

**Eturauhaselle ominainen ANO7-proteiini ja siihen liittyvät proteiinit  
eturauhassyövässä**

Aliisa Takala

Pro gradu –tutkielma

Turun yliopisto  
Biologian laitos  
20.05.2020

Linja: Fysiologian ja genetiikan linja  
Erikoistumisala: Ihmisgenetiikka

Laajuus: 40 op

Tarkastajat:

- 1.
- 2.

Hyväksytty

# Sisällysluettelo

<b>1. JOHDANTO</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1. Eturauhassyöpä</b> .....	<b>5</b>
1.1.1. Eturauhanen.....	6
1.1.2. Eturauhassyöpä Suomessa.....	6
1.1.3. Eturauhassyövän hoito ja ennuste.....	7
<b>1.2. Eturauhassyövän geneettinen tausta</b> .....	<b>8</b>
1.2.1. Perinnöllinen eturauhassyöpä .....	9
1.2.2. DNA:n korjausreaktioteihin osallistuvat geenit.....	9
<b>1.3. ANO7</b> .....	<b>12</b>
1.3.1. ANO7-geeni .....	12
1.3.4. ANO7-geenin pistemutaatiot .....	14
1.3.5. Vuorovaikuttavien proteiinien tunnistus .....	15
<b>1.4. Vesikkeliliikenne</b> .....	<b>16</b>
1.4.1. Syöpäsolujen erittämät vesikkelit .....	16
1.4.2. Proteiinit vesikkeliliikenteessä .....	17
1.4.3. AP2B1 .....	19
1.4.4. COPG2 .....	20
1.4.5. HSPA1A .....	21
1.4.6. SND1.....	22
<b>1.5. Tutkimuksen tarkoitus</b> .....	<b>23</b>
<b>2. AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3. Soluviljely</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4. Midiprepin valmistus</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5. LNCaP-solujen transfektointi</b> .....	<b>25</b>
<b>2.6. Vasta-ainevärjäykset</b> .....	<b>25</b>
2.6.1. Vasta-aineiden optimointi.....	25
2.6.2. Vasta-ainevärjäykset .....	26
<b>2.7. Mikroskopia</b> .....	<b>27</b>
2.7.1. Fluoresenssimikroskopia .....	27
2.5.2. STED-konfokaalimikroskopia .....	27
<b>3. TULOKSET</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. Validointi fluoresenssimikroskoopilla</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2. Tranfektoidut konstruktit</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3. AP2B1</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4. COPG2</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5. HSPA1A</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6. SND1</b> .....	<b>37</b>
<b>4. POHDINTA</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1. ANO7:n kanssa kolokaloituvat proteiinit</b> .....	<b>42</b>
4.1.1. AP2B1 .....	43
4.1.2. COPG2 .....	43
4.1.3. HSPA1A .....	44
4.1.4. SND1.....	45
<b>4.2. Yhteydet muihin anoktamiineihin</b> .....	<b>46</b>

4.3.	Menetelmien vahvuudet ja heikkoudet.....	47
4.4.	Tulevaisuuden tavoitteet ja tulosten soveltamismahdollisuudet .....	48
	<b>KIITOKSET.....</b>	<b>50</b>
	<b>KIRJALLISUUS .....</b>	<b>51</b>
	<b>LIITTEET.....</b>	<b>58</b>

TURUN YLIOPISTO  
Biologian laitos  
Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta

TAKALA, ALIISA: Eturauhaselle ominainen ANO7-proteiini ja siihen liittyvät proteiinit eturauhassyövässä

Pro gradu -tutkielma, 53 s., 2 liitettä  
Ihmisgenetiikka  
Toukokuu 2020

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

---

Eturauhassyöpädiagnoosin saa maailmassa vuosittain yli miljoona miestä. Tämä suomalaistenkin miesten yleisin syöpä on edelleen iso haaste terveydenhuollolle. Eturauhassyövän ennusteen parantamiseksi sen diagnosointiin kaivattaisiin tarkempia menetelmiä kuin nykyiset käytössä olevat menetelmät. Nykyiset diagnostiset menetelmät eivät kykene ennustamaan taudin aggressiivisuutta, ja ne aiheuttavat usein taudin yliidiagnosointia ja -hoitoa. Yliidiagnosointi ja -hoito aiheuttavat lisäkustannuksia terveydenhuollossa ja huonontavat potilaan elämänlaatua huomattavasti. Koko genomien laajuisessa assosiaatiotutkimuksessa ja kytkentäanalyyseissä löydetyn *Anoktamiini 7*-geenin mutaatioiden on todettu altistavan eturauhassyöväälle ja sen aggressiiviselle muodolle. Kyseisen geenin ja sen tuottaman ANO7-proteiinin toimintamekanismit ovat vielä tuntemattomia. Tutkimalla ANO7-proteiinia ja sen toimintaa, voidaan selvittää, voisiko proteiini olla mahdollinen biomarkkeri eturauhassyöväälle. Tulevaisuudessa geeni voisi toimia jopa eturauhassyövän immunoterapian kohteena.

Tässä tutkimuksessa tunnistettiin ANO7-proteiinin kanssa mahdollisesti vuorovaikuttavia proteiineja ja pyrittiin saamaan lisää tietoa ANO7:n toiminnasta soluissa. Pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli selvittää sijoittuvatko ANO7 ja kukin viidestä valitusta proteiinista samaan paikkaan solussa. ANO7-proteiinille ja kullekin mahdollisesti vuorovaikuttavalle proteiinille (AP2B1, COPG2, HSPA1A, Ku80 ja SND1) tehtiin samanaikaisesti immunofluoresenssivärjäys eturauhassyöpäsoluissa ja kolokalisaatiota tutkittiin mikroskoopilla.

Tämä tutkimus oli osa suurempaa kokonaisuutta, jossa tarkasteltiin ensimmäistä kertaa ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavia proteiineja. Tutkimuksessa havaittiin, että ANO7 kolokalisoituu solussa muun muassa vesikkelien muodostukseen ja vesikkeliliikenteeseen osallistuvien AP2B1-, COPG2-, SND1- ja HSPA1A-proteiinien kanssa. Tutkittavat proteiinit sijoituivat soluissa pääasiassa solukalvolle ja lisäksi solun kalvorakenteista muun muassa Golgin laitteeseen. Tutkimuksessa tarkasteltuja proteiineja voitaisiin tulevaisuudessa tutkia tarkemmin eturauhassyöpäsolujen vesikkeliliikenteessä. Syövän kehittyessä syöpäsolujen vesikkelien muodostus ja erityis lisääntyy. Syöpäsolujen erittämiä ja solun sisällä liikkuvia vesikkelejä tutkimalla voitaisiin mahdollisesti tulevaisuudessa seurata syövän syntyä ja sen kehittymistä. Lisäksi tutkimalla syöpäsolujen erittämiä vesikkelejä voitaisiin saada lisää tietoa syövästä ja sen mekanismeista.

ASIASANAT: ANO7, biomarkkeri, eturauhassyöpä, immunofluoresenssivärjäys, proteiini-proteiini vuorovaikutus, vesikkeliliikenne

# 1. JOHDANTO

## 1.1. *Eturauhassyöpä*

Eturauhassyöpä, kuten muutkin syövät, syntyy geeneihin kertyvien mutaatioiden seurauksena. Normaalisti elimistön solujen jakautuminen on tarkasti säädeltyä. Pitkälle kehittyneiden korjausjärjestelmien avulla korjataan perimäaineksen vaurioita, joita syntyy jatkuvasti soluissa. Mutaatioiden vaikutuksesta soluihin kertyy useita geenivirheitä. Geenivirheet sekä solun jakautumista, kasvua ja erilaistumista säätelevien mekanismien pettäminen saattavat johtaa syövän syntyyn. Solun jakautumista säätelevien mekanismien pettäessä solut voivat kasvaa ja jakaantua hallitsemattomasti, jolloin muodostuu kasvaimiksi kutsuttava solumassa. Kasvaimet voivat olla hyvänlaatuisia tai pahanlaatuisia. Pahanlaatuista kasvainta kutsutaan syöpäkasvaimeksi.

Onkogeeneit ja kasvunrajoitegeeneit ovat solun toimintaa ohjaavia geenejä. Onkogeeni on proto-onkogeenistä, eli esisyöpägeenistä, mutaation vaikutuksesta muuttunut syöpägeeniksi (onkogeeni). Esiisyöpägeenit osallistuvat useisiin solun normaaliin kasvuun ja jakautumiseen liittyviin toimintoihin, kuten solusyklin säätelyyn ja apoptoosiin (ohjelmoitu solukuolema). Kasvunrajoitegeenit, jotka tunnetaan myös syövänestogeneineinä, tuottavat nimensä mukaan proteiineja, joilla on syövän syntymistä estävä vaikutus. Syöpägeenien aktivoitumisen lisäksi kasvunrajoitegeenien toiminnan häiriintyminen kasvattavat syöpäriskiä.

Eturauhassyöpä etenee monivaiheisena ketjuna. Ensimmäisenä solut jakaantuvat hallitsemattomasti eturauhasen rauhasrakenteissa. Tämän seurauksena eturauhasen rauhas soluissa kehittyy PIN-muutos (engl. pre-cancerous prostatic intraepithelial neoplasia). Seuraavaksi solut leviävät, mutta pysyvät edelleen eturauhasessa. Mikäli syöpä jatkaa leviämistään, tunkeutuvat syöpäsolut eturauhasesta ulos ja leviävät lähellä oleviin elimiin. Ensimmäisenä rakkularauhasiin ja virtsarakkoon edenneet syöpäsolut leviävät lopulta imusolmukkeisiin ja muihin elimiin muodostaen etäpesäkkeitä. (Abate-Shen, Cory & Shen 2000).

### 1.1.1. Eturauhanen

Eturauhanen on noin luumun kokoinen rauhanen, joka sijaitsee osittain virtsaputken ympärillä ja virtsarakon alapuolella. Lisäsukupuolirauhasiin kuuluvalla rauhasella on olennainen osa miehen lisääntymiselimistöä, sillä se tuottaa suuren osan siemennesteestä. Eturauhasen tuottama ja erittämä neste ravitsee, suojaa ja auttaa siemennesteen siittiöitä liikkumaan. Kyseinen erite sisältää myös eturauhassyövän diagnosoinnissa käytettävää entsyymiä, eturauhaselle ominaista antigeeniä (PSA, prostate specific antigen). Siemennesteen tuottamisen lisäksi eturauhasen tehtäviin kuuluu miessukupuolihormoni testosteronin muokkaus biologisesti aktiiviseen muotoon dihydrotestosteroniksi (DHT).

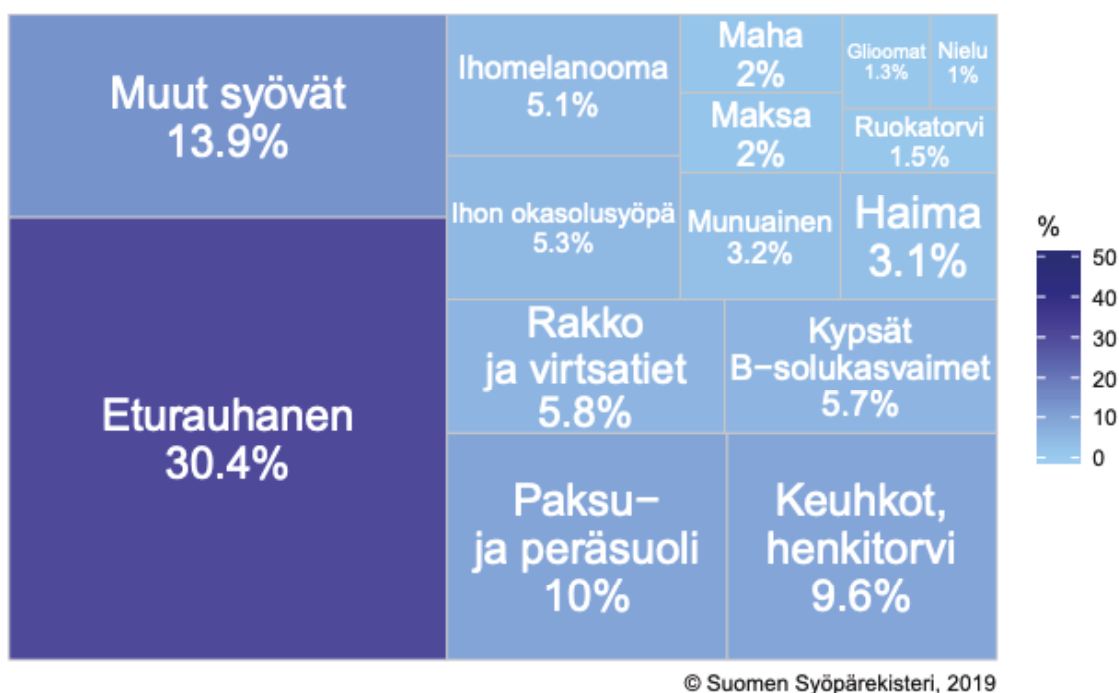
Eturauhanen koostuu histologisesti sidekudoksesta ja rauhasista. Kudos voidaan jakaa sen sijainnin perusteella sisä-, keski- ja ulko-osaan. Sisäosassa tapahtuvat muutokset johtavat usein eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvuun (BPH, benign prostatic hyperplasia), joka on ikääntyvien miesten yleinen vaiva. Eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvuun liittyvät tiheä virtsaamisen tarve ja vaikeudet virtsatessa johtuvat eturauhasen painautumisesta virtsarakkoa ja virtsaputkea kohti. Pahanlaatuiset kasvaimet eturauhasessa kehittyvät useimmiten eturauhasen uloimpaan osaan, joka kattaa noin 70% kudoksesta. (Abate-Shen, C. & Shen 2000).

### 1.1.2. Eturauhassyöpä Suomessa

Eturauhassyöpä on yksi maailman yleisimmistä syöivistä ja Suomessa siihen sairastuu vuosittain noin 5000 miestä (Suomen syöpärekisteri, 2019). Eturauhassyövän ennuste on parantunut viime vuosien aikana huomattavasti. Hoidon ja ennusteen kannalta olisi tärkeää, että aggressiiviset ja etäpesäkkeitä lähettävät eturauhassyövät havaittaisiin entistä aikaisemmin. Levinnyttä ja etäpesäkkeitä lähettänyttä eturauhassyöpää sairastavien miesten keskimääräinen elinaikaennuste on 2-3 vuotta.

Eturauhassyövän kustannukset Suomessa kattavat vuosittain suurimman osan kaikkien syöpien hoitokustannuksista (THL, 2014). Eturauhassyövän ilmaantuvuus alkoi kasvaa huomattavasti 1990-luvulla, ja vuonna 2017 se oli miesten yleisin syöpä kattaen yli 30% kaikista miesten syöpätapauksista (Suomen Syöpärekisteri, Kuva 1). Syövän diagnosointiin käytettävän PSA:n määrittäminen on tällä hetkellä eturauhassyövän käytetyin

biomarkkeri. PSA-merkkiaineen tutkimuksen myötä vuosittaisten eturauhassyöpädiagnoosien määrää nousi runsaasti aina vuoteen 2005 asti (Duodecim, 2019). Suuri osa havaituista eturauhassyöpätapauksista ei kuitenkaan koskaan kehity kliiniseksi syöväksi, mikä aiheuttaa eturauhassyövän yli diagnosointia ja –hoitoa. Kaikki eturauhassyövät eivät kuitenkaan aiheuta veren PSA-pitoisuuden nousua ja toisin päin, PSA-pitoisuuden nousu ei aina ole merkki eturauhassyövästä. PSA-pitoisuus voi nousta myös esimerkiksi eturauhasen tulehduksessa. PSA-merkkiaineen tutkimuksen lisäksi eturauhassyöpään tarvittaisiin herkempiä ja tarkempia biomarkkereita.



Kuva 1. Suomen syöpärekisterin (2017) raportissa esitetty kaaviokuva prosentti-osuuksilla kaikista uusista miehillä todetuista syöpätapauksista Suomessa vuonna 2017. Eturauhassyöpä kattaa lähes kolmasosan kaikista uusista syöpätapauksista.

### 1.1.3. Eturauhassyövän hoito ja ennuste

Eturauhassyöpää voidaan hoitaa radikaalilla eturauhasen poistoleikkauksella, sädehoidolla ja/tai liitännäishoidolla eli hormonihoidolla. Paikallishoidolla voidaan hoitaa kaikkia paikallisia ja paikallisesti edenneitä eturauhassyöpiä, mutta pienen riskin potilaille ei anneta liitännäishoitoa. Pienen riskin eturauhassyöpä voidaan jättää jopa säännölliseen seurantaan, jos hoidon ei odoteta parantavan potilaan ennustetta (Käypä hoito, Eturauhassyöpä). Syöpä voi kuitenkin edetä paikallishoidoista huolimatta. Paikallisesti levinnyt syöpä voi ennen pitkää johtaa hormonihoidoista riippumattomaan

etäpesäkkeitä lähettävään eturauhassyöpään (CRPC, castration resistant prostate cancer). Potilaan, jonka eturauhassyöpä on edennyt hormonihoidoista riippumattoman etäpesäkkeitä lähettävään eturauhassyöpään, elinajanodote on yleensä noin 6–18 kuukautta (Duodecim 2014). Eturauhassyövän hoitomuotona käytettävät leikkaus ja säde-/hormonihoito ovat osoittautuneet lähes tuloksettomiksi, mikäli eturauhassyöpä on hormonihoidolle resistentti, tai syöpä on ehtinyt lähettää etäpesäkkeitä (Alexandra J. Stewart ym. 2005). Pitkälle edenneissä syöpätapauksissa voidaan antaa myös kemoterapiaa ja uuden sukupolven antiandrogeenejä. Kemoterapia ja uuden sukupolven antiandrogeenit eivät kuitenkaan ole parantavia hoitoja, vaan pikemminkin lisäävät potilaan elinaikaa. Edenneeseen eturauhassyöpään on myös löydetty uusia yksittäisempiä hoitomuotoja, mutta tällä hetkellä on hyvin vaikea ennustaa mistä lääkkeestä kukin potilas hyötyy. Yksilöllistettyä hoitoa varten tarvitaan lisää tietoa syövän mekanismeista ja siitä, kuinka esimerkiksi erilaiset geneettiset muutokset vaikuttavat hoitovasteisiin.

## *1.2. Eturauhassyövän geneettinen tausta*

Eturauhassyövän syntyyn vaikuttavat vahvasti geneettiset tekijät, mutta myös ulkoiset riskitekijät. Monitekijäisenä tautina eturauhassyövän syntyyn vaikuttavaa yksittäistä tekijää ei voida sanoa. Huomattavia riskitekijöitä tiedetään olevan muun muassa aikaisemmin perheessä sairastettu eturauhassyöpä, ikä ja etninen tausta (Schaid2004). Viisikymmentävuotiasta eturauhassyöpäpotilasta voidaan sanoa vielä nuoreksi potilaaksi, sillä eturauhassyöpä on yleensä vanhempien miesten tauti. Suurin osa eturauhassyövän geneettisistä tekijöistä liittyy luultavasti geenien säätelyyn. Eturauhassyövän, kuten muidenkin syöpien, yksi suurimmista syövän syntyyn vaikuttavista tekijöistä geneettisten riskitekijöiden lisäksi on sattuma.

Eturauhassyöpätapaukset voidaan jakaa perhehistorian perusteella sporadisiin, familiaalisiin ja perinnöllisiin eturauhassyöpätapauksiin. Suurin osa eturauhassyöpätapauksista on satunnaisesti suvussa esiintyviä sporadisia syöpiä (75-80%), jolloin suvun muilla jäsenillä ei ole todettu eturauhassyöpää. Sporadinen syöpä on yleisesti ottaen sattuman, elintapojen ja ympäristötekijöiden yhteistulos. Periytyvissä eturauhassyöpätapauksissa eturauhassyöpään altistavat geenimuutokset peritään vanhemmilta ja ne lisäävät miehen riskiä sairastua eturauhassyöpään. Familiaalisella syöpäalttiudella tarkoitetaan suvuittain esiintyvää synnynnäistä syöpäalttiutta, jossa joko kaksi ensimmäisen asteen sukulaista tai yksi ensimmäisen asteen ja kaksi tai useampi toisen asteen sukulaista on sairastanut eturauhassyövän. Perinnöllinen eturauhassyöpä

noudattaa mendelististä periytymiskaavaa ja sitä voidaan pitää familiaalisen eturauhassyövän alatyypinä. Perinnöllisessä eturauhassyövässä suvussa eturauhassyöpää sairastavien/sairastaneiden lukumäärän tulee olla suurempi kuin familiaalisessa periytymisessä. (Carter ym. 1993) Periytymättömät sporadiset mutaatiot, jotka johtavat eturauhassyöpään, eivät eroa huomattavasti kliinisesti perinnöllisistä eturauhassyöivistä. Sporadisten mutaatioiden seurauksena kehittyneet syövät havaitaan yleensä noin 6-7 vuotta myöhemmin kuin perinnölliset eturauhassyövät. (Duodecim 2014).

### 1.2.1. Perinnöllinen eturauhassyöpä

Perinnöllinen eturauhassyöpä on todennäköisesti useiden tiettyihin geeneihin kohdistuvien mutaatioiden yhteisvaikutuksen tulos yhdessä elämäntapaan liittyvien riskitekijöiden kanssa (MacInnis ym. 2010). Perinnöllisen eturauhassyövän taustalla saattaa olla useampi geeni, joista jokainen osaltaan lisää riskiä sairastua eturauhassyöpään. Perinnölliseen eturauhassyöpään liitettäviä geenejä voidaan havaita kytkenäanalyyysien avulla. Kaksi geeniä ovat usein kytkeytyneet toisiinsa, kun ne sijaitsevat kromosomissa lähellä toisiaan. Tämän seurauksena ne myös useimmiten periytyvät yhdessä. Genomin laajuisen kytkenäanalyysin avulla on löydetty useita eturauhassyöpään liittyviä kromosomilokuksia, ja tätä kautta mahdollisia kandidaattigeenejä. Useat tutkimukset ovat osoittaneet suvussa sairastettujen eturauhassyöpien lisäävän miehen riskiä sairastua eturauhassyöpään. Eturauhassyövän riski kasvaa sitä mukaan, mitä useampi lähisukulainen on sairastanut syövän, verrattaessa mieheen, jolla ei ole positiivista perhetaustaa eturauhassyövän suhteen. (Steinberg ym. 1990).

Pohjoismaisten kaksosten tutkimuksessa havaittiin, että peräti 57% eturauhassyövän riskistä saattaa selittyä perinnöllisillä tekijöillä (Mucci ym. 2016). Erimunaisten kaksosten riski sairastua elämänsä aikana eturauhassyöpään, kun toinen on sairastunut, on noin 6% ja samanmunaisten peräti 20%. Samanmunaisten riski on noin kaksi kertaa suurempi kuin muulla populaatiolla. (Hjelmborg ym. 2014).

### 1.2.2. DNA:n korjausreaktioteihin osallistuvat geenit

Eturauhassyövän synnyn kannalta oleellisia ovat erityisesti DNA-korjausreaktioteihin osallistuvien geenien mutaatiot ja androgeenireseptoreja koodaavien geenien muutokset. Solun normaali toiminta ja ympäristön mutageenit voivat aiheuttaa DNA:han vaurioita,

jotka voivat pahimmassa tapauksessa johtaa syöpään. Soluilla on useita proteiineja, jotka pyrkivät tunnistamaan ja korjaamaan DNA-vaurioita. Tällaisia proteiineja ovat esimerkiksi solusyklin tarkastuspisteissä toimivat proteiinit. Vahingolliset mutaatiot emäspariutumavirheitä korjaavia proteiineja koodaavissa geneissä saattavat johtaa syövän kehittymiseen. Eturauhassyövälle, etenkin aggressiiviselle taudille, altistavat DNA-korjausreaktioteihin osallistuvia proteiineja koodaavien geenien mutaatiot ovat jokseenkin yleisiä, toisin kuin androgeenireseptorin perinnölliset mutaatiot. Androgeenireseptori kuitenkin muuttuu syövän kehittyessä hyvin helposti ja tarjoaa kasvuedun syövälle. Androgeenireseptorin vääränlaista versioita tuottaville potilaille ei sovi eturauhassyöpään yleisesti lääkityksenä käytetty abirateroni tai entsalutamidi, jotka estävät androgeenisäätelyä. Tämä tekee kyseisten potilaiden eturauhassyövän hoidosta haastavampaa. Syynä lääkityksen tehostomuuteen on geenituotteesta puuttuva lääkkeen sitoutumiseen osallistuva ligandia sitova osa.

Perinnölliseen syöpäalttiuteen liittyvät muun muassa *BRCA1*- (Breast cancer type 1 susceptibility protein), *BRCA2*- (Breast cancer type 2 susceptibility protein), *MSH2*- (DNA mismatch repair protein, MutS homolog 2) ja *HOXB13*- geenit (Homeobox protein 13). DNA:n korjausteissä toimivien *BRCA1* ja *BRCA2* kasvunrajoitegeenien (engl. tumor suppressor gene) tehtävänä on suojata syöpään johtavilta solumuutoksilta koodaamalla kasvua rajoittavia ja kasvaimen muodostusta estäviä proteiineja. *BRCA1*- ja *BRCA2*-proteiineilla on keskeinen rooli solun DNA:n kaksoisjuosteaurioiden korjaamisessa. Molempien edellä mainittuja proteiineja koodaavien geenien mutaatiot altistavat rintasyövälle ja niitä kutsutaankin rintasyövälle altistaviksi korkean riskin geneiksi. *BRCA*-geneissä on tunnettuja perinnöllisiä muutoksia, jotka altistavat myös eturauhassyövälle (Mateo ym. 2016). Näistä esimerkiksi rinta- ja munasarjasyöpäalttiutta aiheuttavien *BRCA2*-mutaatioiden on joissakin populaatioissa arvioitu olevan eturauhassyöpää eteenpäin ajava mutaatio noin 2%:lla tapauksista (Lääketieteellinen genetiikka, Duodecim 2006). Genomin sekvensoinneissa 15–25%:ssa CRPC-potilaiden näytteistä on havaittu somaattisia DNA:n korjausreaktioteihin osallistuvia proteiineja koodaavien geenien mutaatioita, etenkin *BRCA1/2* ja *ATM* (serine/threonine protein kinase gene) geneissä (Robinson ym. 2015). Niistä potilaista, joilla on jossakin edellä mainituissa geneissä somaattinen poikkeavuus, noin puolella on havaittu myös perinnöllinen ituradan virhe samassa geenissä (kaikkiaan 8–12%:lla) (Pritchard ym. 2016). Tutkimuksessaan Grindedal ym. löysivät eturauhassyöpäpotilailta mutaatioita DNA:n kahdentumisessa tai rekombinaatiossa syntyneitä virheitä korjaavissa

mekanismeissa (engl. MMR, mismatch repair). Tällaisia eturauhassyöpöpotilailta löydettyjä emäspariutumavirheitä korjaavia proteiineja koodaavien geenien mutaatioita, joita voidaan yhdistää eturauhassyöpään, löydettiin *MSH2*, *MSH6* ja *PMS2* geeneistä (Grindedal ym. 2009). Yksi oleellisimmista eturauhassyöpää ennustavista geeneistä on eturauhaselle ominainen kasvunrajoite- ja esisyöpägeeni *HOXB13*. Erityisesti *HOXB13*-geenin G84-mutaation on todettu olevan yleinen eturauhassyöpää sairastavilla suomalaisilla (Xu ym. 2013). Sekä ituradan että somaattisten DNA:n korjausreaktioteihin osallistuvien geenien mutaatioiden tutkimus on merkityksellistä eturauhassyövän ennustamisen ja hoitojen kannalta. (Terada ym. 2017) Esimerkiksi PARP-inhibiittori-lääkitys on todettu tehokkaaksi hoitokeinoksi *BRCA*-geenimutaation kantajille eturauhassyövässä. (Adashek ym. 2019).

Ku80 on DNA:n korjausreaktioteihin osallistuvan *XRCC5*-geenin (X-ray repair cross complementing 5) tuottama proteiini, joka osallistuu DNA:n kaksoisjuosteen katkosten korjaamiseen. Ku80 on Ku-proteiinin 80 kilodaltonin alayksikkö, joka sitoutuu vapaaseen kaksoisjuosteisen DNA:n päihin ja on DNA:sta riippuvan proteiinikinaasin sitojakomponentti. Ku-proteiini, joka koostuu 70 kilodaltonin (Ku70) ja 80 kilodaltonin (Ku80) alayksiköistä, osallistuu DNA:n korjaukseen ja lymfosyyttien kehityksen aikana tapahtuvaan rekombinaatioon (V(D)J recombination). (Taccioli ym. 1994) Ku-proteiini toimii ikään kuin molekulaarisena rakennustelineenä, johon muut ei-homologisten päiden sitomiseen (NHEJ, non-homologous end joining) osallistuvat proteiinit voivat sitoutua. Ei-homologisten päiden sitominen on solusyklin aikana tapahtuva DNA-kaksoisjuosteen katkosten pääasiallinen korjausmekanismi nisäkässoluissa.

Ku80 ja Ku70 muodostama heterodimeeri tunnistaa DNA:n päät ja sitoutuu niihin samalla houkutellen paikalle DNA-riippuvaisen kinaasin (DNA-PK) katalyyttisen alayksikön. Ku80 ja Ku70 yhdessä DNA-PK:n kanssa muodostavat DNA-PK-holoentsyymin. (Schulte-Uentrop ym. 2008) Ku80 on yksijuosteinen DNA- ja ATP-riippuvainen helikaasi, jolla on suuri merkitys kromosomin siirtymässä. DNA-helikaasi 2-kompleksi sitoutuu ensisijaisesti kaksijuosteisen DNA:n haarukkamaiseen päähän ja toimii 3'-5'-suunnassa. DNA:han sitoutuminen tapahtuu mahdollisesti Ku80-proteiinin välityksellä. Ku70/80 (XRCC5/6) dimeeri toimii säätelevänä tekijänä proteiinikinaasi DNA-PK-kompleksissa lisäämällä katalyyttisen PRKDC (Protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit) alayksikön kiinnittymiskykyä DNA:han. Ku70/80 dimeeri

vakauttaa hajonneen DNA:n päitä ja auttaa niitä yhdistymään uudelleen. DNA-PK-kompleksi DNA:n päissä on välttämätön ei-homologisten päiden sitomisessa.

DNA:n kaksoisjuosteen katkosten korjaus on puutteellista soluissa, joissa ei esiinny Ku80-proteiinia ja kromosomistoon voi kohdistua tällöin laajoja poistumia. Vielä suuremman vaikutuksen Ku80-proteiinin puutos soluissa aiheuttaa DNA:n kaksoisjuosteen kohesiivisten (kaksijuosteinen DNA, jossa toinen juosteista on pidempi) päiden uudelleen sitomisessa toisiinsa, mikä on lähes täysin puutteellista soluissa, joissa ei esiinny Ku80-proteiinia. (Guirouilh-Barbat ym. 2004).

### 1.3. *ANO7*

Anoktamiinit ovat kiinnostaneet syöpätutkijoita jo kauan ennen kuin niiden tiedettiin toimivan solujen ionikanavana, sillä niiden havaittiin ilmentyvän voimakkaasti syövässä (Galindo & Vacquier 2005). *ANO7*-geeni (anoktamiini 7), joka tunnetaan myös nimellä *NGEP* (new gene expressed in prostate cancer) ja *TMEM16G* (transmembrane protein 16G), on erityisesti eturauhaselle ominainen geeni. *ANO7*-geeni sijaitsee kromosomin 2 pitkän haaran raidassa 37.3 ja koodaa samannimistä solukalvoproteiinia *ANO7*, joka kuuluu *TMEM16*-proteiinien perheeseen. Kyseisen geenin kromosomaalinen sijainti havaittiin alun perin eturauhassyöpäpotilaiden perheistä tehdyssä kytkentäanalyyysissä (Cropp ym. 2011) ja koko genomien laajuisissa (GWAS, genome wide association) tapaus-verrokki-assosiaatiotutkimuksissa (Schumacher ym. 2011). *ANO7* solukalvoproteiinin tarkkaa funktiota ei tunneta, mutta se on todennäköisesti kalsiumin aktivoima kloridi-ionikanava (CaCC) tai fosfolipidejä solukalvon puolelta toiselle siirtävä kalvoproteiini (engl. scramblase) (Whitlock & Hartzell 2017). Kyseisen geenin koodaama proteiini sijaitsee eturauhasen epiteelisolujen apikaalisilla ja lateraalisilla pinnoilla (Das ym. 2007) sekä terveessä eturauhasessa että eturauhassyövässä (Kaikkonen ym. 2018). *ANO7*-proteiinin kanssa vuorovaikuttavia proteiineja ei vielä tunneta, eikä tiedetä, millä mahdollisilla metaboliareiteillä *ANO7* vaikuttaa.

#### 1.3.1. *ANO7*-geeni

*Anoktamiini 7* tunnistettiin ensimmäisen kerran analysoitaessa EST tietokannan (expressed sequence tag database) avulla geenejä, jotka ilmentyvät yksinomaan eturauhasessa tai eturauhassyövässä. EST on lyhyt noin 500-800 nukleotidin sekvenssi

cDNA:ta, jota voidaan käyttää esimerkiksi tunnistamaan geenejä ja löytämään sen eri geenituotteita (transcript). *ANO7*-geeniä analysoitaessa havaittiin, että geeni esiintyy kahtena eri geenituotteena (Bera ym. 2004). Geenituotteesta riippuen *ANO7* esiintyy solussa sekä lyhyenä (*ANO7S*) että pitkänä (*ANO7L*) muotona.

*ANO7*-geenin ilmentymisen on todettu olevan koholla eturauhassyöpäkasvaimissa verrattaessa terveeseen eturauhaskudokseen (Mohsenzadegan ym. 2013). Tämän vuoksi kyseinen geeni on mielenkiintoinen tutkimuksen kohde eturauhassyöpätutkimuksessa. *ANO7* ilmentyy pääasiassa hyvin erilaistuneessa eturauhassyöpäkudoksessa ja androgeeniriippuvaisissa eturauhassyöpäsoluissa (Mohsenzadegan ym. 2013). Sen ilmentymisen on todettu olevan voimakasta erityisesti silloin kun solut ovat kontaktissa toistensa kanssa (Das ym. 2007). *ANO7* RNA:n kohonnut ilmentyminen kasvaimessa voi jopa 18-kertaistaa eturauhassyöpäpotilaan riskin kuolla eturauhassyöpään tietyn ajan sisällä (HR 18). (Kaikkonen ym. 2018).

### 1.3.2. *ANO7*-proteiini

Oletetusti solulimassa sijaitsevaa 179:ää aminohappoa koodittaa neljä eksonia ja sen N-terminaali on pitkän muodon kanssa yhteinen. Polytooppisen seitsemän kertaa solukalvon läpäisevää 934 aminohappoa pitkää geenimuotoa koodittaa 25 eksonia. Pitkää muotoa koodaava proteiini saattaa esiintyä solukalvon (Bera ym. 2004) lisäksi myös solun muilla kalvostoilla, kuten solulimakalvostossa (Duran ym. 2012) tai Golgin laitteessa (Das ym. 2007). *ANO7*:n tarkkaa rakennetta ei tunneta, mutta todennäköisesti sekä N- että C-terminaali, eli amino- ja karboksyyli-pää, sijoittuvat solun sisäpuolelle. Tässä pro-gradu tutkimuksessa keskitytään *ANO7*:n pitkään muotoon, johon viitataan jatkossa puhuttaessa *ANO7*-geenistä tai sen tuottamasta *ANO7*-proteiinista.

### 1.3.3. *ANO7* solulinjoissa

Tutkimuksessa käytetty LNCaP- (Lymph node carcinoma of the prostate) eturauhassyöpäsolulinja on eristetty alun perin ihmisen eturauhasen pahanlaatuisesta kasvaimesta, adenokarsinoomasta. Solut ovat heikosti alustaan kiinnittyviä androgeeniherkkiä epiteelisoluja, jotka tuottavat PSA:ta.

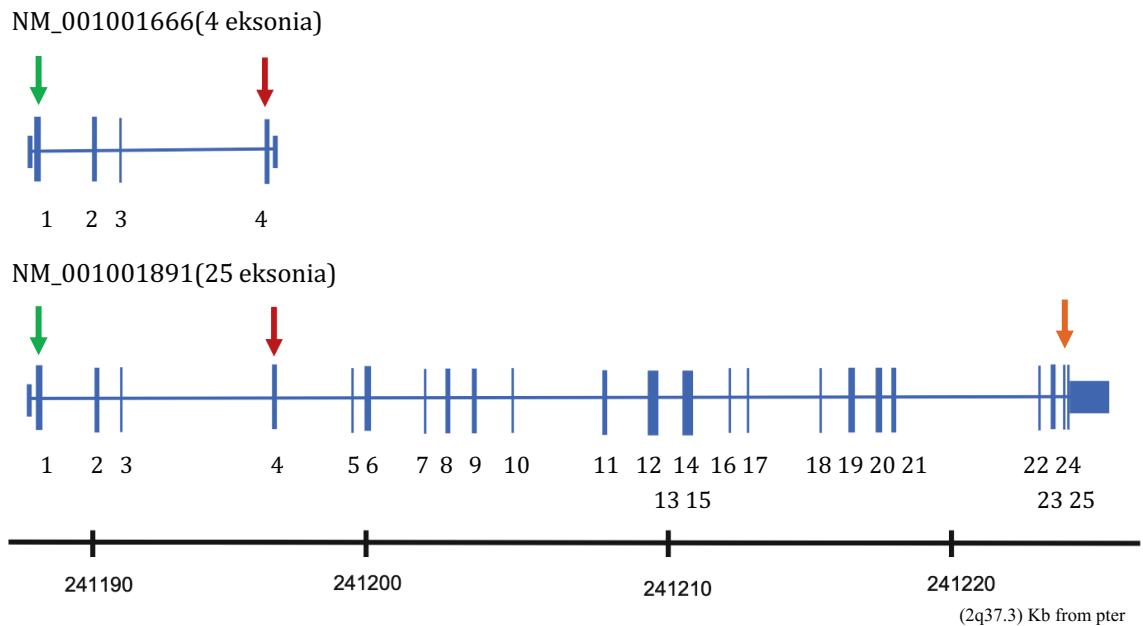
ANO7:n pitkä muoto esiintyy pieniä määriä androgeeni-riippuvaisessa LNCaP-eturauhassyöpäsolumalinjassa (Kiessling ym. 2005), toisin kuin androgeenista riippumattomassa PC-3 ja DU145 eturauhassyöpäsolumalinjassa (Bera ym. 2004). Pitkä muoto esiintyy eturauhassyöpäsoluissa solukalvolla ja se voisi sijaintinsa vuoksi olla hyvä kohde uusille immunoterapiamuodoille. ANO7-proteiinin pitkä muotoa vastaan onkin kehitetty jo T-soluterapiaa (Cereda ym. 2010). ANO7-proteiinin ilmentymisen on havaittu nousevan solukalvolla kohdissa, joissa on solu-solu kontaktia (Das ym. 2007), ja tämän perusteella ANO7 saattaa osallistua solujen väliseen vuorovaikutukseen.

Etäpesäkkeitä lähettävän eturauhassyövän tuntomerkkeinä pidetään sen muuttumista aggressiivisesta eturauhassyövästä androgeenista riippumattomaan muotoon. Etäpesäkkeitä lähettävällä eturauhassyövällä on taipumus muodostaa etäpesäkkeitä etenkin luuhun. Perinteiset eturauhassyöpäsolumalinjat DU145:n ja PC3:n käyttäytyvät hyvin samalla tavoin kuin androgeenista riippumaton eturauhassyöpä, mutta kyseiset solulinjat eivät kuitenkaan ole hyviä malleja luuhun etäpesäkkeitä lähettävän eturauhassyövän käyttäytymisen tutkimiseen. LNCaP-solumalinja tarjoaa kliinisesti paremman mallin eturauhassyöpää tutkittaessa. Mikäli ANO7:n ilmentyminen on androgeenista riippuvaista, voisi myös olettaa geenin ilmentyvän ennemmin androgeeniherkissä LNCaP-soluissa.

#### 1.3.4. *ANO7*-geenin pistemutaatiot

Tutkimuksessaan Kaikkonen ym. (2018) löysivät *ANO7*-geenistä kolme yhden emäsparin muutosta eli SNP:iä (single nucleotide polymorphism), jotka ovat yhteydessä eturauhassyöpään (Kuva 2). Kyseisessä tutkimuksessa kolmesta *ANO7*:n geenimuutoksesta yksi todettiin harvinaiseksi ja jätettiin pois lopullisista analyyseistä. Kahdesta löydetyistä muutoksesta ensimmäisessä eksonissa oleva pistemutaatio (rs148609049) lyhentää eturauhassyöpäpotilaiden elinaikaa, kun taas pistemutaatio neljännessä intronissa/eksonissa (rs77559646) altistaa eturauhassyövälle. Pistemutaatio muutoksessa rs77559646:ssa aiheuttaa *ANO7*:n lyhyessä muodossa eksonissa neljä aminohappomuutoksen (engl. missense mutation) ja pitkässä muodossa silmukointikohdan muuttumisen. Pistemutaatiot saattavat vaikuttaa mRNA:n silmukointiin ja tämä voi puolestaan häiritä *ANO7*:n pitkän ja lyhyen muodon tasapainoa. Kaksi löydettyä pistemutaatiota voisivat olla sopivia eturauhassyövän kliiniseen testaukseen (Kaikkonen ym. 2018). Edellä mainittujen pistemutaatioiden analyyseissa

käytettiin muun muassa suomalaisista, ruotsalaisista, norjalaisista ja englantilaisista eturauhassyöpää sairastavista potilaista saatua dataa (Kaikkonen ym. 2018). rs77559646 muutoksen huomattiin vaikuttavan myös eturauhassyöpäpotilaiden kemoterapiavasteeseen siten, että muutoksen kantajat hyötyivät erityisen paljon hoidosta. (Kaikkonen ym. 2019). Kaikkonen ym. (2018, 2019) osoittivat assosiaation ANO7-mutaatioiden ja eturauhassyövän välillä, mutta edelleen on tutkittava mitä mutaatiot tekevät ja miksi ne aiheuttavat aggressiivista eturauhassyöpää.

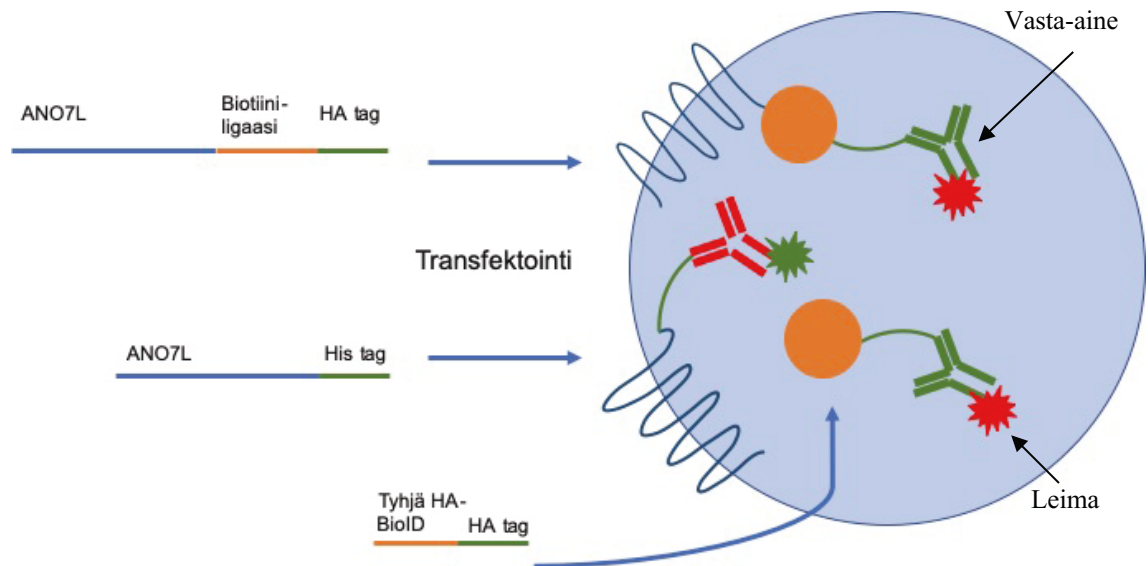


Kuva 2. *ANO7*-geenistä löydetty pistemutaatiot. Sekä lyhyessä että pitkässä muodossa vihreällä nuolella merkitty ensimmäisessä eksonissa oleva pistemutaatio (rs148609049) ja punaisella nuolella merkitty neljännessä eksonissa esiintyvä pistemutaatio (rs77559646). Oranssi nuoli osoittaa varianttiin rs181722382. (Kaikkonen ym. 2018, muokattu [http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_ANO7.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ANO7.html))

### 1.3.5. Vuorovaikuttavien proteiinien tunnistus

Mahdollisia tutkittavan proteiinin kanssa vuorovaikuttavia proteiineja voidaan tunnistaa BioID-menetelmällä (a screen for protein-protein interactions). BioID-menetelmä perustuu biotiiniligaasin leimaamien proteiinien tunnistukseen. Menetelmässä valmistetaan biotiiniligaasi–fuusioproteiini, jossa tutkittavaan proteiiniin liitetään biotiiniligaasi. Tämän fuusioproteiinin avulla voidaan tutkia fysiologisesti merkittävien proteiinien vuorovaikutuksia elävissä soluissa. Kun tällaisen fuusioproteiinin tuottava vektori transfektoidaan soluihin, kaikkiin tutkittavaa proteiinia tarpeeksi lähelle tulevat muut vuorovaikuttavat proteiinit leimautuvat biotiinilla. Leimautumisen jälkeen solut hajotetaan ja niistä poimitaan kaikki biotiinileiman sisältävät proteiinit talteen streptavidinihelmillä. Tämän jälkeen proteiinit irrotetaan helmistä ja tunnistetaan

massaspektrometrialla, jolloin saadaan lista mahdollisia tutkittavan proteiinin kanssa vuorovaikuttavia proteiineja. Kuvassa 3 esimerkkinä BioID-menetelmä sovellettu ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavien proteiinien tutkimiseen.



Kuva 3. BioID-menetelmä sovellettu ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavien proteiinien tutkimiseen. ANO7:aan liitetään biotiiniligaasi ja leima, jonka jälkeen fuusioproteiini transfektoidaan soluun. Samalla menetelmällä kontrollisoluihin transfektoidaan tyhjä BioID plasmidi samalla leimalla kuin ANO7:n kanssa, sekä ANO7 his-leimalla. Edellä mainittujen kahden kontrollikonstruktiin avulla voidaan tunnistaa ja poistaa epäspesifit proteiinivuorovaikutukset seuraavia analyyseja varten.

#### 1.4. Vesikkeliliikenne

Solut erittävät ympärillään oleviin kudoksiin ja elimistön nesteisiin kalvopäällysteisiä rakkuloita, joita kutsutaan vesikkeleiksi. Vesikkelien koostumus kertoo niiden alkuperästä, sillä eritetyt vesikkelit sisältävät samoja molekyylejä kuin solu, josta ne ovat alun perin erittyneet. Endosytoosi, eksosytoosi ja solun kalvostojen välinen proteiinien kuljetus tapahtuu vesikkeliliikenteen avulla.

##### 1.4.1. Syöpäsolujen erittämät vesikkelit

Syövän kehittyessä syöpäsolujen vesikkelien muodostus ja erityis lisääntyy (Camussi ym. 2011). Etureuhassyöpäsolulinjojen PC-3 ja LNCaP erittämien vesikkelien solun sisäänottoon vaikuttaa vastaanottavan solun syklin eli elämänsyklin vaihe. Fluoresoivien

väriaineiden avulla tutkittujen vesikkelien signaalin on todettu olevan koholla solusyklin G<sub>2</sub>/M-vaiheessa olevissa soluissa verrattuna G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- ja S-vaiheeseen. Solusyklin G<sub>2</sub>-vaiheessa DNA:n eheys varmistetaan ja M-vaiheessa solu jakautuu. G<sub>0</sub>-vaiheessa solusykli on pysähtynyt esimerkiksi kasvutekijöiden loppumisen vuoksi, G<sub>1</sub>-vaihe on solun kasvuvaihetta ja S-vaiheessa DNA kahdentuu. Solujen tehokkuuteen ottaa vesikkelejä sisäänsä vaikuttaa vastaanottavan solun elämänkierron vaihe ja lisäksi myös vesikkelejä erittäneiden syöpäsolujen laatu. Etäpesäkkeistä alkuperää olevien solujen tuottamat vesikkelit kulkeutuvat solun sisään huomattavasti tehokkaammin kuin hyvänlaatuisen tai primaarisen eturauhassyövän solujen tuottamat vesikkelit. (Lázaro-IbáñezNeuvonen ym. 2017).

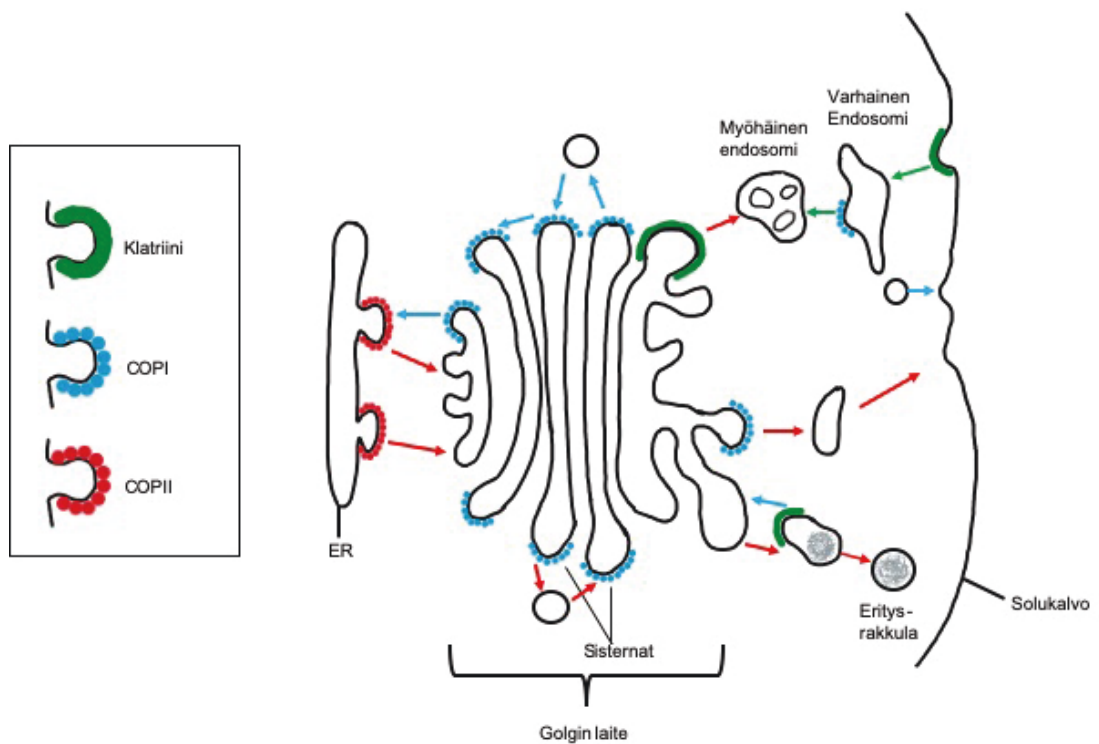
Syöpäsolujen erittämät vesikkelit edistävät vesikkelejä vastaanottaneen solun lisääntymistä ja liikkumista, mikä osaltaan edistää solun erilaistumista syöpäsoluksi. Lisääntynyt vesikkelien sisäänotto ja tätä kautta syöpäsolujen lisääntynyt jakautuminen, voi stimuloida esimerkiksi virtsarakon (Yang ym. 2013), munuaisen (Lindoso ym. 2015) ja sappitien (Haga ym. 2015) solujen erilaistumista ja jakautumista syöpäsoluiksi. Solukalvon suotuisa proteiinikoostumus saattaa mahdollistaa syöpäsolujen erittämien vesikkelien nopean liikkumisen ja kulkeutumisen soluihin (Harris ym. 2015). Lázaro-Ibáñez tutkimusryhmineen havaitsi eturauhassyöpäsolujen erittämien vesikkelien kantavan laajan kirjon erilaista rikastunutta mRNA:ta verrattuna eturauhasen normaalien epiteelisolujen erittämiin vesikkeleihin. Nämä erilaisen mRNA:n sisältävät vesikkelit voitaisiin yhdistää syövän eri kehitysvaiheisiin ja saada tietoa vesikkelien kommunikaatiosta syöpäsolujen välillä. (Lázaro-IbáñezLunavat ym. 2017).

#### 1.4.2. Proteiinit vesikkeliliikenteessä

Proteiinien ja lipidien tarkkaan säädely liikkuminen solun kalvostojen välillä on tärkeää solujen välisen ja solunsisäisen signaaloinnin sekä solun olosuhteiden suotuisan ylläpidon säilyttämiseksi. Kuljetukseen osallistuvien vesikkelien muodostuminen alkaa tietyn G-proteiinin avustuksella. Vesikkelien päällyspoteiinit COPI (Coat Protein I), COPII (Coat Protein II) ja klatriinit määräytyvät vesikkelien kuljetusreitistä riippuen. Kuvassa 4 on havainnollistettu vesikkeliliikennettä kunkin päällyspoteiinien tapauksessa. Päällystetyt proteiinit välittävät tietoa ympäristöstään ja kontrolloivat glykosylaatiota ja proteolyttisiä prosesseja sekä solun sisäpuolella että solukalvolla.

Kaksi parhaiten tunnettua vesikkeliliikenteessä toimivaa päällysproteiinia, jotka osallistuvat vesikkelien kuljetukseen, ovat COPI ja klatriinien päällystämä adaptoriproteiini 2 (AP2). AP2 osallistuu endosomien muodostumiseen ja kuljetukseen solukalvolla, kun taas COPI osallistuu Golgilta solulimakalvostoon tai Golgin sisällä kuljetettavien vesikkelien liikkumiseen. Päällysproteiinien tehtävänä on liittää vesikkeli ja sen sisällä kuljetettava molekyyli toisiinsa. Vesikkelit liikkuvat mikrotubuluksia pitkin ja niin kutsuttuina moottoriproteiineina toimivat dyneiini ja kinesiini määräävät vesikkelien suunnan. Klatriinipäällysteisten vesikkelien kuroutumiseen kalvoilta osallistuvat energiasta riippuvaiset proteiinit epsiini ja dynamiini. Tarkkaan säädeltyyn kuljetuskoneistoon, joka määrittää vesikkelien lopullisen kohdekalvon, kuuluvat muun muassa Rab, t- SNARE (engl. target snap receptor) ja v-SNARE (engl. vesicle snap receptor) proteiinit. COPI päällysteisten vesikkelien muodostukseen, kuljetukseen ja kalvostoilta kiinnittymiseen osallistuvat muun muassa TRAPP:t (transport protein particles), SNARE:t ja Rab-proteiinit. Rab GTPaasit liikkuvat soluliman, vesikkeli- ja kohdekalvon välillä ja tätä liikkumista säädellään GDP-GTP-syklillä. Vesikkelien kiinnittyessä kohdekalvostolle GTP (Guanosine triphosphate) irrottaa yhden fosfaateistaan ja päällysproteiinit irtoavat toisistaan vapauttaakseen vesikkelin. Vesikkelin muodostumiseen ja kuljetukseen osallistuneet proteiinit kierrätetään takaisin alkuperäiseen paikkaansa ja käytetään uudestaan seuraavan vesikkelin muodostuksessa. Väärään paikkaan kuljetetut vesikkelit palautetaan oikeaan paikkaansa ja väärin laskostetut vesikkelit palautetaan solulimakalvostolle.

Bai tutkimusryhmineen selvitti AP2- ja COPI-proteiinien mahdollisia yhteyksiä ja yhteisiä rakenneosia. GTPaasin aktivoivan proteiinin (GAP) ARF1 (ribosylaatiotekijä 1), ARFGAP1, todettiin vuorovaikuttavan sekä COPI kompleksin että AP2:n kanssa. (Bai ym. 2011) ARF1 kuuluu ADP ribosylaatiotekijöiden (ARF) perheeseen. ARF:t ovat pieniä G-proteiineja, jotka sitovat GTP:tä. ARFGAP1 edesauttaa AP2:sta riippuvaa endosytoosia ja osallistuu myös COPI-välitteiseen kuljetukseen, jolloin ARF1 toimii itse vesikkeliliikenteessä ja sen säätelijänä. (Lee, S. Y. ym. 2009).



Kuva 4. Vesikkeliliikenne solulimakalvostolta Golgin laitteen kautta solukalvolle ja takaisin. Klatriinivälitteisessä endosytoosissa klatriinipeitteiset rakkulat kuroutuvat solukalvolta solun sisään ja siirtyvät solunsisäiseen kalvoliikenteeseen. COPI ja COPII vesikkelit osallistuvat solun sisäiseen vesikkeliliikenteeseen kalvostoilla. COPI vesikkelit kulkevat Golgin laitteen sisemmistä sisternoista solulimakalvostolle ja COPII vesikkelit solulimakalvostolta Golgin laitteeseen. (Muokattu. Alberts ym. *Molecular Biology of the Cell*).

#### 1.4.3. AP2B1

AP2B1 (Adaptor related protein complex 2 subunit beta 1) on AP2:n rakenneosana. AP2 muodostuu kahdesta suuresta alayksiköstä, alfa( $\alpha$ ) ja beta( $\beta$ ), keskikokoisesta alayksiköstä gamma ( $\mu$ ) ja pienestä alayksiköstä sigma ( $\sigma$ ) (Traub1997). Edellä mainituista alayksiköistä *AB2B1* koodaa AP2 $\beta$  alayksikköä. Adaptoriproteiinit ovat olennaisessa osassa vesikkeli-välitteisessä proteiinien kuljetuksessa erilaisissa membraanien välisissä kuljetusreiteissä. AP2-kompleksit ovat solukalvolla sijaitsevia vesikkeli-vaippojen komponentteja, jotka osallistuvat kuljetettavan proteiinin valintaan ja vesikkeli-vaippojen muodostumiseen. Adaptoriproteiinikompleksit osallistuvat klatriinivälitteiseen endosytoosiin, jossa kuljetettavat proteiinit kiinnittyvät klatriinien ympäröimiin vesikkeleihin (CCV, clathrin-coated vesicle) ja nämä CCV-rakkulat muodostavat varhaisia endosomeja (Nakatsu & Ohno2003). Klatriinit toimivat niin kutsuttuna mekaanisena rakennustelineenä. Klatriinivälitteiset AP-kompleksit voivat sitoutua joko suoraan klatriineihin tai lipidi- ja proteiinikomponentteihin solukalvolla.

AP-kompleksit yhdistävät muodostuneen klatriinikuoren fosfolipidikalvostolle, valitsevat ja sitovat kuljetettavat proteiinit sekä liittävät tähän muodostuneeseen kompleksiin useita muita proteiineja, jotka osallistuvat CCV-rakkulan muodostukseen ja hajotukseen. (Owen ym. 2004).

AP2:n toiminta voidaan jakaa selkeästi kahteen osaan. Ensimmäisenä fosfatidyliinositoli 4,5-bifosfaatti (PIP2) avustaa AP2-kompleksin sitoutumista membraanille. Tämän jälkeen AP2 käy läpi kaikki tarvittavat rakennemuutokset ja avaa sitoutumiskohtansa kuljetettaville proteiineille. (Collins ym. 2002) AP2 valikoi ja järjestää kalvoproteiinit, jotka osallistuvat reseptorivälitteiseen endosytoosiin ja on myös osallisena hermosolujen välisten vesikkelien membraanien kierrätyksessä. AP2-proteiinin  $\beta$ -alaysikkö toimii rakennus- ja alustana endosytoosiin osallistuville avustajaproteiineille. Klatriini-avusteisella kuljetusreitillä AP2 $\beta$  alaysikkö sitoutuu klatriinin raskaaseen ketjuun ja aloittaa klatriiniverkon muodostumisen. Lau ym. tutkimusryhmineen selvittivät miten AP2 osallistuu myös normaaliin endosytoosin jälkeiseen ARF6-säädelyyn (ADP-ribosylation factor 6) kuljetusreittiin, johon klatriinit eivät osallistu. Samalla he todistivat miten klatriinien ja AP2-proteiinin ehtyminen solussa vaikuttaa laaja-alaisesti endosomaalisten ja lysosomaalisten reittien häiriintymiseen. (Lau &Chou 2008).

Tutkimuksessaan Gallusser ja Kirchhausen (1993) näyttivät että  $\beta 1$  ja  $\beta 2$  alaysiköt ovat välttämättömiä ja ensisijaisia vesikkelin kuoren muodostumisessa. Vaikka klatriinia saattavat sitoa myös muut AP1 ja AP2 kompleksien yksiköt,  $\beta 1$  ja  $\beta 2$  alaysiköt ovat ensisijaisia ja tärkeimpiä sitojia. AP-kompleksien tulee myös sitoutua membraanille, jotta ne voivat edistää vesikkelien muodostumista. Myös muut AP-kompleksin komponentit vaikuttavat luultavasti suoraan tai epäsuoraan membraanille sitoutumiseen ja säätelevät kompleksin sitoutumista klatriineihin. (Gallusser & Kirchhausen 1993) (Lau &Chou 2008).

#### 1.4.4. COPG2

Vaippapäälysteiset vesikkelit osallistuvat useaan solujen sisällä tapahtuvaan kuljetusvaiheeseen, kuten solulimakalvostolta Gogille ja päinvastaiseen suuntaan liikkuvaan kuljetukseen. COPI-päälysteiset vesikkelit ovat vesikkelien muodostumiseen ja eristysreitteihin osallistuvia proteiineja, joiden vaippa muodostuu seitsemästä

alayksiköstä,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\varepsilon$ - ja  $\zeta$ -COP. *COPG2* koodaa edellä mainituista alayksiköistä coatomer subunit gamma 2 proteiinia ( $\gamma$  2-COP, *COPG2*).

Aminohappoanalyysien perusteella vesikkelien kuljetukseen Golgilta solulimakalvostolle osallistuvien COPI vesikkelien alayksiköt ovat evoluutiivisesti samanlaisia kuin adaptoriproteiinit (Schledzewski ym. 1999).  $\gamma$ -alayksikön C-terminaalisen rakenteen selvittäminen on vahvistanut tämän suhteen alayksiköiden ja AP:n välillä (Hoffman ym. 2003) (Watson ym. 2004). Lisäksi  $\gamma$ -alayksikön N-terminaalisen pään  $\beta$ -propellit ja ainakin yksi CHCR toisto  $\alpha$ - ja  $\beta'$ -alayksiköissä sekä edellä mainittujen todennäköinen kyky vuorovaikuttaa  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - ja  $\zeta$ -alayksikköjen kompleksissa antaa viitteitä klatriinipäällysteisten AP-kompleksien ja COPI:n alayksikköjen samankaltaisuudesta. (Eugster ym. 2000). *COPG2*- ja  $\zeta$ -COP-proteiinin on näytetty vuorovaikuttavan  $\beta$ -COP-proteiinin kanssa Golgin laitteella. (Futatsumori ym. 2000).

*COPG2* muodostaa solulimaan proteiinikompleksin, joka sitoutuu dilysiini-osiin ja nämä yhdessä liittyvät Golgin laitteen vesikkeileistä niihin, jotka eivät ole klatriinipäällysteisiä. Muodostuneet kompleksit osallistuvat edelleen proteiinien biosynteettisellä reitillä kuljetukseen trans-golgilta solulimakalvostolle. Vaippakompleksia tarvitaan, jotta aluillaan olevat proteiinit voivat irrottautua Golgista ja mikrotubulusten avulla dilysiini-merkityt proteiinit voidaan kuljettaa Golgilta solulimakalvostolle. Nisäkkäillä vaippaproteiineja voivat houkuttaa ainoastaan membraanit, jotka ovat yhteydessä ADP-ribosylaatiofaktoreihin (ARF). *COPG2*-proteiinin on nähty vaikuttavan myös LDL reseptorien prosessointiin, aktiivisuuteen ja niiden kierrätykseen solussa. (Harter ym. 1996).

#### 1.4.5. HSPA1A

Heat shock-proteiinit (Hsp) tunnetaan yleisesti stressiproteiineina, sillä ne ilmentyvät voimakkaasti solujen ollessa stressitilassa (Hartl ym. 2011). Hsp-proteiinien ilmentyminen kasvaa usein ympäristön aiheuttaman stressin, normaalien fysiologisten prosessien ja geeninsiirron jälkeen (Kiang & Tsokos 1998). Kaperonit (engl. chaperon) ovat Hsp-luokan avustajaproteiineja, jotka auttavat muodostuvia proteiineja laskostumaan oikein. Avustajaproteiinit tarjoavat sisällään proteiinille suojaosan ympäristön laskostua oikeaan kolmiulotteiseen muotoonsa. Avustajaproteiinien tehtävänä on myös estää vaarallisten proteiinikertymien muodostusta estämällä väärin

laskostuneita proteiineja kerääntymästä yhteen. Lisäksi Hsp-luokan avustajaproteiinit mahdollistavat proteiinien biologisen toimintakyvyn säilymisen solun lämpötilan noustessa. Toimintakyvyn säilymiseksi avustajaproteiinien synteesi lisääntyy solun lämpötilan ja stressitason noustessa.

Hsp70 (DnaK) koostuu HSPA1A (Hsp70-1) ja HSPA1B (Hsp70-2) yksiköistä, joita koodaavat geenit ovat vastaavasti *HSPA1A* ja *HSPA1B*. Hsp70-proteiinien perhe on laajalle levinnein ja konservoitunein solujen väliseen viestintään osallistuva avustajaproteiinien perhe (Laskowska ym. 2019). Hsp70 avustajaproteiinit ovat keskeisessä asemassa väärin laskostuneiden proteiinien uudelleenjärjestämisessä ja hajotettavaksi kuljetettavien proteiinien merkitsemisessä (Mayer & Bukau 2005), sekä uusien polypeptidien laskostumisen ja kuljetuksen avustamisessa. Avustajaproteiinit sitoutuvat väärin laskostuneen tai aluillaan olevan aminohappoketjun vettä hylkivään osaan erottaen tämän osan aminohappoketjusta ja estäen sitä muodostamasta epänormaaleja vuorovaikutuksia muiden solun proteiinien kanssa. Tämä sitoutuminen ei vaadi ATP-energiaa, mutta proteiinin laskostuminen vaatii ATP-syklin, jossa substraatti vuoroin sitoutuu ja irtoaa. (Laskowska ym. 2019).

#### 1.4.6. SND1

Staphylococcal nuclease and Tudor domain-containing protein 1 (SND1, Tudor-SN; p100) on tietyissä mRNA:n prosesseissa toimiva RISC-proteiinikompleksin (RNA-induced silencing complex) osa. Proteiinin tarkkaa toimintaa ei tunneta, mutta sen tiedetään toimivan proteiinisynteesiä aktivoivana tekijänä useiden muiden proteiinien ohella. SND1-proteiini osallistuu myös useisiin muihin tehtäviin soluissa, kuten esimerkiksi RNA:n silmukointiin ja RNA:n käynnistämään geenin hiljentämiseen (RNA interference). SND1 esiintyy myös jyvärakenteissa (engl. stress granules), jotka muodostuvat solulimassa vasteena ympäristön aiheuttamalle stressille. Tutkimuksessaan Miki (2009) kollegoineen havaitsivat, että SND1-proteiinia ilmentyi 60:lla 62:sta eturauhassyöpöpotilaista. SND1 esiintyy solun solulimassa vesikkelimäisinä rakenteina. Kyseinen proteiini ilmentyy erityisen paljon syövässä ja nousee tämän vuoksi esiin lukuisissa syöpätutkimuksissa.

### *1.5. Tutkimuksen tarkoitus*

Eturauhassyöpään liitettävien geenien tuottamien proteiinien ja vuorovaikuttavien proteiinien tunnistaminen voi avata uusia näkökulmia syövän synnyn ja etenemisen suhteen. Proteiinien tunnistaminen voi antaa paremman käsityksen siitä, mitkä tekijät vaikuttavat kasvaimen syntyyn. Eturauhassyöpäsoluille ominaisten geenien ja proteiinien tutkimus saattaa johtaa uusien biomarkkereiden ja hoitomuotojen jäljille, jolloin uudet biomarkerit voivat olla avuksi etenkin aggressiivisen eturauhassyövän ennustamisessa ja hoidossa.

Tämä tutkimus on osa kokonaisuutta, jossa pyritään tunnistamaan ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavia proteiineja ja saamaan lisää tietoa ANO7:n toiminnasta soluissa. Aikaisemmin tutkimuksessa löydettiin BioID-menetelmän avulla mahdollisia ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavia proteiineja. Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli selvittää sijoittuvatko ANO7 ja kukin aikaisemmin tutkimuksessa valitusta viidestä proteiinista (AP2B1, COPG2, HSPA1A, Ku80 ja SND1) samaan paikkaan soluissa. Proteiinien hakeutuminen toistensa luokse (kolokalisaatio) antaisi tukea BioID-menetelmällä löydettyjen mahdollisten vuorovaikuttavien proteiinien ja ANO7-proteiinin väliselle vuorovaikutushypoteesille.

## 2. AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.3. Soluviljely

Nestetyypeen jäädytettyjä LNCaP-solulinjan soluja (1ml) sulatettiin 37 °C, kunnes ne olivat sulaneet sen verran, että solunapin sai irrotettua 15 ml:n Falcon-putkeen. Putki täytettiin 15 ml:aan asti lämmintä kasvatusliuosta (37 °C). Kasvatusliuksena LNCaP soluilla käytettiin RPMI-1640 (Lonza, Basel, Switzerland), jossa 10% FBS, 1% Ultraglutamiinia ja 1% Penisilliini-Streptomysiinia (1:100). Solut laitettiin kasvamaan vuorokaudeksi T75-pulloon hiilidioksidikaappiin (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Seuraavana päivänä solujen medium vaihdettiin tuoreeseen ja annettiin kasvaa hiilidioksidikaapissa, kunnes konfluenssi oli 70-90 % maljan pinta-alasta. Kolmen päivän kuluttua solut pestiin kolme kertaa steriilillä PBS-liuoksella ja tämän jälkeen solut irrotettiin pipetoimalla pulloon 1,5 ml trypsiini-EDTA liuosta. Trypsiini inaktivoitiin lisäämällä 2 x 1,5 ml kasvatusliuosta. Solut jaettiin uuteen pulloon suhteessa 1:5 ja solujen kasvatusta jatkettiin, kunnes jakoja oli tehty kahdeksan, jonka jälkeen voitiin aloittaa solujen transfektointi.

### 2.4. Midiprepin valmistus

Ampisilliinia lisättiin 3 µl (100 ug/ml) 3 ml: aan LB-mediumia ja sekoitettiin. Liuokseen lisättiin raapimalla glyserolistokista nesteeseen pienen nokareen verran his-ANO7L plasmidin sisältäviä *E. coli*-bakteereita (Glyserolistokki pcDNA3.1.-ANO7-His, in Nova Blue). Erlenmeyer-pullo asetettiin ravistelijaan 250 rpm kuudeksi tunniksi. Kasvatuksesta otettiin bakteerisuspensiota 500 µl steriiliin Erlenmeyer-pulloon, jossa oli 200 ml LB-mediumia ja 200 µl ampisilliinia. Bakteereita kasvatettiin 16 tuntia ravistelevassa lämpökaapissa (230 rpm ravistelunopeidella). Seuraavana päivänä aloitettiin Midiprepin (Macherey-Nagel, NucleoBond® Xtra plasmid purification) valmistus siten, että viljelmästä mitattiin absorbanssi, minkä jälkeen kasvatusta jäähdytettiin sentrifugissa 5 minuutin ajan (+4 °C, 5000 g). Absorbanssilukeman perusteella nähtiin, kuinka paljon midiprep-eristykseen otettiin bakteereita. Seuraavat vaiheet suoritettiin seuraamalla NucleoBond® Xtra plasmid purification-protokollaa. Jotta pystyttiin varmistamaan, että bakteereista eristetyissä plasmideissa oli oikeanlainen insertti, His-ANO7L midiprepistä tehtiin testidigestio 1% agarosigeelille. Geeli valmistettiin punnitsemalla 0,5 g

agarosia, 50 ml TBE:tä ja 5 µl Midorigreen. Testidigestio valmistettiin lisäämällä 15,4 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl 10-kertaista Fast Digest puskuria, 0,6 µl (1mg) His-ANO7L midiprepiä, 1 µl BamH1-entsyymiä ja 1 µl EcoR1 entsyymiä. Digestiota inkuboitiin 20 min RT ja ajettiin 100 V tunnin ajan ja geeli kuvattiin Chemidoc geelinkuvauslaitteella (Liite 1).

## 2.5. LNCaP-solujen transfektointi

Päivää ennen transfektointia solut kasvatettiin steriileille laseille 12-kuoppalevyissä. Jotta heikosti alustaan kiinnittyvät LNCaP-solut saatiin tarttumaan tiukemmin kiinni värjäyksiä varten, laseille pipetoitiin 400 µl Poly-L-lysine liuosta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, U.S.A), joka pestiin pois steriilillä vedellä. Jokaiseen kuoppaan laskettiin 1ml (100 000 solua) kasvatusmediumia ja solujen annettiin laskeutua kuoppiin 15 min RT. Solut kasvatettiin hiilidioksidikaapissa ja vuorokauden kuluttua, kun solujen konfluenssi oli 70-90 %, solut transfektoitiin.

LNCaP-eturauhassyöpäsolut transfektoitiin ANO7L-BirA\*HA-, BirA\*-HA- tai ANO7L-His-konstruktilla. Kaikki edellä mainitut konstruktit on kloonattu pcDNA3.1 plasmidivektoriin (Addgene, Kyle Roux Lab Plasmids). ANO7L-BirA\*HA-konstruktiksi sisältää *ANO7*-geenin pitkän muodon ja biotiiniligaasin, jonka C-terminaaliin on liitetty HA-leima. BirA\*-HA-konstruktiksi sisältää edellä mainitut biotiiniligaasin ja HA-leiman. ANO7L-His-konstruktiksi sisältää *ANO7*-geenin pitkän muodon, jonka C-terminaaliin on liitetty V5-His-leima. LNCaP-solut transfektoitiin käyttämällä Lipofektamiini 3000 reagenssia (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.A). Transfektio toteutettiin Thermo Fisherin LNCaP-soluille optimoidun protokollan mukaan (Liite 2). Optimoinnissa DNA:n määränä käytettiin 0,5 µg/µl ja 1 µg/µl. Transfektioituja soluja inkuboitiin hiilidioksidikaapissa 24h, jonka jälkeen soluille tehtiin immunofluoresenssivärjäys.

## 2.6. Vasta-ainevärjäykset

### 2.6.1. Vasta-aineiden optimointi

Jokainen käytetyistä vasta-aineista optimoitiin erikseen, jotta värjäystulokset olisivat mahdollisimman hyvät. Optimoinnin tarkoituksena oli löytää sopivat konsentraatiot transfektioille ja värjäyksessä käytettäville vasta-aineille (Liite 1).

## 2.6.2. Vasta-ainevärjäykset

Soluilta poistettiin kasvatusmedium ja solut pestiin kaksi kertaa PBS:llä. Soluille lisättiin 400 µl/kuoppa fiksaatiivia (4 % PFA-PBS, paraformaldehydi) ja inkuboitiin 15 min huoneenlämmössä. Solujen fiksoimisen jälkeen suoritettiin kolme pesua PBS:llä ja säilytettiin solut PBS:ssä +4 °C lämpötilassa tai jatkettiin solujen permeabilisaatioon. Permeabilisaatiossa soluille lisättiin 400 µl/kuoppa 0,4% Triton X-100 PBS:ssä ja inkuboitiin 10 min huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen Triton X-100 poistettiin soluilta ja solut pestiin kolme kertaa PBS:llä. Primaarivasta-aineet valmistettiin 1% BSA-PBS:ään (Bovine serum albumin-PBS) ja soluille pipetoitiin valmista vasta-ainetta 100 µl/kuoppa. Primaarivasta-ainetta inkuboitiin +4 °C lämpötilassa yön yli. Primaarivasta-aineet olivat seuraavat: anti-COPG2 (Novus Biologicals, Colorado, U.S.A NBP2-55178), anti-HSPA1A (ab79852), anti-AP2B1 (ab220778), anti-SND1 (Abcam ab65078, Boston, U.S.A), anti-XRCC5 (Abcam ab80592, Boston, U.S.A), anti-6×His tag (Abcam ab18184) ja anti-HA tag (Abcam ab130275). Seuraavana päivänä primaarivasta-aine pestiin pois kolme kertaa PBS-puskurilla, jonka jälkeen valmistettiin sekundaarivasta-aine 1% BSA-PBS:ään. Sekundaarivasta-aineet olivat seuraavat: (Abcam, Boston, U.S.A), STAR RED anti-rabbit IgG (Abberior 2-0012-011-9), and STAR 580 anti-mouse IgG (Abberior 2-0002-005-1) (Abberior Instruments GmbH, Göttingen, Germany). Sekundaarivasta-ainetta pipetoitiin 100 µl/kuoppa ja inkuboitiin 1h huoneenlämmössä valolta suojattuna. Tämän jälkeen sekundaarivasta-aine pestiin pois kolme kertaa PBS:llä. Primaari- ja sekundaarivasta-aineiden lopulliset konsentraatiot taulukossa 1. Ensimmäisissä värjäyksissä peitinlasien kiinnitykseen käytettiin Mount Solid Antifade (Abberior) kiinnitysainetta, mutta lopullisiin värjäyksiin paremmaksi todettiin Mowiol Mounting Media. Lasit kuivattiin kevyesti ja asetettiin mikroskooppilaseille solut vasten kiinnitysainetta ja annettiin kuivua valolta suojattuna yön yli, jonka jälkeen säilytettiin +4 °C lämpötilassa.

Taulukko 1. Värjäyksessä käytetyt vasta-aineet ja konsentraatiot

Kohde	Vasta-aine	Konsentraatio
HSPA1A	ab79852 (Abcam)	1:100
AP2B1	ab220778 (Abcam)	1:300
COPG2	NBP2-55178 (Novus Biologicals)	1:200
SND1	ab65078 (Abcam)	1:1000
STAR RED, goat anti-rabbit IgG	2-0012-011-9 (Abberior Instruments GmbH)	1:200
STAR 580 anti-mouse IgG	2-0003-005-1 (Abberior Instruments GmbH)	1:200
Anti-HA tag antibody	H6908 (Sigma-Aldrich)	1:200
Anti-6X His tag® antibody	ab18184 (Abcam)	1:150

## 2.7. Mikroskopia

### 2.7.1. Fluoresenssimikroskopia

Värjäyksien optimointi ja transfektion onnistuminen tarkistettiin värjäytyiltä laseilta Nikon Eclipse Ni-U fluoresenssimikroskoopilla (Nikon Instruments, Inc. Shinagawa, Tokyo, Japan). Mahdolliset epäonnistuneet värjäykset tai väärinpäin olevat lasit jätettiin kuvaamatta korkean erottelukyvyn mikroskopiolla.

### 2.5.2. STED-konfokaalimikroskopia

Värjätyt solut kuvattiin STED (stimulated emission microscopy) superresoluutiomikroskoopilla (Abberior STED Microscope), jonka resoluutiolla on mahdollista erottaa proteiinit jotka ovat 2,4 nm etäisyydellä toisistaan. Käytetty objektiivi oli Olympus UPLSAPO 100x/1.4 öljyobjektiivi ja mikroskoopin eksitaatiolaaserit toimivat aallonpituuksilla 488nm ja 640nm ja eksitaatioita seuraavat depleetiitit aallonpituuksilla 580nm ja 775nm. STED mikroskooppi mahdollistaa solujen kuvaamisen hyvin yksityiskohtaisesti.

### 3. TULOKSET

Tässä pro gradu -tutkielmassa selvitettiin sijoittuvatko ANO7 ja tutkimukseen valitut proteiinit samaan paikkaan solussa. Proteiinien mahdollinen kolokalisaatio voisi antaa lisää tietoa ANO7-proteiinin toiminnasta eturauhasen soluissa. Pro gradu -tutkielmaa edeltävässä tutkimuksessa tunnistettiin ANO7-proteiinin kanssa mahdollisia vuorovaikuttavia proteiineja BioID-menetelmällä. Tunnistuneiden proteiinien joukosta valittiin lähempään tarkasteluun viisi sellaista proteiinia, jotka löydettiin useammasta kuin yhdestä näyttereplikaatista, ja näitä proteiineja tutkin pro gradu -tutkielmassani. Lähempään tarkasteluun valitut proteiinit olivat AP2B1, COPG2, HSPA1A, Ku80 ja SND1.

LNCaP-eturauhassyöpäsolulinja valittiin tutkimuksessa käytettäväksi solulinjaksi, koska se tuottaa myös luonnostaan ANO7-proteiinia ja tämän vuoksi myös vuorovaikuttavien proteiinien pitäisi olla soluissa läsnä. Kyseiset solut kasvavat sekä yksittäisinä että muodostaen rykelmiä. Mikroskopoinnin kannalta oli tärkeää, että solut saatiin kuvattua yksittäisinä.

#### *3.1. Validointi fluoresenssimikroskoopilla*

Valittujen proteiinien värjäysmenetelmä ja vasta-ainekonsentraatiot optimoitiin fluoresenssimikroskoopilla. Tarkasteltaessa värjättyjä proteiineja Ku80-proteiinin todettiin sijoittuvan solussa tumaan ja AP2B1-, COPG2-, HSPA1A- ja SND1-proteiinien nähtiin sijoittuvan tuman ulkopuolelle. Ennen tätä tutkimusta tehtyjen aikaisempien analyysien perusteella Ku80-proteiini oli mahdollinen ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttava proteiini. Fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltaessa Ku80-proteiinin todettiin kuitenkin sijoittuvan täysin tumaan, joten kyseinen proteiini jätettiin pois varsinaisista värjäyksistä.

#### *3.2. Tranfektoidut konstruktit*

ANO7-proteiinin kanssa mahdollisesti vuorovaikuttavat proteiinit validoitiin immunofluoresenssi kaksoisvärjäyksellä ja STED mikroskopoinnilla. Kaikkien mahdollisten vuorovaikutusproteiinien kohdalla tutkimuksessa käytettävät konstruktit, ANO7L-BirA\*-HA ja ANO7L-His tai BirA\*-HA transfektoitiin LNCaP-soluihin.

Transfektion jälkeen ANO7 ja kukin mahdollisesti vuorovaikuttava proteiini värjättiin proteiinia vastaavalla vasta-aineella. ANO7 havaittiin transfektoiduissa LNCaP-soluissa joko anti-HA tai anti-His primaarivasta-aineella ja käyttämällä sitä vastaan fluoresoivalla väriaineella leimattua sekundaarivasta-aineita. Luontaisesti solussa esiintyvät mahdolliset vuorovaikutusproteiinit havaittiin niitä vastaavilla polyklonaalisilla vasta-aineilla ja fluoresoivalla väriaineella leimattua sekundaarivasta-ainetta käyttämällä.

ANO7L-BirA\*-HA konstrukti koostui ANO7-proteiinin pitkää muotoa tuottavasta osasta, biotiiniligaasista, joka leimaa lähelle tulevat proteiinit ja HA-leimasta, jonka avulla konstrukti voidaan havaita soluissa värjäysten avulla. Edellä mainittu konstrukti oli käytössä jo aikaisemmassa tutkimuksessa, jossa tunnistettiin ANO7-proteiinin kanssa mahdollisia vuorovaikuttavia proteiineja BioID -menetelmän avulla. Jotta voitiin nähdä, että kohtalaisen suuren biotiiniligaasin läsnäolo konstruktissa ei vaikuta konstruktin paikantamiseen solussa, ANO7L-BirA\*-HA-konstruktilla transfektoitujen solujen värjäyksiä verrattiin ANO7L-His-konstruktilla transfektoitujen solujen värjäyksiin, joista puuttuu biotiiniligaasi. Lisäksi halusimme näyttää että ANO7-proteiinin pitkä muoto on se osa konstruktiota, joka ohjaa proteiinin sille oletettuun paikkaan solussa. Täten ANO7L-BirA\*-HA- ja ANO7L-His-konstruktin tulisi näkyä spesifisissä rakenteissa samassa paikassa mahdollisten interaktioproteiinien kanssa, kun taas tyhjän BirA\*-HA-konstruktin tulisi paikantua eri paikkaan solussa.

### 3.3. *AP2B1*

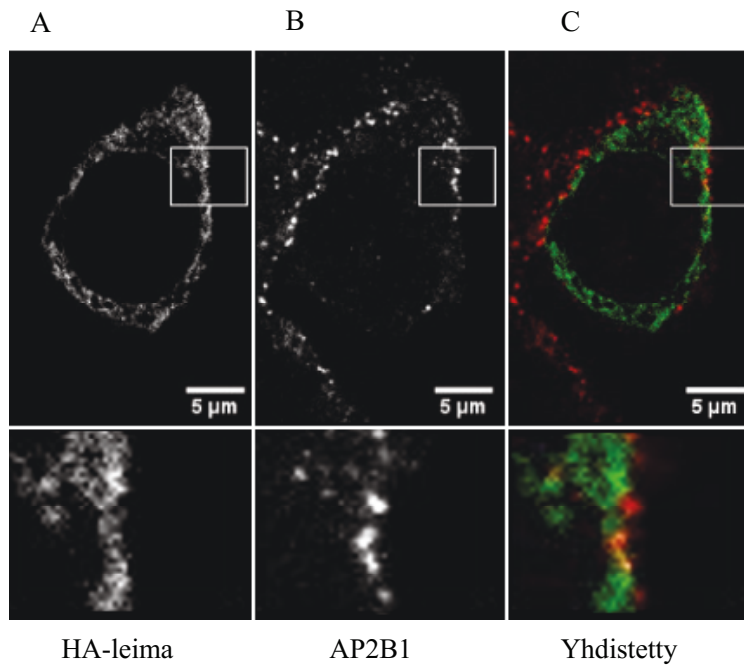
AP2B1 on osa AP2-kompleksia. AP2-kompleksi on tärkeässä osassa vesikkelivälitteisessä proteiinien kuljetuksessa solun membraanien välisissä kuljetusreiteissä. AP2-kompleksit sijaitsevat solukalvolla ja sen läheisyydessä, jossa myös ANO7-proteiinin tiedetään ilmentyvän. AP2B1-proteiini osallistuu solussa kuljetettavan proteiinin valintaan ja vesikkelien muodostumiseen. Tätä tutkimusta edeltävässä tutkimuksessa tehtyjen analyysien perusteella ANO7-proteiinin kanssa mahdollisista vuorovaikuttavista proteiineista vesikkeliliikenteeseen osallistuva AP2B1 näytti runsasta rikastumista, ja siksi kyseinen proteiini valittiin tarkasteluun. Tarkasteltaville proteiineille ANO7 ja AP2B1 suoritettiin immunofluoresenssivärjäys LNCaP-soluissa.

Tutkimuksessa käytettävät konstruktit, ANO7L-BirA\*-HA ja ANO7L-His, transfektoituna LNCaP-soluihin ilmentävät ANO7-proteiinia solukalvolla ja sen

välittömässä läheisyydessä (kuva 5A ja 6A), jossa sen on todettu ilmentyvän myös luontaisesti. Värjäyskuvista nähdään, että myös AP2B1-proteiini (kuva 5B ja 6B) ilmentyy LNCaP-solujen solukalvolla ja sen läheisyydessä. AP2B1-proteiinin värjäys muodostaa selkeästi erottuvia vesikkelejä, jotka kuroutuvat mitä luultavammin solukalvolta tai solun kalvorakenteista todennäköisesti Golgin laitteesta. Kaksoisvärjäyskuvista 5C ja 6C ANO7- ja AP2B1-proteiinien voidaan nähdä sijoittuvan osittain samaan paikkaan soluissa, jolloin proteiinien päällekkäiset signaalit nähdään keltaisina/kirkkaan vaaleina kohtina kuvissa. Päällekkäiset signaalit, joissa ANO7- ja AP2B1-proteiini kolokalisoituvat, ovat kohtia, joissa proteiinit mahdollisesti vuorovaikuttavat keskenään.

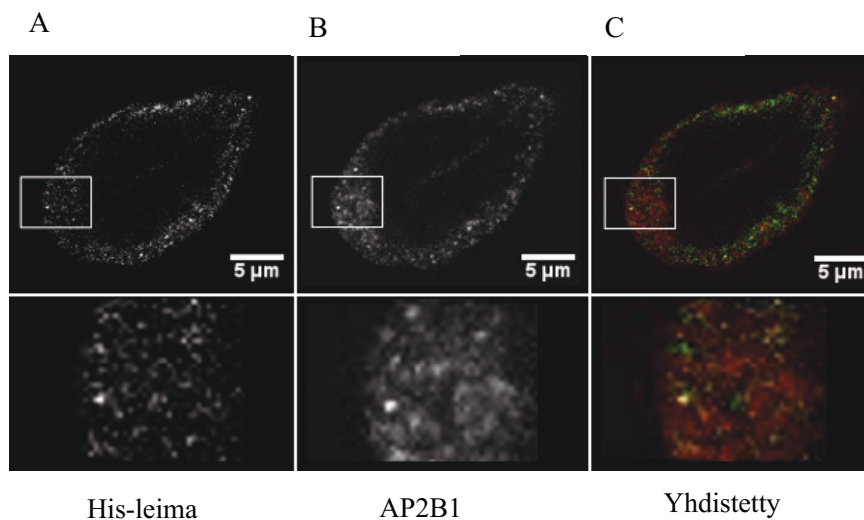
Kuvissa 7A ja C kontrollina toimiva BirA\*-HA-konstrukti värjää koko solun paikallistumatta mihinkään tiettyyn rakenteeseen solussa. Mahdollisesti vuorovaikuttavat proteiinit sijoittuvat samalla tavoin sekä ANO7 yli-ilmentyvän konstruktin ANO7L-BirA\*-HA (kuva 5B) solussa että tyhjän plasmidikonstruktin BirA\*-HA (kuva 7B) solussa. Tämän perusteella voidaan todeta, että ANO7-proteiinin yli-ilmentäminen ei vaikuta AP2B1-proteiinin sijoittumiseen solussa.

## ANO7L-BirA\*-HA



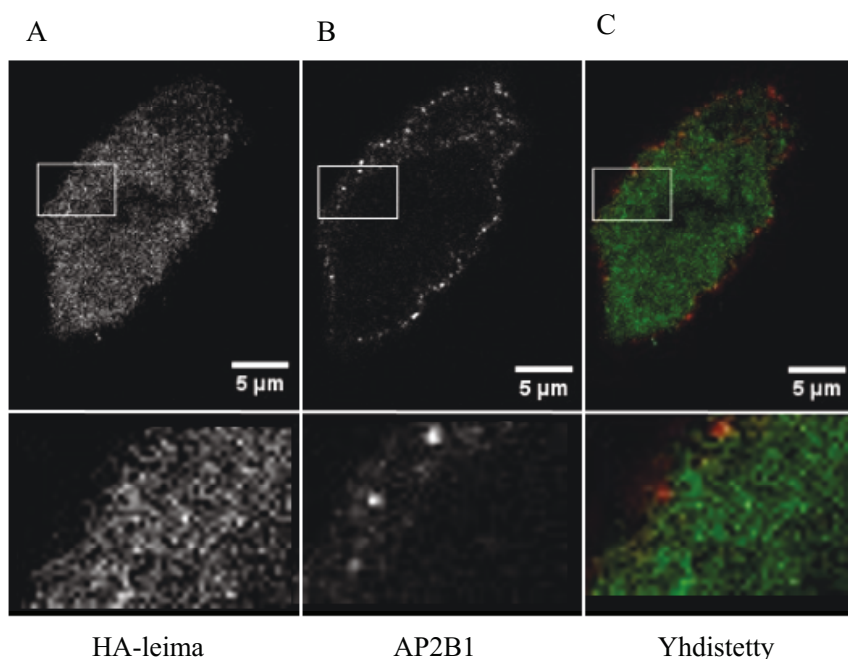
Kuva 5. Kaksoisvärjätty ANO7L-BirA\*-HA transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylempäästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. ANO7 (A) sijoittuu solukalvolle samoin kuin AP2B1 (B), joka muodostaa solukalvolle vesikkelejä muistuttavia rakenteita. Yhdistetyn kuvan (C) keltainen väri kertoo ANO7- (vihreä) ja AP2B1- (punainen) proteiinien päällekkäisistä signaaleista.

## ANO7L-His



Kuva 6. Kaksoisvärjätty ANO7L-His transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylempäästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. ANO7 (A) sijoittuu pääosin solukalvolle ja sen läheisyyteen samalla tavoin kuin AP2B1 (B). Yhdistetyn kuvan (C) keltaiset/kirkkaat kohdat kertovat ANO7- (vihreä) ja AP2B1- (punainen) proteiinien päällekkäisistä signaaleista.

## BirA\*-HA



Kuva 7. Kaksoisvärjätty BirA\*-HA transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvosta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. HA-leima (A,C vihreä) värjää koko solun paikantumatta mihinkään tiettyyn rakenteeseen solussa ja AP2B1 (B,C punainen) sijoittuu solukalvolle.

### 3.4. *COPG2*

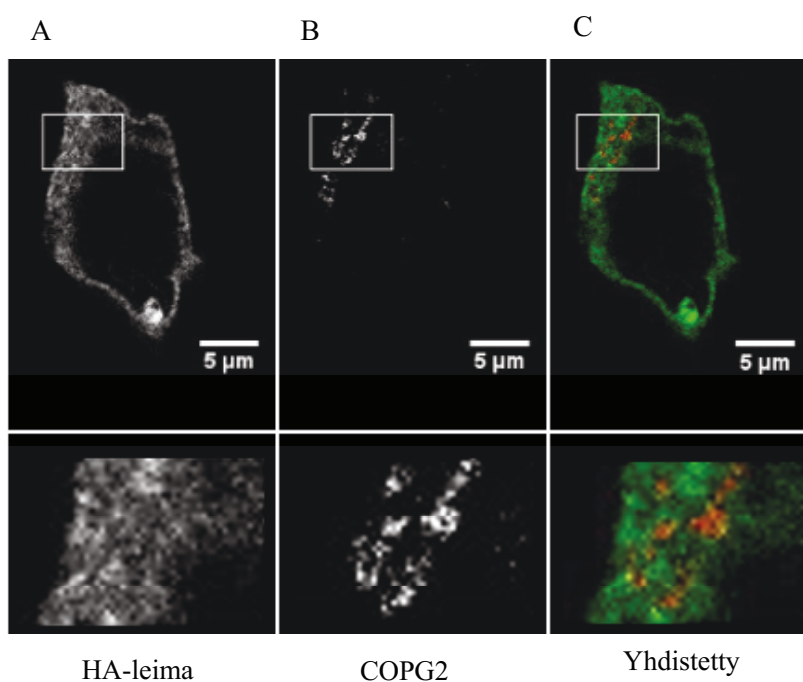
Soluissa kompleksit, joihin COPG2 kuuluu, osallistuvat proteiinien kuljetusreitillä kuljetukseen trans-golgilta solulimakalvostolle. Ennen pro gradu -tutkielmaa tehdyssä tutkimuksessa ANO7-proteiinin kanssa mahdollisia vuorovaikuttavia proteiineja tutkittaessa todettiin vesikkeliliikenteeseen osallistuvien proteiinien runsasta ilmentymistä soluissa. Yksi näistä mahdollisesti vuorovaikuttavista proteiineista oli COPG2. Immunofluoresenssivärjäyksen avulla voidaan tutkia ilmentyvät ANO7 ja COPG2 samoissa kohdissa solua.

COPG2-proteiinin värjäytyminen LNCaP-soluissa kuvissa 8B ja 9B osoittaa tämän proteiinin ilmentyvän solukalvolla ja sen läheisyydessä muodostaen vesikkelejä muistuttavia rakenteita. Vesikkelit ovat kuitenkin keskittyneet selkeämmin tiettyyn kohtaan, mikä on luultavasti jokin solun sisällä oleva rakenne. Tällainen rakenne, jossa esiintyy runsaasti vesikkeliliikennettä ja COPG2-proteiinin tiedetään ilmentyvän, on Golgin laite. ANO7 sijoittuu kuvissa 8A ja 9A tapansa mukaan solukalvolle ja aivan sen

läheisyyteen. Yhdistetyissä kuvissa 8C ja 9C keltaiset kohdat kuvaavat ANO7- ja COPG2-proteiinien signaalien päällekkäisyyttä. Signaalien päällekkäisyys todistaa proteiinien kolokalisaation solussa, jolloin proteiinit voisivat vuorovaikuttaa keskenään.

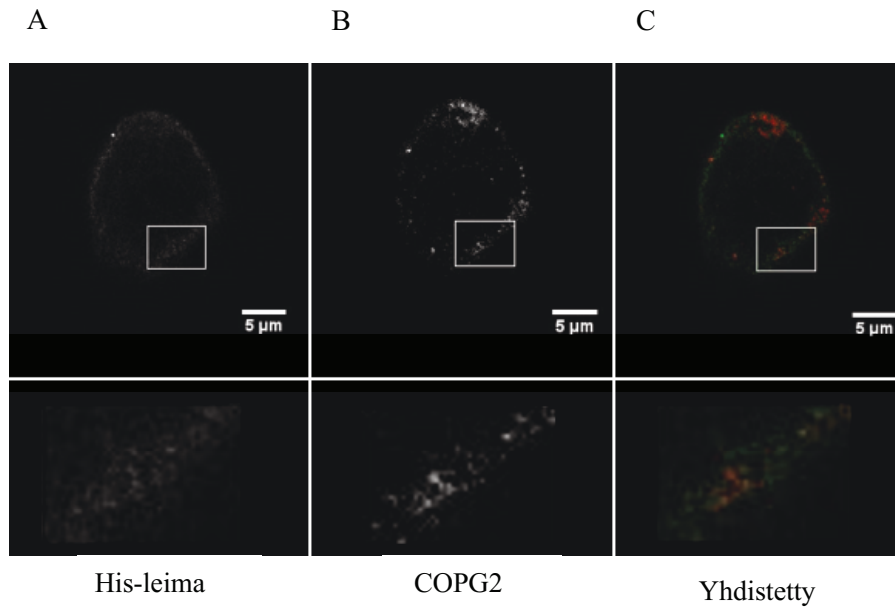
Kontrollina toimivan BirA\*-HA-konstruktin sisältävässä solussa (kuva 10A ja C) koko solu värjäytyy ja signaali ei paikannu mihinkään rakenteeseen solussa. COPG2 sijoittuu ANO7 yli-ilmentyvän konstruktin ANO7L-BirA\*-HA (kuva 8B) sisältävässä solussa rykelmänä solukalvolle ja sen läheisyyteen. Tyhjän plasmidikonstruktin BirA\*-HA sisältävässä solussa COPG2 vesikkelit ovat levittäytyneet ympäri solua, mutta sijoittuvat kuitenkin keskittyneemmin solukalvon läheisyyteen (kuva 10B).

### ANO7L-BirA\*-HA



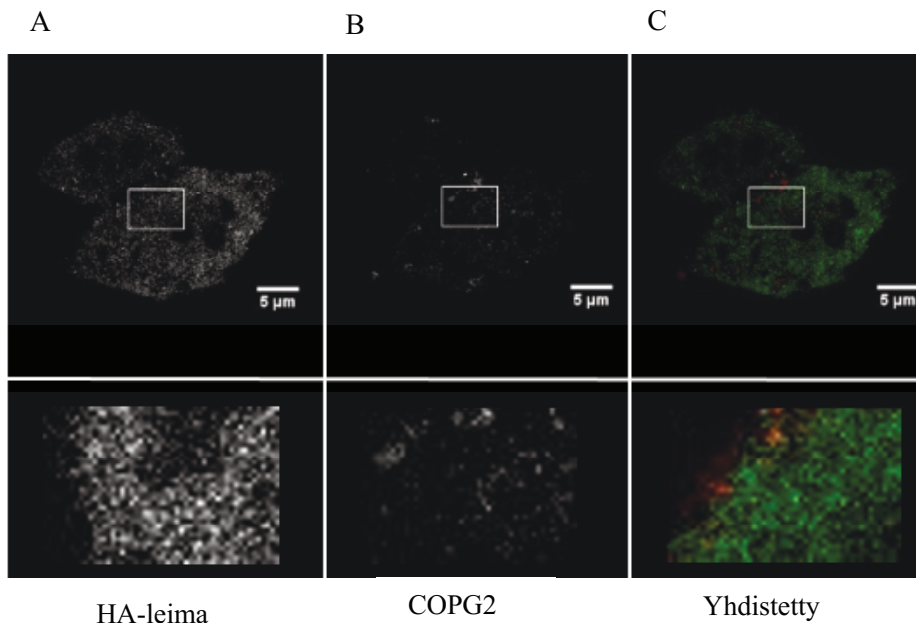
Kuva 8. Kaksoisvärjätty ANO7L-BirA\*-HA transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. COPG2 (B) muodostaa vesikkelimäisiä rakenteita solukalvolle ja sen läheisyyteen, jonne myös ANO7(A) sijoittuu. Yhdistetyssä kuvassa (C) keltaiset kohdat kuvaavat ANO7- (vihreä) ja COPG2- (punainen) proteiinien päällekkäisiä signaaleja.

## ANO7L-His



Kuva 9. Kaksoisvärjätty ANO7L-His transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. COPG2 (B) sijoittuu solukalvolle ja sen läheisyyteen, jonne myös ANO7(A) sijoittuu. Yhdistetyn kuvan C keltaiset pisteet ovat kohtia, joissa ANO7- (vihreä) ja COPG2- (punainen) proteiinien signaalit osuvat päällekkäin.

## BirA\*-HA



Kuva 10. Kaksoisvärjätty BirA\*-HA transfektoitu LNCaP- solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. HA-leima (A) värjää koko solun paikantumatta mihinkään tiettyyn rakenteeseen (C, vihreä). COPG2 (B) on levittäytynyt ympäri solua, mutta yhdistetyssä kuvassa C nähdään, että proteiini on keskittynyt solukalvon läheisyyteen (punainen).

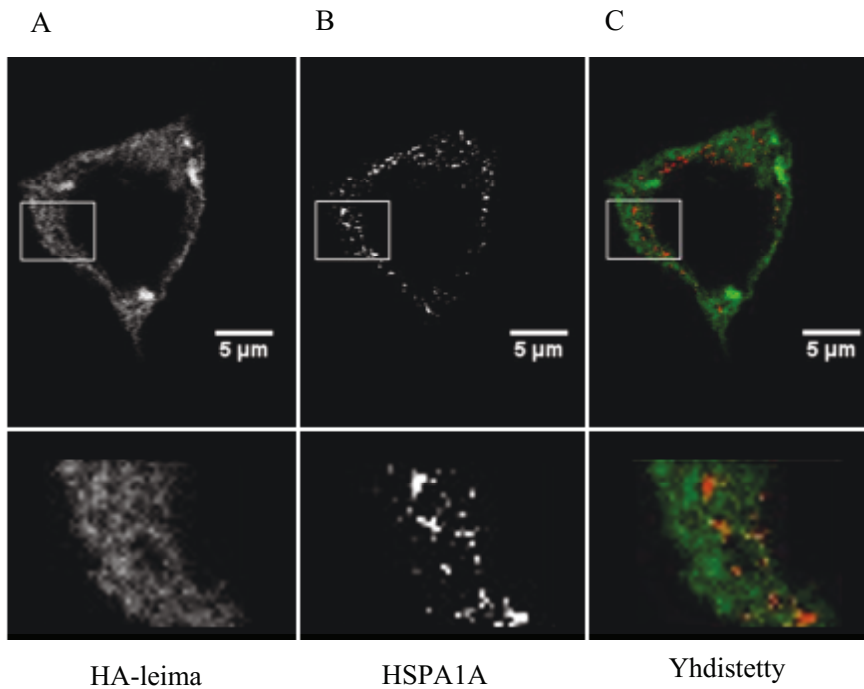
### 3.5. HSPA1A

Hsp70 avustajaproteiinien perheeseen kuuluva HSPA1A osallistuu muun muassa solujen väliseen viestintään, väärin laskostuneiden proteiinien uudelleenjärjestämiseen ja uusien polypeptidien laskostumiseen ja kuljetukseen. HSPA1A-proteiini näytti selkeää rikastumista aikaisemmassa tutkimuksessa tehdyissä analyyseissa ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavia proteiineja tutkittaessa, joten proteiinit voisivat olla vuorovaikutuksessa keskenään. ANO7- ja HSPA1A-proteiinien samanaikaisessa immunofluoresenssivärjäyksessä voidaan nähdä sijoittuvatko proteiinit samaan paikkaan solussa.

Värjäyskuvin 11B, 12B ja 13B nähdään HSPA1A-proteiinin signaali selkeästi solukalvolla ja sen läheisyydessä. ANO7L-BirA\*-HA transfektoidun solun kuvassa 11B voidaan nähdä, kuinka HSPA1A-proteiinin värjäys näkyy solukalvolla ja sen läheisyydessä hyvin erottuvina rakenteina, jotka muistuttavat proteiinien kuljetukseen osallistuvia vesikkelejä. ANO7L-BirA\*-HA (kuva 11) ja ANO7L-His (kuva 12) transfektoiduissa soluissa HSPA1A- (11B ja 12B) ja ANO7- (11A ja 12A) proteiinien värjäykset muodostavan hyvin samanlaiset kuviot soluissa. Yhdistetyissä kuvissa 11C ja 12C keltaiset kohdat solukalvolla ovat merkkejä proteiinien päällekkäisistä signaaleista. Tämän perusteella HSPA1A- ja ANO7-proteiini sijoittuvat osittain samoihin kohtiin solukalvolla ja sen läheisyydessä. Päällekkäisten signaalien kohdissa proteiinit ovat suurella todennäköisyydellä vuorovaikutuksessa keskenään.

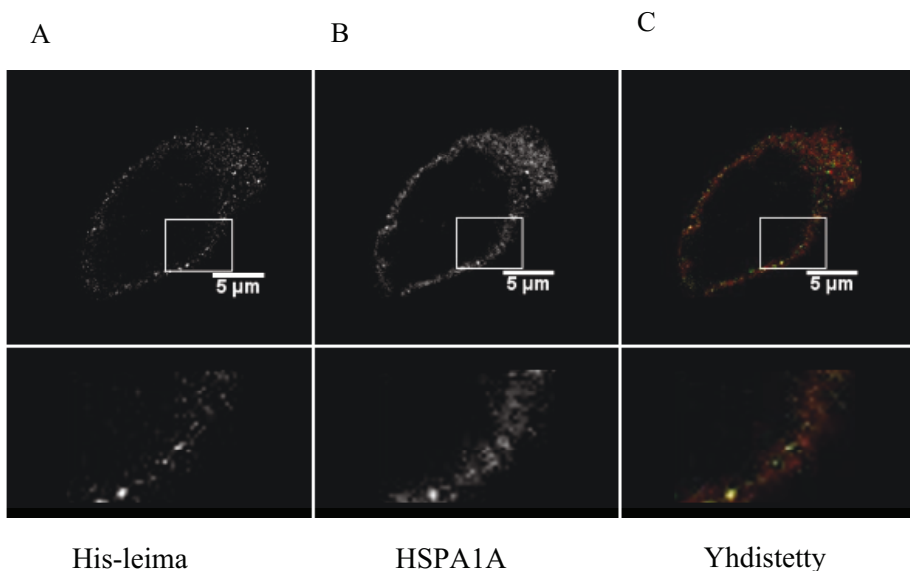
BirA\*-HA-transfektoidussa solussa solussa HA-leima värjää koko solun ilman että signaali paikantuu mihinkään tiettyyn kohtaan solussa (kuva 13A ja C) ja HSPA1A-proteiinin värjäys keskittyy solukalvolle ja sen läheisyyteen. HSPA1A-proteiini sijoittuu samalla tavoin sekä ANO7 yli-ilmentyvän konstruktin ANO7L-BirA\*-HA (kuva 11B) sisältävässä solussa, että tyhjän plasmidikonstruktin BirA\*-HA sisältävässä solussa (kuva 13B). Tämän perusteella voidaan todeta, että ANO7-proteiinin yli-ilmentäminen ei vaikuta HSPA1A-proteiinin sijoittumiseen solussa.

## ANO7L-BirA\*-HA



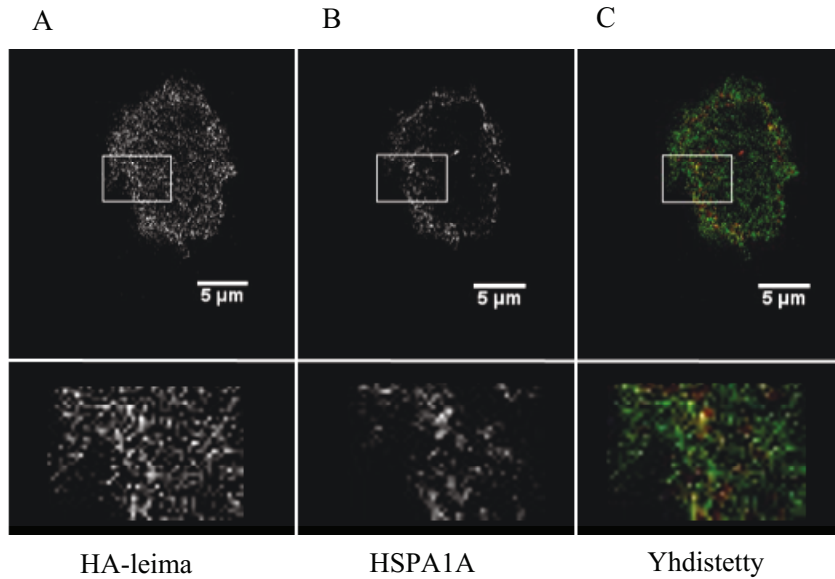
Kuva 11. Kaksoisvärjätty ANO7L-BirA\*-HA transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylempään kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. ANO7 (vihreä) sijoittuu solukalvolle ja sen läheisyyteen (A), jonne myös HSPA1A (punainen) muodostaa selvästi vesikkelimäisiä rakenteita (B). Yhdistetyn kuvan (C) keltaisissa kohdissa ANO7- ja HSPA1A-proteiinien signaalit ovat päällekkäisiä.

## ANO7L-His



Kuva 12. Kaksoisvärjätty ANO7L-His transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylempään kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. ANO7 (A) ja HSPA1A (B) muodostavat samanlaiset kuviot solukalvolle ja sen läheisyyteen. Kuvassa C keltaiset/kirkkaat pisteet kuvaavat ANO7 (vihreä) ja HSPA1A (punainen) proteiinien päällekkäisiä signaaleja.

## BirA\*-HA



Kuva 13. Kaksoisvärjätty BirA\*-HA transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. HA-leima (A) saa koko solun värjäytymään paikantumatta mihinkään tiettyyn rakenteeseen ja HSPA1A (B) levittäytyy vesikkeliä muistuttavina rakenteina ympäri solua, mutta keskittyy solukalvolle.

### 3.6. *SND1*

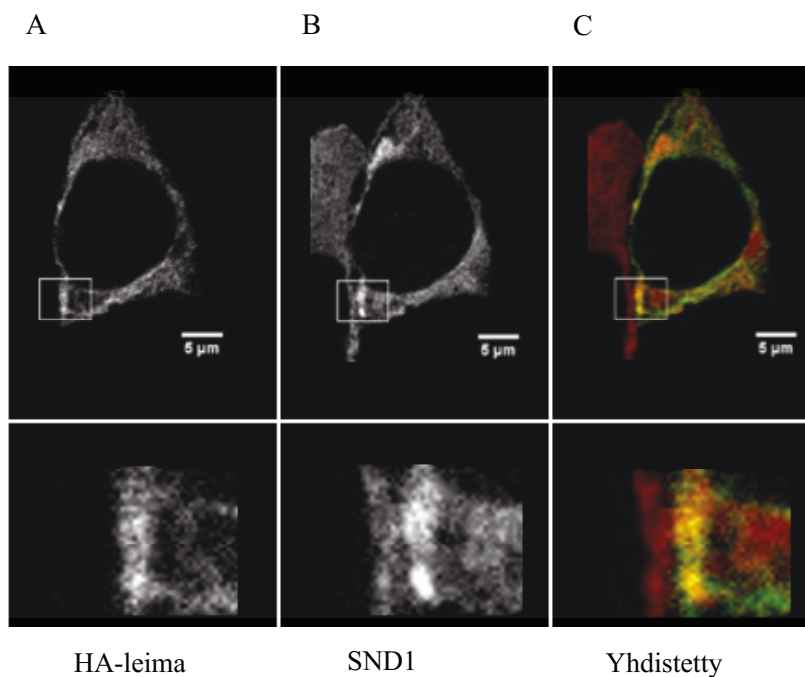
SND1-proteiinin tiedetään osallistuvan muun muassa geenin luennan säätelyyn, silmukointiin, stressin aiheuttamien jyvärakenteiden muodostukseen ja proteiinien ja lipidien säätelyyn. SND1-proteiini valittiin ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavien rikastuneiden proteiinien joukosta aikaisemmassa tutkimuksessa tehtyjen kokeiden ja analyysien perusteella. Aikaisempien tulosten perusteella ANO7-proteiini voisi olla vuorovaikutuksessa SND1-proteiinin kanssa. Immunofluoresenssivärjäyksen avulla voidaan tutkia ilmentyvätkö ANO7- ja SND1-proteiini samoissa kohdissa solua, mikä antaisi tukea aikaisemmille havainnoille siitä, että proteiinit ovat vuorovaikutuksessa keskenään.

ANO7L-BirA\*-HA ja ANO7L-His transfektoitujen LNCaP-solujen värjätty SND1-proteiini (kuva 14A ja 15A) sijoittuu ANO7-proteiinin (kuva 14B ja 15B) kanssa osittain samoihin kohtiin soluissa. Molemmat proteiinit ilmentyvät voimakkaasti solukalvolla, mutta SND1-proteiinin signaali esiintyy solun sisäpuolella levinneenä laajemmalle alueelle kuin ANO7. Yhdistetyissä kuvissa 14C ja 15C keltaiset kohdat etenkin ANO7L-BirA\*-HA transfektoidussa solussa ovat hyvin laajalla alueella. ANO7- ja SND1-

proteiini sijoittuvat osin samoihin kohtiin soluissa. Kaikkia edellä läpi käytyjä kuvia (5-14) vertailemalla voidaan nähdä kuinka SND1-proteiinin signaali esiintyy huomattavasti muita tutkittavia proteiineja vahvemmin LNCaP-soluissa. SND1-proteiinin signaali havaitaan kuvissa hyvin vahvana, mikä kertoo tämän proteiinin ilmentyvän voimakkaasti LNCaP-eturauhassyöpäsolulinjassa.

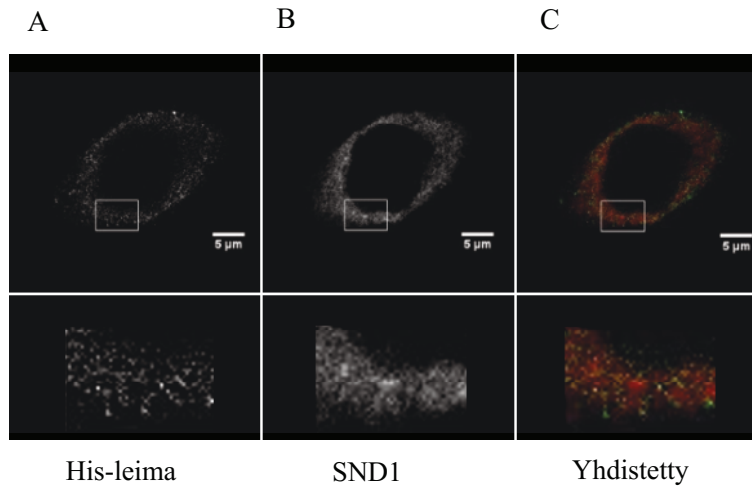
Tyhjän BirA\*-HA plasmidin sisältävä solu värjäytyy kokonaan signaalin paikantumatta mihinkään rakenteeseen solussa (kuva 16A ja C). SND1-proteiini sijoittuu solussa samoihin kohtiin sekä ANO7 yli-ilmentyvän konstruktin ANO7L-BirA\*-HA (kuva 14B) sisältävässä solussa että tyhjän plasmidikonstruktin BirA\*-HA (kuva 16B) sisältävässä solussa. Tämän perusteella voidaan todeta, että ANO7-proteiinin yli-ilmentäminen ei vaikuta SND1-proteiinin sijoittumiseen solussa.

### ANO7L-BirA\*-HA



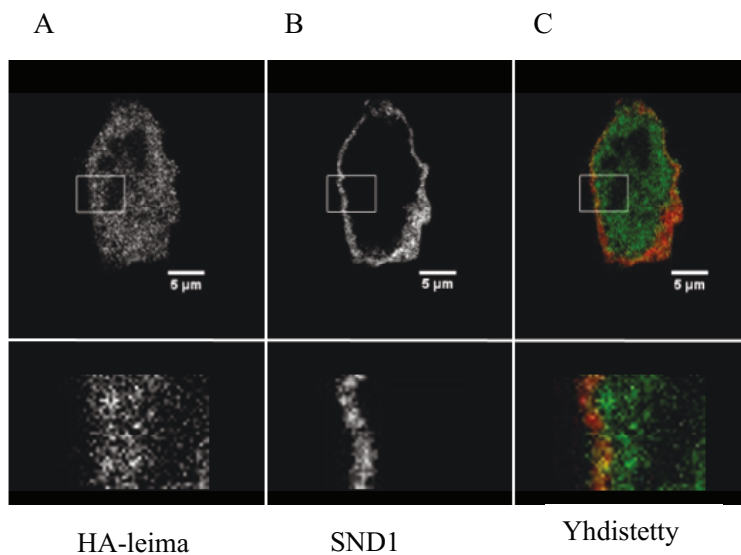
Kuva 14. Kaksoisvärjätty ANO7L-BirA\*-HA transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. Yhdistetyn kuvan keltainen väri kertoo ANO7- (vihreä) ja SND1- (punainen) proteiinien päällekkäisistä signaaleista (C). ANO7 (A) sijoittuu solukalvolle, jonne paikantuu osittain myös SND1 (B). SND1 levittäytyy myös soluliman muihin rakenteisiin, mutta ei tumaan.

## ANO7L-His



Kuva 15. Kaksoisvärjätty ANO7L-His transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. ANO7 (A) sijoittuu solukalvolle, jonne sijoittuu osittain myös SND1 (B). Lisäksi SND1 levittäytyy solukalvon läheisyyteen solulimaan. Yhdistetyn kuvan C voimakkaan SND1-proteiinin (punainen) ilmentymisen joukosta voi nähdä keltaisia pisteitä, joissa ANO7- (vihreä) ja SND1-proteiinien signaalit ovat päällekkäiset.

## BirA\*-HA



Kuva 16. Kaksoisvärjätty BirA\*-HA transfektoitu LNCaP-solu. Ylempänä kuva koko solusta ja alempana lähikuva solukalvolta ylemmästä kuvasta valitun rajatun alueen kohdalta. HA-leima (A) levittäytyy laajalle ympäri solua paikantumatta juuri mihinkään ja SND1 (B) ilmenee voimakkaana solukalvolla ja sen läheisyydessä.

#### 4. POHDINTA

Solun sisällä olevien proteiinien välillä tapahtuu tuhansia vuorovaikutuksia joka sekunti. Nämä vuorovaikutukset voivat olla hyvin vakaita ja pysyviä tai toisaalta vain lyhyitä ja hetkellisiä. Proteiinien välisten vuorovaikutusten tutkiminen on tärkeää solujen välisen ja solun sisällä tapahtuvien mekanismien ymmärtämiseksi. Mikroskopian avulla voimme tarkkailla proteiinien sijoittumista soluissa ja havaita mahdollisen kolokalisaation tutkittavien proteiinien välillä. Kahden proteiinin välisen vuorovaikutuksen todistamiseksi tarvitaan kuitenkin myös muita mitattavia menetelmiä visuaalisen havainnoinnin lisäksi.

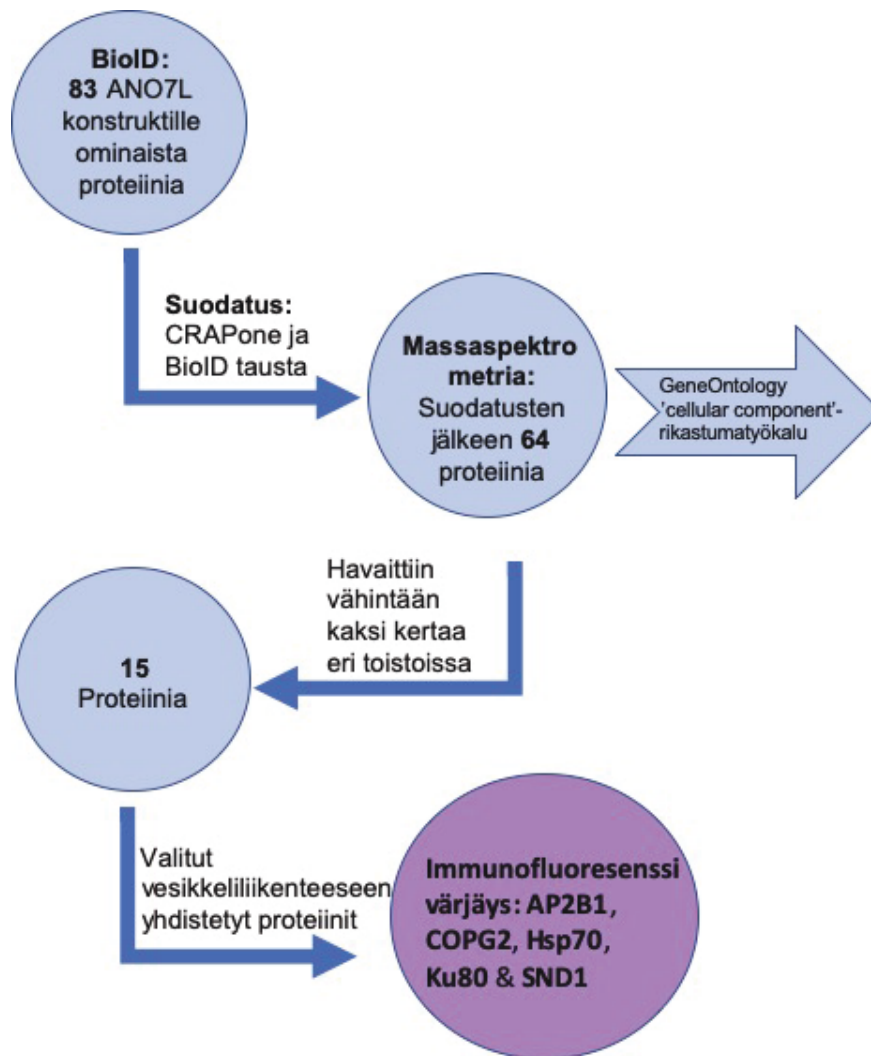
Tämä pro gradu -tutkielma on osa laajempaa tutkimusta, jonka tarkoituksena on tunnistaa ANO7-proteiinin kanssa mahdollisesti vuorovaikuttavia proteiineja ja saada alustava käsitys ANO7-proteiinin vuorovaikutussuhteista. ANO7-proteiinia ja mahdollisia vuorovaikuttavia proteiineja tutkimalla voidaan saada lisää tietoa proteiinien sijainnista ja metaboliareiteistä soluissa. Kaikkonen ym. (2019) havaitsivat, että *ANO7*:n neljännessä intronissa tai eksonissa olevan mutaation kantajille (rs77559646) tehoaa erityisen hyvin docetaxel-lääke. ANO7-proteiinin toimintaa ei tunneta tarpeeksi hyvin, jotta voitaisiin tietää miksi ja millä mekanismilla *ANO7* mutantti rs77559646 herkistää potilaat docetaxelille. Kun saadaan selville mitä ANO7-proteiini tekee soluissa, minkä proteiinien kanssa se on vuorovaikutuksessa ja missä solun prosesseissa se on mukana, päästään mahdollisesti tämänkin syyn jäljelle.

Aiemmin tutkimuksessa BioID-menetelmän ja massaspektrometrian avulla on havaittu 442 proteiinia, jotka mahdollisesti vuorovaikuttavat ANO7-proteiiniin kanssa. Suodatusten jälkeen jäljelle on jäänyt 64 proteiinia, joista 15 on havaittu vähintään kahdessa toistossa. ANO7-proteiinin kanssa vuorovaikuttavat proteiinit on analysoitu Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) "cellular component" rikastumatyökalulla. (Kaikkonen ym. 2020). Cellular component-rikastumatyökalu tunnistaa solun rakenteita ja molekyylikomplekseja, joissa tutkittavat proteiinit mahdollisesti sijaitsevat ja vaikuttavat soluissa. Analyysin perusteella ANO7 on yhdistetty muun muassa vesikkeliliikenteeseen, DNA:n korjausmekanismeihin ja Arp2/3 kompleksiin osallistuviin proteiineihin. Viidestätoista proteiinista kuusi (HSPA1A, AP2B1, COPG2,

HNRNPL, SND1 ja Ku80) on tunnistettu vähintään kahdessa rinnakkaisnäytteessä. Edellä mainituista kuudesta proteiinista HSPA1A, AP2B1, COPG2, SND1 ja Ku80 on yhdistetty vesikkeliliikenteeseen ja nämä viisi proteiinia on valittu yksityiskohtaisempaan tarkasteluun tässä pro gradu -tutkielmassa. Kaaviokuvassa 17 on esitettyä aikaisemmin tutkimuksessa suoritetun työn kulku, joka johti viiden ANO7-proteiinin kanssa mahdollisesti vuorovaikuttavan proteiinin valintaan.

Tässä pro gradu -tutkielmassa selvitettiin sijoittuvatko ANO7 ja kukin yllä mainitun aikaisemman tutkimuksen perusteella valittu proteiini samaan paikkaan solussa. Pro gradu -tutkielmassani tutkin näiden viiden proteiinin (AP2B1, COPG2, HSPA1A, Ku80 ja SND1) sijoittumista eturauhassyöpäsoluissa ja proteiinien mahdollista vuorovaikutusta ANO7-proteiinin kanssa. Tutkimuksessa ANO7:lle ja kullekin edellä mainituille proteiinille tehtiin samanaikaisesti immunofluoresenssivärjäys. Tarkoituksena oli katsoa, nähdäänkö proteiinien lähettämät fluoresenssisignaalit päällekkäin, mikä antaisi tukea sille, että proteiinit voisivat vuorovaikuttaa keskenään. Fluoresenssisignaalien päällekkäisyys antaisi tukea aikaisemmin tutkimuksessa löydettyjen proteiinien ja ANO7-proteiinin väliselle vuorovaikutushypoteesille. Kolokalisaatiota todennettiin erittäin tarkan erottelukyvyn omaavalla STED mikroskoopilla. STED mikroskoopin avulla saatiin korkean resoluution kuvat proteiinien sijoittumisesta soluissa ja mahdollisesta kolokalisaatiosta.

Fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltaessa Ku80-proteiini todettiin sijoittuvan täysin tumaan. Kyseinen proteiini saattaa ilmentyä eturauhassyöpäsoluissa vain tumassa tai käytetty vasta-aine värjää vain tumassa olevaa Ku80-proteiinia. Ku80-proteiinin on kuitenkin nähty ilmentyvän tuman lisäksi myös solukalvolla (Muller ym. 2004). Tällä menetelmällä ja näillä vasta-aineilla ei voitu havaita kolokalisaatiota, sillä signaalit näkyivät eri osissa solua, joten kyseinen proteiini jätettiin pois varsinaisista värjäyksistä.



Kuva 17. Kaaviokuva aikaisemmin tutkimuksessa tehdystä työn kulusta, joka johti pro gradu -tutkielmassa tutkitun viiden proteiinin valintaan. BioID:n avulla saadut 83 mahdollista ANO7:n kanssa vuorovaikuttavaa proteiinia suodatettiin CRAPone-ohjelman avulla ja tunnetuista BioID taustaproteiineista. Suodatusten jälkeen 64 jäljelle jäänyttä proteiinia analysoitiin GeneOntology 'cellular component'-rikastumatyökalulla. ANO7:n kanssa vuorovaikuttavista proteiineista solujen vesikkeliliikenteeseen osallistuvat proteiinien joukosta valittiin tarkempaan tarkasteluun viisi sellaista proteiinia, jotka tunnistuivat useammasta kuin yhdestä näytereplikaatista. Näistä 15 proteiinista valittiin viisi immunofluoresenssivärjäyksiin.

#### 4.1. ANO7:n kanssa kolokalisoituvat proteiinit

Kaikkonen ym. (2020) tutkivat ensimmäisenä ANO7-proteiinin kanssa mahdollisesti vuorovaikuttava proteiineja. Tämä pro gradu -työ on osa edellä mainittua tutkimusta. Aikaisemman tutkimuksen perusteella lopullisiin värjäyksiin valitut proteiinit paikallistuivat soluissa odotettuihin rakenteisiin ja tämän perusteella myös proteiinien värjäykset onnistuivat. Työssä havaittiin, että ANO7 kolokalisoituu vesikkelien muodostukseen ja vesikkeliliikenteeseen osallistuvien AP2B1-, COPG2-, SND1- ja HSPA1A-proteiinin kanssa. Tutkimukseen valittu viides proteiini, Ku80, todettiin jo

optimoinnin aikana paikantuvan tumaan, joten kyseinen proteiini jätettiin pois varsinaisista värjäyksistä.

#### 4.1.1. AP2B1

AP2B1-proteiini on tärkeä tekijä vesikkeliliikenteessä ja erityisesti proteiinien kuljetuksessa solun membraanien välisillä kuljetusreiteillä. AP2B1 avustaa vesikkelien kuroutumista solukalvolta tai Golgin laitteesta. ANO7- ja AP2B1-proteiini vuorovaikuttavat solukalvolla, joten ANO7-proteiini saattaa osallistua proteiinien kuljetukseen tai vesikkelien muodostukseen LNCaP-eturauhassyöpäsoluissa. ANO7-proteiinin voisi myös toimia mahdollisesti avustajana tai välittäjänä solukalvolla ja osallistua tällä tavoin vesikkeliliikenteeseen.

Rintasyövän solujen hiljennyskokeilla on osoitettu, että AP2-kompleksin  $\beta 2$ -alaysikön hiljennys aiheuttaa syöpäsoluille ominaisten rakenteiden muodostumisen soluväliaineeseen. Soluväliaineeseen muodostuvat rakenteet saattavat tunkeutua myös soluun ja aiheuttaa tätä kautta syövän leviämistä muihin soluihin (Pignatelli ym. 2012).  $\beta 2$ -alaysikkö saattaa olla tärkeänä osana normaalia solujen välistä kommunikointia samalla estäen häiritsevien rakenteiden muodostumista solujen välille. (Rangel ym. 2017). Mikäli ANO7-proteiini osallistuu yhdessä AP2B1-proteiinin kanssa vesikkeliliikenteeseen, saattaa myös ANO7-proteiinin tehtävä olla merkittävä. ANO7 voisi toimia esimerkiksi syöpäsolujen välisen viestinnän ja kommunikoinnin ylläpidossa tai rakenteellisena komponenttina proteiinikompleksissa.

#### 4.1.2. COPG2

COPG2 kuuluu kompleksiin, joka osallistuu proteiinien kuljetukseen trans-golgilta solulimakalvostolle. Tulosten perusteella COPG2-proteiini ilmenee solukalvolla ja sen läheisyydessä vesikkelejä muistuttavina rakenteina. ANO7 ja COPG2 esiintyvät soluissa osittain samoissa kohdissa, mikä antaa tukea sille, että ANO7 osallistuisi vesikkelien muodostukseen tai kuljetukseen solukalvolla ja sen välittömässä läheisyydessä.

COPI-päällysteisen vesikkelin  $\beta 2$  alaysikön (COPB2) ilmentymisen on todettu olevan koholla eturauhassyöpäkudoksessa ja tämä on yhdistetty potilailla huonoon ennusteeseen eturauhassyövässä (Mi ym. 2018). *COPB2*-geenin tutkimuksessa kyseisen geenin

hiljentäminen estä eturauhassyöpäsolujen jakautumista ja lisäsi apoptoosia (Mi ym. 2016). Samaan COPI- päällysteisen vesikkelien ryhmään kuuluvan COPB1 on näytetty vuorovaikuttavan anoktamiinien perheeseen kuuluvan ANO1-proteiinin kanssa laskien ANO1-proteiinin ilmentymistä soluissa (Lee ym. 2016). COPI-päällysteisiin vesikkeleihin kuuluvalla COPG2-proteiinilla saattaa olla samanlaisia toimintoja kuin samaan päällysteisten ryhmään kuuluvalla COPB2-proteiinilla. COPG2-proteiini voisi toimia esimerkiksi eturauhassyöpäsolujen jakautumista edistävänä tekijänä. ANO7-proteiinia on havaittu ilmenevän runsaasti etenkin aggressiivisessa eturauhassyöpässä, jolloin syöpäsolujen jakautuminen on nopeaa. COPG2- ja ANO7-proteiinin välinen vuorovaikutus voisi vauhdittaa syöpäsolujen jakautumista ja leviämistä.

#### 4.1.3. HSPA1A

Hsp70-proteiinien perheeseen kuuluvat HSPA6 ja HSPA1A paikallisti Khalouei (2014) tutkimusryhmineen. He havaitsivat kyseiset proteiinit tumassa pilkkuina, jotka ovat rikastuneina RNA:n silmukoinnissa, sekä näiden pilkkujen lisäksi tuman jyväsissä. Soluja ärsytettiin erilaisilla stressitekijöillä, jotta proteiineille saatiin korkeampi ilmentyminen. (Khalouei ym. 2014). Eukaryootit ilmentävät useita Hsp70 perheen proteiinien isoformeja kaikkialla solussa ja HSPA1A-proteiinia on löydetty sekä solulimasta että tumasta. Joidenkin HSPA1A-proteiinin toimintojen solulimassa oletetaan olevan tarpeettomia, mutta tämän proteiinin ilmentyminen korreloi kuitenkin vahvasti stressireaktioissa viitaten sen tärkeyteen solun puolustusreaktioissa. (Evans ym. 2010).

Solun kalvostoissa esiintyvien Hsp-proteiinien alkuperä on edelleen osittain epäselvä. On ehdotettu, että solut voisivat erittää kyseisiä proteiineja stressireaktiossa, mikä saattaisi selittää proteiinien esiintymisen solulimakalvostolla ja solukalvolla. Hsp70-proteiini on ANO7-proteiinin tavoin yhdistetty solukalvon fosfolipideihin. (Broquet ym. 2003). Tulosten perusteella ANO7 ja HSPA1A kolokalisoituvat solukalvolla ja sen läheisyydessä. HSPA1A-proteiini voisi osallistua ANO7-proteiinin kanssa solukalvolla esimerkiksi solukalvon fosfolipidien liikutteluun ja solukalvon läpäisyvyyden säätelyyn sekä mahdollisesti stressireaktiossa erittyvien proteiinien liikkumiseen solulimakalvoston ja solukalvon välillä. Solukalvon fosfolipidien liikkuminen saattaa aktivoida solujen signalointireittejä tai avustaa vesikkelien muodostumisessa ja kuroutumisessa solukalvolta.

#### 4.1.4. SND1

Tulosten perusteella SND1-proteiinia ilmentyy runsaasti solukalvolla, mutta proteiinia esiintyy myös solun muissa rakenteissa tumaa lukuun ottamatta. ANO7- ja SND1-proteiinin välinen vuorovaikutus tapahtuu solukalvolla ja sen läheisyydessä. SND1-proteiini on aikaisemmin yhdistetty solun stressireaktiossa muodostuviin jyvärakenteisiin. ANO7 saattaa osallistua näiden jyvärakenteiden muodostukseen, eritykseen tai liikkumiseen solukalvon läheisyydessä. SND1 ilmentyi voimakkaasti LNCaP-eturauhassyöpäsoluissa, mikä saattaa olla merkki stressireaktion aiheuttamasta proteiinin runsaasta ilmentymisestä syöpäsoluissa.

Muun muassa silmukointiin osallistuvalla SAM68-proteiinilla on syöpäsolujen jakautumista edistäviä ominaisuuksia ja sen kohonnut ilmentyminen korreloi usein syövän kehityksen ja etenemisen kanssa. Ko-immunopresipitaatio (vasta-aineen avulla kalastetaan proteiini, minkä jälkeen siihen kiinnittyneitä proteiineja voidaan analysoida) ja massaspektrometria ovat osoittaneet että SND1-proteiini vuorovaikuttaa SAM68-proteiinin kanssa. Tutkimuksessaan Cappellari ym. (2014) selvittivät, että SND1- ja SAM68-proteiinin hiljentäminen vähensi solujen jakautumista ja leviämistä eturauhassyövän soluissa. SAM68 ja SND1 esiintyivät runsaammin eturauhassyövän soluissa verrattuna terveisiin eturauhasen soluihin. SND1 toimi vaihtohtoisen silmukoinnin säätelijänä sekä edisti eturauhassyövän solujen kasvua ja selviytymistä. SND1 lisäsi *CD44*-geenin (syövässä merkityksellisen geenin) vaihtohtoisten eksonien muodostumista mRNA:sta SAM68-välitteisen silmukoinnin kautta ja voitiin yhdistää syövän etenemiseen ja etäpesäkkeiden muodostumiseen. (Cappellari ym. 2014).

Tutkimuksessaan Miki ym. (2009) havaitsivat SND1-proteiinin voimakkaan ilmentymisen eturauhassyöpäpotilailla, jossa se esiintyi solun solulimassa pieninä jyväsinä. Kyseistä proteiinia esiintyi suuressa osassa eturauhassyöpäpotilaiden näytteitä, kun taas terveissä eturauhasen soluissa ja liikakasvusolunäytteissä SND1-proteiinia ilmentyi vain hyvin heikosti tai ei ollenkaan. Huonosti erilaistuneen syövän todettiin korreloivan korkean SND1-proteiinin ilmentymisen kanssa. Näiden tulosten perusteella SND1 voisi mahdollisesti toimia eturauhassyövän biomarkkerina. Syövän histologisessa arvioinnissa yleisesti käytetty AMACR ( $\alpha$ -methylacyl-coenzyme A racemase) yhdessä muiden kudosmarkkereiden kanssa on todettu hyväksi, mutta kuitenkin epätarkaksi syövän indikaattoriksi. Miki ym. osoittivat SND1:n toimivan lupaavana tarkempaan

biomarkkerina kuin AMACR, mutta kuitenkin toimimattomana yksinään. SND1 ja AMACR voisivat toimia yhdessä hyvänä syövän biomarkkerina. (Miki ym. 2009). Mikäli ANO7 ja SND1 vuorovaikuttavat tiivistä keskenään, nämä voisivat myös toimia SND1:n ja AMACR:in tavoin yhdessä mahdollisena syövän biomarkkerina esimerkiksi aggressiivisen eturauhassyövän tapauksissa.

SND1-proteiinilla on havaittu myös muita funktioita, kuten osallistuminen RNA:n käynnistämään geenin hiljentämiseen (Caudy ym. 2003). SND1-proteiinin osallistuminen RNA:n käynnistämään geenin hiljentämiseen tarkoittaa, että kyseinen proteiini ilmenee tuman lisäksi myös solulimassa. Muun muassa nisäkkään soluilla tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että RNA:n käynnistämä geenin hiljentäminen tapahtuu suurimmaksi osaksi solulimassa SND1-proteiinin avustamana (X Tong ym. 1995). Syövän kannalta erityisen mielenkiintoinen löydös on ollut, että SND1-proteiinin ja soluväliliitoksiin osallistuvan methadheriinin (MTDH, Metadherin-Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1) muodostama kompleksi heikentää solun ohjelmoitua kuolemaa jo ennen kuin varsinaisia syöpämuutoksia on havaittavissa (Kannan & Eaves 2014).

#### *4.2. Yhteydet muihin anoktamiineihin*

Joitakin anoktamiineja on jo aiemmin yhdistetty vesikkeliliikenteeseen (Kunzelmann ym. 2019), joten mitä luultavammin myös ANO7-proteiini osallistuu vesikkelien muodostumiseen tai liikkumiseen soluissa. Kuten monet muutkin anoktamiinit, myös ANO7:n on näytetty osallistuvan syövän eri vaiheisiin ja osallistuvan fosfolipidien liikkumiseen solukalvon puolelta toiselle samalla taivuttaen solukalvoa. (Suzuki ym. 2013) Vesikkelien muodostuminen ja liikkuminen on mitä luultavammin yhteydessä solukalvon fosfolipidien liikkumiseen. Fosfatidyylikeriini fosfolipidit jakautuvat epätasaisesti solukalvolle siten, että suurin osa kohdistuu soluliman puolelle. Fosfolipidikalvon proteiinien liikkuminen solukalvon puolelta toiselle voi tasoittaa tätä jakoa solukalvon sisä- ja ulkopuolen välillä aiheuttaen solukalvon taipumista ja vesikkelien muodostumista. Lisäksi fosfolipidien liikkuminen saattaa aktivoida solun signalointireittejä. (Bever & Williamson 2016)

Anoktamiini 6 säätelee eksosomien liikettä solukalvolta yhdessä fosfolipidiskramblaasin kanssa. Solukalvon taipumisella ja liikkumisella on tärkeä osa eksosomien muodostumisessa ja erityksessä. Anoktamiinien perheeseen kuuluvilla ANO1- ja ANO6-

proteiineilla on näytetty olevan solujen leviämistä ja etäpesäkkeiden muodostumista edistäviä vaikutuksia. (Whitlock & Hartzell 2017) ANO7-proteiinia on havaittu eturauhasen epiteelisolujen erittämässä solujen ulkoisissa vesikkeleissä, prostasomeissa (Poliakov ym. 2009), mikä voi osaltaan selittää ANO7-proteiinin merkityksen vesikkelien muodostuksessa ja kuljetuksessa. Prostatomit ja AP2B1-proteiinit ovat molemmat klatriinipäällysteisiä. Klatriinit puolestaan osallistuvat solun avustettuun endosytoosiin yhdessä AP2B1-proteiinien kanssa (Collins ym. 2002).

### *4.3. Menetelmien vahvuudet ja heikkoudet*

Tutkimuksessa käytettiin LNCaP-solulinjaa, sillä sen tiedetään olevan yksi harvoista eturauhassyöpäsolulinjoista, jotka ilmentävät luontaisesti havaittavan määrän ANO7-proteiinia. Tämän perusteella voidaan olettaa, että tutkittavat ANO7-proteiinin kanssa mahdollisesti vuorovaikuttavat proteiinit ovat soluissa läsnä. Menetelmissä käytimme ANO7-proteiinin yli-ilmentämistä, sillä LNCaP-solujen luontaisesti tuottamaa ANO7-proteiinia on soluissa hyvin vähän, eikä ANO7-proteiinille ole hyvin toimivaa ja validoitua vasta-ainetta. Vain yhtä solulinjaa ja hetkellistä transfektiota käyttämällä ei voida kuitenkaan saada täysin luotettavaa kuvaa proteiinien vuorovaikutuksesta. Tulokset esittävät ANO7:n kanssa mahdollisesti vuorovaikuttavia proteiineja eturauhassyövässä, mutta eivät anna tietoa kyseisten proteiinien toiminnasta terveeseen eturauhasen soluissa. Koska luontaisesti solussa esiintyvää ANO7-proteiinia vastaan ei ole validoitua vasta-ainetta, joten käytimme vasta-ainetta, joka sitoutui konstruktin C-terminaaliseen hisleimaan tai HA-leimaan. RNA:n keinotekoinen yli-ilmentyminen voi mahdollisesti haitata solujen luontaista käyttäytymistä ja solut saattavat kasautua väärin paikkoihin, jos ilmentymistä esiintyy liikaa. Menetelmämme on kuitenkin useissa tutkimuksissa käytetty ja todettu toimivaksi.

Aikaisemmin tutkimuksessa käytetyssä BioID-menetelmässä, joka johti viiden proteiinin valintaan, tutkittavan proteiinin ei tarvitse sitoutua suoraan vuorovaikutusproteiinin kanssa. Biotiiniligaasi merkitsee kaikki lähellä olevat proteiinit ja tämä on yksi menetelmän heikkouksista. Värjäys todistaa signaalien lähekkäisyyden, mutta tämä ei välttämättä todista proteiinien sitoutumista toisiinsa. Toisaalta tällainen signaalien lähekkäisyys antaa mahdollisuuden tunnistaa heikkoja ja lyhyitäkin vuorovaikutuksia proteiinien välillä. Värjäystulos voi myös antaa vääriä positiivisia signaaleja. Koimmunopresipitaatio on perinteinen tapa tutkia proteiinien välisiä vuorovaikutuksia,

mutta menetelmä ei sovi heikkojen yhteyksien näyttämiseen. Edellä mainitussa menetelmässä vasta-aineella pyydystetään toinen proteiini, tässä tapauksessa ANO7, ja puhdistuksen jälkeen tunnistetaan siihen sitoutuneet proteiinit esimerkiksi Western Blot -menetelmällä. ANO7 on vahvasti vettä hylkivä proteiini, joka on tiukasti kiinni solukalvolla, joten sen liuottaminen hajottaisi solukalvon ja samalla myös todennäköisesti proteiinien väliset vuorovaikutukset.

#### 4.4. *Tulevaisuuden tavoitteet ja tulosten soveltamismahdollisuudet*

Solujen vesikkelien erityksen on yleisesti ottaen todettu lisääntyvän syövässä ja syöpäsoluissa. Vesikkelit toimivat solujen välisinä viestinviejinä ja kertovat erilaisista muutoksista elimistön tilassa. Vesikkelien tiedetään sisältävän samoja molekyylejä kuin sen erittänyt alkuperäinen solu ja vesikkelien koostumuksen tiedetään muuttuvan syövässä. Tämän perusteella vesikkelit voisivat mahdollisesti toimia merkkiaineina syövän diagnosoinnissa ja syövän hoidon tehon seurannassa. (Liu ym. 2016) Vesikkelien tutkiminen voisi helpottaa ja nopeuttaa diagnostiikkaa, mikäli syöpä voitaisiin todeta esimerkiksi veri- ja virtsanäytteestä ilman koepalan ottoa. Tutkimalla syöpäsolujen erittämiä ja solun sisällä liikkuvia vesikkelejä voitaisiin mahdollisesti tulevaisuudessa seurata syövän syntyä ja sen kehittymistä. Lisäksi syöpäsolujen erittämiä vesikkelejä tutkimalla voitaisiin saada tietoa syövästä ja sen mekanismeista. Vesikkelien tutkimus voi tarjota lääketieteelle uusia hoito- ja diagnostiikkamahdollisuuksia.

ANO7-proteiinin esiintymistä voitaisiin tutkia eturauhassyöpäsolujen erittämistä vesikkeleistä ja tätä kautta tarkentaa mahdollisia diagnostisia sovelluksia eturauhassyövässä. Esimerkiksi LNCaP-solujen solumediumista voisi eristää vesikkeleitä ja tunnistaa näistä eristetyistä vesikkeleistä ANO7-proteiinia. Vesikkelejä erittyy eturauhasesta myös siemennesteeseen ja virtsaan, josta voisi vastaavalla menetelmällä tutkia ANO7-proteiinin olemassaoloa. Vesikkeliliikenne liittyy yleisesti useisiin eri syöpiin ja niiden etenemiseen, kuten myös eturauhassyöpään. Vesikkeliliikenne osallistuu mitä todennäköisemmin myös ANO7:n toimintaan, joten vesikkelien tutkiminen voisi antaa uutta tietoa eturauhassyövän mekanismeista. ANO7-geenin yliekspression ja hiljentämisen vaikutusta voitaisiin tutkia myös vesikkelien muodostumiseen ja määrään. BioID-konstrukteihin voitaisiin lisätä aggressiiviselle taudille altistavat mutaatiot ja tutkia näissä proteiinien välisiä vuorovaikutussuhteita.

Aikaisempien tutkimusten perusteella ANO7 voisi mahdollisesti toimia uutena biomarkerina eturauhassyövälle ja auttaa erityisesti aggressiivisen eturauhassyövän havaitsemisessa (Kaikkonen ym. 2018). Kuitenkin ennen kuin tällaista testausta voidaan ottaa kliniseen käyttöön, on selvitettävä, miten ANO7 toimii ja miten geenin mutaatiot voivat vaikuttaa proteiinien toimintaan ja siihen että syöpä muuttuu helpommin aggressiiviseksi. ANO7:n kanssa vuorovaikuttavien proteiinien tunnistaminen saattaisi olla hyödyksi eturauhassyövän mekanismien ymmärtämisessä. Lisäksi lääkkeiden kohdentaminen tietyille potilasryhmille eli yksilöity lääkehoito olisi merkittävää edistysaskel terveydenhuollolle ja siksi tärkeä tavoite tulevaisuudelle. Eturauhassyövän monimuotoisuus ja sattuman merkitys syövän synnyssä asettaa kuitenkin haasteita syövän tunnistamiselle, ennaltaehkäisylle ja hoidolle. Ennustavien geneettisten biomarkkerien tunnistaminen eturauhassyövässä olisi hyvin tärkeää, jotta voitaisiin kehittää tehokkaita seulontoja ja välttyttäisiin yli-diagnoosoinnilta ja -hoidolta.

## KIITOKSET

Haluan esittää kiitokseni ohjaajalleni professori Johanna Schleutkerille asiantuntevuudesta, hyvästä ohjauksesta ja tästä upeasta mahdollisuudesta olla mukana tärkeässä tutkimuksessa. Kiitos Biologian laitoksen ohjaajalleni professori Harri Savilahdelle kommentteista ja avusta kirjoitustyössä. Iso kiitos myös lähiohjaajalleni tohtoritutkija Elina Kaikkoselle arvokkaasta avusta, opastuksesta ja tuesta, jota sain häneltä pitkin matkaa. Kiitokset myös koko työryhmälle. Haluan kiittää myös perhettäni saamastani tuesta ja kannustuksesta.

## KIRJALLISUUS

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

Adashek JJ, Jain RK, and Zhang J. 2019. Clinical Development of PARP Inhibitors in Treating Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cells* 8, 860.

Alexandra J. Stewart, Howard I. Scher, Ming-Hui Chen, David G. McLeod, Peter R. Carroll, Judd W. Moul, and Anthony V. D'Amico. 2005. Prostate-Specific Antigen Nadir and Cancer-Specific Mortality Following Hormonal Therapy for Prostate-Specific Antigen Failure. *Journal of Clinical Oncology* 23, 6556-6560.

Bai M, Gad H, Turacchio G, Cocucci E, Yang J, Li J, Beznoussenko GV, Nie Z, Luo R, Fu L, *et al.* 2011. ARFGAP1 promotes endocytosis regulated by AP-2. *Nature Cell Biology* 13, 559-567.

Bera TK, Das S, Maeda H, Beers R, Wolfgang CD, Kumar V, Hahn Y, Lee B, and Pastan I. 2004. NGEP, a gene encoding a membrane protein detected only in prostate cancer and normal prostate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3059-3064.

Bever EM & Williamson PL. 2016. Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiol. Rev.* 96, 605-645.

Broquet AH, Thomas G, Masliah J, Trugnan G, and Bachelet M. 2003. Expression of the Molecular Chaperone Hsp70 in Detergent-resistant Microdomains Correlates with Its Membrane Delivery and Release. *J. Biol. Chem.* 278, 21601-21606.

Camussi G, Deregibus M, Bruno S, Grange C, Fonsato V, and Tetta C. 2011. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *American Journal of Cancer Research* 1, 98-110.

Cappellari M, Bielli P, Paronetto MP, Ciccocanti F, Fimia GM, Saarikettu J, Silvennoinen O, and Sette C. 2014. The transcriptional co-activator SND1 is a novel regulator of alternative splicing in prostate cancer cells. *Oncogene* 33, 3794-3802.

Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, and Walsh PC. 1993. Hereditary Prostate Cancer: Epidemiologic and Clinical Features. *The Journal of Urology* 150, 797-802.

Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AMP, Tops BBJ, Silva JM, Myers MM, Hannon GJ, and Plasterk RHA. 2003. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425, 411-414.

Cereda V, Poole DJ, Palena C, Das S, Bera TK, Remondo C, Gulley JL, Arlen PM, Yokokawa J, Pastan I, Schlom J, and Tsang KY. 2010. New gene expressed in prostate: a potential target for T cell-mediated prostate cancer immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 59, 63-71.

- Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, and Owen DJ. 2002. Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex. *Cell* 109, 523-535.
- Cropp CD, Simpson CL, Wahlfors T, Ha N, George A, Jones MS, Harper U, Ponciano-Jackson D, Green TA, Tammela TLJ, Bailey-Wilson J, and Schleutker J. 2011. Genome-wide linkage scan for prostate cancer susceptibility in Finland: Evidence for a novel locus on 2q37.3 and confirmation of signal on 17q21-q22. *International Journal of Cancer* 129, 2400-2407.
- Das S, Hahn Y, Nagata S, Willingham MC, Bera TK, Lee B, and Pastan I. 2007. NGEP, a Prostate-Specific Plasma Membrane Protein that Promotes the Association of LNCaP Cells. *Cancer Research* 67, 1594-1601.
- Duran C, Qu Z, Osunkoya AO, Cui Y, and Hartzell HC. 2012. ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 [Cl<sub>2</sub>sup.-] channel family are intracellular proteins. *The American Journal of Physiology* 302, C482.
- Eugster A, Frigerio G, Dale M, and Duden R. 2000. COP I domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *Embo J* 19, 3905-3917.
- Evans CG, Chang L, and Gestwicki JE. 2010. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 4585-4602.
- Futatsumori M, Kasai K, Takatsu H, Shin HW, and Nakayama K. 2000. Identification and characterization of novel isoforms of COP I subunits. *J. Biochem.* 128, 793-801.
- Galindo BE & Vacquier VD. 2005. Phylogeny of the TMEM16 protein family: Some members are overexpressed in cancer. *International Journal of Molecular Medicine* 16, 919-924.
- Gallusser A & Kirchhausen T. 1993. The beta 1 and beta 2 subunits of the AP complexes are the clathrin coat assembly components. *Embo J.* 12, 5237-5244.
- Grindedal EM, Møller P, Eeles R, Stormorken AT, Bowitz-Lothe IM, Landrø SM, Clark N, Kvåle R, Shanley S, and Mæhle L. 2009. Germ-Line Mutations in Mismatch Repair Genes Associated with Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 2460-2467.
- Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L, and Lopez BS. 2004. Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells. *Molecular Cell* 14, 611-623.
- Haga H, Yan IK, Takahashi K, Wood J, Zubair A, and Patel T. 2015. Tumour cell-derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth. *J. Extracell Vesicles* 4, 24900.
- Harris DA, Patel SH, Gucek M, Hendrix A, Westbroek W, and Taraska JW. 2015. Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement. *PLoS One* 10, e0117495.

- Harter C, Pavel J, Coccia F, Draken E, Wegehangel S, Tschochner H, and Wieland F. 1996. Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Pnas* 93, 1902-1906.
- Hartl FU, Bracher A, and Hayer-Hartl M. 2011. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-332.
- Hjelmborg JB, Scheike T, Holst K, Skytthe A, Penney KL, Graff RE, Pukkala E, Christensen K, Adami HO, Holm NV, *et al.* 2014. The heritability of prostate cancer in the Nordic Twin Study of Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 2303-2310.
- Hoffman GR, Rahl PB, Collins RN, and Cerione RA. 2003. Conserved structural motifs in intracellular trafficking pathways: structure of the gammaCOP appendage domain. *Mol. Cell* 12, 615-625.
- Kaikkonen E, Ettala O, Nikulainen I, Taimen P, Lehtinen I, Boström Pj, Kellokumpu-Lehtinen P, And Schleutker J. 2019. ano7 rs77559646 is associated with first-line docetaxel treatment response in metastatic castration-resistant prostate cancer. *anticancer research* 39, 5353-5359.
- Kaikkonen E, Rantapero T, Zhang Q, Taimen P, Laitinen V, Kallajoki M, Jambulingam D, Ettala O, Knaapila J, Boström PJ, *et al.* 2018. ANO7 is associated with aggressive prostate cancer. *Int. J. Cancer*
- Kaikkonen E, Takala A, Pursiheimo J, Wahlström G, and Schleutker J. 2020. The interactome of the prostate-specific protein Anoctamin 7. *Cancer Biomarkers Preprint*, 1-10.
- Kannan N & Eaves C. 2014. Tipping the Balance: MTDH-SND1 Curbs Oncogene-Induced Apoptosis and Promotes Tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 15, 118-120.
- Khalouei S, Chow AM, and Brown IR. 2014. Localization of heat shock protein HSPA6 (HSP70B) to sites of transcription in cultured differentiated human neuronal cells following thermal stress. *Journal of Neurochemistry* 131, 743-754.
- Kiang JG & Tsokos GC. 1998. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. *Pharmacology and Therapeutics* 80, 183-201.
- Kiessling A, Weigle B, Fuessel S, Ebner R, Meye A, Rieger MA, Schmitz M, Temme A, Bachmann M, Wirth MP, and Rieber EP. 2005. D-TMPP: a novel androgen-regulated gene preferentially expressed in prostate and prostate cancer that is the first characterized member of an eukaryotic gene family. *Prostate* 64, 387-400.
- Kunzelmann K, Ousingsawat J, Benedetto R, Cabrita I, and Schreiber R. 2019. Contribution of Anoctamins to Cell Survival and Cell Death. *Cancers* 11, 382.
- Laskowska E, Kuczyńska-Wiśnik D, and Lipińska B. 2019. Proteomic analysis of protein homeostasis and aggregation. *Journal of Proteomics* 198, 98-112.

Lau AW & Chou MM. 2008. The adaptor complex AP-2 regulates post-endocytic trafficking through the non-clathrin Arf6-dependent endocytic pathway. *Journal of Cell Science* 121, 4008-4017.

Lázaro-Ibáñez E, Lunavat TR, Jang SC, Escobedo-Lucea C, Oliver-De La Cruz J, Siljander P, Lötval J, and Yliperttula M. 2017. Distinct prostate cancer-related mRNA cargo in extracellular vesicle subsets from prostate cell lines. *BMC Cancer* 17, 92.

Lázaro-Ibáñez E, Neuvonen M, Takatalo M, Thanigai Arasu U, Capasso C, Cerullo V, Rhim JS, Rilla K, Yliperttula M, and Siljander PR-. 2017. Metastatic state of parent cells influences the uptake and functionality of prostate cancer cell-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* 6, 1354645-12.

Lee SY, Hsu VW, and Yang J. 2009. The evolving understanding of COPI vesicle formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 360-364.

Lee Y, Bae Y, Park N, Park J, Yoo JC, Cho C, Ryoo K, and Hwang EM. 2016. Surface expression of the Anoctamin-1 (ANO1) channel is suppressed by protein-protein interactions with  $\beta$ -COP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 475, 216-222.

Lindoso RS, Collino F, and Camussi G. 2015. Extracellular vesicles derived from renal cancer stem cells induce a pro-tumorigenic phenotype in mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* 6, 7959-7969.

Liu C, Hsieh C, Shen C, Lin C, Shigemura K, and Sung S. 2016. Exosomes from the tumor microenvironment as reciprocal regulators that enhance prostate cancer progression. *International Journal of Urology* 23, 734-744.

MacInnis RJ, Antoniou AC, Eeles RA, Severi G, Guy M, McGuffog L, Hall AL, O'Brien LT, Wilkinson RA, Dearnaley DP, *et al.* 2010. Prostate cancer segregation analyses using 4390 families from UK and Australian population-based studies. *Genetic Epidemiology* 34, 42-50.

Mateo Joaquin, Boysen Gunther, Barbieri Christopher E., Bryant Helen E., Castro Elena, Nelson Pete S., Olmos David, Pritchard Colin C., Rubin Mark A., de Bono Johann S. 2016. DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. *European Urology* 71, 417-425.

Mayer M & Bukau B. 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 62, 670-684.

Mi Y, Sun F, Sun C, Wei B, Guo Y, Hu Q, Ding W, Zhu L, and Xia G. 2018. Coatomer subunit beta 2 (COPB2), identified by label-free quantitative proteomics, regulates cell proliferation and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495, 473-480.

Mi Y, Yu M, Zhang L, Sun C, Wei B, Ding W, Zhu Y, Tang J, Xia G, and Zhu L. 2016. COPB2 Is Upregulated in Prostate Cancer and Regulates PC-3 Cell Proliferation, Cell Cycle, and Apoptosis. *Archives of Medical Research* 47, 411-418.

- Miki J, Hayashi N, Egawa S, Kuruma H, Kimura T, Kamata Y, Takahashi H, Sasaki H, Igarashi K, and Miki K. 2009. Staphylococcal Nuclease Domain-Containing Protein 1 as a Potential Tissue Marker for Prostate Cancer. *American Journal of Pathology*, The 174, 2044-2050.
- Mohsenzadegan M, Madjd Z, Asgari M, Abolhasani M, Shekarabi M, Taeb J, and Shariftabrizi A. 2013. Reduced expression of NGEF is associated with high-grade prostate cancers: a tissue microarray analysis. *Cancer Immunol Immunother* 62, 1609-1618.
- Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, Czene K, Havelick DJ, Scheike T, Graff RE, Holst K, Möller S, Unger RH, *et al.* 2016. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *Jama* 315, 68-76.
- Muller C, Paupert J, Salles B, Monferran S, and Dauvillier S. 2004. The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *The EMBO Journal* 23, 3758-3768.
- Nakatsu F & Ohno H. 2003. Adaptor Protein Complexes as the Key Regulators of Protein Sorting in the Post-Golgi Network. *Cell Structure and Function* 28, 419-429.
- Owen DJ, Collins BM, and Evans PR. 2004. ADAPTORS FOR CLATHRIN COATS: Structure and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 153-191.
- Pignatelli J, Jones MC, LaLonde DP, and Turner CE. 2012. Beta2-Adaptin Binds Actopaxin and Regulates Cell Spreading, Migration and Matrix Degradation. *PloS One* 7, e46228.
- Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, and Mobley JA. 2009. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate* 69, 159-167.
- Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H, Garofalo A, Gulati R, Carreira S, Eeles R, *et al.* 2016. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* 375, 443-453.
- Rangel R, Guzman-Rojas L, Kodama T, Kodama M, Newberg JY, Copeland NG, and Jenkins NA. 2017. Identification of New Tumor Suppressor Genes in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 77, 4089-4101.
- Robinson D, Van Allen EM, Wu Y, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera J, Montgomery B, Taplin M, Pritchard CC, Attard G, *et al.* 2015. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 161, 1215-1228.
- Schledzewski K, Brinkmann H, and Mendel RR. 1999. Phylogenetic analysis of components of the eukaryotic vesicle transport system reveals a common origin of adaptor protein complexes 1, 2, and 3 and the F subcomplex of the coatomer COPI. *J. Mol. Evol.* 48, 770-778.
- Schulte-Uentrop L, El-Awady RA, Schliecker L, Willers H, and Dahm-Daphi J. 2008. Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease-

and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 36, 2561-2569.

Schumacher FR, Berndt SI, Siddiq A, Jacobs KB, Wang Z, Lindstrom S, Stevens VL, Chen C, Mondul AM, Travis RC, *et al.* 2011. Genome-wide association study identifies new prostate cancer susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 20, 3867-3875.

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, and Walsh PC. 1990. Family history and the risk of prostate cancer. *The Prostate* 17, 337-347.

Suzuki J, Fujii T, Imao T, Ishihara K, Kuba H, and Nagata S. 2013. Calcium-dependent Phospholipid Scramblase Activity of TMEM16 Protein Family Members. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 13305-13316.

Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, and Jeggo PA. 1994. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 265, 1442-1445.

Terada N, Akamatsu S, Kobayashi T, Inoue T, Ogawa O, and Antonarakis ES. 2017. Prognostic and predictive biomarkers in prostate cancer: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 9, 565-573.

Traub LM. 1997. Clathrin-associated adaptor proteins — putting it all together. *Trends in Cell Biology* 7, 43-46.

Watson PJ, Frigerio G, Collins BM, Duden R, and Owen DJ. 2004. Gamma-COP appendage domain - structure and function. *Traffic* 5, 79-88.

Whitlock JM & Hartzell HC. 2017. Anoctamins TMEM16 Proteins: Chloride Channels Flirting with Lipids and Extracellular Vesicles. *Annual Review of Physiology* 79, 119-143.

X Tong, R Drapkin, R Yalamanchili, G Mosialos, and E Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Molecular and Cellular Biology* 15, 4735-4744.

Xu J, Lange EM, Lu L, Zheng SL, Wang Z, Thibodeau SN, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Camp NJ, Johnson AM, *et al.* 2013. HOXB13 is a susceptibility gene for prostate cancer: results from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG). *Hum. Genet.* 132, 5-14.

YANG L, WU X, WANG D, LUO C, and CHEN L. 2013. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Molecular Medicine Reports* 8, 1272-1278.

Eturauhassyöpä, Suomalainen Lääkäriseura Duodecim ja Suomen Urologiyhdistys ry,  
Käypä hoito -suositus 27.05.2014

<https://www.kaypahoito.fi/hoi11060>

Luettu 23.5.2019

Saarelma Osmo Eturauhassyöpä, 7.2.2019, Duodecim

[https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=dlk00210](https://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00210)

Luettu 13.5.2019

Syövän ehkäisy, varhaisen toteamisen ja kuntoutumisen tuen kehittäminen vuosina 2014–2025, THL

[http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/116179/URN\\_ISBN\\_978-952-302-185-3.pdf?sequence=1](http://www.julkari.fi/bitstream/handle/10024/116179/URN_ISBN_978-952-302-185-3.pdf?sequence=1)

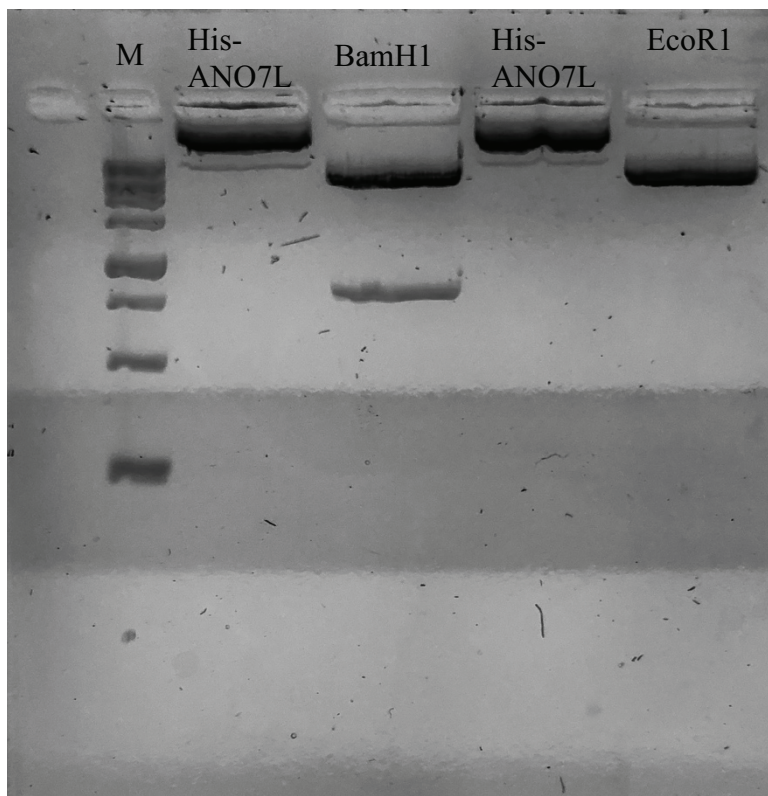
Luettu 20.5.2019

## LIITTEET

### Liite 1

Taulukko 2. Eri proteiinien vasta-ainevärykset sekä transfektoiduille ANO7:lle että kontrolleille

	His-ANO7	BioID-ANO7	BioID-HA	Ei transfektoidut
1. AP2B1	1.	1.	1.	1.
2. COPG2	2.	2.	2.	2.
3. Hsp70 eli HSPA1A	3.	3.	3.	3.
4. Ku80 eli XRCC5	4.	4.	4.	4.
5. SND1	5.	5.	5.	5.
6. pelkkä sekundääri vasta-aine	6.	6.	6.	6.



Kuva 18. His-ANO7L midiprepistä tehty testidigestio, jonka avulla varmistettiin, että bakteereista eristetyissä plasmideissa oli oikeanlainen insertti. Agarosegeeli on 1% ja molekyylipainomarkkeri 1 kb (M)

Liite 2

Vaihe	Ainesosa	12- kuoppalevy
Sekota Lipofektamiini 3000 reagenssi Opti-MEM mediumiin	Opti-MEM	50 $\mu$ l
	Lipofectamine 3000	3 $\mu$ l
Valmista DNA master mix sekottamalla DNA Opti-MEM mediumiin ja lisäämällä P3000 reagenssi $\rightarrow$ sekoita hyvin	Opti-MEM	50 $\mu$ l
	DNA	1 $\mu$ g
	P3000 (2 $\mu$ l/ $\mu$ g DNA)	2 $\mu$ l
Lisää sekoitettu DNA jokaiseen Lipofektamiini 3000 reagenssia sisältävään seokseen (1:1)	Sekoitettu DNA ja P3000 reagenssi	50 $\mu$ l
	Sekoita Lipofektamiini 3000	50 $\mu$ l
Inkuboi 10-15 minuuttia		
Lisää DNA-lipidikompleksi soluille		

His-ANO7 HA-ANO7 HA-tyhjä pcDNA3.1

