

**Filamiini A:n ja taliinin sitoutuminen  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -  
integrinien sytoplasmisiin domeeneihin**

Pro gradu-tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Molekyylibiologia

29.8.2006

Kimmo Isoniemi

## **Alkusanat**

Pro gradu-työ tehtiin Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella solubiologian osastolla. Filamiini A:n 21-domeenin puhdistus tehtiin Oulun yliopiston Biokemian laitoksella professori Jari Ylänteen ryhmässä. Pro gradu-tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin touko-joulukuussa 2005.

Haluan kiittää avustuksesta pro gradu-tutkielmani tekoon ohjaajaani professori Jari Yläntettä ohjeistuksesta, taustatiedoista ja tutkimuksen mahdollistamisesta. Laboratoriomestari Arja Mansikkaviita on ollut korvaamattomana apuna laboratorion välinesokkeloissa. Myös FM Mira Tulla on auttanut tiedoillaan. Lisäksi kiitän muutakin laboratorion väkeä kaikesta avusta ja toimivan työilmapiirin luomisesta.

Jyväskylässä 29. elokuuta 2006

Kimmo Isoniemi

---

**Tekijä:** Kimmo Isoniemi  
**Tutkielman nimi:** Filamiini A:n ja taliinin sitoutuminen  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-integriinien sytoplasmisiin domeeneihin  
**English title:** Binding of filamin A and talin to  $\beta$ 7 and  $\beta$ 1A integrin cytoplasmic domains  
**Päivämäärä:** 29.8.2006 **Sivumäärä:** 63

**Laitos:** Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
**Oppiaine:** Molekyylibiologia  
**Tutkielman ohjaaja(t):** Jari Yläne

---

### Tiivistelmä:

Integriinit ovat heterodimeerisiä adheesioreseptoreita, jotka muodostuvat  $\alpha$ - ja  $\beta$ -osista. Niillä on olennainen rooli sikiön kehityksessä, valkosolujen liikkumisessa, angiogeneesissä ja kasvaimen metastaasissa. Integriinit välittävät biokemiallisia signaaleja ja mekaanista voimaa solukalvon läpi. Filamiini A on suuri, aktiinisäikeitä ristiin liittävä proteiini, joka säätelee solun migraatiota sitoutumalla integriinin sytoplasmisiin  $\beta$ -häntiin. Tärkein integriinejä sitova kohta filamiini A:ssa on immunoglobuliininkaltainen domeeni 21. On osoitettu, että voimakkaampi filamiini A:n sitoutuminen integriinien  $\beta$ -häntiin vähentää solujen migraatiota. Periventrikulaarinen heterotopia on filamiini A:n mutaation aiheuttama sairaus, jossa hermosolujen migraatio aivokuorelle kehityksen aikana on vähentynyt. Taliini on toinen aktiinia sitova proteiini. Taliinilla on tärkeä rooli integriinin affiniteetin lisäämisessä solunulkoisia ligandeja kohtaan (integriinin aktivaatio). Integriinin aktivaatio on olennainen prosessi solun migraatiolle ja solun kiinnittymiselle kollageeniin ja fibronectiiniin. Taliini aiheuttaa jossain tapauksissa integriinin aktivaation, kun se sitoutuu integriinien  $\beta$ -häntiin N-terminaaliosallaan. Filamiini A sitoutuu kompetitiivisesti päällekkäin meneviin paikkoihin integriinin  $\beta$ -hännissä taliinin kanssa. Käytimme fluorometristä määrittystä ja affiniteettikromatografiaa tutkiaksemme filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin pääosan F2- ja F3-domeenit sisältävän polypeptidin sitoutumista integriinien  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-hännistä saatuihin peptideihin. Taliinin F2-F3-domeenien sitoutuminen  $\beta$ 1A- ja  $\beta$ 7-häntiin oli suurinpiirtein yhtä voimakasta, kuten myös filamiini A:n 21-domeenin. Taliinin F2-F3-domeenit sitoutuivat molempiin häntiin huomattavasti filamiini A:n 21-domeenia voimakkaammin.  $K_d$ :ksi filamiini A:n 21-domeenin sitoutumiselle saatiin  $\beta$ 1A:han 1600 nM ja  $\beta$ 7:ään 1400 nM, kun taas taliinin F2-F3-domeenien dissosiaatiovakio  $\beta$ 1A:ta kohtaan sai arvon 93 nM ja  $\beta$ 7:ä kohtaan 86 nM. Tulevaisuudessa filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin päädomeenin sitoutumista integriinien  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-häntiin tullaan tutkimaan tarkemmin pistemutaatioilla sitoutumiskohtiin. Nämä kokeet voivat auttaa ymmärtämään solun migraatiota ja integriinin aktivaatiota paremmin.

---

**Avainsanat:** aktiini, filamiini, integriinien aktivaatio, integriinit, solujen kiinnittyminen, solujen migraatio, taliini

---

**Author:** Kimmo Isoniemi  
**Title of thesis:** Binding of filamin A and talin to  $\beta 7$  and  $\beta 1A$  integrin cytoplasmic domains  
**Finnish title:** Filamiini A:n ja taliinin sitoutuminen  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -integriinien sytoplasmisiin domeeneihin  
**Date:** 29.8.2006 **Pages:** 63  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Molecular Biology  
**Supervisor(s):** Jari Yläanne

---

**Abstract:**

Integrins are heterodimeric adhesion receptors which contain  $\alpha$ - and  $\beta$ -parts. They play a crucial role in embryonic development, leukocyte trafficking, angiogenesis and tumor metastasis. They transmit biochemical signals and mechanical force through plasma membrane. Filamin A is a large actin cross-linking protein, which regulates cell migration by binding to integrin cytoplasmic  $\beta$  tails. The major integrin-binding site in filamin A is immunoglobulin-like domain 21. Stronger filamin A binding to integrin  $\beta$  tails has been shown to reduce cell migration. Periventricular heterotopia is a disease caused by filamin A mutation. In periventricular heterotopia neuronal migration to cortex during development is reduced. Another actin-binding protein, talin, has an important role in controlling affinity of integrins for their extracellular ligands (integrin activation). Integrin activation is crucial process for cell migration and cell adhesion to collagen and fibronectin. Talin binds to integrin  $\beta$  tails with its N-terminal head domain causing in some cases integrin activation. Filamin A binds competitively to overlapping places in integrin  $\beta$  tails with talin. We used fluorometric assay and affinity chromatography to study filamin A 21 domain and a polypeptide containing talin F2 and F3 domains from head domain binding to peptides derived from integrin  $\beta 7$  and  $\beta 1A$  tails. Binding for talin F2-F3 domains was significantly stronger to both of these tails with  $K_d=93$  nM to  $\beta 1A$  and  $K_d=86$  nM to  $\beta 7$  tail compared to filamin A 21 domain for which  $\beta 1A$  binding had  $K_d=1600$  nM and  $\beta 7$  binding had  $K_d=1400$  nM. Talin F2-F3 domains bound  $\beta 7$  and  $\beta 1A$  almost equally strong as did filamin A also. In the future, binding to these tails will be studied further with point mutations to some of these binding sites. These experiments may help us to understand cell migration and integrin activation better.

---

**Keywords:** actin, cell adhesion, cell migration, filamin, integrin activation, integrins, talin

# Sisällysluettelo

1. JOHDANTO	8
1.1.Solun kiinnittyminen soluväliaineeseen	8
1.2.Solujen migraatio	10
1.3.Aktiinifilamenttiverkostot	13
1.4.Integriinit	15
1.4.1. Integriinien solunulkoisten osien rakenne	16
1.4.2. Integriinien solunulkoiset ligandit	17
1.4.3. Integriinien aktivaatio	18
1.4.4. Integriinien sytoplasmiset osat integriinien aktivaatiossa	20
1.5.Filamiinit	22
1.5.1. Filamiinien toiminta	24
1.6.Taliini	26
1.6.1. Taliinin FERM-domeeni	27
1.6.2. Taliini integriinin aktivaation välittäjänä	27
1.6.3. Taliini-integriini-vuorovaikutusten säätely	28
1.7.Integriinien sytoplasmisten osien linkittäminen solutukirankaan	29
1.7.1. Taliinivälitteiset integriini-aktiinilinkit	30
1.7.2. Filamiini välittäjänä	31
1.7.3. $\alpha$ -aktiniini-välitteiset yhdyssiteet	32
1.7.4. Muita integriini-solutukirankayhdistäjäproteiineja	33
2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS	34
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	35
3.1.Käytetyt proteiinit, plasmidit ja solut	35
3.2.Proteiinin tuotto	35
3.3.Proteiinin puhdistus	35

3.4. Bradfordin analyysi ja proteiinkonsentraation määrittäminen	
absorbanssista	37
3.5. Europiumleimaus	37
3.6. DELFIA	38
3.7. Affiniteettikromatografia	39
3.8. SDS-PAGE	41
3.9. Western blottaus	41
4. TULOKSET	43
4.1. Fuusioproteiinin puhdistus	43
4.2. DELFIA-metodin optimointi	43
4.3. Filamiini A:n 21-domeenin, filamiini C:n 23-24-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien europiumleimaus	44
4.4. Filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien konsentraatiokäyrät DELFIA:lla	44
4.5. Affiniteettikromatografian optimointi	47
4.6. Filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien konsentraatiokäyrät ja kompetitiivinen määrittäminen affiniteettikromatografiassa	48
5. TULOSTEN TARKASTELU	52
6. LÄHDELUETTELO	56

## Lyhenteet

ABD	Actin-binding domain, aktiinia sitova domeeni
BSA	Bovine serum albumin, naudan seerumista eristettyä albumiinia
CH-domeeni	Calponin homology domain, kalponiinihomologiadomeeni
EGF	Epidermal growth factor, epidermaalinen kasvutekijä
ES-solut	Embryonic stem cells, sikiön kantasolut
F-aktiini	Säiemäinen aktiini, joka muodostuu useista aktiiniproteiineista
FLNa21	Filamiini A:n 21-domeenin sisältävä peptidi
FLNc23-24	Filamiini C:n 23- ja 24-domeenit sisältävä peptidi
FRET	Fluorescence resonance energy transfer, Fluoresenssi-resonanssi-energian-siirto
GST	Glutathione-s-transferase, glutationi-s-transferaasi
GTP	Guanosine triphosphate, guanosiinitrifosfaatti
HeLa-solut	Henrietta Lacks-solut
HRP	Horseradish peroxidase, piparjuuriperoksidaasi
NMR	Nuclear magnetic resonance, Ydinmagneettinen resonanssi
PBS	Phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PSI-domeeni	Pleksiini-semaforiini-integriini-domeeni
PTB	Phosphotyrosine binding, fosforyloitunutta tyrosiinia sitova
PVDF	Polyvinylidene difluoride, polyvinyylidifluoridi
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, natriumlauryylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
Taliini F2-F3	Taliinin F2- ja F3-domeenit sisältävä peptidi

# 1. JOHDANTO

## 1.1 Solun kiinnittyminen soluväliaineeseen

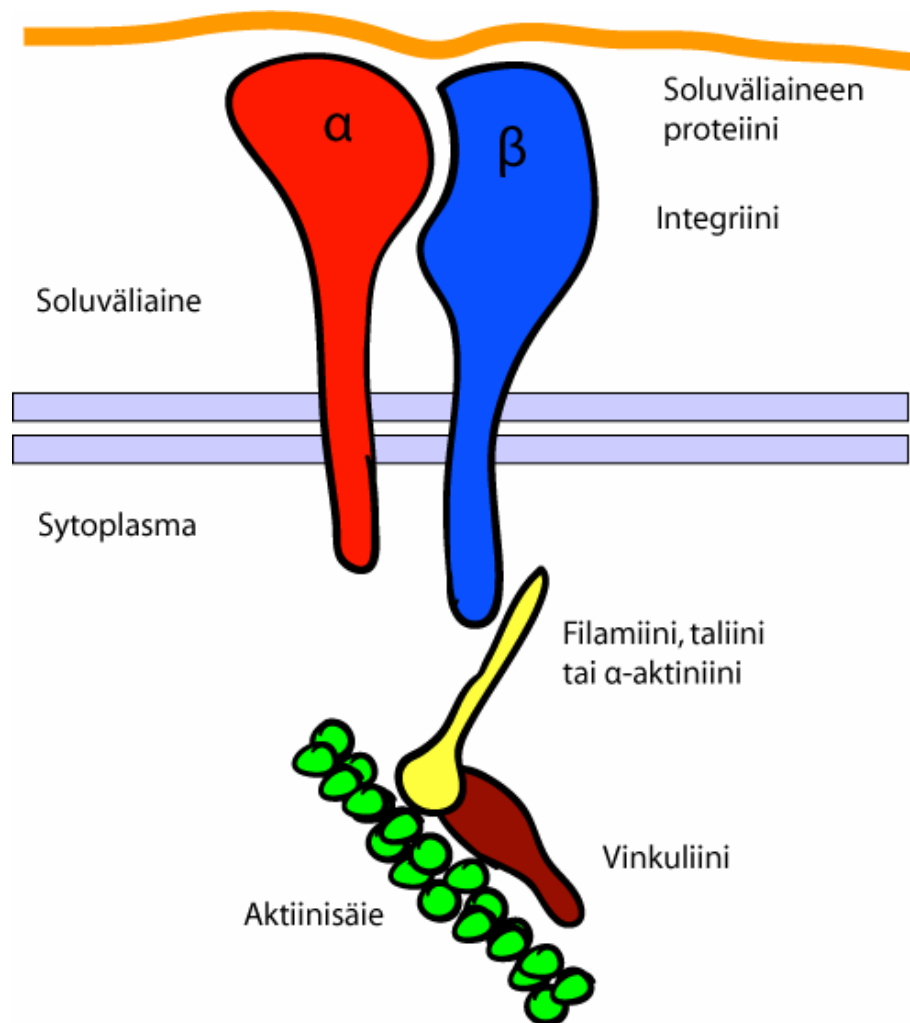
Monisoluisessa eliössä solujen pitää jotenkin kiinnittyä toisiinsa ja soluväliaineeseen (ECM), jotta eliö säilyisi koossa ja pitäisi muotonsa. Eliöillä on erilaisia tukevia ja yhdistäviä proteiineja ja rakenteita solujensa ulkopuolella vahvistamassa kudosta ja useissa muissa tehtävissä. Solujen liitoskohdat toisiin soluihin tai soluväliaineeseen jaetaan sulkeviin, ankkuroiviin ja kommunikoiviin liitoksiin. Suljettuja liitoksia ovat tiukat liitokset selkärangaisilla ja septate-liitokset selkärangattomilla. Ankkuroivia liitoksia ovat aktiinifilamenttien kiinnittymiskohdat, joista adherenssiliitokset ovat solujen välillä ja fokaaliadheesiot solujen ja soluväliaineen välillä. Myös välikokoisten filamenttien kiinnittymiskohdat kuuluvat ankkuroiviin liitoksiin. Välikokoisten filamenttien kiinnittymiskohtia solujen välillä ovat desmosomit ja solujen ja soluväliaineen välillä hemidesmosomit. Kommunikoivat liitokset on jaettu aukkoliitoksiin, kemiallisiin synapseihin sekä plasmodesmatoihin, joita on vain kasveilla. Integriinit ovat pääosassa hemidesmosomeissa ja fokaaliadheesioissa (Alberts ym., 2002).

Hemidesmosomit yhdistävät soluväliaineen keratiinin muodostamaan solutukirankaan. Ne kiinnittävät epiteelisoluja alla olevaan tyvikalvoon kerroksellisessa levyepiteelissä, transitionaalisessa ja pseudokerroksellisessa epiteelissä. Hemidesmosomit yhdistyvät välikokoisiin filamentteihin. Tärkein hemidesmosomeihin liittyvä integriini on  $\alpha_6\beta_4$  (ks. yleiskatsaus Nievers ym., 1999).

Fokaaliadheesiot muodostuvat solukalvon lävistävistä integriineistä ja monenlaisista adaptoriproteiineista. Ne liittyvät solun ulkopuolella soluväliaineeseen ja solun sisäpuolella aktiinifilamenttiverkostoon (Kuva 1.1). Fokaaliadheesiot muodostuvat, kun integriinit sitoutuvat soluväliaineen komponenttiin kuten esimerkiksi fibronektiiniin. Tämä sitoutuminen saa aikaan signaaliketjun aktivoitumisen, joka johtaa aktiini-myosiinirangan supistumiseen solun sisällä GTP:tä (guanosiinitrifosfaattia) sitovan Rho-proteiinin avustuksella. Supistuva solutukiranka saa aikaan integriinien kasautumisen solun pinnalla muodostaen fokaaliadheesioita. Fokaaliadheesiot ankkuroivat solua ja vaikuttavat



aktiivisesti soluväliaineen ja solun väliseen signalointiin (outside-in-signalointi). Integriinien kasautuminen johtaa tyrosiinifosforylaatiokaskadiin solun sisällä ja mm. Akt- ja MAPK (mitogeneeniaktivoitu proteiinkinaasi)-proteiinien aktivoitumiseen. Lisäksi solu pystyy viestittämään integriinien kautta takaisin soluväliaineeseen (sisältä ulos-signalointi). Solutukiranka vaikuttaa soluväliaineen uudelleenjärjestäytymiseen ja fokaaliadheesiot osaltaan solutukirangan aktiiniverkon säätelyyn. Fokaaliadheesioiden kautta kulkee apoptoosiin, solusykliin, migraatioon ja kasvuun vaikuttavia viestejä (ks. yleiskatsaus Sarkar, 1999).



Kuva 1.1: Fokaaliadheesioiden rakenne ja pääkomponentit: Integriini sitoutuu soluväliaineen proteiineihin. Solun integriinit sitoutuvat aktiinisäikeisiin useiden yhdistäjäproteiinien avulla (Kuva muokattu Alberts ym., 2002, kuvan s. 1074 perusteella).

Tällä hetkellä yli 50 proteiinin on havaittu liittyvän fokaaliadheesioihin ja samankaltaisiin soluväliaineen kiinnikkeisiin. Useimmat näistä sisältävät useita domeeneja, joiden kautta syntyy vuorovaikutuksia useiden muiden molekyylien kanssa. Näin on mahdollista luoda heterogeeninen, tiheä proteiiniverkosto kiinnikepaikan sytoplasmapuolelle. Tämän kasautuman rakennetta säädellään useilla mekanismeilla. Näitä ovat eri proteiinikumppaneiden kompetitio samoihin sitoutumispaikkoihin, tyrosiinin fosforylaation aikaansaamat vuorovaikutukset tai niiden puute sekä proteiinikomponenttien konformaatiomuutokset, jotka voivat vaikuttaa niiden reaktiivisuuteen. Integriinivälitteiset kiinnikkeet voivat vaihdella rakenteeltaan ja muuttua dynaamisesti pistemäisistä fokaalikomplekseista stressisäiekiinnitteisiksi fokaalikontakteiksi. Fokaalikontaktit voivat myöhemmin muodostaa fibronektiinisidoksia omaavia säikeisiä kiinnikkeitä. Nämä muutokset saavat energiaa solun aktiiniin ja myosiiniin perustuvasta supistumiskoneistosta tai soluihin vaikuttavasta ulkopuolisesta voimasta. Soluväliaineen jäykkyys on muutoksia säätelevä tekijä. Soluväliaineeseen kiinnittyminen tapahtuu solukalvon pohjapuolella useissa pienissä ja erilaistuneissa alueissa. Nämä alueet ovat tiukasti kiinni substraatissa jättäen noin 10-15 nm:n välin solun ja substraatin väliin. Näitä paikkoja nimitetään fokaaliadheesioiksi tai fokaalikontakteiksi (ks. yleiskatsaus Zamir ja Geiger, 2001).

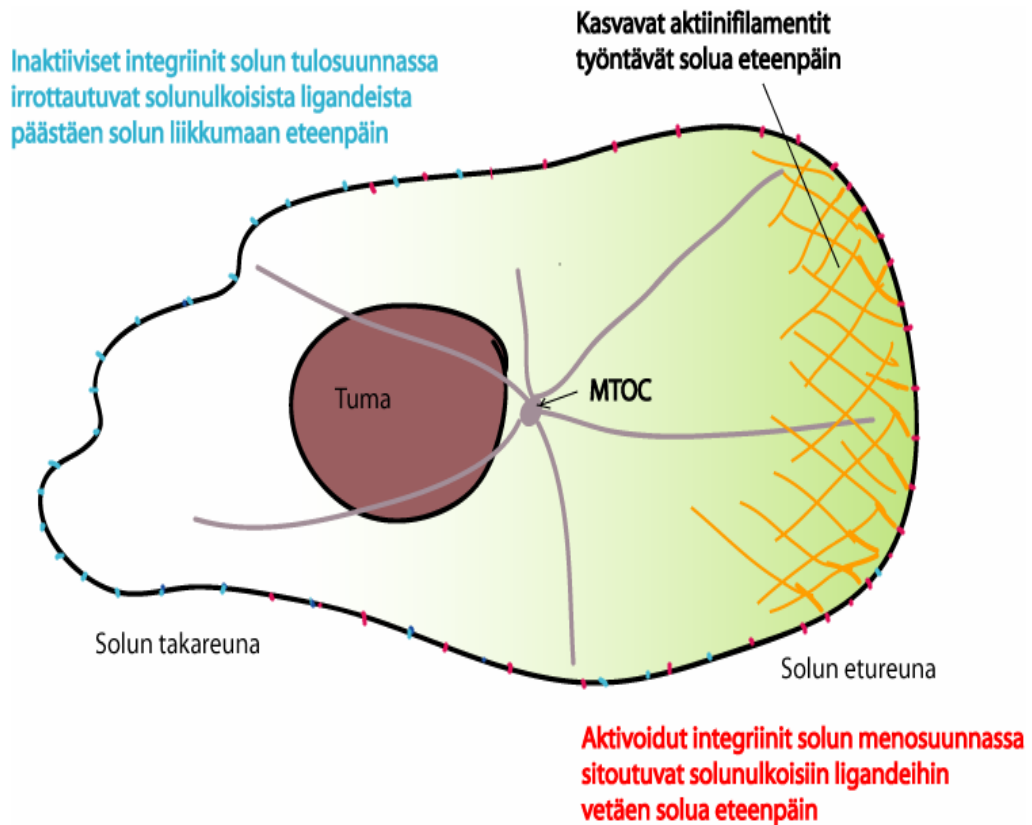
## **1.2 Solujen migraatio**

Solujen migraatiota tapahtuu sekä yksi- että monisoluisissa eliöissä. Solujen migraatio liittyy yksinkertaisilla organismeilla pariutumiseen ja ravinnonetsintään (ks. yleiskatsaus Vicente-Manzanares ym., 2005). Monisoluiset eliöt taas tarvitsevat solujen erilaistumista ja erilaistuneiden solujen liikettä oikealle paikalle. Monisoluisilla eliöillä solujen migraatio välittää kudosten muodostumista, organogeneesiä ja homeostaasia (ks. yleiskatsaus Ridley ym., 2003). Myös haavan paraneminen, angiogeneesi ja leukosyyttiliikenne ovat riippuvaisia solujen migraatiosta. Solujen migraation ymmärtäminen on tärkeää myös syöpätutkimukselle, koska syövässä normaalisti migroimattomat solut voivat alkaa liikkua ja synnyttävät etäpesäkkeitä muualle kehoon. Tätä kutsutaan metastasiksi ja ilmiön tapahtuminen on merkki pahanlaatuisesta syövästä.

Solun migraatiossa solu polarisoituu, jolloin muodostuvat funktionaalisesti erilaiset etureuna ja takareuna. Etureuna osoittaa liikkeen suuntaan. Aktiinitukirangalla on tärkeä rooli solun migraatiossa, sillä aktiinin polymerisaatio työntää solun etureunaa eteenpäin. Migraatio vaatii useiden kohtien kontrollia solussa onnistuakseen. Migraatio on monimutkainen tapahtuma ja pienikin virhe tapahtumaketjussa voi johtaa esimerkiksi verisuonisairauksiin, syöpään, kroonisiin tulehduksiin, henkiseen jälkeenjääneisyyteen sekä virus- ja bakteeri-infektioihin (ks. yleiskatsaus Vicente-Manzanares ym., 2005). Tästä esimerkkinä on filamiini A:n mutaation aiheuttama periventrikulaarinen heterotopia, jossa hermosolujen migraatio aivokuorelle on heikentynyt. Hermosolujen migraation heikentyminen johtuu luultavasti puutteellisesta etureunan pidennyksestä (ks. yleiskatsaus Lambert de Rouvroit ja Goffinet, 2001). Sairaus on yhdistetty X-kromosomiin. Periventrikulaarisen heterotopian oireisiin kuuluu epileptisiä kohtauksia, lateraalisiin ventrikkeleihin syntyviä hermosolukasaumia, sekä suuri verisuonisairauksien riski. Periventrikulaarinen heterotopia tappaa miespuolisen kantajan usein jo kohdussa ilmeisesti mutaatiosta riippuen (Fox ym., 1998).

Solut tarvitsevat migroidessaan kiinnikkeitä. Kiinnikkeet sijaitsevat solukalvolla ja kiinnittävät soluja ympäröivään kudokseen tai muuhun aineeseen. Kiinnikkeet rakentuvat polarisoituneen solun etureunalle ja hajaantuvat pääsääntöisesti takareunalta solunulkoisten signaalien kautta säädellen solun liikkeitä (Webb ym., 2004). Kiinnikkeet voivat hajota myös etureunalla solun ulostyöntymisen aikana muiden kiinnikkeiden komponenteiksi aktiinin vaihtumiseksessa tai kypsyy, jolloin ne kasvavat suuremmiksi. Ei ole täysin selvää, mikä tämän määrää, mutta esimerkiksi Rho GTPaasit ovat kriittisiä prosessille. Useat proteiinit liittävät aktiinisäikeitä kiinnikkeitä muodostaviin integriineihin säädellen signalointia integriineistä aktiinirankaan ja integriinien aktivaatiota. Integriinit yhdistävät osaltaan solut soluväliaineeseen. Kun solu on liikkumattomana levossa, useimmat integriineistä ovat inaktiivisia. Solun pyrkiessä liikkumaan solu aktivoi integriinejä lähinnä solun menosuunnasta, jolloin ne sitoutuvat tiukemmin soluväliaineeseen, ja inaktivoi integriinejä lähinnä solun takaosasta, jolloin näiden sitoutuminen soluväliaineeseen heikkenee. Sitoutuminen menosuuntaan vetää solua eteenpäin ja sitoutumisen heikkeneminen takaosasta päästää solun liikkumaan eteenpäin (Kuva 1.2). Lisäksi solu vahvistaa migraatiota poimuttamalla etureunan solukalvoaan aktiinisäikeiden avulla.

Aktiinifilamenttien työntäessä solukalvoa syntyy etureunan pidennys, joka luetaan migraation ensimmäiseksi vaiheeksi. Solukalvo liikkuu näin haluttuun suuntaan ja kiinnittyessään vetää solua perässään (ks. yleiskatsaus Lambert de Rouvrait ja Goffinet, 2001, yleiskatsaus Vicente-Manzanares ym., 2005).



Kuva 1.2: Solun migraation toimintaperiaate (Kuva muokattu yleiskatsauksen Vicente-Manzanares ym., 2005, perusteella).

Migraatiossa myös solun tuma, golgin laite ja mikrotubulusten organisointikeskus (MTOC) liikkuvat solussa mikrotubulusten organisointikeskuksen sijoittuessa johtavaan päähän solua. Tuman translokaatio tai toiselta nimeltään nukleokineesi onkin migraation toinen vaihe. Se riippuu oleellisesti mikrotubulusverkostosta monissa soluissa aina limasienistä selkärankaisiin (ks. yleiskatsaus Vicente-Manzanares ym., 2005, yleiskatsaus Lambert de Rouvrait ja Goffinet, 2001). Migraation kolmannessa vaiheessa takareunan täytyy supistua ja takareunan kiinnikkeiden hajota solun liikuessa. Tätä säätelevät mm. mikrotubuluksista riippuvainen dynamiinin kohdistus ja kiinnikekomponenttien endosytoosi (Ezraty ym., 2005, yleiskatsaus Lambert de Rouvrait ja Goffinet, 2001). Myosiinivälitteistä supistumista välittää myosiinin kevyen ketjun (MLC) fosforylaatio. Tätä taas säätelee mm. RhoA, Rac ja Rho-kinaasi. Kiinnikekontaktien hajoamisessa osana on myös affiniteetin

säätely fosforylaatiolla (ks. yleiskatsaus Vicente-Manzanares ym., 2005) tai esimerkiksi taliinin proteolyysillä kalpaiinin avulla (Franco ym., 2004). Kalsium on myös tärkeä säätelijä solun takareunan supistumisessa (ks. yleiskatsaus Vicente-Manzanares ym., 2005).

### **1.3 Aktiinifilamenttiverkostot**

Aktiinifilamenttien muodostamat rakenteet vaihtelevat yhdensuuntaisista kimpuista geelimäisiin verkostoihin. Aktiinifilamentit muodostavat kolmiulotteisia, ortogonaalisia verkostoja. Verkostot mukautuvat joustuen sisäiseen veden, liuenneiden aineiden ja pienten soluelinten diffuusioon. Verkosto vastustaa heikkoa osmoottista ja hydrostaattista nesteen virtausta, toimii sekä rakennustelineenä heikoille supistuksille että esteenä suurten soluelinten liikkeelle. Verkostot rajaavat lisäksi signaalinvälitystä ja muita solunsisäisiä toimintoja (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

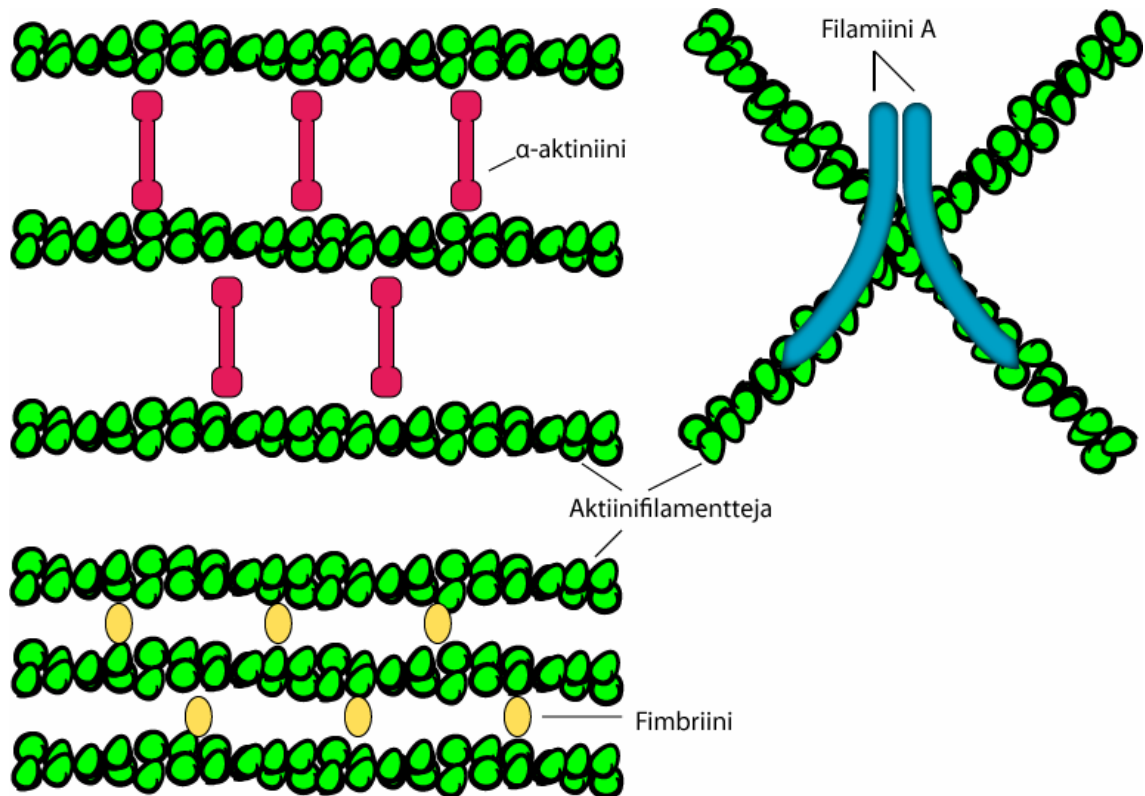
Aktiinia sitovat proteiinit rakentavat aktiinisolutukirangan. Niillä on useita tehtäviä: aktiinialayksikköjen lisäyksen ja poiston säätely lineaarisista aktiinipolymeereistä, aktiinipolymeerien irrottaminen ja kiinnittäminen kolmiulotteiseen rakennuskehikkoon ja aktiinisäikeiden kiinnittäminen solukalvoihin (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

Filamiini on tehokkain tunnettu aktiinifilamenttiverkostojen muodostaja (Brotschi ym., 1978, yleiskatsaus Stossel ym., 2001), sillä vain yksi filamiini A-dimeeri aktiinifilamenttia kohden riittää hyytelöimään aktiinin (Ito ym., 1992). Muodostuvien aktiiniverkostojen laatu soluissa riippuu filamiinin moolisesta suhteesta aktiiniin. Kun filamiinin suhde aktiinimonomeereihin on korkea, noin 1:10-50, muodostuu samansuuntaisia aktiinifilamenttikimppuja. Kun taas filamiinin moolisuhde aktiinia kohti on pienempi, noin 1:150-740, muodostuu ortogonaalisia aktiiniverkostoja. Tämä riippuu myös mistä solutyypistä filamiini on peräisin, koska esimerkiksi makrofaageista tai verihituleista peräisin olevat filamiinit sitovat aktiinia hiukan eri affiniteetilla. Melanoomasoluissa filamiinin suhde aktiiniin on noin 1:80-140 (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001b). Filamiinin affiniteetti aktiiniin on samaa luokkaa kuin muissa aktiinia sitovissa proteiineissa, mutta joustava rakenne mahdollistaa monipuolisemmat liittymiskulmat ja

tehokkaamman verkottumisen. Filamiinimolekyylit levittäytyvät tasaisesti koko aktiinifilamenttiverkoston alueelle. Ne vakauttavat kolmiulotteisia aktiiverkkoja ja liittävät niitä solukalvoon. Lisäksi filamiinit integroivat solun rakenteellisia ja signaalointiin liittyviä tehtäviä ja ovat olennaisia sikiön kehitykselle ja solun liikkumiselle (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

Filamiinilla ja monilla muilla aktiinia sitovilla proteiineilla on samankaltainen aktiinia sitova domeeni: ABD (actin-binding domain). Jotta proteiini pystyisi yhdistämään aktiinisäikeitä, sen biologisessa yksikössä on oltava ainakin kaksi sitoutumispaikkaa aktiinille. Sekä filamiini että  $\alpha$ -aktiniini muodostavat kahden polypeptidiketjun muodostamia homodimeerejä (Kuva 1.3). Spektriini taas yhdistyy heterotetrameereiksi, joissa on kaksi erilaista ABD:n sisältävää polypeptidiketjua (ks. yleiskatsaus Viel, 1999, yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001b). Tiukkoja rakenteita muodostavilla plastiinilla, fimbriinillä, ja ABP-67:lla (actin-binding protein 67) on kaksi ABD:tä samassa polypeptidissä (Kuva 1.3). Plakin-perheen jäseniä ovat plektiini ja dystoniini, joilla on ABD ja välikokoisia filamentteja sitovat osat. ACF-7/MACF:llä on ABD ja mikrotubuluksiin sitoutuva osa (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001b). Aktiinipäät liittyvät toisten aktiinimolekyylien keskelle muodostaen T- ja Y-muotoisia haarautumakohtia (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

Integriinit voivat muodostaa sopivan solunsisäisen paikan aktiinifilamenttien järjestäytymiselle kiinnittyneissä ja migroivissa soluissa. Tämä tapahtuu integriini-solutukirankalinkkien ja integriinivälitteisten ulkoa sisälle-signaalien avulla. Useat näihin tapahtumiin osallistuvista aktiinin järjestäytymisen säätelyssä toimivista proteiineista ovat joko fokaaliadheesioiden komponentteja tai vuorovaikuttavat integriinien  $\beta$ -häntiin sidoksissa olevien solutukirangan proteiinien kanssa (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000).



Kuva 1.3: Erilaisia aktiineja yhdistäviä proteiineja. Fimbriini liittää aktiinit tiukoiksi kimpuiksi,  $\alpha$ -aktiniini muodostaa löysempiä kimppuja kun taas filamiini A mahdollistaa aktiiniverkoston syntymisen liittämällä niitä ristikkäin suurin, joustavin kulmin (Kuva muokattu Alberts ym., 2002, perusteella).

## 1.4 Integriinit

Integriinit ovat heterodimeerisiä molekyylejä. Ne koostuvat  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alalyksikköjen yhteenliittymistä. Integriinien  $\alpha$ -alalyksiköitä on 18 ja  $\beta$ -alalyksiköitä 8 erilaista ja ne muodostavat ainakin 24 heterodimeeriyhdistelmää. Integriinien monimuotoisuutta lisää myös joidenkin  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alalyksikköjen mRNA:n vaihtoehtoinen silmukointi sekä posttranslacionaaliset modifikaatiot (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001a).

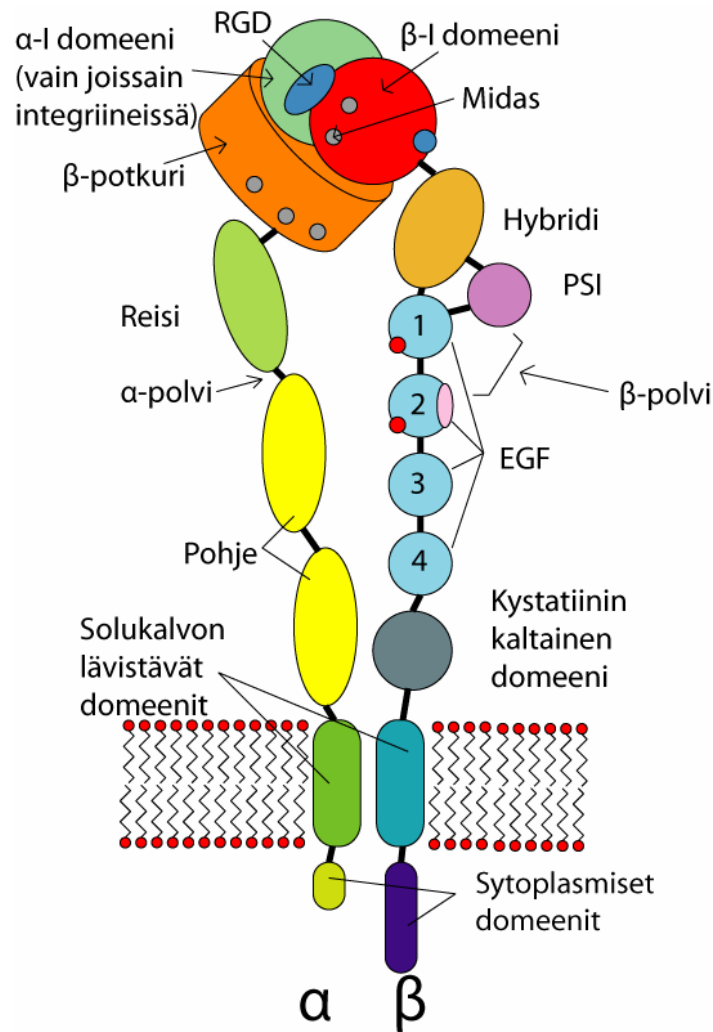
Integriinit toimivat solujen kiinnittymisessä yhdistäen soluväliaineen solun tukirankaan ja siinä erityisesti aktiinisäikeisiin. Integriinien tehtäviin kuuluu myös biokemiallisten signaalien ja mekaanisen voiman siirto solukalvon läpi (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). Soluväliaineen uudelleenjärjestäytyessä syntyy integriinien avulla jännitteitä, jotka mahdollistavat solujen migraation. Solun tukirangan liittäminen integriineihin mahdollistaa solujen kiinnittymisen soluväliaineeseen ja toisiinsa, solun muodon jonkinasteisen kontrollin sekä geenien ilmentymisen säätelyn (Choquet ym., 1997). Integriinit toimivat

signalointireittien eri vaiheissa säädellen solujen jakautumista, erilaistumista, apoptoosia ja migraatiota. Solunsisäiset signaalit, jotka vaikuttavat lopulta näihin ilmiöihin, voivat välittyä integriineihin sitoutuvien solunsisäisten komponenttien avulla. Nämä proteiinit voivat säädellä integriinien sitoutumista solunsisäisiin signalointireitteihin (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001a).

### 1.4.1 Integriinien solunulkoisten osien rakenne

$\alpha$ V $\beta$ 3-integriini on ensimmäinen integriini, jonka rakenne on kyetty selvittämään kokonaisuudessaan (ks. yleiskatsaus Xiong ym., 2001). Integriinin yleinen rakenne muodostuu pallomaisesta ”päästä”, jota kannattelee kaksi sauvamaista ”jalkaa”. Tärkein kontakti  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaysikköjen välillä on pääalue, joka muodostuu seitsensiivekkeisestä  $\beta$ -potkurista ja  $\beta$ I-domeenista. Joissain integriinien  $\alpha$ -alaysiköissä on  $\beta$ -potkurin yhteyteen laskostuva ns. lisätty domeeni eli  $\alpha$ I-domeeni (inserted domain), jota kutsutaan myös von Willebrand-tekijän A-domeenin kaltaiseksi domeeniksi. Vastaava  $\beta$ I-domeeni löytyy kaikista  $\beta$ -alaysiköistä. I-domeenin laskos on hydrofobinen  $\beta$ -levy, joka sijaitsee kahden amfipaattisen  $\alpha$ -heliksijoukon välissä. Kuitenkaan esimerkiksi integriinillä  $\alpha$ V $\beta$ 3 ei joidenkin muiden muassa ole  $\alpha$ I-domeenia.  $\alpha$ I-domeeni kohtaa  $\beta$ -domeenin  $\beta$ -potkurin silmukassa. Integriinin  $\alpha$ -alaysikkö sisältää kolme suurta  $\beta$ -kerrosdomeenia. ”Reisi”- ja ”pohje”-alaysikköjen välissä on ”polvi”-alaysikkö, joka on hyvin taipuisa taipuen kristallirakenteessa 135 astetta (Kuva 1.4.1).  $\beta$ -alaysikön jalka sisältää immunoglobuliinilaskoksellisen hybrididomeenin, pleksiini-semaforiini-integriini-domeenin (PSI), neljä epidermaalisen kasvutekijän (EGF) kaltaista toistojaksoa sekä uudenlaisen kystatiinin kaltaisen laskoksen.  $\beta$ -alaysikön polviosa muodostuu hybrididomeenin, PSI-domeenin ja kahden EGF-toistojakson yhteenliittymästä. Ensimmäisessä  $\alpha$ V $\beta$ 3-rakenteessa havaittiin kuusi kalsiumia sitovaa kohtaa ja myöhemmässä mangaania sisältävässä 2 lisää  $\beta$ I-domeenissa. Ligandia sitova kohta sijaitsee  $\beta$ -potkurin ja  $\beta$ I-domeenin liittymäkohdassa integriineillä, joilla ei ole  $\alpha$ I-domeenia (ks. yleiskatsaus Humphries ym., 2003).





Kuva 1.4.1: Integriinin rakenne pääsääntöisesti (Kuva muokattu yleiskatsauksen Liddington, 2002, perusteella).

## 1.4.2 Integriinien solunulkoiset ligandit

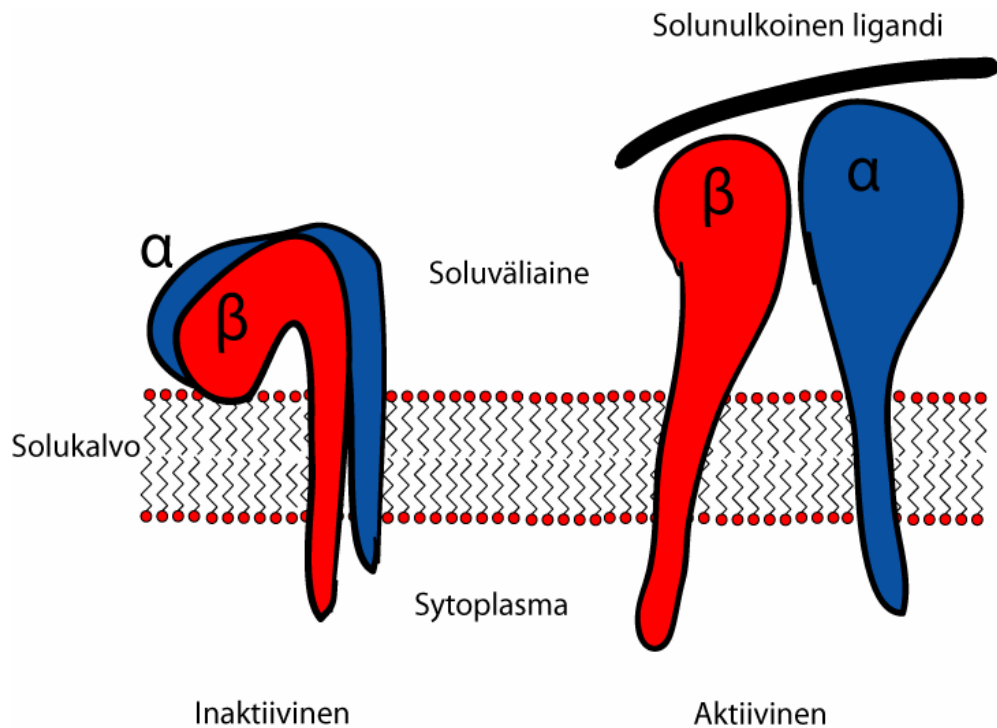
Integriinit sitoutuvat solun ulkopuoleisesta osastaan useanlaisiin proteiineihin.  $\alpha$ I-domeenilla varustettuja kollageenireseptoreita ovat  $\alpha 1\beta 1$ -,  $\alpha 2\beta 1$ -,  $\alpha 10\beta 1$ - ja  $\alpha 11\beta 1$ -integriinit. RGD-reseptoreita ovat  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ -,  $\alpha \text{V}\beta 3$ -,  $\alpha \text{V}\beta 5$ -,  $\alpha \text{V}\beta 6$ -,  $\alpha \text{V}\beta 8$ -,  $\alpha \text{V}\beta 1$ -,  $\alpha 5\beta 1$ - ja  $\alpha 8\beta 1$ -integriinit. RGD-reseptorit sitoutuvat RGD-tripeptidisekvenssiin esimerkiksi fibronektiinissa ja vitronektiinissa. Laminiinireseptoreita ovat  $\alpha 6\beta 4$ -,  $\alpha 3\beta 1$ -,  $\alpha 6\beta 1$ - ja  $\alpha 7\beta 1$ -integriinit. Leukosyyttispesifisiä reseptoreita ovat  $\alpha \text{L}\beta 2$ -,  $\alpha \text{M}\beta 2$ -,  $\alpha \text{X}\beta 2$ -,  $\alpha \text{D}\beta 2$ - ja  $\alpha \text{E}\beta 7$ -integriinit. Lisäksi on olemassa  $\alpha 4\beta 7$ -,  $\alpha 4\beta 1$ - ja  $\alpha 9\beta 1$ -integriinit (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002).

### 1.4.3 Integriinien aktivaatio

Solut tarvitsevat tavan säädellä kiinnittymistään soluväliaineeseen ja muun muassa tätä kautta toisiinsa. Soluväliaineeseen kiinnittymiseen integriinit voivat vaikuttaa integriinin aktivaatiolla (tai toiselta nimeltään sisältä ulos-signaloinnilla) (ks. yleiskatsaus Hughes ja Pfaff, 1998). Integriinien aktivaatio määritellään nopeina, peruutettavissa olevina muutoksina integriiniheterodimeerin solunulkoisissa osissa, jotka johtavat muutoksiin integriinin affiniteetissa solunulkoisiin ligandeihin (Kuva 1.4.3) (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004a, Sims ym., 1991). Integriinin aktivaatiota säädellään integriineihin sitoutuvien sytoplasmisten proteiinien kautta kulkevilla solunsisäisillä signaaleilla, jotka vaikuttavat vuorovaikutuksilla integriinien sytoplasmisiin osiin. Signaalit lisäävät affiniteettia ligandiin, kun ne edistävät integriinien aktivaatiota. Taliinin sitoutuminen integriinin  $\beta$ -häntiin on tavallinen viimeinen askel integriinin aktivaatiossa (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004b). Muita integriinin aktivaation säätelijöitä ovat ainakin  $\beta$ -häntiä suoraan sitovat proteiinit  $\beta$ 3-endoneksiini, sytohesiini ja CIB (calcium- and integrin-binding protein), jotka mahdollisesti aktivoivat suoraan integriinejä (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004a). Integriinien solunsisäisiin osiin sitoutuu myös lukuisia muita proteiineja (ks. yleiskatsaus Zamir ja Geiger, 2001).

Tarkka tietämys integriinien aktivaatiosta on vielä kiistanalaista (ks. yleiskatsaus Humphries ym., 2003, yleiskatsaus Hynes, 2002, yleiskatsaus Liddington ja Ginsberg, 2002, Shimaoka ym., 2003, yleiskatsaus Xiong ym., 2003). Esimerkiksi integriinien ryhmittyminen, reseptorien lateraalinen diffuusio, solutukirangan vuorovaikutukset ja uudelleenrakentuminen sekä muutokset integriinien ilmentymisessä ovat integriinien solunulkoisiin ligandeihin kohdistuvasta affiniteetista riippumattomia tapahtumia, mutta silti vaikuttavat integriinivälitteiseen kiinnittymiseen (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004a, yleiskatsaus Hogg ym., 2002, yleiskatsaus Laudanna ym., 2002, yleiskatsaus van Kooyk ja Figdor, 2000). Affiniteetti-riippuvalaiset ja -riippumattomat tapahtumat voivat toimia yhdessä: mm. aktivaatio solunulkoisen ligandin sitoutumisen kanssa voi lisätä integriinien ryhmittymistä (Erb ym., 1997, Isenberg ym., 1987, yleiskatsaus Li ym., 2003). Esimerkiksi veritulpan muodostumisessa  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-integriinin aktivoituminen verihytaleissa on

olennaisessa asemassa (ks. yleiskatsaus Shattil ym., 1998) ja leukosyyttien liikkumiseen vaikuttavat  $\beta$ 1- ja  $\beta$ 2-integriinien aktivaatiot tarvitaan, jotta kehitys olisi normaalia (ks. yleiskatsaus Hogg ym., 2002, yleiskatsaus Laudanna ym., 2002). Integriinien aktivaatio vaikuttaa myös angiogeneesissä eli uusien verisuonien muodostumisessa (Byzova ym., 2000) ja kasvainsolujen etäpesäkkeiden muodostumisessa (Felding-Habermann ym., 2001).



Kuva 1.4.3: Integriinin aktivaatiossa tapahtuva integriinin konformaatiomuutos (Kuva muokattu yleiskatsauksen Hynes, 2002, perusteella).

Sisältä ulos-signaali integrineistä ovat alkujaan lähtöisin monenlaisista solukalvoreseptoreista. Nämä kiihdyttävät reseptorit ilmeisesti säätelevät integrinejä laukaisemalla translaation jälkeisiä muutoksia, kuten fosforylaatiota ja defosforylaatiota, vaikuttaen avainentsyymien ja substraattien aktiivisuuteen ja/tai solunsisäiseen lokalisaatioon integriinisäädelyssä signaalireiteissä (ks. yleiskatsaus Pawson ja Scott, 1997). Solutukirangan proteiinit voivat säädellä integriinien aktivaatiota edistämällä integrinejä säätelevien proteiinien aktiivisuutta ja/tai näiden sijaintia integriinihänhtiin nähden (ks. yleiskatsaus Hughes ja Pfaff, 1998). Jotkut solutukirangan proteiinit voivat säädellä integriinien aktivaatiota suoraan säädelyin muutoksin integriini-solutukiranka-liittymissä. Tapauksissa, joissa integriinit sitoutuvat vastareseptoreihin tai muihin soluihin

soluväliaineen sijasta, integriinien sitoutumisvoimakkuuteen saattaa vaikuttaa solutukirangan säätelemä kalvojen järjestäytyminen viereisissä soluissa (Kucik ym., 1996).

#### 1.4.4 Integriinien sytoplasmiset osat integriinin aktivaatiossa

Integriinien sytoplasmisten osien rakennetta on saatu selvitettyä lähinnä kristallografisilla menetelmillä ja NMR (ydinmagneettinen resonanssi)-analyysillä (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004a). Integriinien sytoplasmiset osat ovat yleensä alle 50 aminohapon mittaisia.  $\beta$ -alaysiköt ovat yleensä ottaen pidempiä kuin  $\alpha$ -alaysiköt. Molempien lähellä solukalvoa oleva osa muodostaa  $\alpha$ -heliksin.  $\beta$ -alaysikössä  $\alpha$ -helix on noin 20 aminohapon mittainen ja  $\alpha$ -alaysikössä kymmenen. Seuraavat noin 25 aminohappoa  $\beta$ -alaysikössä ovat epäjärjestyneempiä konservoitunutta NPxY-motiivia lukuun ottamatta. Eri  $\beta$ -alaysiköt ovat keskenään homologisempia kuin  $\alpha$ -alaysiköt (ks. yleiskatsaus Humphries ym., 2003).

$\alpha$ - ja  $\beta$ -integriinien solukalvoa lähellä olevat sytoplasmiset osat ovat konservoituneita. Nämä osat ovat olennaisia integriinien aktivaatiolle. Tätä todistavat tulokset, joissa koko  $\alpha$ -osan deleetio tai vain solukalvon lähellä olevan GFFKR-sekvenssin deleetio sai aikaan integriinin aktivaation, kun taas deleetio ilman GFFKR-sekvenssin poistoa ei aktivoanut integriiniä (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004a, Lu ja Springer, 1997, O'Toole ym., 1994, Yläne ym., 1993). Myös solukalvoa lähellä olevan  $\beta$ -hännän osan deleetio aktivoi integriiniä kun taas lähempänä karboksyyliapäätä oleva deleetio esti integriinin aktivaatiota (Crowe ym., 1994, Hughes ym., 1995, Lu ym., 2001). Molemmat näistä tuloksista ovat riippumattomia solutyypistä. Deleetioiden vaikutukset lähempänä karboksyyliapäätä riippuvat solutyypistä. Esimerkiksi NPxY-osien mutaatiot  $\beta$ -hännässä vaikuttavat useisiin solutukirangan ja signaloiviin proteiineihin (ks. yleiskatsaus Liu ym., 2000) mm. aktivoivaan taliiniin (Calderwood ym., 1999, Calderwood ym., 2002). Kauempana solukalvosta olevat alueet voivat olla sitoutumiskohtia aktivaatiota sääteleville proteiineille. Eristetyt  $\beta$ 1A-,  $\beta$ 1D-,  $\beta$ 3- tai  $\beta$ 5-hännät, joihin on tehty kauempana solukalvosta olevia inaktivoivia mutaatioita, inaktivoivat peptidien määrästä riippuen muita integriinejä kilpailemalla aktivoivista proteiineista solussa (Bodeau ym., 2001, Chen ym., 1994, Fenczik ym., 1997, Mastrangelo ym., 1999, Zent ym., 2000).  $\beta$ -hännät ovat  $\alpha$ -

häntiä tärkeämpiä integriinien aktivaatiossa (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004b, yleiskatsaus Liddington ja Ginsberg, 2002), mutta myös  $\alpha$ -hännät vaikuttavat integriinien aktivaatioon (Tohyama ym., 2003).

$\alpha$ -häntä vaikuttaa integriinien aktivoitumiseen spesifisesti erilaisissa solutyypeissä (O'Toole ym., 1994).  $\alpha$ -hännän GFFKR-sekvenssin jälkeiset deleetiot inhiboivat solutyypispesifistä agonistien indusoimaa  $\alpha 2\beta 1:n$ ,  $\alpha 4\beta 1:n$  tai  $\alpha L\beta 2:n$  välittämää kiinnittymistä (Kassner ja Hemler, 1993, Kawaguchi ja Hemler, 1993, Tohyama ym., 2003, Weber ym., 1997). Tämä voidaan estää, jos lisätään 5-7 aminohappoa GFFKR-sekvenssin perään. Poikkeuksena tästä on Rap1:n indusoima  $\alpha L\beta 2:n$  välittämä BAF/3-solujen kiinnittyminen, jossa aminohappojen lisäyksellä ei ole väliä (Kassner ym., 1994, Tohyama ym., 2003).  $\alpha I\beta 3:ssa$   $\alpha I\beta$ -hännän GFFKR-osan karboksyylipuolen läheinen osa vuorovaikuttaa ilmeisesti  $\beta 3:n$  kanssa. Peptidit, jotka sisältävät tämän epitoopin muodostavan sekvenssin, estävät  $\alpha I\beta 3:n$  aktivaatiota verihituleissa (Ginsberg ym., 2001). Suolasilta välillä R995  $\alpha I\beta$  - D723  $\beta 3$  vakauttaa rakennetta (eli pitää solunsisäiset  $\alpha$ - ja  $\beta$ -integriinihännät yhdessä). Kun suolasilta on muodostuneena, integriini ei ole aktiivinen (Hughes ym., 1996).  $\alpha$ - ja  $\beta$ -häntien välillä oleva matala-affiniteettinen vuorovaikutus (Ginsberg ym., 2001, Laplantine ym., 2000) voidaan hajottaa mutatoimalla  $\alpha$ -hännän kalvonläheistä sisäpuolista osaa (aina aktiivinen) (Vallar ym., 1999, Vinogradova ym., 2002).  $\alpha L\beta 2$ - tai  $\alpha M\beta 2$ -integriinien liittäminen toisiinsa estää aktivaation, kun taas liittymisen esto saa aikaan aktivaation (ks. yleiskatsaus Kim ym., 2003, Lu ym., 2001). Lipidimuokatut peptidit, jotka vastaavat  $\alpha I\beta$ - ja  $\alpha 2$ -häntien solukalvon läheistä rakennetta, aktivoivat  $\alpha I\beta 3:n$  ja  $\alpha 2\beta 1:n$  ehkä hajottamalla  $\alpha$ - ja  $\beta$ -häntien välisen sitoutumisen (Stephens ym., 1998, Wang ym., 2003).  $\alpha L:n$  ja  $\beta 2:n$  välinen vuorovaikutus on todistettu FRET (fluoresenssi-resonanssi-energiansiirto)-analyysillä (ks. yleiskatsaus Kim ym., 2003).  $\beta$ -häntien kauempana solukalvosta olevat solunsisäiset osat sitoutuvat aktivaatiota sääteleviin proteiineihin kun taas  $\alpha$ -häntien vastaavat säätelevät  $\beta$ -hännän muotoa ja liittymistä aktivoijaproteiineihin solutyypistä riippuen (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004a).

Integriinien sytoplasmiset hännät sisältävät vaihtelevia rakenteita.  $\beta 3:n$  NPLY-motiivissa on käänös, jota edeltävät 7 aminohappoa muodostavat  $\beta$ -nauhan. Tämä  $\beta$ -nauha

vahvistaa  $\beta$ -kerrosrakennetta taliinissa (Garcia-Alvarez ym., 2003). Rakenteen pysyvyys saattaa riippua solunsisäisistä tekijöistä. Joustavuudesta huolimatta pistemutaatiot voivat hajottaa rakenteen (Ulmer ym., 2001, Ulmer ym., 2003, Vinogradova ym., 2000). Vuorovaikutukset integriinien häntien välillä ovat matala-affiniteettisiä tehden ne vaikeiksi havaita eristetyistä hännistä (Vallar ym., 1999).  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaysiköiden solunulkoiset osat muodostavat kompleksin, joka alkuperäisessä konformaatioissaan olevissa integriineissä rajoittaa häntien suhteellista liikkuvuutta ja voi edesauttaa integriinikompleksin muodostumista.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -osien lähekkäin sijoittaminen ei paljastanut vuorovaikutusta (Ulmer ym., 2001). Ainoa kokonaisten  $\alpha$ - ja  $\beta$ -häntien vuorovaikutus havaittiin pieninä kemiallisina siirtyminä, kun misellejä ei ollut läsnä. Vuorovaikutus ei välttämättä ole biologisesti merkittävä. Kompleksi hajosi solukalvonläheisten  $\alpha$ -hännän mutaatioiden ja taliinin avulla johtaen integriinin aktivaatioon (Vinogradova ym., 2002). Aktivoivat taliinin osat muuttavat solukalvonläheisiä osia  $\beta$ 3-hännässä, mutta  $\alpha$ Ib inhiboi tätä vaikutusta (Ulmer ym., 2003). Vaikka liuoksessa vapaana olevat integriinien sytoplasmiset osat vaikuttavat hajanaisilta ja niiden vuorovaikutukset kiistanalaisilta, rakenteelliset tutkimukset antavat tukea solukalvonläheisten osien vuorovaikutuksille  $\alpha$ Ib- ja  $\beta$ 3-integriinien välillä ja taliinin roolille säätelijänä (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004a).

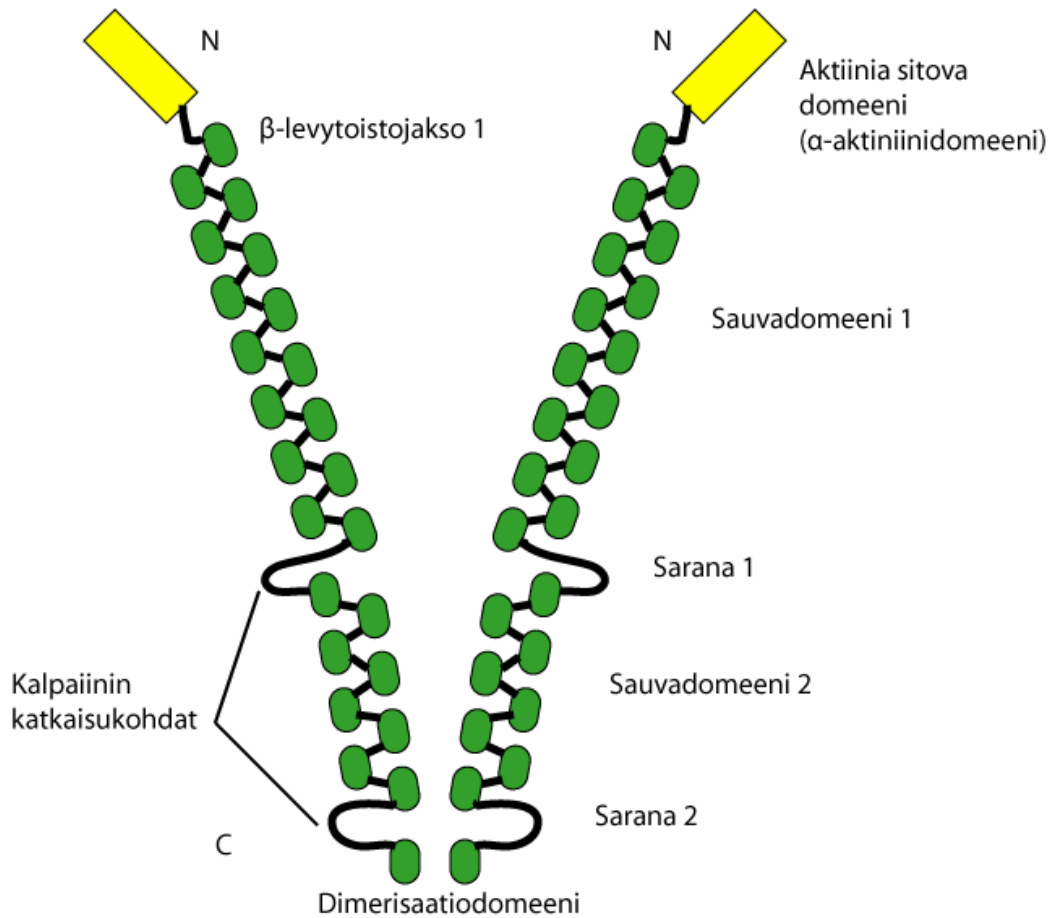
## 1.5 Filamiinit

Ihmisessä ilmentyy kolmea eri filamiiniperheen jäsentä. Filamiini A on laajimmin ja eniten ilmenetty filamiini ihmiskudoksissa. Filamiini B on myös yleinen kudoksissa. Filamiini C on yleisin filamiini lihaksissa. Filamiini C:ssä 81 aminohapon insertti toistojaksossa 20 saa aikaan spesifisen lokalisaation kehittyvissä lihassoluissa (Chakarova ym., 2000, yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Ihmisen filamiiniperheen jäsenillä on 60-80% sekvenssihomologia. Variaatio on suurinta karboksyyliipään sitoutumisdomeeneissa. Muilla lajeilla on suuriakin eroja filamiinien välillä (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

Filamiinimonomeeri on 80 nm:n pitkä. Filamiineilla on noin 200 Å:n pituinen elliptinen muoto (Wang ja Singer, 1977, yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001b). Filamiinit ovat pitkulaisia dimeerejä, jotka muodostuvat 240-280 kDa:n polypeptidiketjuista. Dimeerit sitoutuvat karboksyyliipäistään toisiinsa (Li ym., 1999, Sokol ja Cooley, 1999,

yleiskatsaus Stossel ym., 2001), kun taas aminopäät sitovat aktiinia (Kuva 1.5). Aminopään aktiinia sitovat osat ovat 275 aminohappoa pitkiä. Samankaltainen sekvenssipätkä löytyy  $\beta$ -spektriinistä, dystrofiinistä,  $\alpha$ -aktiniinista sekä muistakin aktiinia sitovista proteiineista mm. kalponiinista ja utrofiinistä (Lebart ym., 1994, yleiskatsaus Stossel ym., 2001). ABD sisältää 2 kalponiinihomologiadomeenia (CH). Aminopään CH1- ja karboksyylipään CH2-domeenit ovat molemmat 110 aminohappoa pitkiä ja omaavat sitoutumiskapasiteetin aktiiniin (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001a). CH-domeeni muodostuu kuudesta tai seitsemästä pitkien lenkkien yhdistämästä  $\alpha$ -heliksistä, joista 4 on 11-18 aminohappoa pitkiä ja 2 tai 3 lyhyempiä ja epäsäännöllisempiä (Norwood ym., 2000, yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001a). Filamiinit sitovat aktiinin lisäksi muitakin molekyyliä. Jo 20 tällaista molekyyliä on löydetty. Suurin osa vuorovaikutuksista tapahtuu filamiinien karboksyylipäissä, joista filamiinit myös dimerisoituvat (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Integriinien  $\beta$ 1A-,  $\beta$ 2-,  $\beta$ 3-, ja  $\beta$ 7-hännät sekä  $\beta$ 10 pienemmässä määrin sitoutuvat filamiiniin. Mutaatio tyrosiinista alaniiniksi  $\beta$ 1:n NPXY-motiivissa estää filamiinin sitoutumista (Pfaff ym., 1998, Sharma ym., 1995).

Loppu proteiinista koostuu 24:stä noin 96 aminohapon toistojaksosta sekä yhdestä tai kahdesta ”saranasekvenssistä”. Toistojaksot muodostavat antiparalleelisista  $\beta$ -levyistä ja käännöksistä muodostuvia immunoglobuliinien kaltaisia domeeneja, jotka menevät limittäin muodostaen sauvamaisen rakenteen (Kuva 1.5) (Ezzell ym., 1988, Gorlin ym., 1990). Saranakohta 2 on selkärankaisilla 35 aminohappoa pitkä ja sijaitsee toistokohtien 23 ja 24 välissä. Ihmisen filamiini A:lla (Gorlin ym., 1990), B:llä (Zhang ym., 1998) ja C:llä (Chakarova ym., 2000, yleiskatsaus Stossel ym., 2001) kaikilla on tämä saranakohta. Joissain filamiineissa on saranakohta 1 toistojaksojen 15 ja 16 välissä. Kalpaiini pystyy katkaisemaan filamiineja saranakohdista (Ezzell ym., 1988).



Kuva 1.5: Filamiini A:n rakenne (Kuva muokattu yleiskatsauksen Stossel ym., 2001, perusteella).

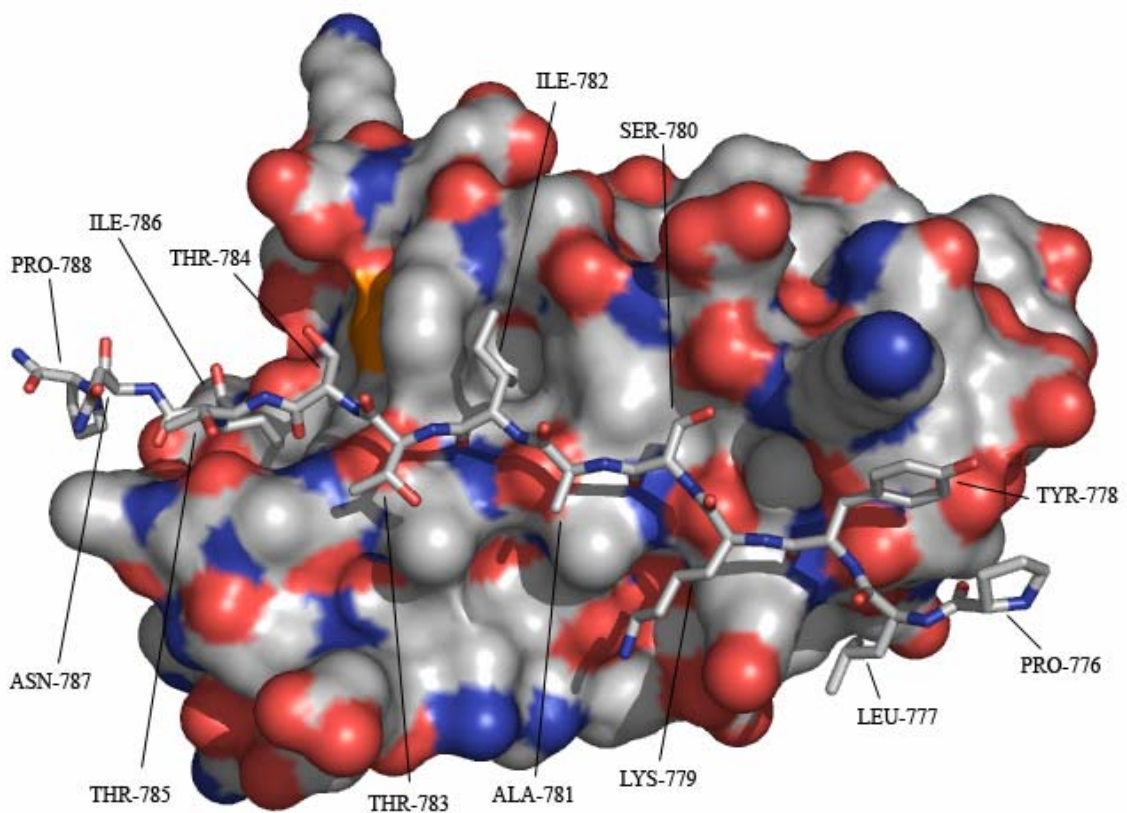
### 1.5.1 Filamiinien toiminta

Aktiinien yhdistäminen integriineihin vakauttaa solukalvoa sekä muodostaa yhteyksiä solujen sekä solujen ja soluväliaineen välille. Filamiinit yhdistävät  $\beta$ -integriinejä, solukalvon alaista aktiiniverkkoa ja solujenvälisen viestinnän komponentteja helpottaen paikallisia solun prosesseja.

Filamiinien säätelyyn osallistuu muutamia proteiineja. Useat seriini/treoniinikinaasit fosforyloivat filamiineja. Näitä ovat proteiinikinaasi A, proteiinikinaasi C,  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmoduliiniriippuvainen proteiinikinaasi II ja p90 ribosomaalinen S6 kinaasi (Chen ja Stracher, 1989, Jay ym., 2000, Ohta ja Hartwig, 1996, yleiskatsaus Stossel ym., 2001, Wallach ym., 1978). Fosforylaatio lisää vastustuskykyä kalpainenkatkaisulle (Chen ja Stracher, 1989) ja kanan kuvun filamiini A:n fosforylaatio vähentää aktiininsitomiskykyä (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Filamiini A lisää solujen migraatiota.



Syöpäsolulinjoihin, joissa ei ole filamiini A:ta, on siirretty filamiini A:n cDNA:ta, jolloin migraatio lisääntyi kunnes filamiini A:n ilmentymismäärä oli sama kuin villityypillä (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Kuitenkin on myös todettu, että filamiini A:n voimakkaampi sitoutuminen integriinien  $\beta$ -häntiin vähentää solujen migraatiota (Calderwood ym., 2001) (Kuva 1.5.1). Filamiini A:n puute aiheuttaa hermo- tai melanosyyttisolussa vajavaista migraatiota ja morfologiamuutoksia: mm. solun pinnan kupruilua aktiiniverkoston heiketessä (Cunningham, 1995, yleiskatsaus Calderwood ym., 2000, Fox ym., 1998).



Kuva 1.5.1: Filamiini A:n 21-domeenin sitoutuminen integriinin  $\beta$ 7-häntäpeptidiin. Rakenne on selvitetty kristallirakenteesta. Rakenteen PDB (Protein Data Bank) ID on 2brq.

## 1.6 Taliini

Taliini on antiparalleelinen homodimeeri, joka muodostuu kahdesta 270 kDa:n alayksiköstä. Molemmissa näissä on N-terminaalinen noin 50 kDa:n pallomainen pää ja noin 220 kDa:n C-terminaalinen sauva (ks. yleiskatsaus Critchley, 2000).

Taliini sitoutuu integriinien  $\beta$ -häntiin. Se sitoutuu  $\beta$ 1A-,  $\beta$ 1D-,  $\beta$ 2-,  $\beta$ 3- ja  $\beta$ 5-häntiin ja heikommin lisäksi  $\beta$ 7:ään (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000, yleiskatsaus Critchley, 2000). Tehokkain integriinejä sitova osa on taliinin päässä. Sauvassa on pienempiaffiniteettinen integriinejä sitova kohta (Calderwood ym., 1999, Yan ym., 2001). Taliini kolokalisoituu aktivoituneiden integriinien kanssa ja sillä on kriittinen rooli integriinien aktivaatiossa (ks. yleiskatsaus Tadokoro ym., 2003).

Taliinin pääosa aktivoi  $\alpha$ Ib $\beta$ 3-hännän (Calderwood ym., 2002) ja myös aktivoi  $\beta$ 2- ja  $\beta$ 1-häntiä (ks. yleiskatsaus Kim ym., 2003). Taliinia tarvitaan solun energiasta riippuvaisiin muutoksiin integriinien rakenteessa. Rakennemuutos johtaa aktivaatioon. Solunsisäiset signaalireitit tarvitsevat taliinia integriinien aktivoimiseen.  $\beta$ 1- ja  $\beta$ 3-integriinien aktivaatio heikentyy ilman taliinia. Toiminta ei korvaudu muilla otaksutuilla integriinejä aktivoivilla proteiineilla (ks. yleiskatsaus Tadokoro ym., 2003). Taliinia on kokeissa huomattu tarvittavan normaaliin kehitykseen hiirillä, *Drosophila*:lla ja *Caenorhabditis elegans*:illa. Näillä ilman taliinia kehittyvät samankaltaisia fenotyyppijä kuin ilman integriinejä. Taliinia tarvitaan integriinien aktivaatioon ja integriinien alustavaan kiinnittymiseen aktiiniin ja näiden linkkien vahvistamiseen (Brown ym., 2002, yleiskatsaus Calderwood ja Ginsberg, 2003, Jiang ym., 2003). Taliinin kasautuminen on varhainen vaihe fokaaliadheesion muodostumiselle ja vaatii integriinejä, mutta ei vinkuliinia (Moulder ym., 1996). Taliinin ylimääräinen ilmentyminen aktivoi  $\beta$ 2:n ja  $\beta$ 3:n (Calderwood ym., 1999, yleiskatsaus Kim ym., 2003).

### 1.6.1 Taliinin FERM-domeeni

Taliinin N-pää sisältää FERM-domeenin (Calderwood ym., 2002, yleiskatsaus Critchley, 2000), jossa sijaitsevat F1, F2 ja F3-aldomeenit (Pearson ym., 2000). FERM sijaitsee taliinin päädomeenissa (Garcia-Alvarez ym., 2003) ja sitoutuu solukalvon lävistäviin proteiineihin. F2- ja F3-domeenit sitoutuvat integriinien  $\beta$ -häntiin - erityisesti  $\beta$ 3:een, johon F3-domeenilla on nelinkertainen affiniteetti ( $K_d=120$  nM) F2-domeeniin verrattuna. 96 aminohapon pituinen F3 sisältää korkea-affiniteettisen integriinejä sitovan kohdan (Calderwood ym., 2002). F3:ssa on 2 ortogonaalista antiparalleelista  $\beta$ -levyä, joiden perässä on  $\alpha$ -helix, joka muistuttaa PTB-domeenia (phosphotyrosine binding, fosforyloitunutta tyrosiinia sitova). PTB-domeenit tunnistavat usein NPxY-motiiveja sisältäviä  $\beta$ -käännöksiä sisältäviä peptidiligandeja (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004b). NPxY-motiivit ovat hyvin konservoituneita integriinien  $\beta$ -hännissä. Mutaatiot näissä häiritsevät integriinien aktivaatiota (Calderwood ym., 1999, Calderwood ym., 2002, O'Toole ym., 1995, Ulmer ym., 2001). F3:n sitoutuminen  $\beta$ 3-hännän aminohappoihin 739-750 on PTB-domeenin ja sen ligandin välistä vuorovaikutusta muistuttava. Integriinin aminohapot D740TA742 muodostavat  $\beta$ -nauhan, joka vahvistaa F3:n  $\beta$ -levyä ja aminohapot N744PLY747 muodostavat käännöksen taaksepäin Y747:n osoittaessa happamaan, hydrofobiseen taskuun (Garcia-Alvarez ym., 2003). Konservoitunut integriinin  $\beta$ -hännän tryptofaaniaminohappo ( $\beta$ 3 W739) varaa taliiniin sitoutuneena taskun F3:ssa. Mainittujen aminohappojen mutaatiot häiritsevät taliinin ja  $\beta$ 3:n välistä vuorovaikutusta ja integriinin aktivaatiota (Garcia-Alvarez ym., 2003, yleiskatsaus Tadokoro ym., 2003). Nämä aminohapot ovat hyvin konservoituneita esimerkiksi nisäkkäillä, linnuilla, *Drosophila*:lla ja *Caenorhabditis elegans*:illa. F2 on suurelta osin  $\alpha$ -heliksiä ja muistuttaa asyyli-CoA:ta sitovaa proteiiniä. F3 muodostaa kahdesta ortogonaalisesta, antiparalleelisesta  $\beta$ -levystä ja näitä seuraavasta  $\alpha$ -heliksistä koostuvan kerrosrakenteen.

### 1.6.2 Taliini integriinin aktivaation välittäjänä

Taliinin sitoutuminen vaikuttaa  $\alpha$ IIb:n ja  $\beta$ 3:n solukalvoa lähellä olevien osien rakenteeseen. Sitoutuminen näkyy NMR-spektrin häiriönä (Garcia-Alvarez ym., 2003).

Sitoutumista tarvitaan luultavasti aktivaatiosignaalin siirtoon. Sitoutuminen on joko suora tai epäsuora, kompleksin muodostumista seuraava, vuorovaikutus. Vain integriinejä aktivoivat taliinipalaset sitoutuvat.  $\alpha$ Ib estää sitoutumista (Ulmer ym., 2003). Taliinin päädomeeni estää  $\alpha$ Ib- $\beta$ 3- sekä  $\alpha$ L- $\beta$ 2-välisen vuorovaikutuksen havaitsemisen ja vähentää FRET:tiä fluoroforilla merkityn  $\alpha$ - ja  $\beta$ -integriinin välillä elävissä soluissa (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004b, yleiskatsaus Kim ym., 2003). NMR:n ja FRET:n perusteella taliinin pää sitoutuu  $\beta$ 3-hännän solukalvonläheiseen osaan. Tämä näkyy NMR-spektrin häiriöinä. Integriinin  $\alpha$ - $\beta$ -vuorovaikutus häiriytyy aktivaatiossa, kun syntyy taliinin PTB-domeenin ja integriinin  $\beta$ -hännän NPxY-osan muodostama kompleksi (Garcia-Alvarez ym., 2003, yleiskatsaus Kim ym., 2003, Patil ym., 1999, Vallar ym., 1999, Vinogradova ym., 2002).

### 1.6.3 Taliini-integriini-vuorovaikutusten säätely

ERM-proteiiniperheen jäsenissä, joihin taliini kuuluu, FERM-domeenin ja C-terminaalisen pään vuorovaikutukset piilottavat ligandia sitovia kohtia (Pearson ym., 2000). Vuorovaikutus hajoaa ERM-proteiinin fosforyloituaessa, Rho-riippuvaisissa signaalireiteissä ja PIP2:n ansiosta. Pelkällä taliinin päällä on 6-kertainen affiniteetti  $\beta$ 3:een kuin koko molekyylillä.  $\beta$ 3:a sitova osa on piilotettu normaalissa taliinissa (Yan ym., 2001). PIP2:n sitoutuminen aiheuttaa konformaatiomuutoksen, jossa  $\beta$ 1:a sitova osa tulee esiin (affiniteetti paranee) (Martel ym., 2001).

Taliini sitoutuu yhteen PIP2:a tuottavan entsyymin PIPKI $\gamma$ -90:n (phosphatidylinositol phosphate kinase type I $\gamma$ -90) varianttiin aktivoiden sen (Barsukov ym., 2003, yleiskatsaus Calderwood ja Ginsberg, 2003). Näin taliini voi lisätä PIP2:n tuotantoa, joka voimistaa vuorostaan taliinin ja integriinien välisiä vuorovaikutuksia ja edistää integriinien aktivaatiota. Kuitenkin PIPKI $\gamma$ -90 ja integriinin  $\beta$ -hännät kilpailevat samasta sitoutumispaikasta F3-aladomeenissa, joten sitoutuminen voi vähentääkin integriinien aktivaatiota (Barsukov ym., 2003). Kalpaiini katkaisee taliinin pään muusta osasta lisäten integriineihin sitoutumista ja tuoden aktivoijakohdan esiin (Yan ym., 2001). Ei tosin ole varmuutta, riittääkö tämä yksistään integriinien aktivoimiseksi. Kalpaiini katkoo myös integriinien  $\beta$ -häntiä, joka taas vähentää aktivaatiota (Pfaff ym., 1999). PTB on alun perin

fosforyloitunutta tyrosiinia sitova, mutta fosforyloitumattomakin integriinihännät sitovat taliinia ja tyrosiinin fosforylaatio  $\beta$ -hännän NPxY-motiivissa heikentää taliiniin sitoutumista (ks. yleiskatsaus Calderwood, 2004b). Src-perheen tai muiden kinaasien katalysoima tyrosiinin fosforylaatio NPxY:ssä vähentää solun kiinnittymistä ja poistaa integriinejä fokaaliadheesioista. Tämä lisää solun migraatiota ja muuttaa solun muotoa (Datta ym., 2002, Johansson ym., 1994, Sakai ym., 2001). Myös muut integriinien  $\beta$ -häntiin sitoutuvat proteiinit, jotka kilpailevat taliinin kanssa omilla PTB-domeeneillaan, luultavasti vähentävät integriinien aktivaatiota (Calderwood ym., 2003). Näistä ICAP-1 $\alpha$  sitoutuu  $\beta$ 1A:han (Chang ym., 2002).  $\beta$ -häntien tyrosiinifosforylaatio voi suosia muiden proteiinien sitoutumista (Calderwood ym., 2003, Chang ym., 2002).

## 1.7 Integriinien sytoplasmisten osien sitoutuminen solutukirankaan

Integriinien  $\beta$ -hännät yhdistävät integriinit aktiinirankaan.  $\alpha$ -häntien osallisuudesta on vähemmän todisteita.  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 4- tai  $\alpha$ Ib-häntien poistaminen luultavasti lisää  $\beta$ -häntien vuorovaikutuksia solutukirankaan (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). Paxilliinin suora sitoutuminen  $\alpha$ 4-häntään säätelee  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-välitteistä solujen levittäytymistä, migraatiota ja stressisäikeiden muodostumista (Liu ym., 1999). Säädellyt muutokset  $\alpha$ - ja  $\beta$ -häntien vuorovaikutuksissa voivat vaikuttaa integriinien solutukirankaan sitoutumiseen (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000).

Solujen kiinnittyminen, levittäytyminen ja migraatio soluväliaineeseen välittyvät osaltaan  $\beta$ -integriinien kautta ja vaativat toimivan aktiinirangan. Näitä prosesseja välittävät soluväliaineen kiinnikkeet yhdistyvät aktiinifilamentteihin dynaamisesti ja heterogeenisesti (ks. yleiskatsaus Hall, 1998, Zamir ym., 1999). Fokaaliadheesiot yhdistyvät välittäjäproteiinien avulla aktiinistressisäikeiden päihin (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000, yleiskatsaus Hall, 1998). Mutaatioiden avulla on selvitetty 47-aminohappoisen  $\beta$ 1-integriinin sitoutumista solutukirankaan.  $\beta$ 1-integriinissä on kolme aminohappojen ryhmittymää, jotka ovat tärkeitä integriinien sijoittumiselle fokaaliadheesioihin. Näitä ovat solukalvonläheinen osa ja kaksi konservoitunutta NPXY-motiivia (Reszka ym., 1992). Samanlaiset motiivit  $\beta$ 3-hännässä ovat tärkeitä  $\beta$ 3-integriinien lokalisaatiolle fokaaliadheesioihin (Ylänne ym., 1995). Myös treoniineja sisältävä motiivi kahden NPXY-

motiivin välillä on yhdistetty  $\beta$ 2-integriiniin solutukirankaan kiinnittymiseen (Peter ja O'Toole, 1995).

### **1.7.1 Taliinivälitteiset integriini-aktiinilinkit**

Tietyt aktiinia sitovat proteiinit liittävät integriinit aktiinifilamentteihin. Taliini on yksi näistä välittäjistä. Taliini on fokaaliadheesioiden pääkomponentteja aktiinin ja vinkuliinin lisäksi (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). Taliini sisältää sitoutumiskohdat aktiinille, vinkuliinille, fokaaliadheesiokinaasille, fosfolipideille ja solukalvon lävistävälle proteiinille layliinille (Borowsky ja Hynes, 1998, yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). Taliini oli ensimmäinen aktiinia sitova proteiini, jonka näytettiin suoraan sitovan integriinejä ja jonka arveltiin yhdistävän niitä aktiinitukirankaan (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). Taliinin tai taliinin antisense-RNA:n vasta-aineiden ruiskuttaminen hajottaa aktiinistressisäikeet ja inhiboi kiinnittymistä, levittäytymistä ja fibroblastien migraatiota HeLa-soluissa (Albiges-Rizo ym., 1995, yleiskatsaus Calderwood ym., 2000).

Taliinin merkitystä integriinien ja solutukirangan toiminnalle on havainnollistettu taliinia ilmentämättömillä ES-soluilla (sikiön kantasoluilla). Näillä taliinin puute aiheuttaa voimakasta kalvon kupruilua, puutteita solun kiinnittymisessä ja levittäytymisessä sekä fokaaliadheesioiden ja stressisäikeiden häiriintynyttä muodostumista. Erilaistumattomilla taliinittomilla ES-soluilla myös  $\beta$ 1-integriinin, vinkuliinin ja  $\alpha$ -aktiniinin ilmentyminen on vähäisempää. Tämä voi vaikuttaa fenotyyppiin. Taliinittomien ES-solujen erilaistuessa syntyi kaksi morfologisesti erilaista solutyyppiä, eikä järjestäytyneitä kudoksia muodostunut (Priddle ym., 1998). Erilaistuneet solut ilmensivät normaalimäärän  $\beta$ 1-integriiniä ja vinkuliinia ja pystyivät levittäytymään ja muodostamaan aktiinifilamentteja sekä fokaaliadheesiorakenteita. Taliini on siis korvattavissa joissain erilaistuneissa soluissa  $\beta$ 1-integriinin ilmentymisen ylläpidossa ja fokaaliadheesion rakentumisessa (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000).

Useampia  $\beta$ -integriinihäntiä sitova taliinidimeeri voi edistää integriinien kasautumista (Calderwood ym., 1999, Patil ym., 1999). Taliinin pää- ja sauvaosien sitoutumista

integriineihin voidaan estää mutatoimalla tyrosiini alaniiniksi solukalvoa lähellä olevassa NPXY-motiivissa  $\beta$ 1- ja  $\beta$ 3-integriineissä (Calderwood ym., 1999, Käätä ym., 1999, Pfaff ym., 1998). Tämä aiheuttaa näiden integriinien jäämisen pois fokaaliadheesioista (Reszka ym., 1992, Yläne ym., 1995). V-Src-transformoiduissa soluissa  $\beta$ 1-hännän NPXY-motiivin tyrosiini on fosforyloitunut, jolloin taliinin sitoutuminen on estynyt. Tämä aiheuttaa solun kiinnittymisen heikkenemistä ja solutukirangan epäjärjestystä (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). NPXY-motiivisekvenssin omaavat syntetisoidut peptidit sitoutuvat taliiniin ja estävät taliinin sitoutumisen  $\beta$ 1-häntään (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000, Käätä ym., 1999).

Muut alueet  $\beta$ -hännässä luultavasti vaikuttavat taliinin sitoutumiseen  $\beta$ -häntään, koska NPXY-alueet ovat konservoituneita, mutta taliini kuitenkin sitoutuu eri määrissä eri  $\beta$ -häntiin (Pfaff ym., 1998). Esimerkiksi 13:n karboksyyli-terminaalisen aminohapon poisto  $\beta$ 1-hännästä inhiboi taliinin sitoutumista *in vitro* ja taliinin ja aktiinin kolokalisaatiota kasaantuneen  $\beta$ 1-integriinin kanssa *in vivo*. Kun vain 4 aminohappoa poistetaan  $\beta$ 1-hännän karboksyyli-lopusta, näitä vaikutuksia ei tule (Käätä ym., 1999, Lewis ja Schwartz, 1995).

### 1.7.2 Filamiini välittäjänä

Filamiinit sitoutuvat aktiinisäikeisiin, integriineihin sekä lisäksi myös joidenkin muiden solukalvon lävistävien proteiinien sytoplasmapuolelle ja joihinkin solunsisäisiin signaalintimolekyyleihin (Fox ym., 1998, Ohta ym., 1999). Filamiinit lokalisoituvat kortikaaliseen aktiinisolutukirankaan pitkin stressisäikeitä sekä joihinkin fokaaliadheesioihin (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). Sekä filamiinit että  $\alpha$ -aktiiniini ovat osana  $\beta$ 1-häntiä sisältäviä fokaaliadheesioita, kun solu altistuu mekaaniselle rasitukselle. Melanoomasoluissa, joissa filamiini A ei ilmenny, F-aktiini (säiemäinen aktiini) ei sitoudu näihin rakenteisiin (Glogauer ym., 1998). Filamiini A:ta ilmentämättömillä melanoomasoluilla ilmenee vähemmän useita solukalvoreseptoreja, esimerkiksi  $\beta$ -integriinejä, mikä saattaa vaikuttaa osaltaan näihin fenotyyppeihin (Meyer ym., 1998). Filamiinien toiminnasta signaalinvälityksessä sekä integriinien ja aktiinisäikeiden yhdistäjänä ovat todisteena esimerkiksi heikot valo- ja lämpöaistimusvasteet *Dictyostelium discoideum*-ameebamutantilla, jolla ei ole

*dictyostelium*:in filamiinia (ABP-120). Myös solun muodon säätely ja fagosytoosi oli mutanteilla heikkoa, aktiiniverkot vähemmän kolmiulotteisia ja tiheämpiä sekä osmoottinen resistanssi pienempi (Fisher ym., 1997). Nisäkkäiden fibroblasteissa filamiini A välittää stressisignaaleja aktiinirankaan. Voimakkaalle stressille altistuvissa soluissa  $\beta$ 1-integriini liittyy suoraan filamiini A:han signaloiden solua vahvistumaan. Soluissa, joissa ei ole filamiini A:ta ei ole vahvistumisvastetta (Glogauer ym., 1998). Vahvistumisvaste on mahdollisesti erityisen tärkeä lihassoluissa (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

### 1.7.3 $\alpha$ -aktiniini-välitteiset yhdyssiteet

$\alpha$ -aktiniini on homodimeerinen proteiini, joka lokalisoituu fokaaliadheesioihin (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000).  $\alpha$ -aktiniinimonomeerit, jotka eivät ole lihaksissa, ovat noin 100 kD:n painoisia sauvamaisia proteiineja, joilla on kolme toiminnallista osaa. Näitä ovat N-terminaalinen aktinia sitova osa, joka koostuu kahdesta kalponiinin kanssa homologisesta domeenista, keskiosa, joka koostuu neljästä spektriinin kaltaisesta toistojaksosta ja C-terminaalinen osa, joka koostuu neljästä EF-käsimotoiivista. Neljä  $\alpha$ -aktiniinigeeniä ja vaihtoehtoinen katkenta mahdollistaa useiden  $\alpha$ -aktiniini-isoformien tuotannon.  $\alpha$ -aktiniini sitoutuu F-aktiiniin, vinkuliiniin, zyxiiniin sekä  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- ja  $\beta$ 3-integriineihin (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000, Liu ym., 1999).  $\alpha$ -aktiniini kulkeutuu fokaaliadheesioihin mikroinjektoiduissa soluissa ja soluvapaassa ympäristössä ilmeisesti solunsisäisten  $\beta$ -häntien vuorovaikutuksen avulla (Cattelino ym., 1999, Pavalko ym., 1998).  $\alpha$ -aktiniinin sitoutumiskohdat  $\beta$ -integriineissä ovat solukalvonläheisessä puoliskossa solun sisällä  $\beta$ 1- ja  $\beta$ 2-hännissä.  $\beta$ 2:een sitoutumista heikentää karboksyyliterminaalinen hännän osa (Sampath ym., 1998).  $\beta$ 1-integriinien, joista oli poistettu 13 aminohappoa karboksyylipäästä, kasaantuminen vasta-aineiden avulla aiheutti myös  $\alpha$ -aktiniinin kasaantumisen (Lewis ja Schwartz, 1995). Tämä ei kuitenkaan riitä F-aktiinin sitouttamiseen (Cattelino ym., 1999, Lewis ja Schwartz, 1995).  $\alpha$ -aktiinin ylimääräinen ilmentyminen fibroblasteissa saa aikaan vahvemmat liittymiskohdat. Isoloidut integriinejä sitovat  $\alpha$ -aktiniinipalaset hajottavat stressisäikeitä, fokaaliadheesioita ja mekaanisen stressin aiheuttamaa viestitystä fibroblasteissa ja osteoblasteissa (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000, Pavalko ym., 1998).



#### 1.7.4 Muita integriini-solutukirankayhdistäjäproteiineja

Vinkuliini on noin 120 kDa:n painoinen molekyyli. Se on yksi yleisimmistä molekyyleistä fokaaliadheesioissa. Vinkuliini sitoutuu F-aktiiniin, taliiniin,  $\alpha$ -aktiniiniin, paksilliiniin ja VASP:iin (Bubeck ym., 1997, ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000). Vinkuliini ei sitoudu suoraan integriineihin mutta voi liittyä niihin taliinin tai  $\alpha$ -aktiniinin välityksellä. Vinkuliinin vähäisempi ilmentyminen vähentää integriini-solutukirankalinkin jäykkyyttä ja tätä kautta johtaa solun voimakkaampaan migraatioon. Tämä ei kuitenkaan estä vinkuliinittomissa ES-soluissa solujen erilaistumista *in vitro* (Xu ym., 1998) eikä myöskään estä solujen levittäytymistä tai taliinia sisältävien fokaaliadheesioiden ja stressisäikeiden muodostumista (Priddle ym., 1998). Huolimatta vinkuliinin ilmentymisen yleisyydestä vinkuliinia ei välttämättä tarvita joihinkin integriini-F-aktiiniliitoksiin. Vinkuliini toimii ilmeisesti molekulaarisena siltana, joka vakauttaa jo olemassa olevia liitoksia (ks. yleiskatsaus Calderwood ym., 2000).

Mitä luultavimmin on myös muita proteiineja, jotka tarjoavat suoria linkkejä integriinien ja solutukirangan välillä. Verihiutaleissa kaksi tyrosiinia fosforyloituu  $\beta$ 3-integriineissä (Law ym., 1999) ja tätä rakennetta vastaava analogimolekyyli sitoutuu myosiiniin (Jenkins ym., 1998). Solunsisäinen M-nauhaproteiini, skelemiini, voi sitoutua  $\beta$ 1- ja  $\beta$ 3-, mutta ei  $\beta$ 2-häntään *in vitro*. Skelemiini kolokalisoituu tasaisesti ilmennetyn  $\alpha$ IIb $\beta$ 3:n kanssa joissain olosuhteissa ja skelemiinin integriiniä sitovan domeenin mikroinjektio saa myoblastit kasautumaan (Reddy ym., 1998) luultavasti estämällä integriinien ja solutukirangan väliset vuorovaikutukset (ks. yleiskatsaus Liu ym., 2000).

## 2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tutkimuksen tarkoituksena oli syventää ymmärrystä filamiinin ja taliinin sitoutumisesta integriinien  $\beta$ -häntiin. Tarkoituksena oli määrittää tarkemmin sitoutuvien kohtien rakennetta ja toimintaa: mitkä ovat kriittisiä aminohappoja sitoutumiselle. Samalla pyrittiin selvittämään, millä aminohappomuutoksilla sitoutumisvoimakkuutta voidaan säädellä. Tutkimuksessa pyrittiin määrittämään filamiini A:n 21-domeenin sekä taliinin F2-F3-domeenien sitoutumisvakiot integriinin  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -häntiin sekä filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien kompetitiivisen sitoutumisen tulos. Näiden kokeiden tarkoituksena on selvittää osaltaan integriinien aktivaation säätelyä sekä valaista integriinien aktiivirankaan sitoutumisen säätelyä ja tätä kautta antaa tietoa myös solun migraation säätelystä.

## 3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 3.1 Käytetyt proteiinit, plasmidit ja solut

Ihmisen filamiini A:n 21-domeenia (FLNa21) koodittava pGEX plasmidi on kuvattu aiemmin (Kiema ym., 2006). Kanan taliinin F2-F3-domeeneja (taliini F2-F3) koodittava plasmidi (aminohapot 200-400) (Garcia-Alvarez ym., 2003) saatiin Tr. David Calderwoodilta (Yalen yliopisto, New Haven, USA). Puhdistettuja filamiini C:n domeeneja 23-24 (FLNc23-24) käytettiin kontrollina (Pudas ym., 2005). Filamiini C:n 23-24-domeenit oli saatu Regina Pudakselta (Oulun yliopisto). Integriini  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-häntäpeptidit, joissa oli histidiinihäntä ja dimerisoituva kierteinen kierre (coiled coil) (Pfaff ym., 1998) saatiin Tr. David Calderwoodilta valmiina lyofilisoituna proteiininä. Proteiini ilmentettiin *E. Coli* BL21-kannassa. Plasmideja siirrettiin myös *E. Coli*:n DH5 $\alpha$ -kantaan Qiagenin Spin Mini-puhdistuspylväskitin avulla.

### 3.2 Proteiinin tuotto

Esikasvatus tehtiin 5 ml:ssa LB-mediumia, johon oli lisätty ampicilliinia 100  $\mu$ l/ml, ravistelussa yön yli 37 C°:ssa. Esikasvatus siirrettiin kasvamaan suurempaan tilavuuteen, esimerkiksi 2 litraan, LB:tä, johon oli lisätty ampicilliinia. Tämä annettiin kasvaa 37 C°:ssa, kunnes absorbanssi 600 nanometrillä mitattuna oli yli 0,6. Tällöin lisättiin 0,4 mM IPTG:tä (isopropyyl  $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidi), ja annettiin kasvaa 37 C°:ssa 3 tuntia.

### 3.3 Proteiinin puhdistus

Tuottokasvatuksen jälkeen solut sentrifugoitiin 1500\*g:ssä 10 minuuttia (useimmiten Herauksen Megafuge1.0R BS4402/A-roottorilla 389 rpm). Supernatantti poistettiin. Solupelletti suspensoitiin 10 ml:aan PBS:ää (fosfaattipuskuroitu salini) (8,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7,4) yhtä grammaa solupellettiä kohti. Tämä liuos laitettiin yön yli -20 C°:een. Seuraavana päivänä liuos sulatettiin ja käytettiin

joko french press:iä [GST (glutathioni-s-transferaasi)-Filamiini A 21:n puhdistuksessa, 2000 kPa:n paineella kerran läpi] tai sonikaattoria solujen hajottamiseen. Sonikaattorilla käytettiin 30 %:sta amplitudia, 3:a 10 sekunnin pulssia - aikaa pulssien välillä oli 30 sekuntia. Tämä toistettiin 2 kertaa.

Seuraavaksi liuos sentrifugoitiin joko ultrasentrifuugilla (Beckman L-70, roottori srp70wt-166 sarjanumero 3032) 100 000\*g 30 minuuttia tai high speed-sentrifuugilla (Sorvall RC5C, roottori Sorvall GSA). Supernatantti otettiin talteen ja suodatettiin 0,2 µm:n ruiskusuodattimen läpi.

Seuraavaksi otettiin noin 1 ml Amershamin Glutathione Sepharose 4B:tä ja se pestiin 3 kertaa 10-15 ml:lla PBS:ää (500\*g sentrifugointi 5 minuuttia ja poistetaan supernatantti välissä). Suodatettu liuos lisättiin Sepharose:en ja inkuboitiin 1 tunti 4 °C pyörittimessä. Sepharose pestiin 3 kertaa noin 30 ml:lla PBS:ää. Glutathione Sepharose 4B pipetoitiin 5 ml:n kromatografiapylvääseen ja pestiin PBS:llä kunnes kerättyjen fraktioiden  $A_{280\text{ nm}} < 0,1$ . Ylimääräinen PBS valutettiin pois.

Kromatografiapylvääseen lisättiin eluutiopuskuri (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM glutathioni, pH 8,0). Läpi valuneesta nesteestä kerättiin noin 8 0,5 ml:n fraktiota ja otettiin niistä SDS-PAGE (natriumlauryylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi)-näytteet. Eluutiofraktiot, joiden  $A_{280\text{ nm}} > 1,0$  yhdistettiin ja dialysoitiin yli yön noin 2 litrassa dialyysipuskuria (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9,3). Dialyysiputken läpäisyraja oli 10 000 daltonia. Dialysoitu neste konsentroidtiin tarpeen vaatiessa, jaettiin sopiviin osiin ja laitettiin -70 °C säilöön.

GST-merkatun proteiinin puhdistukseen käytettiin kerran ÄKTA Prime-laitetta ja 5 ml:n GST-pylvästä. Käytettiin 0,5 MPa:n painetta ja kerättiin 5 ml:n fraktioita. Eluutiogradienttia ei tehty, vaan 100 % eluutiopuskuria (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM glutathioni, pH 8,0) käytettiin suoraan eluoidessa. Sitoutumispuskuri: 20 mM natriumfosfaatti, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Proteiinin puhdistusprosessin aikana kerättiin eri vaiheista näytteitä, jotka ajettiin SDS-PAGE:lla. Geeleistä voitiin päätellä proteiiniliuoksen puhtaus ja että puhdistettu proteiini on oikean kokoinen, kun proteiinin paikkaa verrattiin vieressä olevan proteiininstandardin (Bio-Rad Dual Color) proteiinikokoihin.

### **3.4 Bradfordin analyysi ja proteiinkonsentraation määrittäminen absorbanssista**

Proteiinikonsentraatiot määritettiin yleensä proteiiniliuoksen  $A_{280 \text{ nm}}$ :stä, josta proteiinin konsentraatio lasketaan kaavalla  $C \text{ (g/l)} = A_{280 \text{ nm}} / \text{absorbanssikerroin}$  laskettavalle proteiinille. Liuos ei saa sisältää vertailuliuokseen verrattuna merkittäviä määriä muita epäpuhtauksia puhdistettua proteiinia lukuun ottamatta.

Bradfordin määrittämisessä valmistettiin 3-5 laimennosta, jotka edustivat proteiinin arvioitua konsentraatiota liuoksessa. Vertailuproteiinina käytettiin BSA:ta (naudan seerumin albumiinia) (myös IgG eli immunoglobuliini G on mahdollinen käytettäväksi), jolle lineaarinen alue on 1,2-10,0  $\mu\text{g/ml}$ . BSA:sta valmistettiin sama määrä näytteitä kuin määritettävästä proteiinista tarkkoina konsentraatioina. Jokaista näytettä pipetoitiin 800  $\mu\text{l}$  eppendorfiin ja mukaan laitettiin 200  $\mu\text{l}$  värireagenssia (Bio-Rad Protein Assay: Dye Reagent Concentrate, Catalog #500-0006) ja vorteksoitiin. Liuoksia inkuboitiin huoneenlämmössä ainakin viisi minuuttia ja  $A_{595 \text{ nm}}$  mitattiin tunnin kuluessa. BSA-liuosten tuloksista tehtiin standardisuora, johon määritettävän proteiiniliuoksen tuloksia verrattiin ja määritettiin konsentraatio.

### **3.5 Europiumleimaus**

Europiumleima on voimakkaasti fluoresoiva muodostaessaan kelaatin kehitysliuoksen kanssa. Europiumleima muodostuu  $\text{Eu}^{3+}$ -ionista ja isotiosyanaattiryhmästä, jotka sitoutuvat primaariseen, alifaattiseen aminoryhmään proteiinissa emäksisessä pH:ssa.

Europiumleimaukseen käytettiin Wallac Oy:n (kuuluu PerkinElmeriin) DELFIA Eu- Labelling Kit:tiä (tuotenumero 1244-302). Tarkoituksena oli saada peptideihin sitoutuvat proteiinit leimattua suoraan, jottei tarvitsisi käyttää europiumleimattua anti-GST:tä ja näin ollen GST:tä tutkittavissa proteiineissa. GST tuotti voimakkaasti taustaa DELFIA:ssa.

Proteiiniliuos oli ennen leimausta dialysoitu leimauspuskuriin (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,3). Proteiinin konsentraation tuli olla noin 4 mg/ml, joten jos liuos oli liian laimeaa (alle 1 mg/ml), sitä konsentroidtiin Centriprep:in 15 ml:n tai Centricon:in 2 ml:n konsentroidjilla. Proteiiniliuosta otettiin 250 µl (maksimi noin 1 mg proteiinia) ja se laitettiin Eu-reagenssipulloon tai Eu-reagentti liuotettiin leimauspuskuriin ja osa siitä lisättiin proteiiniliuokseen. Leimausseosta sekoitettiin varovasti ja säilytettiin yön yli +4 °C:ssa.

Proteiiniin sitoutumaton Eu-kelaatti poistettiin geelisuodatuksella Amershamin NAP-5-pylväillä. NAP-5-pylväät sisältävät Sephadex G-25 mediumia, joilla pystytään erottamaan mm. suola ja muut pienet molekyylit (tässä tapauksessa Eu-kelaatti) suuremmista proteiineista, nukleiinihapoista yms. Europiumleimausliuos ajettiin pylvään läpi, kerättiin noin 200 µl:n fraktioita ja mitattiin niiden absorbanssi 280 nm:n aallonpituudella. Absorbansseista tehdystä käyrästä päätellen yhdistettiin fraktiot, jotka muodostivat ensimmäisen absorbanssihuipun. Nämä fraktiot sisälsivät valtaosan leimatusta proteiinista ilman vapaata Eu-kelaattia. Eu-kelaatin konsentraatio leimatussa proteiinissa arvioitiin vertaamalla yhdistettyjen ja muiden fraktioiden absorbanssia ja laskemalla yhdistettyjen osa koko leimausliuoksen Eu-kelaatista. Yhdistettyjen fraktioiden proteiinikonsentraatio määritettiin ja lisättiin BSA:ta 0,1 %:n konsentraatioon asti stabiloijaksi.

### **3.6 DELFIA**

DELFIA on PerkinElmerin fluorometrinen määrittely, jossa käytetään lantanoidikelaatteja fluoresenssisignaalin tuottamiseen. DELFIA:ssa käytettiin DNA-Bind 96-kuoppalevyjä (Costar, Corning Inc.). Kaivoja täytettiin 100 µl:lla päällystysliuosta, jossa oli yleensä 1-2 µg β7- tai β1A-peptidiä pH 9,0:n PBS:ssä. Levyt päällystettiin parafilmillä kuivumisen estämiseksi ja inkuboitiin 1 tunti huoneenlämpötilassa tai yli yön +4 °C:ssa. Kaivot pestiin kerran pH 7,4:n PBS:llä, jonka jälkeen kaivot blokattiin 50 mM:lla pH 7,6:n Tris-HCl:llä.

Levyjä inkuboitiin yksi tunti huoneenlämpötilassa tai yli yön +4 °C:ssa ja sitten ne pestiin kerran pH 7,4:n PBS:llä. Levyt blokattiin 2-4 %:sella BSA:lla (käytettiin Wallacin Diluent II-liuosta 1:2 tai 1:3 laimennoksena) pH 9,0:n PBS:ssä. pH tarkistettiin laimennoksen jälkeen. Levyjä inkuboitiin tunti huoneenlämmössä tai yli yön +4 °C:ssa. Kaivot pestiin kerran pH 7,4:n PBS:llä ja kaivoihin pipetoitiin 100 µl määrityspuskuria (Wallac), jossa oli haluttu määrä näyteproteiinia (FLNa21:ä, FLNc23-24:ä tai taliini F2-F3:a GST:n kanssa tai ilman GST:tä Eu-kelaatilla leimattuna). Levyjä inkuboitiin 1 tunti huoneenlämpötilassa tai yli yön +4 °C:ssa. Kaivoja pestiin 6 kertaa pH 7,4:n PBS:llä automaattisella pesurilla (DELFIA Platewash, PerkinElmer). Tämän jälkeen kaivoihin pipetoitiin 100 µl Europiumleimattua anti-GST-vasta-ainetta 1:1000 laimennoksena määrityspuskurissa. Jos näyteproteiini oli jo europiumleimattu, tätä vaihetta ei tarvittu. Nyt levyjä inkuboitiin joko 30 minuuttia tai tunti, jonka jälkeen ne pestiin kuuteen kertaan pH 7,4:n PBS:llä. Kaivoihin pipetoitiin 100 µl/kaivo kehitysliuosta ja odotettiin 5 minuuttia. Näytteiden fluoresenssi mitattiin Wallac Victor 2-spektrofotometrillä (PerkinElmer). Nyt kaivoissa oleva näyteproteiinin määrä voitiin suhteellisesti laskea ja päätellä sitoutumisen voimakkuus päällystyspeptideihin.

### **3.7 Affiniteetikromatografia**

Affiniteetikromatografiassa yritettiin selvittää GST-merkittyjen filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenin sitoutumista integriinin  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-fragmentteihin. DELFIA:ssa tämä ei lopulta onnistunut, koska taustasitoutumista ei saatu riittävän pieneksi. Affiniteetikromatografiassa kokeiltiin useita histidiinimerkattuja proteiineja sitovia hartseja (Protinon Ni 150-esipakattu pylväspakkaus, Qiagenin Ni-NTA Resin ja Novagenin His-Bind Resin). Lopulta käytettiin Novagenin His-Bind Resin:iä, koska sitä oli käytetty aiemmissa vastaavissa kokeissa ja siinä taustasitoutuminen saatiin vähenemään myös taliinilla, toisin kuin Qiagenin hartsilla. Affiniteetikromatografiassa on useita vaiheita: proteiinien sitoutus, SDS-PAGE, western blottaus, leimaus, kuvaus ja kuvien kehitys.

Affiniteetikromatografiassa Novagenin His-Bind Resiniin ensin sitoutettiin nikkeliä. Tämä tehtiin ottamalla aluksi 10 ml 50 %:sta histidiiniä sitovaa hartsia 50 ml:n Falcon-putkeen. Liuosta sentrifugattiin 500\*g 1 minuutti ja poistettiin supernatantti. Hartsi pestiin 2 kertaa

15 ml:lla vettä. Sitten lisättiin 24 ml latauspuskuria (50 mM NiCl<sub>2</sub>) ja inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuuttia. Hartsia sentrifugoitiin 500\*g 1 minuutti ja poistettiin supernatantti. Tätä seurasi pesu 2 kertaa 25 ml:lla sitoutumispuskuria (5 mM imidatsoli, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9). Seokseen lisättiin lopuksi 20 ml sitoutumispuskuria ja varastoitiin 4 C°:ssa.

Hartsin helmet päällystettiin integriinien rekombinanttihäntäproteiineilla. Kiertynyt kierrekonstruktin sisältävissä  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-häntäpeptideissä oli päässä 6 histidiiniaminohappoa, jotka sitoutuvat nikkelillä varattuun His-Bind Resiniin tiukasti. Integriinihännät liuotettiin sitoutumispuskuriin, jossa oli lisänä 6 M ureaa. Jokaista päällystyskohdetta kohti otettiin 250  $\mu$ l:a tai enemmän 20 %:sella nikkelillä varattuja helmiä eppendorfiin. Nämä sentrifugattiin Eppendorfin Centrifuge 5414 C:llä (kaikkien eppendorfin sentrifugointiin käytettiin tätä sentrifuugia) 100\*g 30 sekuntia ja poistettiin supernatantti. Hartsia suspensoitiin vastaavaan määrään sitoutumispuskuria, jossa oli lisänä 6 M ureaa (muodostui 50 %:sta hartsia). Häntäproteiini lisättiin tähän liuokseen. Häntäproteiinia käytettiin aluksi 40 ng/ $\mu$ l helmiä, mutta myöhemmin puolet tästä. Seos jätettiin tunniksi huoneenlämpötilaan sekoittajassa. Tämän jälkeen liuos sentrifugattiin 100\*g 1 minuutti, poistettiin supernatantti ja pestiin aina 1 ml:lla laskevassa ureasarjassa sitoutuspuskurissa 6, 3 ja 1,5 molaarisen urean kanssa ja lopuksi ilman ureaa. Sitten helmiä pestiin 2 kertaa 1 ml:lla puskuri X-T:ä (1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 40 mM NaPPi, 50 mM NaCl, 150 mM sakkaroosi, 10 mM Pipes, 0,05 % Triton-X, pH 6,8) ja lopuksi suspensoitiin 500  $\mu$ l:aan puskuri X-T:ä ja varastoitiin 4 C°:ssa.

Sitoutusmäärityksessä hartsia, johon oli sitoutettu haluttua integriinihäntää tai kontrolleissa ei, pipetoitiin katkaistulla pipetillä jokaiseen näytteeseen 10  $\mu$ l. Jokaiseen näytteeseen tuli lisäksi haluttu määrä GST-filamiini A 21-domeeni- tai GST-taliini F2-F3-fuusioproteiinia tai taliini F2-F3:a ja täytettiin kokonaistilavuudeksi 100  $\mu$ l puskurilla X-T (ensimmäisissä tehdyissä kokeissa käytettiin puskuri X-T:n asemesta puskuria A: 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 40 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 10 mM Pipes, 50 mM NaCl, 150 mM sakkaroosi, pH 6.8, jossa oli myös 0,05 % Triton X-100, 3 mM MgCl<sub>2</sub> ja proteaasiestäjä CLAP 10  $\mu$ g/ml). Näytteet sekoitettiin ja jätettiin tunniksi huoneenlämpöön tai yön yli 4 C°:een. Tämän jälkeen näytteitä pestiin 3 kertaa 1 ml:lla puskuria X-T (useita pesumääriä ja -kertoja kokeiltiin)



sentrifugoiden aina välissä 500\*g 1 minuutti ja poistaen supernatantti. Näytteiden kanssa pyrittiin tasaiseen pesutulokseen varomalla hartsin poistamista ja jättämällä suurin piirtein sama määrä supernatanttia jäljelle. Viimeisen pesun jälkeen pyrittiin konsentroimaan näyte noin 20 µl:ksi. Näytteisiin lisättiin 10 µl:a 2-kertaista SDS-PAGE-näytepuskuria ajoa varten ja eppendorfeja pidettiin 3 minuuttia kiehuvaan vesihauteeseen.

### **3.8 SDS-PAGE**

Affiniteettikromatografiassa käytettiin 10 %:sta geeliä ja proteiinipuhdistuksissa 12 %:sta. SDS-PAGE:n teossa käytettiin Bio-Radin laitteita. SDS-PAGE:ssa käytettiin 86\*68\*0,75 mm vertikaaligeelisiä (Bio-Rad). Puskurisysteemi on kuvattu aikaisemmin (Laemmli, 1970).

### **3.9 Western blottaus**

Proteiinit siirrettiin SDS-PAGE-geeliltä Immobilon P-PVDF (polyvinylidifluoridi)-kalvolle. Blottausaikana käytettiin kahta tuntia ja 100 voltin jännitettä, joka johti noin 0,24 ampeerin virtaan Bio-Rad:in blottauslaitteessa. Blottauspuskurin (Towbin ym., 1979) jäähtymiseen blottauksen aikana käytettiin sekä jäätä blottausastian alla, että jääastia blottausastian sisällä, jotta kulkeva virta ei kuumentaisi nestettä liikaa.

PVDF-kalvot käsiteltiin (blotin värjäyksessä aina proteiinipuoli ylöspäin) 1 tunti 25 C°:ssa tai yön yli 4 C°:ssa TBS:ssä (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,6), jossa oli 5 % rasvatonta maitojauhetta (Valio). Tämän jälkeen kalvoja huuhdeltiin kaksi kertaa PBST-pesupuskurissa (8,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 0,2 tilavuus-%:a Tween-20, pH 7,4). PVDF-kalvon leimauksessa käytettiin Amershamin anti-GST-HRP (horseradish peroxidase, piparjuuriperoksidaasi)-konjugaattia. Blotille sitoutuneet GST-fuusioproteiinit leimattiin inkuboimalla blotteja sekoituksen kanssa tunti 1:10000 laimennetussa anti-GST-HRP-konjugaatissa, joka laimennettiin pH 7,4:n PBST:hen. Laimennosta käytettiin ainakin 0,25 ml yhtä kalvon neliösenttimetriä kohti. Seuraavaksi

kalvoja huuhdeltiin 2 kertaa PBST:ssä ja tämän jälkeen pestiin 5 kertaa 5 minuuttia sekoituksen kanssa.

Anti-GST-HRP-konjugaatti havaittiin SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substraten (Pierce) avulla. Kuvaukseen käytetyt filmit olivat Fujifilmin Fuji Medical X-ray Filmejä. Valotetut, kehitetyt, kiinnitetyt, huuhdellut ja kuivatut röntgenfilmit skannattiin Epson Perfection 2000-skannerilla EM-negative-asetuksilla 800 pikseliä/tuumatarkkuudella. Tiff-muotoiset skannatut kuvatiedostot kvantitoitiin ImageJ-ohjelmalla. Ohjelmassa käytettiin subtract background-toimintoa rolling ball säteellä 130 (tai enemmän, jos oli tarvetta). Ohjelmassa käytettiin valmista geelikvantitointitoimintoa, jossa eri vyöhykkeet määriteltiin käsin.

## 4 TULOKSET

### 4.1 Fuusioproteiinin puhdistus

Kokeiden aikana puhdistettiin GST-filamiini A:n 21-domeenia, pelkkää filamiini A:n 21-domeenia ja GST-taliinin F2-F3-domeeneja. Jokainen puhdistus onnistui siten että lopullisessa puhdistustuotteessa ei näkynyt muita raitoja kuin haluttu (molekyylipaino oikea) proteiini SDS-PAGE:ssa. Myös puhdistetut proteiinimäärät olivat jokseenkin odotettuja (n. 2-10 mg riippuen puhdistuksesta).

### 4.2 DELFIA-metodin optimointi

DELFI-metodissa oli alusta lähtien ongelmana taustasitoutuminen. GST sitoutui integriinin  $\beta$ 7-häntäpalasella päällystettyihin DNA-Bind 96-kuoppalevyn kuoppiin lähes yhtä tehokkaasti kuin GST yhdistettynä filamiini A:n 21-domeeniin, jonka kuitenkin olisi pitänyt aiempien tutkimusten mukaan sisältää sitoutumiskohdan  $\beta$ 7-integriinille.

Taustan vähentämiseksi yritettiin lisätä pesujen määrää kuuteen, joka hieman auttoi. 1  $\mu$ g:n  $\beta$ 7-peptidipäällystyksellä ja 40  $\mu$ g:n GST-Filamiini A 21-määrällä kolmella rinnakkaisnäytteellä saatiin fluoresenssimääräsuhteeksi ilman  $\beta$ 7-peptidiä jaettuna  $\beta$ 7-peptidin kanssa 0,596498. Jos tris-blokkausta ei tehty, vastaava tulos oli 1,013481 eli heikompi. Ditiotreitoli, joka estää ja vähentää rikkisiltojen syntyä, säilyttää monotiolit pelkistyneessä tilassa sekä vakauttaa sulfhydryyliryhmiä, tuotti myös heikomman tuloksen: 1,01783. Yli yön +4 °C:ssa tapahtunut BSA-blokkaus tuotti suhteen 0,831107 eli hieman paremmat tulokset kuin tunti huoneenlämpötilassa. 30 minuutin europiumleimatun anti-GST:n inkubaatio tuotti vastaavasti suhteen 0,342084 eli huomattavasti paremmat tulokset kuin 1 tunti. Kokeissa oli kolme rinnakkaisnäytettä. Kontrolli antoi ilman  $\beta$ 7-peptidiä jaettuna  $\beta$ 7-peptidin kanssa-suhteeksi 1,115111.

GST:n aiheuttamaa taustaa yritettiin vähentää leimaamalla filamiini A:n 21-domeeni ja kontrollina käytettävä filamiini C:n 23-24-domeeni sekä myöhemmin taliinin F2-F3-

domeenit suoraan europiumleimalla, jolloin myöskään vasta-aineinkubaatiota ei tarvittu. Tällä tavalla tausta saatiin jonkin verran alhaisemmaksi, mutta vieläkin se oli aivan liian korkea. Parhaimmillaan fluoresenssisuhteeksi (ilman  $\beta$ 7-peptidiä/ $\beta$ 7-peptidin kanssa) saatiin 0,49, jolloin tosin europiumleimatulla FLNc23-24:llä tehdyn kontrollinkin suhteeksi tuli 0,70. Tausta oli jonkin verran pienempi, kun europiumleima oli suoraan kiinni peptidissä ilman GST:tä. BSA-blokin sijasta koetettiin myös FLNc23-24:n käyttämistä blokkaukseen, jolloin tulokset olivat vastaavat kuin BSA:lla

### **4.3 Filamiini A:n 21-domeenin, filamiini C:n 23-24-domeenien ja taliinin F2-F3-domeenien europiumleimaus**

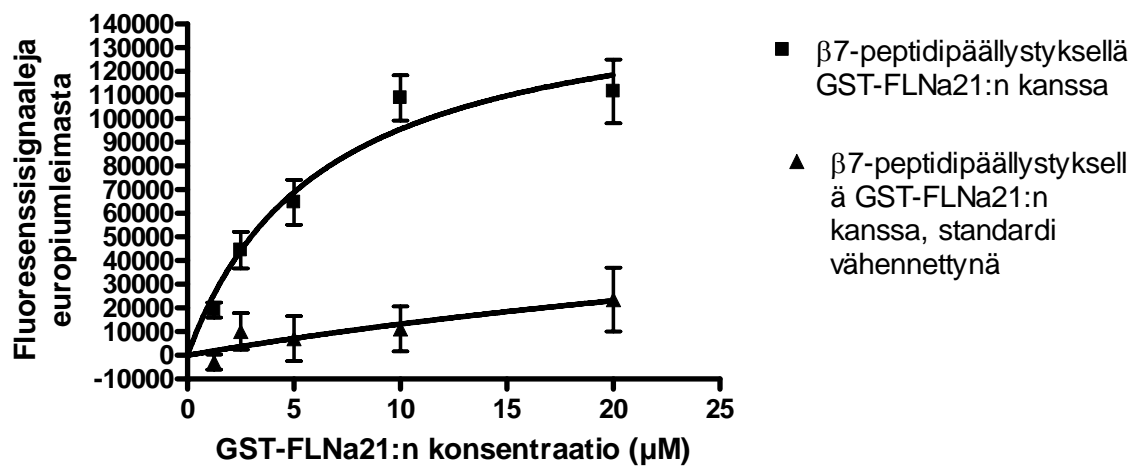
Filamiini A:n 21-domeenin sekä kontrollina käytettävän filamiini C:n 23-24-domeenien europiumleimauksessa  $\text{Eu}^{3+}$ -konsentraatioksi leimatuissa proteiineissa saatiin FLNa21:lle 87.6 nmol/mg ja FLNc23-24:lle 124 nmol/mg. Taliinin F2-F3-domeenien ja FLNc23-24:n europiumleimauksessa europiumkonsentraatio oli paljon pienempi ja fluoresenssi vähäisempää johtuen ilmeisesti liuotetun europiumreagentin väärästä säilytyslämpötilasta (+4 °C:ta -20 °C:een sijasta). Fluoresenssin vähyys laski tarkkuutta mittauksissa.

### **4.4 Filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien konsentraatiokäyrät DELFIA:lla**

Taustasta johtuen konsentraatiokäyriä ei voi pitää aivan luotettavina, mutta niiden muoto vastaa jotakuinkin odotettuja käyriä. Konsentraatiokäyrät tehtiin ja sitoutumisvakiot laskettiin GraphPad Prism 4-ohjelmalla. Sitoutumisvakioiden laskemisessa käytettiin pohjana kaavaa  $Y=B_{\max} * X / (K_d * X)$ , jota käytetään, kun määrittäessä tutkitulle molekyylille on vain yhdenlaisia merkittäviä sitoutumispaikkoja. Kaavassa Y on fluoresenssin määrä, X sitoutuvan molekyylin konsentraatio,  $B_{\max}$  ilmaisee maksimaalista sitoutumista ja  $K_d$  on dissosiaatiovakio, jonka ilmaisemassa konsentraatiossa ligandi saavuttaa puolet maksimaalisesta sitoutumisestaan. Parhaana tuloksena kaikissa sitoutumiskäyrän tuottavissa tutkimuksissa sekä DELFIA:lla että affiniteetikromatografialla pidettiin koetta, jossa tulokset muodostivat kuvaajaan

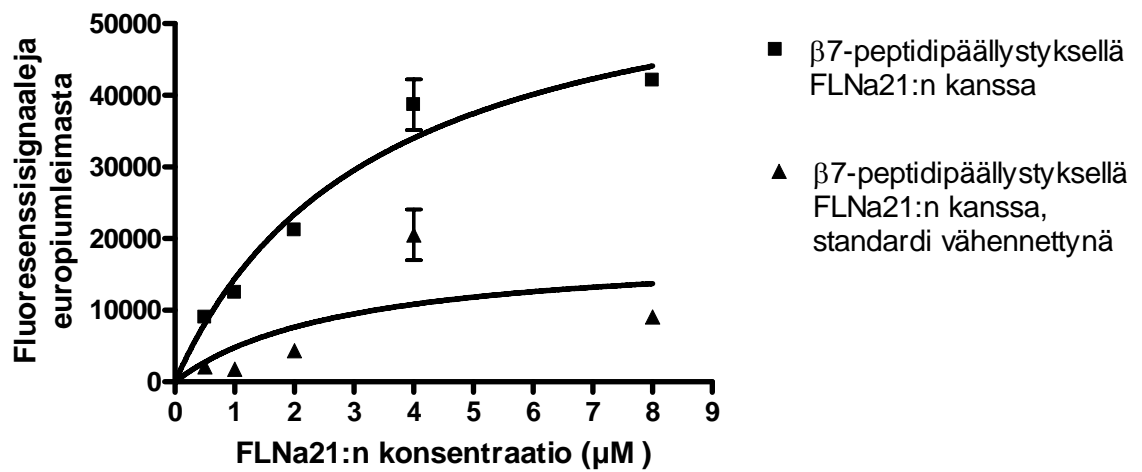
sijoitettuina mahdollisimman läheisesti sitoutumiskäyrää muistuttavan muodon. Tällöin myös luottamusväli muodostuu pienemmäksi kuin kuvaajissa, joiden pisteet muodostavat vähemmän sitoutumiskäyrämäisen muodon.

GST-FLNa21:n sitoutumisesta  $\beta$ 7-peptidiin saatiin DELFIA:lla parhaimmillaan seuraavanlainen käyrä (Kuva 4.4.1). Kokeessa käytettiin kolmea rinnakkaisnäytettä joka GST-FLNa21:n konsentraatioissa ja kolmea kontrollia, joissa ei ollut  $\beta$ 7-peptidipäällystystä, myös joka konsentraatioissa. Keskiarvo kyseisen konsentraation kontrollien lukemista vähennettiin jokaisesta  $\beta$ 7:ää sisältävästä lukemasta.  $K_d$ :ksi GST-FLNa21:n sitoutumiselle  $\beta$ 7-peptidiin saatiin 58,38  $\mu$ M 95 %:n luottamusvälin ollessa 0,0-657,9  $\mu$ M:a. Taustasitoutumista vähentämättä  $K_d$ :ksi saatiin 6,322  $\mu$ M 95 %:n luottamusvälin ollessa 1,734-10,91  $\mu$ M:a.



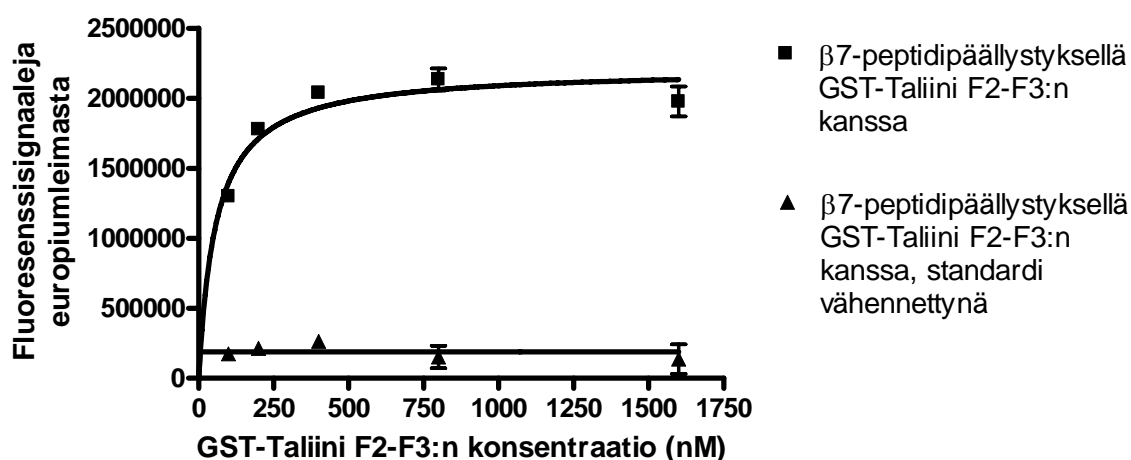
Kuva 4.4.1: GST-FLNa21:n sitoutuminen  $\beta$ 7-peptidiin DELFIA:lla eri konsentraatioissa.

FLNa21:n sitoutuminen  $\beta$ 7-peptidiin onnistui parhaimmillaan seuraavasti (Kuva 4.4.2). Rinnakkaisnäytteet ja kontrollit sekä  $K_d$ :n lasku olivat samanlaisia kuin edellisessä kokeessa.  $K_d$ :ksi FLNa21:n sitoutumiselle  $\beta$ 7-peptidiin saatiin 2,892  $\mu$ M 95 %:n luottamusvälin ollessa 0,0-9,951  $\mu$ M:a. Taustasitoutumista vähentämättä  $K_d$ :ksi saatiin 3,356  $\mu$ M 95 %:n luottamusvälin ollessa 1,718-4,994  $\mu$ M:a.



Kuva 4.4.2: FLNa21:n sitoutuminen  $\beta$ 7-peptidiin DELFIA:lla eri konsentraatioissa.

GST-Taliini F2-F3:n sitoutuminen  $\beta$ 7-peptidiin tuotti parhaimmillaan seuraavanlaisen käyrän (Kuva 4.4.3). Rinnakkaisnäytteet ja kontrollit sekä  $K_d$ :n lasku olivat samanlaisia kuin edellisessä kokeessa.  $K_d$ :ksi FLNa21:n sitoutumiselle  $\beta$ 7-peptidiin saatiin  $1,000 \cdot 10^{-7}$  nM:a 95 %:n luottamusvälin ollessa 0,0-94,98 nM:a. Taustasitoutumista vähentämättä  $K_d$ :ksi saatiin 58,29 nM 95 %:n luottamusvälin ollessa 33,73-82,85 nM:a.



Kuva 4.4.3: GST-Taliini F2-F3:n sitoutuminen  $\beta$ 7-peptidiin DELFIA:lla eri konsentraatioissa.

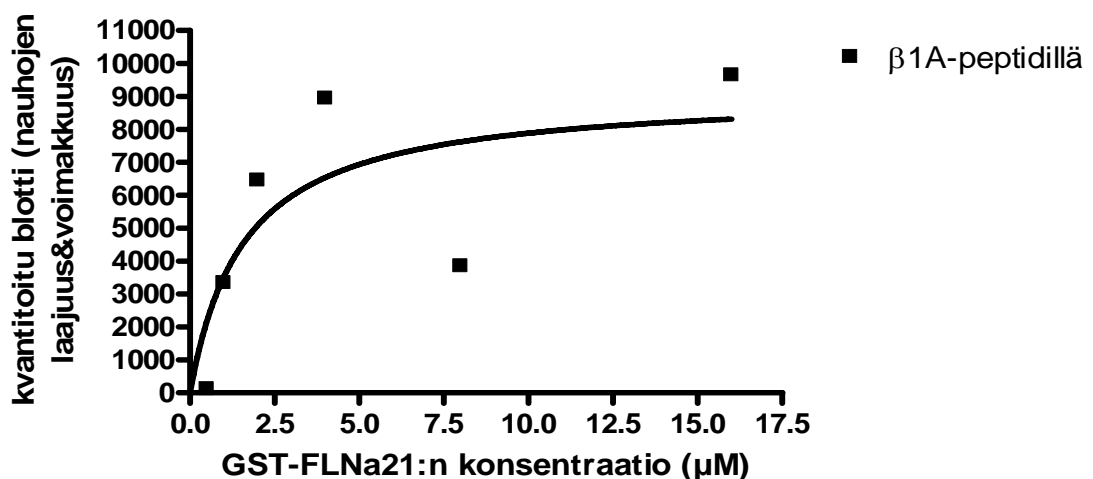
#### 4.5 Affiniteetikromatografian optimointi

Affiniteetikromatografiaa yritettiin useilla nikkelpäällystetyillä helmillä, joihin sitoutettiin peptidejä, joiden toisissa päissä ovat 6 histidiinin muodostamat ketjut sitoutuvat nikkelpäällysteisiin helmiin. Protinon Ni 150-esipakattujen pylväiden helmet saivat aikaan paljon taustaa sekä filamiinilla että taliinilla. Myös PVDF-kalvoon sitoutunut tausta oli piipohjaisella Protinon hartsilla suurempaa kuin Qiagenin ja Novagenin Sepharosepohjaisilla. Qiagenin Ni-NTA Resin tuotti parhaan tuloksen taustan suhteen. Sitä käytettäessä sekä GST-FLNa21 että GST-Taliini F2-F3 tuottivat vähäisen taustan.

#### 4.6 Filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien konsentraatiokäyrät ja kompetitiivinen määrittäminen affiniteettikromatografiassa

GST-Taliini F2-F3:n aiheuttama tausta saatiin lopulta vähennettyä Novagenin His-Bind Resiniä käyttämällä, kuten mm. David A. Calderwoodin ryhmä on käyttänyt (Calderwood ym., 1999, Pfaff ym., 1998). Affiniteettikromatografia kärsi huomattavasti epätarkkuudesta. Parhaiten onnistuneina kokeina myös affiniteettikromatografiassa pidettiin kokeita, joissa tuloksista muodostui kuvaajassa sitoutumiskäyrämuoto.

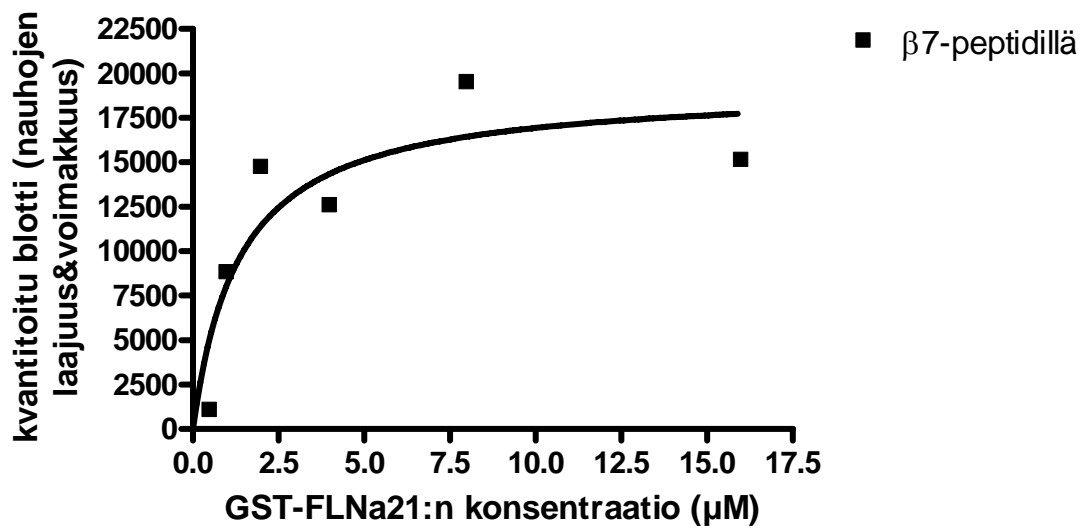
Affiniteettikromatografian avulla GST-FLNa21:n sitoutumisesta  $\beta$ 1A-peptidiin eri konsentraatioissa saatiin parhaimmillaan alla olevassa kuvassa ilmenevä käyrä (Kuva 4.6.1). Rinnakkaisnäytteitä ei ollut ja tausta vähennettiin laskemalla 16  $\mu$ M:n GST-FLNa21:n konsentraatioissa tehdyn standardin (jossa ei käytetty  $\beta$ 1A-peptidiä) avulla näytteistä vähennettävä suhteellinen taustasignaali (standardi samassa GST-FLNa21:n konsentraatioissa kuin näyte).  $K_d$ :ksi GST-FLNa21:n sitoutumiselle  $\beta$ 1A-peptidiin saatiin 1,592  $\mu$ M 95 %:n luottamusvälin ollessa 0,0-6,348  $\mu$ M:a.



Kuva 4.6.1: GST-FLNa21:n sitoutuminen  $\beta$ 1A-peptidiin affiniteettikromatografialla eri konsentraatioissa.

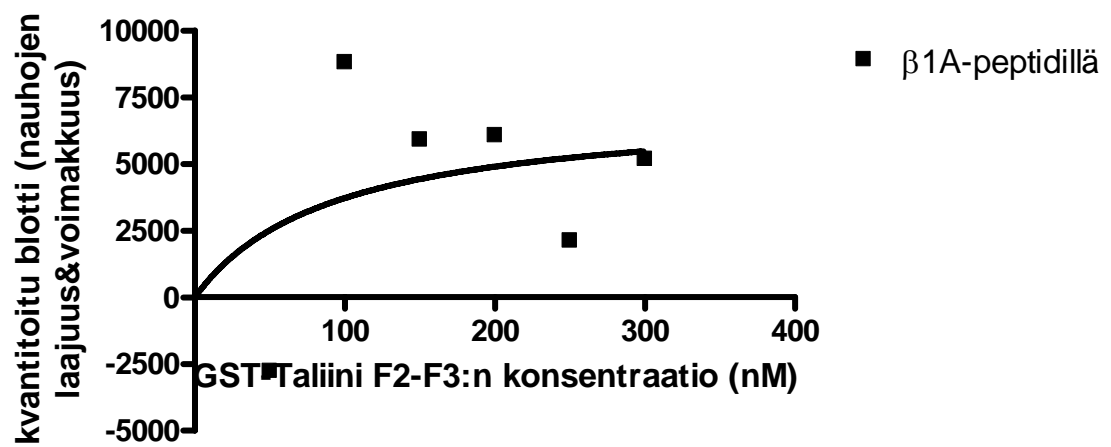


Affiniteettikromatografian avulla GST-FLNa21:n sitoutumisesta  $\beta$ 7-peptidiin saatu paras konsentraatiokäyrä näkyy alla olevassa kuvassa (Kuva 4.6.2). Standardin lasku ja taustan vähentäminen suoritettiin kuten edellisessä kokeessa.  $K_d$ :ksi GST-FLNa21:n sitoutumiselle  $\beta$ 7-peptidiin saatiin  $1,363 \mu\text{M}$  95 %:n luottamusvälin ollessa  $0,0-3,829 \mu\text{M}$ :a.



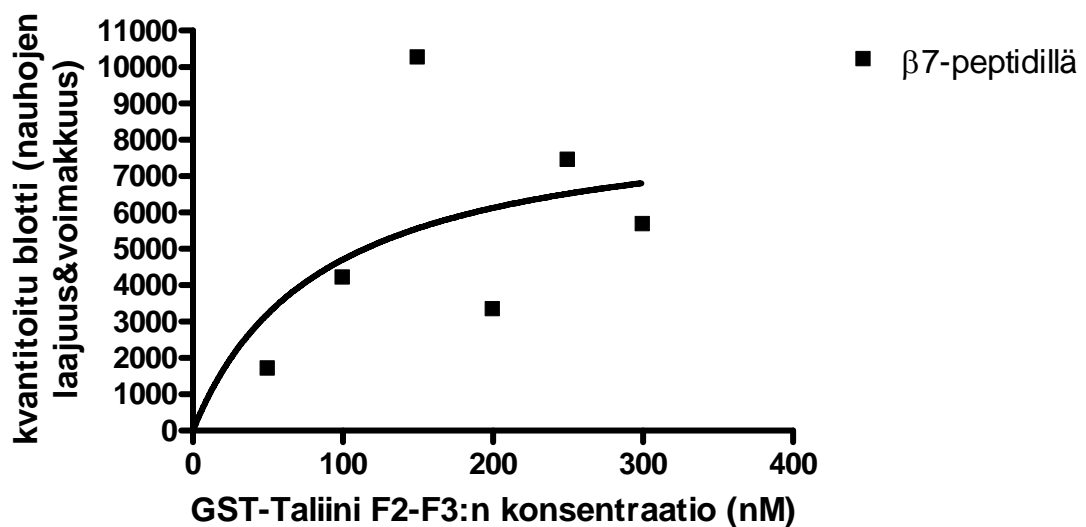
Kuva 4.6.2: GST-FLNa21:n sitoutuminen  $\beta$ 7-peptidiin affiniteettikromatografialla eri konsentraatioissa.

Parhaiten onnistunut konsentraatiokäyrä GST-Taliini F2-F3:n sitoutumisesta  $\beta$ 1A-peptidiin näkyy alla olevassa kuvassa (Kuva 4.6.3). Standardin lasku ja taustan vähentäminen suoritettiin kuten edellisessä kokeessa.  $K_d$ :ksi GST-Taliini F2-F3:n sitoutumiselle  $\beta$ 1A-peptidiin saatiin 92,62 nM 95 %:n luottamusvälin ollessa 0,0-988,6 nM:a.



Kuva 4.6.3: GST-Taliini F2-F3:n sitoutuminen  $\beta$ 1A-peptidiin affiniteetikromatografialla eri konsentraatioissa.

Parhaiten onnistunut konsentraatiokäyrä GST-Taliini F2-F3:n sitoutumisesta  $\beta$ 7-peptidiin näkyy alla olevassa kuvassa (Kuva 4.6.4). Standardin lasku ja taustan vähentäminen suoritettiin kuten edellisessä kokeessa.  $K_d$ :ksi GST-Taliini F2-F3:n sitoutumiselle  $\beta$ 7-peptidiin saatiin 86,32 nM 95 %:n luottamusvälin ollessa 0,0-566,5 nM:a.



Kuva 4.6.4: GST-Taliini F2-F3:n sitoutuminen  $\beta$ 7-peptidiin affiniteetikromatografialla eri konsentraatioissa.

Filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3:n kompetitiiviselle sitoutumiselle  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-peptideihin ei saatu laskettua arvoja tulosten liian suuren epätarkkuuden takia.

## 5. TULOSTEN TARKASTELU

On saatu selville, että filamiini A:n 21-domeeni ja taliinin F2-F3-domeenit sisältävät voimakkaimmin  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-integriinejä sitovan osan kyseisissä proteiineissa (Calderwood ym., 1999, Kiema ym., 2006). Näiden osien käyttö antaa jonkinlaisen kuvan kokonaisten proteiinien sitoutumisesta integriinien  $\beta$ -häntiin ja erityisesti spesifisemmän tiedon näiden osien sitoutumisesta. Peptidien ekspressio ja mutaatioiden teko on myös käytännöllisempää, kun käytetään vain tutkittavia domeeneita.

Kaiken kaikkiaan kokeiden tulokset olivat hyvin epätarkkoja. DELFIA:lla GST tuotti paljon taustaa. Ilmeisesti GST-peptidin ominaisuudet olivat sellaiset, että se sitoutui herkästi 96-kuoppalevyn kaivojen seiniin. Tätä ongelmaa on vaikea ratkaista, koska viimeiset vaiheet tehtiin DELFIA:n standardissa määrityspuskurissa, jonka koostumuksen muuttaminen GST:n irrottamiseksi voi vaikuttaa lopputulokseen muutenkin. Blokkausta koetettiin sekä BSA:lla, että filamiini C:n 23-24 domeeneilla (tarkoituksena vain käyttää eri proteiinia kuin BSA). Blokkaukset filamiini C:n 23-24 domeeneilla oli jotakuinkin yhtä tehokasta kuin BSA:lla. Lisäksi blokkattiin Tris:llä (ennen BSA:ta). Huomattiin, että molemmat blokkaukset vaadittiin. Tris on molekyylivälikooltaan pienempi ja mahdollisesti täyttää välit, jotka suurempikokoiselta BSA:lta jäisivät täyttämättä. Myös BSA-blokin käyttö vähensi taustasitoutumista täydentäen Tris:n työtä. BSA ei haitannut leimattujen peptidien sitoutumista  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-integriinihäntäpeptideihin. GST:n taustasitoutumista voisi mahdollisesti vähentää ylimääräisillä pesuilla sellaisella liuoksella, joka irrottaisi GST:tä kaivoista, mutta ei vaikuttaisi niinkään Filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien sitoutumiseen  $\beta$ 7- ja  $\beta$ 1A-integriinihäntäpeptideihin.

DELFIA:lla saatuja sitoutumisvakioita ei voi pitää luotettavina. Ne ovat enintään suuntaa-antavia johtuen suurista 95 %:n luottamusväleistä. DELFIA:lla ilmeni voimakasta taustasitoutumista, joka ajoittain oli lähes yhtä suurta kuin tutkittavien peptidien sitoutuminen  $\beta$ 7- tai  $\beta$ 1A-peptideillä päällystettyihin kaivoihin. Itse asiassa  $K_d$  oli useissa kokeissa lähempänä arvioitua oikeaa, jos taustasitoutumista ei vähennetty.

Joissain affiniteettikromatografian kokeissa epätarkkuutta aiheutti röntgenfilmien liian suuri valotusaika. Tällöin osa röntgenfilmistä saavutti maksimivalotuksen ja skannatut ja kvantitoidut filmit tuottivat epätarkemman tuloksen, koska signaalin voimakkuus maksimivalottuneissa kohdissa oli näin todellista pienempi.

Qiagenin His-Bind Resiniä käyttämällä taustasitoutuminen saatiin vähennettyä siedettäviin mittoihin, mutta mittauksia vaivasi vielä epätarkkuus. Epätarkkuuden syihin voi kuulua GST-fuusioproteiinien sitoutusvaiheen jälkeisissä pesuissa tapahtuva mittavirhe: kaikkea nestettä ei saatu pois pipetillä, koska sefaroosia, jossa sitoutuneet peptidit olivat, olisi tullut mukaan. Myös saman määrän liuosta otto kaikista näytteistä olisi ollut vaikeaa, koska liuos piti saada melko tarkasti pois, jottei epätarkkuutta lisäävien pesujen määrää tarvitsisi kasvattaa. Myös epätarkkuus liuosten lisäyksessä ja poistossa kertautuisi näin seuraavissa pesuissa. Epätarkkuutta lisäsi jonkin verran myös pesunesteiden inkubaatioaikojen vaihtelevuus, koska kaikkia eppendorfeja ei voinut käsitellä samaan aikaan – näin pääsi joistakin näytteistä enemmän ja joistakin vähemmän sitoutunutta peptidiä irtoamaan. SDS-PAGE-vaiheessa haittana oli, että sefaroosiin jäi jonkin verran nestettä tai pipetoinnin mukana SDS-PAGE-laitteen kaivoihin tuli hiukan sefaroosia, joka lisäsi signaalia. Sefaroosi oli kuitenkin niin pienijyväästä, että neulallakin (17G) nestettä annosteltaessa sefaroosia tuli mukaan. SDS-PAGE-vaiheessa kaivojen rajallinen määrä (10 geeliä kohti) oli myös suuri rajoittava tekijä epätarkkuuden karsimisessa. Suuremmalla näytekäivojen määrällä olisi eri konsentraatioista pystytty tekemään enemmän rinnakkaisnäytteitä, jolloin näiden keskiarvot olisivat antaneet huomattavasti tarkemman tuloksen. Affiniteettikromatografiallakin saadut sitoutumisvakiot voidaan luokitella melko hatariksi 95 % luottamusvälin ollessa suuri jokaisessa. Affiniteettikromatografiassa näytteitä käsiteltiin myös niin monessa vaiheessa, että se todennäköisesti vähensi lopputulosten tarkkuutta huomattavasti, vaikka yhden vaiheen aiheuttama tarkkuuden menetys olisikin ollut pieni.

Aikaisemmin on havaittu, että filamiini A sitoutuu voimakkaasti  $\beta$ 7-häntään, mutta huomattavasti vähemmän  $\beta$ 1A-häntään (Calderwood ym., 2001, Pfaff ym., 1998). Näissä tutkimuksissa ei kerrottu sitoutumisen voimakkuuksia muuten kuin että toisessa mainittiin  $\beta$ 7-konstruktin sitovan 8,4 kertaa enemmän filamiinia kuin  $\beta$ 1A-konstruktin (Pfaff ym.,

1998). Tekemissäni kokeissa taas näytti, että filamiini A sitoutuu suurin piirtein yhtä voimakkaasti  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -häntiin. 95 %:n luottamusvälit tosin ovat niin suuret, että on mahdollista, että filamiini A:n sitoutuminen  $\beta 7$ -häntään olisi selvästi voimakkaampaa kuin  $\beta 1A$ -häntään. Aikaisempi tutkimus kertoo myös, että  $\beta 1A$ -häntä sitoutuu kesinkertaisesti sekä filamiini A:han että taliiniin (Calderwood ym., 2001, Pfaff ym., 1998). Saamani tulokset taas viittaavat siihen, että taliini sitoutuisi selvästi voimakkaammin  $\beta 1A$ -häntään kuin filamiini A. Tätä on vaikea selittää, koska järjestelmällisesti taliinin sitoutuminen vaikutti voimakkaammalta, vaikka riittävän tarkkoja sitoutumiskäyriä ei saatukaan tehtyä. Samainen tutkimus mainitsee myös, että taliinin sitoutuminen  $\beta 7$ -häntään on heikkoa (Calderwood ym., 2001, Pfaff ym., 1998). Taliinin ja filamiini A:n kompetitiivista sitoutumista  $\beta 7$ -häntään ei kuitenkaan ollut tehty, joten tuloksia ei voi täysin verrata. Tutkimus kertoo myös, että taliinin sitoutuminen  $\beta 7$ -häntään on heikompaa kuin  $\beta 1A$ -häntään (Calderwood ym., 2001, Pfaff ym., 1998). Saamani tulokset taas vihjaavat, että taliini sitoutuisi suurin piirtein yhtä lujasti  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -häntiin. Jälleen 95 %:n luottamusvälit mahdollistavat kuitenkin, että taliinin sitoutuminen  $\beta 1A$ -häntään olisi huomattavasti lujempaa kuin  $\beta 7$ -häntään. Mainituissa aikaisemmissa tutkimuksissa on kuitenkin käytetty kokonaista filamiini A:ta ja taliinia, kun taas tässä tutkimuksessa käytettiin näiden osia. Käytetty filamiini A:n 21-domeeni ja taliinin F2-F3-domeenikonstruktio kuitenkin sisältävät integriinin  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -häntiä voimakkaimmin sitovat osat näissä proteiineissa. Sitoutumiseen voivat kuitenkin vaikuttaa  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -häntiä heikommin sitovat osat proteiineissa, kuten filamiini A:n 19-domeeni ja muut osat proteiineissa voivat muuttaa rakenteellisesti tai peittää  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -häntiä sitovia osia muuttaen näin sitoutumisvoimakkuutta (esim. taliinin muut osat voivat peittää taliinin N-terminaalisen pääosan  $\beta$ -integriinejä sitovaa osaa). Nämä syyt vähentävät tuloksien vertailukelpoisuutta mainittuihin aikaisempiin tuloksiin huomattavasti.

Aikaisemmat tutkimukset filamiini A:n ja taliinin sitoutumisesta integriinien sytoplasmisiin domeeneihin (Calderwood ym., 2001, Pfaff ym., 1998) viittaavat mahdollisesti siihen, että niidenkään teossa affiniteettikromatografia ei ole ollut tarpeeksi tarkka metodi sitoutumiskäyrien tekoon, koska näitä ei ole esitetty. Sen sijaan affiniteettikromatografiaa on käytetty taliinin ja filamiini A:n sitoutumisvoimakkuuksien vertailuun joitain integriinien  $\beta$ -häntiä kohtaan. Tutkimusta olisi ehkä täsmentänyt

samanlaisten vertailujen teko sitoutumiskäyrien ohella, koska sitoutumiskäyrät olivat epätarkkoja.

Jos DELFIA, affiniteettikromatografia tai mahdollisesti BIACORE saadaan toimimaan kyseisten peptidien kanssa paremmin, voidaan filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien sitoutumisvakio  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -peptideihin määrittää luotettavammin sekä määrittää filamiini A:n 21-domeenin ja taliinin F2-F3-domeenien kompetitiivinen sitoutuminen  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -peptideihin. Tämän jälkeen peptideihin voidaan tehdä mutaatioita, jotta saataisiin tietää, mitkä kohdat peptideissä vaikuttavat kyseisiin sidoksiin eniten ja millä muutoksilla sitoutumisvoimakkuutta voidaan muuttaa. Mahdollisesti tullaan tietämään myös tarkemmin taliinin ja filamiini A:n keskinäisestä vuorovaikutuksesta niiden sitoutuessa integriinien  $\beta 7$ - ja  $\beta 1A$ -häntiin. Kun sitoutumisvoimakkuutta pystytään muuntelemaan, voidaan näiden mutaatioiden vaikutusta mahdollisesti tutkia transformoiduissa, elävissä soluissa. Elävissä soluissa voidaan tutkia mutaatioiden vaikutuksia esim. integriinien aktivaation säätelyyn ja solujen migraatioon sekä *in vitro* että *in vivo*.

## 6. Lähdeluettelo

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ja Walter, P. 2002. Molecular Biology of The Cell. Garland Science, United States of America.
- Albiges-Rizo, C., Frachet, P. ja Block, M.R. 1995. Down regulation of talin alters cell adhesion and the processing of the alpha 5 beta 1 integrin. *J.Cell.Sci.* 108 ( Pt 10):3317-3329.
- Barsukov, I.L., Prescott, A., Bate, N., Patel, B., Floyd, D.N., Bhanji, N., Bagshaw, C.R., Letinic, K., Di Paolo, G., De Camilli, P., Roberts, G.C. ja Critchley, D.R. 2003. Phosphatidylinositol phosphate kinase type 1gamma and beta1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *J.Biol.Chem.* 278:31202-31209.
- Bodeau, A.L., Berrier, A.L., Mastrangelo, A.M., Martinez, R. ja LaFlamme, S.E. 2001. A functional comparison of mutations in integrin beta cytoplasmic domains: effects on the regulation of tyrosine phosphorylation, cell spreading, cell attachment and beta1 integrin conformation. *J.Cell.Sci.* 114:2795-2807.
- Borowsky, M.L. ja Hynes, R.O. 1998. Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J.Cell Biol.* 143:429-442.
- Brotschi, E.A., Hartwig, J.H. ja Stossel, T.P. 1978. The gelation of actin by actin-binding protein. *J.Biol.Chem.* 253:8988-8993.
- Brown, N.H., Gregory, S.L., Rickoll, W.L., Fessler, L.I., Prout, M., White, R.A. ja Fristrom, J.W. 2002. Talin is essential for integrin function in Drosophila. *Dev.Cell.* 3:569-579.
- Bubeck, P., Pistor, S., Wehland, J. ja Jockusch, B.M. 1997. Ligand recruitment by vinculin domains in transfected cells. *J.Cell.Sci.* 110 ( Pt 12):1361-1371.
- Byzova, T.V., Goldman, C.K., Pampori, N., Thomas, K.A., Bett, A., Shattil, S.J. ja Plow, E.F. 2000. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol.Cell.* 6:851-860.
- Calderwood, D.A. 2004a. Integrin activation. *J.Cell.Sci.* 117:657-666.
- Calderwood, D.A. 2004b. Talin controls integrin activation. *Biochem.Soc.Trans.* 32:434-437.
- Calderwood, D.A., Fujioka, Y., de Pereda, J.M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C.J., Liddington, R.C. ja Ginsberg, M.H. 2003. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:2272-2277.
- Calderwood, D.A. ja Ginsberg, M.H. 2003. Talin forges the links between integrins and actin. *Nat.Cell Biol.* 5:694-697.
- Calderwood, D.A., Huttenlocher, A., Kiosses, W.B., Rose, D.M., Woodside, D.G., Schwartz, M.A. ja Ginsberg, M.H. 2001. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat.Cell Biol.* 3:1060-1068.
- Calderwood, D.A., Shattil, S.J. ja Ginsberg, M.H. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J.Biol.Chem.* 275:22607-22610.
- Calderwood, D.A., Yan, B., de Pereda, J.M., Alvarez, B.G., Fujioka, Y., Liddington, R.C. ja Ginsberg, M.H. 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J.Biol.Chem.* 277:21749-21758.
- Calderwood, D.A., Zent, R., Grant, R., Rees, D.J., Hynes, R.O. ja Ginsberg, M.H. 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J.Biol.Chem.* 274:28071-28074.



- Cattelino, A., Albertinazzi, C., Bossi, M., Critchley, D.R. ja de Curtis, I. 1999. A cell-free system to study regulation of focal adhesions and of the connected actin cytoskeleton. *Mol.Biol.Cell.* 10:373-391.
- Chakarova, C., Wehnert, M.S., Uhl, K., Sakthivel, S., Vosberg, H.P., van der Ven, P.F. ja Furst, D.O. 2000. Genomic structure and fine mapping of the two human filamin gene paralogues FLNB and FLNC and comparative analysis of the filamin gene family. *Hum.Genet.* 107:597-611.
- Chang, D.D., Hoang, B.Q., Liu, J. ja Springer, T.A. 2002. Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J.Biol.Chem.* 277:8140-8145.
- Chen, M. ja Stracher, A. 1989. In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J.Biol.Chem.* 264:14282-14289.
- Chen, Y.P., O'Toole, T.E., Shipley, T., Forsyth, J., LaFlamme, S.E., Yamada, K.M., Shattil, S.J. ja Ginsberg, M.H. 1994. "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *J.Biol.Chem.* 269:18307-18310.
- Choquet, D., Felsenfeld, D.P. ja Sheetz, M.P. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell.* 88:39-48.
- Critchley, D.R. 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:133-139.
- Crowe, D.T., Chiu, H., Fong, S. ja Weissman, I.L. 1994. Regulation of the avidity of integrin alpha 4 beta 7 by the beta 7 cytoplasmic domain. *J.Biol.Chem.* 269:14411-14418.
- Cunningham, C.C. 1995. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J.Cell Biol.* 129:1589-1599.
- Datta, A., Huber, F. ja Boettiger, D. 2002. Phosphorylation of beta3 integrin controls ligand binding strength. *J.Biol.Chem.* 277:3943-3949.
- Erb, E.M., Tangemann, K., Bohrmann, B., Muller, B. ja Engel, J. 1997. Integrin alphaIIb beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry.* 36:7395-7402.
- Ezratty, E.J., Partridge, M.A. ja Gundersen, G.G. 2005. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat.Cell Biol.* 7:581-590.
- Ezzell, R.M., Kenney, D.M., Egan, S., Stossel, T.P. ja Hartwig, J.H. 1988. Localization of the domain of actin-binding protein that binds to membrane glycoprotein Ib and actin in human platelets. *J.Biol.Chem.* 263:13303-13309.
- Felding-Habermann, B., O'Toole, T.E., Smith, J.W., Fransvea, E., Ruggeri, Z.M., Ginsberg, M.H., Hughes, P.E., Pampori, N., Shattil, S.J., Saven, A. ja Mueller, B.M. 2001. Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:1853-1858.
- Fenczik, C.A., Sethi, T., Ramos, J.W., Hughes, P.E. ja Ginsberg, M.H. 1997. Complementation of dominant suppression implicates CD98 in integrin activation. *Nature.* 390:81-85.
- Fisher, P.R., Noegel, A.A., Fechheimer, M., Rivero, F., Prassler, J. ja Gerisch, G. 1997. Photosensory and thermosensory responses in Dictyostelium slugs are specifically impaired by absence of the F-actin cross-linking gelation factor (ABP-120). *Curr.Biol.* 7:889-892.
- Fox, J.W., Lamperti, E.D., Eksioglu, Y.Z., Hong, S.E., Feng, Y., Graham, D.A., Scheffer, I.E., Dobyns, W.B., Hirsch, B.A., Radtke, R.A., Berkovic, S.F., Huttenlocher, P.R. ja Walsh, C.A. 1998. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron.* 21:1315-1325.

- Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennin, D.A., Critchley, D.R. ja Huttenlocher, A. 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat.Cell Biol.* 6:977-983.
- Garcia-Alvarez, B., de Pereda, J.M., Calderwood, D.A., Ulmer, T.S., Critchley, D., Campbell, I.D., Ginsberg, M.H. ja Liddington, R.C. 2003. Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol.Cell.* 11:49-58.
- Ginsberg, M.H., Yaspan, B., Forsyth, J., Ulmer, T.S., Campbell, I.D. ja Slepak, M. 2001. A membrane-distal segment of the integrin alpha IIb cytoplasmic domain regulates integrin activation. *J.Biol.Chem.* 276:22514-22521.
- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P.A., Downey, G.P. ja McCulloch, C.A. 1998. The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J.Biol.Chem.* 273:1689-1698.
- Gorlin, J.B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T.P., Kwiatkowski, D.J. ja Hartwig, J.H. 1990. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J.Cell Biol.* 111:1089-1105.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-514.
- Hogg, N., Henderson, R., Leitinger, B., McDowall, A., Porter, J. ja Stanley, P. 2002. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol.Rev.* 186:164-171.
- Hughes, P.E., Diaz-Gonzalez, F., Leong, L., Wu, C., McDonald, J.A., Shattil, S.J. ja Ginsberg, M.H. 1996. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J.Biol.Chem.* 271:6571-6574.
- Hughes, P.E., O'Toole, T.E., Ylänne, J., Shattil, S.J. ja Ginsberg, M.H. 1995. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J.Biol.Chem.* 270:12411-12417.
- Hughes, P.E. ja Pfaff, M. 1998. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol.* 8:359-364.
- Humphries, M.J., McEwan, P.A., Barton, S.J., Buckley, P.A., Bella, J. ja Mould, A.P. 2003. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem.Sci.* 28:313-320.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Isenberg, W.M., McEver, R.P., Phillips, D.R., Shuman, M.A. ja Bainton, D.F. 1987. The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. *J.Cell Biol.* 104:1655-1663.
- Ito, T., Suzuki, A. ja Stossel, T.P. 1992. Regulation of water flow by actin-binding protein-induced actin gelatin. *Biophys.J.* 61:1301-1305.
- Jay, D., Garcia, E.J., Lara, J.E., Medina, M.A. ja de la Luz Ibarra, M. 2000. Determination of a cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the C-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Arch.Biochem.Biophys.* 377:80-84.
- Jenkins, A.L., Nannizzi-Alaimo, L., Silver, D., Sellers, J.R., Ginsberg, M.H., Law, D.A. ja Phillips, D.R. 1998. Tyrosine phosphorylation of the beta3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *J.Biol.Chem.* 273:13878-13885.
- Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D.R., Fukumoto, E. ja Sheetz, M.P. 2003. Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature.* 424:334-337.

- Johansson, M.W., Larsson, E., Luning, B., Pasquale, E.B. ja Ruoslahti, E. 1994. Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated beta 1 integrin. *J.Cell Biol.* 126:1299-1309.
- Kääpä, A., Peter, K. ja Yläne, J. 1999. Effects of mutations in the cytoplasmic domain of integrin beta(1) to talin binding and cell spreading. *Exp.Cell Res.* 250:524-534.
- Kassner, P.D. ja Hemler, M.E. 1993. Interchangeable alpha chain cytoplasmic domains play a positive role in control of cell adhesion mediated by VLA-4, a beta 1 integrin. *J.Exp.Med.* 178:649-660.
- Kassner, P.D., Kawaguchi, S. ja Hemler, M.E. 1994. Minimum alpha chain cytoplasmic tail sequence needed to support integrin-mediated adhesion. *J.Biol.Chem.* 269:19859-19867.
- Kawaguchi, S. ja Hemler, M.E. 1993. Role of the alpha subunit cytoplasmic domain in regulation of adhesive activity mediated by the integrin VLA-2. *J.Biol.Chem.* 268:16279-16285.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Yläne, J. ja Calderwood, D.A. 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol.Cell.* 21:337-347.
- Kim, M., Carman, C.V. ja Springer, T.A. 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science.* 301:1720-1725.
- Kucik, D.F., Dustin, M.L., Miller, J.M. ja Brown, E.J. 1996. Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J.Clin.Invest.* 97:2139-2144.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lambert de Rouvroit, C. ja Goffinet, A.M. 2001. Neuronal migration. *Mech.Dev.* 105:47-56.
- Laplantine, E., Vallar, L., Mann, K., Kieffer, N. ja Aumailley, M. 2000. Interaction between the cytodomains of the alpha 3 and beta 1 integrin subunits regulates remodelling of adhesion complexes on laminin. *J.Cell.Sci.* 113 ( Pt 7):1167-1176.
- Laudanna, C., Kim, J.Y., Constantin, G. ja Butcher, E. 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol.Rev.* 186:37-46.
- Law, D.A., DeGuzman, F.R., Heiser, P., Ministri-Madrid, K., Killeen, N. ja Phillips, D.R. 1999. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature.* 401:808-811.
- Lebart, M.C., Mejean, C., Casanova, D., Audemard, E., Derancourt, J., Roustan, C. ja Benyamin, Y. 1994. Characterization of the actin binding site on smooth muscle filamin. *J.Biol.Chem.* 269:4279-4284.
- Lewis, J.M. ja Schwartz, M.A. 1995. Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin beta 1 cytoplasmic domain mutants. *Mol.Biol.Cell.* 6:151-160.
- Li, M.G., Serr, M., Edwards, K., Ludmann, S., Yamamoto, D., Tilney, L.G., Field, C.M. ja Hays, T.S. 1999. Filamin is required for ring canal assembly and actin organization during Drosophila oogenesis. *J.Cell Biol.* 146:1061-1074.
- Li, R., Mitra, N., Gratkowski, H., Vilaire, G., Litvinov, R., Nagasami, C., Weisel, J.W., Lear, J.D., DeGrado, W.F. ja Bennett, J.S. 2003. Activation of integrin alphaIIb beta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science.* 300:795-798.
- Liddington, R.C. 2002. Will the real integrin please stand up? *Structure.* 10:605-607.

- Liddington, R.C. ja Ginsberg, M.H. 2002. Integrin activation takes shape. *J.Cell Biol.* 158:833-839.
- Liu, S., Calderwood, D.A. ja Ginsberg, M.H. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J.Cell.Sci.* 113 ( Pt 20):3563-3571.
- Liu, S., Thomas, S.M., Woodside, D.G., Rose, D.M., Kiosses, W.B., Pfaff, M. ja Ginsberg, M.H. 1999. Binding of paxillin to alpha4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature.* 402:676-681.
- Lu, C., Takagi, J. ja Springer, T.A. 2001. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J.Biol.Chem.* 276:14642-14648.
- Lu, C.F. ja Springer, T.A. 1997. The alpha subunit cytoplasmic domain regulates the assembly and adhesiveness of integrin lymphocyte function-associated antigen-1. *J.Immunol.* 159:268-278.
- Martel, V., Rocaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M.R. ja Albiges-Rizo, C. 2001. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J.Biol.Chem.* 276:21217-21227.
- Mastrangelo, A.M., Homan, S.M., Humphries, M.J. ja LaFlamme, S.E. 1999. Amino acid motifs required for isolated beta cytoplasmic domains to regulate 'in trans' beta1 integrin conformation and function in cell attachment. *J.Cell.Sci.* 112 ( Pt 2):217-229.
- Meyer, S.C., Sanan, D.A. ja Fox, J.E. 1998. Role of actin-binding protein in insertion of adhesion receptors into the membrane. *J.Biol.Chem.* 273:3013-3020.
- Moulder, G.L., Huang, M.M., Waterston, R.H. ja Barstead, R.J. 1996. Talin requires beta-integrin, but not vinculin, for its assembly into focal adhesion-like structures in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol.Biol.Cell.* 7:1181-1193.
- Nievers, M.G., Schaapveld, R.Q. ja Sonnenberg, A. 1999. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol.* 18:5-17.
- Norwood, F.L., Sutherland-Smith, A.J., Keep, N.H. ja Kendrick-Jones, J. 2000. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure.* 8:481-491.
- Ohta, Y. ja Hartwig, J.H. 1996. Phosphorylation of actin-binding protein 280 by growth factors is mediated by p90 ribosomal protein S6 kinase. *J.Biol.Chem.* 271:11858-11864.
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H. ja Stossel, T.P. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:2122-2128.
- O'Toole, T.E., Katagiri, Y., Faull, R.J., Peter, K., Tamura, R., Quaranta, V., Loftus, J.C., Shattil, S.J. ja Ginsberg, M.H. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J.Cell Biol.* 124:1047-1059.
- O'Toole, T.E., Ylänne, J. ja Culley, B.M. 1995. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J.Biol.Chem.* 270:8553-8558.
- Patil, S., Jedsadayanmata, A., Wencel-Drake, J.D., Wang, W., Knezevic, I. ja Lam, S.C. 1999. Identification of a talin-binding site in the integrin beta(3) subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions. The talin n-terminal head domain interacts with the membrane-proximal region of the beta(3) cytoplasmic tail. *J.Biol.Chem.* 274:28575-28583.
- Pavalko, F.M., Chen, N.X., Turner, C.H., Burr, D.B., Atkinson, S., Hsieh, Y.F., Qiu, J. ja Duncan, R.L. 1998. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am.J.Physiol.* 275:C1591-601.

- Pawson, T. ja Scott, J.D. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*. 278:2075-2080.
- Pearson, M.A., Reczek, D., Bretscher, A. ja Karplus, P.A. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*. 101:259-270.
- Peter, K. ja O'Toole, T.E. 1995. Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. *J.Exp.Med.* 181:315-326.
- Pfaff, M., Du, X. ja Ginsberg, M.H. 1999. Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *FEBS Lett.* 460:17-22.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D.J. ja Ginsberg, M.H. 1998. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J.Biol.Chem.* 273:6104-6109.
- Priddle, H., Hemmings, L., Monkley, S., Woods, A., Patel, B., Sutton, D., Dunn, G.A., Zicha, D. ja Critchley, D.R. 1998. Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *J.Cell Biol.* 142:1121-1133.
- Pudas, R., Kiema, T.R., Butler, P.J., Stewart, M. ja Yläne, J. 2005. Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure*. 13:111-119.
- Reddy, K.B., Gascard, P., Price, M.G., Negrescu, E.V. ja Fox, J.E. 1998. Identification of an interaction between the m-band protein skelemin and beta-integrin subunits. Colocalization of a skelemin-like protein with beta1- and beta3-integrins in non-muscle cells. *J.Biol.Chem.* 273:35039-35047.
- Reszka, A.A., Hayashi, Y. ja Horwitz, A.F. 1992. Identification of amino acid sequences in the integrin beta 1 cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. *J.Cell Biol.* 117:1321-1330.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T. ja Horwitz, A.R. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302:1704-1709.
- Sakai, T., Jove, R., Fassler, R. ja Mosher, D.F. 2001. Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1A integrins in transformation by v-src. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:3808-3813.
- Sampath, R., Gallagher, P.J. ja Pavalko, F.M. 1998. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J.Biol.Chem.* 273:33588-33594.
- Sarkar, S. 1999. Focal adhesions. *Curr.Biol.* 9:R428.
- Sharma, C.P., Ezzell, R.M. ja Arnaout, M.A. 1995. Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J.Immunol.* 154:3461-3470.
- Shattil, S.J., Kashiwagi, H. ja Pampori, N. 1998. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood*. 91:2645-2657.
- Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J.H. ja Springer, T.A. 2003. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*. 112:99-111.
- Sims, P.J., Ginsberg, M.H., Plow, E.F. ja Shattil, S.J. 1991. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J.Biol.Chem.* 266:7345-7352.
- Sokol, N.S. ja Cooley, L. 1999. Drosophila filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr.Biol.* 9:1221-1230.

- Stephens, G., O'Lunaigh, N., Reilly, D., Harriott, P., Walker, B., Fitzgerald, D. ja Moran, N. 1998. A sequence within the cytoplasmic tail of GpIIb independently activates platelet aggregation and thromboxane synthesis. *J.Biol.Chem.* 273:20317-20322.
- Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. ja Shapiro, S.S. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:138-145.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H. ja Calderwood, D.A. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science.* 302:103-106.
- Tohyama, Y., Katagiri, K., Pardi, R., Lu, C., Springer, T.A. ja Kinashi, T. 2003. The critical cytoplasmic regions of the alphaL/beta2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. *Mol.Biol.Cell.* 14:2570-2582.
- Towbin, H., Staehelin, T. ja Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76:4350-4354.
- Ulmer, T.S., Calderwood, D.A., Ginsberg, M.H. ja Campbell, I.D. 2003. Domain-specific interactions of talin with the membrane-proximal region of the integrin beta3 subunit. *Biochemistry.* 42:8307-8312.
- Ulmer, T.S., Yaspan, B., Ginsberg, M.H. ja Campbell, I.D. 2001. NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin alpha IIb beta 3 in aqueous solution. *Biochemistry.* 40:7498-7508.
- Vallar, L., Melchior, C., Plancon, S., Drobecq, H., Lippens, G., Regnault, V. ja Kieffer, N. 1999. Divalent cations differentially regulate integrin alphaIIb cytoplasmic tail binding to beta3 and to calcium- and integrin-binding protein. *J.Biol.Chem.* 274:17257-17266.
- van der Flier, A. ja Sonnenberg, A. 2001a. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-298.
- van der Flier, A. ja Sonnenberg, A. 2001b. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1538:99-117.
- van Kooyk, Y. ja Figdor, C.G. 2000. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:542-547.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D.J. ja Horwitz, A.R. 2005. Cell migration at a glance. *J.Cell.Sci.* 118:4917-4919.
- Viel, A. 1999. Alpha-actinin and spectrin structures: an unfolding family story. *FEBS Lett.* 460:391-394.
- Vinogradova, O., Haas, T., Plow, E.F. ja Qin, J. 2000. A structural basis for integrin activation by the cytoplasmic tail of the alpha IIb-subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:1450-1455.
- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E. ja Qin, J. 2002. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell.* 110:587-597.
- Wallach, D., Davies, P.J. ja Pastan, I. 1978. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of filamin in mammalian smooth muscle. *J.Biol.Chem.* 253:4739-4745.
- Wang, K. ja Singer, S.J. 1977. Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:2021-2025.
- Wang, Z., Leisner, T.M. ja Parise, L.V. 2003. Platelet alpha2beta1 integrin activation: contribution of ligand internalization and the alpha2-cytoplasmic domain. *Blood.* 102:1307-1315.

- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T. ja Horwitz, A.F. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6:154-161.
- Weber, C., Lu, C.F., Casasnovas, J.M. ja Springer, T.A. 1997. Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells. *J.Immunol.* 159:3968-3975.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L. ja Arnaout, M.A. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science.* 294:339-345.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Goodman, S.L. ja Arnaout, M.A. 2003. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood.* 102:1155-1159.
- Xu, W., Baribault, H. ja Adamson, E.D. 1998. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development.* 125:327-337.
- Yan, B., Calderwood, D.A., Yaspan, B. ja Ginsberg, M.H. 2001. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J.Biol.Chem.* 276:28164-28170.
- Yläñne, J., Chen, Y., O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Takada, Y. ja Ginsberg, M.H. 1993. Distinct functions of integrin alpha and beta subunit cytoplasmic domains in cell spreading and formation of focal adhesions. *J.Cell Biol.* 122:223-233.
- Yläñne, J., Huuskonen, J., O'Toole, T.E., Ginsberg, M.H., Virtanen, I. ja Gahmberg, C.G. 1995. Mutation of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. Differential effects on cell spreading, recruitment to adhesion plaques, endocytosis, and phagocytosis. *J.Biol.Chem.* 270:9550-9557.
- Zamir, E. ja Geiger, B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J.Cell.Sci.* 114:3583-3590.
- Zamir, E., Katz, B.Z., Aota, S., Yamada, K.M., Geiger, B. ja Kam, Z. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J.Cell.Sci.* 112 ( Pt 11):1655-1669.
- Zent, R., Fenczik, C.A., Calderwood, D.A., Liu, S., Dellos, M. ja Ginsberg, M.H. 2000. Class- and splice variant-specific association of CD98 with integrin beta cytoplasmic domains. *J.Biol.Chem.* 275:5059-5064.
- Zhang, W., Han, S.W., McKeel, D.W., Goate, A. ja Wu, J.Y. 1998. Interaction of presenilins with the filamin family of actin-binding proteins. *J.Neurosci.* 18:914-922.