CBP-GEENIN GENEETTISET MUUTOKSET ETURAUHASSYÖVÄSSÄ

Hanna Suikki
Syventävien opintojen kirjallinen työ
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Eturauhassyövän molekyylibiologian tutkimusryhmä
Elokuu 2010

Tampereen yliopisto
Lääketieteen laitos
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Eturauhassyövän molekyylibiologian tutkimusryhmä

SUIKKI HANNA: *CBP*-GEENIN GENEETTISET MUUTOKSET ETURAUHASSYÖVÄSSÄ
Kirjallinen työ, 19 s.
Ohjaaja: Professori Tapio Visakorpi
Tammikuu 2010

Androgeenireseptori, koreguloija, hormoneista riippumaton

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpä teollisuusmaissa. Sen synnyn ja etenemisen molekylaarisia mekanismeja on tutkittu paljon, mutta selittävää syytä ei ole vielä löydetty. Tässä työssä tutkittiin androgeenireseptorin koaktivoijan, CBP:n, geneettisiä muutoksia eturauhassyövässä. Androgeenireseptorin koaktivoijat edistävät reseptorin transaktivaatiokykyä eri tavoin.

Geenialueen mutaatioita tutkittiin viidestä solulinjasta ja 32 vieraskudossiirteestä käyttämällä denaturoivaa korkeapaineista nestekromatografiaa (DHPLC) ja sekvensointia. Geenikopioluvun muutoksia tutkittiin fluoresoivalla *in situ* -hybridisaatiolla (FISH) samoista solulinjoista ja 12 vieraskudossiirteestä. CBP-geenialueen mutaatioita ei todettu yhdessäkään tutkituista näytteistä. Vieraskudossiirteissä ei ollut myöskään geenikopioluvun muutoksia. Kolmessa solulinjassa todettiin geenialueen kopiolukumäärän muutos: DU145 soluissa oli kromosomi 16:n, jossa *CBP* geeni sijaitsee, trisomia; LNCaP- sekä LAPC4-solulinjoissa oli tetrasomia.

Näiden tulosten perusteella vaikuttaisi siltä, että *CBP* ei ole geneettisesti muuttunut eturauhassyövässä. Lisätutkimukset ovat kuitenkin tarpeen, koska solutasolla on havaittu, että *CBP*:n yliekspressio vaikuttaa syöpäsolujen vasteeseen eri hormonihoitoihin.

SISÄLLYS

LYHENTEET 4
1. JOHDANTO 5
2. AINEISTO JA MENETELMÄT 8
    2.1 Aineisto 8
    2.2 Menetelmät 8
        2.2.1 PCR 9
        2.2.2 DHPLC 9
        2.2.3 Sekvensointi 12
        2.2.4 FISH 12
3. TULOKSET 14
    3.1 Mutaatioanalyysi 14
    3.2 FISH 14
4. POHDINTA 15
LÄHTEET 17
LIITTEET

LYHENTEET

AR	androgeenireseptori
CBP	CREB binding protein; CREB:a sitova proteiini
cAMP	cyclic adenosine monophosphate; syklinen adenosiinimonofosfaatti
cDNA	complementary DNA; komplementaarinen DNA
CREB	cAMP response element binding; cAMP:n vaste-elementtiä sitova
DAPI	4.6-diamidine-2-phenylindole; 4.6diamidiini-2-fenyylindoli
DHPLC	denaturing high-pressure liquid chromatography; denaturoiva korkeapaineinen nestekromatografia
DNA	deoxyribonucleic acid; deoksiribonukleiinihappo
dUTP	deoxyuridine triphosphate; deoksiuridiini trifosfaatti
FISH	fluorescence in situ hybridization
HAT	histoniasetyylitransferaasi
HIF	hypoksia-inducible factor; hypoksian indusoima tekijä
mRNA	messenger RNA; lähetti-RNA
PCR	polymerase chain reaction; polymeraasiketjureaktio
Q-RT-PCR	quantitative real time PCR; kvantitatiivinen reaaliaikainen PCR
RNA	ribonucleic acid; ribonukleiinihappo
SID	steroidireseptorien koaktivaattori-1-interaktiodomeeni
SNP	single-nucleotide polymorphism; yhden nukleotidin polymorfia
VEGF	vascular endothelial growth factor; verisuonten endoteelin kasvutekijä

1 JOHDANTO

Eturauhassyöpä on miesten yleisin syöpätauti teollistuneissa maissa (Jemal ym. 2007). Androgeeneillä eli mieshormoneilla on merkittävä osuus eturauhassyövän syntyyn ja etenemiseen. Androgeenireseptori (AR) välittää eturauhasen solussa androgeenivaikutuksen. AR:iin vaikuttavat monet tekijät, jotka voivat joko edistää (koaktivoijat) tai estää (korepressoijat) kohdegeenien aktivaatiota (McKenna ym. 1999). Kokeellisesti on osoitettu, että AR:n yliekspressio muuttaa hormoniriippuvaisen eturauhassyövän hormoneista riippumattomaksi (Porkka & Visakorpi 2004). Täten on mahdollista, että taudin hormonaalisen hoidon aikaisen uusiutumisen mekanismit liittyisivät AR:n signaloinnin uudelleen aktivoitumiseen, johon mahdollisesti erilaiset säätelijät myös vaikuttaisivat.

AR:n aktivaatio on monivaiheinen prosessi, johon tarvitaan sekä koaktivoijia että korepressoreja sopivan mikroympäristön luomiseksi. Näistä koaktivoijat toimivat yhteistyössä reseptorin kanssa muuttamalla niiden transaktivaatio-ominaisuuksia mm. edistämällä kromatiinin muokkausta, preinitiaatiokompleksin syntymistä ja RNA-polymeraasin liikettä. Useita koaktivaattoreita on jo löydetty, näistä tutkituin on p160/SRC-perhe (McKenna ym. 1999).

CBP (CREB binding protein eli cAMP-response element binding eli CREB:a sitova proteiini) on yksi näistä säätelijöistä, joka toimii AR:stä riippuvan transkription koaktivoijana (Aarnisalo ym. 1998). CBP:n toiminta mm. mahdollistaa histoniasetyylitransferaasien (HAT) aktiivisuuden, mikä johtaa transkriptioon (Vo & Goodman 2001).

Ihmisillä CBP säätelee solujen erilaistumista, kasvua ja homeostaasia (Kalkhoven 2004). Sitä ekspressoidaan monissa soluissa, ja se onkin elintärkeä proteiini. *CBP*:n mutaation tiedetään aiheuttavan Rubenstein-Taybi-syndrooman, johon kuuluu älyllinen kehitysvammaisuus, tietyt kasvonpiirteet, lyhytkasvuisuus ja leveät varpaat sekä sormet (Hallam & Boutchouladze 2006). CBP:llä on kriittinen rooli mm. monissa hermoston kehitykseen vaikuttavissa vaiheissa, ja sen

toimimattomuus onkin yhdistetty mm. ALS:ään, Alzheimerin tautiin ja Huntingtonin tautiin (Hallam & Boutchouladze 2006).

CBP-geeni sijaitsee kromosomialueella 16p13.3, jossa on havaittu uudelleenjärjestäytymistä ainakin akuutissa myeliinisessa leukemiassa (Giles ym. 1997). Proteiinissa on monta konservoitunutta aluetta, kuten histoneihin sitoutuva bromo-domeeni, kolme transkriptiotekijöihin sitoutuvaa kysteiini- ja histidiinirikasta aluetta, CREB:a sitova KIX-domeeni, steroidireseptorien koaktivaattori-1-interaktiodomeeni (SID) sekä HAT-domeeni (Vo & Goodman 2001, Kalkhoven ym. 2002, Kalkhoven 2004).

p300 on CBP:n rakennehomologi, ja niillä on monia yhteisiä toimintoja sekä hyvin säilynyt, samankaltainen sekvenssi (Sterner & Berger 2000, Vo & Goodman 2001, Goodman & Smolik 2000). p300, kuten myös CBP, on isokokoinen asetyylitransferaasi, joka nimensä mukaan säätelee ja asetyloi monia transkriptioon liittyviä proteiineja (Sterner & Berger 2000). Se on interaktiossa monien promoottoreihin sitoutuvien transkriptiotekijöiden kanssa, joista osa, esimerkiksi c-Jun, c-Fos ja c-Myb, on liitetty syövän etenemiseen (Sterner & Berger 2000).

CBP:n aktiivisuus asetyloi histoneja ja muita transkriptiotekijöitä, kuten tumareseptoreita, joihin AR:kin kuuluu. Se toimii yhdessä monien muiden histoniasetyylitransferaasien kanssa (Vo & Goodman 2001, Goodman & Smolik 2000, Kalkhoven 2004, Sadoul ym. 2008). Esimerkiksi hypoksiassa CBP stabiloi transkriptiokompleksia, johon kuuluvat mm. HIF-1α, STAT3 ja Ref/APE. Tämä saa aikaan VEGF:n (vascular endothelial growth factor) aktiivisuuden nousun, joka on kuvattu sekä haima- että eturauhassyöpäsoluissa (Kalkhoven 2004, Gray ym. 2005). Muissakin syövissä CBP toimii aktiivisesti; se kykenee mm. sitoutumaan p53:n kanssa, mikä inhiboi tätä kasvurajoitegeeniä, jonka on havaittu vaikuttavan useiden kasvainten kasvuun (van Orden ym. 1999).

CBP sitoutuu AR:n LXXLL-motiiviin matalalla affiniteetilla ja lisää sen aktiivisuutta *in vivo* ilman androgeenivaikutusta (Heery ym. 2001). Eniten CBP:tä löytyy eturauhassolujen tumasta, mutta immunohistokemiallisissa tutkimuksissa myös sytoplasma värjäytyy lievästi (Comuzzi ym. 2003).

CBP ilmentyy eri vaiheissa eturauhassyövän kehitystä. Sen ilmenemisessä ei ole kuitenkaan havaittu muutoksia, jotka korreloisivat syövän synnyn ja etenemisen kanssa (Comuzzi ym. 2003, Linja ym. 2004). CBP:tä löytyy LNCaP-, PC-3- ja DU145-soluista, jotka kaikki on eristetty eturauhassyövän metastaaseista. Sitä on niin ikään hyvänlaatuisessa eturauhasepiteelissä, eturauhasen hyvänlaatuisissa kasvaimissa, sitä ympäröivässä stroomassa ja lähialueen syöpäsoluissa. (Comuzzi ym. 2003).

Eturauhassyöpää hoidetaan poistamalla androgeenit verenkierrosta joko kirurgisella tai hormonaalisella hoidolla. Tämän on havaittu lisäävän CBP-proteiinin määrää eturauhaskasvaimissa, ja on myös havaittu, että 80 % kasvainten tumista on positiivisia CBP-proteiinin suhteen, kun eturauhassyöpä on edennyt hoitojen jälkeen (Comuzzi ym. 2003, Culig ym. 2004). Yliekspressoimalla CBP:tä LNCaP-soluissa on havaittu, että nämä solut muuttuvat tavallista aggressiivisemmiksi hydroksiflutamidihoidolla AR:n aktiivisuuden lisäännyttyä. Sen sijaan bicalutamidihoito ei vaikuttanut AR:n aktiivisuuteen CBP:tä yliekspressoivissa soluissa (Comuzzi ym. 2003).

Toistaiseksi ei ole julkaistua tietoa siitä, onko *CBP* geneettisesti muuntunut eturauhassyövässä. Tämän vuoksi tässä työssä selvitettiin *CBP*:n sekvenssi- ja kopiolukumäärän muutoksia eturauhassyövän eri vaiheissa.

2 Aineisto ja menetelmät

2.1 Aineisto

Näytemateriaali koostui eturauhassyöpämalleista (solulinjat ja vieraskudossiirteet). Solulinjoista tutkittiin seuraavat: LNCaP, PC-3, DU145, 22Rv1 (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, USA), sekä LAPC4 (saatu Prof. C. Sawyersilta, UCLA, Los Angeles, CA, USA). Soluja kasvatettiin valmistajan suosittelemalla tavalla.

Solujen lisäksi käytössä oli 32 eturauhassyövän vieraskudossiirrettä: LuCaP 23.1, 23.8, 23.12, 35, 35v, 41, 49, 58, 69, 70, 73, 77, 78, 81, 86.2, 92.1, 93, 96, 105 ja 115 Prof. R. Vessellalta (Univ. Washington, Seattle, WA, USA) ja PC-vieraskudossiirteet (PC82, 133, 135, 295, 310, 324, 329, 339, 346, 346I, 346B, 346BI ja 374) Prof. W. van Weerdeniltä (Erasmus MC, Rotterdam, Alankomaat). Vieraskudossiirteet ovat kasvaimista tai niiden metastaaseista saatuja kudosnäytteitä, joita on kasvatettu kateenkorvattomissa hiirissä.

2.2 Menetelmät

Solulinjoista ja vieraskudossiirteistä eristettiin totaali-RNA TRIZol®-reagenssilla (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) ja Qiagen RNeasy MiniKitiä (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA) käyttäen valmistajien ohjeen mukaan. RNA:sta käännettiin cDNA:ta Superscript II Reverse transcriptaasilla ja oligo d(T)

primerilla (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) valmistajan ohjeen mukaan.

2.2.1 PCR (polymerase chain reaction)

Mutaatioanalyysia varten koko mRNA:n koodaava alue transkription aloituskohdasta loppuun monistettiin 22 fragmenttina polymeraasi ketjureaktiomenetelmällä (PCR, polymerese chain reaction) cDNA:sta Phusion™ High-Fidelity DNA polymeraasientsyymillä (Finnzymes, Espoo, Suomi) valmistajan ohjeen mukaan solulinjoista ja vieraskudossiirrännäisistä. Alukesekvenssit ja PCR-reaktioissa käytetyt alukkeiden kiinnittymislämpötilat näkyvät taulukossa 1. PCR-kierto toteutettiin seuraavasti: alkudenaturaatio 98 °C 30 s, ja sitä seurasi 35 kierrosta seuraavasti: 98 °C 7 s, 57–59 °C 20 s ja 72 °C 25 s. Loppupidennysvaihe oli vielä 5 min 72 °C:ssa.

Alueet, jotka olivat GC-rikkaita monistettiin käyttämällä Advantage®-GC Genomic GC-pakkausta sekä Advantage®-GC Genomic Polymerase Mixiä (Clontech Laboratories, Inc, Mountain view, CA, USA) valmistajan ohjeen mukaan. Nämä näytteet menivät suoraan sekvensoitavaksi (taulukko 1).

2.2.2 DHPLC (denaturing high-pressure liquid chromatography)

Geneettisiä muutoksia tutkittiin käyttämällä denaturoivaa korkeapaineista nestekromatografiaa (DHPLC). DHPLC-määritys perustuu heterodupleksisen DNA:n (villityypin DNA dupleksina mutatoituneen DNA:n kanssa) erilaiseen läpikulkuaikaan osittain denaturoivissa olosuhteissa verrattuna vastaavaan homodupleksiin (Xiao & Oefner 2001). Löytyneet poikkeavuudet tarkistettiin sekvensoimalla, ja menetelmää myös validoitiin satunnaisilla sekvensoinneilla.

Mutaatioanalyysi aloitettiin sekoittamalla PCR-tuotteet kontrolli-DNA:n kanssa ja denaturoimalla niitä 95 °C:ssa 5 minuuttia. Tämän jälkeen näytteitä viilennettiin aste minuutissa 65 °C:een, jotta kontrolli- ja näyte-DNA:t yhdistyisivät keskenään. DHPLC toteutettiin Agilent 1100 LC HPLC -laitteella (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), jossa oli Varian CP28353 Helix DNA -pylväs (50

x 3,0 mm) (Varian, Inc. Palo Alto, CA). Eri fragmenttien sulamislämpötila ja gradientti suunniteltiin Stanford Melt -algoritmin avulla (http://insertion.stanford.edu/melt.html), ja tarkistettiin empiirisillä kokeilla (taulukko 1). Näytteet, joiden muoto, keräysaika tai molemmat poikkesi normaalista, puhdistettiin käyttäen Qiagen QIAquick PCR-puhdistuspakkausta (Qiagen Inc. Valencia, CA) tai Montage suodatusjärjestelmää (Millipore Corporation, Bedford, MA) valmistajien ohjeen mukaisesti.

TAULUKKO 1. PCR- ja DHPLC-ajojen olosuhteet.

	Alukesekvenssit		Alukkeen kiinnittymislämpötila (°C)	DHPLC-ajon lämpötila (°C)		DHPLC-gradientti	
FR 1	gaatcaacagccgccatctt	gctgagtttggctcttttgg	59	sekvensointi			
FR 2	atggctgagaacttgctgga	actgaggctggccatgttag	57	62	63	57-59	56-68
FR 3	ctcaagggcagccgaaca	ggctgtccaaatggacttgt	57	62	63	54-65	53-64
FR 4	cgcaagtcatgaatggatct	aaggtgggcaaactgttgac	57	62	63	54-65	53-64
FR 5	caatgggagccactggag	ggtttgttggtttcgcttgt	57	61	62	56-68	56-68
FR 6	cattggaagaactgcacacg	atcaggtgttgggaagatgg	57	61	62	57-69	56-68
FR 7	gccatctagtgcataaactcgt	tggttctgtggcagaaactg	57	63	64	53-64	53-64
FR 8	ggtgcacacaccaacaacat	gactgaggggtagccacaga	57	63	64	53-64	53-64
FR 9	cagcctcaaaccccagttc	tgccggaaaggtaatgactc	59	62	63	53-64	53-64
FR 10	catgccaaccctagaagcac	gaaaggttcggggtctaagg	57	60	61	56-68	56-68
FR 11	ccagacgacaatttcaaagga	gtggccggaagaaatgaata	57	61	62	57-69	56-68
FR 12	ggcgtgtgtacatttcttatctgg	cagcttctgggacaggtcat	57	60	61	58-70	58-70
FR 13	caacaagaagaagcccagca	gcttcatcttctggcaggat	57	63	64	57-69	57-69
FR 14	caacgagtgcaagcacca	cggtgctgaggtaggagaag	59	63	64	57-69	57-69
FR 15	cttctgcctcaacatcaaacac	cacctggctggtaggcttc	57	sekvensointi			
FR 16	atggccaccatgaacacc	agagcgctgggtgagatg	59	sekvensointi			
FR 17	ggtgaacatcaacaacagcat	catggcattcaggttctgc	57	64	65	57-69	57-69
FR 18	caagtacgtggccaatcag	tctgctgcttcatctgctgt	57	64	65	53-64	53-64
FR 19	agacagcacccccaacatc	tgaaagggaaaaggtgatgc	59	64	65	57-69	57-69
FR 20	ggacacgctagagaagtttgtg	gccggagtcaattcctatca	59	sekvensointi			
FR 21	taatgtatcccgataactttgtgatg	tccaaatacaatgttgaaaacagc	59	58	59	54-66	53-65
FR 22	tcatgcaagcgctctaattc	caggggatcttaaagaacagaa	57	54	55	55-67	55-67

2.2.3 Sekvensointi

Kaikki näytteet, joissa ilmeni ylimääräinen tai epänormaali piikki DHPLC-ajossa, sekvensoitiin. Suoraa sekvensointia käytettiin myös fragmenteista, joiden monistaminen normaalilla PCR:llä oli hankalaa, useimmiten alueen korkean GC-pitoisuuden vuoksi. Sekvensointi suoritettiin käyttämällä BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing -pakkausta (Applied Biosystems, Foster City, CA) ja ABI PRISM ® 3100 sekvensaattoria (Applied Bisosystems) valmistajan ohjeen mukaisesti.

2.2.4 FISH (fluoresenssi *in situ* hybridization)

Geenikopiolukuanalyysissä käytettiin koettimena lokusspesifistä ihmisen BAC-kloonia *CBP*:lle, joka leimattiin nick translaatiolla digoxigenin-dUTP:llä (Roche Diagnostics). Referenssinä käytettiin kromosomin 16 sentromeerikoetinta, joka vastaavasti leimattiin FITC-dUTP:llä eli fluorescein-12-dUTP:llä (NEN, Boston MA). Kaksoisvärihybridisaatio suoritettiin antamalla molempien koettimien hybridisoitua näytteeseen samanaikaisesti.

Solulinjoista valmistettiin FISH-analyysiä varten interfaasi- ja metafaasilaseja käsittelemällä soluja colcemidilla (0,05 µg/ml) 2 - 4 tunnin ajan ja kerämällä soluja joko käsittelyn jälkeen (metafaasilasit) tai kun solut olivat saavuttaneet konfluenssin (interfaasilasit).

Solulinja-metafaasi- ja interfaasilaseille suoritettiin hybridisaatio denaturoimalla lasit 2 minuutin ajan 72 °C:ssa denaturaatioliuoksessa (LIITE 1), jonka jälkeen lasit kuivatettiin nousevassa etanolisarjassa (50 %, 75 % ja 100 % etanoli, 2 minuuttia jokaisessa) ja ilmakuivattiin. Hybridisaatioliuos valmistettiin seuraavasti:

1 µl Cot-1 DNA (1ng/µl)
0.5 µl FITC-leimattua sentromeerikoetinta
1.5 µl digoksigeniini-leimattua *CBP*-koetinta
7 µl Master mixiä (LIITE 1)

Hybridisaatioliuos denaturoitiin, lisättiin laseille ja annettiin hybridisoitua kosteassa kammiossa yön yli 37 °C:ssa.

FISH-analyysia varten vieraskudossiirteistä tehtiin 5 µm paksuja jääleikkeitä. Vieraskudossiirrännäislasit fiksoitiin Carnoy-menetelmällä ennen lasien kuivatusta. Carnoy-liuoksessa on 1:3 metanolia ja etikkahappoa, jossa laseja pidettiin nousevassa sarjassa, 10 minuuttia kaikissa: 50 %, 75 % ja 2 x 100 %. Vieraskudossiirteiden hybridisaatio kesti 2 - 3 vuorokautta kosteassa kammiossa.

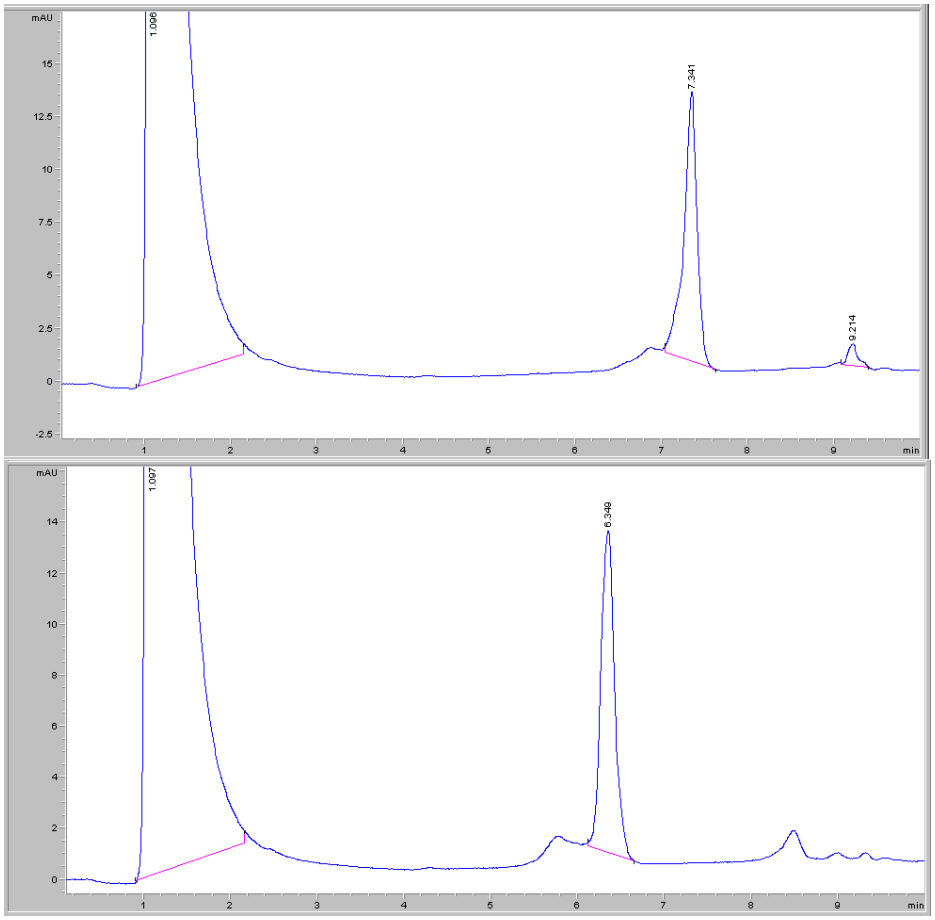
Hybridisaation jälkeen lasit pestiin seuraavasti: solulinjat: 2 minuuttia 72 °C:ssa 0.4 x SSC/0.3 % NP-40, 1 min huoneenlämpöisessä 2 x SSC/0.1 % NP-40 ja 4 x SSC 5 min RT. Tämän jälkeen lasit esiblokattiin käyttämällä 4xSSC/1 % BSA:ta (bovine serum albumin) 5 minuutin ajan, jonka jälkeen lasit värjättiin 1:300 anti-digoksigeeni-rodamiinilla, joka oli laimennettu blokkausliuokseen. Lopuksi lasit pestiin 3 x 10 min PN-puskurissa (LIITE 1), huuhdeltiin vedessä ja kuivatettiin. Viimeiseksi laseille lisättiin tumaväri: 0.1 µM DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole) ja signaalien heikentymistä estävä liuos (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Vieraskudossiirrännäiset pestiin 2 x 5 min 50 -prosenttisessa Formamidi/2 x SSC:ssä 45 °C:ssa, 2 x 5 min 4 x SSC/0.05 -prosenttisessa Tweenissä RT, ja 5 min 4xSSC:ssä RT ennen blokkausta, jonka jälkeen ne käsiteltiin samoin kuin solulinjanäytteet.

CBP- ja referenssikoettimien signaalit laskettiin kymmenistä tumista käyttäen Olympus BX50 epifluoresessimikroskooppia (Tokio, Japani).

3 TULOKSET

3.1 Mutaatioanalyysi

Koko *CBP*:n koodaava alue monistettiin PCR:llä viidestä solulinja- ja 32 vieraskudossiirrenäytteestä ja ajettiin läpi DHPLC:stä. DHPLC-ajon perusteella poikkeavan näköiset näytteet tutkittiin vielä sekvensoimalla. Loppujen lopuksi näytteistä ei löytynyt yhtään sekvenssipoikkeamaa, eli näissä näytteissä CBP-geenin koodaavalla alueella ei ole mutaatioita tai polymorfioita (SNP, single nucleotide polymorphism).



Kuva 1. Esimerkki DHPLC-ajosta LNCaP-solulinjan CBP-geenin koodaavan alueen loppupäästä. Ylempi on ajettu lämpötilassa 54 °C, alempi 55 °C. Näyte on homodupleksi, eli normaali.

1.2 FISH

FISH-analyysillä tutkittiin CBP:n geenikopioluku viidessä solulinjassa ja 12 LuCaP-kudossiirrännäisessä. Solulinjoista 22Rv1 ja PC-3 olivat normaaleja geenin ja kromosomin 16 lukumäärän suhteen, eli sisälsivät kaksi sentromeeriä ja kaksi lokusspesifistä signaalia. DU145 -soluissa oli sekä geeniä että kromosomia 3 kpl, LNCaP- sekä LAPC-solulinjoissa molempia oli 4 kpl. LuCaP-kudossiirrännäisten CBP-geenikopioluvut olivat kaikki normaaleja.

4 POHDINTA

CBP on histoniasetyylitransferaasi, jonka kromosomien välisestä translokaatiosta johtuva epänormaali toiminta on aikaisemmin liitetty erityisesti leukemiaan (Giles ym. 1997). Myöhemmin on havaittu, että CBP sitoutuu myös androgeenireseptoriin toimien sen koaktivoijana (Aarnisalo ym. 1998). Androgeenireseptorin koaktivoijat ovat interaktiossa reseptorin kanssa monilla eri tavoilla, esimerkiksi muokkaamalla kromatiinia tai vaikuttamalla DNA-polymeraasin liikkeeseen. Nämä muutokset lisäävät androgeenireseptorin transaktivaatiokykyä. (McKenna ym. 1999, Heinlein & Chang 2002).

AR-välitteinen signalointi uudelleenaktivoituu eturauhassyövän muuttuessa hormoneista riippumattomaksi, jolloin androgeeniablaatio hoitomuotona ei enää toimi (Linja & Visakorpi 2004). Yksi tämän aiheuttamista mekanismeista on AR:n yliekspressio, mutta myös androgeenireseptorin säätelijöillä, eli koaktivoijilla ja korepressoreilla, saattaa olla vaikutusta eturauhassyövän etenemiseen (Heinlen & Chang 2002).

CBP:n vaikutusta eturauhassyöpään on tutkittu, mutta suuria muutoksia ekspressiossa tai toiminnassa ei ole löydetty (Comuzzi ym. 2004, Linja ym. 2004). Geenimuutoksia ei kuitenkaan ole aikaisemmin tutkittu. Tässä tutkimuksessa etsittiin *CBP*:n sekvenssimuutoksia viidestä eturauhassyöpäsolulinjasta ja 32 vieraskudossiirteestä löytämättä niistä mitään merkittävästi poikkeavaa. Yleisesti solulinjat ja vieraskudossiirteet on saatu pitkälle edenneistä, ja kastraatio-resistenteistä kasvaimista, jolloin niihin on ehtinyt kerääntyä monia geneettisiä muutoksia (van Weerden ym. 1996). Näin ollen oletettavasti *CBP*:n mutaatioiden ollessa yleisiä, niitä löytyisi myös näistä syöpämalleista. Esimerkiksi tutkittaessa *SRC1*-geenin monistumia em. solulinjoista, vieraskudossiirteistä ja kliinisistä näytteistä löydettiin kahdesta vieraskudossiirteestä geenimonistuma, mutta tutkituista 47 kliinisestä näytteestä ei yhdestäkään löytynyt monistumaa (Mäki ym. 2006), ja samankaltaisia tuloksia on saatu muillakin geeneillä (Waltering ym. 2006, Mäki ym. 2007). Myös toisin päin

on havaittu, että jos kasvainnäytteistä on löytynyt geneettisiä muutoksia, samat muutokset löytyvät myös vieraskudossiirteistä (Laitinen ym. 2006).

DHPLC:n herkkyys mutaatioiden suhteen on hyvä, jolloin menetelmänä se soveltuu tämänkaltaiseen tutkimukseen (Xiao & Oefner 2001). Jo aikaisemmin menetelmää on validoitu sekvensoimalla osa DHPLC:stä normaaleina ulos tulleista näytteistä (Mäki ym. 2006). DHPLC-ajojen lisäksi suoritettiin kontrollisekvensointeja menetelmän varmistamiseksi myös tämän tutkimuksen aikana, eivätkä tulokset muuttuneet eri menetelmillä.

CBP- kromosomialueen tutkimiseen solulinjoista ja osasta vieraskudossiirteitä käytettiin FISH-menetelmää, jossa ei vieraskudossiirteistä saatu poikkeavia tuloksia. Solulinjoista DU145 näytti 3 kopiota sekä kromosomin 16 sentromeeria että CPB-lokusta, eli kyseessä on kromosomin trisomia. LNCaP sekä LAPC4 näyttivät 4 kopiota molemmista, eli kyseessä on tetrasomia. FISH on melko vaativa menetelmä niin toteuttaa kuin tulkitakin. FISH-metodin tuloksia on verrattu useampiin eri menetelmiin ja todettu sen soveltuvan geenimonistumien tutkimiseen hyvin (Kallioniemi ym. 1992).

Johtopäätöksenä *CBP*:n geenimuutokset ja geenikopioluvun muutokset ovat harvinaisia eturauhassyövässä. Näyttäisi siltä, että *CBP*:n geneettisillä muutoksilla ei ole merkittävää roolia eturauhassyövän synnyssä ja etenemisessä. Lisätutkimukset esimerkiksi mRNA- ja proteiinitasolla ovat kuitenkin vielä tarpeen, koska solutasolla on havaittu, että *CBP*:n yliekspressio vaikuttaa syöpäsolujen vasteeseen eri hormonihoitoihin (Comuzzi ym. 2003).

LÄHTEET

Aarnisalo P, Palvimo JJ, Jänne OA (1998). CREB-binding protein in androgen receptor-mediated signaling. Proc Natl Acad Sci 95:2122-2127.

Comuzzi B, Lambrinidis L, Rogatsch H, Goody-Tundidor S, Knezevic N, Khren I, Marekovic Z, Bartsch G, Klocker H, Hobisch A, Culig Z (2003). The transcriptional co-activator cAMP response element-binding protein-binding protein is expressed inprostate cancer and enhances androgen- and anti-androgen-induced androgen receptor function. Am J Pathol 162: 233-241.

Culig Z, Comuzzi B, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A (2004). Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol 92:265-271.

Giles RH, Dauwerse JG, Higgins C, Petrij F, Wessels JW, Beverstock GC, Döhner H, Jotterand-Bellomo M, Falkenburg JHF, Slater RM, van Ommen G-JB, Hagemeijer A, van der Reijden BA & Breuning MH (1997). Detection of *CBP* rearrangements in acute myelogenous leukemia with t(8;16). Leukemia 11: 2087-96.

Goodman RH & Smolik S (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. Genes Dev 14: 1553-77.

Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE (2005). HIF-1α, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates SRC-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. Oncogene 24: 3110-20.

Hallam TM, Bourtchouladze (2006). Rubenstein-Taybi syndrome: Molecular findings and therapeutic approaches to improve cognitive dysfunction. Cell Mol Life Sci 63:1725-35.

Heery DM, Hoare S, Hussain S, Parkers MG, Sheppard H (2001). Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1 and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. J Biol Chem 276: 6695-6702.

Heinlein CA, Chang C (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. Endocr Rev 23:175-200.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007). Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 57: 43-66.

Kalkhoven E, Teunissen H, Houweling A, Verrijezer C & Zantema A (2002). The PHD type zink finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain. Mol Cell Biol 22: 1961-70.

Kalkhoven E (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. Biochem Pharm 68: 1145-55.

Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen L-C, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D and Gray JW (1992). ERBB2 amplification in breast cancer analysed by fluorescence in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 89: 5321–5325

Laitinen S, Karhu R, Sawyers CL, Vessella RL, Visakorpi T (2002). Chromosomal aberrations in prostate cancer xenografts detected by comparative genomic hybridization. Genes Chrom Cancer 35: 66-73.

Linja MJ, Porkka KP, Kang Z, Savinainen KJ, Jänne OA, Tammela TLJ, Vessella RL, Palvimo JJ & Visakorpi T (2004). Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. Clin Cancer Res 10: 1032-40.

Linja MJ, Visakorpi T (2004). Alterations of androgen receptor in prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol, 92:255-264.

McKenna NJ, Lanz RB & O`Malley BW (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. Endocr Rev 20:321-344.

Porkka KP, Visakorpi T (2004). Molecular mechanisms of prostate cancer. Eur Urol 45: 683-691.

Mäki HE, Waltering KK, Wallén MJ, Martikainen PM, Tammela TLJ, van Weerden WM, Vessella RL, Visakorpi T (2006). Screening of genetic and expression alterations of SRC1 gene in prostate cancer. Prostate 66: 1391-1398.

Mäki HE, Saramäki OR, Shatkina L, Martikainen PM, Tammela TLJ, van Weerden WM, Vessella RL, Cato ACB, Visakorpi T(2007). Overexpression and gene amplification of Bag-1l in hormone-refractory prostate cancer. J Pathol 212: 395-401.

Sadoul K, Boyault C, Pabion M, Khochbin (2008). Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. Biochimie 90: 306-312.

Saramäki OR, Porkka KP, Vessella RL, Visakorpi T (2006). Genetic aberrations in prostate cancer by microarray analysis. Int J Cancer 119:1322-1329,.

Sterner DE, Berger SL (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rew 64: 435-459.

van Orden K, Giebler HA, Lemansson I, Gonzales M, Nyborg JK (1999). Binding of p53 to the KIX domain of CREB biding protein. J Biol Chem 274: 26321-28.

van Weerden WM, de Ridder CM, Verdaasdonk CL, Romijn JC,van der Kwast TH, Schroder FH, van Steenbrugge GJ (1996). Developmentof seven new human prostate tumor xenograft models and their histopathological characterization. Am J Pathol 149:1055–1062

Vo N, Goodman RH (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. J Biol Chem 276:13505-08.

Waltering KK, Wallén MJ, Tammela TLJ, Vessella RL, Visakorpi T (2006). Mutation screening of the androgen receptor promoter and untranslated regions in prostate cancer. Prostate 66:1585-91.

Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review (2001). Hum Mut 17:439–474.

LIITE 1.

Käytettyjen liuosten teko-ohjeet:

Denaturaatioliuos

700 ml formaldehydiä

100 ml 20 x SSC

Täytetään 1000 ml:aan ja säädetään pH 7

Master mix 1.0

1 g dekstraanisulfaattia

5 ml formamidia

1 ml 20 x SSC

Täytetään 7 ml:ksi ja säädetään pH 7

PN-puskuri

0.1 M NaH_2PO_4

0.1 M% NP-40

1) 13.8 g NaH_2PO_4 liuotetaan litraksi vedellä

2) 89 g Na_2HPO_4 liuotetaan viideksi litraksi vedellä

2) kohdan liuoksen pH säädetään 8:ksi 1) liuoksella, ja tähän lisätään NP-40