

# Androgeenireseptorin tumatranslokaatio, FOXA1-vuorovaikutus ja liikkuvuus ihmisen soluissa

---



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Pro gradu

Vesa Rahkama

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

2012

## **Alkusanat**

Tutkimukset tehtiin Itä-Suomen yliopiston biolääketieteen yksikössä, Jorma Palvimon ryhmässä. Haluan kiittää ohjaajaani, professori Jorma Palvimoa, hienosta mahdollisuudesta työskennellä hänen ryhmässään mielenkiintoisten ja merkittävien aiheiden parissa.

Lisäksi haluan kiittää koko ryhmää lämpimästä vastaanotosta, keskusteluista, rattoisista lounas- ja kahvihetkistä sekä perehdytyksestä savolaiseen maailmankatsomukseen sekä subjektiiviselta että objektiiviselta kantilta. Erityiskiitokset Sanna Kaikkoselle, Miia Ryttingille, Päivi Sutiselle, Merja Räsäselle sekä Niina Laaksolle korvaamattomasta avusta ja neuvoista tutkimuksen parissa. Kiitoksia myös Kirsi Rillalle konfokaalimikroskopian oppaana toimimisesta.

Kiitos niin ikään Kallaveen hilpeälle ja omaperäiselle kansalle, muikuille ja torimyyjille mahtavan tunnelman luomisesta sekä kulinaarisista elämyksistä.

Kiitos ja kumarrus Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen väelle viidestä vuodesta laadukasta opetusta ja mielenkiintoisia kursseja.

Lopuksi haluan vielä kiittää perhettäni, joka on kannustanut minua valitsemallani tiellä kohti tiedemiehuutta. Suurin kiitos rakkaalle Hennalleni nauruista, ymmärtämisestä, valaisemisesta, kannustamisesta ja laiskan takapuoleni potkimisesta yhdessä jos toisessakin asiassa – eikä vähiten esikoisemme kantamisesta.

Kuopiossa

14.8.2012

Vesa Rahkama

<b>Tekijä:</b>	Vesa Rahkama	
<b>Tutkielman nimi:</b>	Androgeenireseptorin tumatranslokaatio, FOXA1-vuorovaikutus ja liikkuvuus ihmisen soluissa	
<b>English title:</b>	The nuclear translocation, FOXA1 interaction and mobility of androgen receptor in human cells	
<b>Päivämäärä:</b>	14.8.2012	<b>Sivumäärä:</b> 66 + 12
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
<b>Oppiaine:</b>	Solu- ja molekyylibiologia	
<b>Tutkielman ohjaaja(t):</b>	Professori Jorma Palvimo, Biolääketieteen yksikkö, Itä-Suomen yliopisto	

---

**Tiivistelmä:**

Androgeenireseptori (AR) on solusyklin ja geenien luennan säätelijänä tärkeä molekyyli muun muassa eturauhassyövässä. MDV3100 on uusi antiandrogeeni, joka estää AR:n tumatranslokaation ja siten AR-välitteisen geenien luennan. FOXA1 on AR:n koregulaattoriproteiini, joka avaa kromatiinia sekä osallistuu transkription säätelyyn joko tehostaen tai vaimentaen geenien luentaa. Sumoylaatio on SUMO-proteiinien konjugoitumista kohdeproteiiniin, ja sen on todettu repressoivan AR-välitteistä geenien luentaa.

Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää AR:n lokalisoitumista solun tumaan eri ligandeilla indusoituna, AR:n ja FOXA1:n kolokalisaatiota sekä sumoylaatiopaikkojen vaikutusta AR:n liikkuvuuteen tumassa. Fluoroforeilla leimattuja AR:a ja sen sumoyloitumatonta AR-K386R/K520R-mutanttia sekä FOXA1:tä tutkittiin blottauksen, raportoijageenikokeiden ja konfokaalimikroskopian avulla HEK-293-soluissa.

AR:n havaittiin lokalisoituvan solun tumaan androgeenillä (R1881) ja antiandrogeeni bikalutamidilla indusoituna. MDV3100 sai aikaan AR:n tumalokalisaation huomattavasti heikommin kuin bikalutamidi, joten se on myös tehokkaampi AR-välitteisen geenien luennan estäjä androgeenille herkkien eturauhassyöpien hoidossa. Ligandikäsittelyjen erot AR:n lokalisoitumiseen heijastuivat myös kolokalisaatioon FOXA1:n kanssa FOXA1:n lokalisoituessa ligandista riippumatta tumaan. AR:n sumoylaatiopaikkojen mutatointi aiheutti hidastumisen AR:n tumansisäisessä liikkuvuudessa R1881-käsittelyllä. Bikalutamidilla indusoituna AR ja AR-K386R/K520R liikkuvat nopeammin kuin R1881:llä indusoituna, mutta villityypin ja mutanttireseptorin välillä ei havaittu eroa. Androgeenillä indusoitujen AR:n ja AR-K386R/K520R:n ero liikkuvuudessa saattaa selittyä sumoylaatiopaikkojen ja tumamatriisin vuorovaikutuksilla, joita ei toistaiseksi tunneta.

---

**Avainsanat:** androgeenireseptori, eturauhassyöpä, FOXA1, MDV3100, sumoylaatio

---

**Author:** Vesa Rahkama  
**Title of thesis:** The nuclear translocation, FOXA1 interaction and mobility of androgen receptor in human cells  
**Finnish title:** Androgeenireseptorin tumatranslokaatio, FOXA1-vuorovaikutus ja liikkuvuus ihmisen soluissa  
**Date:** 14.8.2012 **Pages:** 66 + 12  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell and Molecular Biology  
**Supervisor(s):** Professor Jorma Palvimo, Institute of Biomedicine, University of Eastern Finland

---

**Abstract:**

Androgen receptor (AR) is a major regulator of cell cycle and transcription in prostate cancer. MDV3100 is a novel antiandrogen which blocks the nuclear translocation of AR and the transcription mediated by AR. FOXA1 is an AR coregulator which pioneers in opening the chromatin and activating or repressing AR mediated transcription. Sumoylation is a process where SUMO proteins are conjugated on target proteins and this has been found to repress AR mediated transcription.

In this study the localization of AR induced with different ligands, colocalization between AR and FOXA1 and the effect of sumoylation sites on nuclear mobility of the AR were assessed. Fluorescent labeled AR, its sumoylation-deficient AR-K386R/K520R mutant and FOXA1 were studied by Western blotting, reporter gene analysis and confocal microscopy in HEK-293 cells.

AR was observed to localize into the nucleus when induced with androgen (R1881) and antiandrogen bicalutamide. MDV3100 promoted the nuclear translocation of AR less efficiently than bicalutamide and thereby it is also a more potent inhibitor of AR mediated transcription in androgen-sensitive prostate cancers. The effects of different ligands on AR localization reflected on the colocalization between AR and FOXA1. However, FOXA1 resided in the nucleus independent of treatment. Mutated sumoylation sites retarded the intranuclear mobility of R1881-induced AR. Bicalutamide increased intranuclear mobility of both AR and AR-K386R/K520R compared to R1881 treatment, but no differences were observed between the wild type and the mutant receptors. The difference between androgen-induced AR and AR-K386R/K520R might be explained through interactions between sumoylation sites and nuclear matrix which are yet to be discovered.

---

**Keywords:** androgen receptor, FOXA1, MDV3100, prostate cancer, sumoylation

# Sisällysluettelo

## Alkusanat

## Tiivistelmä

## Lyhenteet

<b>1. Johdanto</b> .....	8
1.1. Androgeenireseptori.....	8
1.1.1. Rakenne ja toiminta.....	8
1.2. AR:n ligandit.....	10
1.2.1. Testosteroni ja dihydrotestosteroni .....	10
1.2.2. R1881 eli metyylitrienoloni .....	11
1.2.3. Bikalutamidi .....	11
1.2.4. MDV3100 .....	12
1.3. AR:n fysiologia.....	13
1.3.1. Hedelmällisyys ja seksuaalisuus .....	13
1.3.2. Muut kudokset.....	16
1.4. AR:iin liittyvät sairaudet.....	17
1.4.1. AR eturauhassyövässä.....	19
1.5. AR:n translaation jälkeiset muokkaukset .....	22
1.5.1. Sumoylaatio.....	24
1.6. AR:n kanssa toimivat koregulaattorit .....	27
1.6.1. FoxA1 .....	28
1.6.2. FoxA1 ja AR .....	30
<b>2. Tutkimuksen tarkoitus</b> .....	32
<b>3. Materiaalit ja menetelmät</b> .....	33
3.1. Soluviljely .....	33
3.2. AR:n lokalisaatio Flp-In <sup>TM</sup> -293 FRT-EGFP-AR -soluissa .....	33
3.3. FOXA1:n kloonaukseen pmCherry-C1-vektoriin .....	34
3.4. AR:n ja FOXA1:n kolokalisaatio .....	38
3.5. Flp-In <sup>TM</sup> -293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solulinjan valmistus .....	39
3.6. Villityypin AR:n ja AR-K386R/K520R-mutanttien vertailu .....	40
<b>4. Tulokset</b> .....	43
4.1. AR:n lokalisaatio androgeenin ja antiandrogeenien indusoimana.....	43

4.2.	pmCherry-FOXA1-konstruktin valmistaminen .....	43
4.3.	AR:n ja FOXA1:n kolokalisaatio .....	44
4.4.	Stabiilin Flp-In <sup>TM</sup> -293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solulinjan valmistaminen .	45
4.5.	Sumoylaatiopaikkojen vaikutus AR:n tumansisäiseen liikkuvuuteen .....	47
<b>5.</b>	<b>Tulosten tarkastelu</b> .....	<b>49</b>
5.1.	AR:n tumalokalisaation voimakkuus vaihtelee eri ligandien indusoimana .....	49
5.2.	AR ja FOXA1 kolokalisoituvat tumassa androgeenin vaikutuksesta .....	49
5.3.	Sumoylaatiopaikat vaikuttavat AR:n tumansisäiseen liikkuvuuteen .....	51
<b>6.</b>	<b>Lähdeluettelo</b> .....	<b>52</b>

## **Liitteet**

## Lyhenteet

AIS	Androgeeni-insensitiivisyys	<i>(Androgen insensitivity syndrome)</i>
AR	Androgeenireseptori	<i>(Androgen receptor)</i>
ARKO	Eläinmalli, jonka AR-geeni on tehty toimintakyvottomäksi	<i>(Androgen receptor knockout)</i>
CRPC	Eturauhassyöpä, joka etenee antiandrogeenihoidosta huolimatta	<i>(Castration-resistant prostate cancer)</i>
DBD	Tumareseptorien DNA:ta sitova domeeni	<i>(DNA-binding domain)</i>
EGFP	Parannettu vihreä fluoresoiva proteiini	<i>(Enhanced green fluorescent protein)</i>
FoxA1	AR:n koregulaattori ja kromatiinia avaava proteiini	<i>(Forkhead box A1)</i>
FRAP	Menetelmä, jossa fluoresenssin palautumista mitataan fluoroforien tuhoamisen jälkeen	<i>(Fluorescence recovery after photobleaching)</i>
H	Tumareseptorien sarana-alue	<i>(Hinge region)</i>
LBD	Tumareseptorien ligandia sitova domeeni	<i>(Ligand-binding domain)</i>
NTD	Tumareseptorien N-terminaalidomeeni	<i>(N-terminal domain)</i>
PCa	Eturauhassyöpä	<i>(Prostate cancer)</i>
PSA	Eturauhaselle spesifinen antigeeni	<i>(Prostate-specific antigen)</i>
SBMA	Spinobulbaarinen lihasatrofia, neurodegeneratiivinen lihasrappeumatauti	<i>(Spinal and bulbar muscular atrophy)</i>
SUMO	Pieni ubiquitiinin kaltainen muokkaaja	<i>(Small ubiquitin-related modifier)</i>

# 1. Johdanto

## 1.1. Androgeenireseptori

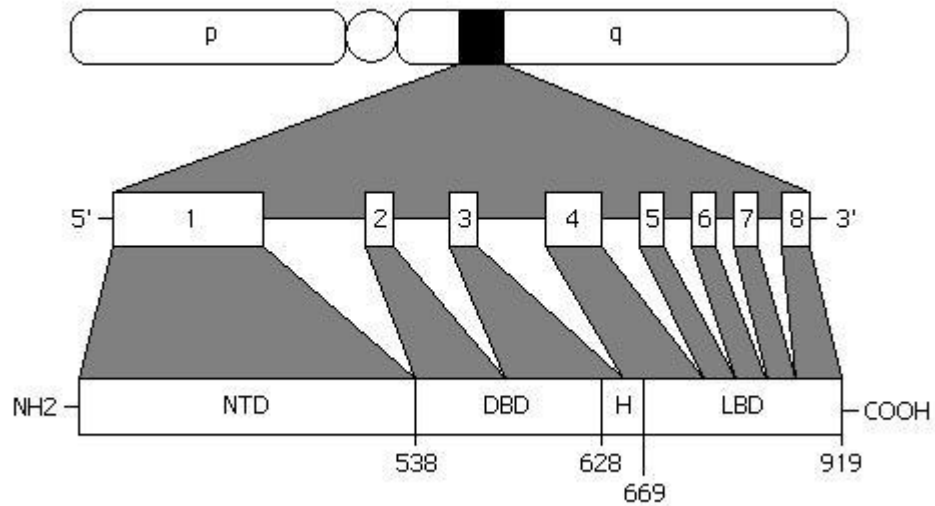
Androgeenireseptori (AR tai NR3C4 eli tumareseptorien alaheimo 3, ryhmä C, geeni 4) kuuluu steroidireseptorien perheeseen, joka puolestaan on osa tumareseptorien superperhettä (ks. yleiskatsaus Aranda ja Pascual, 2001). Kaikki tumareseptorit säätelevät geenien luenta eli transkriptiota sitoutumalla DNA:han. Tumareseptorien toimintaa puolestaan säätelee ligandin – AR:n tapauksessa androgeenien, kuten testosteronin ja dihydrotestosteronin (DHT) – sitoutuminen. Androgeenit ovat kolesterolijohdannaisia, joten ne pääsevät verenkierrasta kohdekudoksiinsa diffuusion avulla. Solulimaan päästyään androgeeni sitoutuu AR:iin, joka puolestaan läpikäy konformaatiomuutoksia ja dimerisaation ennen tumaan siirtymistä. Tumassa AR sitoutuu geenien säätelyalueille ja vaikuttaa siten geenien luentaan. AR:iin liittyy lisäksi koaktivaattori- ja korepressoriproteiineja, jotka joko tehostavat tai estävät transkriptiota vaikuttaen esimerkiksi siittiöiden tuotannon ja seksuaalisen kehityksen säätelyyn miehillä.

### 1.1.1. Rakenne ja toiminta

AR:a koodaava geeni koostuu kahdeksasta eksonista, ja se sijaitsee X-kromosomissa lokuksessa Xq11.2-q12 (Brown ym., 1989). Eksoni 1 koodaa proteiinin N-terminaalidomeenia (NTD), josta löytyy kaksi polymorfista yhden aminohapon (glutamiini ja glysiini) toistojaksoa. Eksonit 2 ja 3 koodaavat NTD:n perässä olevaa DNA:ta sitovaa domeenia (engl. DNA-binding domain, DBD). DBD:n lisäksi eksoni 3 koodaa eksonin 4 kanssa niin kutsuttua sarana-aluetta (engl. hinge region, H), jonka lisäksi eksoni 4 koodaa jäljelle jäävien eksonien 5-8 kanssa reseptorin ligandia sitovaa domeenia (engl. ligand-binding domain, LBD) (Brinkmann ym., 1989). Ihmisen AR on keskimäärin 919 aminohappoa pitkä, ja sen molekyylipaino on keskimäärin 110 kDa (Kuva 1).

LBD sijaitsee AR:n C-terminaalissa, ja se muodostaa ligandinsitomistaskun, johon androgeeni sitoutuu. Inaktiivinen AR on kiinnittyneenä solun tukirangan aktiinisäikeisiin filamiini a:n välityksellä (Loy ym., 2003), ja siihen on sitoutuneena myös lämpöshokkiproteiineja (engl. heat shock protein, hsp) sekä muita apuproteiineja (Cheung-Flynn ym., 2005). Nämä apuproteiinit auttavat AR:a taipumaan oikeaan konformaatioon





Kuva 1. Ihmisen AR:n kaavakuva. Ylimpänä X-kromosomi, jossa lokus Xq11.2-q12 on merkitty mustalla. Keskellä on AR:a koodaava geeni, jossa olevat eksonit on merkitty numeroin 1-8. Alimpana on AR:n proteiinirakenteen kaavakuva: vasemmalta lukien N-terminaalidomeeni (NTD, engl. transcription activation domain), DNA:ta sitova domeeni (DBD, engl. DNA binding domain), sarana-alue (H, engl. hinge region) ja ligandia sitova domeeni (LBD, engl. ligand binding domain). Kuvaan on merkitty domeenien rajalla sijaitsevien aminohappojen sijainnit.

androgeenin sitoutumista varten (ks. yleiskatsaus Buchner, 1999). Androgeenin sitoutuessa AR:n konformaatio muuttuu, intramolekulaarinen (AR-molekyylin sisäinen) N/C-vuorovaikutus syntyy LBD:n sekä NTD:n välille ja apuproteiinikompleksi irtoaa (Schaufele ym., 2005). Intramolekulaarisen N/C-vuorovaikutukseen osallistuu NTD:ssa oleva FQNLF-jakso (aminohapot 23–27) sekä LBD:iin androgeenin sitoutuessa muodostuva aktivaatioalue 2 (engl. activation function 2, AF-2) (van Royen ym., 2012). NTD sisältää lisäksi kaksi aktivaatioaluetta – AF-1 (aminohapot 101–370) ja AF-5 (aminohapot 360–485) – joista AF-1 vastaa täysimittaisen AR:n transaktivaatiopotentiaalista ja AF-5 vastaa transaktivaatiopotentiaalista AR:ssa, josta puuttuu LBD (Jenster ym., 1995). LBD:n puutteeseen palataan osiossa 1.4.

Intramolekulaarisen N/C-vuorovaikutuksen mahdollistaa LBD:n ja DBD:n välissä sijaitseva H, jota ilman transkriptiota ei tapahdu (Deeb ym., 2008). H sisältää myös AR:n toiminnalle oleellisen RKLKKL-tumalokalisiaatiosignaalin (aminohapot 629–634), johon tumakuljetusproteiini importiini- $\alpha$  sitoutuu. Importiini- $\alpha$  vastaa AR:n tumakuljetuksesta yhdessä filamiini a:n kanssa (Loy ym., 2003; Cutress ym., 2008). Tumassa intramolekulaarinen N/C-vuorovaikutus muuttuu intermolekulaariseksi (AR-molekyyliden väliseksi N/C-vuorovaikutukseksi) AR:ien dimerisoituessa (van Royen ym., 2012).

DBD on steroidireseptorien konservoitunein domeeni, jonka avulla homodimerisoitunut AR sitoutuu spesifisesti kohdegeenin promoottorissa olevaan androgeenivaste-elementtiin (engl. androgen response element, ARE) erityisten sinkkisormien avulla (ks. yleiskatsaus Khorasanizadeh ja Rastinejad, 2001). Tällöin AR:n N/C-vuorovaikutus häviää, ja paikalle saapuu koregulaattoriproteiineja, jotka osallistuvat AR-välitteisen geenien luennan säätelyyn sekä transkriptioon (van Royen ym., 2007). N/C-vuorovaikutusten on arveltu estävän AR:a sitomasta koregulaattoriproteiineja ennen DNA:han sitoutumista.

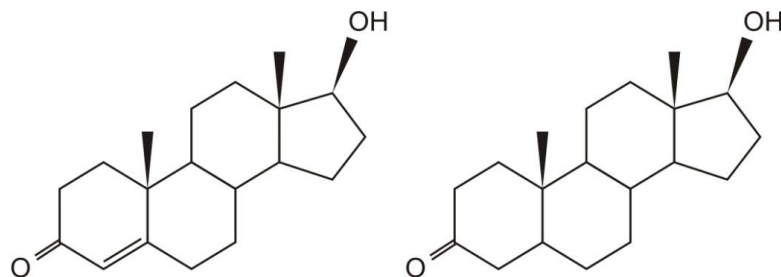
Ligandin irrottua AR:sta reseptori siirtyy takaisin solulimaan (Tyagi ym., 2000). Ligandin irrotessa AR:n konformaatio muuttuu, jolloin LBD:ssa sijaitseva uloskuljetussignaali paljastuu, ja AR kuljetetaan solulimaan (Saporita ym., 2003).

## 1.2. AR:n ligandit

Androgeenit ovat steroidihormoneja, ja ne vaikuttavat olennaisesti miehen fenotyypin kehittymiseen. Paneudun tässä osassa kahteen tärkeimpään endogeeniseen androgeeniin – testosteroniin ja sen johdannaiseen DHT:iin – sekä tutkimuksessa käytettyihin synteettisiin AR:n ligandeihin.

### 1.2.1. Testosteroni ja dihydrotestosteroni

Testosteroni (Kuva 2, vasemmalla) on miehen elimistön yleisin androgeeni, joka vaikuttaa AR:n välityksellä muun muassa miehen lisääntymiselinten tiehytrakenteiden muodostumiseen sekä siittiöiden valmistamiseen. Testosteroni muodostuu kiveksissä, jossa useat entsyymaattiset reaktiot muokkaavat kolesterolista testosteronia (ks. yleiskatsaus Brinkmann, 2011).

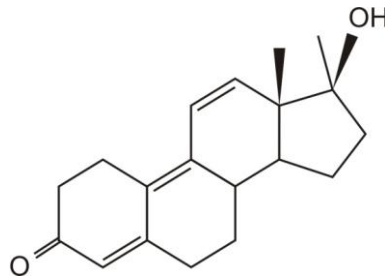


Kuva 2. Testosteronin (vasemmalla, IUPAC: (8R,9S,10R,13S,14S,17S)-17-hydroksi-10,13-dimetyyli-1,2,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahydro syklopenta[a]fenantreen-3-oni) ja DHT:n (oikealla, IUPAC: (5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-hydroksi-10,13-dimetyyli-1,2,4,5,6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-tetradekahydro syklopenta[a]fenantreen-3-oni) rakennekaavat. Ainoa ero molekyylien välillä on 4,5 kaksoissidoksen puuttuminen dihydrotestosteronin vasemmanpuoleisimmasta hiilirenkaasta.

DHT (Kuva 2, oikealla) on testosteronijohdannainen, joka muodostuu tietyissä kudoksissa (esim. eturauhanen, lisäkives ja maksa)  $5\alpha$ -reduktaasin (tyyppi 2) katalysoimassa reaktiossa (ks. yleiskatsaus Russell ja Wilson, 1994).  $5\alpha$ -reduktaasi pelkistää testosteronin A-renkaan 4,5-kaksoissidoksen, jolloin DHT on valmis. DHT on AR-affiniteetiltaan kaksi kertaa testosteronia voimakkaampi, ja se vaikuttaa AR:n kautta muun muassa eturauhasen ja peniksen kehitykseen (ks. yleiskatsaus Brinkmann, 2011).

### 1.2.2. R1881 eli metyyli trienoloni

R1881 (Kuva 3) luokitellaan Maailman antidopingtoimiston säännöksissä kaikkina aikoina kiellettyihin eksogeenisiin anabolis-androgeenisiin steroideihin (<http://www.wada-ama.org/> 11.7.2012).



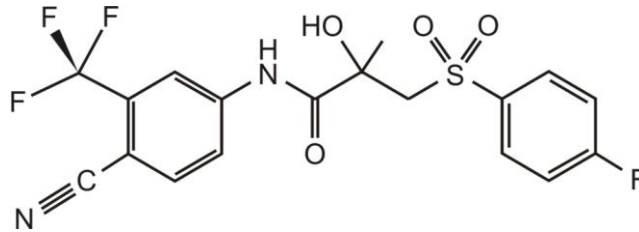
Kuva 3. R1881:n (IUPAC: 17 $\beta$ -hydroksi-17 $\alpha$ -metyylitra-4,9,11-trien-3-oni) rakennekaava. R1881 muistuttaa rakenteeltaan suuresti testosteronia ja DHT:a.

Anaboliset steroidit lisäävät muun muassa lihasmassaa ja -voimaa sekä parantavat hapenottokykyä punasolujen tuotannon kautta. Entinen olympiavoittaja, kreikkalainen aitajuoksija Fani Halkia sekä kaksi muuta Kreikan maajoukkueen juoksijaa kärsivät R1881:n käytöstä ennen Pekingin olympialaisia vuonna 2008 (<http://news.bbc.co.uk/sport2/hi/athletics/7753518.stm> 11.7.2012). R1881 on synteettinen AR-agonisti eli se vaikuttaa samalla periaatteella kuin luontaiset androgeenit ja saa AR:n siirtymään tumaan stimuloiden AR-välitteistä geenien luentaa. Se kuitenkin metaboloituu huonosti ja sopii siksi hyvin tutkimuskäyttöön.

### 1.2.3. Bikalutamidi

Bikalutamidi (Kuva 4), kauppanimeltään Casodex, on vuonna 1995 eturauhassyövän (engl. prostate cancer, PCa) hoitoon kehitetty trifluorometyylibentsonitriili, niin kutsuttu

nonsteroidaalinen AR-antagonisti. Se ei sitoudu muihin steroidireseptoreihin eikä vaikuta niiden säätelyyn (Furr ja Tucker, 1996).

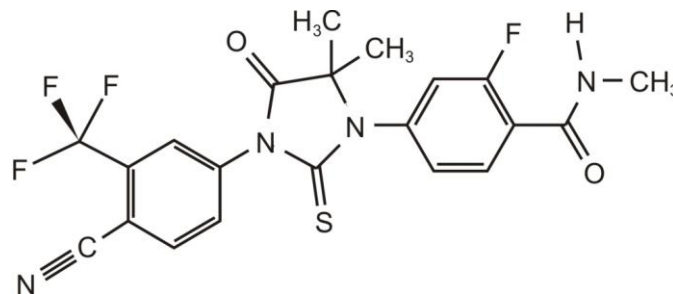


Kuva 4. Bikalutamidin (IUPAC: N-[4-syano-3-(trifluorimetyyli)fenyyli]-3-[(4-fluorifenyyli)sulfonyyli]-2-hydroksi-2-metyylipropanamidi) rakennekaava.

Bikalutamidilla on agonistisia vaikutuksia AR:iin, sillä bikalutamidilla indusoitu AR siirtyy solun tumaan ja sitoutuu siellä spesifisesti kohdegeenien säätelyalueille (Masiello ym., 2002). Bikalutamidilla indusoitu AR on kuitenkin inaktiivinen, eikä geenien luenta pääse alkamaan. Sitoutuessaan AR:iin bikalutamidi estää sitä muodostamasta intramolekulaarisen N/C-vuorovaikutuksen ja siten transkriptiolle välttämätöntä AR:n dimerisaatiota ei pääse tapahtumaan (van Royen ym., 2012).

#### 1.2.4. MDV3100

Myös MDV3100 (Kuva 5) on eturauhassyövän hoitoon kehitetty AR:n signaalointia inhiboiva yhdiste (<http://www.medivation.com/product-pipeline/enzalutamide> 11.7.2012). Myös MDV3100 on trifluorometyyli-bentsonitriili, joten sillä on samoja funktionaalisia ryhmiä bikalutamidin kanssa (vrt. kuvat 4 ja 5).



Kuva 5. MDV3100:n (IUPAC: 4-(3-(4-syano-3-(trifluorimetyyli)fenyyli)-5,5-dimetyyli-4-okso-2-tioksoimidatsolidin-1-yyli)-2-fluori-N-metyyli-bentsamidi) rakennekaava.

Prekliinisissä kokeissa MDV3100:n on todistettu olevan tehokkaampi AR:n signaloinnin estäjä kuin bikalutamidi. MDV3100 estää endogeenisten androgeenien sitoutumisen AR:iin, AR:n translokaation tumaan ja sitoutumisen DNA:han (Tran ym., 2009). Lisäksi yhdisteen on todettu inhiboivan solujen proliferaatiota sekä indusoivan syöpäsolujen apoptoosia eläimillä. Vaiheen 1-2 kliinisissä jatkotutkimuksissa yhdisteellä havaittiin olevan kasvaimia tuhoavia vaikutuksia muille antiandrogeneille resistenteillä potilailla (Scher ym., 2010).

### 1.3. AR:n fysiologia

Androgeenisäätelyn fysiologiaa on tutkittu pääasiassa poistogeenisillä knockout-eläinmalleilla, joista Cre/*loxP*-hiiret ovat olleet toistaiseksi paras tapa selvittää säätelyn vaikutuksia ja AR:n kohdekudoksia nisäkkäissä (ks. yleiskatsaus Nagy, 2000). Cre/*loxP*-menetelmän avulla saadaan luoduksi hiiriä, jotka eivät ilmennä lainkaan AR:a (ks. yleiskatsaus Matsumoto ym., 2008). Menetelmä tarjoaa huomattavan tutkimuksellisen edun, sillä aiemmin käyttöön otetuissa kastroitiomenetelmissä AR:n merkittävin kohdekudos – kives – joko tuhotaan tai poistetaan. AR säätelee eturauhasen, rakkularauhasen sekä lisäkivesten morfologiaa ja erilaistumista. Lisäksi säätely ulottuu myös siemenjohdinten sekä urogenitaalisen ontelon, tuberkkeleiden, kivespussin, virtsaputken sekä peniksen erilaistumisen ja kehityksen säätelyyn. Endogeenisillä androgeeneillä on omat tehtävänsä kudoksetkohtaisessa säätelyssä. Testosteroni osallistuu alkionkehityksen aikana muodostuvasta mesonefrisestä tiehyestä muodostuvien rakenteiden, kuten lisäkivesten, siemenjohdinten, rakkularauhasen ja ejakulatoristen tiehyiden kehitykseen. DHT osallistuu puolestaan eturauhasen sekä ulkoisten sukupuolielinten kehitykseen (ks. yleiskatsaus Brinkmann, 2011). AR:lla on tehtäviä myös muissa kudoksissa, kuten hermostossa, luussa sekä lihaksissa.

#### 1.3.1. Hedelmällisyys ja seksuaalisuus

Spermatogeneesi eli miehen sukusolujen tuotanto tapahtuu kiveksissä Sertolin solujen, Leydigin solujen ja peritubulaaristen myoepiteelisolujen yhteistyönä, mutta sen mekanismia tai solujen toimintaa ei tunneta vielä täysin. Sertolin solut ovat siementiehyiden sisällä olevia soluja, jotka suojaavat valmistuvia siittiöitä. Leydigin solut sijaitsevat siementiehyiden välissä, ja niiden pääasiallinen tehtävä on tuottaa androgeenejä.

Peritubulaariset myoepiteelisolut ovat puolestaan sileitä lihassoluja muistuttavia hitaasti supistuvia soluja, jotka sijaitsevat siementiehyiden ulkopinnalla. AR:n osuutta spermatogeneesissä on tutkittu knockout-hiirikannoilla (engl. androgen receptor knockout, ARKO), joiden Sertolin solujen *Ar*-geenien toinen eksoni on poistettu (De Gendt ym., 2004; Chang ym., 2004). Sertolin solu -spesifisten ARKO-uroshiirten spermatogeneesi pysähtyi meioosissa, joten AR:n merkitys Sertolin solujen toiminnassa on ilmeinen. Kyseisen hiirimallin ongelmana on, että se ei paljasta meioosin jälkeisiä AR-välitteisiä tapahtumia. Hiirimalleilla, joiden Sertolin solujen AR-tuotantoa oli vähennetty, ei havaittu meioosin estymistä, mutta spermatogeneesi pysähtyi spermiogeneesiin eli siittiöiden kypsymiseen (Holdcraft ja Braun, 2004). Vaikuttaa siis siltä, että spermatogeneesin eri vaiheiden läpiviemiseksi tarvittava AR-määrä vaihtelee. Edellä mainitulla ARKO-hiirikannalla tehdyissä kokeissa paljastui, että AR:n puuttuminen Sertolin soluista vaikuttaa Leydigin solujen kehitykseen negatiivisesti (De Gendt ym., 2005). Aikuisikään ehtineillä hiirillä Leydigin solujen määrä oli jopa 40 % pienempi kuin kontrollihiirillä. Tämä viittaa siihen, että Sertolin solujen AR stimuloi Leydigin solujen kehitykselle tärkeiden parakriinisten tekijöiden synteesiä. Sertolin solujen AR:n on todettu vaikuttavan useiden geenien, kuten *Rhox5*:n, säätelyyn kiveksissä. *Rhox5* on homeoottinen geeni, joka on olennainen osatekijä spermatogeneesissä (Eacker ym., 2007). AR:n tehtäviä miehen hedelmällisyydessä on tutkittu myös Leydigin solu -spesifisillä ARKO-hiirillä. Näissä kokeissa hiirten Leydigin solujen testosteronisynteesi ja -eritys väheni, minkä todettiin johtuvan steroidisynteesiin liittyvien entsyymien tuotannon vähenemisestä (Xu ym., 2007). Poistogeenisen hiirikannan luomisessa käytetty *Amhr2*-promootori on kuitenkin aktiivinen myös Sertolin soluissa saman Cre-rekombinaasin yhteydessä (Kyrölahti ym., 2011), joten ei voida olla täysin varmoja, että havaitut vaikutukset johtuvat ainoastaan Leydigin solujen AR-puutteesta. Peritubulaaristen myoepiteelisolujen suhteen spesifisten ARKO-hiirien kivesten paino sekä sulusolutuotanto laskivat voimakkaasti kontrollihiiriin verrattuna (Welsh ym., 2009). Tutkijat kuitenkin esittävät, että tulokset aiheutuvat Sertolin solujen toimintaan vaikuttavien geenien säätelymuutoksista peritubulaarisissa myoepiteelisoluissa. Eturauhasen tehtävä on tuottaa siemennestettä siittiöiden ravinnoksi ja suojaksi sekä niiden kuljettamista varten. AR:n on todettu vaikuttavan eturauhasen epiteelin kasvuun ja erilaistumiseen. Normaalisissa aikuisen eturauhasessa erilaistunut epiteelisolukko ei kasva edes androgeeneillä stimuloituna, mutta eturauhasen epiteelisoluspesifisissä ARKO-

hiirissä havaittiin eturauhasen kasvua ja rauhas kudoksen erilaistumattomuutta verrattuna kontrolliryhmän hiiriin (Wu ym., 2007). Wu ja kumppanit esittävätkin, että AR säätelee eturauhasepiteelin kasvua joko indusoimalla kasvua estävien tekijöiden toimintaa tai vähentämällä kasvua lisäävien tekijöiden tuottoa. Toinen tutkimus antaa tukea esitykselle, jonka mukaan AR hillitsee eturauhasepiteelin kasvua. Eturauhasepiteelin basaalisolu- ja luumensoluspesifisissä ARKO-hiirikokeissa AR:n todettiin estävän epiteelin kasvua pohjasolukerroksessa, mutta samalla suojaavan pintasolukkoa apoptoosilta (Niu ym., 2008). Myöhemmässä ARKO-hiiritutkimuksessa kuitenkin havaittiin, että eturauhasen epiteelikerrosta tukevassa stroomassa sijaitsevien sileiden lihassolujen AR lisää eturauhasepiteelin kasvua insuliininkaltaisen kasvutekijän kautta (Yu ym., 2011). Myös rakkularauhasessa strooman sileiden lihassolujen AR:n on osoitettu hillitsevän epiteelisolukon kasvua (Welsh ym., 2010). Nämä tulokset vahvistavat näkemyksiä strooman AR:n säätelemästä epiteelisolujen toiminnasta sekä etu- että rakkularauhasessa. Stromaalisella AR:lla on merkittävä tehtävä myös proksimaalisen lisäkiveksen epiteelin kehittämisessä (Krutskikh ym., 2011). Lisäkivesspesifisten ARKO-hiirten proksimaalisen lisäkiveksen epiteelisolut olivat matalampia, ja siementiehyiden välinen tila oli suurempi kuin verrokkihiirillä, jolloin tiehyiden tukkeutuminen solujen kuona-aineilla johti siittiökatoon.

Seksuaalikäyttäytymisen AR-säätelyä on tutkittu useissa rotta- ja hiirikokeissa, ja jäljet ovat johtaneet eläinten aivoihin. Muun muassa urosrotan hypotalamuksen ilmentämä AR on yhdistetty seksuaalikäyttäytymiseen (Fernandez-Guasti ym., 2000). Seksuaaliseen käyttäytymiseen liittyvän androgeenisäätelyn tutkimiseen kehitetyt hermostospesifiset ARKO-uroshiiret osoittivat, että AR:n puuttuminen neuroneista ja gliasoluista aiheutti vähäisen kivesten pienentymisen sekä kohonneet testosteronin, estradiolin ja luteinisoivan hormonin tasot seerumissa (Raskin ym., 2009). Hiirien hedelmällisyys verrattuna kontrollihiiriin oli vaihtelevaa, mutta ARKO-hiiret kykenivät kuitenkin tuottamaan jälkeläisiä. Paritteluun liittyvä käyttäytyminen taantui huomattavasti, eikä osalla uroshiiristä havaittu minkäänlaista seksuaalikäyttäytymistä. Toisessa vastaavassa tutkimuksessa ei puolestaan havaittu eroja kivesten koossa tai hormonitasoissa mutanttien ja kontrolliryhmän välillä (Juntti ym., 2010). Urosten reviiirikäyttäytyminen sekä seksuaalikäyttäytymisen aktivoituminen oli taantunutta, mutta parittelun alkaessa eroja

kontrollihiiriin ei havaittu. Tutkijat esittävätkin, että AR säätelee paritteluun johtavia tapahtumia eikä niinkään parittelun aikaisia tapahtumia.

AR:n vaikutuksia naisen hedelmällisyydessä on tutkittu huomattavasti vähemmän, mutta tähän mennessä tehdyt kokeet osoittavat, että AR:illa on omat tehtävänsä munasarjojen toiminnassa sekä estruskierrossa (Sen ja Hammes, 2010). Granuloosasoluspesifiset ARKO-hiiret tuottivat vähemmän pesueita ja vähemmän poikasia per pesue mahdollisesti AR-puutteen aiheuttaman heikentyneen munarakkulatoiminnan seurauksena.

### 1.3.2. Muut kudokset

Vaikka androgeenien on jo pitkään tiedetty lisäävän lihasten kokoa ja tehoa, tämän säätelymekanismin toimintaa lihaksissa ei ymmärretä kovinkaan hyvin, ja lisätutkimuksille on tarvetta. Lihaskudoksessa muun muassa fibroblastit, mesenkymaaliset kantasolut, satelliittisolut sekä lihassäikeet ilmentävät AR:a ( ks. yleiskatsaus De Gendt ja Verhoeven, 2012). Myosyyttispesifiset ARKO-hiirten peräaukon kohottajalihaksen ja jalan *extensor digitorum longuksen* lihaspaino oli pienempi AR:a normaalisti ilmentäviin hiiriin verrattuna, mutta ARKO-hiirten lihasvoima tai väsyminen ei eronnut kontrolliryhmästä (Ophoff ym., 2009). Lisäksi pohkeen *soleuksen* lihassäikeet erilaistuivat voimakkaammin hitaiksi säikeiksi. Tutkijoiden mukaan AR siis säätelee välilihan lihasten massaa sekä vastaa osaltaan nopeiden lihassäikeiden kehittymisestä. Ophoff ja kumppanit havaitsivat myös, että lihasten AR säätelee vatsansisäisen, mutta ei ihonalaisen rasvakudoksen määrää. Toisella myosyyttispesifisellä ARKO-hiirikannalla tehdyissä kokeissa tulokset olivat erilaisia: AR:a ilmentämättömien hiirien raajojen nopeat ja keskinopeat lihakset olivat huomattavasti heikompia kuin kontrolliryhmällä, mutta niiden koko ei poikennut verrokeista (Chambon ym., 2010). Ristiriitaisten tulosten tärkein huomio lienee, että AR-välitteinen säätely vaihtelee lihastyypin välillä.

Osteoblastispesifisillä ARKO-uroshiirillä tehtyjen kokeiden perusteella AR:n tiedetään säätelevän luukudoksen homeostaasia ja ehkäisevän luukatoa hohkaluussa (Callewaert ym., 2009). AR:n puuttuessa hohkaluun testosteronitaso laskee, luuaineenvaihdunta lisääntyy ja hohkaluun määrä vähenee. Samoissa kokeissa AR:n puutteen todettiin vähentävän myös kuoriluun massaa ja vahvuutta uroshiirillä.

Hermosoluista verisuonten seinämien endoteelisoluhin vapautuva asetyylikoliini stimuloi endoteelisolujen typpioksidisyntaasia, joka puolestaan alkaa tuottaa typpioksidia



arginiinistä. Endoteelisolujen tuottama typpioksidi siirtyy diffuusisti verisuonen seinämän sileisiin lihassoluihin, joissa se käynnistää lihaksen rentoutumiseen johtavan reaktiosarjan. Lihasten rentoutuminen laajentaa verisuonia ja parantaa verenkiertoa. AR-välitteisen säätelyn on todettu vaikuttavan valtimoiden laajenemiseen yhdessä typpioksidisyntaasin kanssa (Lu ym., 2012). Testosteroni-induktio näyttää lisäävän typpioksidituotantoa verisuonten endoteelisoluissa AR:n välityksellä, mutta tarkkaa säätelymekanismia ei vielä tunneta. AR:n on todettu säätelevän myös angiogeneesiä sekä miesten endoteelisoluissa *in vitro* -kokeissa että uroshiirillä *in vivo* -kokeissa (Sieveking ym., 2010). Molemmissa tapauksissa AR-välitteinen angiogeneesi oli verisuonten endoteelikasvutekijästä riippuvaa. Rasvakudoksen AR-säätelyä on tutkittu melko vähän. Adiposyytti-ARKO-hiirillä tehdyissä kokeissa on havaittu, että AR saattaa säädellä adiposyyttien leptiinituotantoa (Yu ym., 2008). ARKO-hiirillä leptiinin erityis oli voimakkaampaa sekä veren kolesteroli- ja triglyseriditasot matalammat kuin kontrollihiirillä. Rasvahappojen hapetusreaktioihin osallistuvien koregulaattoreiden lähetti-RNA-tasot olivat korkeammat ARKO-hiirien valkoisessa rasvakudoksessa kuin kontrolliryhmällä, mutta ruumiinkoossa ei havaittu eroja. Yu ja kumppanit esittävät tulostensa perusteella, että AR:lla on leptiinituotantoa estävä vaikutus rasvakudoksessa, mikä johtaa rasvahappojen kiihtyneeseen hapetukseen ja siten hyperleptinemiaan eli seerumin leptiinitason kohoamiseen. Hypotalamuksen suprakiasmaattinen tumake säätelee käyttäytymisen ja elintoimintojen vuorokausirytmää, ja AR:lla on todettu olevan valoärsykkeiden indusoima säätelyvaikutus suprakiasmaattisen tumakkeen kuorikerroksessa (Butler ym., 2012). Tutkijoiden mukaan AR:lla ja sirkadiaanisella rytmillä saattaa olla yhteys muun muassa urosten kasvussa ja lisääntymisessä.

#### **1.4. AR:iin liittyvät sairaudet**

Kuten edellä todetaan, miehen sukupuolisten ominaisuuksien kehittymisen ja etenkin geenien luennan säätelijänä AR vaikuttaa varsin laaja-alaisesti elimistön toimintaan. AR:n toimintaan liittyviä ja sen mutaatioiden aiheuttamia sairauksia on diagnosoitu useita erilaisia, joista vakavimpia ovat androgeeni-insensitiivisyys (engl. androgen insensitivity syndrome, AIS), spinobulbaarinen lihasatrofia (engl. spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA) ja eturauhassyöpä (engl. prostate cancer, PCa).

AIS:stä kärsivien miesten ulkoiset ja sisäiset sukuelimet eivät kehity normaalisti. Oireyhtymän ominaispiirteisiin lukeutuvat rintojen kehittyminen, kainalo- ja häpykarvoituksen vähäisyys tai puuttuminen, naisen ulkoiset sukupuolielimet sekä laskeutumattomat kivekset (ks. yleiskatsaus Jääskeläinen, 2012). AIS:n jäljet johtavat AR-geeniin, josta on löydetty yli 400 tautimutaatiota – jokaisesta eksonista useampia. Mutaatiot aiheuttavat tilan, jossa miehen androgeenikohde-elinten AR ei enää reagoi androgeeni-induktioon. Kivesten kehittyminen on AR:sta riippumaton tapahtuma, mutta mesonefrisen tiehyen stabiloituminen ja erilaistuminen lisäkiveksiksi, siemenjohtimiksi ja rakkularauhaseksi on testosteronin ja AR:n säätelemää (Renfree ym., 2009). AIS:ssä AR ei kykene reagoimaan testosteroni-induktioon, joten mesonefrisen tiehyen kehitys jatkuu kohti naisen ulkoisia sukuelimiä (ks. yleiskatsaus Sajjad, 2010). Tuore ARKO-hiiritutkimus osoittaa, että kivesten johdattimien (*gubernaculum testis*) AR säätelee kivesten laskeutumista, jolloin AIS-miesten toimimaton AR ei kykene aloittamaan kivesten laskeutumiseen vaadittavien geenien luentaa (Kaftanovskaya ym., 2012). AIS voidaan jakaa fenotyyppien mukaan täydelliseen AIS:een, osittaiseen AIS:een ja lievään AIS:een. Täydellisestä AIS:stä kärsivällä geneettisellä miehellä (46,XY) on naisen ulkoinen fenotyyppi, XY-karyotyyppi sekä normaalisti kehittyneet, mutta laskeutumattomat kivekset, joiden testosteronieritys on niin ikään normaalia. AIS:n lievin muoto tuottaa miehen fenotyypin, mutta yksilöt kärsivät rintojen kasvusta sekä virtsaputken kehityshäiriöistä. Osittainen AIS on laajakirjoinen välimuoto edellä mainittujen ääripäiden väliltä (Hughes ja Deeb, 2006).

Terveillä miehillä AR:n ensimmäisessä eksonissa sijaitseva polyglutamiinitoistojakso sisältää 10–36 glutamiinikodonia. Mikäli toistoja on 38–62, yksilölle kehittyy SBMA eli Kennedyn oireyhtymä (<http://www.omim.org/entry/313200> 11.7.2012). SBMA:n oireet alkavat näkyä yleensä 20–50-vuotiailla miehillä, ja niihin kuuluu raajojen ja ydinjatkeeseen yhteydessä olevien lihasten heikkous, nykiminen ja surkastuminen sekä rintojen kasvu, kivesten surkastuminen ja hedelmättömyys (Harding ym., 1982). Oireet aiheutuvat mutantti-AR:n aggregoitumisesta (Stenoien ym., 1999), mikä johtaa selkäytimen ja aivorungon liikehermojen motoristen tumakkeiden katoon (ks. yleiskatsaus Robitaille ym., 1997). SBMA:aa ei toistaiseksi voida parantaa, mutta oireita voidaan lievittää lääkityksellä. Tauti ei vaikuta elinikään suorasti, mutta esimerkiksi nielun lihasten heikkouden seurauksena ruokaa tai limaa saattaa päästä hengitysteihin, mikä saattaa

aiheuttaa SBMA-potilaalle keuhkokuumeen (<http://www.lihastautiliitto.fi/cgi-bin/wafnet3.pl?id=376&kid=1> 11.7.2012).

AR:n polymorfiset toistojaksot on liitetty myös kaljuuntumiseen (Zhuo ym., 2012) sekä eturauhasen hyvänlaatuisen liikakasvuun (Roberts ym., 2004).

#### 1.4.1. AR eturauhassyövässä

Suomessa PCa:ään sairastuu vuosittain lähes 4500 miestä, mikä kattaa lähes kolmanneksen kaikista Suomessa todetuista syöpätapauksista. PCa:ään kuolee vuosittain noin 800 miestä, ja syöpäkuoleman vaara 75 vuoden ikään mennessä on yhden prosentin luokkaa. Kaikista Suomen syöpäkuolemista PCa aiheuttaa noin 14 % (<http://www.dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/StatsFact.asp?cancer=241&country=246> 11.5.2012). Tällä hetkellä syövän etenemistä voidaan hidastaa erilaisilla hoidoilla ja niiden yhdistelmillä, mutta parantavaa hoitoa ei ole olemassa.

PCa:ssä, kuten muissakin syövyissä, kohdekudokseen kehittyy kasvaimia. Pahanlaatuiset kasvaimet lähettävät syöpäsolujen muodostamia etäpesäkkeitä eli metastaaseja verenkierron mukana muihin kudoksiin, jolloin syöpä pääsee leviämään. Kuten aiemmin on todettu, eturauhasen stromaallinen AR säätelee eturauhasepiteelin erilaistumista sekä hillitsee rauhasen kasvua (Yu ym., 2011). Muutokset AR-geenin sekvenssissä, transkriptiossa, mRNA:n silmukoinnissa tai AR:n aktivoitumisessa sekä koregulaattorivuorovaikutuksissa tai paikallisessa androgeenituotannossa saattavat aiheuttaa muutoksia AR:n toimintaan ja siten johtaa PCa:n kehittymiseen. PCa:n karsinogeneesiä ei edelleenkään tunneta hyvin, mutta androgeenien ja AR:n osuuden näissä tapahtumissa tiedetään olevan suuri.

Valtaosalla PCa-potilaita havaitaan merkittävä AR:n ilmentymisen kasvu eturauhasessa (Visakorpi ym., 1995), ja AR:n määrän lisääntyminen puolestaan edistää syövän etenemistä (Chen ym., 2004). PCa:n alkuvaiheessa taudin eteneminen on androgeeneistä riippuvaista. Eturauhassyöpäsoluilla (LNCaP) tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että androgeenin puute estää solusyklin etenemisen G1-vaiheesta (kasvuvaihe) S-vaiheeseen (DNA:n replikaatio) (Knudsen ym., 1998). Toinen tutkimus tarkensi, että AR säätelee epäsuorasti sykliini D:n (G1-S-siirtymistä säätelevä proteiini) tuotantoa eturauhassyöpäsoluissa, jolloin androgeenien puuttuessa siirtyminen S-vaiheeseen estyy (Xu ym., 2006). PCa:n hoidoksi määrätäänkin usein antiandrogeenejä, jotka estävät AR:n

toiminnan ja pysäyttävät syövän etenemisen. PCa:lla on kuitenkin tapana kehittyä vakavammaksi kastraatioresistentiksi eturauhassyöväksi (engl. castration-resistant prostate cancer, CRPC), jossa androgeenien sitoutumisen estäminen johtaa usein AR:n yli-ilmentämiseen eivätkä antiandrogeenit enää kykene estämään reseptorin toimintaa (Chen ym., 2004). Antiandrogeenihoito saattaa johtaa myös nonmetastaattiseen CRPC:ään, jossa PCa ja metastaasien kasvu on toisistaan riippumatonta. Näillä potilailla metastaasit ilmenevät muita potilaita myöhemmin (Smith ym., 2005).

Useiden AR:n kohdegeenien, joista tunnetuin on eturauhaselle spesifistä antigeeniä (PSA) koodaava *KLK3*, transkriptitasojen on todettu kohoavan PCa:ssä (Dai ym., 1996). PSA ilmentyy eturauhasen epiteelissä, ja sen oletetaan osallistuvan siemennesteen nesteyttämiseen. PSA:ä käytetään yleisesti PCa-diagnostiikassa, mutta koska sen tasot ovat kohonneet myös hyvänlaatuisessa eturauhasen liikakasvussa, se ei ole kovinkaan tarkka metastaattisen syövän indikaattori. *TMPRSS2* on AR:n kohdegeeni, joka koodaa seriiniproteaasi *TMPRSS2*:ta (Lin ym., 1999). *TMPRSS2* ilmentyy voimakkaasti eturauhasen epiteelissä (sekä terveessä kudoksessa että PCa:ssä), mutta sen toimintaa ei tunneta tarkasti (Afar ym., 2001). Kahden PCa:ssä ilmentyvän onkogeenisestä ETS-koregulaattoriperheen proteiineja koodaavan geenin, *ERG*:n ja *ETV1*:n, transkriptiotasojen on niin ikään todettu kasvavan PCa:ssä (Tomlins ym., 2005). Tomlins ryhmineen havaitsi, että sekä LNCaP-soluista että kahdesta PCa-metastaasista löytyneet *ERG* ja *ETV1* olivat fuusioituneet *TMPRSS2*:n kanssa. Näin ollen AR säätelisi näiden onkogeenien luentaa PCa:ssä edistäen syövän leviämistä. Tutkijat esittivät, että *TMPRSS2*:ETS-fuusiot olisivat hyviä ehdokkaita prognoottisiksi syöpämarkkereiksi. Toinen tutkimus kuitenkin osoitti, etteivät *TMPRSS2*:ETS-fuusiot olleet yksiselitteisiä PCa-indikaattoreita (Toubaji ym., 2011). Sen sijaan *ERG*-geenin kasvanut kopiaoluku näytti olevan vahvasti sidoksissa syövän uusiutumiseen. Tuoreessa tutkimuksessa myös muiden ETS-perheen geenien (*ETV1*, *ETV4*, *ETV5* ja *ELK4*) kopiaoluvuilla todettiin olevan yhteys syövän etenemiseen (Shaikhibrahim ym., 2012). Myös solusyklin mitoottisen vaiheen geenien (*CDC20*, *UBE2C* ja *CDK1*) ilmentyminen kasvaa CRPC:ssä (Wang ym., 2009). Wang ja kumppanit havaitsivat, että AR lisää näiden geenien luentaa CRPC:ssä ja siten edistää kasvaimen kasvua.

Tutkimuksissa kasvainten on havaittu sisältävän erilaisia mutantti-AR:ita, joiden aktivoituminen eri ligandien sitoutumisesta on laajentunut muiden steroidihormonien

lisäksi myös antiandrogeneihin (Shi ym., 2002). Esimerkiksi AR, jonka LBD:n histidiini H874 on muuttunut tyrosiiniksi, kykenee sitomaan testosteronin ja DHT:n lisäksi myös verenkierrossa runsaana esiintyvää steroidihormonien esiastetta, dehydroepiandrosteronia (Tan ym., 1997). Toisessa tutkimuksessa AR:n kaksi mutanttimuotoa – AR-L701H ja AR-L701H/T877A – aktivoituivat kortisolin sitoutuessa niiden LBD:iin (Zhao ym., 2000). AR:n mutaatioista yleisimmin havaittu on T877A, jonka ansiosta mutantti-AR kykenee aktivoitumaan androgeenien lisäksi dehydroepiandrosteronista, progesteronista sekä yleisesti PCa:n hoidossa käytetystä antiandrogenistä, flutamidista (Shi ym., 2002). Tutkimuksen mukaan AR-T877A aktivoitui heikosti myös estradiolilla indusoituna. Eräässä tutkimuksessa hoitamattomien ja antiandrogeneilla hoidettujen metastaasien AR-mutaatioita verrattiin keskenään ja havaittiin, että hoidettujen potilaiden metastaasien AR:t sisälsivät enemmän mutaatioita (Steinkamp ym., 2009). Antiandrogenihoito näytti siis tuottavan selektiopaineen vähemmän mutaatioita sisältäviä AR:ita vastaan. AR:n syöpämutaatioita on löydetty myös DBD:sta sekä H:sta (Shi ym., 2002).

Lähetä-RNA:n poikkeavan silmukoinnin tuottamien LBD:n suhteen vajaavaisten AR:ien on havaittu vaikuttavan PCa:n etenemiseen. Kuten osiossa 1.1.1 mainittiin, LBD:n puuttuminen ei estä AR:n aktivoitumista, vaan pikemminkin vapauttaa sen ligandiriippuvuudesta (Jenster ym., 1995; Dehm ym., 2008). Eturauhassyöpäsoluista on löydetty useita aktiivisia AR-variantteja, joista puuttuu LBD (Guo ym., 2004; Guo ym., 2009; Hu ym., 2009; Sun ym., 2010). Näissä tapauksissa antiandrogeniterapia tai edes kastratio eivät kykene estämään AR:n toimintaa. AR-varianttien määrän onkin todettu kasvavan CRPC:n edetessä (Watson ym., 2010). Watson ja kumppanit vertailivat myös eri AR-variantteja keskenään ja huomasivat, että ne eroavat toisistaan toiminnallisesti, vaikka ovatkin rakenteellisesti hyvin samankaltaisia. Esimerkiksi varianteilta, joilta puuttuu kolmas eksoni, puuttuu myös tumalokalisatiosignaali, joten ne eivät siirry omin avuin solun tumaan. Näiden AR-varianttien havaittiin kuitenkin lokalisoituvan tumaan yllättävästi täysimittaisen AR:n avustuksella. Variantin ja villityypin reseptorin vuorovaikutuksen mekanismi on toistaiseksi epäselvä.

Kuten aiemmin on mainittu, eturauhasessa AR:ita löytyy sekä epiteeli- että stroomasolukosta. Vastikään epitelialisen ja stromaalisen AR:n vaikutuksia PCa:n karsinogeneesissä selvittäneessä tutkimuksessa havaittiin, että eturauhasen strooman AR vastaa PCa:n muuttumisesta hyvänlaatuisesta pahanlaatuiseksi, syövän etenemisestä sekä

metastaasista (Ricke ym., 2012). Lisäksi selvisi, että vaikka stromaalisen AR:n merkitys eturauhasen kehityksessä on huomattava, sitä ei tarvita kehittyneen eturauhasen homeostaasissa. Näin ollen stromaaliseen AR:iin kohdistettu hormonaalinen hoito saattaa tarjota uusia mahdollisuuksia taudin pysäyttämiseen mahdollisesti vähäisin sivuvaikutuksin.

### 1.5. AR:n translaation jälkeiset muokkaukset

AR altistuu monenlaisille translaation jälkeisille muokkauksille, joiden vaikutusten selvittäminen on vasta alussa. AR:iin voidaan liittää kovalenttisesti fosfaattiryhmiä, asetyyliryhmiä tai metyyliiryhmiä, mutta siihen voidaan myös konjugoida ubikitiini- tai SUMO-proteiineja. Lähes kaikki translaation jälkeiset muokkaukset vaikuttavat AR:n säätelemään geenien luentaan ja osa myös reseptorin lokalisaatioon, vakauten sekä solujen kasvuun, joten niillä saattaa olla suurikin vaikutus PCa:n fysiologiassa (ks. yleiskatsaus Gioeli ja Paschal, 2012).

Fosforylaatio on aminohapoissa mitattuna yleisin AR:n translaation jälkeinen muokkaus. AR sisältää 16 fosforyloituvaa aminohappoa, joista 13 sijaitsee NTD:ssa. DBD, H ja LBD sisältävät kukin yhden fosforyloituvan seriinin. NTD:n fosforyloituvat aminohapot ovat myös pääasiassa seriinejä, mutta joukossa on lisäksi kolme tyrosiinia ja yksi treoniini (ks. yleiskatsaus Gioeli ja Paschal, 2012). Eri aminohappojen fosforylaatioista vastaavat erilaiset kinaasit, kuten sykliiniriippuvaiset kinaasit (engl. cyclin-dependent kinase, CDK), AKT, Aurora A ja MAP-kinaasit.

Sykliineistä riippuvainen kinaasi CDK9 fosforyloi AR:n seriini S81:n, joka on vilkkain kohta androgeenin indusoimalle fosforylaatiolle (Gordon ym., 2010). S81:n fosforyloituminen tehostaa solujen kasvua sekä *TMPRSS2*- ja *ORM1*-geenien luenta, joten sillä on osuus AR:n geenien luennan säätelyssä. Myös CDK1:n on todettu fosforyloivan S81:tä estäen AR:n hajotuksen, mutta CDK1:n fosforyloima S81 ei vaikuta AR-välitteiseen transkriptioon (Chen ym., 2006). Raportoiijageenikokeissa CDK7:n fosforyloiman S515:n on havaittu aktivoivan AR-välitteistä transkriptiota (Chymkowitch ym., 2011). Lisäksi S515:n fosforylaatio nopeuttaa AR:n hajoamista (engl. turnover). CDK11:n katalysoima S308:n fosforylointi puolestaan hillitsee AR:n säätelemää geenien luenta (Zong ym., 2007).

AKT-kinaasin on havaittu fosforyloivan AR:n S213:a ja S791:tä (Wen ym., 2000). AKT-välitteisen fosforyloinnin vaikutuksia selvittäneiden tutkimusten tulokset ovat kuitenkin vaihtelevia. Edellä mainitun tutkimuksen mukaan S213:n ja S791:n fosforylaatio indusoi AR-välitteistä transkriptiota ja siten solujen eloonjäämistä sekä jakautumista, kun taas Lin ja kumppanit osoittavat, että LNCaP-solulinjan varhaisessa vaiheessa AKT vaimentaa AR:n toimintaa, mutta aktivoi sitä jakokertojen karttuessa (Lin ym., 2003). Taneja kumppaneineen puolestaan esittää, että S213:n fosforylaatio on soluspesifistä ja rajoittuu tiettyihin yksilönkehitysvaiheisiin (Taneja ym., 2005).

Aurora A on kinaasi, joka fosforyloi AR:n treoniini T282:n ja seriini S293:n (Shu ym., 2010). Tutkijat havaitsivat, että Aurora A:n indusoimat fosforylaatiot ovat androgeeneistä riippumattomia ja ne lisäävät AR:n transkriptionaalista aktiivisuutta.

Epidermaalisen kasvutekijän aktivoimat mitogeneeniaktivoitu proteiinikinaasi (engl. mitogen-activated protein kinase, MAPK) ja proteiinikinaasi C (PKC) fosforyloivat AR:n S515:tä (MAPK) ja S578:aa (PKC), jolloin AR:n palautuminen tumasta solulimaan nopeutuu (Ponguta ym., 2008). Tutkimuksen mukaan S578:n fosforylaatio on olennainen epidermaalisen kasvutekijän välittämälle geenien luennan AR-säätelyn kannalta, ja se myös stabiloi S515:n fosforylaatiota. MAPK-kinaasi 4:n aktivoima c-Jun N-terminaalikinaasi (JNK) fosforyloi AR:n S650:tä, ja saman seriinin kykenee fosforyloimaan myös MAPK-kinaasi 6:n aktivoima p38 (Gioeli ym., 2006). MAPK-kinaasi 4 ja 6 ovat niin kutsuttuja stressikinaaseja, jotka aktivoituvat esimerkiksi fyysikaalisen stressin seurauksena. Ne säätelevät muun muassa solujakautumista ja apoptoosia. MAPK-kinaasien 4 ja 6 indusoima S650:n fosforylaatio hillitsee AR-välitteistä geenien luentaa ja vauhdittaa AR:n kuljetusta solulimaan.

Epidermaalinen kasvutekijä aktivoi myös tyrosiinikinaaseja Ack1 ja Src. Nämä kinaasit fosforyloivat AR:n tyrosiineja Y267, Y363 (Ack1) (Mahajan ym., 2007) ja Y534 (Src) (Guo ym., 2006). Molemmat ryhmät esittävät, että näiden tyrosiinien fosforylaatio aktivoi AR:a, mutta aktivoituminen saattaa vaatia muiden tekijöiden osallistumista.

AR:n defosforylaatio on vähemmän tutkittu aihe kuin fosforylaatio, ja sen vaikutukset ovat vielä epäselviä. On kuitenkin osoitettu, että kaksi fosfataasia, proteiinifosfataasit PP1 $\alpha$  ja PP2A, sitoutuvat AR:iin (Yang ym., 2005; Chen ym., 2009). PP1 $\alpha$  defosforyloi AR:n fosfoseriini S650:tä, joten se todennäköisesti tasapainottaa stressikinaasien säätelmää

AR:n toimintaa (Chen ym., 2009). PP2A puolestaan defosforyloi viittä AR:n fosfoseriiniä (Yang ym., 2005), ja sen vaikutus AR:n toimintaan on inhiboiva.

AR:n asetylaatio säätelee koregulaattorien sitoutumista AR:iin ja tehostaa siten reseptorin transaktivaatiota sekä PCa:n etenemistä (Fu ym., 2003). Asetyloituvat lysiinit sijaitsevat vierekkäin AR:n H:lla (K630, K632 ja K633) muodostaen KLKK-asetylaatiomotiivin, jota histoniasetyylitransferaasit p300, P/CAF ja Tip60 asetuloivat (Fu ym., 2000; Gaughan ym., 2002) ja histonideasetylaasit HDAC1 ja SIRT1 deasetuloivat (Gaughan ym., 2002; Fu ym., 2006). AR:n asetylaatio tehostaa sen koregulaattoriaffiniteettia sekä transkriptionaalista aktiivisuutta (Fu ym., 2003; Gong ym., 2006).

Myös AR:n metylaatio kohdistuu H:n KLKK-motiiviin. Yhden ryhmän mukaan histonimetyylitransferaasi Set9 metyloi AR:n lysiini K630:a (Ko ym., 2011). Immunopresipitaatiokokeidensa perusteella toinen ryhmä väittää Set9-välitteisen metylaation kohdistuvan lysiini K632:een (Gaughan ym., 2011). Molemmat ryhmät kuitenkin esittävät, että metylaatio tehostaisi AR:n intramolekulaarisia N/C-vuorovaikutuksia tehostaen AR-välitteistä transkriptiota.

Ubikitinaatio on prosessi, jossa ubikitiiniproteiineja konjugoidaan kohdeproteiinin pintaan. Ubikitiiniketju toimii signaalina proteasomeissa tapahtuvaa proteiinien hajotusta varten, minkä avulla solu pääsee eroon tehtävänsä jo tehneistä tai haitallisista proteiineista. E3-ubikitiiniligaasit CHIP ja MDM2 vastaavat AR:n ubikitinaatiosta, joka johtaa proteasomeilla tapahtuvaan hajotukseen (Lin ym., 2002; Rees ym., 2006). Vastoin tavanomaista ubikitiinivälitteistä proteasomaalista hajotusta, E3-ubikitiiniligaasi RNF6:n välittämä lysiinien K845 ja K847 ubikitinaatio johtaa AR:n transaktivaatioon (Xu ym., 2009), joten RNF6:lla on mahdollisesti vaikutus PCa:n etenemiseen.

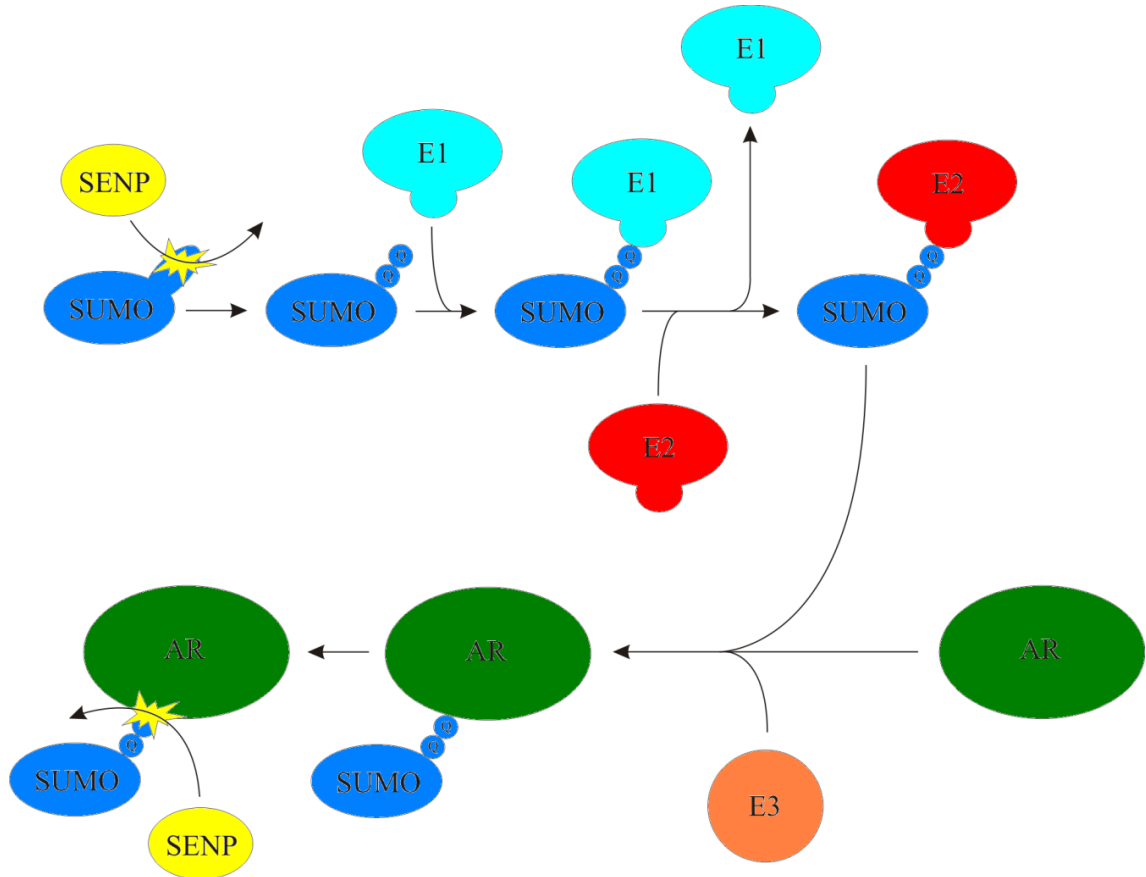
### 1.5.1. Sumoylaatio

Sumoylaatio on mekanismiltaan edellä mainitun ubikitinaation kaltainen prosessi, mutta sen seuraukset ovat erilaiset. SUMO (engl. small ubiquitin-related modifier) -proteiinit ovat läheistä sukua ubikitiinille, ja myös sumoylaatioon osallistuvat entsyymit muistuttavat ubikinaatioon osallistuvia entsyymejä. Ubikitinoituneet proteiinit kuljetetaan proteosomille hajotettavaksi, mutta proteiinien sumoylaation vaikutukset ovat verrattain huonosti tiedossa.



Ihmisen genomissa on neljä SUMO-perheen proteiineja koodaavaa geeniä: *SUMO1* (lokus 2q33), *SUMO2* (lokus 17q25.1), *SUMO3* (lokus 21q22.3) ja *SUMO4* (lokus 6q25). SUMO-4 on yhdistetty I $\kappa$ B $\alpha$ :n muokkauksiin ja sitä kautta diabetekseen (Guo ym., 2004), mutta sillä ei tiettävästi ole tekemistä AR:n kanssa. *SUMO1* koostuu viidestä eksonista, ja se koodaa 101 aminohapon pituista SUMO-1-proteiinia. *SUMO2* ja *SUMO3* koostuvat puolestaan neljästä eksonista, ja ne koodaavat 95 aminohapon SUMO-2-proteiinia ja 102 aminohapon SUMO-3-proteiinia (Su ja Li, 2002). SUMO-1-proteiinisekvenssin identtisyys verrattuna SUMO-2:een ja SUMO-3:een on 44 % ja SUMO-2:n ja SUMO-3:n sekvenssien identtisyys on 86 %, joten kaikilla näillä kolmella SUMO:lla on selkeästi yhteinen evolutiivinen historia.

SUMO-proteiinien konjugaatio kohdeproteiiniin tapahtuu neljässä vaiheessa (Kuva 6), josta ensimmäisessä – heti translaation jälkeen – SUMO-proteiinien esiasteiden C-terminaalien diglysiinimotiivit leikataan esiin (ks. yleiskatsaus Wang ja Dasso, 2009). Nisäkkäillä leikkaamisen hoitavat sentriinispesifiset proteaasit (engl. sentrin-specific protease, SENP). Toisessa vaiheessa aktivoiva entsyymi E1 (ihmisellä SAE1:n ja SAE2:n muodostama heterodimeeri) katalysoi tioesterisidoksen muodostumista E1:n ja SUMO:n C-terminuksen välille (Yunus ja Lima, 2006). Kolmannessa vaiheessa aktivoitunut SUMO siirtyy seuraavalle entsyymille – E2:lle (ihmisellä UBC9) – sitoutumalla sen aktiivisessa kohdassa olevaan kysteiiniin. On esitetty, että E2 vaikuttaa substraatin SUMO:n kanssa vuorovaikuttavassa motiivissa olevan lysiinin orientaatioon ja siten pienentää sen pK-arvoa helpottaen SUMO:n konjugoitumista substraattiin (Yunus ja Lima, 2006). E2 myös kuljettaa SUMO:n substraatille. Neljännessä vaiheessa SUMO-ligaasi E3 avustaa SUMO:n glysiinin liittämistä substraatin lysiiniin isopeptidisidoksella (ks. yleiskatsaus Geiss-Friedlander ja Melchior, 2007). Tietyt SUMO-proteiinit voivat sitoutua toisiinsa isopeptidisidoksin muodostaen ketjuja substraatin pinnalle (Tatham ym., 2001). Tätä tapahtumaa katalysoivat E1- ja E2-entsyymit. Sumoylaatio on reversiibeli tapahtuma, joten SUMO-konjugoidut proteiinit voidaan myös irrottaa kohdeproteiinin pinnasta. Dekonjugaatiosta vastaavat SENP:t (SENP1, -2, -3, -5, -6 ja -7), joista osa vastaa myös SUMO-proteiinien translaation jälkeisestä proteolyttisestä käsittelystä (ks. yleiskatsaus Geiss-Friedlander ja Melchior, 2007). Dekonjugaatiossa entsyymit katkovat isopeptidisidokset irrottaen SUMO:t substraatin pinnasta ja toisistaan.



Kuva 6. Yksinkertaistettu kaavakuva AR:n sumoylaatiosta ja desumoylaatiosta. Sumoylaation aluksi SENP leikkaa SUMO:n diglysiinimotiivin esiin. Sitten E1 sitoutuu glysiineihin ja aktivoi SUMO:n, minkä jälkeen SUMO siirtyy E2:lle. E3 katalysoi SUMO:n liittämisen AR:n pintaan. Desumoylaatiassa SENP katkoo isopeptidididokset AR:n ja SUMO:n väliltä.

AR:n NTD:ssa on kaksi sumoylaatioon tarvittavan konsensussekvenssin (I/L/V)KXE ympäröimää lysiiniä (Poukka ym., 2000). Nämä lysiinit ovat K386 ja K520, joista K386:n on todettu sumoyloituvan tehokkaammin. Sumoylaatio voi tapahtua sekä tumassa että solulimassa, ja androgeeni-induktio tehostaa SUMO-proteiinien konjugoitumista AR:n pintaan (Kaikkonen ym., 2009). SUMO-1:n liittämistä AR:iin edistävät E3-ligaasit PIAS1 ja PIAS $\alpha$  (Nishida ja Yasuda, 2002; Kotaja ym., 2002), ja AR:iin sitoutuneen SUMO-1:n dekonjugoinnista vastaavat puolestaan SENP1 ja SENP2 (Kaikkonen ym., 2009). AR:n sumoyloitumisen vaikutuksista tiedetään toistaiseksi melko vähän, mutta esimerkiksi Poukka kumppaneineen havaitsi, että sumoyloittumaton AR-K386R/K520R-mutantti oli transkriptionaalisesti aktiivisempi kuin villityypin reseptori, joten sumoylaatio näyttäisi vaimentavan AR:n säätelemää geenien luentaa (Poukka ym., 2000). Lisäksi sumoylaatiopaikkojen ja LBD:n on havaittu olevan tärkeitä korepressorien sitoutumiselle (Moehren ym., 2007).

## 1.6. AR:n kanssa toimivat koregulaattorit

AR:n kanssa yhdessä yhteistyössä toimivat koregulaattorit voidaan jakaa koaktivaattoreihin ja korepressoreihin. Niitä yhdistävät LXXLL:n ja FXXLF:n kaltaiset motiivit, joiden välityksellä sitoutuminen AR:n NTD:iin ja LBD:iin tapahtuu. Koregulaattorit vastaavat AR:n translaation jälkeisistä muokkauksista sekä kromatiinin rakenteen muutoksista, jotka vaikuttavat AR-välitteiseen geenien luentaan. Osa koregulaattoreista sisältää useita motiiveja, joista kukin osallistuu eri reseptorin toiminnan säätelyyn (Ding ym., 1998).

Jotta AR voi sitoutua DNA:han, tiukkaan pakattu kromatiinirakenne pitää avata. Histoniproteiinit H2A, H2B, H3 ja H4 muodostavat oktameerin, jossa on kaksi kappaletta kutakin histoniproteiinia. Histonikompleksit sitovat DNA:ta ympärilleen muodostaen nukleosomeja, jotka käyvät läpi samanlaisia translaation jälkeisiä muokkauksia kuin AR. Nämä muokkaukset muuttavat DNA:n ja histonien välisiä vuorovaikutuksia tehden kromatiinin kierteisyyden joko väljemmäksi tai tiheämmäksi. AR:n yhteydessä mainitut histoniasetyylitransferaasit liittävät histonien lysiineihin asetyyliryhmiä väljentäen kromatiinin rakennetta ja helpottaen samalla koregulaattoreiden sitoutumista DNA:han. Esimerkiksi AR:akin asetyloivien p300:n ja P/CAF:n sekä SRC-1:n on todettu asetyloivan histoneita (Chen ym., 1997; Spencer ym., 1997). Histonideasetyylitransferaasit puolestaan poistavat asetyyliryhmiä histoneilta ja siten tiivistävät histoni-DNA-vuorovaikutuksia pakaten kromatiinin tiheämmäksi.

Toinen kromatiinin rakennetta avaava mekanismi on SWI/SNF-kompleksin säätelämä ATP:n energialla tapahtuva muokkaaminen, jonka toimintaa tai muokkaustapaa ei tunneta tarkkaan (Zofall ym., 2006). SWI/SNF-kompleksin, jossa ATPaasi BRM on mukana, on todettu indusoivan AR-välitteistä geenien luentaa (Marshall ym., 2003). Link ja kumppanit havaitsivat, että SWI/SNF-kompleksin BAF57 sitoutuu AR:n DBD:iin sekä H:een, ja sen toiminnan estäminen johtaa AR-välitteisen geenien luennan vähenemiseen (Link ym., 2005; Link ym., 2008). Myös toisen SWI/SNF-kompleksin proteiinin, BAF60:n, on havaittu sitoutuvan AR:iin ja säätelevän sen välittämää transkriptiota (van de Wijngaart ym., 2009).

Niin kutsuttu mediaattori on valtava 30 alayksikön transkriptiota säätelevä proteiinikompleksi, joka toimii AR:a, koregulaattoreita ja RNA-polymeraasi II:ta yhdistävänä siltana (ks. yleiskatsaus Malik ja Roeder, 2005). Mediaattori osallistuu sekä

AR-välitteiseen että AR:sta riippumattomaan transkriptioon eturauhassyöpäsoluissa (Vijayvargia ym., 2007), vaikkakin mediaattorin suoran sitoutumisen AR:iin on todettu olevan heikkoa (Coulthard ym., 2003).

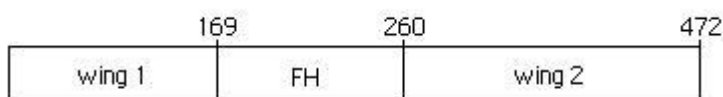
Ligandin sitoutuessa AR:n LBD:iin, reseptorin konformaatio muuttuu, ja LBD:iin syntyy neljän heliksin (3,4,5 ja 12) muodostama koregulaattorien sitomistasku (Darimont ym., 1998). LBD sitoo pääasiallisesti FXXLF-motiivin sisältäviä koregulaattoreita, kuten myös NTD:sta löytyvää FQNLF-motiivia AR:n dimerisoitumisen yhteydessä (He ym., 2000). N/C-vuorovaikutukseen osallistuvan FQNLF-motiivin on havaittu sitovan SRC-koaktivaattoreita, joiden sitoutumisen AR:n NTD:iin ajatellaan katalysoivan FQNLF-motiivin ja LBD:n välisen vuorovaikutuksen syntymistä (Ma ym., 1999). AR-koaktivaattoreiden ARA54, ARA55 ja ARA70 sekä AR-repressori hRad9:n on todettu sitoutuvan LBD:iin FXXLF-motiiviansa välityksellä (He ym., 2002; Wang ym., 2004). Myös LXXLL-motiiveja sisältävien koregulaattorien on todettu sitoutuvan LBD:iin, mutta vuorovaikutus ei ole yhtä vahva kuin FXXLF-motiiveilla (Dubbink ym., 2004). AR:n koregulaattorien sitoutumista NTD:iin ei tunneta yhtä hyvin, mutta esimerkiksi AF-1:stä löydetyn L/HX<sub>7</sub>LL-motiivin on otaksuttu sitovan NCoR-repressorikompleksin proteiinia Tab2, mikä johtaisi AR-välitteisen geenien luennan vaimenemiseen (Zhu ym., 2006). Lisäksi AF-5:n on puolestaan havaittu sitovan voimakkaasti SRC-koaktivaattoreita (Alen ym., 1999).

Androgeenien kanssa sitoutumisessa kilpailevien antiandrogeenien havaittiin aiheuttavan eroja AR:n koregulaattorien sitoutumiseen. Esimerkiksi bikalutamidilla indusoituna AR sitoi korepressoriproteiineja, kuten NCoR-kompleksia, SMRT:tä sekä histonideasetylaaseja HDAC1 ja HDAC2, *KLK3*:n promoottorialueella, mutta ei tehostaja-alueella (Shang ym., 2002). Myöhemmin NCoR:n ja SMRT:n on kuitenkin havaittu sitoutuvan myös agonistin sitomaan AR:iin (Hodgson ym., 2005), joten repressiota tapahtuu myös aktivoituneen AR:n välityksellä.

### 1.6.1. FoxA1

FoxA1 (engl. forkhead box A1), aikaisemmalta nimeltään HNF-3 $\alpha$  (engl. hepatocyte nuclear factor 3 $\alpha$ ) tai TCF-3A (engl. transcription factor 3A), on koregulaattori, joka kuuluu HNF-superperheeseen. Perheestä on erotettu selkärankaisten HNF-koregulaattorit omaksi joukokseen ja ne on nimetty uudelleen Fox:ksi (Kaestner ym., 2000). Fox-perheen

eri proteiinit on lajiteltu fylogeneettisesti ja koodattu kirjain-numero-yhdistelmällä, joten esimerkiksi FOXA1 on ihmisen (isot kirjaimet) Fox-proteiinien alaluokan A jäsen 1. Pelkästään ihmisen genomista on löydetty 43 Fox-perheen proteiinia koodaavaa geeniä. FOXA1:tä koodaava geeni sijaitsee kromosomissa 14 lokuksessa 14q12-q13 (Mincheva ym., 1997) ja koostuu kahdesta eksonista (Ensembl: ENST00000250448). FOXA1 on 472 aminohappoa pitkä ja 49,1 kDa painava proteiini (Kuva 7). Sen DNA:ta sitova forkhead-domeeni (FH) on 92 aminohappoa pitkä (<http://www.uniprot.org/uniprot/P55317> 11.7.2012).



Kuva 7. FOXA1:n domeenirakenne, jonka keskellä on DNA:han sitoutuva forkhead-domeeni (FH). FH-domeenin molemmilla puolilla on niin kutsutut ”siipidomeenit” (wing 1, wing 2).

Fox-proteiineja kutsuttiin aiemmin ”siivekkäiksi kierteiksi” (vrt. engl. winged helix/forkhead) niiden rakenteen takia. Fox-proteiinien toiminnan kannalta oleellisin domeeni – forkhead (FH) – koostuu kahdesta  $\alpha$ -kierteestä. Nämä  $\alpha$ -kierteet muodostavat pihdin (engl. forkhead), jolla Fox-proteiini sitoutuu DNA:n suuriin uurteisiin (vrt. engl. major groove) (ks. yleiskatsaus Augello ym., 2011). Kierteiden sivustoilla on silmukat, joiden on esitetty vuorovaikuttavan DNA:ssa olevien pienten uurteiden kanssa (vrt. engl. minor groove) (Cirillo ja Zaret, 2007). Röntgenkristallografian avulla määritellyssä proteiininirakenteessa nämä silmukat muistuttavat siipiä, mistä vanha lempinimi ”siivekkäät kierteet” on syntynyt.

FOXA-proteiinit löydettiin alun perin maksasta (mistä alkuperäinen nimikin tulee), jossa niiden todettiin osallistuvan geenien luennan säätelyyn (Costa ym., 1989). Nykyään FOXA1:n tiedetään ilmentyvän useissa kudoksissa, joista haiman Lagerhansin saarekkeet, munuaisen tiehyet sekä rinnan, kilpirauhasen ja eturauhasen rauhaskudokset edustavat voimakkainta FOXA1:n ilmentämistä (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000129514/normal> 11.7.2012). Hiiren alkioilla tehdyissä kokeissa FoxA1:n on todettu ilmentyvän alkionkehityksen aikana alkeisjuovan myöhäisessä kehitysvaiheessa keskiviivan endodermissä sekä sen jälkeen hermostoputken pohjalevyssä, selkäjänteessä sekä ruoansulatuskanavassa (Sasaki ja Hogan, 1993; Monaghan ym., 1993; Ang ym., 1993). Aikuisilla hiirillä tehdyt immunohistokemialliset kokeet paljastivat FoxA1:n ilmentyvän

useissa kudoksissa, kuten aivoissa, ruoansulatuskanavassa, hengityselimissä ja urosten lisääntymiselimissä – myös eturauhasessa (Besnard ym., 2004). FoxA1:tä ei kuitenkaan havaittu imukudoksessa, lihaksissa, verenkiertoelimistössä, luissa, rustossa tai rasvakudoksessa eikä naaraiden sisäisissä lisääntymiselimissä.

Niin ikään aiemman nimeämisen mukaisesti Fox-proteiinit lokalisoituvat solun tumaan, jossa ne toimivat niin kutsuttuina pioneeritekijöinä avaten kromatiinin tiukkaan pakattua nukleosomirakennetta (Cirillo ym., 2002). FoxA-proteiinit tunnistavat DNA:sta (A/C/G)A(A/T)T(G/A)TT(G/T)(G/A)(C/T)T(C/T)-konsensussekvenssin, johon ne sitoutuvat (Overdier ym., 1994). Hiljattain FoxA1-spesifisillä geenien tehostajajaksoilla havaittiin DNA:n demetyloitumista, jonka ajatellaan stabiloivan FoxA1:n sitoutumista sekä lisäävän muiden koregulaattoreiden värväämistä ja siten tehostavan geenien luentaa (Serandour ym., 2011). Lisäksi vastaavien nukleosomien histoni H3:ssa olevan lysiini 4:n (H3K4) havaittiin metyloituvan.

### 1.6.2. FoxA1 ja AR

Tuoreessa AR:n ja FoxA1:n sitoutumispaikkoja kartoittaneessa tutkimuksessa FoxA1:n todettiin indusoivan AR:n sitoutumista tietyillä kromatiinialueilla ja estävän AR:an sitoutumasta toisille alueille (Sahu ym., 2011). Lisäksi osa AR:n sitoutumisesta ilmeni olevan FoxA1:stä riippumatonta. Onkin havaittu, että FoxA1:n vaimentaminen indusoi mediaattorikompleksin Med12:n ja histoniasetyylitransferaasi p300:n sitoutumista DNA:han, mikä puolestaan mahdollistaa AR-välitteisen geenien luennan (Wang ym., 2011). FoxA1 sitoutuu AR:n DBD:iin ja siten molemmat proteiinit kykenevät sitoutumaan DNA:han toistensa välityksellä, vaikka oma konsensussekvenssi ei olisi lähelläkään (Yu ym., 2005).

PCa:ssä FoxA1-tasojen on havaittu nousevan AR-tasojen mukaisesti eturauhassyöpöpotilailla, mikä korreloi myös potilaiden Gleasonin luokitusten kanssa (Sahu ym., 2011). Lisäksi AR:n kohdegeenin, mitoosia indusoivaa proteiinia koodaavan *UBE2C*:n, tehostaja-alueen H3K4:n metyloitumisen ja FoxA1:n sitoutumisen on havaittu lisääntyvän CRPC:ssä (Wang ym., 2009). Yleisesti PCa:ään liitettyjen *TMPRSS2*:n ja *KLK3*:n AR-välitteinen säätely osoittautui olevan FoxA1:stä riippumatonta, ja FoxA1:n vaimentaminen jopa lisäsi näiden geenien transkriptiota (Sahu ym., 2011). Näistä tuloksista päätellen FoxA1:llä on sekä indusoiva että repressoiva vaikutus AR:n geenien

luentaan kohdegeenistä riippuen. Wang ja kumppanit esittävät, että FoxA1:n ja AR:n välinen vuorovaikutus estäisi AR:a sitoutumasta tietyille ARE:ille ja selittäisi siten FoxA1:n aiheuttaman repression (Wang ym., 2011). FoxA1:n ja AR:n yhdessä säätelemä transkriptio-ohjelma on joka tapauksessa soluspesifinen ja myös omanlaisensa verrattuna ilman FoxA1:tä toimivaan AR:iin (Sahu ym., 2011; Wang ym., 2011).

Molekulaarinen apokriininen rintasyöpä on mielenkiintoinen esimerkki AR:n toiminnasta poikkeusoloissa. Molekulaarinen apokriininen rintasyöpä on harvinainen rintasyövän muoto, jossa estrogeenireseptori  $\alpha$ :n puuttuminen valjastaa AR:n estrogeenireseptorin tilalle. Sairautta jäljittelevällä solumallilla tehdyissä kokeissa AR:n sitoutuminen kromatiiniin vastasi estrogeenireseptorin sitoutumista rintasyöpäsoluissa (Robinson ym., 2011). Lisäksi FoxA1:n ja AR:n sitoutumispaikkojen välillä havaittiin suuri yhteneväisyys, joten tutkijat esittävät, että molekulaarisessa apokriinisessä rintasyövässä FoxA1 indusoi AR-välitteistä transkriptio-ohjelmaa samaan tapaan kuin PCa:ssä.

## 2. Tutkimuksen tarkoitus

AR on solusyklin, miehen seksuaalielinten kehityksen ja geenien luennan säätelijänä (niin normaaleissa kudoksissa kuin syövässäkin) tärkeä molekyyli. Sen toiminta on erilaisten ligandien, translaation jälkeisten muokkausten sekä koregulaattoreiden säätelyinä monimuotoista, ja mekanismit näiden tapahtumien takana ovat vasta avautumassa tutkijoille.

AR:iin liittyviä sairauksia – etenkin CRPC:ää – vastaan kehitellään jatkuvasti uusia yhdisteitä, ja yksi lupaavimmista antiandrogeneista on MDV3100. Edellisten tutkimusten mukaan MDV3100 estää AR:n translokaation tumaan, mihin yhdisteen AR:n toimintaa hillitsevä teho perustuukin. Tässä tutkimuksessa selvitettiin kuinka tehokkaasti MDV3100 estää AR:n tumatranslokaation verrattuna muihin AR-ligandeihin.

FoxA1 on suhteellisen vähän tutkittu, mutta kasvavan mielenkiinnon kohteena oleva koregulaattori, joka raivaa tietä muille geenien luentaa sääteliville tekijöille. PCa:ssä FoxA1-tasojen on havaittu kohoavan yhdessä AR-tasojen kanssa, ja lisäksi FoxA1:n on todettu sekä tehostavan että vaimentavan AR:n säätelyä geenien luentaa sitoutumalla AR:n DBD:iin. FoxA1:llä näyttäisi siis olevan merkittävä asema PCa:ään liittyvässä geenien luennassa. FOXA1:n ja AR:n kolokaalisatiota soluissa tutkittiin eri AR-ligandeilla indusoituna konfokaalimikroskopian avulla. Tutkimusten avulla pyrittiin selvittämään eri ligandien vaikutusta kolokalisaatioon ja sen voimakkuuteen.

Sumoylaatio vaimentaa tutkimusten mukaan AR-välitteistä geenien luentaa, joten sumoylaatioreitin toiminnan muuttuminen PCa:ssä saattaa edistää taudin kehittymistä. Sumoylaation vaikutuksia ei kuitenkaan tunneta täysin, ja esimerkiksi sumoylaation välittämät AR:n ja kromatiinin väliset vuorovaikutukset ovat hämärän peitossa. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli myös selvittää sumoylaatiopaikkojen vaikutusta AR:n tumansisäiseen liikkuvuuteen sumoylaatiopaikoistaan mutatoituneen AR:n avulla. Tulokset saattavat tarjota uutta tärkeää tietoa sumoylaatiopaikkojen merkityksestä AR:n ja transkriptiokompleksien sekä kromatiinin välisistä vuorovaikutuksista.



### 3. Materiaalit ja menetelmät

#### 3.1. Soluviljely

Kokeissa käytettiin Flp-In<sup>TM</sup>-293-soluja (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat), jotka pohjautuvat ihmisen alkion munuaisesta eristettyyn HEK-293-solulinjaan (engl. human embryonic kidney). Kaikki soluviljelmät jaettiin kolmen neljän päivän välein 1:8. Inkubaattorikaapin (Heraeus<sup>®</sup>) lämpötila oli 37 °C ja ilman hiilidioksidipitoisuus oli 5 %.

Transfektoitavia Flp-In<sup>TM</sup>-293-soluja ylläpidettiin ennen transfektiota Dulbecco's Modified Eagle Mediumilla (DMEM, Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat), johon oli lisätty 10 % (v/v) naudan sikiön seerumia (fetal bovine serum, FBS), 100 U/ml penisilliini ja 100 µg/ml streptomysiini (EuroClone S.p.A., Pero, Milano, Italia) sekä 100 µg/ml Zeocin<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat).

pFRT-EGFP-AR:lla (pcDNA5/FRT-ilmentämisvektoriin kloonattu villityypin EGFP-AR) transfektoitua Flp-In<sup>TM</sup>-293-solulinjaa ylläpidettiin hygromycin-ylläpitomediumilla (DMEM, 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml penisilliini, 100 µg/ml streptomysiini, 100 µg/ml hygromycin B (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat)).

pFRT-EGFP-AR-K386R/K520R-transfektion jälkeen Flp-In<sup>TM</sup>-293-solujen selektioon ja ylläpitoon käytettiin hygromycin-ylläpitomediumia.

Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -solujen ylläpidossa käytettiin DMEM:a, johon oli lisätty 10 % (v/v) FBS sekä antibiootit 100 U/ml penisilliini ja 100 µg/ml streptomysiini.

Jakojen yhteydessä solut irrotettiin kasvatusmaljoilta 0,25 % (w/v) trypsiini, 0,5 mM etyleenidiamiinitetraetikkahapolla (EDTA).

#### 3.2. AR:n lokalisatio Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR -soluissa

Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR -solut jaettiin µ-Slide 8 well ibiTreat - kahdeksankuoppalevyille (Ibidi, München, Saksa) 15 000 solua/kuoppa ylläpitomediumiin ilman hygromycin B:tä. Kahden vuorokauden kasvatuksen jälkeen soluille lisättiin ligandit: 0,01 % (v/v lopputilavuudesta) etanoli negatiiviseksi kontrolliksi, 10 nM R1881 (säilytys absoluuttisessa etanolissa -20 °C; Perkin-Elmer Inc, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat), 10 µM bikalutamidi (säilytys absoluuttisessa etanolissa -20 °C; Bidragon Pharmservice LLC, Burlingame, Kalifornia, Yhdysvallat) ja 10 µM MDV3100 (säilytys

DMSO:ssa -20 °C; Selleck Chemicals Co. Ltd, Houston, Texas, Yhdysvallat). Soluja inkuboitiin kaksi tuntia (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ennen kuvantamista.

Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR -solujen kuvantamiseen käytettiin Zeiss Axio Observer -mikroskooppia, johon oli liitetty Zeiss LSM 700 -konfokaalimoduuli sekä Zeiss XL-LSM S1 -inkubaattori lämmitettävällä tasolla. Inkubaattorin olosuhteiksi asetettiin 37 °C ja 5 % CO<sub>2</sub>. Kuvantamisessa käytettiin 63x öljyobjektiveja ja 488 nm laseria sekä Zeiss:n Zen 2009 -kuvantamisohjelmaa. Konfokaalimikroskoopilla otetut kuvat siirrettiin Adobe Photoshop CS2 -kuvankäsittelyohjelmaan, jonka avulla laskettiin solujen soluliman ja tumien välinen intensiteettiero. Kunkin solun tumasta ja solulimasta rajattiin edustava alue, jonka intensiteetti tarkastettiin. Intensiteetit laskettiin jokaisen käsittelyn kohdalla sadasta solusta. Intensiteetit koottiin taulukoksi Microsoft Office Excel 2007:llä, jonka avulla kunkin solun tuman intensiteetistä vähennettiin soluliman intensiteetti. Solut luokiteltiin intensiteettien erotusten perusteella. Solut, joissa tuman ja soluliman intensiteettien erotukseksi saatiin  $0 \pm 10$ , edustivat AR:n yhtäläistä levittäytymistä koko solun alueelle, solut, joissa tuman ja soluliman erotukseksi saatiin  $> 10$ , edustivat AR:n lokalisoitumista tumaan ja solut, joiden tuman ja soluliman erotukseksi saatiin yli 100, edustivat lähes täydellistä AR:n tumalokalisaatiota. Vastaavasti negatiiviset arvot edustivat AR:n lokalisoitumista soluliman puolelle.

### 3.3. FOXA1:n kloonauksen pmCherry-C1-vektoriin

FOXA1:n DNA-sekvenssi monistettiin kokonaisen FOXA1-cDNA:n sisältävästä pBluescriptR-FOXA1-plasmidista (Genome Biology Unit, Helsingin yliopisto) polymeraasiketjureaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) avulla. PCR-monistamista varten suunniteltiin alukkeet, jotka tilattiin Oligomeriltä (Oligomer Oy, Helsinki, Suomi) (Taulukko 1).

Taulukko 1. FOXA1:n sekvenssin PCR-monistukseen suunnitellut alukkeet. Sekvenssien alleviivatut osat ovat restriktioentsyymien tunnistuskohtia.

	Restriktioentsyymi	Sekvenssi
Forward-aluke	SacI	5'-CAG GGT <u>GGA GCT CGG</u> ATG TTA G-3'
Reverse-aluke	BamHI	5'-CAG TCC <u>GGA TCC</u> CTA GGA AGT G-3'

PCR tehtiin kolmessa 20 µl reaktiossa steriiliin veteen (Baxter Healthcare, Deerfield, Illinois, Yhdysvallat) laimennetussa Phusion® GC -puskurissa (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat) Phusion® DNA-polymeraasilla (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat) valmistajan ohjeiden mukaisesti (Taulukko 2). PCR:ssa käytettiin GC-puskuria FOXA1-sekvenssin korkean guaniini-sytosiini-suhteen takia. Myös dimetyylisulfoksidia (DMSO: Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat) lisättiin denaturoitumistehokkuuden parantamiseksi.

Taulukko 2. PCR-reaktioiden sisältämät reagenssit ja niiden loppupitoisuudet.

Reagenssi	Pitoisuus
Phusion GC -puskuri	1 x
dNTP-seos	200 µM/NTP
Forward-aluke	0,5 µM
Reverse-aluke	0,5 µM
pBluescriptR-FOXA1	0,05 ng/µl (1 ng)
DMSO	3 % (v/v)
Phusion DNA-polymeraasi	200 U/µl

PCR:ssa käytettiin 68 °C:n sitoutumislämpötilaa (Taulukko 3), joka määritettiin Finnzymesin  $T_m$  Calculatorilla ([http://www.finnzymes.fi/tm\\_determination.html](http://www.finnzymes.fi/tm_determination.html) 2.12.2011). Lisäksi käytettiin 64 ja 66 °C:n sitoutumislämpötiloja optimaalisen sitoutumislämpötilan määrittämiseksi. PCR-ohjelma toteutettiin Biometra T3 Thermocyclerilla.

Taulukko 3. FOXA1:n monistukseen käytetty PCR-ohjelma.

	Lämpötila (C°)	Aika (s)	Syklit (kpl)
Alkudenaturaatio	98	30	1
Denaturaatio	98	10	
Sitoutuminen	64/66/68	30	35
Pidennys	72	45	
Loppupidennys	72	600	1
Jäähdytys	4	∞	

PCR-tuotteet värjättiin SYBR<sup>®</sup> Green I:llä (Molecular Probes<sup>™</sup>, Invitrogen<sup>™</sup>, Eugene, Oregon, Yhdysvallat) ja Southern-värillä (6x Southern-väriliuos: 0,15 % bromifenolisininen (Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa), 60 % glyseroli) sekä tarkastettiin agarosigeelielektroforeesilla (AGE). AGE:ssa geelinä käytettiin 1 % (w/v) agarosia (Invitrogen<sup>™</sup>, Life Technologies, Paisley, Skotlanti, Iso-Britannia) TAE-puskurissa. Näytteiden ajo geelille tapahtui 100 V jännitteellä (Biometra Standard Power Pack P25) 45 minuutin ajan. Monistuneet FOXA1-sekvenssit leikattiin irti geelistä ja puhdistettiin QIAquick Gel Extraction Kit:llä (QIAGEN, Hilden, Saksa) valmistajan ohjeiden mukaisesti käyttäen Eppendorf Centrifuge 5424 -pöytäseentrifuugia. Ohjeista poiketen puhdistettu DNA eluoiitiin lopuksi 30 µl:lla steriiliä vettä.

FOXA1:n sekvenssi kloonattiin Anna Akhmanovalta (Utrecht University, Alankomaat) saatuun pmCherry-C1-vektoriin, joka sisältää fluoresoivaa mCherry-proteiinia koodaavan sekvenssin. FOXA1 liitettiin pmCherry-C1:n kloonauskohtaan (engl. multiple cloning site, MCS) SacI- (5') ja BamHI-endonukleaasien (3') leikkauskohtiin. Vektori ja monistettu insertti digestoititiin FastDigest SacI- ja BamHI-endonukleaaseilla (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat) FastDigest-puskurissa (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Digestio-olosuhteet olivat 35 minuuttia 37 °C vesihauteessa. Molempien entsyymien määrä reaktioissa oli 1 FDU (FastDigest Unit). Digestoidut näytteet puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kit:llä (QIAGEN, Hilden, Saksa) valmistajan ohjeiden mukaisesti käyttäen Eppendorf Centrifuge 5424 -pöytäseentrifuugia. Ohjeista poiketen puhdistettu DNA eluoiitiin 30 µl:lla steriiliä vettä.

Ennen ligaatiota vektorin ligoituminen itsensä kanssa estettiin Antarctic Phosphatase - käsittelyllä (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Yhdysvallat) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Fosfataasin määrä 33,3 µl reaktiossa oli 5 U ja defosforylaatio tehtiin Antarctic Phosphatase -puskurissa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Yhdysvallat) 37 °C vesihauteessa tunnin ajan. Fosfataasikäsittelyn jälkeen DNA puhdistettiin QIAquick PCR Purification Kit:llä valmistajan ohjeiden mukaisesti käyttäen Eppendorf Centrifuge 5424 -pöytäseentrifuugia. Puhdistettu DNA eluoiitiin 30 µl:lla steriiliä vettä.

Ligaatioissa käytettiin 50 ng pmCherry-C1-vektoria sekä emäsparimäärään suhteutettuna kuusin- ja kymmenkertainen määrä (6 x 1400 bp / 4700 bp x 50 ng ≈ 89,36 ng ja 10 x 1400

bp / 4700 bp x 50 ng  $\approx$  148,94 ng) FOXA1-inserttiä. Ligaatiot tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti 20  $\mu$ l reaktiotalavuudessa T4-ligaatiopuskurissa (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Yhdysvallat), jossa T4 DNA-ligaasin (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Yhdysvallat) määrä oli 400 U. Reaktioseosta inkuboitiiin jäädytetyssä blokissa (Eppendorf ThermoStat Plus) 16 °C:ssa yön yli. Ennen transformaatiota T4 DNA-ligaasi inaktivoitiin 65 °C lämpöblokissa kymmenen minuutin ajan.

pmCherry-FOXA1 transformoitiin kompetentteihin JM109-soluihin (Promega, Madison Wisconsin, Yhdysvallat) lämpöshokin avulla. 50  $\mu$ l JM109-soluja sulatettiin jäällä ja niiden sekaan pipetoitiin ligaatioseosta 1:6 (10  $\mu$ l). Ligaatioseoksen ja solujen annettiin inkuboitua jäällä kymmenen minuuttia. Tämän jälkeen seos siirrettiin 42 °C vesihauteeseen 50 sekunniksi ja taas jälle kahdeksi minuutiksi. Selektiota varten transformoidut solut maljattiin kanamysiiniä (50  $\mu$ g/ml) sisältävälle LB-maljalle (engl. lysogeny broth) ja inkuboitiiin (37 °C) yön yli. Kasvaneista bakteeripesäkkeistä tehtiin 5 ml kasvatukset LB:ssä, johon oli lisätty 50  $\mu$ g/ml kanamysiini. Kasvatuksia inkuboitiiin ravistellen (200 rpm, 37 °C) yön yli. Ligaation onnistuminen tarkastettiin eristämällä konstrukti transformoiduista soluista QuickLyse<sup>®</sup> Miniprep Kit:llä (QIAGEN Sciences, Germantown, Maryland, Yhdysvallat) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Ohjeista poiketen puhdistettu DNA eluotiiin 30  $\mu$ l:lla steriiliä vettä. DNA digestoitiiin uudestaan SacI- ja BamHI-endonukleaaseilla ja digestiotuotteet tarkastettiin AGE:lla (1 % agarosigeeli, 100 V elektroforeesi TAE-puskurissa).

5 ml kasvatuksista tehtiin 100 ml massakasvatukset LB:ssä, johon oli lisätty 50  $\mu$ g/ml kanamysiini. Massakasvatuksia inkuboitiiin ravistellen (200 rpm, 37 °C) yön yli, minkä jälkeen DNA puhdistettiin QIAfilter<sup>™</sup> Plasmid Maxi Kit:llä (QIAGEN, Hilden, Saksa) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Puhdistettu DNA eluotiiin TE-puskuriin (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) niin, että loppupitoisuudeksi tuli 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. DNA:n kunto tarkastettiin vielä digestoimalla se FastDigest SacI- ja BamHI-endonukleaaseilla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Digestioaika oli 35 minuuttia 37 °C vesihauteessa. DNA:n määrä 10  $\mu$ l reaktiossa oli 100 ng/ $\mu$ l, ja molempien entsyymien määrä reaktioissa oli 0,5 FDU. Digestiotuotteet tarkastettiin AGE:lla (1 % agarosigeeli, 100 V elektroforeesi TAE-puskurissa).

Lisäksi mCherry-FOXA1:n ilmentymistä testattiin transfektoimalla se Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -soluihin, joihin oli aiemmin transfektoitu tyhjä pcDNA5/FRT-ilmentämisvektori. Soluja jaettiin 6-kuoppalevyille 70 000 solua/kuoppa ylläpitomediumissa. Solujen annettiin kasvaa kaksi vuorokautta 37 °C:ssa ja 5 % CO<sub>2</sub>:ssa. Neljä tuntia ennen transfektioita soluille vaihdettiin transfektiomedium (DMEM, 2,5 % (v/v) aktiivihiihlistripattu FBS). Transfektioit tehtiin TransIT<sup>®</sup>-LT1-transfektioagenssilla (Mirus, Madison, Wisconsin, Yhdysvallat) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Soluihin transfektoitiin 200 ng, 500 ng ja 800 ng pmCherry-FOXA1:tä, ja ilmentymisen annettiin tapahtua kaksi vuorokautta 37 °C:ssa ja 5 % CO<sub>2</sub>:ssa. Tämän jälkeen solut kerättiin kuopilta SDS-PAGE:a ja western blotia varten (Liite 1). Primäärivasta-aineena käytettiin kanin polyklonaalista IgG FOXA1-vasta-ainetta (Abcam<sup>®</sup>), joka laimennettiin 1:1000 pesupuskuriin (TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20). Sekundäärivasta-aineena käytettiin piparjuuriperoksidaasikonjugoitua vuohen anti-kani IgG:tä (Molecular Probes<sup>TM</sup>, Invitrogen<sup>TM</sup>, Eugene, Oregon, Yhdysvallat), joka laimennettiin 1:3000 pesupuskuriin. ECL-detektiossa valotuksen pituus oli yksi sekunti.

### 3.4. AR:n ja FOXA1:n kolokalisaatio

Kolokalisaation tutkimisessa käytettiin Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -solulinjaa, johon oli stabiilisti transfektoitu tyhjä pcDNA5/FRT-ilmentämisvektori. Solut jaettiin µ-Slide 8 well ibiTreat -kahdeksankuoppalevyille 10 000 solua/kuoppa ylläpitomediumiin ilman hygromycin B:tä, ja niiden annettiin kasvaa kaksi vuorokautta (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). pmCherry-FOXA1 sekä pEGFP-AR transfektoitiin soluihin TransIT<sup>®</sup>-LT1-transfektioagenssilla valmistajan ohjeiden mukaisesti (Taulukko 4). Neljä tuntia ennen transfektioita soluille vaihdettiin transfektiomedium (DMEM, 2,5 % (v/v) aktiivihiihlistripattu FBS).

Taulukko 4. Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -soluihin transfektoidut plasmidit määriin. pSG5-vektori toimi täytevektorina, jonka avulla transfektoitavan DNA:n määrä nostettiin 100 ng:aan.

pSG5 (täytevektori)	80 ng
pEGFP-AR	10 ng
pmCherry-FOXA1	10 ng

Transfektioituja soluja inkuboitiin yön yli (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ja kaksi tuntia ennen kuvantamista puolelle kuopista lisättiin 10 nM R1881 sekä toiselle puolelle negatiiviseksi kontrolliksi 0,01 % (v/v lopputilavuudesta) etanoli.

Toinen koejärjestely tehtiin edeltävällä tavalla, mutta kuopille jaettujen solujen määrä oli 15 000 solua/kuoppa ja soluihin transfektoitiin 20 ng pEGFP-AR:a ja pmCherry-FOXA1:tä (Taulukko 5).

Taulukko 5. Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -soluihin toisessa kokeessa transfektoidut plasmidit määrineen. Sekä pEGFP-AR:n että pmCherry-FOXA1:n määrä nostettiin 20 ng:aan. Vastaavasti pSG5:n määrä laskettiin 60 ng:aan, jotta DNA:n kokonaismäärä pysyisi samana kuin edellisessä kokeessa.

pSG5 (täytevektori)	60 ng
pEGFP-AR	20 ng
pmCherry-FOXA1	20 ng

Transfektioituja soluja inkuboitiin yön yli (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), ja kaksi tuntia ennen kuvantamista kuopille lisättiin 10 µM bikalutamidi tai 10 µM MDV3100. Kontrollina käytettiin sekä 0,01 % (v/v lopputilavuudesta) etanolia että 10 nM R1881:tä.

Kuvantaminen tehtiin Zeiss Axio Observer -mikroskoopilla, johon oli liitetty Zeiss LSM 700 -konfokaalimoduuli sekä Zeiss XL-LSM S1 -inkubaattori lämmitettävällä tasolla. Inkubaattorin olosuhteiksi asetettiin 37 °C ja 5 % CO<sub>2</sub>. Kuvantamisessa käytettiin 63x öljyobjektiveja, 488 nm ja 555 nm lasereita sekä Zeiss:n Zen 2009 -kuvantamisohjelmaa. Kolokalisaatiota tarkasteltiin Zen 2009:n kolokalisaatiotyökalun avulla, jolloin ohjelma ilmaisi kolokalisoituneet fluoroforit omalla värillä erotuksena kolokalisoitumattomista fluoroforeista. Ohjelma tuotti kuvista lisäksi hajontakuvaajan (engl. scatter plot), jossa kolokalisaatio määrittyy pikselin tarkkuudella. Transientin transfektion aiheuttamien solukohtaisten ilmentymiserojen takia laserien tehoja vaihdeltiin solusta riippuen. Näin kolokalisaatiota kyettiin havainnoimaan myös proteiineja epätasaisemmin ilmentävissä soluissa. Laserien tehon suhteelliset solukohtaiset erot on ilmoitettu tulosten yhteydessä (Kuva 11). Zen 2009:llä otetut kuvat käsiteltiin Adobe Photoshop CS2:lla, jonka avulla kuvista rajattiin tumat. Rajatut tumat siirrettiin CorelDRAW X3:een, jossa kuvat koostettiin solutyypin ja käsittelyn mukaan. Kuvien värejä, kontrastia tai kirkkautta ei säädetty missään vaiheessa.

### 3.5. Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solulinjan valmistus

Nestetyypen säilötyt Flp-In<sup>TM</sup>-293-solut sulatettiin, ja solut siirrettiin 10 cm maljalle ylläpitomediumiin (DMEM, 10 % (v/v) FBS, 100 U/ml penisilliini ja 100 µg/ml

streptomysiini). Maljaamisen jälkeen soluja inkuboitiin vuorokausi (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Toisena päivänä soluille vaihdettiin tuore ylläpitomedium, johon oli lisätty 100 µg/ml Zeocin™. Antibiootin lisäämisen jälkeen soluja inkuboitiin kaksi vuorokautta (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Neljäntenä päivänä solut jaettiin kahdelle 10 cm maljalle (3 000 000 solua/malja) ylläpitomediumiin ilman antibiootteja (DMEM, 10 % (v/v) FBS). Viidentenä päivänä toisen maljan soluihin transfektoitiin pcDNA5/FRT-ilmentämisvektoriin (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat) liitetty EGFP-AR-K386R/K520R. Transfektio tehtiin Lipofectamine 2000 -transfektioagenssin (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat) avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti. DNA:n määrä transfektiossa oli 1 µg pcDNA/FRT-EGFP-AR-K386R/K520R-ekspressioplasmidia ja 9 µg Flp-rekombinaasia koodaavaa pOG44-plasmidia (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat). DNA-Lipofectamine-kompleksien annettiin muodostua 20 minuutin ajan Opti-MEM I -mediumissa (Gibco®, Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat) huoneenlämmössä ennen transfektiota. Kuudentena päivänä soluille vaihdettiin tuore antibiootiton ylläpitomedium, ja seitsemäntenä päivänä transfektoidut solut jaettiin kahdelle maljalle 1:2 hygromycin-ylläpitomediumissa. Myös transfektoimattomalle kontrollimaljalle vaihdettiin hygromycin-ylläpitomedium. Tuore hygromycin-ylläpitomedium vaihdettiin soluille tästedes kolmen neljän päivän välein, kunnes transfektoimattomat solut kuolivat pois, ja selviä solupesäkkeitä ilmaantui. Solut pestiin PBS:llä, irrotettiin (0,25 % (w/v) trypsiini 0,5 mM EDTA) ja suspensoitiin ylläpitomediumiin. Solut siirrettiin 10 cm maljoille hygromycin-ylläpitomediumiin ja niitä kasvatettiin inkubaattorikaapissa (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Soluille vaihdettiin tuore hygromycin-ylläpitomedium kolmen neljän päivän välein 10 cm maljoille siirtämisen jälkeen.

### **3.6. Villityypin AR:n ja AR-K386R/K520R-mutantın vertailu**

Sumoyloitumisen tarkastelua varten Flp-In™-293 FRT-EGFP-AR ja Flp-In™-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solut jaettiin 6-kuoppalevyille 250 000 solua/kuoppa ylläpitomediumiin ilman hygromycin B:tä, ja solujen annettiin kasvaa neljä vuorokautta (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Kolme tuntia ennen solujen keräämistä, puolelle kuopista lisättiin 10 nM R1881 ja toiselle puolelle 0,01 % (v/v lopputilavuudesta) etanoli negatiiviseksi kontrolliksi. Tunti ennen solujen keräämistä solut altistettiin lämpöstressille (1 h



lämpökaapissa 43 °C:ssa), minkä jälkeen solut kerättiin kuopilta SDS-PAGE:a ja western blotia varten (Liite 1). Primäärivasta-aineena käytettiin kanin polyklonaalista AR-vasta-ainetta K183 (tarkkaa kuvausta varten ks. Karvonen ym., 1997), joka laimennettiin 1:10 000 pesupuskuriin. Sekundäärivasta-aineena käytettiin piparjuuriperoksidaasi-konjugoitua vuohen anti-kani IgG:tä (Molecular Probes™, Invitrogen™, Eugene, Oregon, Yhdysvallat), joka laimennettiin 1:3000 pesupuskuriin. ECL-detektiossa valotuksen pituus oli 30 sekuntia.

Raporttoijageenimäärityksiä varten Flp-In-293 FRT-EGFP-AR ja Flp-In-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solut jaettiin omille 12-kuoppalevyilleen 100 000 solua/kuoppa ylläpitomediumiin ilman hygromycin B:tä, ja solujen annettiin kasvaa kaksi vuorokautta (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Soluihin transfektoitiin kahta erilaista lusiferaasikonstruktiota, joista toinen oli liitetty probasiini- ja toinen ARE2-TATA-promoottoriin (Taulukko 6). Lisäksi soluihin transfektoitiin β-galaktosidaasia koodaava plasmidi.

Taulukko 6. Flp-In-293 FRT-EGFP-AR ja Flp-In-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -soluihin transfektoidut plasmidit määrineen. pSG5:tä käytettiin tasaamaan plasmidien kokonaismäärä 500 ng:aan.

pSG5 (täytevektori)	280 ng
pCMV-βgal	20 ng
pPB(-285/+32)-Luc tai pGL3-ARE2-TATA-Luc	200 ng

Neljä tuntia ennen transfektioita soluille vaihdettiin transfektiomedium (DMEM, 2,5 % (v/v) aktiivihiihlistripattu FBS). Transfektiot tehtiin TransIT<sup>®</sup>-LT1-transfektioareagenssilla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Vuorokauden kuluttua puolelle transfektoiduista soluista lisättiin 10 nM R1881 sekä toiselle puolelle 0,01 % (v/v lopputilavuudesta) etanoli, ja solujen annettiin inkuboitua yön yli (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Raporttoijageenimääritysten protokolla löytyy liitteestä 2.

FRAP:a (engl. fluorescence recovery after photobleaching) varten Flp-In<sup>™</sup>-293 FRT-EGFP-AR ja Flp-In<sup>™</sup>-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -soluja jaettiin μ-Slide 8 well ibi-Treat -kahdeksankuoppalevyille 15 000 solua/kuoppa ylläpitomediumiin ilman hygromycin B:tä. Soluja inkuboitiin kaksi vuorokautta (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), minkä jälkeen

niille lisättiin 10 nM R1881 ja 10  $\mu$ M bikalutamidi transfektiomediumissa (DMEM, 2,5 % (v/v) aktiivihiihlistripattu FBS) kaksi tuntia ennen FRAP:a.

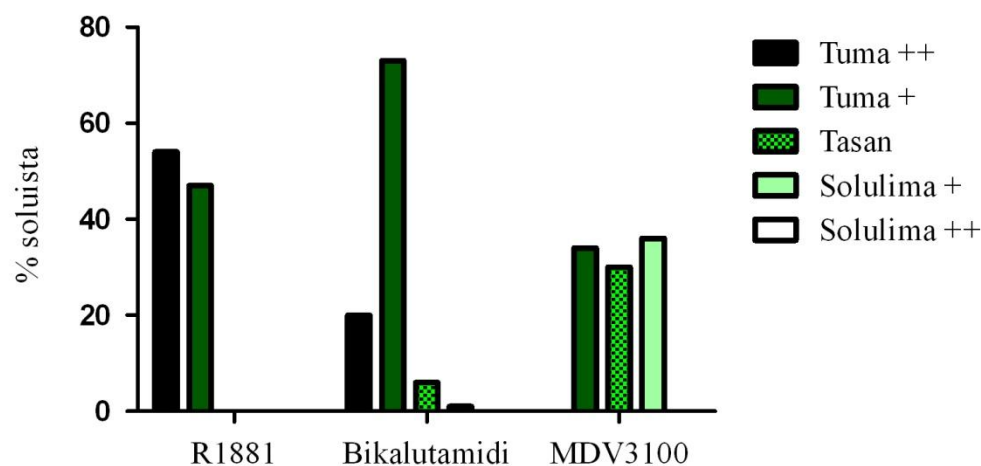
FRAP tehtiin Zeiss Axio Observer -mikroskoopilla, johon oli liitetty Zeiss LSM 700 -konfokaalimoduuli sekä Zeiss XL-LSM S1 -inkubaattori lämmitettävällä tasolla. Inkubaattorin olosuhteiksi asetettiin 37 °C ja 5 % CO<sub>2</sub>. Kuvantamisessa käytettiin 63x öljyobjektiveja ja Zeiss:n Zen 2009 -kuvantamisohjelmaa.

Bleach eli fluoroforien tuhoaminen tehtiin 488 nm laserilla sadalla iteraatiolla (kesto noin kolme sekuntia) laserin tehon ollessa 100 %. Soluja kuvattaessa laserin teho oli 17 %. Solut kuvattiin 30 kertaa, joista viidennen jälkeen fluoroforit tuhottiin solujen tumista suorakaiteen muotoiselta rajatulta alueelta (ROI, engl. region of interest; 2,772 x 9,9  $\mu$ m, noin 25 % tuman pinta-alasta). Fluoresenssin palautumista tarkkailtiin 25 kuvan eli noin 25 sekunnin ajan. Zen-ohjelma lasi fluoresenssin palautumisesta puoliajan ( $t_{half}$ ), jonka avulla proteiineja voidaan verrata toisiinsa liikkuvuuden perusteella. Vertailua varten kuvattiin 50 solua, ja tulokset analysoitiin Microsoft Office Excel 2007:llä, jonka avulla fluoresenssin palautumisen puoliajoista laskettiin keskiarvot, keskihajonnat sekä keskivirheet. Tilastolliset merkitsevyydet laskettiin Microsoft Office Excel 2007:n T-testin avulla (kaksisuuntainen kahden otoksen testi).

## 4. Tulokset

### 4.1. AR:n lokalisatio androgeenin ja antiandrogeenien indusoimana

Androgeeni-induktio (R1881) sai AR:n siirtymään solujen tumaan (100 % soluista), mutta antiandrogeeneilla indusoidaessa AR:n lokalisatio oli vaihtelevampaa (Kuva 8, Liite 3).

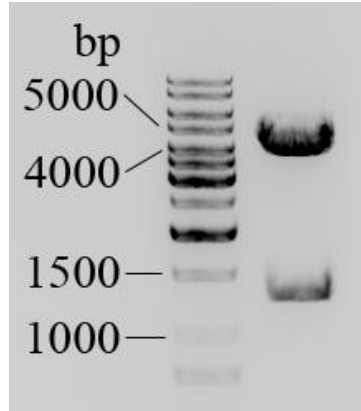


Kuva 8. AR:n lokalisoituminen Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR -soluissa (n = 100). Solut on luokiteltu lokalisation mukaan viiteen ryhmään tumaan tai solulimaan lokalisoitumisen voimakkuuden mukaan.

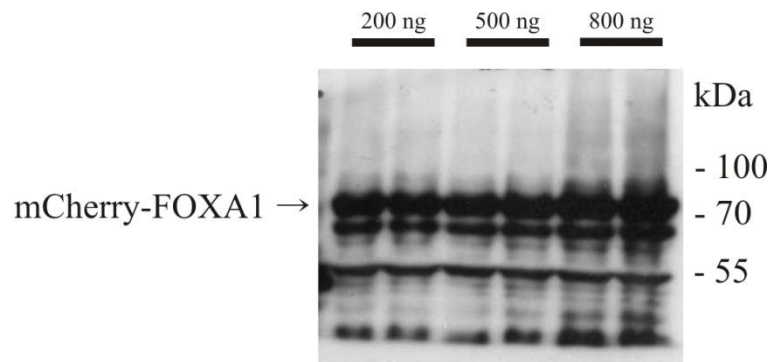
Bikalutamidin ja MDV3100:n välillä oli huomattava ero: bikalutamidi sai AR:n lokalisoitumaan pääosin tumaan (93 %), mutta MDV3100:n vaikutuksesta suurimmassa osassa soluja (36 %) AR pysyi solulimassa. Seuraavaksi eniten (34 %) oli soluja, joissa AR oli tuman puolella. Vähiten (30 %) oli soluja, joissa AR oli jakautunut tasaisesti tuman ja soluliman välille.

### 4.2. pmCherry-FOXA1-konstruktin valmistaminen

SacI:llä ja BamHI:llä digestoitu pmCherry-FOXA1 pilkkoutui kahteen osaan, joiden koot vastasivat yhteen liitettyjen pmCherry-C1-vektorin ja FOXA1-insertin kokoja (Kuva 9). Konstruktin sekvensointi vahvisti konstruktin sisältävän *mCherry*-geenin sekvenssin, jonka 3'-päästä alkoi *FOXA1*-geenin sekvenssi. Lisäksi pmCherry-FOXA1-transfektio Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -soluihin tuotti oikean kokoista fuusioproteiinia (FOXA1 + mCherry ≈ 78 kDa), joka leimautui FOXA1-vasta-aineella blottauksessa (Kuva 10).



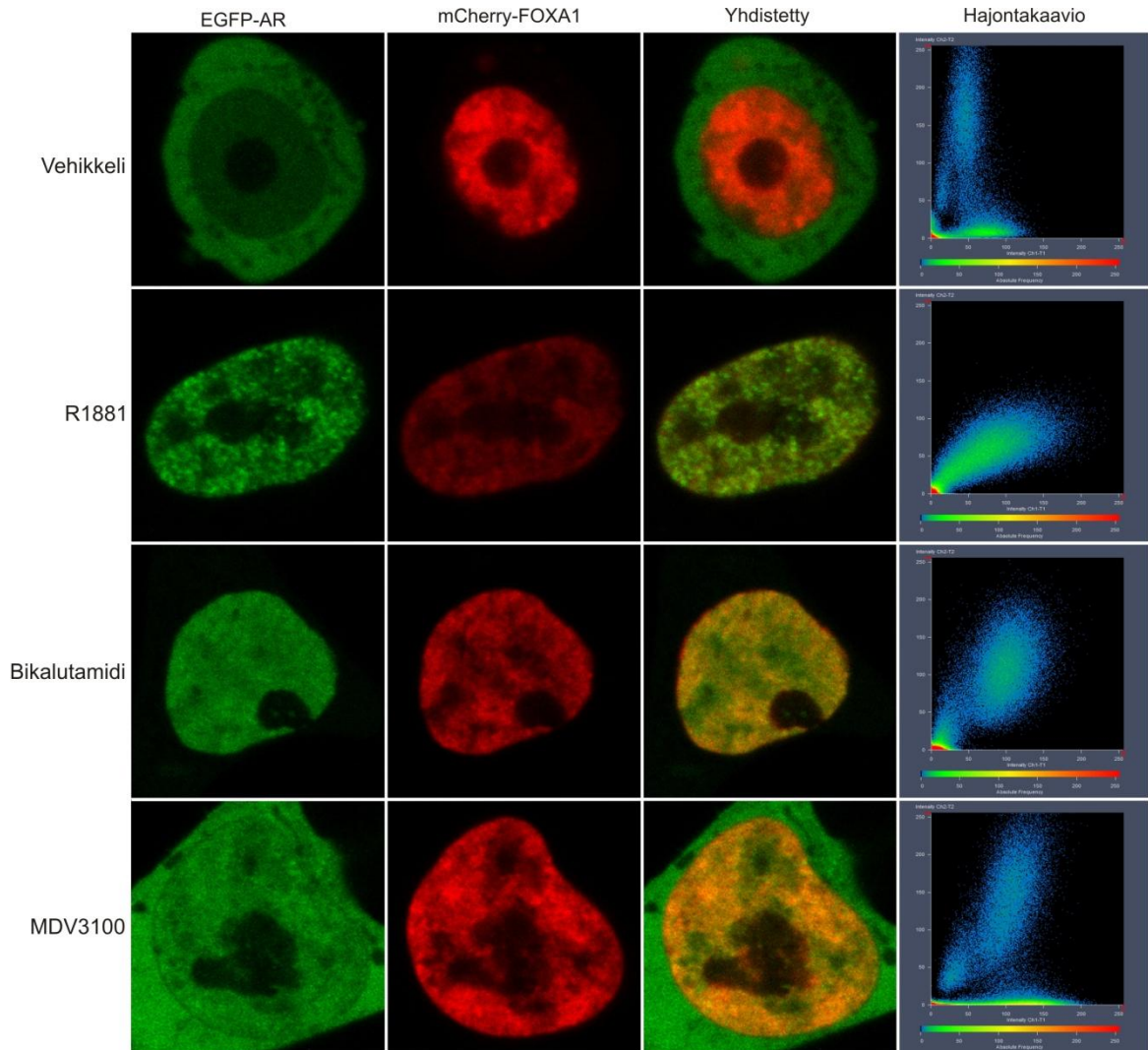
Kuva 9. Tarkastus-AGE:ssa SacI:llä ja BamHI:llä pilkottu pmCherry-FOXA1 ajautui kahtena palana, joiden koot vastasivat yhteen liitettyjä pmCherry-C1-vektoria (noin 4700 bp) ja FOXA1-inserttiä (noin 1400 bp).



Kuva 10. Western blot 200 ng:lla, 500 ng:lla ja 800 ng:lla pmCherry-FOXA1:tä transfektoiduista Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -soluista. mCherry-FOXA1 näkyy paksuimpana raitana nuolen osoittamassa kohdassa noin 78 kDa:n kohdalla. Blottauksessa primäärivasta-aineena käytettiin kanin polyklonaalista IgG FOXA1-vasta-ainetta.

### 4.3. AR:n ja FOXA1:n kolokalisaatio

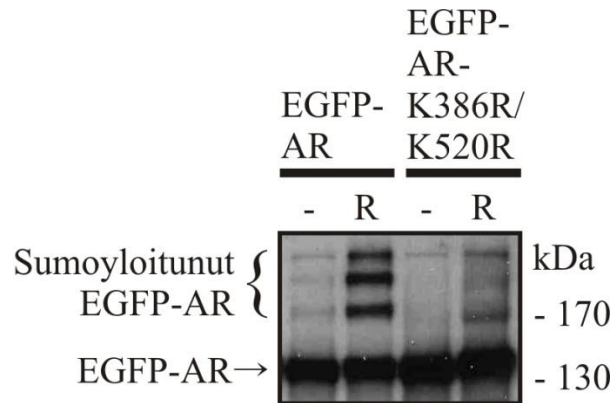
Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -soluissa tehdyissä kokeissa FOXA1 lokalisoitui tumaan käsittelystä riippumatta. AR:n lokalisaation voimakkuus vaihteli eri ligandeilla indusoituna (Kuva 11). AR lokalisoitui etanolikäsittelyllä (vehikkeli) pääasiallisesti solulimaan ja androgeenikäsittelyllä (R1881) pääasiallisesti tumaan. Antiandrogeenikäsittelyllä saatiin vaihtelevia tuloksia: bikalutamidilla indusoitu AR lokalisoitui tumaan, mutta MDV3100-induktiolla AR lokalisoitui solulimaan, tumaan tai osaksi molempiin (kuvaan on valittu tasaista tuma-solulima-jakautumista edustava solu). Kolokalisaatiota havainnollistavista hajontakaavioista selviää, että kolokalisaation intensiteetti oli voimakkainta androgeenillä indusoiduissa soluissa, heikompaa bikalutamidilla indusoiduissa soluissa ja vielä heikompaa MDV3100:lla indusoiduissa soluissa (Kuva 11).



Kuva 11. EGFP-AR:n (vasemmalla) ja mCherry-FOXA1:n (toinen vasemmalta) kolokalisaatio Fip-In<sup>™</sup>-293 FRT -soluissa eri ligandeilla indusoituna (ligandit kuvasarjojen vasemmalla puolella). Yhdistelmäkuvassa (kolmas vasemmalta) keltaiset alueet kuvaavat EGFP-AR:n ja mCherry-FOXA1:n kolokalisaatiota. Viimeisenä oikealla ovat kolokalisaatiota havainnollistavat hajontakaaviot, joissa x-akselilla on EGFP:n (AR) intensiteetti ja y-akselilla mCherryn (FOXA1) intensiteetti. Kolokalisaatiopikselit sijoittuvat kaavioon suoraan verrannollisesti ja kolokalisaation intensiteetti ilmoitetaan väreillä suureten sinisestä punaiseen. Laserien suhteelliset voimakkuudet: vehikkeli 488 nm 2 %, 555 nm 8 %; R1881 488 nm 3 %, 555 nm 10 %; bikalutamidi 488 nm 3 %, 555 nm 5 %; MDV3100 488 nm 2,4 %, 555 nm 1,1 %.

#### 4.4. Stabiilin Fip-In<sup>™</sup>-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solulinjan valmistaminen

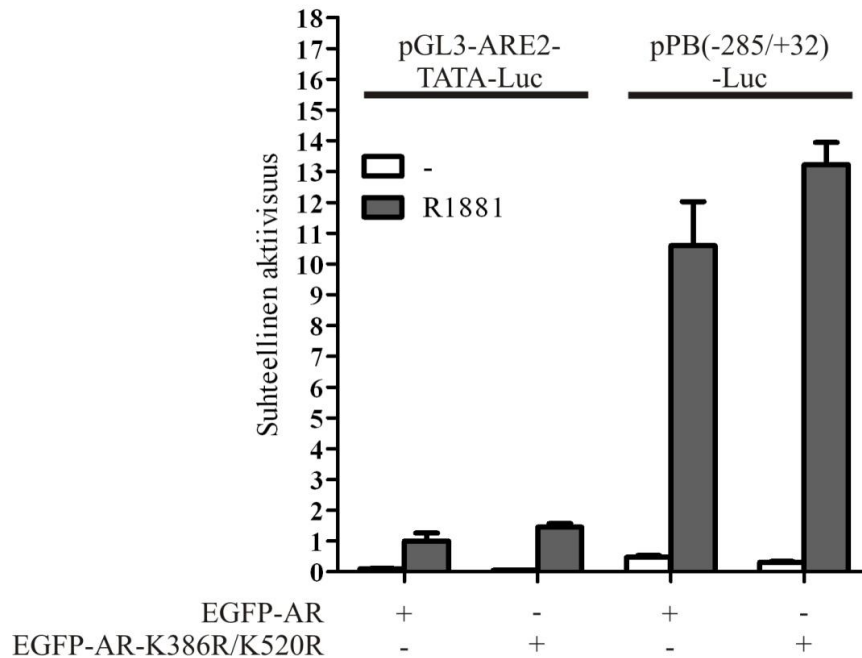
Fip-In<sup>™</sup>-293 FRT-EGFP-AR ja Fip-In<sup>™</sup>-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solulinjojen sumoylaatiovertailussa villityypin EGFP-AR ja sen K386R/K520R-sumoylaatiomutantti erosivat toisistaan selkeästi (Kuva 12). Sekä EGFP-AR että EGFP-AR-K386R/K520R olivat oikean kokoisia western blot -analyysin perusteella (AR + EGFP  $\approx$  137 kDa).



Kuva 12. Western blot lämpöstressikäsitellyistä Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR ja Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -soluista sekä R1881-induktiolla (R) että ilman (-). Primäärivasta-aineena käytettiin kanin polyklonaalista AR-vasta-ainetta K183 (Karvonen ym., 1997). Villityypin EGFP-AR ja sumoylaatiopaikoistaan mutatoitu EGFP-AR-K386R/K520R näkyvät paksuina raitoina kuvan alalaidassa ja sumoyloituneet reseptorit erottuvat kolmena erillisenä raitana villityypin AR-näytteissä kuvan yläosassa. EGFP-AR-K386R/K520R-näytteet eivät osoita selkeää sumoyloittumista.

Lämpöstressillä käsitellyissä Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR -soluissa endogeeniset SUMO-proteiinit konjugoituivat EGFP-AR:iin tuottaen kolme elektroforeesissa erottuvaa kompleksia (Kuva 12, kaksi vasemmanpuoleisinta näytettä). K386R/K520R-sumoylaatiomutanttia ilmentävässä Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solulinjassa lämpöstressi ei aiheuttanut selkeää reseptorin sumoylaatiota. Androgeeni aiheuttaa positiivisen vasteen AR:n ilmentymisessä ja sumoyloittumisessa, ja villityypin reseptoria ilmentävissä soluissa vaikutus sumoyloittumiseen on selkeä. Mutantti-AR:n ilmentymisessä on havaittavissa hienoista kasvua androgeenin vaikutuksesta.

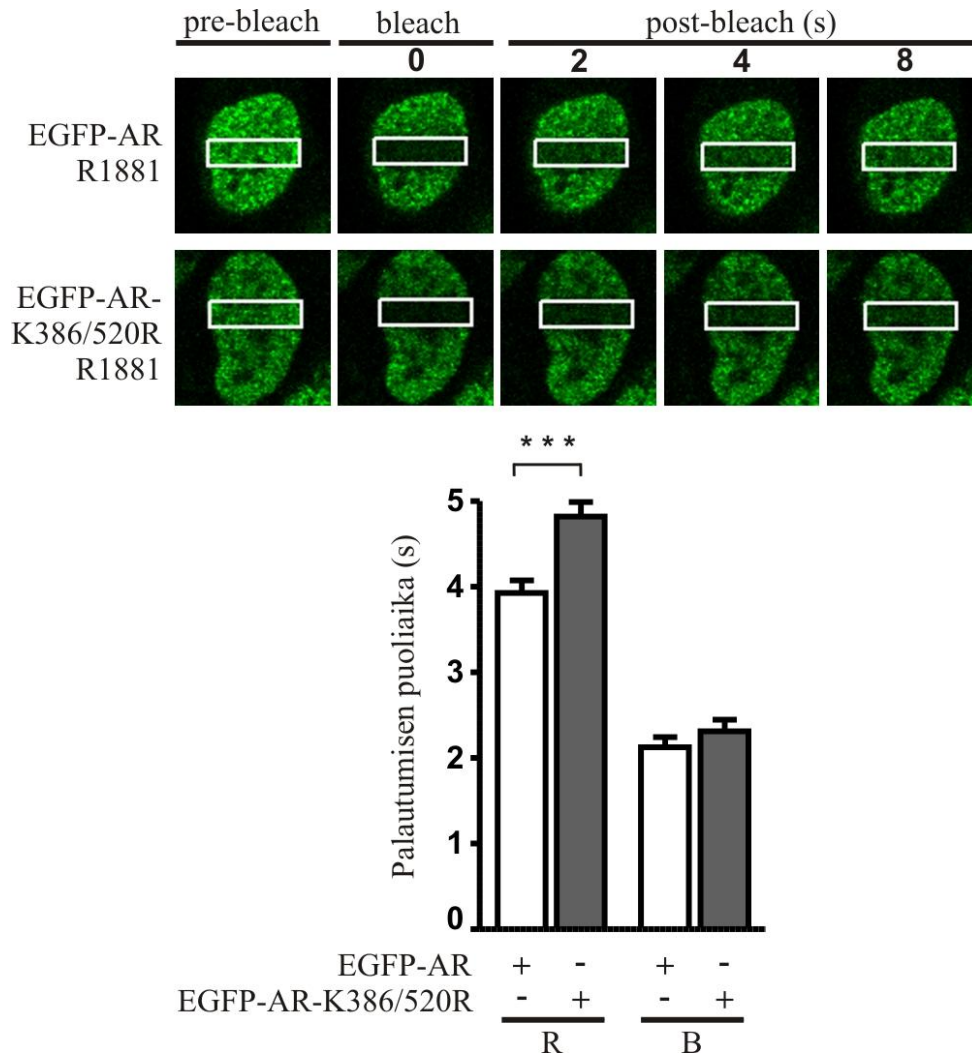
EGFP-AR:n ja EGFP-AR-K386R/K520R:n transkriptioaktiivisuus laskettiin  $\beta$ -galaktosidaasi- ja lusiferaasiaktiivisuuksien suhteena (Kuva 13). Transkriptioaktiivisuus oli suurempi probasiinipromoottorilla (PB-Luc) kuin ARE2-TATA-promoottorilla (ARE2-TATA-Luc) ja androgeeni lisäsi molempien promoottorien alaista transkriptiota.



Kuva 13. Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR ja Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT-EGFP-AR-K386R/K520R -solulinjoille tehtyjen raportoijageenikokeiden tulokset, joissa B-galaktosidaasiaktiivisuus on suhteutettu lusiferaasiaktiivisuuteen. Keskiarvot ja keskihajonnat (SD) kussakin käsittelyssä laskettiin kolmen näytteen perusteella. Tulokset on suhteutettu toisiinsa EGFP-AR:n R1881-indusoidun  $\beta$ -galaktosidaasi/ARE2-TATA-Luc-aktiivisuuden keskiarvon ollessa 1.

#### 4.5. Sumoylaatiopaikkojen vaikutus AR:n tumansisäiseen liikkuvuuteen

FRAP-kokeissa R1881:llä indusoidun villityypin AR:n palautumisaika oli merkittävästi lyhyempi verrattuna K386R/K520R-mutanttiin (\*\*\*,  $p < 0,001$ ), mutta bikalutamidilla indusoiduissa soluissa ei havaittu tilastollisesti merkittävää eroa (Kuva 14, Liite 4). Androgeeni- ja antiandrogeenikäsittelyn ero oli selkeä: bikalutamidilla indusoidun reseptorin palautuminen oli huomattavasti nopeampaa kuin R1881:llä käsiteltynä sekä villityypin AR:n että K386R/K520R-mutanttin kohdalla.



Kuva 14. EGFP-AR:n ja EGFP-AR-K386R/K520R:n fluoresenssin palautuminen sekä palautumisaikojen keskiarvot ja keskivirheet (SEM) FRAP:ssa. R1881-käsittelyllä (R) reseptorien liikkuvuus erosi tilastollisesti erittäin merkittävästi (\*\*\*,  $p < 0,001$ ), mutta bicalutamidi-indusoitujen (B) solujen kohdalla tilastollista merkittävyyttä ei ollut havaittavissa. Ligandien vaikutusten välinen ero oli selkeä sekä villityypin AR:lla että K386R/K520R-mutantilla. Yläpaneelissa on kuvattu solujen fluoresenssin palutuminen eri aikapisteissä alkaen fluoroforien tuhoamista edeltävästä tilanteesta (pre-bleach) ja edeten fluoroforien tuhoamisen hetkestä (bleach) palautumiseen (post-bleach).



## 5. Tulosten tarkastelu

### 5.1. AR:n tumalokalisaation voimakkuus vaihtelee eri ligandien indusoimana

Sekä R1881- että bikalutamidi-induktio sai AR:n siirtymään solun tumaan, mutta MDV3100:lla indusoiduissa soluissa tumalokalisaatio ei ollut yhtä voimakasta (Kuva 8). Tuloksista päätellen MDV3100 heikentää, mutta ei kuitenkaan estä AR:n tumatranslokaatiota. Tässä tutkimuksessa käytettiin samaa 10  $\mu$ M MDV3100-konsentraatiota kuin aiemmassa MDV3100:n ominaisuuksia määrittäneessä tutkimuksessa (Tran ym., 2009). Tranin ja kumppaneiden tutkimuksessa yhdisteen vaikutus AR:n tumalokalisaatioon tehtiin kuitenkin vain kolmen solun perusteella, joten otosta ei voi kutsua erityisen kattavaksi. Lisäksi Tranin tutkimuksessa MDV3100:n inhiboiva vaikutus *TMPRSS2*:n ja *KLK3*:n transkriptioon oli samaa luokkaa kuin 10  $\mu$ M bikalutamidin (Tran ym., 2009). MDV3100 saa kuitenkin aikaan heikomman AR:n translokaation kuin bikalutamidi ja on siten potentiaalisempi yhdiste AR:iin liittyvissä sairauksissa, joissa AR:n transkriptionaalinen aktiivisuus on haitallista ja androgeeniherkkyys on tallella.

LBD:n suhteen vajaavaisten AR:iien on osoitettu olevan transkriptionaalisesti aktiivisia (Jenster ym., 1995), ja näiden varianttien on todettu saavan valintaedun CRPC:ssä (Watson ym., 2010). Tällöin LBD:iin sitoutuvilla antiandrogeneilla ei ole vaikutusta AR-välitteiseen transkriptioon. Vastikään kehitetty EPI-001 on NTD:n AF-1:tä sitova inhibiittori, joka estää AR:n proteiini-proteiini-vuorovaikutuksen sekä vähentää sen sitoutumista ARE:ille (Andersen ym., 2010). Lisäksi EPI-001:n havaittiin estävän syöpäsolujen lisääntymistä ksenokraftikokeissa ilman myrkyllisiä vaikutuksia, joten se vaikuttaa erittäin lupaavalta yhdisteeltä CRPC:n hoidossa.

### 5.2. AR ja FOXA1 kolokalisoituvat tumassa androgeenin vaikutuksesta

Plasmidikonstruktin digestiotuotteiden erottelu AGE:lla (Kuva 9) sekä western blot pmCherry-FOXA1:llä transfektoiduista Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -soluista (Kuva 10) osoittivat, että FOXA1:n kloonauksen pmCherry-C1-plasmidiin onnistui halutulla tavalla. Flp-In<sup>TM</sup>-293 FRT -solulinjalla tehdyissä kolokalisaatiokokeissa FOXA1 lokalisoitui tumaan androgeeni-induktiosta riippumatta (Kuva 11). Sen sijaan AR lokalisoitui tumaan ligandin vaikutuksen mukaan (vrt. kuvat 8 ja 11), jolloin AR:n ja FOXA1:n kolokalisoituminen riippuu

voimakkaasti ligandin vaikutuksesta AR:n lokalisatioon. Antiandrogeneilla indusoidulla AR:lla kolokalisoituminen oli vaimeampaa kuin R1881:llä indusoidulla AR:lla. Esimerkiksi MDV3100:lla indusoitu AR siirtyi vain osaksi tumaan, joten kuvissa näkyvä laikuittaisuus johtunee AR:n pienestä määrästä ja sen keskittymisestä tietyille alueille tumassa (Kuva 11).

AR:n antagonistista bikalutamidin sitoutumisen on päätelty tapahtuvan AR:n LBD:iin (Bohl ym., 2005). Mikäli MDV3100 sitoutuu LBD:iin FoxA1:n todistetusti sitoutuessa DBD:iin (Yu ym., 2005), ei MDV3100 välttämättä vaikuta AR-FoxA1-vuorovaikutuksen syntymiseen. MDV3100:n on kuitenkin havaittu estävän AR:n sitoutumista kohdegeenien säätelyalueille (Tran ym., 2009), joten on mahdollista, että MDV3100:n aiheuttama AR:n konformaatiomuutos muuttaa myös DBD:n rakennetta. Tällöin myös AR:n DBD:n FoxA1:n sitoutumiselle tärkeiden motiivien ominaisuudet saattavat muuttua, jolloin FOXA1:n välittämä AR:n ARE:istä riippumaton sitoutuminen DNA:han (Yu ym., 2005) saattaa estyä. Koska FoxA1:n vaikutus AR-välitteisen geenien luennan säätelyssä on ilmeinen, ja sen vaikutus voimistuu CRPC:ssä (Sahu ym., 2011), AR:n ja FoxA1:n välisen vuorovaikutuksen purkaminen saattaisi estää syövän etenemisen.

p27<sup>Kip1</sup> on sykliiniriippuvaisia kinaaseja inhiboiva proteiini, jolla on kasvaimia taannuttavia vaikutuksia, ja p27<sup>Kip1</sup>:n ilmentymisen on todettu vähenevän PCa:ää mallintavissa LNCaP-soluissa (De Marzo ym., 1998). Ilmentymisen väheneminen on androgeenivälitteistä (Lu ym., 2002), mutta tarkkaa mekanismia ei toistaiseksi tunneta. FoxA1:n on havaittu indusoivan p27<sup>Kip1</sup>:n tuotantoa HCT116-syöpäsoluissa (Williamson ym., 2006). Rintasyöpäsoluilla tehdyissä kokeissa Belaguli on osoittanut FoxA1:n altistuvan sumoyloitumiselle (<http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA478665> 11.7.2012). Sumoylaatio kohdistuu FoxA1:n lysiini K6:een, ja sen mutatoimisen havaittiin vähentävän FoxA1-välitteistä p27<sup>Kip1</sup>-promoottorin aktivoitumista. Myös FoxA1:n ja SUMO-1:n kotransfektio vähensi p27<sup>Kip1</sup>-promoottorin aktivoitumista, joten FoxA1:n sumoyloitumisella näyttäisi olevan yhteys solusyklin säätelyssä. Näin ollen on mahdollista, että FoxA1:n sumoyloituminen vaikuttaa myös AR-välitteiseen geenien luentaan PCa:ssä.

### 5.3. Sumoylaatiopaikat vaikuttavat AR:n tumansisäiseen liikkuvuuteen

Endogeenisten SUMO-proteiinien konjugoituminen AR:iin voimistuu solun joutuessa stressaavaan ympäristöön. Lämpöstressi sai aikaan villityypin reseptorin sumoyloitumisen, mutta selkeää konjugoitumista ei tapahtunut sumoylaatiokohdistaan mutatoitulla EGFP-AR-K386R/K520R-reseptorilla (Kuva 12). Mutanttireseptori myös reagoi androgeeni-induktioon positiivisella transkriptiovasteella (Kuva 13). Tutkimuksen tarpeisiin onnistuttiin siis tuottamaan sumoyloitumatonta EGFP-AR-K386R/K520R:ää stabiilisti ilmentävä FIp-In<sup>TM</sup>-293-solulinja, jonka avulla voidaan selvittää sumoylaatiopaikkojen vaikutuksia AR:n toimintaan nisäkässolun mittakaavassa.

FRAP-analyysi paljasti, että villityypin AR liikkuu tumassa androgeenillä indusoituna nopeammin kuin sen sumoyloitumaton K386R/K520R-mutantti, mutta bikalutamidilla indusoitujen solulinjojen välistä selkeää eroa ei ole (Kuva 14). Näin ollen sumoylaatiopaikkojen vaikutus reseptorin liikkuvuuteen paljastuu agonistin sitoutuessa AR:n LBD:iin. R1881 toimii luontaisen agonistin tavoin ja saa AR:n irtoamaan soluliman aktiinisäikeistä, siirtymään tumaan, dimerisoitumaan sekä sitoutumaan DNA:han. Aiempien tutkimusten mukaan bikalutamidilla indusoitu AR siirtyy myös tumaan ja sitoutuu DNA:han, mutta ei kykene aloittamaan transkriptiota (van Royen ym., 2012; Masiello ym., 2002). Tällöin bikalutamidilla indusoidun AR:n liikkuminen tumamatriisiin ja kromatiinin välillä ei ole luontaista tilannetta vastaavaa. Bikalutamidilla indusoidun AR:n liikkuvuus tumassa oli nopeampaa verrattuna R1881:llä indusoituun AR:iin, mistä voidaan päätellä, että agonistilla käsitelty AR viipyy kromatiinilla pidempään mahdollisesti käynnistyneen transkription takia. Bikalutamidi-indusoidun AR:n on todettu rekrytoivan geenien luentaa vaimentavia korepressoriproteiineja (Shang ym., 2002), joten antagonistin sitoma AR saattaa irrota säätelyalueilta nopeammin transkription estyessä. AR-K386R/K520R-mutantti on puolestaan havaittu olevan transkriptionaalisesti aktiivisempi kuin villityypin reseptorin (Poukka ym., 2000), jolloin androgeeni-induktio seurauksena suurempi osa mutanttireseptoreista saattaa olla rekrytoituna kromatiinilla verrattuna villityypin reseptoriin. Sumoylaatiopaikoilla on siis mahdollisesti vaikutus AR liikkumiseen kromatiinin ja tumamatriisin välillä. Koska eturauhassyöpä vaikuttaa tumamatriisin koostumukseen (Ricci ym., 2012), voi AR:n sumoylaatiolla olla merkittävä tehtävä AR:n toiminnassa syövän etenemisen suhteen.

## 6. Lähdeluettelo

- Afar, D.E., I. Vivanco, R.S. Hubert, J. Kuo, E. Chen, D.C. Saffran, A.B. Raitano ja A. Jakobovits. 2001. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Res.* 61:1686-1692.
- Alen, P., F. Claessens, G. Verhoeven, W. Rombauts ja B. Peeters. 1999. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol.Cell.Biol.* 19:6085-6097.
- Andersen, R.J., N.R. Mawji, J. Wang, G. Wang, S. Haile, J.K. Myung, K. Watt, T. Tam, Y.C. Yang, C.A. Banuelos, D.E. Williams, I.J. McEwan, Y. Wang ja M.D. Sadar. 2010. Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer.Cell.* 17:535-546.
- Ang, S.L., A. Wierda, D. Wong, K.A. Stevens, S. Cascio, J. Rossant ja K.S. Zaret. 1993. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development.* 119:1301-1315.
- Aranda, A. ja A. Pascual. 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol.Rev.* 81:1269-1304.
- Augello, M.A., T.E. Hickey ja K.E. Knudsen. 2011. FOXA1: master of steroid receptor function in cancer. *EMBO J.* 30:3885-3894.
- Besnard, V., S.E. Wert, W.M. Hull ja J.A. Whitsett. 2004. Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. *Gene Expr.Patterns.* 5:193-208.
- Bohl, C.E., W. Gao, D.D. Miller, C.E. Bell ja J.T. Dalton. 2005. Structural basis for antagonism and resistance of bicalutamide in prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:6201-6206.
- Brinkmann, A.O. 2011. Molecular mechanisms of androgen action--a historical perspective. *Methods Mol.Biol.* 776:3-24.
- Brinkmann, A.O., P.W. Faber, H.C. van Rooij, G.G. Kuiper, C. Ris, P. Klaassen, J.A. van der Korput, M.M. Voorhorst, J.H. van Laar ja E. Mulder. 1989. The human androgen receptor: domain structure, genomic organization and regulation of expression. *J.Steroid Biochem.* 34:307-310.
- Brown, C.J., S.J. Goss, D.B. Lubahn, D.R. Joseph, E.M. Wilson, F.S. French ja H.F. Willard. 1989. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am.J.Hum.Genet.* 44:264-269.
- Buchner, J. 1999. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem.Sci.* 24:136-141.

- Butler, M.P., I.N. Karatsoreos, J. Lesauter ja R. Silver. 2012. Dose-dependent effects of androgens on the circadian timing system and its response to light. *Endocrinology*. 153:2344-2352.
- Callewaert, F., K. Venken, J. Ophoff, K. De Gendt, A. Torcasio, G.H. van Lenthe, H. Van Oosterwyck, S. Boonen, R. Bouillon, G. Verhoeven ja D. Vanderschueren. 2009. Differential regulation of bone and body composition in male mice with combined inactivation of androgen and estrogen receptor-alpha. *FASEB J.* 23:232-240.
- Chambon, C., D. Duteil, A. Vignaud, A. Ferry, N. Messaddeq, R. Malivindi, S. Kato, P. Chambon ja D. Metzger. 2010. Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107:14327-14332.
- Chang, C., Y.T. Chen, S.D. Yeh, Q. Xu, R.S. Wang, F. Guillou, H. Lardy ja S. Yeh. 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:6876-6881.
- Chen, C.D., D.S. Welsbie, C. Tran, S.H. Baek, R. Chen, R. Vessella, M.G. Rosenfeld ja C.L. Sawyers. 2004. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat.Med.* 10:33-39.
- Chen, H., R.J. Lin, R.L. Schiltz, D. Chakravarti, A. Nash, L. Nagy, M.L. Privalsky, Y. Nakatani ja R.M. Evans. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* 90:569-580.
- Chen, S., C.T. Kesler, B.M. Paschal ja S.P. Balk. 2009. Androgen receptor phosphorylation and activity are regulated by an association with protein phosphatase 1. *J.Biol.Chem.* 284:25576-25584.
- Chen, S., Y. Xu, X. Yuan, G.J. Bubley ja S.P. Balk. 2006. Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:15969-15974.
- Cheung-Flynn, J., V. Prapapanich, M.B. Cox, D.L. Riggs, C. Suarez-Quian ja D.F. Smith. 2005. Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Mol.Endocrinol.* 19:1654-1666.
- Chymkowitch, P., N. Le May, P. Charneau, E. Compe ja J.M. Egly. 2011. The phosphorylation of the androgen receptor by TFIIH directs the ubiquitin/proteasome process. *EMBO J.* 30:468-479.
- Cirillo, L.A., F.R. Lin, I. Cuesta, D. Friedman, M. Jarnik ja K.S. Zaret. 2002. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol.Cell.* 9:279-289.
- Cirillo, L.A. ja K.S. Zaret. 2007. Specific interactions of the wing domains of FOXA1 transcription factor with DNA. *J.Mol.Biol.* 366:720-724.

Costa, R.H., D.R. Grayson ja J.E. Darnell Jr. 1989. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol.Cell.Biol.* 9:1415-1425.

Coulthard, V.H., S. Matsuda ja D.M. Heery. 2003. An extended LXXLL motif sequence determines the nuclear receptor binding specificity of TRAP220. *J.Biol.Chem.* 278:10942-10951.

Cutress, M.L., H.C. Whitaker, I.G. Mills, M. Stewart ja D.E. Neal. 2008. Structural basis for the nuclear import of the human androgen receptor. *J.Cell.Sci.* 121:957-968.

Dai, J.L., C.A. Maiorino, P.J. Gkonos ja K.L. Burnstein. 1996. Androgenic up-regulation of androgen receptor cDNA expression in androgen-independent prostate cancer cells. *Steroids.* 61:531-539.

Darimont, B.D., R.L. Wagner, J.W. Apriletti, M.R. Stallcup, P.J. Kushner, J.D. Baxter, R.J. Fletterick ja K.R. Yamamoto. 1998. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* 12:3343-3356.

De Gendt, K., N. Atanassova, K.A. Tan, L.R. de Franca, G.G. Parreira, C. McKinnell, R.M. Sharpe, P.T. Saunders, J.I. Mason, S. Hartung, R. Ivell, E. Denolet ja G. Verhoeven. 2005. Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinology.* 146:4117-4126.

De Gendt, K., J.V. Swinnen, P.T. Saunders, L. Schoonjans, M. Dewerchin, A. Devos, K. Tan, N. Atanassova, F. Claessens, C. Lecureuil, W. Heyns, P. Carmeliet, F. Guillou, R.M. Sharpe ja G. Verhoeven. 2004. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:1327-1332.

De Gendt, K. ja G. Verhoeven. 2012. Tissue- and cell-specific functions of the androgen receptor revealed through conditional knockout models in mice. *Mol.Cell.Endocrinol.* 352:13-25.

De Marzo, A.M., A.K. Meeker, J.I. Epstein ja D.S. Coffey. 1998. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am.J.Pathol.* 153:911-919.

Deeb, A., J. Jääskeläinen, M. Dattani, H.C. Whitaker, C. Costigan ja I.A. Hughes. 2008. A novel mutation in the human androgen receptor suggests a regulatory role for the hinge region in amino-terminal and carboxy-terminal interactions. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 93:3691-3696.

Dehm, S.M., L.J. Schmidt, H.V. Heemers, R.L. Vessella ja D.J. Tindall. 2008. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* 68:5469-5477.

Ding, X.F., C.M. Anderson, H. Ma, H. Hong, R.M. Uht, P.J. Kushner ja M.R. Stallcup. 1998. Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol.Endocrinol.* 12:302-313.

Dubbink, H.J., R. Hersmus, C.S. Verma, H.A. van der Korput, C.A. Berrevoets, J. van Tol, A.C. Ziel-van der Made, A.O. Brinkmann, A.C. Pike ja J. Trapman. 2004. Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol.Endocrinol.* 18:2132-2150.

Eacker, S.M., J.E. Shima, C.M. Connolly, M. Sharma, R.W. Holdcraft, M.D. Griswold ja R.E. Braun. 2007. Transcriptional profiling of androgen receptor (AR) mutants suggests instructive and permissive roles of AR signaling in germ cell development. *Mol.Endocrinol.* 21:895-907.

Fernandez-Guasti, A., F.P. Kruijver, M. Fodor ja D.F. Swaab. 2000. Sex differences in the distribution of androgen receptors in the human hypothalamus. *J.Comp.Neurol.* 425:422-435.

Fu, M., M. Liu, A.A. Sauve, X. Jiao, X. Zhang, X. Wu, M.J. Powell, T. Yang, W. Gu, M.L. Avantaggiati, N. Pattabiraman, T.G. Pestell, F. Wang, A.A. Quong, C. Wang ja R.G. Pestell. 2006. Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Mol.Cell.Biol.* 26:8122-8135.

Fu, M., M. Rao, C. Wang, T. Sakamaki, J. Wang, D. Di Vizio, X. Zhang, C. Albanese, S. Balk, C. Chang, S. Fan, E. Rosen, J.J. Palvimo, O.A. Jänne, S. Muratoglu, M.L. Avantaggiati ja R.G. Pestell. 2003. Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol.Cell.Biol.* 23:8563-8575.

Fu, M., C. Wang, A.T. Reutens, J. Wang, R.H. Angeletti, L. Siconolfi-Baez, V. Ogryzko, M.L. Avantaggiati ja R.G. Pestell. 2000. p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *J.Biol.Chem.* 275:20853-20860.

Furr, B.J. ja H. Tucker. 1996. The preclinical development of bicalutamide: pharmacodynamics and mechanism of action. *Urology.* 47:13-25; discussion 29-32.

Gaughan, L., I.R. Logan, S. Cook, D.E. Neal ja C.N. Robson. 2002. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J.Biol.Chem.* 277:25904-25913.

Gaughan, L., J. Stockley, N. Wang, S.R. McCracken, A. Treumann, K. Armstrong, F. Shaheen, K. Watt, I.J. McEwan, C. Wang, R.G. Pestell ja C.N. Robson. 2011. Regulation of the androgen receptor by SET9-mediated methylation. *Nucleic Acids Res.* 39:1266-1279.

Geiss-Friedlander, R. ja F. Melchior. 2007. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:947-956.

- Gioeli, D., B.E. Black, V. Gordon, A. Spencer, C.T. Kesler, S.T. Eblen, B.M. Paschal ja M.J. Weber. 2006. Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol.Endocrinol.* 20:503-515.
- Gioeli, D. ja B.M. Paschal. 2012. Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol.Cell.Endocrinol.* 352:70-78.
- Gong, J., J. Zhu, O.B. Goodman Jr, R.G. Pestell, P.N. Schlegel, D.M. Nanus ja R. Shen. 2006. Activation of p300 histone acetyltransferase activity and acetylation of the androgen receptor by bombesin in prostate cancer cells. *Oncogene.* 25:2011-2021.
- Gordon, V., S. Bhadel, W. Wunderlich, J. Zhang, S.B. Ficarro, S.A. Mollah, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, I. Xenarios, W.C. Hahn, M. Conaway, M.F. Carey ja D. Gioeli. 2010. CDK9 regulates AR promoter selectivity and cell growth through serine 81 phosphorylation. *Mol.Endocrinol.* 24:2267-2280.
- Guo, D., M. Li, Y. Zhang, P. Yang, S. Eckenrode, D. Hopkins, W. Zheng, S. Purohit, R.H. Podolsky, A. Muir, J. Wang, Z. Dong, T. Brusko, M. Atkinson, P. Pozzilli, A. Zeidler, L.J. Raffel, C.O. Jacob, Y. Park, M. Serrano-Rios, M.T. Larrad, Z. Zhang, H.J. Garchon, J.F. Bach, J.I. Rotter, J.X. She ja C.Y. Wang. 2004. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat.Genet.* 36:837-841.
- Guo, Z., B. Dai, T. Jiang, K. Xu, Y. Xie, O. Kim, I. Nesheiwat, X. Kong, J. Melamed, V.D. Handratta, V.C. Njar, A.M. Brodie, L.R. Yu, T.D. Veenstra, H. Chen ja Y. Qiu. 2006. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer.Cell.* 10:309-319.
- Guo, Z., X. Yang, F. Sun, R. Jiang, D.E. Linn, H. Chen, H. Chen, X. Kong, J. Melamed, C.G. Tepper, H.J. Kung, A.M. Brodie, J. Edwards ja Y. Qiu. 2009. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* 69:2305-2313.
- Harding, A.E., P.K. Thomas, M. Baraitser, P.G. Bradbury, J.A. Morgan-Hughes ja J.R. Ponsford. 1982. X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 45:1012-1019.
- He, B., J.A. Kempainen ja E.M. Wilson. 2000. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J.Biol.Chem.* 275:22986-22994.
- He, B., J.T. Mingos, L.W. Lee ja E.M. Wilson. 2002. The FXXLF motif mediates androgen receptor-specific interactions with coregulators. *J.Biol.Chem.* 277:10226-10235.
- Hodgson, M.C., I. Astapova, S. Cheng, L.J. Lee, M.C. Verhoeven, E. Choi, S.P. Balk ja A.N. Hollenberg. 2005. The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *J.Biol.Chem.* 280:6511-6519.



- Holdcraft, R.W. ja R.E. Braun. 2004. Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development*. 131:459-467.
- Hu, R., T.A. Dunn, S. Wei, S. Isharwal, R.W. Veltri, E. Humphreys, M. Han, A.W. Partin, R.L. Vessella, W.B. Isaacs, G.S. Bova ja J. Luo. 2009. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 69:16-22.
- Hughes, I.A. ja A. Deeb. 2006. Androgen resistance. *Best Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab*. 20:577-598.
- Jääskeläinen, J. 2012. Molecular biology of androgen insensitivity. *Mol.Cell.Endocrinol*. 352:4-12.
- Jenster, G., H.A. van der Korput, J. Trapman ja A.O. Brinkmann. 1995. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J.Biol.Chem*. 270:7341-7346.
- Juntti, S.A., J. Tollkuhn, M.V. Wu, E.J. Fraser, T. Soderborg, S. Tan, S. Honda, N. Harada ja N.M. Shah. 2010. The androgen receptor governs the execution, but not programming, of male sexual and territorial behaviors. *Neuron*. 66:260-272.
- Kaestner, K.H., W. Knochel ja D.E. Martinez. 2000. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*. 14:142-146.
- Kaftanovskaya, E.M., Z. Huang, A.M. Barbara, K. De Gendt, G. Verhoeven, I.P. Gorlov ja A.I. Agoulnik. 2012. Cryptorchidism in mice with an androgen receptor ablation in gubernaculum testis. *Mol.Endocrinol*. 26:598-607.
- Kaikkonen, S., T. Jääskeläinen, U. Karvonen, M.M. Rytinki, H. Makkonen, D. Gioeli, B.M. Paschal ja J.J. Palvimo. 2009. SUMO-specific protease 1 (SEN1) reverses the hormone-augmented SUMOylation of androgen receptor and modulates gene responses in prostate cancer cells. *Mol.Endocrinol*. 23:292-307.
- Karvonen, U., P.J. Kallio, O.A. Jänne ja J.J. Palvimo. 1997. Interaction of androgen receptors with androgen response element in intact cells. Roles of amino- and carboxyl-terminal regions and the ligand. *J.Biol.Chem*. 272:15973-15979.
- Khorasanizadeh, S. ja F. Rastinejad. 2001. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem.Sci*. 26:384-390.
- Knudsen, K.E., K.C. Arden ja W.K. Cavenee. 1998. Multiple G1 regulatory elements control the androgen-dependent proliferation of prostatic carcinoma cells. *J.Biol.Chem*. 273:20213-20222.
- Ko, S., J. Ahn, C.S. Song, S. Kim, K. Knapczyk-Stwora ja B. Chatterjee. 2011. Lysine methylation and functional modulation of androgen receptor by Set9 methyltransferase. *Mol.Endocrinol*. 25:433-444.

- Kotaja, N., U. Karvonen, O.A. Jänne ja J.J. Palvimo. 2002. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol.Cell.Biol.* 22:5222-5234.
- Krutsikh, A., K. De Gendt, V. Sharp, G. Verhoeven, M. Poutanen ja I. Huhtaniemi. 2011. Targeted inactivation of the androgen receptor gene in murine proximal epididymis causes epithelial hypotrophy and obstructive azoospermia. *Endocrinology.* 152:689-696.
- Kyrölahti, A., R. Euler, M. Bielinska, E.L. Schoeller, K.H. Moley, J. Toppari, M. Heikinheimo ja D.B. Wilson. 2011. GATA4 regulates Sertoli cell function and fertility in adult male mice. *Mol.Cell.Endocrinol.* 333:85-95.
- Lin, B., C. Ferguson, J.T. White, S. Wang, R. Vessella, L.D. True, L. Hood ja P.S. Nelson. 1999. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Res.* 59:4180-4184.
- Lin, H.K., Y.C. Hu, L. Yang, S. Altuwajri, Y.T. Chen, H.Y. Kang ja C. Chang. 2003. Suppression versus induction of androgen receptor functions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer LNCaP cells with different passage numbers. *J.Biol.Chem.* 278:50902-50907.
- Lin, H.K., L. Wang, Y.C. Hu, S. Altuwajri ja C. Chang. 2002. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J.* 21:4037-4048.
- Link, K.A., S. Balasubramaniam, A. Sharma, C.E. Comstock, S. Godoy-Tundidor, N. Powers, K.H. Cao, A. Haelens, F. Claessens, M.P. Revelo ja K.E. Knudsen. 2008. Targeting the BAF57 SWI/SNF subunit in prostate cancer: a novel platform to control androgen receptor activity. *Cancer Res.* 68:4551-4558.
- Link, K.A., C.J. Burd, E. Williams, T. Marshall, G. Rosson, E. Henry, B. Weissman ja K.E. Knudsen. 2005. BAF57 governs androgen receptor action and androgen-dependent proliferation through SWI/SNF. *Mol.Cell.Biol.* 25:2200-2215.
- Loy, C.J., K.S. Sim ja E.L. Yong. 2003. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:4562-4567.
- Lu, L., H. Schulz ja D.A. Wolf. 2002. The F-box protein SKP2 mediates androgen control of p27 stability in LNCaP human prostate cancer cells. *BMC Cell Biol.* 3:22.
- Lu, Y., Y. Fu, Y. Ge, L.A. Juncos, J.F. Reckelhoff ja R. Liu. 2012. The vasodilatory effect of testosterone on renal afferent arterioles. *Gend.Med.* 9:103-111.
- Ma, H., H. Hong, S.M. Huang, R.A. Irvine, P. Webb, P.J. Kushner, G.A. Coetzee ja M.R. Stallcup. 1999. Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. *Mol.Cell.Biol.* 19:6164-6173.

- Mahajan, N.P., Y. Liu, S. Majumder, M.R. Warren, C.E. Parker, J.L. Mohler, H.S. Earp ja Y.E. Whang. 2007. Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:8438-8443.
- Malik, S. ja R.G. Roeder. 2005. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem.Sci.* 30:256-263.
- Marshall, T.W., K.A. Link, C.E. Petre-Draviam ja K.E. Knudsen. 2003. Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *J.Biol.Chem.* 278:30605-30613.
- Masiello, D., S. Cheng, G.J. Bubley, M.L. Lu ja S.P. Balk. 2002. Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J.Biol.Chem.* 277:26321-26326.
- Matsumoto, T., H. Shiina, H. Kawano, T. Sato ja S. Kato. 2008. Androgen receptor functions in male and female physiology. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 109:236-241.
- Mincheva, A., P. Lichter, G. Schutz ja K.H. Kaestner. 1997. Assignment of the human genes for hepatocyte nuclear factor 3-alpha, -beta, and -gamma (HNF3A, HNF3B, HNF3G) to 14q12-q13, 20p11, and 19q13.2-q13.4. *Genomics.* 39:417-419.
- Moehren, U., M. Papaioannou, C.A. Reeb, W. Hong ja A. Baniahmad. 2007. Alien interacts with the human androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Mol.Endocrinol.* 21:1039-1048.
- Monaghan, A.P., K.H. Kaestner, E. Grau ja G. Schutz. 1993. Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development.* 119:567-578.
- Nagy, A. 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26:99-109.
- Nishida, T. ja H. Yasuda. 2002. PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J.Biol.Chem.* 277:41311-41317.
- Niu, Y., S. Altuwaijri, K.P. Lai, C.T. Wu, W.A. Ricke, E.M. Messing, J. Yao, S. Yeh ja C. Chang. 2008. Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105:12182-12187.
- Ophoff, J., K. Van Proeyen, F. Callewaert, K. De Gendt, K. De Bock, A. Vanden Bosch, G. Verhoeven, P. Hespel ja D. Vanderschueren. 2009. Androgen signaling in myocytes contributes to the maintenance of muscle mass and fiber type regulation but not to muscle strength or fatigue. *Endocrinology.* 150:3558-3566.

- Overdier, D.G., A. Porcella ja R.H. Costa. 1994. The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol.Cell.Biol.* 14:2755-2766.
- Ponguta, L.A., C.W. Gregory, F.S. French ja E.M. Wilson. 2008. Site-specific androgen receptor serine phosphorylation linked to epidermal growth factor-dependent growth of castration-recurrent prostate cancer. *J.Biol.Chem.* 283:20989-21001.
- Poukka, H., U. Karvonen, O.A. Jänne ja J.J. Palvimo. 2000. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:14145-14150.
- Raskin, K., K. de Gendt, A. Duittoz, P. Liere, G. Verhoeven, F. Tronche ja S. Mhaouty-Kodja. 2009. Conditional inactivation of androgen receptor gene in the nervous system: effects on male behavioral and neuroendocrine responses. *J.Neurosci.* 29:4461-4470.
- Rees, I., S. Lee, H. Kim ja F.T. Tsai. 2006. The E3 ubiquitin ligase CHIP binds the androgen receptor in a phosphorylation-dependent manner. *Biochim.Biophys.Acta.* 1764:1073-1079.
- Renfree, M.B., J. Fenelon, G. Wijiyanti, J.D. Wilson ja G. Shaw. 2009. Wolffian duct differentiation by physiological concentrations of androgen delivered systemically. *Dev.Biol.* 334:429-436.
- Ricci, F., A. Rubagotti, L. Zinoli, R. Mangerini, P.V. Nuzzo, G. Carmignani, A. Simonato, P. Barboro, C. Balbi ja F. Boccardo. 2012. Prognostic value of nuclear matrix protein expression in localized prostate cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*
- Ricke, E.A., K. Williams, Y.F. Lee, S. Couto, Y. Wang, S.W. Hayward, G.R. Cunha ja W.A. Ricke. 2012. Androgen hormone action in prostatic carcinogenesis: stromal androgen receptors mediate prostate cancer progression, malignant transformation and metastasis. *Carcinogenesis.*
- Roberts, R.O., E.J. Bergstralh, J.M. Cunningham, S.J. Hebring, S.N. Thibodeau, M.M. Lieber ja S.J. Jacobsen. 2004. Androgen receptor gene polymorphisms and increased risk of urologic measures of benign prostatic hyperplasia. *Am.J.Epidemiol.* 159:269-276.
- Robinson, J.L., S. Macarthur, C.S. Ross-Innes, W.D. Tilley, D.E. Neal, I.G. Mills ja J.S. Carroll. 2011. Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1. *EMBO J.* 30:3019-3027.
- Robitaille, Y., I. Lopes-Cendes, M. Becher, G. Rouleau ja A.W. Clark. 1997. The neuropathology of CAG repeat diseases: review and update of genetic and molecular features. *Brain Pathol.* 7:901-926.
- Russell, D.W. ja J.D. Wilson. 1994. Steroid 5 alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu.Rev.Biochem.* 63:25-61.

- Sahu, B., M. Laakso, K. Ovaska, T. Mirtti, J. Lundin, A. Rannikko, A. Sankila, J.P. Turunen, M. Lundin, J. Konsti, T. Vesterinen, S. Nordling, O. Kallioniemi, S. Hautaniemi ja O.A. Jänne. 2011. Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer. *EMBO J.* 30:3962-3976.
- Sajjad, Y. 2010. Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo. *J.Obstet.Gynaecol.Res.* 36:929-937.
- Saporita, A.J., Q. Zhang, N. Navai, Z. Dincer, J. Hahn, X. Cai ja Z. Wang. 2003. Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J.Biol.Chem.* 278:41998-42005.
- Sasaki, H. ja B.L. Hogan. 1993. Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development.* 118:47-59.
- Schafele, F., X. Carbonell, M. Guerbodot, S. Borngraeber, M.S. Chapman, A.A. Ma, J.N. Miner ja M.I. Diamond. 2005. The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:9802-9807.
- Scher, H.I., T.M. Beer, C.S. Higano, A. Anand, M.E. Taplin, E. Efstathiou, D. Rathkopf, J. Shelkey, E.Y. Yu, J. Alumkal, D. Hung, M. Hirmand, L. Seely, M.J. Morris, D.C. Danila, J. Humm, S. Larson, M. Fleisher, C.L. Sawyers ja Prostate Cancer Foundation/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials Consortium. 2010. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet.* 375:1437-1446.
- Sen, A. ja S.R. Hammes. 2010. Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function. *Mol.Endocrinol.* 24:1393-1403.
- Serandour, A.A., S. Avner, F. Percevault, F. Demay, M. Bizot, C. Lucchetti-Miganeh, F. Barloy-Hubler, M. Brown, M. Lupien, R. Metivier, G. Salbert ja J. Eeckhoutte. 2011. Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers. *Genome Res.* 21:555-565.
- Shaikhibrahim, Z., M. Braun, P. Nikolov, D. Boehm, V. Scheble, R. Menon, F. Fend, G. Kristiansen, S. Perner ja N. Wernert. 2012. Rearrangement of the ETS genes ETV-1, ETV-4, ETV-5, and ELK-4 is a clonal event during prostate cancer progression. *Hum.Pathol.*
- Shang, Y., M. Myers ja M. Brown. 2002. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol.Cell.* 9:601-610.
- Shi, X.B., A.H. Ma, L. Xia, H.J. Kung ja R.W. de Vere White. 2002. Functional analysis of 44 mutant androgen receptors from human prostate cancer. *Cancer Res.* 62:1496-1502.
- Shu, S.K., Q. Liu, D. Coppola ja J.Q. Cheng. 2010. Phosphorylation and activation of androgen receptor by Aurora-A. *J.Biol.Chem.* 285:33045-33053.

- Sieveking, D.P., P. Lim, R.W. Chow, L.L. Dunn, S. Bao, K.C. McGrath, A.K. Heather, D.J. Handelsman, D.S. Celermajer ja M.K. Ng. 2010. A sex-specific role for androgens in angiogenesis. *J.Exp.Med.* 207:345-352.
- Smith, M.R., F. Kabbinavar, F. Saad, A. Hussain, M.C. Gittelman, D.L. Bilhartz, C. Wynne, R. Murray, N.R. Zinner, C. Schulman, R. Linnartz, M. Zheng, C. Goessl, Y.J. Hei, E.J. Small, R. Cook ja C.S. Higano. 2005. Natural history of rising serum prostate-specific antigen in men with castrate nonmetastatic prostate cancer. *J.Clin.Oncol.* 23:2918-2925.
- Spencer, T.E., G. Jenster, M.M. Burcin, C.D. Allis, J. Zhou, C.A. Mizzen, N.J. McKenna, S.A. Onate, S.Y. Tsai, M.J. Tsai ja B.W. O'Malley. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature.* 389:194-198.
- Steinkamp, M.P., O.A. O'Mahony, M. Brogley, H. Rehman, E.W. Lapensee, S. Dhanasekaran, M.D. Hofer, R. Kuefer, A. Chinnaiyan, M.A. Rubin, K.J. Pienta ja D.M. Robins. 2009. Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res.* 69:4434-4442.
- Stenoien, D.L., C.J. Cummings, H.P. Adams, M.G. Mancini, K. Patel, G.N. DeMartino, M. Marcelli, N.L. Weigel ja M.A. Mancini. 1999. Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum.Mol.Genet.* 8:731-741.
- Su, H.L. ja S.S. Li. 2002. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Gene.* 296:65-73.
- Sun, S., C.C. Sprenger, R.L. Vessella, K. Haugk, K. Soriano, E.A. Mostaghel, S.T. Page, I.M. Coleman, H.M. Nguyen, H. Sun, P.S. Nelson ja S.R. Plymate. 2010. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J.Clin.Invest.* 120:2715-2730.
- Tan, J., Y. Sharief, K.G. Hamil, C.W. Gregory, D.Y. Zang, M. Sar, P.H. Gumerlock, R.W. deVere White, T.G. Pretlow, S.E. Harris, E.M. Wilson, J.L. Mohler ja F.S. French. 1997. Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells. *Mol.Endocrinol.* 11:450-459.
- Taneja, S.S., S. Ha, N.K. Swenson, H.Y. Huang, P. Lee, J. Melamed, E. Shapiro, M.J. Garabedian ja S.K. Logan. 2005. Cell-specific regulation of androgen receptor phosphorylation in vivo. *J.Biol.Chem.* 280:40916-40924.
- Tatham, M.H., E. Jaffray, O.A. Vaughan, J.M. Desterro, C.H. Botting, J.H. Naismith ja R.T. Hay. 2001. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J.Biol.Chem.* 276:35368-35374.

- Tomlins, S.A., D.R. Rhodes, S. Perner, S.M. Dhanasekaran, R. Mehra, X.W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J.E. Montie, R.B. Shah, K.J. Pienta, M.A. Rubin ja A.M. Chinnaiyan. 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 310:644-648.
- Toubaji, A., R. Albadine, A.K. Meeker, W.B. Isaacs, T. Lotan, M.C. Haffner, A. Chaux, J.I. Epstein, M. Han, P.C. Walsh, A.W. Partin, A.M. De Marzo, E.A. Platz ja G.J. Netto. 2011. Increased gene copy number of ERG on chromosome 21 but not TMPRSS2-ERG fusion predicts outcome in prostatic adenocarcinomas. *Mod.Pathol.* 24:1511-1520.
- Tran, C., S. Ouk, N.J. Clegg, Y. Chen, P.A. Watson, V. Arora, J. Wongvipat, P.M. Smith-Jones, D. Yoo, A. Kwon, T. Wasielewska, D. Welsbie, C.D. Chen, C.S. Higano, T.M. Beer, D.T. Hung, H.I. Scher, M.E. Jung ja C.L. Sawyers. 2009. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*. 324:787-790.
- Tyagi, R.K., Y. Lavrovsky, S.C. Ahn, C.S. Song, B. Chatterjee ja A.K. Roy. 2000. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol.Endocrinol.* 14:1162-1174.
- van de Wijngaart, D.J., H.J. Dubbink, M. Molier, C. de Vos, J. Trapman ja G. Jenster. 2009. Functional screening of FxxLF-like peptide motifs identifies SMARCD1/BAF60a as an androgen receptor cofactor that modulates TMPRSS2 expression. *Mol.Endocrinol.* 23:1776-1786.
- van Royen, M.E., S.M. Cunha, M.C. Brink, K.A. Mattern, A.L. Nigg, H.J. Dubbink, P.J. Verschure, J. Trapman ja A.B. Houtsmuller. 2007. Compartmentalization of androgen receptor protein-protein interactions in living cells. *J.Cell Biol.* 177:63-72.
- van Royen, M.E., W.A. van Cappellen, C. de Vos, A.B. Houtsmuller ja J. Trapman. 2012. Stepwise androgen receptor dimerization. *J.Cell.Sci.*
- Wang, D., I. Garcia-Bassets, C. Benner, W. Li, X. Su, Y. Zhou, J. Qiu, W. Liu, M.U. Kaikkonen, K.A. Ohgi, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld ja X.D. Fu. 2011. Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature*. 474:390-394.
- Wang, L., C.L. Hsu, J. Ni, P.H. Wang, S. Yeh, P. Keng ja C. Chang. 2004. Human checkpoint protein hRad9 functions as a negative coregulator to repress androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. *Mol.Cell.Biol.* 24:2202-2213.
- Wang, Q., W. Li, Y. Zhang, X. Yuan, K. Xu, J. Yu, Z. Chen, R. Beroukhim, H. Wang, M. Lupien, T. Wu, M.M. Regan, C.A. Meyer, J.S. Carroll, A.K. Manrai, O.A. Jänne, S.P. Balk, R. Mehra, B. Han, A.M. Chinnaiyan, M.A. Rubin, L. True, M. Fiorentino, C. Fiore, M. Loda, P.W. Kantoff, X.S. Liu ja M. Brown. 2009. Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell*. 138:245-256.
- Wang, Y. ja M. Dasso. 2009. SUMOylation and deSUMOylation at a glance. *J.Cell.Sci.* 122:4249-4252.

- Watson, P.A., Y.F. Chen, M.D. Balbas, J. Wongvipat, N.D. Socci, A. Viale, K. Kim ja C.L. Sawyers. 2010. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107:16759-16765.
- Welsh, M., L. Moffat, L. Jack, A. McNeilly, D. Brownstein, P.T. Saunders, R.M. Sharpe ja L.B. Smith. 2010. Deletion of androgen receptor in the smooth muscle of the seminal vesicles impairs secretory function and alters its responsiveness to exogenous testosterone and estradiol. *Endocrinology.* 151:3374-3385.
- Welsh, M., P.T. Saunders, N. Atanassova, R.M. Sharpe ja L.B. Smith. 2009. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 23:4218-4230.
- Wen, Y., M.C. Hu, K. Makino, B. Spohn, G. Bartholomeusz, D.H. Yan ja M.C. Hung. 2000. HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res.* 60:6841-6845.
- Vijayvargia, R., M.S. May ja J.D. Fondell. 2007. A coregulatory role for the mediator complex in prostate cancer cell proliferation and gene expression. *Cancer Res.* 67:4034-4041.
- Williamson, E.A., I. Wolf, J. O'Kelly, S. Bose, S. Tanosaki ja H.P. Koeffler. 2006. BRCA1 and FOXA1 proteins coregulate the expression of the cell cycle-dependent kinase inhibitor p27(Kip1). *Oncogene.* 25:1391-1399.
- Visakorpi, T., E. Hyytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. Keinänen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola ja O.P. Kallioniemi. 1995. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat.Genet.* 9:401-406.
- Wu, C.T., S. Altuwaijri, W.A. Ricke, S.P. Huang, S. Yeh, C. Zhang, Y. Niu, M.Y. Tsai ja C. Chang. 2007. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:12679-12684.
- Xu, K., H. Shimelis, D.E. Linn, R. Jiang, X. Yang, F. Sun, Z. Guo, H. Chen, W. Li, H. Chen, X. Kong, J. Melamed, S. Fang, Z. Xiao, T.D. Veenstra ja Y. Qiu. 2009. Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination. *Cancer.Cell.* 15:270-282.
- Xu, Q., H.Y. Lin, S.D. Yeh, I.C. Yu, R.S. Wang, Y.T. Chen, C. Zhang, S. Altuwaijri, L.M. Chen, K.H. Chuang, H.S. Chiang, S. Yeh ja C. Chang. 2007. Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine.* 32:96-106.
- Xu, Y., S.Y. Chen, K.N. Ross ja S.P. Balk. 2006. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res.* 66:7783-7792.



- Yang, C.S., M.J. Vitto, S.A. Busby, B.A. Garcia, C.T. Kesler, D. Gioeli, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, K. Rundell, D.L. Brautigan ja B.M. Paschal. 2005. Simian virus 40 small t antigen mediates conformation-dependent transfer of protein phosphatase 2A onto the androgen receptor. *Mol.Cell.Biol.* 25:1298-1308.
- Yu, I.C., H.Y. Lin, N.C. Liu, R.S. Wang, J.D. Sparks, S. Yeh ja C. Chang. 2008. Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology.* 149:2361-2368.
- Yu, S., C. Zhang, C.C. Lin, Y. Niu, K.P. Lai, H.C. Chang, S.D. Yeh, C. Chang ja S. Yeh. 2011. Altered prostate epithelial development and IGF-1 signal in mice lacking the androgen receptor in stromal smooth muscle cells. *Prostate.* 71:517-524.
- Yu, X., A. Gupta, Y. Wang, K. Suzuki, J. Mirosevich, M.C. Orgebin-Crist ja R.J. Matusik. 2005. Foxa1 and Foxa2 interact with the androgen receptor to regulate prostate and epididymal genes differentially. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1061:77-93.
- Yunus, A.A. ja C.D. Lima. 2006. Lysine activation and functional analysis of E2-mediated conjugation in the SUMO pathway. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 13:491-499.
- Zhao, X.Y., P.J. Malloy, A.V. Krishnan, S. Swami, N.M. Navone, D.M. Peehl ja D. Feldman. 2000. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat.Med.* 6:703-706.
- Zhu, P., S.H. Baek, E.M. Bourk, K.A. Ohgi, I. Garcia-Bassets, H. Sanjo, S. Akira, P.F. Kotel, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld ja D.W. Rose. 2006. Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance by a nuclear receptor derepression pathway. *Cell.* 124:615-629.
- Zhuo, F.L., W. Xu, L. Wang, Y. Wu, Z.L. Xu ja J.Y. Zhao. 2012. Androgen receptor gene polymorphisms and risk for androgenetic alopecia: a meta-analysis. *Clin.Exp.Dermatol.* 37:104-111.
- Zofall, M., J. Persinger, S.R. Kassabov ja B. Bartholomew. 2006. Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 13:339-346.
- Zong, H., Y. Chi, Y. Wang, Y. Yang, L. Zhang, H. Chen, J. Jiang, Z. Li, Y. Hong, H. Wang, X. Yun ja J. Gu. 2007. Cyclin D3/CDK1p58 complex is involved in the repression of androgen receptor. *Mol.Cell.Biol.* 27:7125-7142.

## Internet-lähteet:

Maailman Antidopingtoimisto WADA  
<http://www.wada-ama.org/> 11.7.2012

BBC  
<http://news.bbc.co.uk/sport2/hi/athletics/7753518.stm> 11.7.2012

Medivation: MDV3100/Enzalutamide  
<http://www.medivation.com/product-pipeline/enzalutamide> 11.7.2012  
<http://investors.medivation.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=620500> 7.2.2012  
<http://www.medivation.com/clinical-trials/> 7.2.2012

OMIM: SBMA  
<http://www.omim.org/entry/313200> 11.7.2012

Lihastautiliitto: SBMA  
<http://www.lihastautiliitto.fi/cgi-bin/wafnet3.pl?id=376&kid=1> 11.7.2012

The UniProt Knowledgebase: FOXA1  
<http://www.uniprot.org/uniprot/P55317> 11.7.2012

The Human Protein Atlas: FOXA1  
<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000129514/normal> 11.7.2012

Belaguli, N. S. 2007. Forkhead Box Protein 1 (Foxa1) and the Sumoylation Pathway that Regulates Foxa1 Stability are Potential Targets for Breast Cancer Treatment. The Defense Technical Information Center (DTIC®)  
<http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA478665> 11.7.2012

# Liitteet

## Liite 1

### Solujen keräys, SDS-PAGE ja western blot

Näytteiden solut pestiin PBS:llä ja kerättiin keräysliuoksessa (PBS, 20 mM N-etyylimaleimidi, NEM) raaputtamalla. Solut sentrifugoitiin pohjaan Eppendorf miniSpin pöytäsentrifuugilla (13 000 rpm, 30 s) ja supernatantti poistettiin. Solut lyysattiin 1x SDS-näytepuskurilla (5x SDS-näytepuskuri: 312 mM Tris-HCl, pH 6,8, 62,5 % (v/v) glyseroli, 10 % (w/v) natriumlauryylisulfaatti (SDS), 0,025 % (w/v) bromifenolisininen, 1425 mM  $\beta$ -merkaptetaanoli (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat)), johon oli lisätty 10 mM NEM ja 1:200 laimennettu Protease Inhibitor Cocktail P88340 (PIC; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat), ja sonikoitiin kaksi kertaa kymmenen sekunnin ajan 100 % teholla (Ultrasonic processor UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Saksa). Näytteisiin lisättiin 1:50  $\beta$ -merkaptetaanolia ja sekoitettiin voimakkaasti. Näytteiden proteiinit denaturoitiin 95 °C lämpöblokkissa viiden minuutin ajan. Kuumennetut näytteet ajettiin 7,5 % polyakryyliamidigeelille elektroforeettisesti (SDS-PAGE) 200 V jännitteellä. Näytteiden lisäksi geelille pipetoitiin proteiinistandardiksi 1,5  $\mu$ l PageRuler™ Prestained Protein Ladderia (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat).

SDS-PAGE:n jälkeen proteiinit siirrostettiin geeliltä 0,45  $\mu$ m nitroselluloosakalvolle (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Yhdysvallat) western blotin avulla. Siirrostus tehtiin siirrostuspuskurissa (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 25 % metanoli vedessä) 250 mA:lla tunnin ajan. Siirrostuksen jälkeen proteiinitaustan määrä minimoitiin ravistelemalla kalvoa blokkauuspuskurissa (5 % (w/v) rasvaton maitojauhe pesupuskurissa: TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20) tunnin ajan. Blokattu kalvo pestiin pesupuskurilla ensin 15 minuuttia ja vielä kaksi kertaa viisi minuuttia. Pestyä kalvoa ravisteltiin primäärivasta-ainetta sisältävässä blokkauuspuskurissa 4 °C:ssa yön yli. Sitoutumaton primäärivasta-aine pestiin pois pesupuskurilla ensin 15 minuuttia ja vielä kaksi kertaa viisi minuuttia. Piparjuuriperoksidaasikonjugoitu sekundäärivasta-aine laimennettiin pesupuskuriin, ja primäärivasta-aineella leimattua nitroselluloosakalvoa ravisteltiin sekundäärivasta-ainetta sisältävässä pesupuskurissa 45 minuuttia huoneenlämmössä, minkä jälkeen kalvoa pestiin pesupuskurilla kolme kertaa kymmenen minuuttia ja vielä kerran TBS:llä kymmenen minuuttia.

Proteiinien detektio tehtiin Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, Yhdysvallat) -reagenssisarjalla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Valotuksessa käytettiin Kodak BioMax -röntgenkasettia, ja valotettu kalvo kehitettiin Amersham Hyperfilm ECL -filmille (GE Healthcare, Buckinghamshire, Iso-Britannia) Kodak X-OMAT 1000 Processor -kehityslaitteella.

## Liite 2

### Raportojageenimääritykset

Seuraavana aamuna solut pestiin PBS:llä ja lyysattiin puoli tuntia 50 µl Reporter Lysis -puskurilla (Promega, Madison, Wisconsin, Yhdysvallat) -70 °C:ssa. Lyysatut solut sulatettiin, kerättiin Eppendorf-putkiin ja sentrifugoitiin pohjaan. Supernatantista otettiin 10 µl näytteet lusiferaasiaktiivisuuden ja β-galaktosidaasiaktiivisuuden määrittämistä varten 96-kuoppalevyille. Lusiferaasinäytteisiin lisättiin 30 µl Luciferase Assay Substrate -reagenssia (Promega, Madison, Wisconsin, Yhdysvallat) ja aktiivisuus määritettiin Thermo Scientific LUMINOSKAN Ascent -kuoppalevylukijalla. B-galaktosidaasiaktiivisuutta varten näytteille lisättiin 65 µl reaktioseosta, jonka koostumus on ilmoitettu Taulukko 7.

Taulukko 7. B-galaktosidaasiaktiivisuuden määrittämisessä käytetty reaktioseos.

Reagenssi	Pitoisuus
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
β-merkaptotetanoli (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat)	50 mM
OPNG (Sigma-Aldrich, Steinheim, Saksa)	0,74 mg/ml
Na-fosfaatti, pH 7	80 mM

Reaktion annettiin tapahtua 37 °C:ssa, kunnes näytteisiin tuli vaaleankeltainen väri. Näytteiden absorbanssi mitattiin 405 nm:ssä Thermo Labsystems Multiskan EX -kuoppalevylukijalla. Tulokset koottiin Microsoft Office Excel 2007 -taulukkoon, ja kunkin kokeen kolmesta rinnakkaisnäytteestä laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat.

### Liite 3

#### AR:n lokalisoituminen eri ligandeilla indusoituna

R1881:llä indusoidun EGFP-AR:n intensiteetit tumassa ja solulimassa sekä niiden erotus.

Taulukon lopussa erotusten keskiarvo (KA) ja keskihajonta (SD).

	Tuma	Solulima	Erotus
1	141	16	125
2	153	14	139
3	67	13	54
4	151	19	132
5	148	16	132
6	154	22	132
7	151	18	133
8	89	15	74
9	119	15	104
10	111	16	95
11	144	15	129
12	128	14	114
13	130	14	116
14	93	16	77
15	99	15	84
16	114	17	97
17	170	20	150
18	164	14	150
19	95	15	80
20	104	15	89
21	118	14	104
22	103	16	87
23	149	16	133
24	52	14	38
25	238	25	213
26	87	13	74
27	165	21	144
28	39	20	19
29	128	21	107
30	114	22	92
31	120	14	106
32	129	14	115
33	164	23	141
34	92	24	68
35	89	17	72
36	119	18	101
37	55	28	27
38	115	18	97
39	81	16	65
40	110	18	92
41	122	22	100
42	228	23	205
43	95	17	78
44	133	19	114
45	110	18	92
46	69	16	53
47	94	19	75

48	193	24	169
49	97	17	80
50	167	17	150
51	211	22	189
52	205	25	180
53	137	17	120
54	138	18	120
55	132	18	114
56	58	14	44
57	57	14	43
58	74	15	59
59	65	12	53
60	89	19	70
61	99	19	80
62	71	18	53
63	124	22	102
64	111	17	94
65	101	18	83
66	146	25	121
67	155	25	130
68	104	15	89
69	216	32	184
70	159	14	145
71	72	19	53
72	127	16	111
73	82	19	63
74	145	17	128
75	155	19	136
76	91	16	75
77	151	25	126
78	109	22	87
79	107	22	85
80	115	17	98
81	126	16	110
82	131	19	112
83	130	19	111
84	104	17	87
85	159	18	141
86	110	16	94
87	133	29	104
88	124	27	97
89	116	21	95
90	65	16	49
91	145	20	125
92	169	20	149
93	145	19	126
94	151	19	132
95	222	25	197
96	167	25	142
97	100	16	84
98	176	22	154
99	127	16	111
100	131	20	111
KA			105,83
SD			38,24827322

Bikalutamidilla indusoidun EGFP-AR:n intensiteetit tumassa ja solulimassa sekä niiden erotus. Taulukon lopussa erotusten keskiarvo (KA) ja keskihajonta (SD).

	Tuma	Solulima	Erotus
1	103	0	103
2	94	4	90
3	143	19	124
4	174	16	158
5	54	2	52
6	145	28	117
7	61	3	58
8	95	5	90
9	75	13	62
10	122	13	109
11	203	33	170
12	107	22	85
13	69	17	52
14	236	36	200
15	27	3	24
16	124	33	91
17	150	18	132
18	179	26	153
19	168	12	156
20	227	25	202
21	175	41	134
22	161	35	126
23	97	38	59
24	92	40	52
25	77	34	43
26	88	41	47
27	105	36	69
28	108	33	75
29	99	32	67
30	95	35	60
31	18	38	-20
32	112	41	71
33	117	40	77
34	113	38	75
35	78	47	31
36	136	41	95
37	97	32	65
38	69	48	21
39	39	37	2
40	43	35	8
41	77	26	51
42	78	28	50
43	67	31	36
44	48	25	23
45	47	23	24
46	112	56	56
47	100	38	62
48	102	39	63
49	118	36	82
50	46	25	21
51	52	26	26



52	135	32	103
53	88	26	62
54	48	37	11
55	49	36	13
56	50	35	15
57	153	38	115
58	116	38	78
59	125	49	76
60	124	43	81
61	118	49	69
62	229	56	173
63	207	47	160
64	78	28	50
65	104	33	71
66	91	40	51
67	76	28	48
68	92	32	60
69	117	39	78
70	78	33	45
71	109	28	81
72	196	58	138
73	75	20	55
74	118	79	39
75	91	40	51
76	119	87	32
77	36	18	18
78	53	18	35
79	97	36	61
80	101	40	61
81	89	34	55
82	33	18	15
83	115	41	74
84	83	34	49
85	170	39	131
86	109	38	71
87	101	35	66
88	76	38	38
89	84	36	48
90	86	32	54
91	29	19	10
92	34	17	17
93	29	17	12
94	80	42	38
95	28	32	-4
96	25	35	-10
97	34	33	1
98	232	102	130
99	120	34	86
100	60	25	35
KA			67,25
SD			46,09835

MDV3100:lla indusoidun EGFP-AR:n intensiteetit tumassa ja solulimassa sekä niiden erotus. Taulukon lopussa erotusten keskiarvo (KA) ja keskihajonta (SD).

	Tuma	Solulima	Erotus
1	79	36	43
2	35	26	9
3	36	65	-29
4	78	42	36
5	33	31	2
6	62	43	19
7	37	49	-12
8	33	47	-14
9	42	59	-17
10	35	21	14
11	39	53	-14
12	43	12	31
13	35	24	11
14	34	50	-16
15	75	52	23
16	43	37	6
17	84	75	9
18	73	55	18
19	123	83	40
20	109	72	37
21	29	30	-1
22	25	23	2
23	59	77	-18
24	104	69	35
25	48	38	10
26	64	54	10
27	55	30	25
28	54	40	14
29	58	46	12
30	23	50	-27
31	60	95	-35
32	49	92	-43
33	70	136	-66
34	55	102	-47
35	75	85	-10
36	39	37	2
37	60	50	10
38	70	100	-30
39	65	91	-26
40	20	49	-29
41	105	51	54
42	41	34	7
43	124	71	53
44	94	60	34
45	35	28	7
46	57	40	17
47	23	42	-19
48	44	47	-3
49	42	61	-19
50	51	33	18
51	38	39	-1

52	20	33	-13
53	33	43	-10
54	119	146	-27
55	59	54	5
56	41	30	11
57	59	63	-4
58	64	69	-5
59	26	48	-22
60	81	72	9
61	64	35	29
62	64	45	19
63	26	47	-21
64	105	64	41
65	100	73	27
66	84	94	-10
67	126	64	62
68	97	59	38
69	88	39	49
70	92	39	53
71	87	63	24
72	46	58	-12
73	47	53	-6
74	43	44	-1
75	37	34	3
76	66	139	-73
77	47	139	-92
78	44	90	-46
79	36	51	-15
80	34	45	-11
81	33	45	-12
82	40	37	3
83	44	37	7
84	95	46	49
85	103	42	61
86	38	37	1
87	56	71	-15
88	56	68	-12
89	48	62	-14
90	78	90	-12
91	40	64	-24
92	38	60	-22
93	41	41	0
94	114	53	61
95	76	36	40
96	32	39	-7
97	31	44	-13
98	32	46	-14
99	89	50	39
100	66	70	-4
KA			2,46
SD			28,94524

Luvut ilmaisevat EGFP-AR:n prosentuaalisen solunsisäisen lokalisaation kussakin käsittelyssä (n=100).

	R1881	Bikalutamidi	MDV3100
Tuma ++ (>100)	53	20	0
Tuma + (>10)	47	73	34
Yhtä paljon (0±10)	0	6	30
Solulima + (<-10)	0	1	36
Solulima ++ (<-100)	0	0	0

## Liite 4

### FRAP

FRAP-kokeissa mitatut fluoresenssin palautumisen puoliajat ( $t_{\text{half}}$ ) sekä lasketut keskiarvot (KA), keskihajonnat (SD) ja keskivirheet (SEM).

Flp EGFP-AR R1881	Flp EGFP-AR-K2R R1881	Flp EGFP-AR Bikalutamidi	Flp EGFP-AR-K2R Bikalutamidi
4,2295	5,1562	3,4955	3,8366
2,9655	6,0641	2,2407	2,9759
5,6551	3,404	2,8081	2,9524
3,7474	3,681	1,47	1,5243
3,7141	4,4406	1,4874	3,2164
4,1451	3,7972	1,4198	2,3388
3,0637	4,2099	3,7133	2,266
5,1499	5,579	1,4439	3,2899
5,6506	4,6144	3,1033	1,5183
5,187	2,8887	1,5701	1,525
3,5318	9,1232	3,2531	1,5021
2,5001	4,3398	1,49	1,5027
3,7946	4,8677	1,4753	2,1694
2,9384	6,4027	2,263	3,0665
4,2913	4,4665	2,1544	2,2048
4,3919	5,1432	2,8406	1,5273
4,6544	7,625	1,6745	2,2812
4,6153	5,5196	1,58	2,0357
4,8393	3,9898	1,4085	1,5307
3,9657	5,2958	2,9933	1,5442
3,5192	4,6936	3,2142	2,3134
2,0537	5,5317	2,2377	2,6924
3,1976	4,5173	0,6497	2,331
5,3548	3,8723	0,6905	1,4745
2,0979	5,968	1,5884	2,2843
2,8895	2,9824	4,0997	4,4099
4,9429	5,4887	2,0917	1,4635
3,8295	5,1731	2,7904	2,0953
2,7173	5,0062	0,6717	1,507
4,3544	6,423	1,5703	1,4928
3,9874	5,3043	2,2456	1,4599
3,6302	3,7257	2,1409	2,2646
4,1899	5,3807	1,4006	1,5026
4,3224	4,6238	2,1701	1,4585
5,1819	3,749	2,3478	3,5041

	6,0906	3,7792	2,2501	2,821
	3,5031	6,3083	1,4999	1,4801
	5,3226	4,4103	3,1462	2,2635
	2,8596	5,212	3,5896	2,9819
	3,4624	3,7669	1,4908	2,0906
	2,9849	6,3428	2,197	1,5066
	3,6193	5,1807	2,1272	4,6469
	1,3695	3,709	1,5286	2,0553
	3,6697	4,5939	2,3288	1,4754
	3,6055	2,5358	1,527	2,2115
	4,4751	4,2154	2,3048	1,4726
	5,009	5,4887	1,5497	5,5741
	4,5754	2,9637	1,5218	4,2677
	2,983	4,3315	3,9659	2,104
	3,6832	5,1437	1,4225	1,5626
KA	3,930244	4,820602	2,12488	2,311516
SD	1,012624064	1,214112797	0,842513956	0,964658124
SEM	0,143206669	0,171701478	0,119149466	0,13642326