

Petra Pussinen & Emilia Salmivaara

**VAL201-PEPTIDIN VAIKUTUS ETURAUHASSYÖPÄSOLUJEN
SIGNAALINVÄLITYKSEEN**

**VAL201-PEPTIDIN VAIKUTUS ETURAUHASSYÖPÄSOLUJEN
SIGNAALINVÄLITYKSEEN**

Petra Pussinen
Emilia Salmivaara
Opinnäytetyö
Kevät 2015
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijät: Pussinen, Petra. Salmivaara, Emilia.

Opinnäytetyön nimi: VAL201-peptidin vaikutus eturauhassyöpäsolujen signaalinvälitykseen

Työn ohjaajat: Mäkitalo, Outi. Rasi, Simo. Reponen, Paula. Salmivaara, Jani.

Työn valmistumislukukausi- ja vuosi: Kevät 2015

Sivumäärä: 49 + 6

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli tutkia potentiaalisen eturauhassyöpälääkemolekyylin VAL201-peptidin vaikutusta eturauhassyöpäsolujen signaalinvälitykseen. Työn tilasi Oulun ammattikorkeakoulun tiloissa toimiva Valirx Plc:n tytäryhtiö Valirx Finland Oy. Työ toteutettiin yhteistyössä Oulun ammattikorkeakoulun ja Oulun yliopiston fysiologian laitoksen kanssa.

Työlle asetettiin tavoitteiksi tutkia, estääkö VAL201 Src-kinaasin aktivoitumisen androgeenien vaikutuksesta eturauhassyöpäsolulinjoissa, sekä selvittää Src:n soveltuvuutta merkkiaineeksi VAL201-lääkemolekyylin vaikutuksen seuraamiselle.

Työtä varten viljeltiin kahden eturauhassyöpäsolulinjan, PC-3- ja LNCaP-soluja, joille tehtiin hormonikäsittely lisäämällä testosteronia, synteettistä androgeeniä R1881, 5- α -dihydrotestosteronia tai β -estradiolia joko VAL201-peptidin kanssa tai ilman sitä. Solut hajotettiin ja määritettiin proteiinipitoisuus. Kaupallisella immunokemiallisella menetelmällä mitattiin fosforyloidun Src:n määrää hormoneilla stimuloituissa ja stimuloimattomissa soluissa signaalireittien aktivoitumisen ja lääkemolekyylin vaikutuksen tutkimiseksi. Pitoisuuserojen havaitsemiseksi tuloksista muodostettiin pylväsdiagrammit.

Menetelmällä saadut tulokset jäivät negatiivisen kontrollin tasolle, eli tulokset olivat vain taustasignaalia. Koska Src:n signaalia ei saatu näkyviin, tutkimuksen tavoitteisiin ei päästy, eikä VAL201-lääkemolekyylin vaikutusta Src:in aktivoitumiseen voitu tutkia tämän työn perusteella.

Koejärjestelyä voitaisiin mahdollisesti yrittää optimoida Src:n signaalitason kasvattamiseksi. Käytetty kaupallinen menetelmä ei kuitenkaan välttämättä ollut luotettava fosforyloidun Src:n tutkimiseen, eikä Src ehkä ole paras mahdollinen merkkiaine VAL201-lääkemolekyylin vaikutukselle. VAL201:n vaikutuksen tutkimiseksi sekä sopivan merkkiaineen löytämiseksi tarvitaan lisätutkimuksia.

Asiasanat: VAL201-peptidi, Src-kinaasi, androgeenireseptori, signaalinvälitys, eturauhassyöpä, soluviljely

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

Authors: Pussinen, Petra. Salmivaara, Emilia.

Title of thesis: The Effect of VAL201 peptide on Signaling of Prostate Cancer Cells

Supervisors: Mäkitalo, Outi. Rasi, Simo. Reponen, Paula. Salmivaara, Jani.

Term and year when the thesis was submitted: Spring 2015

Number of pages: 49 + 6

This thesis was contracted to us by Valirx Finland Oy and was part of Valirx Plc's anti-cancer drug development project. The study was done at Oulu University of Applied Sciences and the Department of Physiology of Oulu University.

The aims of the study were to examine if a novel anti-cancer drug VAL201-peptide has an inhibitory effect on activation of Src induced by androgens in prostate cancer cells, and to assess the potential of Src as a marker protein for the effect of VAL201-peptide.

Two common prostate cancer cell lines PC-3 and LNCaP were cultured and treated with different hormones in the presence or absence of VAL201-peptide in varying exposure times. The cells were then lysed and the protein concentration was measured. The activation of cell signaling by hormones and the effect of VAL201 were investigated by measuring the amount of phosphorylated Src in stimulated and non-stimulated cells with a commercial immunoassay kit.

The immunoassay results remained on the level of the negative control. Since phosphorylation of Src could not be seen in either stimulated or non-stimulated cells, the aims of the study could not be reached and the effect of VAL201-peptide on Src activation could not be examined based on this work.

The experiment could be optimized to increase the Src signal level. However, the commercial method used was not necessarily a reliable method for measuring phosphorylated Src. Also, Src may not be the best marker for the effect of VAL201-peptide. Further studies are needed to investigate the effect of VAL201 and to find a suitable marker for it.

Keywords: VAL201 peptide, Src-kinase, androgen receptor, signaling, prostate cancer, cell culture

LYHENNELUETTELO

AR	Androgeenireseptori
DHEA	Dehydroepiandrosteroni
DHT	5- α -dihydrotestosteroni
EGFR	Kasvutekijäreseptori (Epidermal growth factor receptor)
EMT	Epiteeli-mesenkyymitransitio
ERK	Proteiinikinaasiperhe (Extracellular-signal-regulated kinase)
GnRH	Gonadotropiineja vapauttava hormoni
LH	Luteinisoiva hormoni
LNCaP	Eturauhassyöpäsolulinja (Lymph Node Carcinoma of the Prostate)
MAPK	Mitogeeniaktivoitu proteiinikinaasi
PAP	Hapan fosfataasientsyymi (Prostatic Acid Phosphatase)
PC-3	Eturauhassyöpäsolulinja (Prostate Cancer)
PIN	Epiteelinsisäinen neoplasia (Prostatic intraepithelial neoplasia)
<i>PTEN</i>	Tuumorisupressorigeeni (Phosphatase and Tensin homolog)
PSA	Prostataspesifinen antigeeni
Ras	Proteiiniperhe
SAPE	Streptavidiinifykoerytriini
SFK	Src-perheen kinaasi
SH	Src-homologia-alayksikkö
<i>Src, Src</i>	Proto-onkogeeni ja sen geenituote, proteiinityrosiinikinaasi
SRC	Steroidihormonikoaktivaattoriperhe
VEGF	Verisuonen endoteelin kasvutekijä (Vascular endothelial growth factor)

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	7
2	TIETOPERUSTA.....	10
2.1	Eturauhassyöpä.....	10
2.1.1	Eturauhasen rakenne.....	10
2.1.2	Eturauhassyövän yleisyys ja oireet.....	12
2.1.3	Eturauhassyövän hoito.....	13
2.1.4	Syövän molekulaarinen perusta.....	14
2.1.5	Eturauhassyövän molekyyli­genetiikka.....	15
2.2	Androgeenivälitteinen säätely.....	18
2.2.1	Androgeenit.....	18
2.2.2	Androgeenireseptori.....	19
2.2.3	Src.....	23
2.2.4	VAL201-peptidi.....	28
3	TUTKIMUSTEHTÄVÄT JA METODOLOGIA.....	29
3.1	Kehittäm­is- ja tutkimustehtävän kuvaus.....	29
3.2	Soluviljely.....	30
3.3	LNCaP- ja PC-3-solulinjat.....	31
3.4	Immunokemiallinen määrittäys.....	32
4	TUTKIMUSMENETELMÄT.....	35
4.1	Soluviljely.....	35
4.2	Hormonikäsittely.....	35
4.2	Proteiinimäärittäys.....	36
4.3	Immunokemiallinen määrittäys.....	37
5	TULOKSET.....	38
6	POHDINTA.....	40
	LÄHTEET.....	42
	LIITTEET.....	50

1 JOHDANTO

Eturauhanen on miehen virtsarakon alapuolella sijaitseva androgeeneille herkkä lisäsukupuolirauhanen, jonka normaali kehittyminen ja toiminta vaativat androgeenien ja muiden hormonien läsnäoloa (Heinlein & Chang 2004, 276–308; Oh ym. 2003). Eturauhassyöpä on länsimaissa miesten yleisin syöpä ja toiseksi yleisin syöpäkuolemien syy (Suomen Syöpärekisteri 2012, hakupäivä 13.1.2015).

Eturauhasen syöpä on monimuotoinen sairaus, joka voi alkaa monesta eri kohdasta eturauhaskudosta. Syöpä on myös herkkä metastasoitumaan imusolmukkeisiin ja luustoon. Siksi jokaisen eturauhassyöpätapauksen hoidon suunnittelu on tehtävä yksilöllisesti. (Bostwick ym. 1998, 995–2002.)

Diagnosointivaiheessa suurin osa eturauhassyövistä on riippuvaista androgeeneista ja syöpäsolut reagoivat solunsisäistä testosteronipitoisuutta vähentävään androgeenideprivaatiohoitoon tai androgeenireseptorin (AR) toimintaa inhiboiviin antiandrogeeneihin (Heinlein & Chang 2004, 276–308). Androgeenideprivaatio on myös ensisijainen hoitokeino metastasoituneelle eturauhassyövälle, jossa alkuperäistä kasvainta ei enää hyödytä leikata (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35).

Hormonihoitojen ongelmana on, etteivät ne tehoa kaikkiin syöpätyyppeihin. Tämän lisäksi toimiessaankin hormonihoidot johtavat lopulta kastroatioresistenttien syöpäsolujen kehittymiseen, jolloin androgeenideprivaatiosta selvinneet syöpäsolut ovat sopeutuneet alhaiseen androgeenitasoon. Tällöin syöpäsolut kasvavat matalasta seerumin androgeenipitoisuudesta huolimatta ja syöpä uusiutuu. (Dawson 2000, 409–416; Heinlein & Chang 2004, 276–308.)

Kastroatioresistentin eturauhassyövän ennuste on huono, ja vain alle puolet potilaista on elossa seuraavan kahden vuoden kuluttua. Lisäksi hormonihoitojen

haittapuolena ovat lukuisat sivuvaikutukset, koska ne estävät AR:n toimintaa ja vaikuttavat siten hyvin laajasti myös androgeeni/AR-säätelyn alaisten normaalien solujen toimintaan. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

Kastraatioresistenttiin eturauhassyöpään ei ole vielä olemassa toimivaa hoitoa. Lääkekehityksen tavoitteena on löytää tehokas, spesifisesti syöpäsoluihin vaikuttava lääkeaine ilman vaikeita haittavaikutuksia. Suuri osa nykyisin kehitteillä olevista syöpälääkkeistä perustuu signaalinvälittäjä Src-inhibiittoreihin, jotka ovat joko epäspesifisiä ja sitoutuvat muihinkin reseptoreihin tai inhiboivat Src:n toiminnan kokonaan. Koska Src toimii eräänlaisena signaalireittien tienristeyksenä, on sen rooli soluissa tärkeä ja vaikutukset solujen toimintaan hyvin monipuoliset. (Parsons & Parsons 2004, 7906–7909; Vlaeminck-Guillem ym. 2014, 1–10.) Src:n inhibitiolla on siis laajat vaikutukset paitsi syöpäsolujen, myös normaalien solujen toimintaan, minkä seurauksena potilailla ilmenee sivuvaikutuksia.

Uusin lupaava lääkemolekyylä eturauhassyövän hoitoon perustuu VAL201-peptidiin, joka on tällä hetkellä kiivaan tutkimuksen ja lääkekehityksen alla. Peptidistä ollaan kehittämässä suun kautta otettavaa tulevaisuuden syöpälääkettä. VAL201 on potentiaalinen lääke paitsi kastraatioresistentin eturauhassyövän hoitoon, myös estämään eturauhassyövän kasvua ja metastasoitumista taudin aiemmissa vaiheissa. Lisäksi VAL201 olisi vaihtoehto kemialliselle tai kirurgiselle kastraatiolle. VAL201 ei aiheuta AR:n transkriptionaalisen aktiivisuuden estämisestä aiheutuvia sivuvaikutuksia. Se eroaa myös muista Src-inhibiittoreihin perustuvista lääkkeistä, koska se ei vaikuta kaikkiin Src:n signaalireitteihin, vaan estää spesifisesti androgeeni/AR-välitteistä Src:n aktivaatiota ja solujen proliferaatiota. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia potentiaalisen eturauhassyöpälääkkeen VAL201:n vaikutusta eturauhassyöpäsolujen androgeenireseptoriin ja sen signaalinvälitykseen Src-kinaasin kautta. Tavoitteena oli tutkia, estääkö VAL201 Src:n aktivoitumisen androgeenien vaikutuksesta eturauhassyöpäsolulinjoissa. Samalla haluttiin selvittää myös

Src:n soveltuvuutta markkeriproteiiniksi VAL201-lääkemolekyylin vaikutuksen seuraamiseen.

2 TIETOPERUSTA

2.1 Eturauhassyöpä

Eturauhassyöpä on Suomessa ja maailmanlaajuisesti merkittävä miesten syöpäkuolemien syy (Suomen Syöpärekisteri 2012, hakupäivä 13.1.2015). Etenkään aggressiiviseen syöpään ei vielä nykyäänkään ole toimivaa hoitokeinoa, joten uusien tehokkaampien ja spesifisempien lääkkeiden kehittäminen on tärkeää.

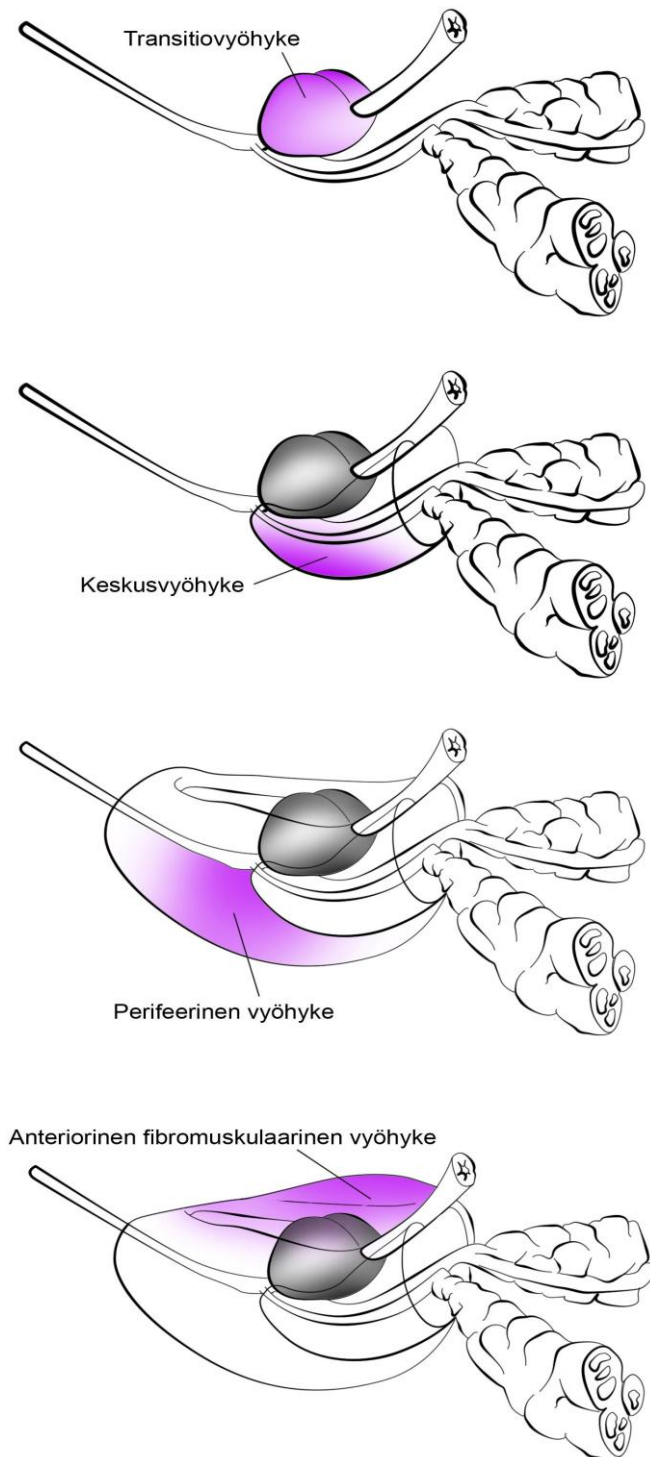
2.1.1 Eturauhasen rakenne

Eturauhanen on miehen lisäsukupuolirauhanen, joka sijaitsee virtsarakon alapuolella ympäröiden virtsaputkea ja siemenjohtimien loppuosia eli siemenheittotiehyeitä. Halkaisijaltaan eturauhanen on noin 4 cm ja painoltaan noin 20–25 g. Eturauhasen tehtävänä on erittää osa siemennesteestä ja taata siittiöiden selviäminen ja hyvä liikkuvuus. (Oh ym. 2003.)

Elin koostuu eksokriinisestä eli avoeritteisestä rauhasepiteelistä sekä sen alaisesta sidekudoksen ja sileiden lihassolujen muodostamasta stroomasta (Taari ym. 2013, 35). Rauhasepiteelisolut ovat eturauhasen pääsolutyyppejä, niiden kasvu on androgeeni-riippuvaista ja ne erittävät prostataspesifistä antigeeniä (Prostate Specific Antigen, PSA). Epiteelin alainen erilaistumaton tyvisolukerros ei ole androgeeneista riippuvaista, ja sen uskotaan tuottavan kantasoluja epiteelisoluille. (Oh ym. 2003.)

Eturauhanen jaetaan neljään eri vyöhykkeeseen, joita ovat perifeerinen vyöhyke, transitio- eli välivyöhyke, sentraalinen eli keskusvyöhyke sekä anteriorinen fibromuskulaarinen vyöhyke, joka ei sisällä lainkaan rauhaskudosta (kuvio 1.). Vyöhykkeistä suurin, perifeerinen vyöhyke, sijaitsee lähimpänä peräsuolta ja on yleisin kehityspaikka karsinoomille. Transitio- eli välivyöhyke sijaitsee eturauhasen keskiosassa molemmiin puolin virtsaputkea. Eturauhasen

hyvänlaatuinen liikakasvu alkaa yleensä transiiovyöhykkeeltä. Siemenheittotiehyet kulkevat parillisen keskusvyöhykkeen lävitse. (Oh ym. 2003; Taari ym. 2013, 35.)



KUVIO 1. Eturauhasen neljä vyöhykettä. (Mukaiillen: Oh ym. 2003).

2.1.2 Eturauhassyövän yleisyys ja oireet

Eturauhassyöpä on länsimaissa miesten yleisin syöpä ja toiseksi yleisin syöpäkuolemien syy. Suomessa todetaan keskimäärin 5000 tapausta vuodessa ja tautiin kuolee vuosittain noin 800 miestä. Sairastuneiden keski-ikä on noin 71 vuotta ja alle 50-vuotiailla tauti on harvinainen. (Suomen Syöpärekisteri 2012, hakupäivä 13.1.2015.) Eturauhassyövän ennuste on parantunut viimeisten 15 vuoden aikana. Sairastuneiden suhteellinen elossaolo-osuus on 93 % viiden vuoden kuluttua. Jos eturauhassyöpä on levinnyt, pitkälle edennyt ja etäpesäkkeitä lähettänyt, on sairastuneiden elinajanodote 2–3 vuotta. (Taari ym. 2013, 252, 261–262.)

Eturauhassyövän syntymisen syitä ei vielä tarkkaan tiedetä. Tunnetuimpia riskitekijöitä ovat ikä, etninen tausta, ylipaino, runsas rasvankäyttö ja tupakointi (Norlén & Schenkmanis 2008, 13–17). Ikä on riskitekijöistä suurin, koska eturauhasen syövässä sairastumisriski nousee iän myötä enemmän kuin missään muussa syövässä (Gelman 2008, 71–97). Myös suurentunut miessukupuolihormonipitoisuus voi mahdollisesti lisätä eturauhassyövän riskiä. Perinnöllistä tyyppiä on noin 2–3 % eturauhassyövistä ja perheittäin esiintyviä syöpiä on noin 20 %. (Taari ym. 2013, 252.) Lisäksi epigeneettisten muutosten on havaittu vaikuttavan eturauhassyövän syntyyn (Joensuu 2013, 562). Yli 95 % syöpätyypeistä on adenokarsinomia, jotka alkavat eturauhasen pinnan rauhasepiteelistä (Oh ym. 2003).

Eturauhanen voi kasvaa iän mukana. Yleensä tämä on hyvänlaatuista liikakasvua, joka aiheuttaa virtsan tulon häiriötä, virtsaamistarpeen lisääntymistä sekä yöllistä virtsaamispakkoa. Syöpä puolestaan voi olla oireeton ja aiheuttaa vasta pitkälle edenneenä samankaltaisia oireita kuin hyvänlaatuinen liikakasvu. (Rosenberg & Östenberg 2008, 6–7.) Alkuun hitaasti kehittyvä eturauhassyöpä ilmeneekin vasta myöhemmin iäkkäämmillä potilailla. Vanhemmilla ihmisillä ehtii usein puhjeta muita tauteja, kuten sydän- ja verisuonisairauksia, tai potilas voi ehtiä kuolla ennen kuin syöpä huomataan. Diagnoisoimattomia ja oireettomia eturauhasen syöpiä löytyykin kuolinsyytutkimuksissa yli puolelta yli 80-vuotiaista miehistä. (Joensuu 2002, 262; Norlén & Schenkmanis 2008, 11.)

Pidemmälle edenneen syövän oireita ovat verivirtsaisuus, toistuvat virtsatulehdukset, alavatsakivut, ristiselkäsärky sekä laihtuminen, väsyminen ja yleistilan heikkeneminen (Rosenberg & Östenberg 2008, 6–7). Leviävä eturauhassyöpä lähettää etäpesäkkeitä elimistöön, ensimmäiseksi eturauhasen lähellä oleviin imusolmukkeisiin ja lopulta luustoon, tavallisimmin luuytimeen sekä selkärankaan lantion alueelle. Noin viidesosalla syöpä huomataankin vasta sen tehtyä etäpesäkkeen luustoon, jolloin oireina voivat olla luustokipu tai luunmurtuma. (Norlén & Schenkmanis 2008, 26; Taari ym. 2013, 253.)

2.1.3 Eturauhassyövän hoito

Eturauhasen syöpä on heterogeeninen ja hyvin monimuotoinen sairaus, joka voi alkaa monesta eri kohdasta eturauhaskudosta, ja syövällä on monipuolisia kliinisiä sekä morfologisia ilmenemismuotoja. Näiden syiden vuoksi jokainen eturauhassyöpä onkin hyvin yksilöllinen, ja myös hoito on suunniteltava tapauskohtaisesti. (Bostwick ym. 1998, 995–2002.)

Syövän kliininen luokitus, PSA-pitoisuus, kasvaimen levinneisyys ja koko, sekä potilaan ikä, yleiskunto ja mahdolliset muut sairaudet vaikuttavat eturauhassyövän hoitopäätökseen. Myös potilaan ja omaisten toiveet huomioidaan hoitoja suunniteltaessa. Mahdollisia hoitomuotoja ovat seuranta, hormoni- tai sädehoito, sekä leikkaus. (Taari ym. 2013, 255.)

Paikallisten, pienen tai kohtalaisen riskin syöpien hoidoksi voi riittää seuranta, jos potilaan odotettavissa oleva elinikä on todennäköisesti alle kymmenen vuotta diagnoosista eikä syöpä aiheuta oireita. Mikäli syöpä alkaa levitä ja oirehtia, aloitetaan hoidot. Pieniä hyvän ennusteen syöpiä hoidetaan aktiiviseurannalla ja pyrkimällä kartoittamaan leviämään lähtevät tapaukset, jotta potilaat ehditään hoitaa parantavasti ajoissa ennen syövän leviämistä. Paikallista eturauhassyöpää voidaan hoitaa sädehoidolla tai leikkauksella, mutta jo etäpesäkkeitä lähettänyttä eturauhassyöpää hoidetaan

hormonihoidoilla. (Rosenberg & Östenberg 2008, 13, 15–16; Taari ym. 2013, 255.)

Noin 80–90 % eturauhassyövistä on diagnosointivaiheessa riippuvaisia androgeeneista eli miessukupuolihormoneista, ja solunsisäisen testosteronipitoisuuden vähentyminen aiheuttaa apoptoosin suurimmalle osalle syöpäkasvainsoluista (Heinlein & Chang 2004, 276–308). Hormonihoitoina käytetäänkin androgeenideprivaatiota, jossa estetään kivesten testosteronituotanto joko kemiallisella tai kirurgisella kastratiolla tai estrogeenihoidolla (Taari ym. 2013, 258). Sen varjopuolena ovat erilaiset sivuvaikutukset kuten impotenssi ja luumassan menetys (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35). Toinen hormonihoitomuoto on käyttää anti-androgeeneja, jotka salpaavat androgeenireseptorin ja siten estävät androgeenien kiinnittymisen siihen (Taari ym. 2013, 258).

Androgeenideprivaatio on ensisijainen hoitokeino metastasoituneelle eturauhassyövälle, jossa alkuperäisen kasvaimen leikkaaminen ei enää auta. Kuitenkaan hormonihoidot eivät aina tehoa loppuun saakka, sillä eturauhassyöpäsolut voivat sopeutua matalaan androgeenitasoon hoidon edetessä. Liki kaikki potilaat, joilla on metastasoitunut syöpä, tulevat lopulta resistenteiksi androgeenideprivaatiolle, ja syöpä muuntuu kastratioresistenttiin muotoon. Kastratioresistentin eturauhassyövän ennuste on huono, alle 50 % potilaista on elossa kahden vuoden kuluttua. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

2.1.4 Syövän molekulaarinen perusta

Syövät syntyvät vaihteittain erilaisten mekanismien kautta. Yksittäisiin soluihin voi syntyä yksi tai useampia mutaatioita, jotka johtavat pahanlaatuisiin muutoksiin. Normaaleissa soluissa olevat esisyöpägeenit eli proto-onkogeenit voivat mutatoitua syöpägeeneiksi eli onkogeeneiksi pistemutaatiolla,

monistamalla, tai translokaation siirtäessä proto-onkogeenin vilkkaamman promoottorin alle. Yleensä proto-onkogeenit ovat geenejä, jotka edesauttavat solusyklin etenemistä tai inhiboivat apoptoosia. Mutaatioita löytyy etenkin dominanteista onkogeeneistä, jotka vaikuttavat solun fenotyyppiin huolimatta normaalista alleelista. (Germann 2008, 71–97.)

Syövän patogeneesin aikana DNA:han voi kohdistua myös muunlaisia muutoksia, joissa emäsjärjestys ei kuitenkaan muutu. Nämä epigeneettiset mekanismit aiheuttavat DNA:n metylaatiota promoottorialueilla, jotka eivät normaaleissa soluissa ole metyloituneita. Syöpäsoluissa promoottorialueen hypermetylaatio johtaa geenien transkription vaimenemiseen, mikä puolestaan voi inaktivoida tuumorisuppressorigeenien eli kasvunrajoitegeenien toimintaa. (Joensuu ym. 2013, 18.) Tuumorisuppressorigeenit ovat vastuussa solusyklin kontrolloinnista, apoptoosista tai DNA-vaurioiden korjaamisesta. Näiden geenien inaktivoituminen voi syöstä solun kontrolloimattomaan jakautumiseen ja johtaa syöpäkasvaimen syntyyn. (Alberts ym. 2002, 1340–1349.)

Syövän syntyminen vaatii yleensä useamman kuin vain yhden muutoksen solun toiminnassa (Alberts ym. 2002, 1340–1349). Syöpäsoluilla solusyklin ja apoptoosin säätely on häiriintynyt, ne ovat heikosti erilaistuneita ja jakautuvat hallitsemattomasti. Monet syöpäsolut voivat myös tuottaa telomeraasientsyymiä ja sen vuoksi pystyvät jakautumaan loputtomasti. Syöpäsolut eivät enää muistuta lähtökudoksen soluja, eivätkä ne kiinnity tyvikalvoon tai toisiinsa, vaan voivat liikkua imusuoniston tai verisuoniston mukana ja metastasoitua ympäri kehoa. (Alberts ym. 2002, 1340–1349; Joensuu ym. 2013, 26.)

2.1.5 Eturauhassyövän molekyylligenetiikka

Suurin osa eturauhasen syövästä on epiteelisoluista lähtöisin olevia adenokarsinomia, jotka kehittyvät monen vaiheen kautta. Ikääntyessä DNA:han kertyy hapettumisvaurioita, jotka voivat johtaa karsinogeneesiin eturauhasessa. Epigeneesi voi hypermetyloidä oksidatiivista vaikutusta estävien

geenien promoottorialueita ja siten tehostaa hapettumisvaurioiden syntyä. Epigeneesin vuoksi oksidatiivista vaikutusta vastaan toimivien geenien ekspressio voi vähentyä, jolloin DNA:n alttius hapetuksen vaurioille lisääntyy. DNA-vaurioiden kasautuminen aiheuttaa normaalin eturauhasen epiteelisolukon muuntumisen epiteelinsisäiseksi neoplasiaksi (prostatic intraepithelial neoplasia, PIN), kuvio 2. (Gelman 2008, 71–97.)

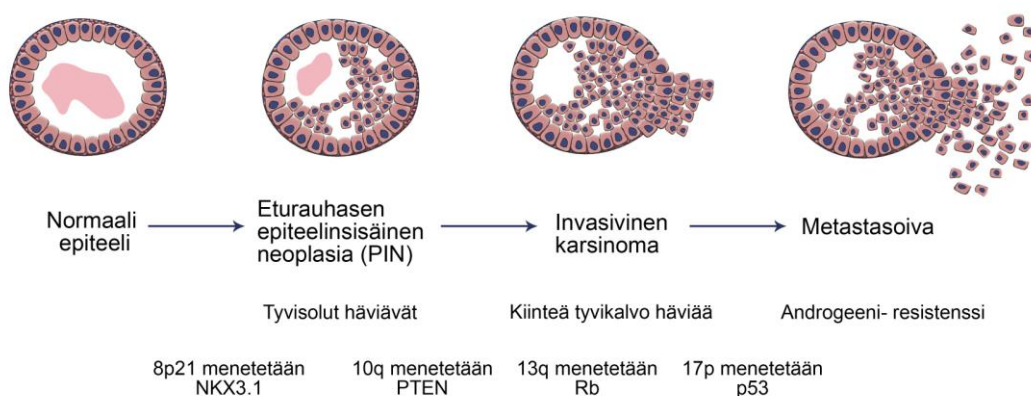
PIN on karsinogeneesin aikaisin vaihe, joka muistuttaa biokemiallisista ja geneettisiltä muutoksiltaan enemmän syöpää kuin normaalia epiteeliä, mutta sillä on vielä kiinteä tyvikalvo, joten se ei ole invasiivinen stroomaan (Bostwick ym. 1993, 298–310). PIN-solut eivät vielä tuota normaalia suurempaa määrää PSA:ta. Yleisemmin PIN saa alkunsa eturauhasen perifeerisestä osasta ja muodostaa useita pesäkkeitä rauhasepiteeliin. PIN on todennäköisin adenokarsinoomaa edeltävä syövän esiaste. PIN-soluilla ja alkavalla adenokarsinoomalla solujen proliferaatio on lisääntynyt 7–10-kertaiseksi, ja apoptoosi puolestaan vähentynyt 60 % normaaleihin eturauhasen epiteelisoluihin nähden. (Abate-Shen & Shen 2000, 2410–2434; Bostwick & Qian 2004, 360–379.)

Seuraava vaihe adenokarsinooman kehitymisessä voi olla esimerkiksi tuumorisuppressorigeeni *PTEN*:n (Phosphatase and Tensin homolog) deleetio tai inaktivaatio hypermetyloinnin seurauksena. Tämä johtaa edelleen kohonneeseen soluproliferaatioon ja apoptoosin vähenemiseen, jolloin PIN muuntuu adenokarsinoomaksi. (Gelman 2008, 71–97.) *PTEN* on androgeenireseptorin (AR) transkriptionaalisen aktiivisuuden negatiivinen säätelygeeni, jonka toiminnan lakkaaminen voi helpottaa AR:n signaloinnin aktivaatiota ja siten vaikuttaa eturauhassyövän kehittymiseen sekä etenemiseen (Nan ym. 2003, 169–183). *PTEN*:in on huomattu puuttuvan tai mutatoituneen useimmissa eturauhassyöpäsolulinjoissa (McMemamin ym. 1999, 4291–4296).

PIN:in muuntuminen adenokarsinoomaksi ei kuitenkaan johdu vain yhden tuumorisuppressorigeenin aktiivisuuden vähentymisestä, vaan syövän etenemiseen voi johtaa usean eri tuumorisuppressorigeenin hypermetylointi

(Abate-Shen & Shen 2000, 2410–2434; Gelmann 2008, 71–97). Adenokarsinoomassa eturauhasen epiteelistä puuttuvat tyvisolut ja pahanlaatuisten syöpäsolujen proliferaatio on muuttunut hallitsemattomaksi, mutta solut ovat osittain erilaistuneita ja muodostavat rauhassolukkoa. Solut myös ekspressoivat edelleen AR:a sekä PSA:ta. (Tai ym. 2011, 1668–1679.)

Adenokarsinooma voi edetä metastasoivaan vaiheeseen monien eri mekanismien vaikutuksesta (Abate-Shen & Shen 2000, 2410–2434). Esimerkiksi solusykliä ja apoptoosia säätelevän *p53*-tuumorisuppressorigeenin mutaatio aiheuttaa karsinooman muuttumisen invasiiviseksi ja edesauttaa luometastaasien syntymistä. *p53* inhiboi solusyklin etenemistä vaiheesta G1 vaiheen S interfaasiin, antaen soluille aikaa korjata DNA-vaurioita ennen jakautumista ja estäen siten mutatoituneen DNA:n replikaation. Mutaatio *p53*-geenissä voi johtaa geneettisesti epävakaisiin ja pahanlaatuisiin soluihin. (Eastham ym. 1995, 1111–1118.) *p53*-mutaatiota onkin havaittu sekä aikaisen vaiheen leviävissä eturauhassyövissä, että myös pitkälle edenneissä metastasoivissa syövässä (Abate-Shen & Shen 2000, 2410–2434).



KUVIO 2. Eturauhassyövän etenemiseen voi johtaa usean eri tuumorisuppressorigeenin hypermetylointi, jolloin geenien toiminta voi inaktivoitua. Kuvassa *NKX3*, *PTEN*, *Rb* sekä *p53* ovat tuumorisuppressorigeenejä. (Mukailten: Abate-Shen & Shen 2000).

2.2 Androgeenivälitteinen säätely

Androgeenivälitteinen säätely on tärkeää eturauhassyövän kehittymiselle ja etenemiselle, ja syövän hoidossa käytetäänkin androgeenien vaikutusta estäviä hormonihoitoja (Heinlein & Chang 2004, 276–308). Eturauhassyövän hormoniriippuvaisen luonteen vuoksi androgeenivälitteinen säätely on hyvä kohde lääkekehitykselle, ja uusilla lääkeaineilla pyritään vaikuttamaan spesifisemmin androgeenien solunsisäisiin signaalireitteihin.

2.2.1 Androgeenit

Eturauhanen on androgeeneille eli miessukupuolihormoneille herkkä elin, jonka normaali kehittyminen ja toiminta vaativat androgeenien ja muiden hormonien läsnäoloa. Myös eturauhasen sairauksien, kuten hyvänlaatuisen liikakasvun sekä eturauhassyövän kehittyminen ja eteneminen ovat riippuvaisia androgeeneista. Androgeenit ovat steroidihormoneja, jotka pystyvät läpäisemään solukalvon ja joilla on solunsisäinen reseptori. (Heinlein & Chang 2004, 276–308.)

Tärkein androgeeni on kivesten tuottama testosteroni, joka edustaa 90 % kaikista verenkierrossa olevista androgeeneista. Lisäksi lisämunuaisten kuorikerros tuottaa androgeeneja kuten dehydroepiandrosteronia (DHEA) ja androstenediolia, jotka muodostavat loput 10 % verenkierron androgeeneista. (Eisenberger 2008, 339–354.)

Testosteronin eritystä säätelee hypotalamus-aivolisäke-kivesakseli. Aivojen välipohjassa sijaitseva hypotalamus tuottaa ja vapauttaa gonadotropiineja vapauttavaa hormonia (GnRH), joka puolestaan stimuloi aivolisäkkeen etulohkon syntetisoimaan ja vapauttamaan luteinisoivaa hormonia (LH). LH:n vapautus aivolisäkkeestä indusoi testosteronin tuotantoa kivesten Leydigin soluissa. (Eisenberger 2008, 339–354.) Kivesten erittämä testosteroni hillitsee hypotalamuksen GnRH:n eritystä negatiivisen palautejärjestelmän kautta, jolloin

myös aivolisäkkeen LH:n erityys vähenee ja testosteronin tuotanto kiveksissä laskee (Vierimaa & Laurila 2013).

Eturauhassoluissa on 5- α -reduktaasientsyymiä, joka kääntää testosteronin 5- α -dihydrotestosteroniksi (DHT). DHT on testosteronin aktiivisempi muoto, joka sitoutuu AR:iin ja indusoi useiden kohdegeenien, kuten *PSA*-geenin transkription sekä epiteelisolujen erilaistumisen, kasvun ja proliferaation erittäviksi soluiksi. (Eisenberger 2008, 339–354.)

2.2.2 Androgeenireseptori

Androgeenit vaikuttavat eturauhaseen androgeenireseptorin (AR) kautta, sitoutumalla reseptoriin ja aktivoimalla reseptorivälitteisiä solunsisäisiä signaalireittejä, jotka vaikuttavat esimerkiksi kasvutekijöiden ekspressioon. AR on solun sisällä sijaitseva tumareseptorien perheeseen kuuluva steroidihormonireseptori, jota ilmennetään kaikissa androgeenien säätelyn alaisissa kudoksissa ja jonka välityksellä androgeenien vaikutukset kudoksiin tapahtuvat. (Heinlein & Chang 2004, 276–308.)

AR aktivoituu androgeenin, normaalisti testosteronin tai DHT:n sitoutuessa siihen, ja vaikuttaa solun toimintaan monilla tavoilla. Inaktiivinen AR sijaitsee sytosolissa, mutta aktivoituttuaan se voi muiden tumareseptorien tavoin kulkeutua tumaan ja muokata useiden eri geenien aktivaatiota sitoutumalla DNA:han ja toimimalla transkriptiotekijänä. (Heinlein & Chang 2004, 276–308.) Transkriptionaalisen aktiivisuuden lisäksi AR voi aktivoida myös solujen tavanomaisia toisilähettemihin perustuvia signaalinvälitysreittejä, kuten kinaasikaskadeja (Heinlein & Chang 2002, 2181–2187).

Eturauhasessa AR:a on sekä epiteeli- että stroomasoluissa, ja androgeenien ja AR:n vuorovaikutus säätelee eturauhassolujen toimintaa, kasvua, proliferaatiota ja erilaistumista. Etenkin DHT:llä on merkittävä stimuloiva vaikutus eturauhasen stroomasolujen kasvuun, ja rauhasepiteelin normaali toiminta on riippuvainen

eturauhasen DHT-tasosta. Seerumin ja eturauhasen DHT-tasojen lasku johtaa epiteelisolujen apoptoosiin ja määrän vähentymiseen 70 %:lla. (Heinlein & Chang 2004, 276–308; Wen ym. 2015, 293–301.)

Androgeeni/AR-signaalointi on tärkeässä roolissa myös eturauhasen sairauksien kehittämisessä ja etenemisessä. Seerumin ja eturauhasen korkean androgeenitason ei ole todettu aiheuttavan syöpää, mutta androgeenit säätelevät niin normaalien kuin muuntuneiden eturauhassolujen kasvua. Eturauhasen hyvänlaatuinen liikakasvu kehittyy yleensä eturauhasen transiiovyöhykkeestä, ja liikakasvusta 88,4 % muodostuu stroomasoluista. (Svidland ym. 1996, 113–117.) Stroomasolujen AR voi vaikuttaa hyvänlaatuisen liikakasvun kehittymiseen muokkaamalla useiden kasvutekijöiden toimintaa (Vezina & Bushman 2007, 275–280; Wen ym. 2015, 293–301).

Toisin kuin hyvänlaatuinen liikakasvu, suurin osa eturauhassyövästä on lähtöisin eturauhasen rauhasepiteelisoluista. Syövän kehittymiseen vaikuttaa kuitenkin myös strooman ja epiteelin vuorovaikutus, joka säätelee epiteelin erilaistumista ja kasvua. Tämä vuorovaikutus on androgeeni/AR-signaaloinnin säätelemää, ja stroomasolujen AR vaikuttaa eturauhassyövän etenemiseen lisäämällä syöpäsolujen kasvua sekä kasvainten ja etäpesäkkeiden muodostusta. (de Marzo ym. 1998, 2381–2392; Wen ym. 2015, 293–301.)

Eturauhassyövästä 80–90 % on diagnosoimishetkellä androgeeniriippuvaisia, mistä johtuen niitä hoidetaan usein hormonihoidoilla, joilla pyritään vähentämään AR:n aktiivisuutta joko androgeenideprivaatiolla tai AR:n toimintaa inhiboivilla antiandrogeeneilla. Osaan syövästä hormonihoitot eivät kuitenkaan tehoa, ja toimiessaankin hormonihoitot johtavat lopulta kastroatioresistenttien syöpäsolukloonien kehittymiseen, jolloin syöpä uusiutuu ja syöpäsolut kasvavat matalasta seerumin androgeenipitoisuudesta huolimatta. (Heinlein & Chang 2004, 276–308.)

Vaikka androgeenitason lasku aiheuttaa eturauhassolujen apoptoosin, on merkittävä osa eturauhassyöpäkasvaimista resistenttejä androgeenideprivaation aiheuttamalle apoptoosille, ja hormonihoito ainoastaan

vähentää solujen proliferaatiota (Heinlein & Chang 2004, 276–308). Yksi mahdollinen mekanismi on apoptoosia estävien geenien ilmentymisen nousu, jota havaitaan sekä eturauhassyövän varhaisissa että myöhemmissä vaiheissa enenevissä määrin (Colombel ym. 1993, 390–400). Androgeenideprivaatiosta selvinneet syöpäsolut voivat sopeutua alhaiseen androgeenitasoon ja siten muuttua hormoniriippumattomiksi (Dawson 2000, 409–416).

AR:a ilmennetään eturauhassyöpäsoluissa syövän kaikissa vaiheissa, sekä hormoniriippuvaisissa syövässä että suurimmassa osassa kastraatioresistenteistä syövästä (Mohler ym. 1996, 889–895; Ruizeveld de Winter ym. 1994, 735–746). Lisääntyneen AR:n ekspresion on havaittu korreloivan eturauhassyövän huonoon ennusteeseen. Myös AR:n transkriptionaalisen aktiivisuuden on todettu säilyvän. Tämä viittaa siihen, etteivät eturauhassyöpäsolut kastraatioresistentissä vaiheessakaan varsinaisesti ole täysin riippumattomia androgeeneistä, vaan niiden kasvu riippuu edelleen AR:n signaloinnista. Kliinisten ja kokeellisten todisteiden valossa eturauhassyövän etenemiseen kastraatioresistenttiin vaiheeseen vaikuttaa AR:n aktiivisuuden säätelyn häiriintyminen. (Attard ym. 2008, 4563–4571; Heinlein & Chang 2004, 276–308).

Eturauhassyövän esiintymisellä on havaittu olevan suvuitaista kasautumista. Jos lähisukulaisella on diagnosoitu eturauhassyöpä, on eturauhassyövän riski 2–3-kertainen normaaliin verrattuna, ja useamman lähisukulaisen sairastuminen nostaa riskiä entisestään. Perinnöllisen eturauhassyövän taustalla on todennäköisesti harvinaisia syöpään liittyvien geenien alleeleja, joiden penetranssi on korkea. (Langeberg ym. 2007, 4101–4110.) AR-geenissä ilmenee polymorfista variaatiota alueella, joka vaikuttaa sen transkriptionaaliseen aktiivisuuteen sekä kykyyn sitoutua säätelytekijöihin, kuten steroidihormonikoaktivaattoreihin (SRC). Tietyt AR-alleelit saattavat lisätä eturauhassyövän riskiä etenkin yhdessä muiden riskitekijöiden kanssa, mutta yksistään niiden penetranssi on matala. (Heinlein & Chang 2004, 276–308; Nwosu ym. 2001, 2313–2318.)

AR-geenin monistuminen on yksi mahdollinen mekanismi, jolla eturauhassyöpäsolut voivat sopeutua matalaan androgeenitasoon hormonihoidojen aikana. Hormoniriippuvaisissa syöissä *AR*-geenin monistumista havaitaan harvoin, kun taas kastraatioresistenteissä eturauhassyöissä sitä ilmenee jopa 30 %:ssa (Visakorpi ym. 1995, 401–406). Hormonihoidot eivät välttämättä suoraan aiheuta *AR*-geenin monistumista, sillä geneettinen epästabiilisuus, kromosomipoikkeavuudet ja onkogeenin monistuminen liittyvät useiden eri syöpätyyppien etenemiseen, ja niiden lisääntymistä havaitaan eturauhassyöissä riippumatta siitä, hoidetaanko syöpää hormonihoidoilla. Androgeenitason pieneneminen ja antiandrogeenihoito voivat kuitenkin suosia *AR*-geenin monistumista. (Heinlein & Chang 2004, 276–308.)

AR-geenin monistuminen johtaa todennäköisesti sen yliekspressioon. *AR*:a ekspressoidaan kastraatioresistenteissä syöpäkasvaimissa 6-kertaisesti verrattuna hormoniriippuvaisiin syöpiin (Linja ym. 2001, 3550–3555). Tämän on havaittu herkistävän eturauhassyöpäsoluja androgeeneille, jolloin androgeenin säätelemät geenit aktivoituvat pienemmässä DHT-pitoisuudessa kuin tavallisesti. Näin ollen syöpäsolut voivat kasvaa huomattavasti normaalia matalammassa androgeenipitoisuudessa. (Waltering ym. 2009. 8141–8149.)

Eturauhassyöpään liittyy useiden *AR*:n koaktivaattoreiden ekspression nousu. SRC-perheen koaktivaattoreiden ekspressio lisääntyy eturauhassyövässä normaaliin eturauhaskudokseen verrattuna usein jo hormoniriippuvaisessa vaiheessa, ja suuressa osassa kastraatioresistenteistä syöivistä havaitaan useiden koaktivaattoreiden yliekspressiota (Gregory ym. 2001, 4315–4319). SRC-3-koaktivaattorin ekspressiotaso korreloi eturauhassyövän vaiheeseen ja huonoon ennusteeseen (Gnanapragasam ym. 2001, 1928–1936). Koaktivaattorit lisäävät *AR*:n transkriptionaalista aktiivisuutta matalammassa liganditasossa, ja voivat osaltaan herkistää eturauhassyöpäsoluja matalalle androgeenitasolle ja siten vaikuttaa eturauhassyövän etenemiseen (Heinlein & Chang 2004, 276–308).

Eturauhassyövän etenemiseen liittyy usein kasvutekijöiden ja kasvutekijäreseptoreiden ekspression muutoksia (Russell ym. 1998, 705–723). Kasvutekijöiden sitoutuminen solukalvolla sijaitsevaan reseptoriinsa aktivoi kinaasikaskadin, joka lopulta aktivoi tai inhiboi jonkin transkriptiotekijän tai sen koaktivaattorin toimintaa. Sekä AR että sen koaktivaattorit ovat kasvutekijöiden aktivoimien kinaasikaskadien kohteita, ja eturauhassyövissä AR:n transkriptionaalista aktiivisuutta lisäävät kasvutekijöiden muutokset voivat vaikuttaa syövän etenemiseen. (Heinlein & Chang 2004, 276–308.)

Eturauhassyövän edetessä syöpäsoluihin kertyy AR:n mutaatioita, joiden seurauksena AR:n ligandispesifisyys voi heiketä. AR-geenin mutaatioita havaitaan 21–44 %:ssa metastasoivista eturauhassyövistä. (Marcelli ym. 2000, 944–949; Tilley ym. 1996, 277–285.) Normaalisti AR aktivoituu testosteronin tai DHT:n sitoutuessa siihen, mutta mutaatiot voivat mahdollistaa myös esimerkiksi lisämunuaisen tuottamien androgeenien DHEA:n ja androstenediolin sitoutumisen ja AR:n aktivoinnin. Kastratioresistenteissä eturauhassyövissä yleisiä ovat myös mutaatiot, joiden seurauksena antiandrogeenit toimivat AR-agonisteina ja aktivoivat sen. Mutaatioiden lisäksi jotkin AR:n koaktivaattorit voivat edesauttaa AR:n aktivoitumista muiden kuin sen normaalien ligandien toimesta. (Heinlein & Chang 2004, 276–308.)

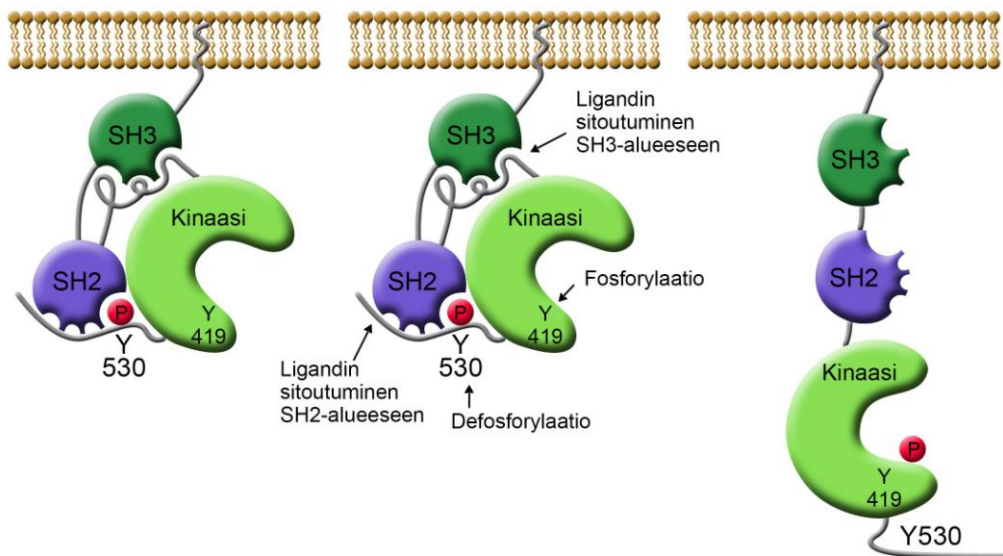
2.2.3 Src

Androgeenivälitteisen signaaloinnin tunnetuin mekanismi on AR:n transkriptionaalisen aktiivisuuden indusointi androgeenin sitoutuessa, mutta androgeeni/AR-signaaloinnilla on myös nopeita, ei-genomisia vaikutuksia (Falkenstein ym. 2000, 513–555; Revelli ym. 1998, 3–17). Näitä vaikutuksia välittävät tyypillisesti solujen toisiolähetteihiin perustuvat signaalintireitit, kuten kinaasikaskadit, joissa signaali siirtyy fosforylaation avulla kinaasilta toiselle ja lopulta kohdemolekyylille. Fosforylaatioissa molekyyliin liitetään fosfaattiryhmä, ja se on yleinen keino säädellä molekyylien, etenkin proteiinien aktiivisuutta

soluissa. Siten kinaasien välityksellä saadaan aikaan muutoksia solujen toiminnassa ja haluttu vaste signaalille.

Tutkituin testosteronin ja DHT:n ei-genominen vaikutusmekanismi soluissa on Src-kinaasin aktivointi. AR:n ja muiden steroidihormonireseptorien on havaittu pystyvän sitoutumaan Src:iin ja aktivoimaan sen (Migliaccio ym. 2000, 5406–5417; Migliaccio ym. 2002, 31–35). Src on proteiinityrosiinikinaasi ja kuuluu Src-perheen kinaaseihin (SFK), joita on kaikkiaan yhdeksän (Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes ja Yrk). SFK:t sijaitsevat sytosolissa, yleensä solukalvon sisäpuoleen tai muihin solunsisäisiin kalvorakenteisiin kiinnittyneinä, eivätkä ne toimi reseptoreina. (Thomas & Brugge 1997, 513–609.) Kaikkien rakenne on samankaltainen: SFK:t koostuvat neljästä Src-homologia-alayksiköstä (SH), joista SH1 on kinaasiaktiivisuudesta vastaava katalyyttinen osa, SH2 ja SH3 sitovat eri proteiineja ja vaikuttavat siten kinaasien aktiivisuuteen ja signaalinvälitykseen, ja SH4 sisältää kullekin kinaasille ominaisen alueen, joka todennäköisesti myös sitoo proteiineja ja on vastuussa kunkin kinaasin spesifisistä vuorovaikutuksista. Lisäksi SH4-alueeseen on liitetty kovalenttisesti lipidi, joka kiinnittää kinaasin solukalvoon tai solunsisäisiin kalvorakenteisiin. (Brown & Cooper 1996, 121–149; Roskoski 2004, 1155–1164.)

Src on normaalisti inaktiivisessa, suljetussa muodossa, jossa molekyyllinsisäiset vuorovaikutukset laskostavat sen siten, että katalyyttinen alue on piilossa proteiinin sisällä. Inaktiivisen muodon ylläpitämiseen vaikuttaa katalyyttiseen alueeseen liittyneellä säätelyalueella olevan tyrosiiniaminohapon (Y530) fosforylaatio (Chong ym. 2005, 233–244). Y530 defosforylaatio edesauttaa Src:n aktivoitumista, ja useat eri kinaasit ja fosfataasit voivat vaikuttaa Src:n aktiivisuuteen säätelämällä sen fosforylaatiotasoa. Muut vuorovaikutuskumppanit voivat aktivoida Src:n sitoutumalla siihen ja estämällä sen sisäisiä vuorovaikutuksia, jolloin sen muoto avautuu paljastaen katalyyttisen alueen ja mahdollistaen vuorovaikutukset substraattiproteiinien kanssa. Src:n täydelliseen aktivoitumiseen vaaditaan lisäksi katalyyttisellä alueella sijaitsevan tyrosiinin (Y419) autofosforylaatio, jonka avoin muoto mahdollistaa (kuvio 3). (Bromann ym. 2004, 7957–7968; Fizazi 2007, 1765–1773; Gonfloni ym. 2000, 281–286; Thomas & Brugge 1997, 513–609; Thomas ym. 1998, 577–583.)



KUVIO 3. Src:n aktivaatio. Vasemmalla Src:n inaktiivinen, suljettu muoto, keskellä Src:n aktivaatioon vaikuttavia tekijöitä, ja oikealla aktiivinen muoto. SH2, SH3: Src-homologia-alueita. Y419, Y530: tyrosiini-aminohappoja. P: fosfaattiryhmä. (Mukailen: Martin 2001.)

Src toimii signaalinvälittäjänä useissa signaaliketjuissa. Se vastaanottaa signaaleja monilta eri solukalvon tai solunsisäisiltä reseptoreilta, kuten kasvutekijäreseptoreilta, G-proteiinikytkentäisiltä reseptoreilta, integriineilta ja steroidihormonireseptoreilta, jotka ligandin aktivoimina sitoutuvat Src:iin. Src puolestaan voi välittää signaalin eteenpäin useita signaalireittejä pitkin, esimerkiksi aktivoimalla MAP-kinaasikaskadin. Koska Src toimii eräänlaisena signaalireittien tienristeyksenä, on sen rooli soluissa tärkeä ja vaikutukset solujen toimintaan hyvin monipuoliset. Normaaleissa soluissa Src osallistuu esimerkiksi solujen kasvun, proliferaation, kiinnittymisen, liikkuvuuden ja apoptoosin säätelyyn. (Parsons & Parsons 2004, 7906–7909; Vlaeminck-Guillem ym. 2014, 1–10.)

Solujen normaaliin toimintaan liittyvän keskeisen roolinsa takia Src:lla ja muilla SFK:illa on yhteys myös monien eri syöpätyyppien kehittymiseen. Sarkoomaviruksesta eristetty viruksen v-Src oli ensimmäinen löydetty

onkogeeni, ja sitä vastaava normaalien solujen Src ensimmäinen tunnettu proto-onkogeeni (Stehelin ym. 1976, 170–173; Stehelin ym. 1977, 675–684). Viruksen v-Src:sta puuttuu säätelyalue, minkä seurauksena se on yliaktiivinen muoto Src:sta ja voi aiheuttaa viruksen infektoimien solujen muuntumisen pahanlaatuisiksi. Myös Src:n häiriintynyt aktiivisuus voi johtaa syövän kehittymiseen. (Fizazi 2007, 1765–1773; Summy & Gallick 2003, 337–358.)

Src:n ekspressio on kohonnut useissa eturauhassyöpäsolulinjoissa, ja lisäksi Src:n ja muiden Src-perheen kinaasien aktiivisuuden on havaittu olevan epänormaali eturauhassyövissä (Chang ym. 2007, 90–100; Robinson ym. 1996, 5958–5962; Tatarov ym. 2009, 3540–3549). Src on osallisena monissa eturauhassyövän syntyyn ja etenemiseen liittyvissä tekijöissä. Sen aktivaatio on yhdistetty esimerkiksi syöpäsolujen häiriintyneeseen proliferaation säätelyyn ja etäpesäkkeiden muodostukseen, ja Src-inhibiittorien on havaittu estävän eturauhassyöpäsolulinjojen proliferaatiota ja liikkumista *in vitro* sekä estävän syövän kasvua ja metastasoitumista hiirimalleissa. (Fizazi 2007, 1765–1773; Nam ym. 2005, 9185–9189; Recchia ym. 2003, 1927–1935.)

Eturauhassolujen kasvu ja proliferaatio on androgeenien säätlemää ja tapahtuu androgeenireseptorin aktivoiman Src:n välityksellä. Src edistää solujen proliferaatiota aktivoimalla Ras/ERK/MAPK-kaskadin, joka aiheuttaa DNA-synteesin käynnistymisen ja solusyklin etenemisen G1-vaiheesta S-vaiheeseen (Migliaccio ym. 2000, 5406–5417). Src:n kohonnut ekspressio ja poikkeava aktiivisuus voivat olla osallisina eturauhassyöpäsolujen herkistymiseen matalalle androgeenitasolle ja syövän etenemiseen kastroatioresistenttiin vaiheeseen (Lee ym. 2001, 8385–8397; Lee ym. 2004, 2197–2205; Unni ym. 2004, 7156–7168).

Syövän metastasoituminen vaatii kasvainsolujen irrottautumisen kudoksesta sekä kyvyn selviytyä irrallisena soluna, liikkua ja tunkeutua uuteen kudokseen. Rauhasepiteelistä lähtöisin olevat syöpäsolut voivat kehittää nämä ominaisuudet epiteeli-mesenkyymitransitiolla (EMT), jossa ne menettävät normaaleja epiteelisolun ominaisuuksia ja alkavat joiltain osin muistuttaa mesenkymaalaisia soluja. EMT:n ajatteluaan olevan ensimmäinen askel

etäpesäkkeiden muodostumisessa, ja Src:n aktivaatio on yksi mahdollinen syöpäsolujen EMT:n laukaiseva tekijä. (Guarino ym. 2007, 305–318; Guarino 2010, 14–26; Nauseef & Henry 2011, 428–439; Yang & Weinberg 2008, 818–829.)

Luumetastaasit ovat eturauhassyövän yleisimpiä etäpesäkkeitä. Metastasoituneet syöpäsolut häiritsevät normaalia luunmuodostusta ja uusiutumista erittämällä kasvutekijöitä ja sytokiineja, jotka rikkovat osteoklastien ja osteoblastien tasapainon (Coleman 2000, 463–470; Coleman 2001, 165–176; Yang ym. 2001, 5652–5659). Src:n välittämä signalointi on tärkeää sekä osteoklastien että osteoblastien normaalille toiminnalle (Marzia ym. 2000, 311–320; Miyazaki ym. 2004, 17660–17666; Xing ym. 2001, 241–253), ja sillä on yhteys myös luumetastaasien muodostumiseen. Src-inhibiittoreiden on havaittu hidastavan luumetastaasien muodostumista syöpämalleissa ja kliinisissä kokeissa (Rucci ym. 2006, 161–172; Rucci ym 2008, 342–349).

Koska Src ja muut SFK:t osallistuvat useisiin eri signaalireitteihin, niillä voi olla yhteisvaikutusta muiden syövän etenemiseen vaikuttavien proteiinien kanssa. Kasvutekijöiden ja niiden reseptorien ekspressio on kohonnut eturauhassyövässä, ja esimerkiksi Src:n ja epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR) yhteisvaikutus voi lisätä syövän aggressiivisuutta (Maa ym. 1995, 6981–6985; Tice ym. 1999, 1415–1420). Src:n vuorovaikutus verisuonen endoteelin kasvutekijän (VEGF) kanssa taas ohjaa syöpäkasvainten angiogeneesiä eli verisuonten muodostusta (Rice ym. 2012, 133–142; Vlaeminck-Guillem ym. 2014, 1–10).

Src:n ja AR:n vuorovaikutus näyttäisi olevan yksi tärkeimpiä tekijöitä eturauhassyövässä. AR:n kohonnut ekspressio tai aktiivisuus korreloi Src:n aktiivisuuden kanssa, ja niillä on selvä yhteisvaikutus eturauhassyövän kehittymiseen ja etenemiseen. AR:n sitoutuminen Src:iin paitsi aktivoi Src:n ja sen välittämiä signaalireittejä, myös vaikuttaa AR:n toimintaan. Src voi fosforyloida AR:n tyrosiinin (Y534), mikä johtaa AR:n translokaatioon tumaan ja sen säätelemien geenien transkriptioon. Fosforylaatio siis mahdollistaa AR:n aktivaation ilman ligandin sitoutumista. Tätä vaikutusta tehostaa se, että Src:n

sitoutuminen AR:iin estää repressorien sitoutumista siihen. (Asim ym. 2008, 3596–3604; Asim ym. 2011, 37108–37117; Cai ym. 2011, 862–872; Guo ym. 2006, 309–319; Migliaccio ym. 2000, 5406–5417; Migliaccio ym. 2002, 31–35.)

2.2.4 VAL201-peptidi

VAL201 on peptidi, joka toimii spesifisenä androgeeni- sekä estrogeenireseptorin inhiboijana. VAL201 sitoutuu suoraan Src:iin estäen AR:n ja Src:n vuorovaikutuksen, jolloin Src ei aktivoidu. Kuitenkin Src:in aktiivisuus ja solujen DNA-synteesi pysyy ennallaan niissä soluissa, joissa ei ole AR:a. Src:n inhibointi VAL201-peptidin vaikutuksesta tapahtuu AR:n sitouduttua Src:iin, jolloin se inhiboi syöpäsolujen kasvun, mutta ei estä AR:n transkriptionaalista aktiivisuutta. VAL201-peptidi on samankaltainen kuin AR:n aminohapposekvenssi Src:n sitoutumiskohdassa. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

VAL201:n on havaittu hillitsevän syöpäkasvainsolujen kasvua *in vitro* sekä LNCaP-solujen kasvua nude-hiirissä. VAL201:n onkin todettu olevan hyvin tehokas eturauhassyöpäsolulinjojen soluja vastaan kuten myös hiirimalleissa. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

3 TUTKIMUSTEHTÄVÄT JA METODOLOGIA

3.1 Kehittämisen- ja tutkimustehtävän kuvaus

Työn tarkoituksena oli tutkia potentiaalisen eturauhassyöpälääkkeen VAL201:n vaikutusta eturauhassyöpäsolujen androgeenireseptoriin ja sen signaalinvälitykseen Src-kinaasin kautta. Androgeenin aktivoima AR sitoutuu Src:iin, jolloin se aktivoituu ja fosforyloituu. Tavoitteena oli tutkia, estääkö VAL201 Src:n aktivoitumisen androgeenien vaikutuksesta eturauhassyöpäsolulinjoissa. Samalla haluttiin selvittää myös Src:n soveltuvuutta markkeriproteiiniksi VAL201-lääkemolekyylin vaikutuksen seuraamiseen. Tavoitteet on esitetty taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Opinnäytetyön tavoitteet

Tutkittiin	Tavoitteet
VAL201-lääkemolekyyli	Tutkia vaikutusta eturauhassyöpäsolujen androgeenireseptoriin ja sen signaalinvälitykseen Src-kinaasin kautta.
Src-kinaasi	Selvittää Src-kinaasin potentiaalia markkeriproteiiniksi VAL201:n vaikutuksen/toiminnan havaitsemiseen ja seuraamiseen.

Metastasoituneeseen eturauhassyöpään ei ole parantavaa hoitokeinoa, vaan sitä hoidetaan androgeenideprivaatiolla tai antiandrogeeneilla, joiden tarkoituksena on hillitä syöpäsolujen androgeeniriippuvaista kasvua ja proliferaatiota. Näillä hormonihoidoilla on kuitenkin hankalia sivuvaikutuksia, koska ne estävät AR:n toimintaa ja vaikuttavat siten hyvin laajasti myös androgeeni/AR-säätelyn alaisten normaalien solujen toimintaan. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35; Taari ym. 2013, 258.)

Koska Src:lla on monia onkogeenisia ominaisuuksia ja sen on havaittu säätelevän myös androgeenivälitteistä proliferaatiota AR:n aktivoimana (Migliaccio ym. 2000, 5406–5417; Migliaccio ym. 2002, 31–35), on erilaisia Src-

inhibiittoreita tutkittu aktiivisesti mahdollisten uusien syöpälääkkeiden löytämiseksi. Niiden ongelmana on kuitenkin epäspesifisyys, sillä ne voivat inhiboida muitakin tyrosiinikinaaseja. Lisäksi Src:n inhibitiolla on laajat vaikutukset myös normaalien solujen toimintaan. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

VAL201 on lupaava uusi lääkemolekyylä, jonka vaikutus perustuu AR:n ja Src:n vuorovaikutuksen ja siitä seuraavan Src:n aktivoitumisen estoon. Se ei estä AR:n transkriptionaalista aktiivisuutta, ja siksi sillä on vähemmän vaikeita sivuvaikutuksia kuin androgeenideprivaatiolla tai antiandrogeeneilla. Se myös poikkeaa muista Src-inhibiittoreista, koska se estää spesifisesti androgeeni/AR-välitteistä Src:n aktivaatiota ja solujen proliferaatiota, eikä vaikuta kaikkiin Src:n signaalireitteihin. Toimintamekanismistaan johtuen VAL201 on vähemmän myrkyllinen kuin aiemmat eturauhassyövän hoitoon kehitetyt lääkevaihtoehdot. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

VAL201 on tällä hetkellä kiivaan tutkimuksen ja lääkekehityksen alla. Se on potentiaalinen lääke kastroatioresistentin eturauhassyövän hoitoon, ja lisäksi sitä on mahdollista käyttää myös taudin aiemmissa vaiheissa estämään eturauhassyövän kasvua ja metastasoitumista. VAL201 on vaihtoehto kemialliselle tai kirurgiselle kastroatiolle syövän etenemisen estoon. Se sopisi hoidoksi myös matalan riskin eturauhassyöpöpotilaille, joille kastroatiosta on enemmän haittaa kuin hyötyä ja joiden hoitona nykyään on vain aktiivinen seuranta. Eturauhassyövän lisäksi VAL201-lääkemolekyylillä näyttää olevan myös merkittävää potentiaalia muidenkin metastasoivien hormoniriippuvaisten syöpien, kuten rintasyövän, kohtusyövän tai munasarjasyövän hoidossa, mutta näiden tutkimus on vasta alussa. (Auricchio & Migliaccio 2012, 32–35.)

3.2 Soluviljely

Soluviljelyssä prokaryootti- tai eukaryoottisoluja kasvatetaan viljelyalustoilla kontrolloiduissa laboratorio-olosuhteissa, jotka imitoivat mahdollisimman paljon

niiden luonnollisia elinolosuhteita. Laboratoriossa voidaan säädellä solujen kasvu ympäristöä, kuten lämpötilaa, pH-arvoa sekä eri ravintoaineiden saantia.

Soluviljelytekniikat mahdollistavat solujen toimintojen, metabolian ja kasvun tutkimisen tarkasti niiden luonnollisen elinympäristön ulkopuolella. Soluviljelyn avulla voidaan tutkia esimerkiksi solujen mutageneesiä, karsinogeneesiä tai mahdollisten lääkeaineiden vaikutusta soluihin. Lisäksi soluviljelyn avulla voidaan valmistaa erilaisia biologisia yhdisteitä.

3.3 LNCaP- ja PC-3-solulinjat

LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) -solulinjan solut eristettiin alunperin vuonna 1977 eturauhassyöpää sairastaneen 50-vuotiaan kaukaasialaisen miehen imusolmukkeen etäpesäkkeestä. LNCaP-solut ovat androgeeneista riippuvaisia ja kasvavat *in vitro* -olosuhteissa jakaantuen noin 60 tunnin aikana. LNCaP-solujen solulimassa on sekä androgeeni- että estrogeeni-reseptoreita, joiden vuoksi solut ovat hormoneihin reagoivia. LNCaP-solut kykenevät muodostamaan syöpäkasvaimia kun niitä injektoidaan hiiriin, mutta hiirillä, joilla on matala androgeenitaso, kasvainten muodostus vähentyy selvästi. (Horoszewicz ym.1980, 115–132.)

LNCaP-solut tuottavat sekä PSA:ta että hapanta fosfataasientsyymiä (Prostatic Acid Phosphatase, PAP) ja ekspressoivat androgeenireseptoria (Tai ym. 2011, 1668–1679). DHT moduloi solujen kasvua ja stimuloi PAP:n tuotantoa *in vitro*. DHT:n lisääminen kasvatusliuokseen vaikuttaa selvästi LNCaP-solujen proliferaatioon. (Horoszewicz ym. 1983, 1809–1818.)

PC-3 (Prostate Cancer) -solulinjan solut eristettiin ensimmäisen kerran vuonna 1979 eturauhassyöpää sairastaneen kaukaasialaisen 62-vuotiaan miehen luometastaasista. PC-3-solut kasvavat hyvin *in vitro* -olosuhteissa, ovat erittäin metastasoivia ja muodostavat kasvaimia nude-hiirissä. PC-3-solut eivät ole hormoniriippuvaisia, eivätkä reagoi glukokortikoideihin tai useisiin kasvutekijöihin. (Kaighn ym. 1979, 16–23.) Yleisesti ajatellaan, etteivät PC-3-

solut myöskään ekspressoi PSA:ta eivätkä AR:a (Tai ym. 2011, 1668–1679). Kuitenkin joissain tutkimuksissa on todettu PC-3-solujen pystyvän ekspressoimaan vähäisiä määriä sekä PSA:ta että AR:a (Alimirah ym. 2006, 2294–2300).

Molempien solulinjojen solut ovat nykyisin laajasti käytössä ympäri maailmaa eturauhassyöpätutkimuksessa. Solulinjoja on helppo kasvattaa laboratoriossa, ne kasvavat nopeasti lyhyessä ajassa ja soveltuvat moniin eri tutkimuksiin. LNCaP- ja PC-3-solut ovatkin yleisimmät eturauhassyöpätutkimuksessa käytetyt solulinjat, ja eri ominaisuuksiensa takia niitä käytetään mallina androgeeniinriippuvaisesta ja kastroatioresistentistä syövästä. Suurin osa adenokarsinoomista sekä kastroatioresistenteistä eturauhassyövistä ilmentävät liki aina AR:a sekä PSA:ta. Eturauhassyövän myöhäisessäkin vaiheessa ekspressoidaan vielä AR:a, joka on toimiva ja kriittinen kasvainsolujen selviytymiselle. (Tai ym. 2011, 1668–1679.)

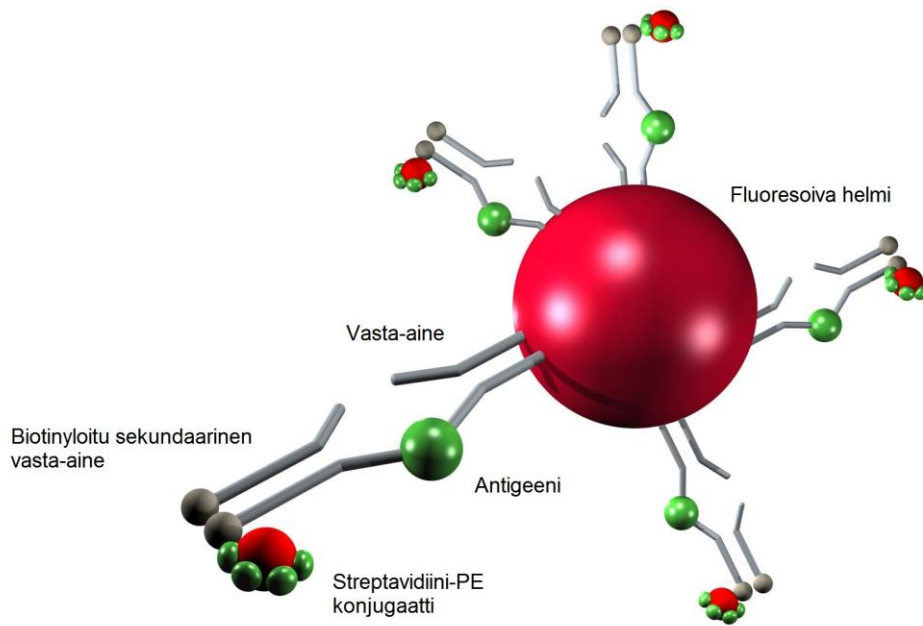
3.4 Immunokemiallinen määrittäminen

Immunokemialliset menetelmät perustuvat spesifisiin vasta-aineisiin, jotka tunnistavat tietyn antigeenin ja sitoutuvat siihen. Halutulle kohdemolekyylille voidaan tuottaa spesifistä vasta-ainetta, jonka avulla kohdemolekyyli tunnistetaan näytteestä. Menetelmät voivat olla joko kvalitatiivisia tai kvantitatiivisia, ja ne ovat erittäin sensitiivisiä ja spesifisiä.

Immunokemiallisia menetelmiä ovat esimerkiksi agglutinaatio, jossa vasta-aineiden tarttuminen solun pinnalla oleviin antigeeneihin aiheuttaa solujen agglutinaation, immunosaostus, immunoturbidimetria, jossa mitataan näytteestä spektrofotometrisesti vasta-aine-antigeenikompleksien aiheuttamaa sameutta, ja immunonefelometria, jossa vastaavasti mitataan näytteestä näiden kompleksien aiheuttamaa valon sirontaa.

Edellä kuvatut menetelmät perustuvat vasta-aine-antigeenikompleksin muodostumisen suoraan havaitsemiseen. Lisäksi voidaan hyödyntää erilaisia vasta-aineeseen sidottuja leimoja, joiden avulla vasta-aineen sitoutuminen antigeeniin havaitaan ja antigeenin määrä näytteessä voidaan mitata. Leima voi olla esimerkiksi radioisotooppi, entsyymi, fluoresoiva tai luminisoiva merkkiaine.

Tässä työssä käytettiin kaupallista immunokemiallista menetelmää (MILLIPLEX[®] MAP), joka perustuu Luminex[®] xMAP -teknologiaan. Menetelmässä käytetään fluoresoivalla väriaineella värikoodattuja magneettihelmiä, jotka päällystetään spesifisellä vasta-aineella. Värikoodauksen avulla samasta näytteestä voidaan määrittää useita eri kohdemolekyylejä. Haluttu kohdemolekyyli sidotaan vasta-aineella päällystettyjen magneettihelmien pinnalle, ja syntyneet vasta-aine-antigeenikompleksit erotellaan näytteestä magneettilevyn avulla. Tämän jälkeen lisätään sekundaarinen, biotinyloitu vasta-aine, joka sitoutuu vasta-aine-antigeenikompleksiin, sekä biotiiniin sitoutuva fluoresoiva streptavidiniifykoerytriini (SAPE). Menetelmän periaate on esitetty kuviossa 4. Magneettihelmiin sidotun kohdemolekyylin määrä mitataan analysaattorilla (MAGPIX[®]), joka tunnistaa oikean magneettihelmen fluoresoivan väriaineen perusteella ja mittaa siihen sidotun SAPE:n antaman fluoresenssisignaalin.



KUVIO 4. MILLIPLEX[®] MAP -menetelmän immunokemiallisen määrittämisen toimintaperiaate. (Mukaillen: Biocompare 2015, viitattu 21.3.2015).

4 TUTKIMUSMENETELMÄT

4.1 Soluviljely

Tutkimusta varten viljeltiin kahta ihmisen eturauhassyövästä johdettua solulinjaa, PC3 ja LNCaP. Kaikki soluviljelyyn käytetyt liuokset ja reagenssit olivat Sigma-Aldrich:n tuotteita. PC3-soluja kasvatettiin 37 °C:ssa 5 % hiilidioksidissa DMEM-kasvatusliuosta, joka sisälsi fenolipunaista, 5 % inaktivoitua seerumia (fetal calf serum, FCS), 100 U/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä. LNCaP-soluja kasvatettiin 37 °C:ssa 5 % hiilidioksidissa RPMI 1640 -kasvatusmediumissa, joka sisälsi fenolipunaista, 5 % inaktivoitua seerumia (fetal calf serum, FCS), 100 U/ml penisilliiniä, 100 µg/ml streptomysiiniä, 2 mM L-glutamiinia, 10 mM HEPES:ää, 4500 mg/ml glukoosia ja 1 mM natriumpyruvaattia. (Liite 1 ja 2.)

4.2 Hormonikäsittely

Hormonikäsittelyä varten solut siirrettiin 24-kuoppalevyille 50 000 solua/kuoppa ja kasvatettiin 2–3 vuorokauden ajan. Ennen koetta kasvatusliuos vaihdettiin fenolipunaa ja seerumia sisältämättömäksi DMEM- tai RPMI 1640 -liuokseksi (ensimmäinen PC3- ja jälkimmäinen LNCaP-soluille), ja soluja pidettiin siinä 24 h. Tämän jälkeen soluja stimuloitiin 2, 10 tai 45 minuuttia joko testosteronilla, synteettisellä androgeenillä R1881, DHT:lla tai β-estradiolilla VAL201-peptidin läsnä ollessa tai ilman sitä. Kaikki näytteet tehtiin kolmena kappaleena. Käytetyt pitoisuudet on esitetty taulukossa 2. Hormonikäsittelyn jälkeen solut hajotettiin suspensoimalla ne lysispuskuriin (MILLIPLEX[®] MAP lysis buffer), joka sisälsi proteaasi-inhibiittoria, ja inkuboimalla 15 minuuttia 4 °C:ssa, jonka jälkeen solulysaatit pakastettiin -70 °C:een. Hormonikäsittelyn työohje on esitetty liitteessä 3. Pakastuksen jälkeen solulysaatit sulatettiin ja suodatettiin 0,22 µm sentrifugaalisuodattimella (Millipore Ultrafree).

TAULUKKO 2. Hormonikäsittelyssä käytettyjen hormonien sekä VAL201-peptidin pitoisuudet

Hormoni (10 nm)	VAL201
-	-
	10 nm
	100 nm
DHT	-
	10 nm
	100 nm
Testosteroni	-
	10 nm
	100 nm
R1881	-
	10 nm
	100 nm
β -Estradioli	-
	10 nm
	100 nm

4.2 Proteiinimääritys

Lysaattien proteiinipitoisuus määritettiin kaupallisella proteiinimääritysmenetelmällä (BCA Protein Assay Kit, Novagen) valmistajan ohjeiden mukaan. Näytteistä mitattiin absorbanssi aallonpituudella 565 nm Victor X4 Multilabel Reader:llä (PerkinElmer) ja määritettiin proteiinipitoisuudet standardikuvaajan perusteella. (Liite 4.)

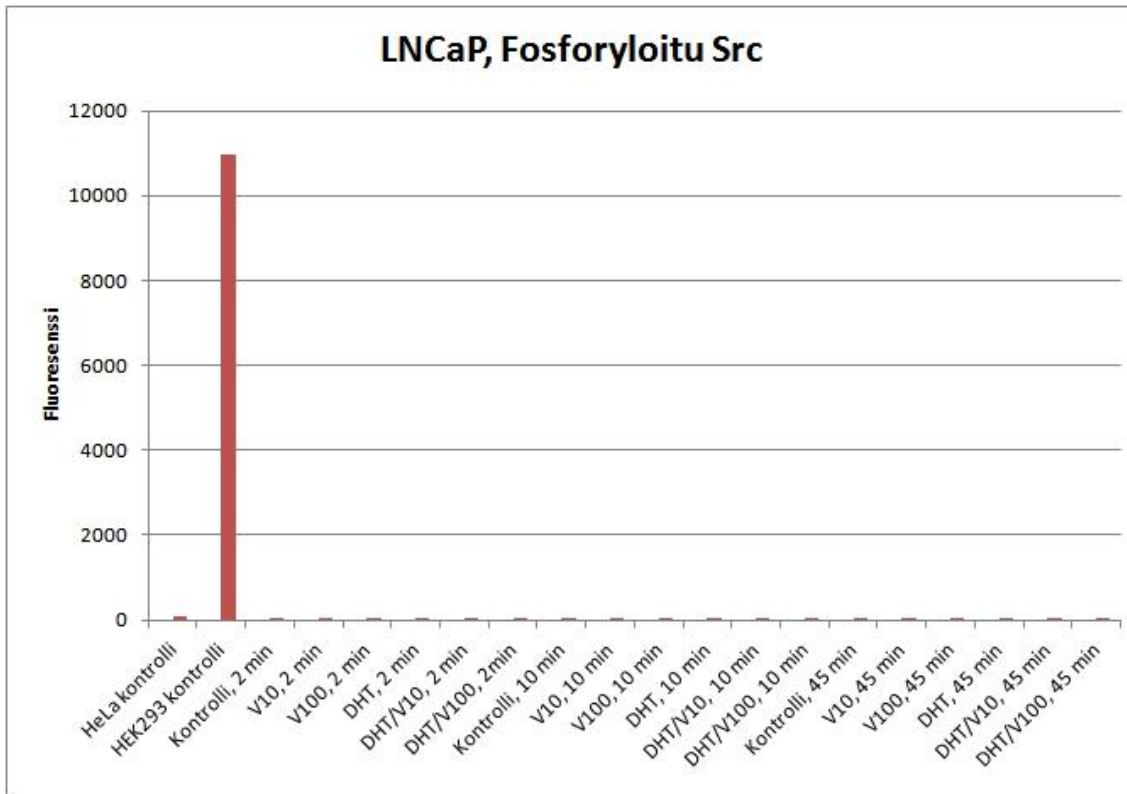
4.3 Immunokemiallinen määrittäminen

Solujen signaalireittien aktivoitumista ja lääkemolekyylin vaikutusta niihin tutkittiin kaupallisella immunokemiallisella menetelmällä (MILLIPLEX[®] MAP, liite 5). Fosforyloidun Src:n antamaa signaalia mitattiin MAGPIX[®]-analysointilaitteella, ja kaikista saaduista signaaleista vähennettiin pelkän reaktioseoksissa käytetyn puskurin signaali. Solulyysaattien signaalit normalisoitiin niiden proteiinipitoisuuksien mukaan, ja saaduista signaaleista muodostettiin pylväsdiagrammit.

5 TULOKSET

Työssä tutkittiin VAL201-peptidin vaikutusta eturauhassyöpäsolujen signaalinvälitykseen. LnCAP- ja PC3-soluja käsiteltiin DHT:lla, testosteronilla, synteettisellä androgeenilla R1881 tai β -estradiolilla VAL201-peptidin läsnä ollessa tai ilman sitä. Androgeenilla käsitellyissä soluissa androgeenireseptori aktivoituu ja sitoutuu Src-kinaasiin aktivoiden sen. Tämä pitäisi voida havaita fosforyloituneen Src:n määrän nousuna. Näytteissä, joihin lisättiin hormonin lisäksi myös VAL201-peptidiä, pitäisi hypoteesin mukaan Src:n aktivaation estyä, jolloin fosforyloidun Src:n määrän tulisi olla pienempi kuin pelkän hormonin läsnä ollessa. Hormonikäsittelyn kontrollina käytettiin käsittelemättömiä soluja, joissa AR:n ja sen signaalireittien aktivoitumista ei tapahdu.

Solulysaateista mitattiin fosforyloituneen Src:n määrää kaupallisella immunokemiallisella menetelmällä (MILLIPLEX[®] MAP). Kontrolleina käytettiin menetelmän omaa positiivista kontrollia, josta menetelmän toimiessa saadaan signaali fosforyloidusta Src:sta, sekä menetelmän omaa negatiivista kontrollia. Näytteistä saatujen signaalien vertailemiseksi tuloksista muodostettiin pylväsdiagrammit. 5- α -dihydrotestosteronilla saadut tulokset on esitetty kuviossa 5.



KUVIO 5. HeLa kontrolli: menetelmän oma negatiivinen kontrolli fosforyloidulle Src:lle (MILLIPLEX® MAP). HEK294 kontrolli: menetelmän oma positiivinen kontrolli fosforyloidulle Src:lle (MILLIPLEX® MAP). Kontrolli: käsittelemättömät LNCaP-solut. V10: VAL201 10 nm. V100: VAL201 100 nm. DHT: DHT 10 nm.

Tuloksista kävi ilmi, että kaikista näytteistä saatu signaali oli menetelmän oman negatiivisen kontrollin tasolla. Saadut tulokset ovat siis taustaa, eivätkä mahdolliset erot hormonikäsiteltyjen ja käsittelemättömien solujen välillä ole merkittäviä. Src:n aktivoitumista androgeenien vaikutuksesta ei siten voitu havaita, eikä näin ollen myöskään pystytty tutkimaan VAL201-peptidin vaikutusta siihen.

6 POHDINTA

Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia, kuinka VAL201-lääkemolekyylä vaikuttaa eturauhassyöpäsolumien androgeenireseptoriin ja sen signaalinvälitykseen Src-kinaasin kautta. Lisäksi haluttiin selvittää, onko Src potentiaalinen markkeriproteiini VAL201:n vaikutuksen havaitsemiseen ja seuraamiseen. Merkittäviä tuloksia ei kuitenkaan saatu, sillä käytetyllä menetelmällä ei havaittu Src:n aktivoitumista eikä siten pystytty tutkimaan VAL201:n vaikutusta signaalinvälitykseen. Mahdollisia syitä koejärjestelyn epäonnistumiseen voisivat olla riittämätön määrä soluja, jolloin aktivoituneen Src:n taso olisi ollut liian matala havaittavaksi käytetyllä menetelmällä, hormonistimulaation epäonnistuminen, jolloin AR:n signaalireittien aktivoitumista ei olisi tapahtunut riittävästi, tai käytetyn kaupallisen menetelmän toimimattomuus.

Työtä varten viljeltiin kahden eri solulinjan, LNCaP- ja PC-3-soluja. Kumpikin on yleisimpiä tutkimuskäytössä olevia eturauhassyöpäsolumilinjooja, joiden kasvuolosuhteet tunnetaan ja joita pidetään hyvinä malleina hormoniriippuvaiselle ja kastraatioresistentille eturauhassyövälle (Tai ym. 2011, 1668–1679). Soluja viljeltiin niille sopivissa olosuhteissa, ne kasvoivat hyvin sekä kasvatuspulloissa että kuoppalevyillä, ja koetta varten saatiin riittävästi soluja. Hormonikäsittely tehtiin stimuloimalla soluja 2, 10 tai 45 minuuttia 10 nm testosteronilla, DHT:lla, synteettisellä androgeenillä R1881 tai β -estradiolilla VAL201-peptidin läsnä ollessa tai ilman sitä. Käytetty hormonipitoisuus on fysiologisella tasolla, ja sen pitäisi olla riittävä solujen stimuloimiseksi. Myös kokeessa käytetyn hormonikäsittelyn pituuden pitäisi olla riittävä AR:n signaloinnin aktivoitumiseksi. (Migliaccio ym. 2000, 5406–5417.)

Solujen hajotuksen jälkeen näytteistä määritettiin kokonaisproteiinipitoisuus ja fosforyloidun Src:n määrää hormoneilla stimuloituissa ja stimuloimattomissa soluissa mitattiin kaupallisella immunokemiallisella MILLIPLEX[®] MAP -menetelmällä. Menetelmällä haluttiin tutkia signaalireittien aktivoitumista androgeeneillä stimuloituissa soluissa sekä VAL201-lääkemolekyylin vaikutusta

signaalinvälitykseen. Menetelmän kontrolleina käytettiin sen omaa positiivista ja negatiivista kontrollia fosforyloidulle Src:lle. Positiivisen ja negatiivisen kontrollin kokonaisproteiinipitoisuutta tai fosforyloidun Src:n määrää ei ole ilmoitettu, eikä menetelmässä ole mukana standardeja, joten menetelmällä ei voida mitata fosforyloidun Src:n tarkkaa pitoisuutta eikä se siis ole kvantitatiivinen. Tarkoituksena oli vertailla fosforyloidun Src:n antamaa signaalia hormonilla stimuloituissa soluissa ilman VAL201:tä sekä sen kanssa.

Fosforyloidun Src:n määrittämiseen näytteistä käytettiin menetelmän suosittelemaa proteiinipitoisuutta, jolla näytteistä pitäisi saada signaali. Positiivisesta kontrollista saadun signaalin perusteella menetelmä toimi. Tuloksista kävi kuitenkin ilmi, että kaikista näytteistä saatu signaali oli menetelmän oman negatiivisen kontrollin tasolla ja saadut tulokset olivat vain taustaa. Src:n aktivoitumista androgeenien vaikutuksesta ei jostain syystä havaittu lainkaan. Näin ollen myöskään VAL201-peptidin vaikutusta ei pystytty tutkimaan. Tavoitteisiin ei päästy, eikä toivottua tulosta tällä menetelmällä saatu näkyviin.

VAL201-lääkemolekyylin vaikutusta Src:in aktivoitumiseen ei voitu tutkia tämän työn perusteella, koska Src:n aktivoitumista ei käytetyllä menetelmällä saatu näkyviin. Koska solujen määrän, hormonikäsittelyssä käytettyjen hormonien pitoisuuden sekä stimuloimisajan ja näytteiden proteiinipitoisuuden pitäisi olla riittävät, epäselväksi jää, epäonnistuiko hormonikäsittely vai eikö kaupallinen menetelmä toiminut halutulla tavalla. Koejärjestelyä optimoimalla voitaisiin mahdollisesti saada kasvatettua Src:n signaalitasoja. Tämän työn perusteella käytetty kaupallinen menetelmä ei kuitenkaan välttämättä ole hyvä eturauhassyöpäsolujen signaalinvälityksen tutkimiseen. Myös Src:n soveltuvuus merkkiaineeksi VAL201-lääkemolekyylin vaikutuksen tutkimiselle jäi kyseenalaiseksi. VAL201:n vaikutuksen tutkimiseksi sekä sopivan merkkiaineen löytämiseksi tarvitaan lisätutkimuksia ja erilaisia koejärjestelyjä. Mahdollisena tutkimuskohteena voisivat olla esimerkiksi AR:n Src-välitteisen signaloinnin kohdegeenit ja niiden ekspressiotasot.

LÄHTEET

Abate-Shen, C. & Shen, M. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Dev* 14, 2410–2434.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4. painos. New York: Garland Science, 1340–1349.

Alimirah, F., Chen, J., Basrawala, Z., Xin, H. & Choubey, D. 2006. PC-3 cell line expresses androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett*. 580 (9): 2294–300.

Asim, M., Siddiqui, I., Hafeez, B., Baniahmad, A. & Mukhtar, H. 2008. Src kinase potentiates androgen receptor transactivation function and invasion of androgen-independent prostate cancer C4-2 cells. *Oncogene* 27 (25), 3596–604.

Asim, M., Hafeez, B., Siddiqui, I., Gerlach, C., Patz, M., Mukhtar, H. & Baniahmad, A. 2011. Ligand-dependent corepressor acts as a novel androgen receptor corepressor, inhibits prostate cancer growth, and is functionally inactivated by the Src protein kinase. *J BiolChem* 286 (43), 37108–37117.

Attard, G., Reid, A., Yap, T., Raynaud, F., Dowsett, M., Settatree, S., Barrett, M., Parker, C., Martins, V., Folkard, E., Clark, J., Cooper, C., Kaye, S., Dearnaley, D., Lee, G. & de Bono, J. 2008. Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *J Clin Oncol* 26, 4563–4571.

Auricchio, F. & Migliaccio, A. 2012. VAL201 – An inhibitor of Androgen Receptor-associated Src and Potential Treatment of Castration-resistant Prostate cancer. *European Oncology & Hematology* 8 (1), 32–35.

Biocompare 2015. Watch Video: MILLIPLEX® MAP Based on Luminex® Technology Streaming Video. Viitattu 21.3.2015. <http://www.biocompare.com/Life-Science-Videos/39984-Watch-Video-MILLIPLEX-MAP-Based-on-Luminex-Technology-Streaming-Video/>

Bostwick, D., Shan, A., Qian, J., Darson, M., Maihle, N., Jenkins, R. & Cheng, L. 1998. Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia. Comparison with matched foci of prostate carcinoma. *Cancer* 83 (1), 995–2002.

- Bostwick, D., Amin, M., Dundore, P., Marsh, M. & Schultz, D. 1993. Architectural patterns of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Human Pathology* 24 (3), 298–310.
- Bostwick, D. & Qian, J. 2004. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology* 17, 360–379.
- Bromann, P., Korkaya, H. & Courtneidge, S. 2004. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23, 7957–7968.
- Brown, M. & Cooper, J. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochimica et Biophysica Acta* 1287 (2–3), 121–149.
- Cai, H., Babic, I., Wei, X., Huang, J. & Witte, O. 2011. Invasive prostate carcinoma driven by c-Src and androgen receptor synergy. *CancerRes* 71, 862–72.
- Chang, Y., Kung, H. & Evans, C. 2007. Nonreceptor tyrosine kinases in prostate cancer. *Neoplasia* 9 (2), 90–100.
- Chong, Y., Mulhern, T. & Cheng, H. 2005. C-terminal Src kinase (CSK) and CSK homologous kinase (CHK) — endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors* 23, 233–244.
- Coleman, R. 2000. Management of Bone Metastases. *Oncologist*. 5 (6), 463–470.
- Coleman, R. 2001. Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev* 27, 165–176.
- Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O’Toole, K., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C., Korsmeyer, S. & Buttyan, R. 1993. Detection of the apoptosis suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 143, 390–400.
- Dawson, N. 2000. Intermittent androgen deprivation. *Curr Oncol Rep* 2, 409–416.
- de Marzo, A., Nelson, W., Meeker, A. & Coffey, D. 1998. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol* 160, 2381–2392.
- Eastham, J. A., Stapleton, A. M., Gousse, A. E., Timme, T. L., Yang, G., Slawin, K. M., Wheeler, T. M., Scardino, P. T. & Thompson, T. C. 1995. Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1 (10), 1111–1118.
- Eisenberger, A. 2008. The current knowledge of hormonal therapy in the treatment of prostate cancer. *Current Clinical Oncology: Prostate Cancer: Signaling Networks, Genetics, and New Treatment Strategies*. New Jersey: Humana Press, 339–354.

- Falkenstein, E., Tillmann, H-C., Christ, M., Feuring, M. & Wehling, M. 2000. Multiple actions of steroid hormones — a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52, 513–555.
- Fizazi, K. 2007. The role of Src in prostate cancer. *Ann Oncol.* 18 (11), 1765–1773.
- Gelmann, E. 2008. Prostate molecular oncogenesis: Gene deletions and somatic mutations. *Current Clinical Oncology: Prostate Cancer: Signaling Networks, Genetics, and New Treatment Strategies.* New Jersey: Humana Press, 71–97.
- Gnanapragasam, V., Leung, H., Pulimood, A., Neal, D. & Robson, C. 2001. Expression of RAC3, a steroid hormone receptor coactivator in prostate cancer. *Br J Cancer* 85, 1928–1936.
- Gonfloni, S., Weijland, A., Kretzschmar, J. & Superti-Furga, G. 2000. Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src, *Nature Structural Biology* 7 (4), 281–286.
- Gregory, C., He, B., Johnson, R., Ford, O., Mohler, J., French, F. & Wilson, E. 2001. A mechanism for androgen receptor mediated prostate cancer after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61, 4315–4319.
- Guarino, M. 2010. Src signaling in cancer invasion. *J CellPhysiol* 223, 14–26.
- Guarino, M., Rubino, B. & Ballabio, G. 2007. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39 (3), 305–318.
- Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., Nesheiwat, I., Kong, X., Melamed, J., Handratta, V., Njar, V., Brodie, A., Yu, L., Veenstra, T., Chen, H. & Qiu, Y. 2006. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *CancerCell* (2006) 10 (4), 309–319.
- Heinlein, C. & Chang, C. 2002. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol.* 16 (10), 2181–2187.
- Heinlein, C. & Chang, C. 2004. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25 (2), 276–308.
- Horoszewicz, J., Leong, S., Chu, T., Wajsman, Z., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, J., Chai, L., Kakati, S., Arya, S. & Sandberg, A. 1980. The LNCaP cell line - a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Models for Prostate Cancer* 37, 115–132.
- Horoszewicz, J., Leong S., Kawinski, E., Karr, J., Rosenthal, H., Chu, T., Mirand, E. & Murphy, G. 1983. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43 (4), 1809–1818.

- Joensuu, H., Kouri, M., Ojala, A. & Tenhunen, M. 2002. *Kliininen sädehoito*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Joensuu, H., Roberts, P. J., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkiö, S. & Kouri, M. 2013. *Syöpätaudit*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J-F. & Jones, L. W. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17 (1), 16–23.
- Langeberg, W., Isaacs, W. & Stanford, J. 2007. Genetic etiology of hereditary prostate cancer. *Front Biosci.* 12, 4101–4110.
- Lee, L., Louie, M., Desai, S., Yang, J., Chen, H., Evans, C. & Kung, H. 2004. Interleukin-8 confers androgen-independent growth and migration of LNCaP: differential effects of tyrosine kinases Src and FAK. *Oncogene* 23 (12), 2197–2205.
- Lee, L., Guan, J., Qiu, Y. & Kung, H. 2001. Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bmx, Src, and focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 21 (24), 8385–8397.
- Linja, M., Savinainen, K., Saramäki, O., Tammela, T., Vessella, R. & Visakorpi, T. 2001. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 61 (9), 3550–3555.
- Maa, M., Leu, T., McCarley, D., Schatzman, R. & Parsons, S. 1995. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6981–6985.
- Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., Zhao, Y., DiConcini, D., Puxeddu, E., Esen, A., Eastman, J., Weigel, N. & Lamb, D. 2000. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 60, 944–949.
- Martin, G. 2001. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (6), 467–475.
- Marzia, M., Sims, N., Voit, S., Migliaccio, S., Taranta, A., Bernardini, S., Faraggiana, T., Yoneda, T., Mundy, G., Boyce, B., Baron, R. & Teti, A. 2000. Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Cell Biol* 151 (2), 311–320.
- McMemamin, M. E., Soug, P., Perera, S., Loda M. & Sellers, W. R. 1999. Loss of PTEN expression in paraffin- embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 59 (17), 4291–4296.

- Migliaccio, A., Castoria, G., Di, D., DeFalco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M., Ametrano, D., Zannini, M., Abbondanza, C. & Auricchio, F. 2000. Steroid-induced androgen receptor oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 19 (20) 5406–5417.
- Migliaccio, A., Castoria, G., DiDomenico, M., DeFalco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Bottero, D., Varricchio, L., Nanayakkara, M., Rotondi, A. & Auricchio, F. 2002. Sex steroid hormones act as growth factors. *J SteroidBiochemMolBiol* 83 (1–5), 31–35.
- Miyazaki, T., Sanjay, A., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W. & Baron, R. 2004. *Src* kinase activity is essential for osteoclast function. *J Biol Chem* 279 (17), 17660–17666.
- Mohler, J., Chen, Y., Hamil, K., Hall, S., Cidlowski, J., Wilson, E., French, F. & Sar, M. 1996. Androgen and glucocorticoid receptors in the stroma and epithelium of prostatic hyperplasia and carcinoma. *Clin Cancer Res* 2, 889–895.
- Nam, S., Kim, D., Cheng, J., Zhang, S., Lee, J., Buettner, R., Mirosevich, J., Lee, F. & Jove, R. 2005. Action of the *Src* family kinase inhibitor, dasatinib (BMS-354825), on human prostate cancer cells. *Cancer Res* 65 (20) 9185–9189.
- Nan, B., Snabboon, T., Unni, E., Yuan, X-J., Whang, Y.E. & Marcelli, M. 2003. The PTEN tumor suppressor is a negative modulator of androgen receptor transcriptional activity. *J Mol Endocrinol* 31 (1), 169–183.
- Nauseef, J. & Henry, M. 2011. Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nat Rev Urol* 8, 428–39.
- Norlén, B. J. & Schenkmanis, U. 2008. *Eturauhassyöpä*. Vantaa: Dark Oy.
- Nwosu, V., Carpten, J., Trent, J. & Sheriden, R. 2001. Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Hum Mol Genet* 10, 2313–2318.
- Oh, W., Hurwitz, M., D'Amico, A., Richie, J. & Kantoff, P. 2003. *Biology of Prostate Cancer*. Cancer Medicine 6. BC Decker.
- Parsons, S. & Parsons, J. 2004. *Src* family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906–7909.
- Recchia, I., Rucci, N., Festuccia, C., Bologna, M., MacKay, A., Migliaccio, S., Longo, M., Susa, M., Fabbro, D. & Teti, A. 2003. Pyrrolopyrimidine *c-Src* inhibitors reduce growth, adhesion, motility and invasion of prostate cancer cells in vitro. *Eur J Cancer* 39, 1927–1935.

Revelli, A., Massobrio, M. & Tesarik, J. 1998. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* 19, 3–17.

Rice, L., Lepler, S., Pampo, C. & Siemann, D. 2012. Impact of the SRC inhibitor dasatinib on the metastatic phenotype of human prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 29, 133–142.

Robinson, D., He, F., Pretlow, T. & Kung, H. 1996. A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5958–62.

Rosenberg, L. & Östenberg, B. 2008. Eturauhassyöpäpotilaan opas. Suomen Syöpäpotilaat ry. Painotalo Miktor Oy.

Roskoski, R. 2004. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (4), 1155–1164.

Rucci, N., Recchia, I., Angelucci, A., Alamanou, M., Del Fattore, A., Fortunati, D., Susa, M., Fabbro, D., Bologna, M. & Teti, A. 2006. Inhibition of protein kinase c-Src reduces the incidence of breast cancer metastases and increases survival in mice: implications for therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 161–172.

Rucci, N., Susa, M. & Teti, A. 2008. Inhibition of protein kinase c-Src as a therapeutic approach for cancer and bone metastases. *Anticancer Agents Med Chem* 8 (3), 342–349.

Ruizeveld de Winter, J., Janssen, P., Sleddens, H., Verleun-Mooijman, M., Trapman, J., Brinkmann, A., Santerse, A., Schroder, F. & van der Kwast, T. 1994. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *American Journal of Pathology* 144 (4), 735–746.

Russell, P., Bennett, S. & Stricker, P. 1998. Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* 44, 705–723.

Stehelin, D., Fujita, D., & Padgett, T. 1977. Detection and enumeration of transformation defective strains of avian sarcoma virus with molecular hybridization. *Virology* 76 (2), 675–684.

Stehelin, D., Varmus, H., Bishop, J. & Vogt, P. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260 (5547), 170–173.

Summy, J. & Gallick, G. 2003. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 22, 337–358.

Suomen syöpärekisteri 2012. Tilastot. Viitattu 13.1.2015.
<http://www.cancer.fi/syoparekisteri/tilastot/ajantasaiset-perustaulukot/koko-maa/>

- Svindland, A., Eri, L. & Tveter, K. 1996. Morphometry of benign prostatic hyperplasia during androgen suppressive therapy: relationships among epithelial content, PSA density, and clinical outcome. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 179, 113–117.
- Taari, K., Aaltomaa, S., Nurmi, M., Parpala, T. & Tammela, T. 2013. *Urologia*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.
- Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W., Liang, C-Z. & Huang, J. 2011. PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. *Prostate* 71 (15), 1668–1679.
- Tatarov, O., Mitchell, T., Seywright, M., Leung, H., Brunton, V. & Edwards, J. 2009. SRC family kinase activity is up-regulated in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15, 3540–3549.
- Thomas, S. & Brugge, J. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513–609.
- Thomas, J., Ellis, B., Boerner, R., Knight, W., White, G. & Schaller, M. 1998. SH2- and SH3-mediated interactions between focal adhesion kinase and Src. *J Biol Chem* 273 (1), 577–583.
- Tice, D., Biscardi, J., Nickles, A. & Parsons, S. 1999. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1415–1420.
- Tilley, W., Buchanan, G., Hickey, T. & Bentel, J. 1996. Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res* 2, 277–285.
- Unni, E., Sun, S., Nan, B., McPhaul, M., Cheskis, B., Mancini, M. & Marcelli, M. 2004. Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Res* 64 (19), 7156–7168.
- Vezina, C. & Bushman, A. 2007. Hedgehog signaling in prostate growth and benign prostate hyperplasia. *Curr Urol Rep* 8, 275–280.
- Vierimaa, H. & Laurila, M. 2013. *Keho. Anatomia ja fysiologia*. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinänen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J. & Kallioniemi, O. 1995. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 9, 401–406.
- Vlaeminck-Guillem, V., Gillet, G. & Rimokh, R. 2014. Src: marker or actor in prostate cancer aggressiveness. *Front Oncol* 4, 222.

Waltering, K., Helenius, M., Sahu, B., Manni, V., Linja, M., Jänne, O. & Visakorpi, T. 2009. Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens. *Cancer Res.* 69 (20), 8141–8149.

Wen, S., Chang, H., Tian, J., Shang, Z., Niu, Y. & Chang, C. 2015. Stromal androgen receptor roles in the development of normal prostate, benign prostate hyperplasia, and prostate cancer. *Am J Pathol* 185 (2), 293–301.

Xing, L., Venegas, A., Chen, A., Garrett-Beal, L., Boyce, B., Varmus, H. & Schwartzberg, P. 2001. Genetic evidence for a role for Src family kinases in TNF family receptor signaling and cell survival. *Genes Dev* 15 (2), 241–253.

Yang, J., Fizazi, K., Peleg S., Sikes, C., Raymond, A., Jamal, N., Hu, M., Olive, M., Martinez, L., Wood, C.G, Logothetis, C., Karsenty, G. & Navone, N. 2001. Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway. *Cancer Res* 61 (14), 5652–5659.

Yang, J. & Weinberg, R. 2008. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *DevCell* 14, 818–29.

KASVATUSLIUOSTEN VALMISTAMINEN

DMEM

500 ml DMEM

50 ml iFCS

5 ml penisilliini/streptomysiini

- Seerumi inaktivoidaan 30 min 56 °C vesihauteessa
- Seerumi ja antibiootti suodatetaan 0,22 µm ruiskusuodattimella ja lisätään kasvatusliuokseen
- Liuos jaetaan 50 ml:n Falcon-putkiin

RPMI

500 ml RPMI 1640

50 ml iFCS

5 ml penisilliini/streptomysiini

0,146 g L-glutamiini

1,19 g HEPES

1,25 g glukoosi

55 mg natriumpyruvaatti

- Seerumi inaktivoidaan 30 min 56 °C vesihauteessa
- Seerumi ja antibiootti lisätään kasvatusliuokseen
- Kiinteät aineet punnitaan ja lisätään liuokseen
- Liuos suodatetaan 0,22 µm ruiskusuodattimella ja jaetaan 50 ml:n Falcon-putkiin

SOLUVILJELYN TYÖOHJE

SOLUJEN SULATUS NESTETYPESTÄ

- Soluampulli sulatetaan 37 °C vesihauteessa
- Solut siirretään 15 ml Falcon-putkeen
- Lisätään 10 ml kasvatusliuosta
- Sentrifugoidaan 4 min 1000 rpm
- Solupelletti suspensoidaan 3–4 ml:aan kasvatusliuosta
- Liuokset jaetaan kahteen pieneen kasvatuspulloon, lisätään kasvatusliuosta lopputilavuuteen 10 ml
- Kasvatus 37 °C inkubaattorissa

SOLUJEN YLLÄPITO (2x / vk)

- Vanha kasvatusliuos poistetaan
- Solut pestään kahdesti 1 x PBS:llä (pieni pullo 7 ml, iso pullo 10 ml)
- Lisätään Trypsiini-EDTA (pieni pullo 2 ml, iso pullo 4 ml)
- Inkuboidaan 5 min 37 °C
- Lisätään 10 ml kasvatusliuosta ja siirretään Falcon-putkeen
- Sentrifugoidaan 4 min 1000 rpm
- Solupelletit suspensoidaan 3–4 ml:aan kasvatusliuosta
- Pieni pullo: kaikki solut siirretään isoon pulloon, jossa kasvatusliuosta lopputilavuuteen 20 ml
- Iso pullo: solut jaetaan uusiin pulloihin, esim 1:3
- Kasvatus 37 °C inkubaattorissa

SOLUJEN PAKASTUS

- Vanha kasvatusliuos poistetaan
- Solut pestään kahdesti 10 ml PBS:illä
- Lisätään 4 ml trypsiini-EDTA
- Inkuboidaan 5 min 37 °C
- Lisätään 10 ml kasvatusliuosta ja siirretään Falcon-putkeen
- Sentrifugoidaan 4 min 1000 rpm
- Solupelletti suspensoidaan 2 ml:aan pakastusliuosta
- Liuos jaetaan kahteen pakastusampulliin
- Ampullit pakastetaan -70 °C solujen pakastusrasiassa
- Siirretään nestetyypeen vuorokauden kuluttua

HORMONIKÄSITTELYN TYÖOHJE

- Solut lasketaan Bürkerin kammiossa
- 24-kuoppalevyille lisätään 50 000 solua / 500 µl kasvatusliuosta / kaivo
- Soluja kasvatetaan 2 vrk 37 °C
- Vanha kasvatusliuos poistetaan
- Pestään 2 x 500 µl PBS:llä
- Lisätään PC-3-soluille köyhä DMEM ja LNCaP-soluille köyhä RPMI 1640 -liuos (ei sisällä fenolipunaa eikä seerumia)
- Inkuboidaan 24 h
- Soluille tehdään hormonikäsittely lisäämällä 300 µl kasvatusliuosta, jossa haluttu hormoni + VAL210 -seos
- Inkuboidaan haluttu aika
- Pestään 2 x 500 µl PBS:llä
- Hormonikäsittelyn jälkeen solut hajotetaan suspensioimalla ne 200 µl MILLIPLEX[®] MAP lyysipuskuriin, jossa proteaasi-inhibiittoria 1:200
- Inkuboidaan 15 min 4 °C
- Pakastus -70 °C
- Sulatetaan ja suodatetaan 0,22 µm sentrifugaalisuodattimella

PROTEIINIMÄÄRITYKSEN TYÖOHJE (BCA Protein Assay Kit, Novagen)

- 96-kuoppalevyille pipetoidaan 25 µl lyaattia tai BSA-standardeja eri pitoisuuksilla (0, 25, 125, 250, 500, 1000 µg/ml BSA)
- Lisätään 200 µl BCA working reagent, jossa 50 osaa BCA ja 1 osa 4 % Cupric sulfate
- Sekoitetaan ravistelijassa 30 s
- Levy peitetään suojamuovilla ja inkuboidaan 30 min 37 °C
- Mitataan absorbanssi aallonpituudella 565 nm

IMMUNOKEMIALLISEN MÄÄRITYKSEN TYÖOHJE (MILLIPLEX® MAP)

- Pestään 96-kuoppalevyjen kaivot 50 µl 1 x Assay Buffer 2: lla
- 10 min RT ravistelijassa
- Poistetaan Assay Buffer 2
- Kaivoihin pipetoidaan 25 µl 1 x magneettihelmiä
- Pipetoidaan nollanäytteeseen 25 µl Assay Bufferia, kontroleihin 25 µl kontrollilysaattia
- Pipetoidaan 25 µl näytelysaatteja (pipetointikaavion mukaisesti)
- Inkuboidaan yön yli 4 °C pimeässä ravistelijassa
- Asetetaan 96-kuoppalevy magneettialustalle ja annetaan magneettihelmien asettua kaivojen pohjalle 1 min
- Kaadetaan näytteet pois (helmet kiinnittyneet pohjalle)
- Pestään kaivot 2 x 100 µl Assay Buffer 2:lla, poistetaan levy magneettialustalta ja sekoitetaan 30 s ravistelijassa
- Levy magneettialustalle 1min ja poistetaan Assay Buffer 2
- Pipetoidaan 25 µl MAP Detection Antibody -seosta kaivoihin
- Peitetään kannella ja inkuboidaan 1 h RT ravistelijassa
- Levy magneettialustalle 1 min ja poistetaan MAP Detection antibody
- Pipetoidaan kaivoihin 25 µl SAPE
- Peitetään kannella ja inkuboidaan 15 min RT ravistelijassa
- Lisätään kaivoihin 25 µl MAP Amplification Buffer
- Inkuboidaan 15 min RT ravistelijassa
- Levy magneettialustalle 1 min ja poistetaan SAPE / Amplification Buffer
- Helmet suspensoidaan 150 µl:n Assay Bufferia
- Inkuboidaan 5 min RT ravistelijassa
- Mitataan signaali MAGPIX®-analysaattorilla