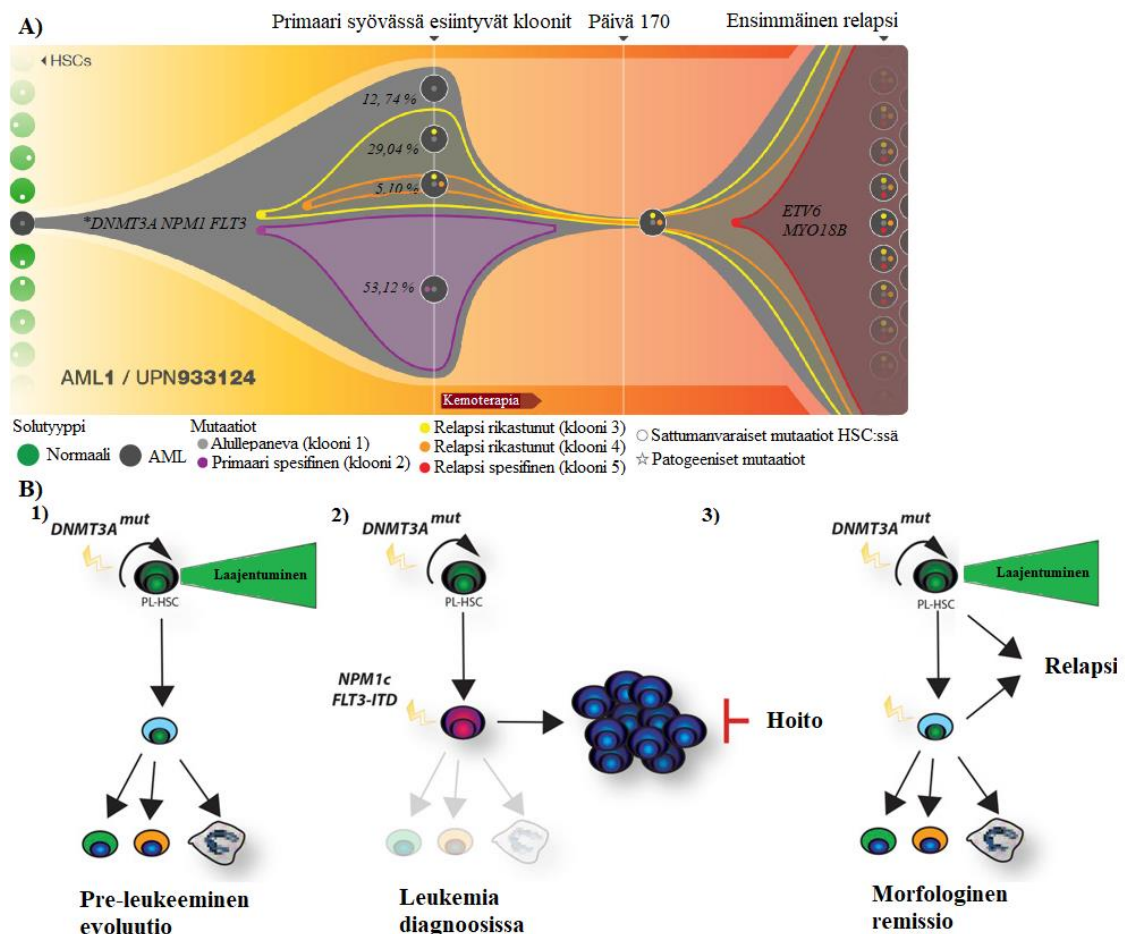
Kuva 8. AML-kloonin asteittainen kehittyminen esileukeemisesta solusta syöpäsoluksi. Hypoteettisen AML-potilaan sairaus on saanut alkunsa *DNMT3A*:n mutatoitumisesta, minkä jälkeen kloonissa on tapahtunut sekä *NPM1c*- että *FLT3-IDT* –geenin mutatoituminen. Lopulta näissä geneeissä tapahtuneet mutaatiot ovat johtaneet taudin kehittymiseen. (Grimwade ja muut 2016.)

2.2.2 Taudin uusiutuminen

AML-taudin uusiutuminen saa alkunsa primäärisyövässä olevista kemoterapialle resistenttisistä syöpäsoluista, mitkä alkavat jakautumaan ja muodostamaan uutta kloonikantaa kemoterapian jälkeen. Yhden näkemyksen mukaan AML-solujen kyky vastustaa kemoterapiaa on seurausta kemoterapian aikana AML-kloonissa tapahtuvasta asteittaisesta evoluutiosta (kuva 9). Kuitenkin vallitsevan ajatuksen mukaan primäärisyövässä esiintyy valmiiksi sellainen alaklooni, mikä sisältää valtaosan niistä

mutaatioista, mitkä mahdollistavat kloonikannan selviytymisen kemoterapiasta. (Ding ja muut 2012.) Tätä ajatusta tukee myös löydökset kantasolujen kaltaisista syöpäsoluista.

Yhä enemmän on todisteita siitä, että kemoterapialle resistentit syöpäsolut olisivat kantasolujen kaltaisia. Tällaisten kantasolujen kaltaisten syöpäsolujen on havaittu kantavan sellaisia yksittäisiä geenimutaatioita, kuten *DNMT3A* ja *ASXL1*, mitkä mahdollistavat niiden selviytymisen kemoterapiasta. Kemoterapian jälkeen näitä mutaatioita ilmentävillä syöpäsoluilla on kyky jakautua ja muodostaa uusi syöpäsolupopulaatio, mikä johtaa AML:n taudin uusiutumiseen (kuva 9). (Grimwade ja muut 2016.)



Kuva 9. Kemoterapian aikana AML-kloonissa tapahtuva asteittainen evoluutio johtaa taudin uusiutumiseen. A) Esimerkkitapauksen (UPN933124) AML-kloonissa tapahtunut asteittainen evoluutio johti taudin alulle saaneen kloonin mutaatioiden, *DNMT3A*, *NPM1* ja *FLT3*, täydentymiseen kemoterapian jälkeen uusilla mutaatioilla, *ETV6* ja *MYO18B*, mikä johti uuden syöpäpopulaation muodostumiseen (Ding ja muut 2012). B) Kantasolujen kaltaisissa syöpäsoluissa esiintyvät tietyt mutaatiot, *DNMT3A* ja *ASXL1*, mahdollistavat syöpäsolujen jakautumisen ja laajentumisen, minkä aikana syöpäsoluissa

alkaa esiintyä täydentäviä mutaatioita *NPM1c*- ja *FLT3*-ITD-geeneissä. Kemoterapialla kyetään tuhoamaan täydentäviä mutaatioita ilmentävät syöpäsolut, muttei sellaisia syöpäsoluja, mitkä sisältävät syövän alkuun saaneita mutaatioita. Tällaiset syöpäsolut jatkavat jakautumistaan ja laajentumistaan kemoterapian jälkeen muodostaen uusia AML-klooneja. (Grimwade ja muut 2016.)

2.2.3 ARPP19 ja leukemian kantasolut

Yhä enemmän on todisteita siitä, että cAMP:n säätelemä fosfoproteiini 19 (engl. *cAMP regulated phosphoprotein 19*, ARPP19) osallistuu kantasolujen kaltaisten solujen toiminnan säätelyyn. Jo 1990-luvulla tehdyssä tutkimuksessa (Girault ja muut 1990) todettiin ARPP19 osallistuvan sellaisten solujen toiminnan säätelyyn, mitkä eivät olleet täysin erilaistuneita tai olivat kasvun kehitys- ja jakautumisvaiheessa. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin ARPP19 ilmentyvän hyvin korkealla tasolla embryonaalisissa kudoksissa, ja erilaistumisen edetessä ARPP19 tason laskevan progressiivisesti hyvin matalalle tasolle. Tutkimuksessa havaitut tulokset viittaavat ARPP19 kantasoluluonteeseen.

Myöhemmin ajatus sai vahvistusta, kun ARPP19 yhteys erilaistumattomien kantasolujen kaltaisten solujen toimintaan pystyttiin todistamaan. Tutkimuksessa (Bruchova-Votavova ja muut 2010) ARPP19 toiminnan alentuminen miR-451:n toimintaa lisäämällä johti punasolujen kehittymiseen ja erilaistumiseen. Sitten on julkaistu kaksi artikkelia (Eppert ja muut 2011; Vitali ja muut 2015), joissa todennettiin ARPP19 ilmentyminen hematopoieettisissa ja leukeemisissa kantasoluissa. Lisäksi 110-yksilön AML-kohortissa tehdyssä tutkimuksessa todettiin ARPP19 olevan yksi niistä kolmesta geenistä, mikä ennustaa potilaan huonoa ennustetta (Eppert ja muut 2011).

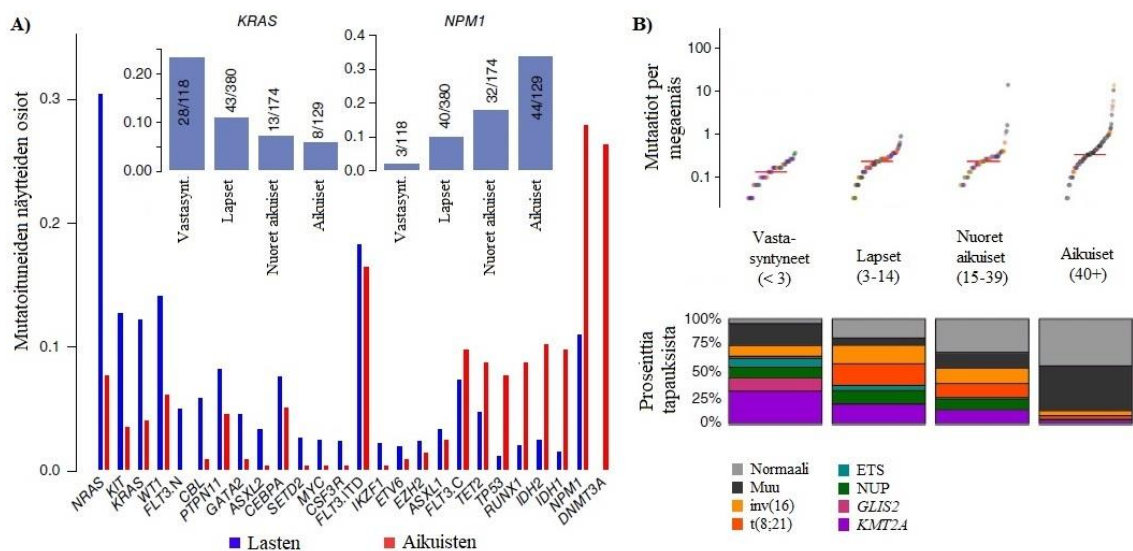
Kuitenkaan ennen Mäkelän ja muiden (2019) tekemää tutkimusta ei ollut todennettu ARPP19 itsenäistä, muista geeneistä riippumatonta, roolia AML:ssä. Tutkimuksessa tunnistettiin ARPP19 korkeasti ilmentävien AML-solujen olevan FAB-luokitusjärjestelmän M1-alatyypin soluja, jotka ovat kehittyneet hyvin varhaisen vaiheen myeloosien linjan esiastesoluista. Tämän lisäksi tutkimuksessa havaittiin ARPP19 mRNA:n ilmentymisen tason ennustavan, tuleeko potilaan tauti uusiutumaan perinteisen lääkehoidon jälkeen. Heidän tutkimuksessaan esitettiin ajatus, että korkea ARPP19

ilmentyminen diagnosoivaiheen AML-soluissa viittaa terapialle resistentin kantasolupopulaation olemassa oloon. (Mäkelä ja muut 2019.)

2.3 Lasten ja aikuisten AML

Viimeisten neljän vuosikymmenen aikana on opittu ymmärtämään enemmän AML:n geneettisiä syitä, mikä on johtanut siihen, että lasten ja aikuisten selviytymismahdollisuudet taudista ovat paremmat (Grimwade ja Mrózek 2011). Lasten ja aikuisten AML tulisi kuitenkin hoitaa kohdennetusti, koska eri-ikäisten potilaiden AML-sairaudet eroavat toisistaan merkittävästi, esimerkiksi mutaatioituneiden geenien ja rakenteellisten muutosten osalta (Bolouri ja muut 2018).

Aikaisemmin on ajateltu sytogeneettisten poikkeavuuksien olevan yksi merkittävimmistä ennustetekijöistä sekä lasten että aikuisten AML:ssä (Grimwade ja muut 2010). Ne ovat kuitenkin paljon yleisempiä lasten kuin aikuisten AML:ssä (Bolouri ja muut 2018). Lasten ja nuorten AML:ssä sytogeneettiset poikkeavuudet johtuvat useimmiten kromosomien fuusiogeenien siirtymistä tai kääntymistä, mikä ei ole asianlaita aikuisten sairauksissa (Ostronoff ja muut 2014). Kuvassa 10 on havainnollistettu lasten ja aikuisten AML:n eroavaisuuksia.



Kuva 10. Lasten ja aikuisten AML:n eroavaisuudet. A) Iästä riippuvaisten mutaatioiden vaihtelut AML:ssä. *FLT3*-mutaatiot on jaoteltu kolmeen kategoriaan: ITD (*FLT3.ITD*), aktivointi silmukka (*FLT3.C*) ja lapsuusspesifiset muutokset (*FLT3.N*). Lisäksi kohdassa on osoitettu geenien, *KRAS* ja *NPM1*, mutaatioiden merkittävyys eri ikäryhmissä. B) Vallitsevien mutaatioiden riippuvaisuus potilaan iästä. Ylempässä osiossa osoitetaan

lasten ja aikuisten AML:n aiheutuvan vähäisestä määrästä mutaatiota. Alemmasta osiosta havaitaan, että lasten AML sisältää enemmän sytogeneettisiä poikkeavuuksia kuin aikuisten AML (väritunnukset löytyvät kohdan B alaosasta). (Bolouri ja muut 2018.)

AML:ssä tapahtuu verrattain vähän mutaatioita muihin syöpiin nähden (Bolouri ja muut 2018). On arvioitu, että AML-potilaat kantavat keskimuotoisesti 13 mutaatiota, mikä on vähemmän kuin useimmissa muissa aikuisten syövässä (Vogelstein ja muut 2013). Kuitenkin on tunnistettu sellaisia geneeissä tapahtuneita muutoksia, jotka ovat merkittävässä asemassa AML:n kehityksessä, kuten lasten ja nuorten aikuisten taudeissa *MBNL1*-, *ZEB2*- ja *ELF1*-geneeissä ja aikuisten taudeissa *DNMT3A*- ja *TP53*-geneeissä tapahtuneet mutaatiot (Bolouri ja muut 2018). Lisäksi genomilajuisen tutkimuksen ansiosta tunnetaan nykyisin sellaisia mutaatioita, jotka sekä aikuisilla, *DNMT3A* (Ley ja muut 2010), että lapsilla, *NUP98/NSD1* ja *FLT3/ITD* oleva yhteisilmeneminen (Ostronoff ja muut 2014), vaikuttavat merkittävästi potilaan ennusteeseen. Aikuisten sairauteen on löydetty uusia mahdollisia terapian kohteeksi sopivia mutaatioita genomien laajuisissa tutkimuksissa (Cancer Genome Atlas Research Network 2013; Papaemmanuil ja muut 2016), mutta niiden merkittävyys lasten taudissa on epäselvä, koska monet yleisimmät mutaatiot aikuisilla ovat merkityksettömämpiä lasten taudissa (Ho ja muut 2011). Tässä Pro Gradu –tutkielmassa on keskitytty aikuisten AML:n sairauksien tutkimiseen ja saatujen tulosten merkittävyyttä ei olla lasten taudeissa tarkastettu.

3 PP2A ja ARPP19

Proteiinifosfataasi 2A (engl. *protein phosphatase 2A*, PP2A) on soluissa toimiva seriini-/treoniinifosfataasi, mikä osallistuu reversiibelin fosforylaation säätelyyn. Reversiibelissä fosforylaatiossa kinaasit lisäävät adensiinitrifosfaatilta saamansa fosfaattiryhmän kohdeproteiinin seriini-, treoniini- tai tyrosiini-aminohappoon (Sharma 2014) ja vastaavasti fosfataasit poistavat fosfaattiryhmän kohdeproteiiniltaan (Hunter 2012). PP2A suorittaa yhdessä proteiinifosfataasi 1:n kanssa yli 90 % soluissa tapahtuvasta seriinin ja treoniinin defosforylaatiosta (Eichhorn ja muut 2009). PP2A osallistuuikin toimintoillaan monien reversiibelin fosforylaation kautta säädelyjen signaalinvälitysketjujen ilmentämiseen osallistuen siten muun muassa jokaisen solusyklin vaiheen säätelyyn (Wlodarchak ja Xing 2016).

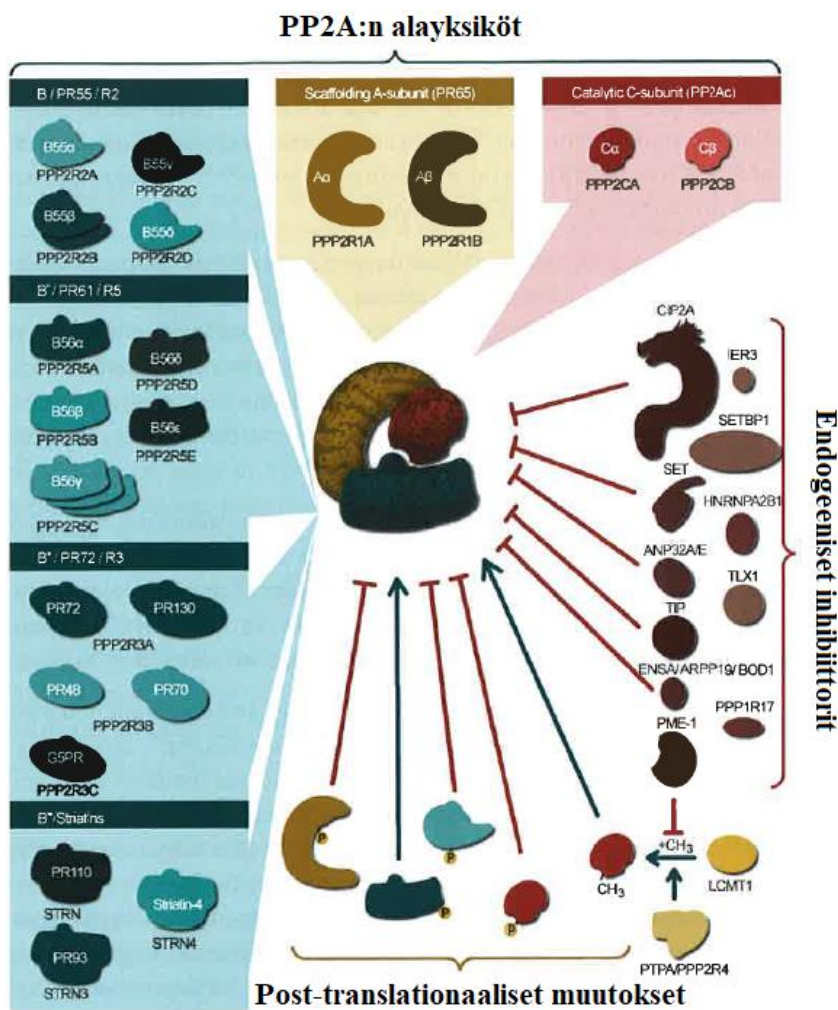
ARPP19 on tunnistettu estävän mitoosissa PP2A:n toimintaa (Gharbi-Ayachi ja muut 2010). ARPP19 on syklisen adensiinimonofosfaatin (engl. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) säätelemä fosfoproteiini. Syklinen AMP toimii toisiolähtettinä signaalinvälitysketjussa, missä solun ulkopuolinen signaalimolekyylä (esimerkiksi adrenaliini) johtaa muun muassa proteiinikinaasi A:n aktivoitumiseen ja kohdeproteiinin fosforyloitumiseen (Nelson ja Cox 2013). ARPP19 on tunnistettu proteiinikinaasi A:n substraatiksi, ja sitä ilmenee eniten ihmisen aivoissa (NCBI 2019; Mochida ja muut 2010; Dulubova ja muut 2001; Girault ja muut 1990). Hiirillä ja rotilla tehdyissä tutkimuksissa on todettu ARPP19 toiminnan olevan aktiivisinta embryogeneesin alkuvaiheessa, ja laskevan solujen erilaistumisen edetessä (Hached ja muut 2019; Girault ja muut 1990). PP2A:n ja ARPP19 toiminnan häiriintymisen on todettu olevan osallisena sairauksien, kuten syövän ja Alzheimerin taudin, muodostumisessa (Meeusen ja Janssens 2018; Nicholls ja muut 2016; Jiang ja muut 2016; Song ja muut 2015; Kim ja muut 2001).

3.1 PP2A:n rakenne

PP2A:n rakenne koostuu kolmesta alayksiköstä, mitkä muodostavat heterotrimeerisen holoentsyymin (kuva 11). Holoentsyymin ydin rakentuu kahdesta alayksiköstä, rakenteellisesta 65 kDa:n kokoisesta A-alayksiköstä (PP2Aa/PR65) ja katalyyttisestä 36 kDa:n kokoisesta C-alayksiköstä (PP2Ac). Molemmat alayksiköt ilmentävät kahta erilaista isoformimuotoa (PPP2R1 α/β ja PPP2C α/β), mitkä ovat

aminohapposekvensseiltään hyvin samankaltaisia A-alayksiköiden ollessa 87 %:sti ja C-alayksiköiden ollessa 97 %:sti samankaltaisia. (Kiely & Kiely 2015.)

Toiminnallinen holoentsyymi muodostuu, kun entsyymiin ytimeen sitoutuu PP2A:n toimintaa säätelevä B-alayksikkö. B-alayksiköistä ilmenee useita rakenteeltaan erilaisia alayksiköitä, mikä on seurausta alayksiköitä ilmentävistä viidestätoista geenistä ja niiden ilmentymisen yhteydessä tapahtuvasta vaihtoehoisesta silmukoinnista. B-alayksiköt jaetaan neljään erilaiseen perheeseen, B (B55/PR55/PPP2R2), B' (B56/PR61/PPP2R5), B'' (B72/PR72/PPP2R3) ja B''' (Striatiniitit) (kuva 11). (Kiely & Kiely 2015.)



Kuva 11. Heterotrimeerinen PP2A-holoentsyymi rakentuu kolmesta, A, C ja B, alayksiköstä. PP2A:n toimintaa voidaan säädellä post-translacionaalisten muutosten ja endogeenisten inhibiittorien avulla (katso sivu 22, 3.2 PP2A:n toiminnan säätely). (Kauko 2017.)

3.1.1 PP2A-B55 ilmentyminen

PP2A:n B-alayksiköiden ilmentyminen on soluelin ja kudostyyppi riippuvaista, mikä osaltaan vaikuttaa PP2A:n substraatin spesifisyyteen ja sen toimintaan kudoksissa. Jopa B-alayksiköiden perheen sisälle kuuluvien alayksiköiden ilmentyminen erilaisissa kudoksissa ja elimissä on yleistä. B-perheeseen kuuluvia B55 α - ja B55 δ -alayksiköitä ilmennetään solujen sytoplasmassa ja useissa erilaisissa kudoksissa, kun taas B55 β - ja B55 γ -alayksiköitä ilmennetään voimakkaasti vain aivoissa. (Kiely & Kiely 2015.) B55 β -alayksiköistä β 1:stä ilmennetään pääasiassa solujen solulimassa, kun taas β 2:sta ilmennetään mitokondrioissa (Kiely & Kiely 2015; Dagda ja muut 2003).

3.2 PP2A:n toiminnan säätely

PP2A:n toimintaan vaikuttavien B-alayksiköiden ilmentyminen erilaisissa kudoksissa ja soluelimissä jo itsessään säätelee PP2A:n toimintaa. Kuitenkin PP2A:n toimintaa ohjataan myös toisten proteiinien toimesta, mitkä vaikuttavat PP2A:n toimintaan aiheuttamalla sen alayksiköihin post-translacionaalaisia muutoksia tai vuorovaikuttamalla holoentsyymin rakenteen kanssa.

3.2.1 Post-translacionaaliset muutokset

Post-translacionaaliset muutokset ovat proteiinin rakenteeseen translaation jälkeen tuotettavia muutoksia, mitkä johtavat proteiinin kolmiulotteisen rakenteen muuttumiseen. Post-translacionaalisilla muutoksilla vaikutetaan PP2A:n toiminnan aktiivisuuteen kohdistamalla muutokset useimmin entsyymin C-alayksikköön, mikä vaikuttaa B-alayksikön ja entsyymin ytimen väliseen vuorovaikutukseen (kuva 11, sivu 21). Yleisimmin muutokset kohdistuvat C-alayksikön C-terminaaliseen häntään (304-309), mikä koostuu treoniinistä, proliinista, asparagiinihaposta, tyrosiinistä, fenyylialaniinista ja leusiinista. (Sents 2013.)

C-terminaalisisessa hännässä ilmentyviä post-translacionaalisia kohtia on tunnistettu kolme, mitkä ovat treoniini (304), tyrosiini (307) ja leusiini (309). Näistä kolmesta aminohaposta treoniiniin kohdistuvalla fosforylaatiolla säädellään mahdollisesti B55-perheeseen kuuluvien alayksiköiden ja tyrosiiniin kohdistuvalla fosforylaatiolla säädellään mahdollisesti B56-perheeseen kuuluvien alayksiköiden sitoutumista PP2A-

entsyymien ytimeen. Näiden aminohappojen fosforyloituminen johtaa PP2A:n toiminnan estymiseen, kun taas leusiinin metyloityminen johtaa PP2A:n toiminnan aktivoitumiseen. (Sents 2013.)

Leusiinin reversiibelillä metylaatiolla vaikutetaan erityisesti PP2A-B55 -holoentsyymien aktiivisuuteen. Reversiibeliin metylaatioon osallistuu kaksi entsyymiä, leusiini-karboksyylimetyyli-transferaasi (engl. *leucine carboxyl methyltransferase*, LCMT), mikä lisää metyyli-ryhmän leusiiniin, ja PP2A metyyli-esteraasi 1 (engl. PP2A methyl esterase 1, PME-1), mikä vuorostaan poistaa metyyli-ryhmän leusiinista. Reversiibeli metylaatio ei kuitenkaan ole mahdollista ennen kuin PP2A:n fosfataasi aktivaattori on lisännyt C-alayksikön aktiivisuutta, mikä osaltaan säätelee PP2A:n aktiivisuutta. (Sents 2013.)

3.2.2 Endogeeniset inhibiittorit

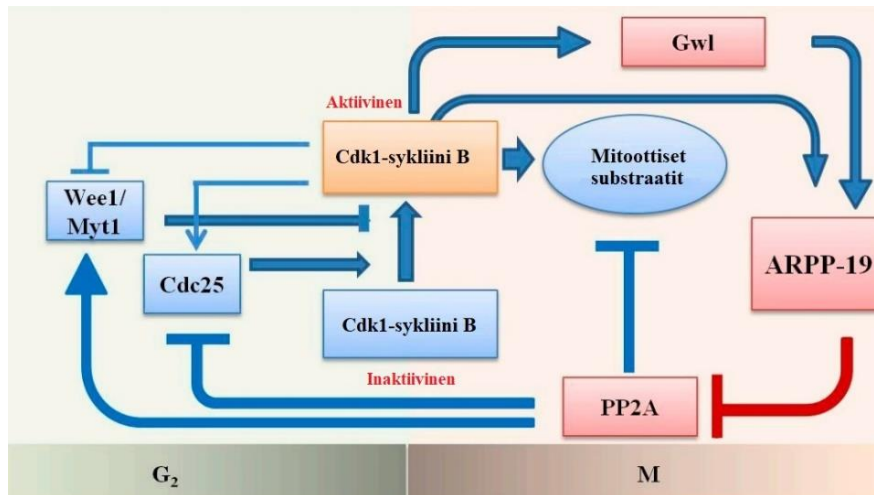
PP2A:n toimintaa voidaan säädellä myös estämällä PP2A:n toimintaa erillisissä geeneissä ilmennettyjen inhibiittoriproteiinien toimesta (kuva 11, sivu 21). Mukaan lukien ARPP-19, tähän päivään mennessä on tunnistettu yhteensä neljätoista inhibiittoria, joista tunnetuimpia ovat PP2A:n syöpään johtavan inhibiittoriproteiinin (engl. cancerous inhibitor of PP2A, CIP2A), SET ja PME-1 (taulukko 1). (Kauko ja muut 2018; Kauko 2017.) Inhibiittoriproteiinit estävät PP2A:n toimintaa hyvin erilaisilla tavoilla, SET-proteiini kiinnittymällä katalyyttiseen C-alayksikköön ja CIP2A kiinnittymällä PP2A-holoentsyymien B56-alayksikköön (Kauko ja muut 2018) ja PME-1 demetyloimalla C-alayksikköä (katso sivu 22, 3.2.1 Post-translacionaaliset muutokset).

Taulukko 1. PP2A:n endogeeniset inhibiittorit (Kauko ja Westermarck 2018, muokattu)

Inhibiittori	Inhibition tyyppi
SET/I2PP2A	Vuorovaikuttaa C-alayksikön kanssa
ANP32A/I1PP2A	
ANP32E	
PME-1	Demetyloi C-alayksikköä
CIP2A	Vuorovaikuttaa PP2A-B56 - holoentsyymien kanssa
TIP/TIPRL	Sitoutuu C-alayksikköön
ARPP19 ja ARPP16	Vuorovaikuttaa PP2A-B55 α / δ - holoentsyymien kanssa, ARPP16 vuorovaikuttaa myös B56 δ kanssa
ENSA	Vuorovaikuttaa PP2A-B55 α / δ - holoentsyymien kanssa
BOD1	Vuorovaikuttaa PP2A-B56 - holoentsyymien kanssa
TLX1	Vuorovaikuttaa C-alayksikön kanssa
PPP1R17/G-substrate	
IER3	Vuorovaikuttaa PP2A-B56 - holoentsyymien kanssa
SETBPI	Vuorovaikuttaa SET:n kanssa johtaen PP2A:n inhibitiioon
HNRNPA2B1	Vuorovaikuttaa SET:n kanssa johtaen PP2A:n inhibitiioon

3.2.3 ARPP19 toiminta mitoosissa

ARPP19 on erityisesti mitoosissa havaittu estävän PP2A:n toimintaa (Gharbi-Ayachi ja muut 2010). Vaikka ARPP19 on tunnistettu proteiinkinaasi A:n substraatiksi, mitoosissa ARPP19 toimintaa säätelee Greatwall-kinaasi. Mitoosissa greatwall-kinaasin toimintaa lisää sykliini B riippuvainen kinaasi 1:n (engl. *cyclin-dependent kinase 1 -cyclin B*, Cdk1-sykliini B). Aktivoituneena Greatwall-kinaasi kykenee fosforyloimaan ARPP19 seriini 62 -aminohapon, jolloin ARPP19 toiminta lisääntyy. Fosforyloituneena ARPP19 kykenee sitoutumaan PP2A-B55 α / δ -holoentsyymiin, mikä johtaa PP2A-B55 α / δ :n toiminnan estymiseen, ja mitoosin etenemiseen (kuva 12). (Gharbi-Ayachi ja muut 2010.)



Kuva 12. PP2A:n toiminta mitoottisen tilan säätelyssä. Solun eteneminen G₂-vaiheesta M-vaiheeseen edellyttää Cdk1-sykliini B:n aktivoitumista ja PP2A:n toiminnan estymistä. Cdk1-sykliini B:n fosforyloimien proteiinien, kuten Cdc25-fosfataasin ja Greatwall-kinaasin, aktivoituminen ja toisaalta toisten proteiinien, kuten Wee1/Myt-kinaasien, toiminnan estyminen edistää solun siirtymistä mitoosiin. Greatwall-kinaasin fosforyloima ARPP19 estää PP2A-B55 α/δ toimintaa mitoosissa. (Song ja muut 2015.)

3.3 PP2A syövän synnyssä

PP2A:n toiminnan estyminen saa aikaan ihmisen solujen muuntumisen tumorigenisiksi. Tämä voi olla seurausta joko PP2A:n geneissä tapahtuneista muutoksista, tai PP2A:n toimintaa säätelevien proteiinien toiminnan häiriöistä. (Kauko ja Westermarck 2018; Meeusen ja Janssens 2018.) Yleisimmin PP2A:n toimintaa estävät geenien mutaatiot ilmentyvät A α -alalyksikköä koodaavassa geenissä, mikä estää erityisesti PP2A-B55 - holoentsyymien muodostumista. Geneissä ilmentyvien mutaatioiden lisäksi esimerkiksi kromosomeissa tapahtuneet homo- tai heterosygoottiset poistumat voivat johtaa PP2A:n ilmentymisen vähenemiseen. Esimerkiksi AML:ssä heterosygoottinen poistuma B55 α -alalyksikköä koodaavassa geenissä estää PP2A-B55 α -holoentsyymien muodostumista, ja siten PP2A-B55 α :n toimintaa. (Meeusen ja Janssens 2018.)

Kuitenkin on havaittu, että monissa syöväissä PP2A:n toiminnan estyminen on useimmin seurausta PP2A:n toimintaa säätelevien proteiinien toiminnan häiriöistä (Kauko ja Westermarck 2018). Myös AML:ssä on havaittu PP2A:n endogeenisten inhibiittori proteiinien, kuten CIP2A:n ja SET:n, toiminnan lisääntymisen johtavan PP2A:n toiminnan vähenemiseen (Lucas ja muut 2018; Pippa ja muut 2016). Lisäksi SET-proteiiniin sitoutuvan SETBPI-proteiinin lisääntyneen toiminnan on havaittu edistävän solujen lisääntymistä ja kasvua (Lucas ja muut 2018). Näiden endogeenisten inhibiittori

proteiinien kasvaneen ilmentymisen on todettu vaikuttavan AML-taudin patogeneesiin ja potilaan ennusteeseen (Lucas ja muut 2018; Pippa ja muut 2016).

3.3.1 ARPP19 ja syöpä

ARPP19 on havaittu jo 1990-luvulla tehdyssä tutkimuksessa (Girault ja muut 1990) ilmentyvän korkealla malignanttisissa solulinjoissa. Tutkimuksessa tarkasteltiin ARPP19 ja ARPP16 ilmentymisen eroja erilaisissa kudoksissa ja syöpäsolulinjoissa, mitkä olivat histiosyyttinen lymfooma (U937), hepatooma (Hep 3B), kohdunkaulan syöpä (HeLa), melanooma (Bowes) ja rintasyöpä (MCF7). ARPP19 ilmentymisen ollessa kaikissa syöpäsolulinjoissa samankaltainen kuin normaalissa kudoksessa tai suurempi, ARPP16 ilmentymistä syöpäsoluissa ei kyetty havaitsemaan ollenkaan, mikä antaa viitteitä ARPP19 osallisuudesta syöpäsolujen toiminnassa. (Girault ja muut 1990.)

Myöhemmin havaittiinkin korkean ARPP19 ilmentymistason lisäävän kiinteissä syövässä, kuten maksasyövässä ja gliomassa, syöpäsolujen elinkykyisyyttä, ja gliomassa myös metastoitumista (Jiang ja muut 2016; Song ja muut 2015). Gliomassa sen korkea ilmentymistaso kyettiin liittämään lyhyempään relapsi vapaaseen selviytymiseen (engl. *relapse-free survival*, RFS) ja yleiseen selviytymiseen (Song ja muut 2015).

ARPP19 on tunnistettu ilmentyvän myös verisyövissä esiintyvissä leukeemissa kantasoluissa, mikä on liitetty AML:ssä potilaan huonoon ennusteeseen (Eppert ja muut 2011). Kuitenkaan tähän päivään mennessä ei olla tutkittu, miten ARPP19 toimii proteiinitasolla AML:ssä. Mäkelän ja muiden (2019) tekemässä tutkimuksessa havaittiin ARPP19 mRNA:n ilmentymistason ennustavan AML-potilaan taudin uusiutumista, mikä toimi tämän Pro Gradu –tutkielman innoittavana lähteenä. Tässä Pro Gradu –tutkielmassa tarkastellaan ARPP19 proteiinitason toimintaa AML-solulinjoissa.

3.4 PP2A kohdennettu hoito

PP2A:n toiminnan estymisen on todistettu johtavan ihmisen solun muuntumiseen tumorigeeniseksi. Tämän vuoksi yritetään kehittää sellaisia syövän hoitoon tarkoitettuja lääkkeitä, mitkä johtavat PP2A:n toiminnan aktivoitumiseen. Tällä hetkellä PP2A:n

toimintaa voidaan lisätä sellaisten lääkkeiden avulla, mitkä estävät PP2A:n endogeenisten inhibiittori proteiinien toimintaa, ja sellaisten lääkkeiden avulla, mitkä aktivoivat suoraan PP2A:n toimintaa tuottamalla PP2A:n rakenteeseen post-translacionaalisia muutoksia (Arriazu ja muut 2016; Kastrinsky ja muut 2015).

Monet niistä lääkkeistä, mitkä estävät PP2A:n endogeenisten inhibiittori proteiinien toimintaa, vaikuttavat SET:n toimintaan (Arriazu ja muut 2016). Yksi tutkituimmista tällaisista lääkkeistä on FTY720. AML:ssä FTY720:n on todettu lisäävän PP2A:n aktiivisuutta estämällä SET-proteiinin toimintaa, mikä johtaa syöpäsolujen kasvun estymiseen ja apoptoosin ilmentymiseen. Kuitenkin FTY720 toimii ainoastaan soluissa, missä SET-proteiinin ilmentyminen on korkea. (Vicente ja muut 2019.) Lisäksi joidenkin lääkeaineiden, kuten bortezomidin ja erlotinibin, on havaittu johtavan CIP2A:n toiminnan alenemiseen ja PP2A:n toiminnan lisääntymiseen. Kuitenkaan ei olla kyetty todentamaan, että näiden lääkeaineiden pääasiallinen toimintamekanismi perustuisi CIP2A:n toiminnan muuttumiseen. (O'Connor ja muut 2018.)

Endogeenisten proteiinien toimintaa estävien lääkkeiden rinnalle on kehitetty täysin uudella tavalla toimivia lääkeainemolekyylejä. Näitä molekyylejä kutsutaan PP2A:n toimintaa lisääviksi pieniksi molekyyleiksi eli SMAPs:ksi (engl. *small molecule activators of PP2A*, SMAPs). Muista lääkeaineista poiketen SMAPs sitoutuu suoraan PP2A:n A-alayksikköön johtaen A-alayksikön kolmiulotteisen rakenteen muuttumiseen ja PP2A-holoentsyymien toiminnan lisääntymiseen. (Kastrinsky ja muut 2015.) SMAPs:n on todettu muun muassa johtavan PP2A:n toiminnan lisääntymiseen tyrosiini kinaasien inhibiittoreille resistentissä keuhkosyövän soluissa, mikä johti syöpäsolujen apoptoosiin ja kasvaimen kasvun estymiseen (Tohmé ja muut 2019).

II KOKEELLINEN OSA

4 TYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Westermarckin ryhmän aikaisemmissa tutkimuksissa havaittiin, että diagnoosivaiheen korkea ARPP19 lähetti-RNA:n (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) ilmentymistaso ennusti AML-potilaan taudin uusiutumista (Mäkelä ja muut 2019). Tutkimuksessa käytettiin 80:stä AML-potilaasta eristettyä diagnoosivaiheen RNA-näytettä. Tästä jatkona, Pro gradu -tutkielmassani pyrin selvittämään ARPP19 molekyyli-tason toimintaa leukemiasoluissa proteiinitasolla.

Tutkielmani tarkoituksena oli tarkastella ARPP19 toimintaa AML-solulinjoissa molekyylibiologisia soluviljelymenetelmiä hyödyntämällä. Tutkimuksessa käytettiin neljää keskenään ilmi-asteen, erilaistumisasteen ja sytogenetiikan mukaan mahdollisimman erilaista AML-solulinjaa, jotka olivat KG-1 (ACC-14), HL-60 (ACC-3), MOLM-14 (ACC-777) ja Kasumi-1 (ACC-220).

Tutkimuksessa ARPP19 ilmentyminen AML-solulinjoissa estettiin lentivirus transduktoiduilla shRNA:lla sekä Nucleofector™ teknologian avulla siirrostetuilla siRNA:lla. Western blottauksella todennettiin AML-solulinjojen ARPP19 hiljentyminen ja sen vaikutukset muiden proteiinien ilmentymistasoihin. Tutkimuksessa hyödynnettiin kaupallista ARPP19 tunnistavaa vasta-ainetta. Solulinjojen aineenvaihdunnallista aktiivisuutta sekä AML-solulinjojen vastetta PP2A:n reaktivaattori molekyyliin (engl. *small molecule activators of PP2A*, SMAP), Greatwall kinaasi inhibiittoriin (engl. *Greatwall kinase inhibitor 1*, GKI-1) ja kahdeksaan muuhun lääkeaineeseen, anagrelidi, tretinoiini, tacrolimus, abirateroni, lenalidomidi, dasatinibi, selumetinibi ja XAV-939, seurattiin luminesenssiin perustuvalla CellTiter-Glo® -menetelmällä. Tulokset analysoitiin Pro gradu -tutkielmassa kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti yleisesti hyväksytyin käytännöin.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

5.1 AML-solulinjojen soluviljely

Tutkimuksessa käytettiin Leibniz-instituutin DSMZ mikro-organismi ja soluviljelmät – kokoelman (Braunschweig, Saksa) neljää erilaista AML-solulinjaa, jotka olivat KG-1 (ACC-14), HL-60 (ACC-3), MOLM-14 (ACC-777) ja Kasumi-1 (ACC-220). KG-1 ja HL-60 -solulinjoja kasvatettiin RPMI-1640 -mediumissa (R5886, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), johon lisättiin 10 % kuumentamalla inaktivoitua naudan sikiön seerumia (FBS, Fetal Bovine Serum) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), 50 yksikköä/ml penisiliiniä (Sigma-Aldrich), 50 mg/ml streptomysiiniä (Sigma-Aldrich) ja 2 mM L-glutamiinia (Sigma-Aldrich). MOLM-14 ja Kasumi-1 -solulinjojen kasvatuksessa käytettiin edellisestä poiketen 20 % inaktivoitua FBS:ä. Soluja viljeltiin + 37°C 5 % CO₂. Solulinjat todettiin soluviljelyyn alettua mykoplasmaasta tartuntavapaiksi.

5.2 Proteiininäytteiden valmistus, SDS-PAGE ja western blot

AML-solunäytteet hajotettiin RIPA-puskurilla (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 % (w/v) superoksididismutaasi (SOD), 150 mM natriumkloridi (NaCl), 0,1 % (w/v) natriumdodekyylisulfaatti (SDS) ja 1 % (v/v) NP-40 (20 mM Tris (pH 8,0), 137 mM NaCl, 10 % (v/v) glyseroli, 1 % (v/v) nonyylifenoksipolyetoksietanoli (NP-40) ja 2 mM etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA))), johon lisättiin EDTA vapaata proteaasin (Pierce™, Thermo Fisher Scientific) ja fosfataasin (Pierce™, Thermo Fisher Scientific) toiminnan estäjiä. Lisäksi näytteitä sonikoitiin viisi minuuttia Bioruptor™ UCD200 -laitteella (320 wattia, intervalli 0,25). Proteiinien absorpanssit mitattiin Protein DC Assay (Bio-Rad) -menetelmän avulla ja ne eroteltiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) denaturoivissa olosuhteissa (4-20 % Mini-PROTEAN® TGX™ geeli, Bio-Rad Laboratories).

Proteiinit siirrettiin 0,2 µm polyvinyylidifluoridi (PVDF) -kalvolle (Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack, Bio-Rad Laboratories) Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories) -siirrostusmenetelmällä. Kalvoja haudutettiin 10 minuuttia 5 % maito-TBST-liuoksessa (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) TWEEN®20 ja 5 % (w/v) rasvaton maito), jotta maidon proteiinit sitoutuisivat kalvon vapaisiin alueisiin.

Kalvon proteiinit leimattiin primaarivasta-aineilla yön yli + 4 °C, minkä jälkeen primaarivasta-aineet leimattiin huoneenlämmössä yhden tunnin pyöriksen aikana ECL HRP -sekundaarivasta-aineella. Vasta-ainelaimennokset tehtiin 5 % maito-TBST-liuokseen. Käytettyjen vasta-aineiden tiedot löytyvät liitteestä 1.

Filmien kehitystä varten kalvoille laitettiin ECL Plus Western blotting –liuosta (GE Healthcare) ja kalvot valotettiin Super RX-N (Fujifilm) -filmeille CURIX 60 (AGFA Healthcare) -laitteella. Proteiiniraitojen voimakkuus mitattiin ImageJ-ohjelmalla (National Institutes of Health).

5.3 RNA:n eristys, cDNA:n synteesi ja RQ-PCR

AML-solulinjoista kerätyt ribonukleiinihappo (engl. *ribonucleic acid*, RNA) näytteet eristettiin ja puhdistettiin NucleoSpin® RNA Midi (Macherey-Nagel) -pakkauksen ohjeiden mukaan. Puhdistetun RNA:n konsentraatio mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), minkä jälkeen 1 µg totaali-RNA:ta käännettiin komplementaariseksi deoksiribonukleiinihapoksi (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) SuperScript III (18080093, Invitrogen, Carlsbad, USA) käänteistranskriptaasin, sattumanvaraisten alukkeiden (Random Primers, C1181, Promega), RiboLock(tm) (#EO0381, Thermo Scientific) ribonukleaasin toiminnan estäjän ja dNTP-sekoituksen (BIO-39028, Bionline, London, UK) avulla. Käänteistranskriptioreaktiot toteutettiin entsyymien valmistajien ohjeiden mukaan.

Kohde cDNA monistettiin kvantitatiivisella reaaliaikaisella polymeerasiketjureaktiolla (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*, RQ-PCR) KAPA PROBE FAST RQ-PCR – pakkauksen (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) ja 7900 HT Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher) ohjeiden mukaan. Monistuksessa käytettyjen alukkeiden ja koettimien sekvenssitiedot löytyvät liitteestä 2. RQ-PCR-reaktio käynnistettiin nostamalla lämpötila 95 °C:een 10 minuutiksi, minkä jälkeen cDNA:ta monistettiin 45 syklin ajan. Syklissä lämpötila pysyi ensin 15 sekuntia 95 °C:ssa ja sitten minuutin 60 °C:ssa.

Geenien suhteellinen ilmentyminen normalisoitiin endogeenisiin taloudenpitogeneihin, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasiin (GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase) ja beeta-aktiiniin (ACTB, beta-actin), vertaamalla. Tulokset analysoitiin $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -metodilla ja SDS -käyttöohjelmalla (versio 2.4.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

5.4 Solujen elinkelpoisuuden määrittäminen

Elinkelpoisuustesteissä tarkasteltavia soluja kasvatettiin valkoreunaisilla 96-kuoppalevyillä (ViewPlate-96 TC, PerkinElmer). Tutkimuksessa käytettiin CellTiter-Glo®-reagenssia (Promega), jonka avulla muodostuva luminesenssi mitattiin Synergy H1, Hybrid Reader (BioTek) -laitteella. Mittausohjelmana käytettiin Gen5 2.09 (BioTek).

5.5 siARPP19 transfektiot

Akuutti ARPP19 ja CIP2A proteiinien hiljentäminen soluissa toteutettiin RNA-interferenssiin (engl. *RNA interference*, RNAi) perustuvan menetelmän avulla, missä geenin hiljentäminen saatiin aikaan sekvenssi spesifisillä pienillä interferoivilla RNA-molekyyleillä (engl. *small interfering RNA*, siRNA). ARPP19 toiminta hiljennettiin siGENOME Ihmisen ARPP19 (10776) siRNA:lla (D-015338-03, Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Mukana käytettiin negatiivista siRNA-kontrollia (scramble siRNA, SCR), jonka sekvenssi oli 5'CGUACGCGAAUACUUCGA (Eurofins Genomics) ja positiivisena kontrollina käytettiin CIP2A 90.2 siRNA, jonka sekvenssi oli 5'CUGUGGUUGUGUUUGCACU (Eurofins Genomics).

Tutkimuksessa siRNA kuljetettiin AML-soluihin elektroporaatiolla (Amaxa Nucleofector®II, Lonza), missä sähköiset pulssit mahdollistavat siRNA:n kulkeutumisen soluihin solukalvon muuttuessa hetkellisesti molekyylejä läpäisevämmäksi. Transfektio suoritettiin Amaxa Nucleofector®II –laitteella (Lonza, Basel, Sveitsi), T-019-ohjelmalla. Transfektio suoritettiin Lonzan Amaxa™ Nucleofector®II -ohjeiden mukaisesti.

5.6 Lentivirus-shARPP19 transduktiot

Pitkäaikainen ARPP19-proteiinin hiljentäminen soluissa toteutettiin toisen RNA-interferenssiin perustuvan menetelmän avulla, missä geenin hiljentäminen saatiin aikaan lyhyillä hiussilmukoivilla RNA-molekyyleillä (engl. *short hairpin RNA*, shRNA).

Tutkimuksessa käytetyt shARPP19-lentiviruspartikkelit tilattiin Helsingin funktionaalisen genomiikka -yksikön TRC1-kirjastosta (FuGu, Helsingin yliopisto, Suomi). Tilatut ARPP19 shRNA olivat TRCN0000160408 (shARPP19_1) ja TRCN0000158847 (shARPP19_2). Kontrollina käytettiin sekoitetun sekvenssin omaavaa shRNA:ta (SHC002, Sigma).

ARPP19-RNAi HL-60 ja KG-1 -solulinjojen luonnissa käytettiin infektiokykyisiä lentiviruksia, joita käytettiin hyvin erilaisia määriä. AML-solujen transduktio suoritettiin sentrifugaatioon perustuvan menetelmän avulla (engl. spinoculation). Transduktoituneet solut valikoitiin puromysiinillä (1,5 µg/ml) 72 h ajan. ARPP19 ilmentyminen määritettiin western blot -analyysillä. Valikoiduille shARPP19 HL-60-soluille tehtiin solujen elinkykyisyydestä 24 h, 48 h, 72 ja 120 h aikapisteissä. Tuloksissa on esitettynä kolmen itsenäisen toiston keskiarvoinen tulos.

5.7 GKI-1 -lääkeainetestaus

GKI-1 (Ocasio ja muut 2016) vaikutusta solujen kasvuun tarkasteltiin neljässä AML-solulinjassa, KG-1, HL-60, MOLM-14 ja Kasumi-1. Molekyylin konsentraatiot olivat 25, 50 ja 75 µM. Kontrollina käytettiin 0,75 % dimetyylisulfoksidia (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) (Sigma Aldrich), johon GKI-1 oli liuotettu. Solujen elinkykyisyys mitattiin 48 h jälkeen. Tuloksissa on esitettynä kolmen itsenäisen toiston keskiarvoinen tulos.

5.8 SMAPs -lääkeainetestaus

SMAPs (Saatu Goutham Narla) vaikutusta solujen kasvuun tarkasteltiin neljässä AML-solulinjassa, KG-1, HL-60, MOLM-14 ja Kasumi-1. Tutkimuksessa käytettiin kahta erilaista molekyyliä, jotka olivat DT-061 ja TRC-766. Molekyylien konsentraatiot olivat 10, 12, 14, 16, 18 ja 20 µM. Negatiivisena kontrollina käytettiin 0,2 % DMSO (Sigma Aldrich), johon SMAPs oli liuotettu. Solujen elinkykyisyys mitattiin 48 h jälkeen. Lääkeainetestauksessa soluja kasvatettiin 10 % iFBS-RPMI -kasvatusliuoksessa. Tuloksissa on esitettynä kolmen itsenäisen toiston keskiarvoinen tulos.

5.9 Kahdeksan lääkeaineen seulonta

Lääkeainetestaus suoritettiin yhteistyössä Turun biotiedekeskuksen yhteydessä toimivien Michael Courtney ja Jesse Mattssonin kanssa. Lääkeainetestaukseen valittiin kahdeksan, anagrelidi (Sellechem.com), tretinoiini (Sellechem.com), tacrolimus (Sellechem.com), abirateroni (CB-7598) (Sellechem.com), lenalidomidi (Abcam), dasatinibi (Sellechem.com), selumetinibi (AZD6244) (Sellechem.com) ja XAV-939 (Sellechem.com), lääkeainetta. Lääkeaineet valikoituivat Suomen molekyyli lääketieteen instituutin (engl. *Institute for Molecular Medicine Finland*, FIMM) suorittamasta lääkeainetestauksesta, missä monia lääkeaineita oli testattu potilaista eristetyissä primaarisolulinjoissa.

Lääkeaineiden vastetta tarkasteltiin kaikissa neljässä AML-solulinjassa. Molekyylien pitoisuudet vaihtelivat 0,1-1 000 000 nM välillä (liite 3). Positiivisena kontrollina käytettiin staurusporiinia (1 μ M). Negatiivisena kontrollina käytettiin 0,5 % DMSO (Sigma Aldrich), johon lääkeaineet oli liuotettu. Solujen elinkykyisyys mitattiin 72 h jälkeen. Lääkeainetestauksessa soluja kasvatettiin mononukleaarissa solu mediumissa (engl. *Mononuclear Cell Medium*, MCM) (Promocell). Tutkimuksesta suoritettiin kaksi itsenäistä toistoa.

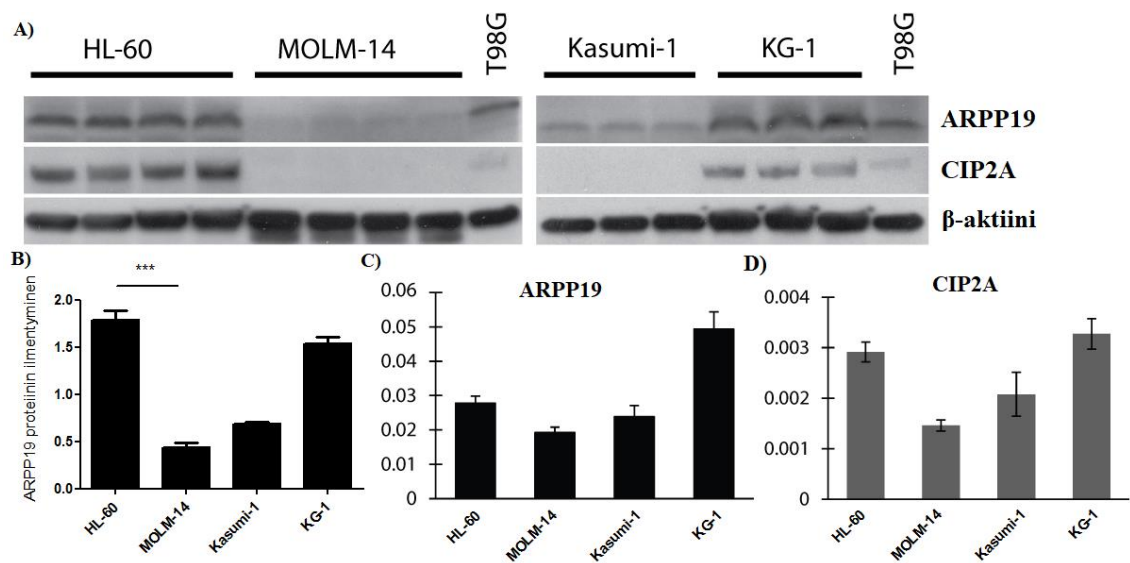
5.10 Tilastollinen analytiikka

Jokaisesta tutkimuksesta suoritettiin kolme itsenäistä toistoa ja jokaisen itsenäisen toiston näyte sisälsi vähintään kaksi replikaattia. Elinkykyisyystestien tuloksien keskiarvoa tarkasteltiin yhdessä keskiarvon keskivirheen (engl. *standard error of mean*, SEM) kanssa. Western blot -analyysien kohdeproteiinien ja RQ-PCR:ssä saatujen geenien ilmentyminen normalisoitiin endogeenisiin kontrolligeeneihin GAPDH ja β -aktiiniin verraten. Tilastoanalyseissa käytettiin Excel- ja SAS-ohjelmaa (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Tilastollisissa analyyseissä käytettiin Studentin t-testiä ja tulosten merkittävyyden raja-arvona käytettiin p-arvoa <0.05.

6 TULOKSET

6.1 ARPP19 ilmentyminen AML-solulinjoissa

ARPP19 ja CIP2A:n ilmentymistä tarkasteltiin neljässä, KG-1, HL-60, MOLM-14 ja Kasumi-1, AML-solulinjassa. Sisäisenä kontrollina käytettiin T98G-glioomasolulinjaa, sillä linjan tiedetään ilmentävän ARPP19-proteiinia (Chin ja muut 2000). Western blot -analyysien perusteella ARPP19 ja CIP2A:n proteiinitasot olivat korkeat KG-1 ja HL-60 -solulinjoissa ja alhaiset MOLM-14 ja Kasumi-1 -solulinjoissa (kuva 13). Kyseisten proteiinien ilmentyminen ei vaihdellut merkittävästi RNA-tasolla eri solulinjojen välillä.



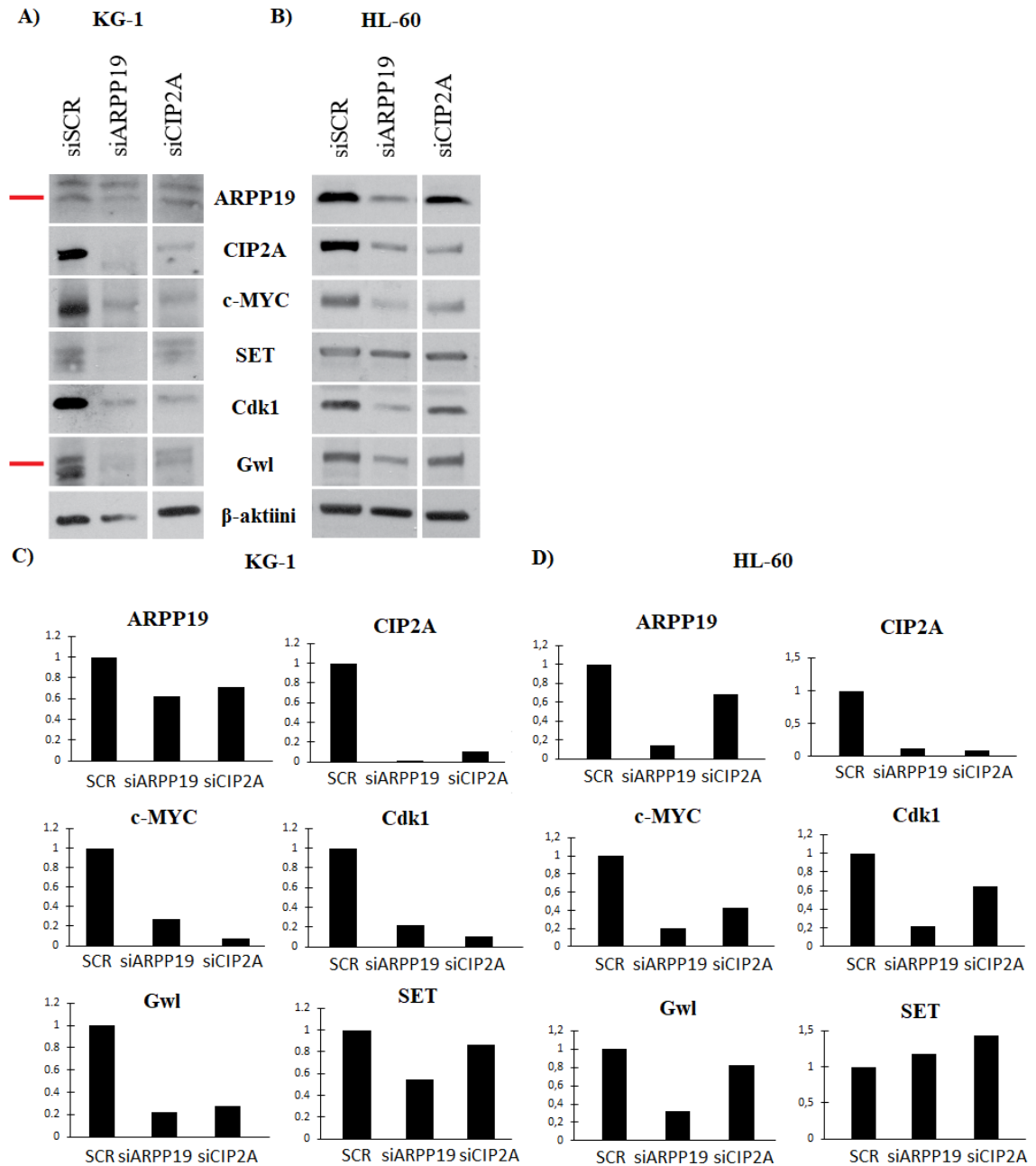
Kuva 13. ARPP19 ja CIP2A:n ilmentymistasot AML-solulinjoissa. A) Esitettyä on western blot -analyysin avulla selvitettyjen ARPP19 ja CIP2A:n ilmentymistasot neljässä AML-solulinjassa toisistaan riippumattomien toistojen kanssa. Sisäisenä kontrollina käytettiin T98G-solulinjaa. B) ARPP19 proteiini-ilmentyminen sekä C) ARPP19 ja D) CIP2A:n RNA:n ilmentyminen neljässä AML-solulinjassa. Esitettyä ovat toisistaan riippumattomien toistojen keskiarvo \pm SEM ja tilastollinen merkittävyys on merkitty tähtimerkein (***) $p < 0,0001$, HL-60 vs. MOLM-14). Tilastollisessa analyysissä käytettiin Studentin t-testiä.

6.2 ARPP19 vaikutus solujen endogeenisiin proteiineihin

6.2.1 siARPP19 transfektoidut AML-solulinjan solut

Akuutti ARPP19 hiljentäminen KG-1 ja HL-60 -solulinjoissa johti c-MYC:n ja CIP2A:n ilmentymisen alenemiseen (kuva 14). Lisäksi ARPP19 hiljentymisen seurauksena Cdk1- ja Greatwall-kinaasin ilmentymistasot laskivat. Cdk1- ja Greatwall-kinaasin ilmentymisen alenemista ei havaittu yhtä voimakkaana soluissa, missä CIP2A oli

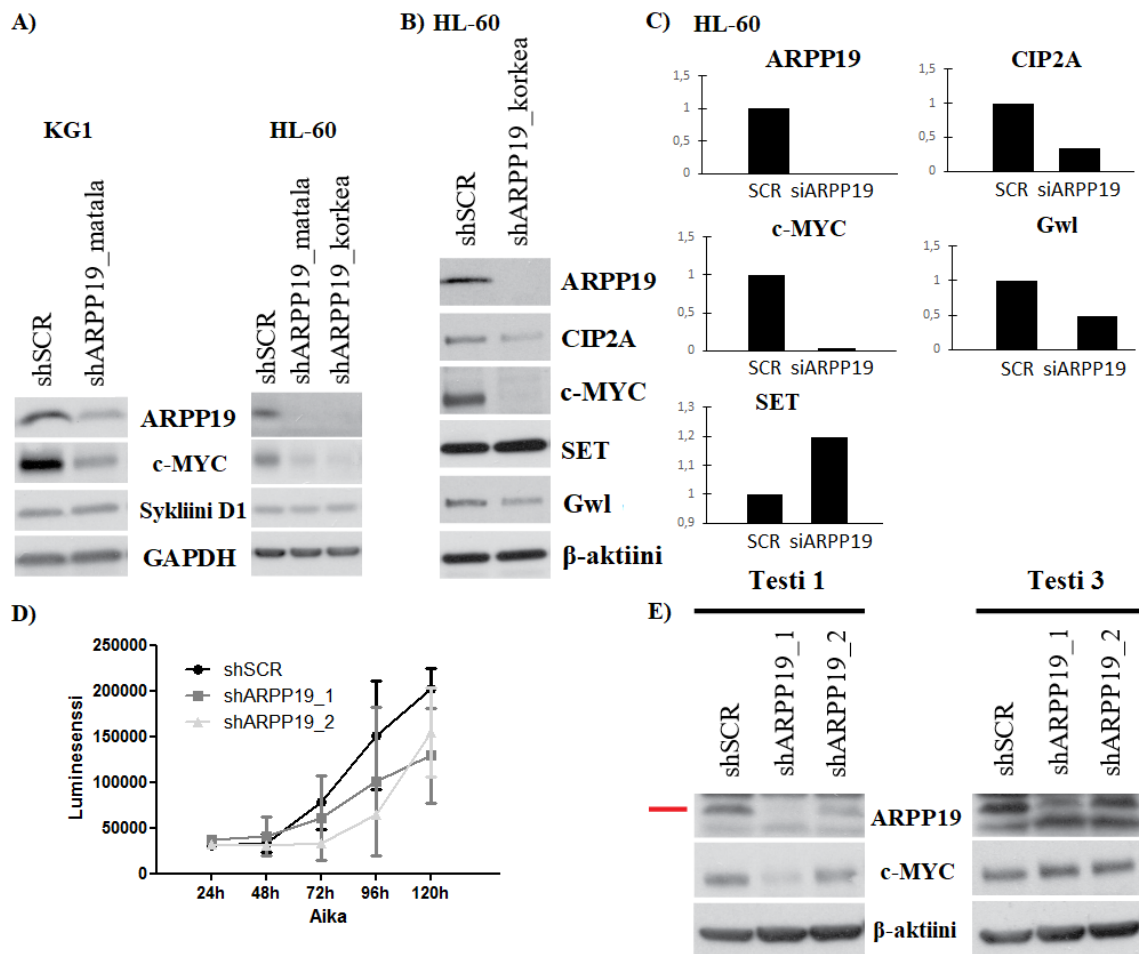
hiljennetty. ARPP19 hiljentymisen seurauksena SET-proteiinin ilmentyminen lisääntyi HL-60 -solulinjassa ja laski KG-1 -solulinjassa.



Kuva 14. ARPP19 vaikutus endogeenisten proteiinien ilmentymiseen. Esitettyinä on western blot -analyysien avulla selvitettyjen ARPP19-, CIP2A-, c-MYC-, SET-, Cdk1- ja Greatwall (Gwl) -proteiinien ilmentyminen A) KG-1 ja B) HL-60 -solulinjoissa 72 h sekoitetun sekvenssin omaavan (scramble) (siSCR), ARPP19 (siARPP19) tai CIP2A (siCIP2A) siRNA transfektion jälkeen. Western blot -analyysien kvantitaatiot C) KG-1 ja D) HL-60 -solulinjoilla tehdyissä tutkimuksissa.

6.2.2 shARPP19 transduktoidut AML-solulinjan solut

Pitkäaikainen ARPP19 hiljentäminen KG-1 ja HL-60 -solulinjoista johti c-MYC:n, CIP2A:n ja Greatwall-kinaasin ilmentymisen alenemiseen (kuva 15). ARPP19 hiljentymisen ei vaikuttanut KG-1 ja HL-60 -solulinjoissa sykliini D1 ilmentymisen tasoihin. ARPP19 hiljentymisen seurauksena SET-proteiinin ilmentyminen lisääntyi HL-60 -solulinjassa. Lisäksi ARPP19 pitkäaikaisen hiljentämisen havaittiin alentavan HL-60 -solujen elinkykyisyyttä. Ajan myötä shARPP19 luotu HL-60 -solulinja kuitenkin menetti ARPP19 hiljennyksen.

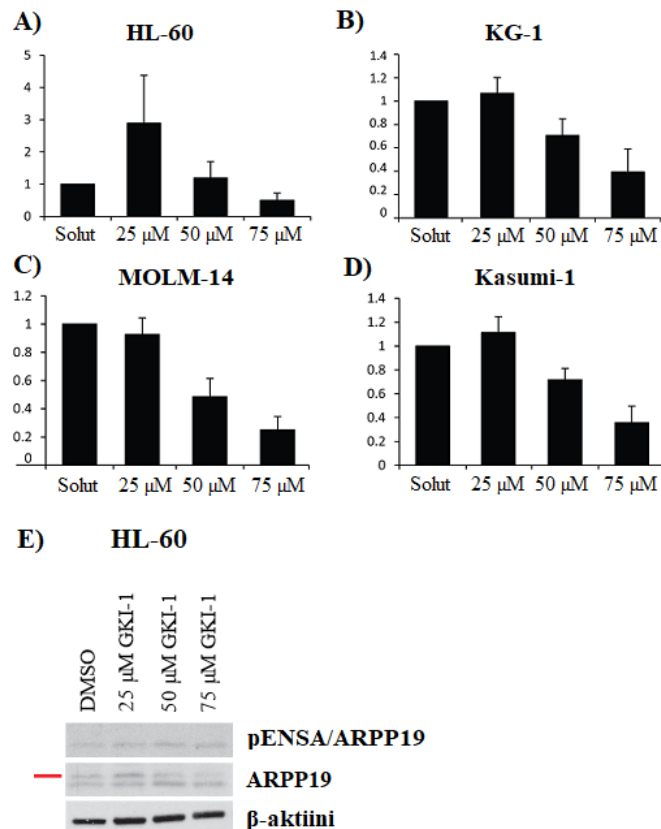


Kuva 15. ARPP19 vaikutus endogeenisten proteiinien ilmentymiseen. Esitettynä on western blot -analyysin avulla selvitettyjen ARPP19-, c-MYC- ja sykliini D1 -proteiinien ilmentyminen A) KG-1 ja HL-60 -solulinjoissa sekä CIP2A-, SET- ja Greatwall (Gwl) -proteiinien ilmentyminen B) HL-60 -solulinjassa sekoitetun sekvenssin omaavan (scramble) (shSCR) tai ARPP19 (shARPP19_1) shRNA transduktion jälkeen. Transduktiossa käytettiin matalaa ja korkeaa shRNA-pitoisuutta, sekä kahta erilaista shARPP19, shARPP19_1 ja _2. C) Western blot -analyysien kvantitaatiot kohdan B) HL-60 -solulinjan western bloteista. D) ARPP19 hiljennettyjen HL-60 -solujen elinkykyisyys CellTiterGlo[®]-analyysillä mitattuna. Esitettynä on keskiarvo ±SEM kolmen toiston välillä E) Western blot -analyysi ARPP19 hiljennetyissä soluista. Western blot -näytteet on kerätty juuri ennen alkavaa elinkykyisyystestiä.

6.3 Lääkeainevaste AML-solulinjoissa

6.3.1 GKI-1 vaste

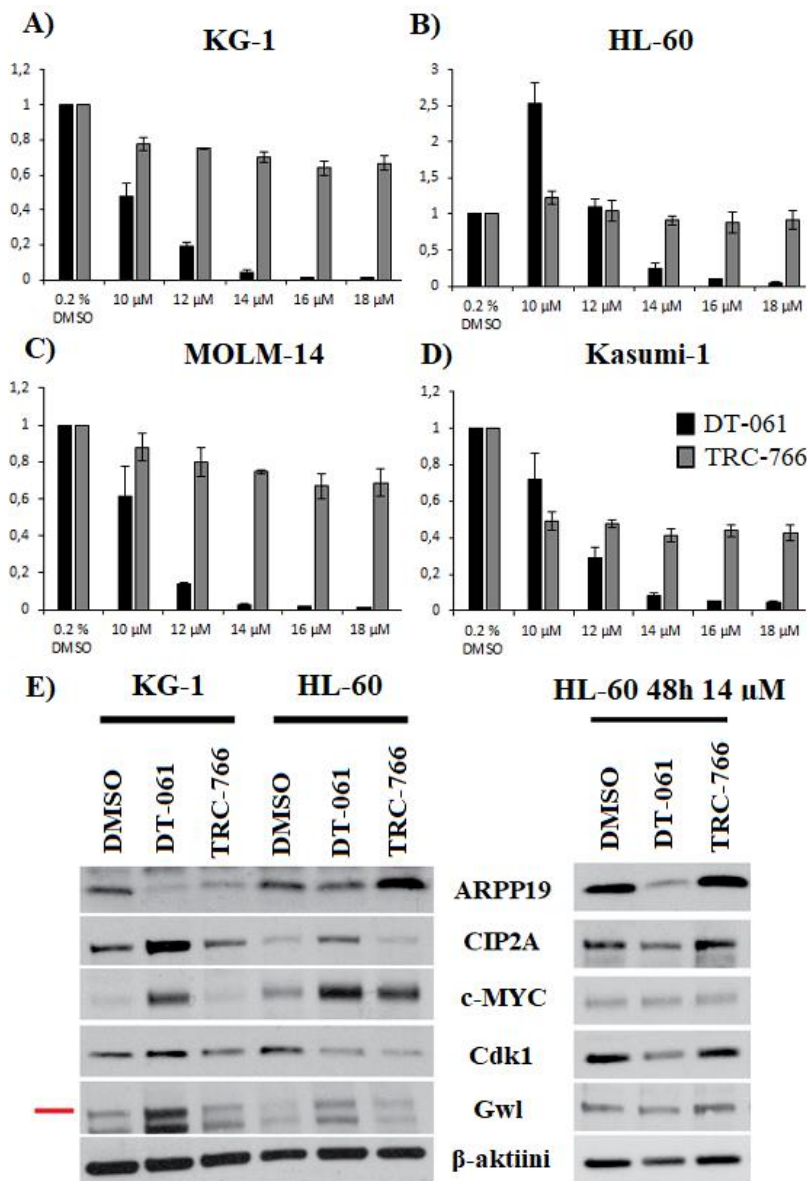
Tutkimuksessa tarkasteltiin AML-solujen vastetta ARPP19-signaalinvälitysketjuun kohdistetussa lääkehoidossa. Lääkehoidollinen vaste saavutettiin Greatwall-kinaasin toimintaa estävällä GKI-1:llä. GKI-1 altistus johti solujen elinkykyisyyden alenemiseen kaikissa neljässä AML-solulinjassa ja lääkehoidollisessa vasteessa ei havaittu eroavaisuuksia solulinjojen välillä (kuva 16). Western blot -analyysissä havaittiin, ettei GKI-1 vaikuttanut fosforyloituneen ENSA:n ja ARPP19:n eikä kokonais-ARPP19 ilmentymistasoihin. Western blot -analyysi onnistuttiin tuottamaan ainoastaan yhdestä toistosta.



Kuva 16. AML-solujen vaste GKI-1:n. A) HL-60 B) KG-1 C) MOLM-14 ja D) Kasumi-1 -solulinjojen elinkykyisyyden vaste GKI-1 mitattiin CellTiterGlo[®]-analyysillä 48 h kuluttua 0, 25 μM, 50 μM ja 75 μM GKI-1 käsittelyssä. Esitettynä on keskiarvo ±SEM kolmen toiston välillä jokaisessa neljässä solulinjassa. E) Esitettynä on western blot -analyysin avulla selvitettyjen fosforyloidun ENSA:n ja ARPP19:n sekä endogeenisen ARPP19 ilmentyminen HL-60 solulinjassa 48 h kuluttua 0, 25 μM, 50 μM ja 75 μM GKI-1 käsittelyn jälkeen.

6.3.2 SMAPs vaste

Lisäksi tutkimuksissa tarkasteltiin SMAPsien avulla, vaikuttaako PP2A:n uudelleen aktivointi AML-solujen erilaiseen vasteeseen. Lääkeainetestaukseen valittiin kaksi erilaista SMAPsia, DT-061 ja TRC-766. TRC-766 on inaktiivinen molekyyli (Sangodkar ja muut 2017), jota käytettiin tutkimuksessa negatiivisena kontrollina. Tutkimuksissa lääkehoidollinen vaste saavutettiin DT-061:lle altistetuissa soluissa. Lääkehoidollisessa vasteessa ei havaittu eroavaisuuksia AML-solulinjojen välillä (kuva 17). Western blot – analyysit eivät osoita selkeää yhdenmukaisuutta lääkeainevasteessa tapahtuvasta proteiinitason muutoksista tarkasteltavissa proteiineissa.

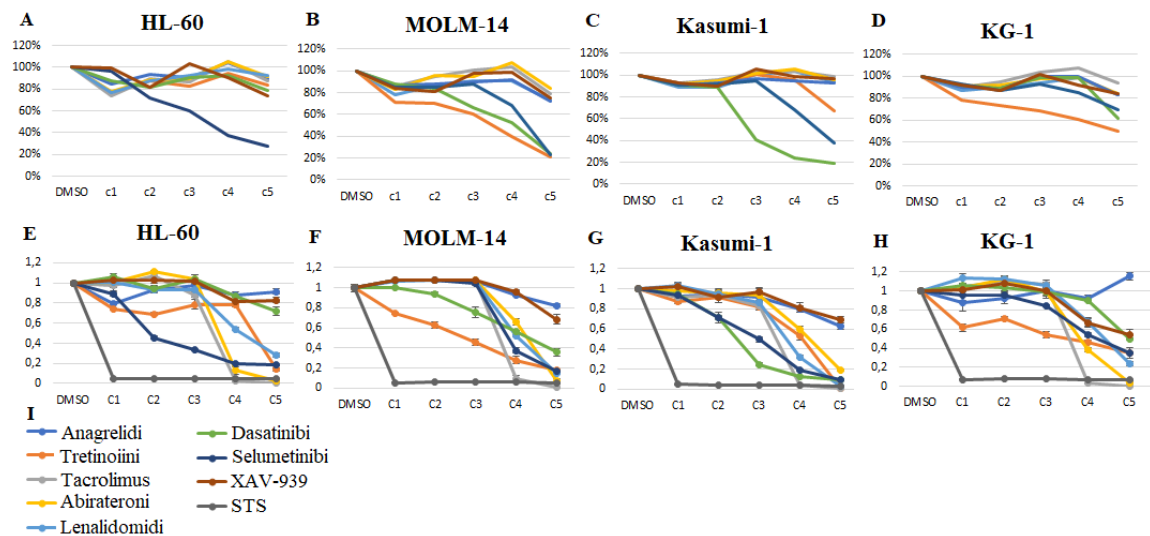


Kuva 17. AML-solujen vaste SMAPs-molekyyleihin. A) KG-1 B) HL-60 C) MOLM-14 ja D) Kasumi-1 -solulinjojen vaste DT-061 ja TRC-766 SMAPs-molekyyleihin. Solujen elinkykyisyys mitattiin CellTiterGlo[®]-analyysin avulla 72 h kuluttua 0, 10, 12, 14, 16 ja

18 μM DT-061 tai TRC-766 käsittelyn jälkeen. Osoitettuna on keskiarvo $\pm\text{SEM}$ kolmen toiston välillä. E) Western blot -analyysin avulla selvitettyjen ARPP19-, CIP2A-, c-MYC-, Cdk1- ja Gwl-proteiinien ilmentyminen KG-1 ja HL-60 -solulinjassa 24 h ja 48 h kuluttua 0 μM , 14 μM ja 16 μM DT-061 tai TRC-766 käsittelyn jälkeen.

6.3.3 Lääkeaineseulonta

Lääkeainetestauksessa selvitettiin kahdeksan lääkeaineen vaste neljässä AML-solulinjassa. Tutkimuksessa havaittiin dasatinibin johtavan erilaiseen vasteeseen AML-solulinjoissa (kuva 18). Lääkevaste saavutettiin Kasumi-1 ja MOLM-14 -solulinjoissa, muttei KG-1 ja HL-60 -solulinjoissa. Selkein ero dasatinibin lääkevasteessa havaitaan Kasumi-1 ja HL-60 -solulinjojen välillä. Tutkimuksessa käytettiin positiivisena kontrollina staurosporiinia, minkä on osoitettu aiheuttavan apoptoosia (Akinaga ja muut 1994).



Kuva 18. AML-solujen vaste kahdeksaan lääkeaineeseen. Esitettynä on toiston 1 lääkeainevaste A) KG-1 B) HL-60 C) MOLM-14 ja D) Kasumi-1 -solulinjoissa sekä toiston 2 lääkeainevaste E) KG-1 F) HL-60 G) MOLM-14 ja H) Kasumi-1 -solulinjoissa. Toiston 2 lääkeainevastetuloksissa on osoitettuna replikaattien välinen keskiarvo $\pm\text{SEM}$. Positiivisena kontrollina tutkimuksissa käytettiin staurosporiinia (STS). I) Lääkeaineiden väritunnukset. Tulokset on normalisoitu DMSO:n

7 TULOSTEN TARKASTELU

Tehdyissä tutkimuksissa todettiin ARPP19 vaikuttavan AML-solulinjojen elinkykyisyyteen. Solujen elinkykyisyyttä tarkasteltiin CellTiterGlo[®]-analyysillä, missä elinkykyisyys ilmentyi läsnäolevan adenosiinitrifosfaatin määrän mukaan (Promega 2018). Menetelmä perustuu ajatukseen siitä, että aineenvaihdunnallisesti aktiiviset solut tuottavat uudelleen ja uudelleen adenosiinitrifosfaattia. Kuitenkin muut läsnäolevat solut saattavat sisältää myös adenosiinitrifosfaattia, mikä aiheuttaa taustaa mittaustuloksiin.

Elinakykyisyyttä olisi voitu tutkia myös toisella testillä, kuten WST-1:llä. Kyseinen menetelmä perustuu tetrasolium suolan muuntumiseen formatsaaniksi mitokondrionaalisten dehydrogenaasien toimesta. Mitokondrionaalisten dehydrogenaasien on todettu olevan aktiivisia vain elinkykyisissä soluissa. (Abcam 2019.) Koska menetelmä perustuu aktiivisten entsyymien toimintaan, voisi ajatella menetelmän tuottavan tarkemman tuloksen elinkykyisistä soluista. Lisäksi solujen elinkykyisyyttä voidaan tarkastella virtaussytometrisellä tutkimuksella, missä solusykliä ilmentävillä markkereilla leimatut solut kyetään tunnistamaan (Thermo Fisher Scientific 2019). Virtaussytometrisillä tutkimuksilla olisi voitu selvittää, pysähtyykö ARPP19 hiljennetyt solut G2/M-vaiheeseen. Jos ARPP19 ilmentymistason aleneminen syöpäsoluissa estäisi solun siirtymistä mitooseen, voitaisiin ARPP19 todeta vaikuttavan syöpäsolujen patogeneesiin edistämällä solujen jakautumista.

Vaikka käytössä on monia erilaisia menetelmiä solujen elinkykyisyyden määrittämiseen, oli ARPP19 hiljennettyjen syöpäsolujen elinkykyisyyden tutkiminen vaikeaa. Kohtasimme ongelmia, kun yritimme luoda ARPP19 hiljennettyjä solulinjoja. ARPP19 hiljennetyt solut kuolivat helposti ja, jos niitä saatiin kasvamaan, ne eivät jakautuneet. Tämä saattaa olla seurausta siitä, että ARPP19 toiminta on välttämätöntä jakautuvien solujen elinkykyisyydelle. Onkin todettu, ettei hiiren kehittyminen ole mahdollista, jos ARPP19 toiminta ei ole aktiivista embryogeneesissä (Hached ja muut 2019). Tämä antaa viitteitä siitä, ettei sellaisten solulinjojen luominen ole mahdollista, mistä ARPP19 toiminta on poistettu kokonaan. Todennäköisesti tutkimuksessa käytetyt ARPP19 hiljennetyt solulinjat olivat siten heterogeenisiä, mitkä sisälvät sekä hiljennettyjä, että hiljentämättömiä soluja. Tämä on saattanut vaikuttaa tutkimuksissa toistojen välillä havaittuihin eroavaisuuksiin.

Kun ARPP19 toimintaa tarkasteltiin proteiinitasolla, havaittiin ARPP19 vaikuttavan c-MYC:n, CIP2A:n, Cdk1- ja Greatwall-kinaasin toimintaan, mikä pystyttiin näkemään sekä ARPP19 akuutisti, että pitkäaikaisesti poistetuista solulinjoista. Aikaisemmin on todettu CIP2A:n säätelevän c-MYC:n ilmentymistä vaikuttamalla PP2A:n toimintaan (Junttila ja muut 2007), minkä vuoksi tehdyissä western blot -analyyseissä CIP2A:n ilmentymisen aleneminen johti c-MYC:n ilmentymisen alenemiseen. Tehdyissä tutkimuksissa ARPP19 ilmentymistason aleneminen johti CIP2A:n ja c-MYC:n ilmentymisen alenemiseen. Mahdollisesti ARPP19 vaikuttaa toiminnoillaan suoraan c-MYC:n ilmentymiseen soluissa. Kuitenkin on todennäköisempää, että c-MYC:n ilmentymistason aleneminen oli seurausta CIP2A:n toiminnan muutoksesta. Voitaisiin ajatella, että ARPP19 edistää syöpäsolujen elinkykyisyyttä lisäämällä CIP2A:n toimintaa.

Harmillisesti tehdyissä western blot -analyyseissä ei tarkasteltu PP2A-B55:n ilmentymisen muutosta. Jos PP2A-B55:n ilmentymistason olisi havaittu nousevan, ARPP19:n ja CIP2A:n ilmentymistason laskiessa, olisi voitu tarkemmin todistaa ARPP19 toiminnan vaikutus PP2A-B55:n ja CIP2A:n toimintaan AML:ssä. Tutkimuksissa havaittiin kuitenkin ARPP19 johtavan lopulta myös muiden mitoosin säätelyyn osallistuvien proteiinien, Cdk1 ja Greatwall, toiminnan estymiseen. Näiden kinaasien toiminnan estyminen oli todennäköisesti seurausta PP2A-B55:n toiminnan lisääntymisestä.

ARPP19-proteiinin toiminnan merkitystä AML-solujen elinkykyisyyden ylläpitämisessä pystyttiin tarkentamaan, kun ARPP19 ilmentymistason osoitettiin vaikuttavan AML-solujen lääkeainevasteeseen dasatinibiä kohtaan. ARPP19 korkea ilmentyminen johti KG-1 ja HL-60 –solulinjojen lääkeaineen vastustamiseen. Harmillisesti samankaltaista lääkeainevastetta ei kyetty havaitsemaan muiden lääkeaineiden kohdalla. Erityisesti GKI-1 -lääkeaineen tuottamat vasteet eivät olleet odotusten mukaisia. GKI-1 on osoitettu estävän ihmisen Greatwall-kinaasin toimintaa *In vitro*, mikä johtaa ENSA:n ja ARPP19 toiminnan alenemiseen (Ocasio ja muut 2016). Tutkimuksissa odotettiin solulinjojen välillä ilmentyvän lääkeainevasteissa eroja, mutta niitä ei havaittu. Western blot -analyyseissä kuitenkin selvisi, ettei lääkeainevaste ollut seurausta ARPP19 ilmentymisen alenemisestä. Saatu tulos ei siten selvennä ARPP19 toimintaa AML-soluissa.

Suoritettujen lääkeainetutkimuksien lisäksi olisi hyvä suorittaa testi, missä ARPP19 yli-ilmentäisiin Kasumi-1 ja MOLM-14 -solulinjoissa. Jos ARPP19 yli-ilmentäminen soluissa johtaisi dasatinibin vastustamiseen, voitaisiin ARPP19 toiminnan vaikutus AML-solujen vastustuskykyyn annettavaa lääkehoitoa kohtaan varmentaa.

Kaiken kaikkiaan saadut tulokset tukevat näkemystä siitä, että korkea ARPP19 mRNA:n ilmentymisen taso ennustaa AML:ssä taudin uusiutumista (Mäkelä ja muut 2019). ARPP19-proteiinitason tutkimuksissa osoitettiin ARPP19 toiminnan merkitys AML:n taudin ilmentymisessä. ARPP19 todettiin vaikuttavan AML-solujen elinkykyisyyteen estämällä PP2A:n ja lisäämällä CIP2A:n toimintaa mitoosissa, mikä johtaa c-MYC toiminnan alenemiseen. Lisäksi todettiin ARPP19 korkean proteiinitason ilmentymisen ennustavan solujen resistenssiä dasatinib-lääkehoitoa kohtaan.

8 POHDINTA

AML-potilaan taudin uusiutuminen voitaisiin ennustaa selvittämällä ARPP19 mRNA:n ilmentymistaso syöpäsoluissa. Tätä varten tulisi kehittää kvantitatiivinen PCR -menetelmä, mitä voitaisiin käyttää AML-potilaiden diagnostiikassa. Lisäksi AML-potilaan diagnostiikkaa voitaisiin täydentää herkemällä dPCR-menetelmällä, minkä avulla voitaisiin selvittää kemoterapian jälkeinen sairauden tila. Kvantitatiivisella PCR:llä ja dPCR:llä saatuja tuloksia voitaisiin hyödyntää potilaan hoidon suunnittelussa. Jos potilaan AML-sairaudessa ARPP19 ilmentyy korkealla, voitaisiin potilas ohjata nopeammin allogeeniseen kantasolusiirtoon.

LÄHTEET

Abcam. WST-1 Assay Reagent - Cell Proliferation (ab155902). <<https://www.abcam.com/wst-1-assay-reagent-cell-proliferation-ready-to-use-ab155902.html>>. (Luettu 21.10.2019).

Akinaga, S., Nomura, K., Gomi, K. & Okabe, M. (1994) Effect of UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C, on the cell-cycle distribution of human epidermoid carcinoma, A431 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **33(4)**:273-280.

Andreotti, G., Freedman, ND., Silverman, DT., Lerro, CC., Koutros, S., Hartge, P., Alavanja, MC., Sandler, DP. & Freeman, LB. (2017) Tobacco Use and Cancer Risk in the Agricultural Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **26(5)**:769-778.

Arber, DA., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, MJ., Le Beau, MM., Bloomfield, CD., Cazzola, M. & Vardiman, JW. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127(20)**:2391-405.

Arriazu, E., Pippa, R. & Odero, MD. (2016) Protein Phosphatase 2A as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol eCollection* **6**:78.

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* **78(3)**:325-359.

Bolouri, H., Farrar, J.E., Triche, T., Ries, R.E., Lim, E.L., Alonzo, T.A., Ma, Y., Moore, R., Mungall, A.J., Marra, M.A., Zhang, J., Ma, X., Liu, Y., Liu, Y., Auvil, J.M.G., Davidsen, T.M., Gesuwan, P., Hermida, L.C., Salhia, B., Capone, S., Ramsingh, G., Zwaan, C.M., Noort, S., Piccolo, S.R., Kolb, E.A., Gamis, A.S., Smith, M.A., Gerhard, D.S. & Meshinchi, S. (2018) The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med* **1**:103-112.

Bruchova-Votavova, H., Yoon, D. & Prchal, J. (2010) miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. *Leuk Lymphoma* **51(4)**:686-693.

Cancer Genome Atlas Research Network. (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **368(22)**:2059-2074.

Chin, L., Singh, S., Wang, Q. & Murray, S. (2000) Identification of okadaic-acid-induced genes by mRNA differential display in glioma cells. *J Biomed Sci* **7(2)**:152-159.

O'Connor, CM., Perl, A., Leonard, D., Sangodkar J. & Narla, G. (2018) Therapeutic targeting of PP2A. *Int J Biochem Cell Biol* **96**:182-193.

Dagda, R., Zaucha, J., Wadzinski, B. & Strack, S. (2003) A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit Bbeta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J Biol Chem* **278(27)**:24976-24985.

Ding, L., Ley, T.J., Larson, D.E., Miller, C.A., Koboldt, D.C., Welch, J.S., Ritchey, J.K., Young, M.A., Lamprecht, T., McLellan, M.D., McMichael, J.F., Wallis, J.W., Lu, C., Shen, D., Harris, C.C., Dooling, D.J., Fulton, R.S., Fulton, L.L., Chen, K., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., Magrini, V.J., Cook, L., McGrath, S.D., Vickery, T.L., Wendl, M.C., Heath, S., Watson, M.A., Link, D.C., Tomasson, M.H., Shannon, W.D., Payton, J.E., Kulkarni, S., Westervelt, P., Walter, M.J., Graubert, T.A., Mardis, E.R., Wilson, R.K. & DiPersio, J.F. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481(7382)**:506-510.

Dombret, H. & Gardin, C. (2016) An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood* **127(1)**:53-61.

Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D. & European LeukemiaNet. (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115(3)**:453-474.

Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.F., Wei, A.H., Löwenberg, B. & Bloomfield, C.D. (2017) Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129(4)**:424-447.

Eichhorn, P., Creighton, M. & Bernards, R. (2009) Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1795(1)**:1-15.

Eppert, K., Takenaka, K., Lechman, E.R., Waldron, L., Nilsson, B., van Galen, P., Metzeler, K.H., Poepl, A., Ling, V., Beyene, J., Canty, A.J., Danska, J.S., Bohlander, S.K., Buske, C., Minden, M.D., Golub, T.R., Jurisica, I., Ebert, B.L. & Dick, J.E. (2011) Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* **17(9)**:1086-1093.

Gharbi-Ayachi, A., Labbé, J.C., Burgess, A., Vigneron, S., Strub, J.M., Brioude, E., Van-Dorselaer, A., Castro, A. & Lorca, T. (2010) The substrate of Greatwall kinase, Arpp19, controls mitosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *Science* **330**:1673-1677.

Girault, J.A., Horiuchi, A., Gustafson, E.L., Rosen N.L. & Greengard, P. (1990) Differential expression of ARPP-16 and ARPP-19, two highly related cAMP-regulated phosphoproteins, one of which is specifically associated with dopamine-innervated brain regions. *J Neurosci* **10(4)**:1124-1133.

Golemis, E.A., Scheet, P., Beck, T.N., Scolnick, E.M., Hunter, D.J., Hawk, E. & Hopkins, N. (2018) Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States. *Genes Dev* **32(13-14)**:868-902.

Greinert, R., de Vries, E., Erdmann, F., Espina, C., Auvinen, A., Kesminiene, A. & Schüz, J. (2015) European Code against Cancer 4th Edition: Ultraviolet radiation and cancer. *Cancer Epidemiol* **39**:75-83.

Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J. & Burnett, A.K.; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**(3):354-365.

Grimwade, D. & Mrózek, K. (2011) Diagnostic and Prognostic Value of Cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin* **25**:1135-1161.

Grimwade, D., Ivey, A. & Huntly, B. J. P. (2016) Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood* **127**:29-41.

Hached, K., Goguet, P., Charrasse, S., Vigneron, S., Sacristan, MP., Lorca, T. & Castro, A. (2019) ENSA and ARPP19 differentially control cell cycle progression and development. *J Cell Biol* **218**(2):541-558.

Hoffbrand, V. & Moss, P. (2015) Hoffbrand's Essential Haematology: Haemopoiesis, 7. painos, s. 1-11. John Wiley & Sons, New York.

Ho, P.A., Kutny, M.A., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Joaquin, J., Raimondi, S.C., Gamis, A.S. & Meshinchi, S. (2011) Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* **57**(2):204-209.

Huang, R. & Chen, G. (2011) Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1815**(2):158-169.

Hunter, T. (2012) Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**(1602):2513-2516.

Jiang, T., Zhao, B., Li, X. & Wan, J. (2016) ARPP-19 promotes proliferation and metastasis of human glioma. *NeuroReport* **27**:960-966.

Junttila, M.R., Puustinen, P., Niemelä, M., Ahola, R., Arnold, H., Böttzauw, T., Ala-aho, R., Nielsen, C., Ivaska, J., Taya, Y., Lu, S.L., Lin, S., Chan, E.K., Wang, X.J., Grénman, R., Kast, J., Kallunki, T., Sears, R., Kähäri, V.M. & Westermarck, J. (2007) CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell* **130**(1):51-62.

Kastrinsky, D.B., Sangodkar, J., Zaware, N., Izadmehr, S., Dhawan, N.S., Narla, G. & Ohlmeyer, M. (2015) Reengineered tricyclic anti-cancer agents. *Bioorg Med Chem* **23**(19):6528-6534.

Kauko, O. & Westermarck, J. (2018) Non-genomic mechanisms of protein phosphatase 2A (PP2A) regulation in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **96**:157-164.

Kauko, O., Imanishi, S.Y., Kuleskiy, E., Laajala, T.D., Yetukuri, L., Laine, A., Jumppanen, M., Haapaniemi, P., Ruan, L., Yadav, B., Suni, V., Varila, T., Corthals, G., Reimand, J., Wennerberg, K., Aittokallio, T. & Westermarck, J. (2018) Rules for PP2A-controlled phosphosignalling and drug responses. *BioRxiv* DOI: <https://doi.org/10.1101/271841>. [sähköinen ennakkajulkaisu]

Kauko, O. (2017) A systems biology analysis of PP2A functions in cancer cells. Turun yliopisto. Lääketieteen laitos. Väitöskirja.

Kiely, M. & Kiely, P. (2015) PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing? *Cancers (Basel)* **7(2)**: 648–669.

Kim, S., Nairn, A., Cairns, N. & Lubec, G. (2001) Decreased levels of ARPP-19 and PKA in brains of Down syndrome and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* **61**:263–272.

Kuusanmäki, H. (2018) Targeting key survival signaling pathways for the treatment of leukemia. Helsingin yliopisto. Lääketieteen laitos. Väitöskirja.

Kytölä, S. & Suomen Hematologiyhdistys Ry. (2018) ELN 2017 riskiluokitus. <<https://www.hematology.fi/fi/hoito-ohjeet/veritaudit/akuutit-leukemiat/aml/luokitus/eln-2017-riskiluokitus>>. (Luettu 12.3.2019).

Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., Harris, C.C., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Fulton, R.S., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J.R., Lin, L., O'Laughlin, M., McMichael, J.F., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Magrini, V.J., Vickery, T.L., Hundal, J., Cook, L.L., Conyers, J.J., Swift, G.W., Reed, J.P., Alldredge, P.A., Wylie, T., Walker, J., Kalicki, J., Watson, M.A., Heath, S., Shannon, W.D., Varghese, N., Nagarajan, R., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Link, D.C., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Mardis, E.R. & Wilson, R.K. (2010) DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **363(25)**:2424-2433.

Li, Y. & Xu, C. (2017) Human Papillomavirus-Related Cancers. *Adv Exp Med Biol* **1018**:23-34.

Lucas, C.M., Scott, L.J., Carmell, N., Holcroft, A.K., Hills, R.K., Burnett, A.K. & Clark, R.E. (2018) CIP2A- and SETBP1-mediated PP2A inhibition reveals AKT S473 phosphorylation to be a new biomarker in AML. *Blood Adv* **2(9)**:964-968.

Meeusen, B. & Janssens, V. (2018) Tumor suppressive protein phosphatases in human cancer: Emerging targets for therapeutic intervention and tumor stratification. *Int J Biochem Cell Biol* **96**:98-134.

Mochida, S., Maslen, S., Skehel, M. & Hunt, T. (2010) Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* **330(6011)**:1670-1673.

Mäkelä, E., Löyttyniemi, E., Salmenniemi, U., Kauko, O., Varila, T., Kairisto, V., Itälä-Remes, M. & Westermarck, J. (2019) Arpp19 Promotes Myc and Cip2a Expression and

Associates with Patient Relapse in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* **11(11)**: 1774.

NCBI. (2019) cAMP regulated phosphoprotein 19 (Homo sapiens (human)). <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10776>>. (Luettu 24.10.2019).

Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2013) Principles of Biochemistry: G Protein-Coupled Receptors and Second Messengers, 6. painos, s. 437-453. W. H. Freeman and Company, New York.

Nicholls, RE., Sontag, JM., Zhang, H., Staniszewski, A., Yan, S., Kim, CY., Yim, M., Woodruff, CM., Arning, E., Wasek, B., Yin, D., Bottiglieri, T., Sontag, E., Kandel, ER. & Arancio, O. (2016) PP2A methylation controls sensitivity and resistance to β -amyloid-induced cognitive and electrophysiological impairments. *Proc Natl Acad Sci* **113(12)**:3347-3352.

Noto, J. & Peek, R. (2017) The gastric microbiome, its interaction with *Helicobacter pylori*, and its potential role in the progression to stomach cancer. *PLoS Pathog* DOI: 10.1371/journal.ppat.1006573. [sähköinen ennakkojulkaisu]

Ocasio, C.A., Rajasekaran, M.B., Walker, S., Le Grand, D., Spencer, J., Pearl, F.M., Ward, S.E., Savic, V., Pearl, L.H., Hohegger, H. & Oliver, A.W. (2016) A first generation inhibitor of human Greatwall kinase, enabled by structural and functional characterisation of a minimal kinase domain construct. *Oncotarget* **7(44)**:71182-71197.

Ostronoff, F., Othus, M., Gerbing, R.B., Loken, M.R., Raimondi, S.C., Hirsch, B.A., Lange, B.J., Petersdorf, S., Radich, J., Appelbaum, F.R., Gamis, A.S., Alonzo, T.A. & Meshinchi, S. (2014) NUP98/NSD1 and FLT3/ITD coexpression is more prevalent in younger AML patients and leads to induction failure: a COG and SWOG report. *Blood* **124(15)**:2400-2407.

Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Roberts, N.D., Potter, N.E., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Gundem, G., Van Loo, P., Martincorena, I., Ganly, P., Mudie, L., McLaren, S., O'Meara, S., Raine, K., Jones, D.R., Teague, J.W., Butler, A.P., Greaves, M.F., Döhner, K., Schlenk, R.F., Döhner, H. & Campbell, P.J. (2016) Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **374(23)**:2209-2221.

Petersdorf, S.H., Kopecky, K.J., Slovak, M., Willman, C., Nevill, T., Brandwein, J., Larson, R.A., Erba, H.P., Stiff, P.J., Stuart, R.K., Walter, R.B., Tallman, M.S., Stenke, L. & Appelbaum, F.R. (2013) A phase 3 study of gemtuzumab ozogamicin during induction and postconsolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **121**:4854-4860.

Pippa, R., Dominguez, A., Malumbres, R., Endo, A., Arriazu, E., Marcotegui, N., Guruceaga, E. & Odero, MD. (2016) MYC-dependent recruitment of RUNX1 and GATA2 on the SET oncogene promoter enhances PP2A inactivation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **8(33)**:53989-54003.

Promega. (2018) CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. <https://fi.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570>. (Luettu 14.10.2018).

Rasche, M., Zimmermann, M., Borschel, L., Bourquin, J.P., Dworzak, M., Klingebiel, T., Lehrnbecher, T., Creutzig, U., Klusmann, J.H. & Reinhardt, D. (2018) Successes and challenges in the treatment of pediatric acute myeloid leukemia: a retrospective analysis of the AML-BFM trials from 1987 to 2012. *Leukemia* **32(10)**:2167-2177.

Rautenberg, C., Germing, U., Haas, R., Kobbe, G. & Schroeder, T. (2019) Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment. *Int J Mol Sci ecollection* **20(1)**:228.

Rowe, J. & Tallman, M. (2010) How I treat acute myeloid leukemia. *Blood* **116(17)**: 3147-3156.

Sangodkar, J., Perl, A., Tohme, R., Kiselar, J., Kastrinsky, D.B., Zaware, N., Izadmehr, S., Mazhar, S., Wiredja, D.D., O'Connor, C.M., Hoon, D., Dhawan, N.S., Schlatzer, D., Yao, S., Leonard, D., Borczuk, A.C., Gokulrangan, G., Wang, L., Svenson, E., Farrington, C.C., Yuan, E., Avelar, R.A., Stachnik, A., Smith, B., Gidwani, V., Giannini, H.M., McQuaid, D., McClinch, K., Wang, Z., Levine, A.C., Sears, R.C., Chen, E.Y., Duan, Q., Datt, M., Haider, S., Ma'ayan, A., DiFeo, A., Sharma, N., Galsky, M.D., Brautigam, D.L., Ioannou, Y.A., Xu, W., Chance, M.R., Ohlmeyer, M. & Narla, G. (2017) Activation of tumor suppressor protein PP2A inhibits KRAS-driven tumor growth. *J Clin Invest* **127(6)**:2081-2090.

Sents, W., Ivanova, E., Lambrecht, C., Haesen, D. & Janssens, V. (2013) The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J* **280(2)**:644-661.

Seshacharyulu, P., Pandey, P., Datta, K. & Batra, S.K. (2013) Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett* **335(1)**:9-18.

Sharma, K., D'Souza, R.C., Tyanova, S., Schaab, C., Wiśniewski, J.R., Cox, J. & Mann, M. (2014) Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Rep* **8(5)**:1583-1594.

Shiba, N., Yoshida, K., Shiraishi, Y., Okuno, Y., Yamato, G., Hara, Y., Nagata, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Terui, K., Kato, M., Park, M.J., Ohki, K., Shimada, A., Takita, J., Tomizawa, D., Kudo, K., Arakawa, H., Adachi, S., Taga, T., Tawa, A., Ito, E., Horibe, K., Sanada, M., Miyano, S., Ogawa, S. & Hayashi, Y. (2016) Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **175(3)**:476-489.

Shumilov, E., Flach, J., Kohlmann, A., Banz, Y., Bonadies, N., Fiedler, M., Pabst, T. & Bacher, U. Current status and trends in the diagnostics of AML and MDS. <<https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.04.008>>. (Luettu 4.11.2018).

Siegel, R., Miller, K. & Jemal, A. (2016) A Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* **66(1)**:7-30.

SEER Statistics. 2019. Cancer Stat facts: Leukemia-Acute myeloid leukemia. <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>>. (Luettu 27.9.2019).

Song, H., Pan, J., Liu, Y., Wen, H., Wang, L., Cui, J., Liu, Y., Hu, B., Yao, Z. & Jo, G. (2015) Increased ARPP-19 Expression Is Associated with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* **16**:178-192.

Thermo Fisher Scientific. Cell Cycle Assays for Flow Cytometry. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-assays-reagents/cell-cycle-assays-flow-cytometry.html?>>. (Luettu 21.10.2019).

Tohmé, R., Izadmehr, S., Gandhe, S., Tabaro, G., Vallabhaneni, S., Thomas, A., Vasireddi, N., Dhawan, NS., Ma'ayan, A., Sharma, N., Galsky, MD., Ohlmeyer, M., Sangodkar, J. & Narla, G. (2019) Direct activation of PP2A for the treatment of tyrosine kinase inhibitor-resistant lung adenocarcinoma. *JCI Insight eCollection* **4(4)**:125693.

Turun yliopistollinen keskussairaala. Allogeeninen kantasolujensiirto. <<http://www.vsshp.fi/fi/hoito-ja-tutkimukset/Sivut/kantasolujensiirrot-allogeeninen.aspx>>. (Luettu 18.11.2019).

Vicente, C., Arriazu, E., Martínez-Balsalobre, E., Peris, I., Marcotegui, N., García-Ramírez, P., Pippa, R., Rabal, O., Oyarzábal, J., Guruceaga, E., Prósper, F., Mateos, MC., Cayuela, ML. & Otero, MD. (2019) A novel FTY720 analogue targets SET-PP2A interaction and inhibits growth of acute myeloid leukemia cells without inducing cardiac toxicity. *Cancer Lett* DOI: 10.1016/j.canlet.2019.10.007. [sähköinen ennakkojulkaisu]

Vigneron, S., Sundermann, L., Labbé, J.C., Pintard, L., Radulescu, O., Castro, A. & Lorca, T. (2009) Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J* **28(18)**:2786-2793.

Vitali, C., Bassani, C., Chiodoni, C., Fellini, E., Guarnotta, C., Miotti, S., Sangaletti, S., Fuligni, F., De Cecco, L., Piccaluga, P.P., Colombo, M.P. & Tripodo, C. (2015) SOCS2 Controls Proliferation and Stemness of Hematopoietic Cells under Stress Conditions and Its Deregulation Marks Unfavorable Acute Leukemias. *Cancer Res* **75(11)**:2387-2399.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A Jr. & Kinzler, K.W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science* **339(6127)**:1546-1558.

World Health Organization (WHO). Cancer. <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. (Luettu 23.9.2019).

Wlodarchak, N. & Xing, Y. (2016) PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **51(3)**:162–184.

Zhao, Y., Wang, Y2. & Ma, S. (2018) Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. *Sci Rep eCollection* **8(1)**:548.

Zuazo-Gaztelu, I. & Casanovas, O. (2018) Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Front Oncol eCollection* **8**:248.

LIITTEET

Liite 1. Proteiini vasta-aineet

Vasta-aine	Alkuperä	Valmistaja
Anti-ARPP19	Kaniini, polyklonaalinen	11678-1-AP, Proteintech Group
Anti-CIP2A	Hiiri, monoklonaalinen	SC-80659, Santa Cruz Biotechnology
Anti-cMYC	Hiiri, monoklonaalinen	sc-40, Santa Cruz Biotechnology
Anti-Sykliini D1	Hiiri, monoklonaalinen	sc-450, Santa Cruz Biotechnology
Anti-I2PP2A (SET)	Hiiri, monoklonaalinen	SC-133138, Santa Cruz Biotechnology
Anti-CDK1	Hiiri, monoklonaalinen	sc-51578, Santa Cruz Biotechnology
Anti-b-aktiini	Hiiri, monoklonaalinen	A1978, Sigma
Anti-GAPDH	Hiiri, monoklonaalinen	5G4-6C5, HyTest
ECL HRP sekundaari vasta-aineet	Anti-hiiri, anti-kaniini	Agilent Dako, USA

Liite 2. RQ-PCR alukkeiden ja koettimien sekvenssit

Kohde-geeni	Forward-alue	Koetin	Reverse-alue
ARPP19	cagagggagcactatgtctgc	aggagcag*	gctttaatttgcctctctg ct
CIP2A	cagtctggactgagaatattattg a	tccactgc*	ggcattgttgctgcatac ttt
b-aktiini	tcaccacactgtgccatctacg c	atgccctccccatgccatcctg cgt	cagcggaaaccgctcattg ccaatgg
GAPDH	accactctccaccttga	acgaccattgtcaagctcatt cctggt	ttgctgtagcceaattcgtt gt

*Rochen Universaali ProbeLibrary (UPL) -koetin

Liite 3. Lääkeainetestauksessa käytetyt lääkeainepitoisuudet

Lääkeaine	Testi 1	Testi 2
	Pitoisuus alue (nM)	Pitoisuus alue (nM)
Anagrelide	1; 10; 100; 1000; 10 000	100; 1000; 10 000; 50 000; 100 000
Tretinoin	1; 10; 100; 1000; 10 000	10; 100; 1000; 10 000; 100 000
Tacrolimus	1; 10; 100; 1000; 10 000	100; 1000; 10 000; 50 000; 100 000
Abiraterone (CB-7598)	0.5; 5; 50; 500; 5000	5; 50; 500; 5000; 50 000
Lenalidomide	10; 100; 1000; 10 000; 100 000	1000; 10 000; 100 000; 500 000; 1 000 000
Dasatinib	0.1; 1; 10; 100; 1000	0.1; 1; 10; 100; 1000
Selumetinib (AZD6244)	1; 10; 100; 1000; 10 000	10; 100; 1000; 10 000; 100 000
XAV-939	1; 10; 100; 1000; 10 000	10; 100; 1000; 10 000; 100 000
Staurosporiini	1 µM	1µM