

Ciona intestinalis integriinin α 2I-domeenin geenin kokoaminen
ja proteiinin tuottaminen

Salla Ruskamo

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Solubiologia

15.12.2006

Alkusanat

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen solubiologian osastolla vuosien 2005–2006 aikana. Tutkielman ohjaajina toimivat professori Jyrki Heino sekä filosofian maisteri Mira Tulla Turun yliopiston Biokemian ja elintarvikekemian laitokselta. Haluan kiittää professori Jyrki Heinoa mahdollisuudesta tehdä tutkielmani hänen ryhmässään.

Suuret kiitokset Miralle ohjauksesta sekä loputtomasta kannustuksesta ja kärsivällisyydestä pro gradu -projektini aikana. Lisäksi haluan kiittää Jarmo Käpylää proteiinin tuottoon liittyvistä neuvoista ja Jyväskylän yliopiston solubiologian osaston väkeä, erityisesti Arja Mansikkaviitaa, hyvistä neuvoista ja kaikenlaisesta avusta. Kiitän myös perhettäni ja ystäviäni antamastanne tuesta tämän projektin aikana.

| | |
|-------------------------------|---|
| Tekijä: | Salla Ruskamo |
| Tutkielman nimi: | <i>Ciona intestinalis</i> integriinin $\alpha 2I$ -domeenin geenin kokoaminen ja proteiinin tuottaminen |
| English title: | DNA building and protein production of <i>Ciona intestinalis</i> integrin $\alpha 2I$ domain |
| Päivämäärä: | 15.12.2006 Sivumäärä: 63+1 |
| Laitos: | Bio- ja ympäristötieteiden laitos |
| Oppiaine: | Solubiologia |
| Tutkielman ohjaaja(t): | FM Mira Tulla, Prof. Jyrki Heino |

Tiivistelmä:

Integriinit ovat heteromeerisiä, α - ja β -alalyksikoista koostuvia solukalvon adheesiomolekyylejä, jotka välittävät solun tarttumista sekä naapurisoluihin että soluväliaineen proteiineihin. Integriinit muodostavat solukalvolla solutukirangan ja soluväliaineen välisen linkin ja toimivat lisäksi signalointimolekyyleinä, jotka välittävät viestejä sekä solusta ulos että soluun sisään. Ihmisellä on 18 erilaista integriinin α -alalyksikköä ja kahdeksan β -alalyksikköä, joista muodostuu 24 heterodimeeriä. Kaikilla β -alalyksikoilla ja yhdeksällä 18 α -alalyksikosta on niin kutsuttu I-domeeni, joka on niiden pääasiallinen ligandija sitova osa. Ihmisen αI -domeenilliset integriinit voidaan jakaa ligandiensa perusteella kahteen ryhmään: leukosyyttispesifisiin integriineihin, joiden ligandeihin kuuluvat esimerkiksi solujenväliset adheesiomolekyylit (ICAM) ja komplementtijärjestelmän C3b, sekä kollageenireseptori-integriineihin, jotka sitoutuvat eri tyyppin kollageenien lisäksi muun muassa laminiiniin.

Kaikilla monisoluisilla eläimillä, sienieläimet ja polttiaiseläimet mukaan lukien, on integriinejä. Selkärangattomiin kuuluvat vaippaeläimet *Ciona intestinalis* ja *Halocynthia roretzi* -meritutet ovat kuitenkin alkeellisimpia eläimiä, joiden integriineissä on havaittu olevan αI -domeeneja. *Halocynthia* genomista on löydetty kaksi α -alalyksikköä, joista toisella on I-domeeni. *Halocynthia* αI -domeeni ilmentyy hemosyyteissä ja sen arvellaan sitoutuvan komplementtijärjestelmän C3b-fragmenttiin. *Cionalla* on viisi erilaista integriinin β - ja 11 α -alalyksikköä, joista kahdeksassa α -alalyksikkössä on I-domeeni. *Cionan* αI -domeenit eivät ole ortologisia selkärankaisten αI -domeenien kanssa. Ne kuitenkin muistuttavat selkärankaisten αI -domeeneja, sillä myös niiden on todettu laskostuvan Rossmannin taitokseksi ja sisältävän metalli-ionista riippuvaisen adheesiokohdan (MIDAS). *Cionan* $\alpha 1$ -alalyksikön I-domeenin on havaittu sitoutuvan tyyppin IX kollageeniin, mutta ei säikeitä muodostaviin kollageeneihin.

Tämän tutkimuksen tarkoitus oli selvittää integriinin I-domeenin evoluutiota *Cionan* $\alpha 2I$ -domeenin avulla. *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geeni koottiin 18 oligonukleotidista PCR-menetelmällä, siirrettiin pGEM-T Easy -välivektorin kautta pGEX-2T-vektoriin ja sekvenssoitiin. Sekvenssin virheet korjattiin QuikChange-mutageneesilla, jonka jälkeen *Ciona* $\alpha 2I$ -domeeni liitettynä pGEX-2T-vektoriin transformoitiin *Escherichia coli* -tuotokantoihin. Liukoisena *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin tuottaminen glutationi-S-transferaasi (GST) -fuusioproteiinina ei onnistunut tuotto-olosuhteiden muuntelusta huolimatta. Proteiinin tuoton ongelmat johtuivat luultavasti liukenemattomien proteiinikasumiin syntymisestä.

Avainsanat: *Ciona intestinalis*, integriini, I-domeeni

Author: Salla Ruskamo
Title of thesis: DNA building and protein production of *Ciona intestinalis* integrin $\alpha 2I$ domain
Finnish title: *Ciona intestinalis* integriinin $\alpha 2I$ -domeenin geenin kokoaminen ja proteiinin tuottaminen
Date: 15.12.2006 **Pages:** 63+1
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): MSc Mira Tulla, Prof Jyrki Heino

Abstract:

Integrins are heterodimeric transmembrane proteins that consist of α and β subunits. They mediate cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion and operate as mechanical links between the cytoskeleton and the extracellular matrix. Integrins are also essential signaling molecules that transmit signals bidirectionally across the plasma membrane. In human genome there are 18 different α subunits and eight β subunits. They assemble into 24 distinct integrin heterodimers. Half of the α subunits have inserted (I) domain. It is the main ligand binding domain of integrins. αI domain-containing human integrins can be divided in two groups. These groups are the leukocyte-specific integrins that recognize for example intercellular adhesion molecules (ICAM) and complement C3b and the collagen receptors that bind to different types of collagens and laminins.

All metazoan, including the simplest ones, have integrins. The invertebrate ascidians *Ciona intestinalis* and *Halocynthia roretzi* are the simplest animals in which αI domains have been found. *Halocynthia* has two distinct α subunits and one of them has an I domain. This I domain-containing α subunit has been observed to be expressed especially in the hemocytes and it is anticipated to serve as a complement receptor. *Ciona* has five distinct β subunits and eleven α subunits. Eight of the eleven α subunits have an I domain. Those I domain-containing α subunits are not orthologous with human I domain-containing α subunits despite many similarities. Both human and *Ciona* αI domains form Rossmann fold and have metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) on the top of the domain. The αI domain of *Ciona* has been observed to recognize type IX collagen but not fibrillar collagens.

The purpose of this study was to examine the evolution of integrin I domains with the help of *Ciona* $\alpha 2I$ domain. The gene of *Ciona* $\alpha 2I$ domain was built from 18 oligonucleotides using PCR, cloned to pGEX-2T vector, and sequenced. The mutations in the gene sequence were corrected by QuikChange mutagenesis and the pGEX-2T plasmid with the gene of *Ciona* $\alpha 2I$ domain was transformed into *Escherichia coli*. The production of soluble glutathione-S-transferase (GST) -*Ciona* $\alpha 2I$ domain fusion protein did not succeed under any conditions. The problems in protein production were probably caused by insoluble inclusion bodies formed during the protein production.

Keywords: *Ciona intestinalis*, integrin, I domain

Sisällys

| | |
|--|----|
| 1. JOHDANTO | 9 |
| 1.1. Integriinit | 9 |
| 1.1.1. Integriinin rakenne | 11 |
| 1.1.1.1. α - ja β -jalka | 11 |
| 1.1.1.2. Pallomainen pää | 12 |
| 1.1.1.3. α I-domeeni | 13 |
| 1.1.2. Integriinin aktivaatio | 15 |
| 1.1.2.1. Integriinin aktiivisuuden säätely solun sisältä | 16 |
| 1.1.2.2. Integriinin signaalinvälitys soluväliaineesta solun sisään | 17 |
| 1.2. α I-domeenillisten integriinien ligandit | 19 |
| 1.2.1. Kollageenit ja niiden tunnistaminen | 20 |
| 1.2.2. α I-domeenien sitomat komplementtijärjestelmän proteiinit | 21 |
| 1.3. Von Willebrand faktori A -tyypin domeenit | 22 |
| 1.3.1. vWA-domeenien esiintyminen ja tehtävät | 23 |
| 1.3.2. vWA-domeenien evoluutio | 24 |
| 1.4. Integriinien evoluutio | 25 |
| 1.4.1. β -alaysikön evoluutio | 26 |
| 1.4.2. α -alaysikön evoluutio | 28 |
| 1.4.3. α I-domeenin evoluutio | 29 |
| 1.4.3.1. Selkärankaisten α I-domeenit | 29 |
| 1.4.3.2. Selkärangattomien α I-domeenit | 31 |
| 1.4.3.3. <i>Ciona intestinalis</i> integriinien α I-domeenit | 32 |
| 2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS | 34 |
| 3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT | 35 |
| 3.1. Geenin kokoaminen PCR:n avulla | 35 |
| 3.1.1. PCR:n suorittaminen | 36 |
| 3.1.2. Geenin eristys agarosigeeliltä | 37 |
| 3.2. Eristetyn PCR-tuotteen päiden tekeminen tylpiksi | 37 |
| 3.3. Geenin siirtäminen pGEM-T Easy -vektoriin | 38 |
| 3.3.1. Adeniininukleotidien lisääminen insertin 3'-päihin | 38 |
| 3.3.2. Insertin ligaatio pGEM-T Easy -vektoriin | 39 |
| 3.3.3. Transformaatio | 40 |
| 3.4. PCR bakteeripesäkkeestä | 40 |
| 3.5. Plasmidin eristys ja sekvensointi | 41 |
| 3.6. Geenin kloonaaaminen pGEX-2T-vektoriin | 42 |
| 3.6.1. Insertin ja vektorin katkaisu sekä eristys agarosigeeliltä | 42 |
| 3.6.2. Ligaatio ja transformatio | 43 |
| 3.7. Kohdennettu mutageneesi | 43 |
| 3.7.1. Oligonukleotidialukkeet sekä PCR:n suorittaminen | 44 |
| 3.7.2. DpnI-katkaisu ja transformatio | 44 |
| 3.8. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin tuotto <i>E. coli</i> BL21- ja Tuner-soluissa | 45 |
| 3.8.1. Transformaatio | 45 |

| | |
|--|----|
| 3.8.2. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin tuoton optimointi | 46 |
| 3.8.3. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin tuottaminen | 47 |
| 3.8.4. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin puhdistus..... | 47 |
| 3.9. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin geenin lyhentäminen..... | 48 |
| 4. TULOKSET | 49 |
| 4.1. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin geenin kokoaminen oligonukleotideista..... | 49 |
| 4.2. Geenin siirtäminen välivektorin kautta pGEX-2T-vektoriin | 50 |
| 4.3. Mutaatioiden korjaus QuikChange-menetelmällä | 50 |
| 4.4. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin tuoton optimointi <i>E. coli</i> -tuottokannoissa | 51 |
| 4.5. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin tuottaminen ja puhdistus..... | 51 |
| 4.6. <i>Ciona</i> α 2I-domeenin geenin lyhentäminen..... | 52 |
| 5. TULOSTEN TARKASTELU..... | 53 |
| 6. LÄHTEET | 57 |
| LIITTEET | 64 |

Lyhenteet

| | |
|----------------|--|
| A | absorbanssi |
| bp | base pair, emäspari |
| BSA | bovine serum albumin, naudan seerumin albumiini |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EGF | epidermal growth factor, epidermaalinen kasvutekijä |
| ERK | externally regulated kinase, ulkoisesti säädelty kinaasi |
| FAK | fokaaliadheesiokinaasi |
| GST | glutathioni-S-transferaasi |
| ICAM | intercellular adhesion molecule, solujenvälinen adheesiomolekyyli |
| I-domeeni | inserted domain |
| IPTG | isopropyylibeta-D-tiogalaktopyranosidi |
| MIDAS | metal ion-dependent adhesion site, metalli-ionista riippuvainen adheesiokohta |
| NIF | neutrophil inhibitory factor, neutrofiilejä inhiboiva tekijä |
| PAGE | polyakryyliamidigeelielektroforeesi |
| PBS | phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos |
| SDS | sodium dodecyl sulphate, natriumdodekyylisulfaatti |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule, verisuonten soluadheesiomolekyyli |
| vWA | von Willebrand faktori A |
| vWF | von Willebrand faktori |

Aminohappojen lyhenteet

| | | |
|------------------|-----|---|
| Alaniini | Ala | A |
| Arginiini | Arg | R |
| Asparagiini | Asn | N |
| Asparagiinihappo | Asp | D |
| Fenyylialaniini | Phe | F |
| Glutamiini | Gln | Q |
| Glutamiinihappo | Glu | E |
| Glysiini | Gly | G |
| Histidiini | His | H |
| Isoleusiini | Ile | I |
| Kysteiini | Cys | C |
| Leusiini | Leu | L |
| Lysiini | Lys | K |
| Metioniini | Met | M |
| Proliniini | Pro | P |
| Seriini | Ser | S |
| Treoniini | Thr | T |
| Tryptofaani | Trp | W |
| Tyrosiini | Tyr | Y |
| Valiini | Val | |

1. JOHDANTO

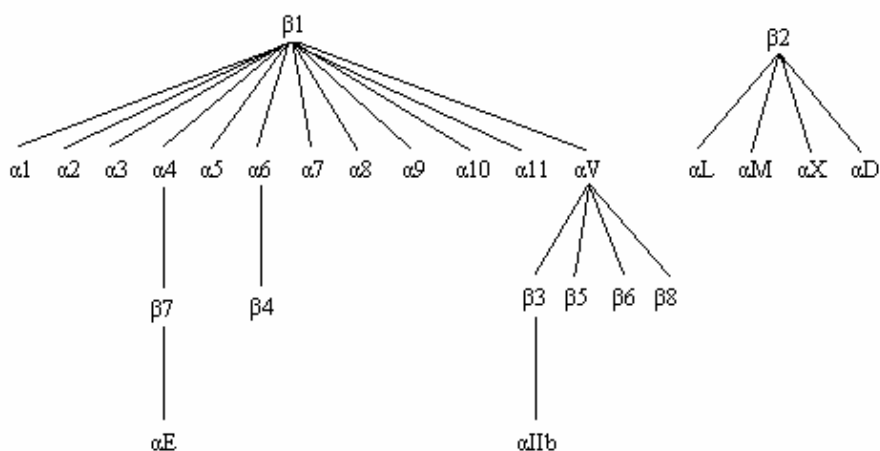
Yksisoluisten eliöiden kehittyminen monisoluisiksi edellytti solujen kykyä tarttua sekä niitä ympäröivään soluväliaineeseen että naapurisoluihin. Monisoluisien eläinten soluilla on pinnallaan erityisiä reseptoriproteiineja, joiden avulla ne kiinnittyvät ympäristöönsä ja vuorovaikuttavat sen kanssa. Tällaisia solun pinnan reseptoreita ovat esimerkiksi kadheriinit, selektiinit ja integriinit, jotka kaikki muodostavat omat laajat proteiiniperheensä.

1.1. Integriinit

Integriinit ovat heterodimeerejä: ne muodostuvat α - ja β -alayksiköistä, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa ei-kovalenttisilla sidoksilla. Molemmat alayksiköt ovat tyypin I glykosyloitua kalvoproteiineja ja sisältävät useita itsenäisesti laskostuvia domeeneja. Ihmisellä on havaittu olevan 18 erilaista α -alayksikköä ja kahdeksan β -alayksikköä, joista muodostuu 24 erilaista heterodimeeriä (ks. Kuva 1). Integriinien lukumäärä kuitenkin vaihtelee lajien välillä, esimerkiksi *Caenorhabditis elegans* -sukkulamadolla on yksi β - ja kaksi α -alayksikköä, joista muodostuu kaksi heterodimeeriä (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Vaippaeläimiin kuuluvalta suolimeritupelta (*Ciona intestinalis*) on löydetty 11 α -alayksikköä ja viisi β -alayksikköä (Ewan ym., 2005). Yleisesti alkeellisilla eläinlajeilla integriinalayksiköiden lukumäärä on pienempi kuin kehittyneemmillä lajeilla, kuten selkärangkaisilla (Hughes, 2001).

Kaikilla monisoluisien eläinten integriinien β -alayksikoilla ja osalla selkäjänteisten α -alayksikoista on niin sanottu I-domeeni (*engl. inserted domain*), joka on niiden pääasiallinen ligandia sitova osa (ks. yleiskatsaus Dickeson ja Santoro, 1998). Integriinit sitoutuvat monenlaisiin ligandeihin, joista suuri osa on soluväliaineen proteiineja kuten kollageeneja, fibronektiineja ja lamiiniineja. Lisäksi integriinien ligandeihin kuuluvat eräät solukalvon reseptorit, kuten verisuonten soluadheesiomolekyyli-1 (VCAM-1, *engl. vascular cell adhesion molecule-1*) ja solujenväliset adheesiomolekyylit (ICAM, *engl. intercellular*

adhesion molecule), immunoglobuliiniproteiiniperheen jäsenet sekä plasman proteiineja (ks. yleiskatsaus Arnaout ym., 2002). Integriinit ja niiden ligandit osallistuvat soluissa ja kudoksissa moniin tapahtumiin kuten kudosten ja elinten kehitykseen, fokaaliadheesioiden syntyyn, leukosyyttien toimintaan, veren hyytymisprosessiin ja angiogeneesiin (ks. yleiskatsaukset Ahrens ym., 2005, Danen ja Sonnenberg, 2003, Estelle ym., 2000, Serini ym., 2006). Integriinigeenien mutaatioiden ja poikkeavan ilmentymisen on todettu aiheuttavan erilaisia perinnöllisiä sairauksia sekä edesauttavan syöpäkasvaimien syntyä ja etäispesäkkeiden muodostumista (Grzesiak ja Bouvet, 2006, Hogg ja Bates, 2000, Sloan ym., 2006, Vidal ym., 1995). Lisäksi eräät patogeetit, kuten echovirus, käyttävät integriinejä reseptoreinaan tunkeutuessaan soluun (Bergelson ym., 1992).



Kuva 1 Ihmisen integriinien α - ja β -alayksiköiden muodostamat heterodimeerit (kuva muokattu Hynes, 2002 yleiskatsauksen pohjalta)

Integriinit ovat tärkeässä osassa solun kommunikoidessa ympäristönsä kanssa. Ne välittävät signaaleja sekä solusta ulos että soluun sisään (ks. yleiskatsaus Jones ja Walker, 1999). Lisäksi ne toimivat solukalvolla mekaanisena linkkinä soluväliaineen proteiinien ja solutukirangan välillä (Lee ja Jacobson, 1997, Zamir ym., 2000).

1.1.1. Integriinin rakenne

Integriiniheterodimeerin rakenne koostuu 120–180 kDa:n kokoisesta α -alaysiköstä ja 90–110 kDa:n kokoisesta β -alaysiköstä. Molempien alaysiköiden soluväliaineen puoleiset osat sisältävät lukuisia sokeritähteitä (ks. yleiskatsaus Faull ja Ginsberg, 1996). Kumpikin alaysikkö läpäisee solukalvon kerran siten, että aminohappoketjujen karboksyyliipäät jäävät sytoplasman ja aminopäät soluväliaineen puolelle solukalvoa. Integriinien uloimmat osat muodostavat heterodimeerin suuren pallomaisen pään (*engl. head*), joka vastaa ligandien sitomisesta. Päästä lähtevät kummankin alaysikön jalkaosat (*engl. leg*), jotka lävistävät solukalvon (Xiong ym., 2001). Integriinien sytoplasmiset domeenit ovat yleisesti erittäin lyhyitä, vain noin 50 aminohapon mittaisia. Ainoan poikkeuksen tekee erityisesti hemidesmosomeissa tavattava β 4-alaysikkö, jonka sytoplasmisen osa on noin 1000 aminohapon pituinen (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002).

1.1.1.1. α - ja β -jalka

β -alaysikkö muodostuu lyhyehköstä sytoplasmisesta osasta, solukalvon läpäisevästä α -heliksistä ja kahdeksasta solun ulkopuolisesta domeenista, joista alaysikön jalkaosan muodostavat β -häntädomeeni (*engl. β -tail domain*), neljä epidermaalisen kasvutekijän (EGF, *engl. epidermal growth factor*) domeenia sekä PSI-domeeni (PSI tulee sanoista pleksiinit, semaforiinit, integriinit). β -häntädomeeni sijaitsee solukalvon läpäisevän α -heliksin jälkeen ja muodostuu neljänauhaisesta β -levyrakenteesta, joka sisältää sekä samansuuntaisia että vastakkaisuuntaisia levyjä, ja yhdestä α -heliksistä (Xiong ym., 2001).

β -häntädomeenia aminohappoketjussa seuraa neljä hyvin samankaltaista EGF-domeenia, jotka ovat laskostuneet niille tyypilliseen tapaan luokan I EGF-laskoksiksi (*engl. EGF fold*) sisältäen kolme rikkisiltaa. Lisäksi EGF-domeenien välillä uskotaan olevan rikkisiltoja, ja EGF-3:n ja EGF-4:n arvellaan muodostavan sauvamaisen kahden domeenin moduulirakenteen. PSI-domeeni yhdistää jalan EGF-domeenit integriinin alaysiköt yhdistävään pääosaan (Xiong ym., 2001).

α -alaysikkö sisältää myös lyhyen sytoplasmisen osan ja kalvon lävistävän α -heliksirakenteen. α -alaysikön solun ulkoinen jalkaosa koostuu kolmesta domeenista, joista lähimpänä solukalvoa ovat niin sanotut calf-1- ja calf-2-domeenit. Kolmas domeeni on immunoglobuliinitaitokseen laskostuva thigh-domeeni (Xiong ym., 2001).

Integriinin alaysiköiden solukalvon lävistävät osat koostuvat α -helikseistä, joiden arvellaan olevan vuorovaikutuksessa keskenään. Alaysiköiden sytoplasmisten osien välillä arvellaan olevan heikkoja elektrostaattisia ja hydrofobisia vuorovaikutuksia, jotka pitävät integriinin inaktiivisessa muodossa (Vinogradova ym., 2002).

1.1.1.2. Pallomainen pää

β -alaysikön hybrididomeeni ja β I-domeeni muodostavat integriinin pään yhdessä α -alaysikön β -potkurin kanssa. β -potkuri muodostuu seitsemästä noin 60 aminohappotähteen toistojaksoista, joista muodostuu seitsemän potkurin lapaa. Yksi lapa koostuu neljästä vastakkaisuuntaisesta β -juosteesta. β -potkurissa on neljä kalsiumionin sitomiskohtaa, joista yksi on β -potkurin ja sen alla olevan thigh-domeenin välissä tehden domeenien liitoskohdan jäykemmäksi (Xiong ym., 2001). Yhdeksässä ihmisen α -alaysikössä tavattava α I-domeeni silmukoituu β -potkurista ja muodostaa osan näiden integriinien suurehkosta päästä (Lee ym., 1995).

β -alaysikön hybrididomeeni on aminohappoketjussa PSI-domeenin jatkeena ja sen tiedetään kuuluvan ryhmän I immunoglobuliinidomeeneihin. Hybrididomeeni muodostaa laajan rajapinnan siitä silmukoituvan β I-domeenin kanssa. β I-domeeni muodostaa α I-domeenin tavoin niin sanotun Rossmannin laskoksen. Se koostuu kuusinauhaisesta β -levyrakenteesta, jota ympäröi kahdeksan α -heliksiä. Keskimmäisen β -levyn päällä on metalli-ionista riippuvainen adheesiokohta (MIDAS, *engl. metal ion-dependent adhesion site*) (Xiong ym., 2001). Lisäksi β I-domeenissa on havaittu olevan kaksi muutakin metallin sitomiskohtaa, jotka sijaitsevat MIDAS:n molemmiin puolin. Nämä sitomiskohdat ovat

ADMIDAS (*engl. adjacent to metal ion-dependent adhesion site*) ja LIMBS (*engl. ligand-associated metal binding site*), joilla arvellaan olevan merkittävä rooli β I-domeenin aktiivisuuden säätelyssä (Chen ym., 2003).

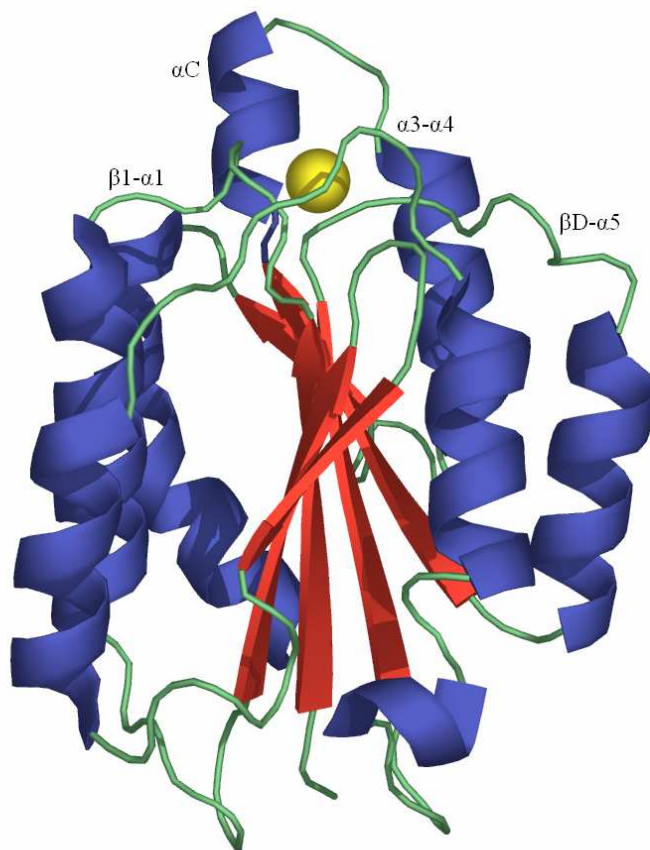
Integriinin α -alaysikön β -potkuri ja β -alaysikön β I-domeeni muodostavat suurimman alaysiköiden välisen rajapinnan, joka on jopa 1600 Å²:n kokoinen. β I-domeeni ei ole sijoittunut keskelle β -potkurirakennetta, vaan sijaitsee hieman sivussa niin, että se on vuorovaikutuksessa kuuden β -potkurin lavan kanssa. Tämä integriinin alaysiköiden yhtymäkohta muistuttaa G-proteiineihin kuuluvien G α :n ja G β :n yhtymäkohtaa (Xiong ym., 2001).

1.1.1.3. α I-domeeni

Yhdeksällä ihmisen 18:sta integriinin α -alaysiköstä on α I-domeeni, joka on noin 200 aminohappotähteen pituinen ja silmukoituu α -alaysikön β -potkurin toisen ja kolmannen lavan välistä muodostaen osan integriinin päästä. α I-domeeni, jota kutsutaan myös A-domeeniksi, laskostuu Rossmannin taitokseksi, jossa viidestä vastakkaissuuntaisesta ja yhdestä lyhyestä samansuuntaisesta β -levystä muodostuvaa β -levy-ydintä ympäröivät α -heliksit (ks. Kuva 2)(Lee ym., 1995).

Kaikkien ihmisen yhdeksän α I-domeenin rakenne on melko samankaltainen, vaikka osa α I-domeeneista on leukosyyttispesifisiä ja osa toimii solujen kollageenireseptoreina. Erityisesti β -levyjen osalta rakenne on erittäin konservoitunut, α -heliksien rakenteissa on sen sijaan havaittu jonkin verran eroavaisuuksia. Kollageeneihin sitoutuvilla α I-domeeneilla, kuten α 1I:llä ja α 2I:llä, on ylimääräinen α C-heliksi, jolla on arveltu olevan merkittävä rooli α I-domeenin sitoutuessa kollageeniin (Dickeson ym., 1999, Emsley ym., 1997, Käpylä ym., 2000).

α I-domeenissa on metalli-ionin sitoutumiskohta β -levyrakenteen päällä domeenin pinnalla. Tämä sitomiskohta sitoo erityisesti kahdenarvoisia kationeja, kuten magnesium- ja mangaani-ioneja. Kalsiumioni ei kuitenkaan suuren kokonsa takia mahdu sitoutumiskohtaan. Metallin on todettu olevan oktaedrisesti koordinoitu, jolloin se muodostaa sidokset α I-domeenin yläpinnalla oleviin aminohappoihin sekä koordinaation täydentävään vesimolekyylisiin tai ligandin aminohapon, esimerkiksi glutamaatin sivuketjuun (Emsley ym., 2000, Lee ym., 1995). Tätä sitomiskohtaa kutsutaan MIDAS:ksi (Michishita ym., 1993).



Kuva 2 Suljetussa konformaatiossa oleva ihmisen α 1 β 1-integriinin α I-domeeni, jossa magnesiumioni (keltainen) on MIDAS:ssä beta-levyjen (punainen) päällä. Silmukat, jotka muodostavat MIDAS:n, ja kollageenireseptoreille tyypillinen α C-heliksi on myös merkitty kuvaan. Kuva on tehty käyttämällä PyMol-ohjelmaa (Delano scientific LLC, San Francisco, Kalifornia, Yhdysvallat) Protein Data Bank (PDB) -tiedostosta 1PT6 (Nymalm ym., 2004).

MIDAS:n tiedetään muodostuvan kolmesta α -heliksiä ja β -levyä yhdistävästä silmukasta (*engl. loop*). β A-juosteen ja α 1-heliksin välinen silmukka sisältää erittäin konservoituneen DxSxS-sekvenssin, jossa x voi olla mikä tahansa aminohappo. Seriinien sivuketjut muodostavat suorat sidokset metalli-ionin kanssa. Lisäksi aspartaatin sivuketju, silmukasta β D- α 5, muodostaa suoran sidoksen metallin kanssa. α 3- α 4-silmukan treoniinin ja DxSxS-sekvenssin aspartaatin sivuketjut taas muodostavat sidokset metalliin vesimolekyylien välityksellä. Edellä kuvatun kaltaisessa inaktiivisessa eli niin sanotussa suljetussa tilassa olevan α I-domeenin kuudennen metalli-ionin ligandin paikan täyttää usein vesimolekyyli (Ajroud ym., 2004).

α I-domeenin aktivoituessa kaikkien kolmen MIDAS:n muodostavan silmukoiden sijainti muuttuu ja α 7-heliksi työntyy alaspäin kohti β I-domeenia. Metallioinia koordinoivat kuusi ligandia järjestäytyvät uudelleen siten, että α 3- α 4-silmukan treoniinin sivuketju muodostaa suoran sidoksen metalliin. Toisin kuin inaktiivisessa muodossa, β D- α 5-silmukan aspartaatin uskotaan aktiivisessa muodossa koordinoivan metallioinia epäsuorasti vesimolekyylin välityksellä. Tämä α I-domeenin konformaatiomuutos mahdollistaa MIDAS:n metallioinin kuudennen sidoksen muodostumisen integriinin ligandiin. Esimerkiksi α 2I-domeenin sitoutuessa kollageeniin sidos muodostuu magnesiumionin ja kollageenin glutamaatin sivuketjun välille (Emsley ym., 2000).

1.1.2. Integriinin aktivaatio

Integriinin on todettu esiintyvän soluissa niin sanottuna taipuneena (*engl. bent*) ja suorana (*engl. extended*) muotona. Lisäksi integriineillä arvellaan esiintyvän myös näiden kahden välimuotoja (*engl. intermediate*) (Takagi ym., 2002, Xiong ym., 2001). Integriini α V β 3:n rakennetutkimus paljasti, että taipuminen tapahtuu α -alalyksikön calf-1- ja thigh-domeenien välistä (*engl. genu*) sekä β -alalyksikön ensimmäisen ja toisen EGF-domeenin välistä (Xiong ym., 2001).

Taipuneen integriinin pääosa osoittaa kohti solukalvoa, mikä vaikeuttaa ligandin sitomista. Taipuneen muodon onkin useimmissa tapauksissa todettu sitovan ligandeja suoraan muotoa selvästi huonommin (Takagi ym., 2002). Viimeaikaisissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että myös taipuneen integriinin on mahdollista sitoutua ligandiin, sillä $\alpha V\beta 3$ -integriinin taipuneen muodon on havaittu sitoutuvan muun muassa fibronektiinipeptidiin (Adair ym., 2005).

Suorassa muodossa olevan integriinin β -alaysikön hybrididomeeni on kääntynyt sivulle ja sen asema βI -domeeniin nähden on muuttunut. Lisäksi βI -domeenissa on suoristumisen yhteydessä havaittu tapahtuvan samankaltaisia rakenteellisia muutoksia kuin αI -domeenissa (Mould ym., 2002). αI -domeenillisissa integriineissä β -alaysikössä tapahtuvien konformaatiomuutosten uskotaan välittyvän allosteerisesti αI -domeeniin aktivoiden sen sitomaan ligandeja (Yang ym., 2004).

1.1.2.1. Integriinin aktiivisuuden säätely solun sisältä

Integriinien konformaatiota ja ligandiaffiniteettia säädellään solun sisältä tulevien erilaisten signaalien avulla. Integriinin β -alaysikön noin 50 aminohappotähteen pituinen sytoplasmisen domeeni on tärkeässä roolissa aktivaatiossa. α -alaysikön arvellaan toimivan viestinvälityksessä lähinnä säätelijän roolissa (ks. yleiskatsaus Ginsberg ym., 2005).

Taliini on solutukirangan proteiini, jolla on keskeinen rooli integriinien aktiivisuuden säätelyssä solun sisältä käsin. Taliinin sitoutuminen, joka tapahtuu sen FERM-domeenissa olevan konservoituneen fosfotyrosiinisitoutumisdomeenin (*engl. phosphotyrosine binding domain*) välityksellä, saa integriinit aktivoitumaan. Fosfotyrosiinisitoutumisdomeeni sitoutuu integriinin β -alaysikön sytoplasmisen domeenin konservoituneeseen NPxY-motiiviin, joka muodostaa usein β -käännöksen (Calderwood ym., 2002).

Inaktiivisessa tilassa olevan integriinin sytoplasmisten osien konservoituneet α -alaysikön arginiini ja β -alaysikön aspartaatti muodostavat alaysiköt yhdistävän suolasillan, joka pitää sytoplasmiset osat lähellä toisiaan (ks. yleiskatsaus Campbell ja Ginsberg, 2004). Taliinin sitoutuminen β -alaysikön sytoplasmiseen osaan saa aikaan suolasillan katkeamisen ja siten alaysiköiden erkaantumisen toisistaan (Vinogradova ym., 2002). Taliinin sitoutuessa β -alaysikön sytoplasmisiin osiin myös alaysiköiden solukalvon lävistävien α -heliksien väliset vuorovaikutukset purkautuvat ja alaysiköiden solukalvon lävistävät osat erkanevat toisistaan. Alaysiköiden solukalvon lävistävien domeenien pakkauksessa tapahtuu myös muutoksia taliinin sitoutumisen yhteydessä, sillä kalvon sisäisten osien on havaittu työntyvän osittain ulos solukalvosta. Sytoplasmisten osien ja solukalvon lävistävien domeenien konformaatiomuutokset välittyvät allosteerisesti integriinin soluväliaineen puoleisiin osiin aktivoiden koko integriinimolekyylin. Aktivoitumisen seurauksena integriini suoristuu ja sen ligandiaffiniteetti kasvaa (Vinogradova ym., 2004).

Integriinin β -alaysikön sytoplasmiseen osaan sitoutuvan taliinin sitoutumisen arvellaan olevan viimeinen vaihe solun sisältä tapahtuvassa integriinin säätelyssä (Tadokoro ym., 2003). Taliinin sitoutumisen säätelystä ja signaalireitin aikaisemmista vaiheista sen sijaan tiedetään vielä melko vähän. Taliinin sitoutumisen säätelyyn on esitetty vaikuttavan muun muassa integriinin β -alaysikön sytoplasmisen domeenin tyrosiinitähteen fosforylaatio (Tapley ym., 1989), taliinin proteolyttinen muokkaus (Yan ym., 2001) sekä fosfatidyliinositoli-4,5-bisfosfaatin sitoutuminen taliiniin (Martel ym., 2001).

1.1.2.2. Integriinin signaalinvälitys soluväliaineesta solun sisään

Integriinit toimivat solujen aistinmolekyyleinä, jotka tunnustelevat solun ympäristöä ja välittävät siitä tietoa solun sisään. Integriinit ovat osa solun monimutkaisia viestinvälitysverkostoja, joiden avulla säädellään muun muassa solujen kasvua ja liikkumista sekä solutukirangan ja geenien ilmentymisten muutoksia. Soluväliaineessa

integrointiin sitoutuva ligandi aiheuttaa integroinissa konformaatiomuutoksen, joka etenee solukalvon läpäisevien domeenien kautta sytoplasmisiin domeeneihin aiheuttaen niiden erkanemisen. Ligandin sitoutuminen aiheuttaa myös integroinimolekyylien kerääntymisen rykelmiksi solukalvolla (*engl. clustering*) joko kalvodomeenien homo-oligomerisaation tai lateraalisen diffuusion avulla. Integroinin sytoplasmisten osien erkaneminen ja integroinien kerääntyminen rykelmäksi saavat aikaan signaalivälitysmolekyylien aktivoitumisen ja viestin kulkeutumisen eteenpäin. Viimeaikaisissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu, että integroinit muodostavat niin kutsuttuja nanoklustereita myös ilman ligandin sitoutumista (Cambi ym., 2006, Li ym., 2005, Luo ja Springer, 2006, Wiseman ym., 2004, ks. yleiskatsaus Miranti ja Brugge, 2002).

Integroinit liittävät soluväliaineen proteiinit erilaisten adapteriproteiinien kuten taliinin, α -aktiniinin ja filamiinin välityksellä solutukirangan aktiinisäikeisiin. Integroineilla on merkittävä rooli signalointimolekyyleinä sekä solutukirangan organisoinnissa että fokaaliadheesioiden, lamellipodien ja filopodien muodostumisessa (Miyamoto ym., 1995, Nobes ja Hall, 1995, Ridley ja Hall, 1992). Integroinien kerääntyminen lähelle toisiaan solukalvolla, niiden sitoutuminen soluväliaineen ligandeihinsa ja aktiinin polymerisaatio ovat tärkeässä roolissa näiden rakenteiden synnyssä. Integroinien välittämät viestit aikaansaavat erilaisten viestinvälitys- ja adapteriproteiinien kerääntymisen fokaaliadheesiorakenteisiin. Pienten GTPaasien, kuten Rho:n, Rac:in ja Cdc42:n, on havaittu indusoivan integroini-välitteisten fokaaliadheesioiden syntyä (Miyamoto ym., 1995).

Integroineilla on merkittävä rooli solusyklin etenemisen ja apoptoosin säätelyssä. Solun jakautumiseen ja sen elossa pysymiseen vaaditaan ulkoisten kasvutekijöiden lisäksi solun tarttuminen ympäristöönsä integroinien välityksellä. Kasvutekijäreseptoreiden ja integroinien on havaittu toimivan yhdessä ja käyttävän osittain samoja viestinvälitysreittejä solusyklin etenemisen säätelyssä (Bill ym., 2004). Integroinien sitoutuminen soluväliaineeseen erityisesti fokaaliadheesioissa aktivoi lukuisia solunsisäisiä signalointimolekyyliä, joista yksi merkittävimmistä on fokaaliadheesiokinaasi (FAK). FAK:n on havaittu aktivoivan erilaisten signaalireittien kautta muun muassa ulkoisesti säädellyn kinaasin (ERK, *engl.*

externally regulated kinase) ja johtaen lopulta solusyklin etenemiseen vaadittavien sykliinien D ja E aktivoitumiseen (Pugacheva ym., 2006). FAK:n on havaittu myös vaikuttavan eräiden transkriptiofaktoreiden aktiivisuuteen ja sitä kautta solusyklin etenemiseen vaikuttavien geenien ilmentymiseen (Zhao ym., 2003). Integriinien sitoutuminen soluväliaineeseen on välttämätöntä myös solusyklin myöhemmissä vaiheissa, eikä esimerkiksi sytokineesi voi tapahtua ilman integriinien välittämää signaalia (Pugacheva ym., 2006).

Sen lisäksi, että integriinien sitoutuminen soluväliaineeseen on välttämätöntä solusyklin etenemiseksi, integriinien sitoutuminen soluväliaineen proteiineihin ja siitä välittyvät viestit ehkäisevät solun ohjattua kuolemaa eli apoptoosia (Meredith ym., 1993). Integriinien kyky estää solujen apoptoottiset kuolemat perustuu lukuisten signaalireittien kuten FAK-, Ras/ERK- ja fosfatidyli-inositoli-3,4,5-trisfosfaattireittien aktivoitumiseen integriinin sitoutuessa soluväliaineeseen (Frisch ym., 1996, Khwaja ym., 1997, McFall ym., 2001). Ympäristöönsä tarttunut integriini inhiboi signaalireittien välityksellä solujen pro-apoptoottisia proteiineja, kuten kaspaseja, ja vastaavasti tehostaa anti-apoptoottisten proteiinien, kuten Bcl-2:n, ilmentymistä. Solujen irrallisuus ympäristöstään aiheuttaa integriinien ja signaalireittien välityksellä soluissa päinvastaiset reaktiot johtaen lopulta apoptoosiin (Rytömaa ym., 1999, Zhang ym., 1995).

1.2. α I-domeenillisten integriinien ligandit

Ihmisen α I-domeenillisissa integriineissä, jotka voidaan siis jakaa leukosyyttispesifiin integriineihin ja kollageenireseptori-integriineihin, α -alayksikön I-domeeni ja sen MIDAS muodostavat ensisijaisen ligandin sitoutumiskohdan. α I-domeenien lukuisten ligandien joukossa on soluväliaineen proteiineja, liukoisia proteiineja sekä solukalvon reseptoreita (ks. Taulukko 1)(Calderwood ym., 1997, Corbi ym., 1988, Shimaoka ym., 2003).

Taulukko 1 Ihmisen integriinien α I-domeenien tärkeimmät ligandit. Taulukko muokattu Nykvist, 2004 pohjalta. Lyhenteet: neutrofiilejä inhiboiva tekijä (NIF, *engl. neutrophil inhibitory factor*)

| Integriini | Ligandit |
|--------------------|--|
| $\alpha 1\beta 1$ | kollageenit I, V, VI, laminiini-1-2 |
| $\alpha 2\beta 1$ | kollageenit I, II, IV, VI, IX, XI |
| $\alpha 10\beta 1$ | kollageenit I-VI, IX, laminiini-1 |
| $\alpha 11\beta 1$ | kollageenit I, II, VI |
| $\alpha L\beta 2$ | ICAM-1, ICAM-3 |
| $\alpha M\beta 2$ | ICAM-3, ICAM-4, VCAM-1, fibrinogeeni, komplementti C3b, hepariini, NIF |
| $\alpha X\beta 2$ | ICAM-1, komplementti C3b |
| $\alpha D\beta 2$ | VCAM-1 |
| $\alpha E\beta 4$ | |
| $\alpha E\beta 7$ | E-kadheriini |

1.2.1. Kollageenit ja niiden tunnistaminen

Kollageenit muodostavat suuren 27-jäsenisen soluväliaine- ja kalvoproteiinien perheen, jonka tunnuspiirteitä ovat trimeerinen, kolmesta α -polypeptidiketjusta koostuva rakenne ja aminohapposekvenssien sisältämät glysiini-X-Y-toistot, joissa X on usein proliini ja Y hydroksiproliini. Kaikki kollageeniperheen jäsenet sisältävät vähintään yhden glysiini-X-Y-toistojaksojen mahdollistaman kolmoishelikaalisen domeenin. Kollageenit jaetaan ryhmiin ominaisuuksiensa mukaan. Tunnetuin kollageeniryhmä on tyyppin I, II, III, V, XI, XXIV ja XXVII kollageenit sisältävä säikeitä muodostavien kollageenien ryhmä. Suurimman kollageeniryhmän sen sijaan muodostavat säikeitä päällystävät kollageenit (*engl. fibril-associated collagens with interrupted triple helices*), joiden prototyyppi on tyyppin IX kollageeni. Muita kollageeniryhmiä ovat verkkoja muodostavat kollageenit, jonka tutkituin jäsen on tyvikalvojen tyyppin IV kollageeni, transmembraanikollageenit, ankkuroivia säikeitä muodostavat kollageenit (tyyppi VII) sekä multipleksiinit (ks. yleiskatsaus Ricard-Blum ja Ruggiero, 2005).

Kollageenireseptori-integriinit, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$ ja $\alpha 11\beta 1$, sitoutuvat kaikki ligandiinsa α I-domeenin yläpinnalla olevan MIDAS:n välityksellä (Emsley ym., 2000). Vaikka kaikkien näiden integriinien MIDAS:t ovat konservoituneita, niiden kyky sitoa eri

kollageeneja eroaa toisistaan (Tulla ym., 2001). Kollageenireseptorien α I-domeenille tyypillisen α C-heliksin ja muiden MIDAS:n lähellä olevien aminohappojen muodostaman kourun on arveltu vaikuttavan kollageenireseptorien ligandispesifisyyteen (Dickeson ym., 1999, Emsley ym., 2000, Käpylä ym., 2000). Lisäksi viimeaikaisten tutkimusten perusteella α C-heliksillä arvellaan olevan vaikutusta kollageenisäikeiden sitomiseen, vaikka kollageenipeptidin ei ole havaittu muodostavan sidoksia α C-heliksiin (Emsley ym., 2000, Emsley ym., 2004).

Kollageenireseptori-integriinien on havaittu tunnistavan säikeitä muodostavista kollageeneista ja tyypin IV verkkoja muodostavasta kollageenista kuuden aminohappotähteen pituisen GFOGER-tunnistuspäätteen. Lisäksi kollageenireseptorit sitoutuvat GFOGER-motiivin johdannaisiin, kuten GLOGER-, GMOGER- ja GASGER-motiiveihin. α I-domeenin MIDAS:n magnesiumionin ja kollageenissä olevan tunnistuspäätteen glutamaatin sivuketjun välille on havaittu muodostuvan sidos (Knight ym., 2000, Zhang ym., 2003). α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinit muistuttavat hyvin paljon toisiaan ja sitoutuvat kumpikin kollageenityyppeihin I-VI (Calderwood ym., 1997, Loeser, 1997, Turner ym., 1987). Nämä kollageenireseptorit sitoutuvat kuitenkin eri tyypin kollageeneihin erilaisella affiniteetilla: Esimerkiksi α 1 β 1 sitoutuu ensisijaisesti verkkoja muodostavaan tyvikalvon tyypin IV kollageeniin, kun taas α 2 β 1:n on todettu sitoutuvan parhaiten säikeitä muodostavaan tyypin I kollageeniin. α I-domeeneilla tehtyjen mittausten perusteella voidaan todeta, että α 10I-domeeni muistuttaa ligandien sitomisprofiililtaan α 1I-domeenia, kun taas α 11I-domeenin on todettu muistuttavan α 2I-domeenia (Tulla ym., 2001, Zhang ym., 2003).

1.2.2. α I-domeenien sitomat komplementtijärjestelmän proteiinit

Komplementtijärjestelmä toimii osana sekä synnynnäistä että hankittua immunitettä, joissa sillä on merkittävä rooli vieraiden patogeenien tunnistuksessa ja fagosytoosissa. Komplementtijärjestelmä koostuu lukuisista verenkierrosta ja kudosten proteiineista, jotka muodostavat monimutkaisen, toisiaan aktivoivien proteiinien reaktiketjun.

Komplementtijärjestelmän tiedetään aktivoituvan kolmea eri reittiä: klassista, vaihtoehtoista ja lektiinireittiä. Kaikki edellä mainitut reitit johtavat komplementtijärjestelmän keskeisen proteiinin, komplementti C3:n aktivoitumiseen, joka pilkotaan C3a- ja C3b-fragmenteiksi. C3:n pilkkomisen jälkeen aktivaatioreitit etenevät samalla tavoin johtaen lopulta MAC:n muodostumiseen (ks. yleiskatsaus Seelen ym., 2005). α M β 2- ja α X β 2-integriinien on havaittu sitoutuvan komplementtijärjestelmän C3b:hen α I-domeeniensa välityksellä ja näin ollen toimivan komplementtireseptoreina (Bilslund ym., 1994, Ueda ym., 1994).

Modernin komplementtijärjestelmän uskotaan kehittyneen vasta leuallisten selkärankaisten kehittymisen yhteydessä (Nonaka, 2001). Alkukantaisemmilla jälkisuissa, kuten meritupilla, on kuitenkin havaittu olevan niin kutsuttu primitiivinen komplementtijärjestelmä, joka sisältää useita modernin komplementtijärjestelmän tavoin toimivia komponentteja, esimerkiksi komplementti C3:n (Nonaka ym., 1999). Primitiivinen komplementtijärjestelmä toimii osana synnynäistä immuunipuolustusta ja sen aktivoituminen tapahtuu vaihtoehtoista reittiä tai lektiinireittiä käyttäen (ks. yleiskatsaus Smith ym., 1999). Meritupilla komplementtijärjestelmän on arveltu tehostavan mikrobien fagocytoosia komplementti C3:n avulla (Nonaka ym., 1999). *Halocynthia roretzi* -meritupen genomista on löydetty integriinin α -alayksikkö, joka selkärankaisten komplementtireseptorien tavoin sisältää I-domeenin. Tämän α HR1-alayksikön, joka on ortologinen *Ciona intestinalis* -meritupen I-domeenillisten α -alayksiköiden kanssa, on havaittu ilmentyvän hemosyyteissä ja sen arvellaan sitoutuvan C3b-komplementtiin ja toimivan siten primitiivisen komplementtijärjestelmän reseptorina (Ewan ym., 2005, Miyazawa ym., 2001).

1.3. Von Willebrand faktori A -tyypin domeenit

Von Willebrand faktori A -tyypin (vWA) domeenit muodostavat laajan homologisten domeenien superperheen, jonka tunnetuimpia jäseniä ovat integriinien I-domeenit (ks. yleiskatsaus Colombatti ja Bonaldo, 1991). vWA-domeenit laskostuvat tyypillisesti

Rossmannin taitokseksi, jossa β -levyä ympäröivät α -heliksit (Huizinga ym., 1997, Lee ym., 1995). Ihmisen genomista on löydetty kaikkiaan 86 proteiinia, jotka sisältävät yhteensä 134 vWA-domeenia. vWA-domeenien levinneisyyttä eliökunnassa kuvaa hyvin se, että niitä tiedetään olevan sekä bakteerien ja arkkieliöiden että eukaryoottien proteiineissa (ks. yleiskatsaus Whittaker ja Hynes, 2002).

1.3.1. vWA-domeenien esiintyminen ja tehtävät

Ensimmäiset vWA-domeenit löydettiin veriplasman glykoproteiinista nimeltä von Willebrand faktori (vWF), joka välittää verihiutaleiden tarttumista verisuonten seinämien säikeitä muodostaviin kollageeneihin verisuonien vaurioituessa (Ruggeri, 1997). Von Willebrand faktori sisältää kolme A-tyyppin domeenia, jotka on nimetty A1-, A2- ja A3-domeeneiksi (Sadler ym., 1985). vWF A3-domeenin tiedetään sitoutuvan säikeitä muodostaviin tyyppin I ja III kollageeneihin (Cruz ym., 1995, Lankhof ym., 1996). vWF A3-domeeni sisältää integriinien I-domeenien MIDAS:ta muistuttavan rakenteen, jonka uskotaan kuitenkin olevan epätäydellinen eikä sen arvella pystyvän koordinoimaan metallionia kuten I-domeenit (Huizinga ym., 1997). vWF A3-domeeni sitoutuu kollageeniin mekanismilla, joka eroaa integriinin I-domeenin tavasta sitoa kollageeneja. vWF A3-domeenin sitoutuminen kollageeniin on metalli-ionista riippumatonta ja sitoutumiskohdan arvellaan olevan domeenin etupinnalla. Domeenin etupinnalla olevat positiivisesti varautuneet aminohappotähteet muodostavat tasaisen pinnan, johon kollageenin arvellaan sitoutuvan heikkojen vuorovaikutusten avulla (Nishida ym., 2003, Romijn ym., 2003).

vWA-domeenit osallistuvat moniin eri tehtäviin soluissa ja kudoksissa. vWA-domeeneja on havaittu olevan sekä solunsisäisissä proteiineissa että soluväliaineen proteiineissa. Solunsisäisten vWA-proteiinien arvellaan olevan vanhimpia, koska niitä on löydetty bakteerien ohella sekä sienistä että kasvi- ja eläinkunnan jäseniltä. Solunsisäisten vWA-proteiinien tehtävät vaihtelevat: niiden tiedetään osallistuvan transkriptioon, DNA:n

korjaukseen ja kalvokuljetukseen (Ponting ym., 1999, ks. yleiskatsaus Whittaker ja Hynes, 2002).

Suurin osa eukaryoottien vWA-domeeneista on löydetty soluväliaineen proteiineista, jotka osallistuvat muun muassa immuunijärjestelmän ja verihiutaleiden toimintaan sekä solujen tarttumiseen ympäristöönsä (Bentley, 1986, Ignatius ym., 1990, Koller ym., 1989, Pytela, 1988, Sadler ym., 1985). Suuri osa ihmisen soluväliaineen proteiinien vWA-domeeneista on kollageeneissa, joista on löydetty 57 ihmisen 134 vWA-domeenista (ks. yleiskatsaus Whittaker ja Hynes, 2002).

1.3.2. vWA-domeenien evoluutio

Suurin osa prokaryoottien vWA-domeeneista toimii osana solunsisäisiä proteiineja, mutta bakteereilla myös joidenkin eritettävien proteiinien ja kalvoproteiinien on havaittu sisältävän vWA-domeeneja. vWA-domeenien ei uskota olevan välttämättömiä prokaryoottien olemassaololle, sillä niitä ei ole kaikilla bakteereilla. Prokaryooteilla esiintyvistä vWA-proteiineista suurin osa ei ole ortologisia eukaryoottien vWA-proteiinien kanssa. Osasta sekä bakteerien että arkkieliöiden genomeista tunnistetuista vWA-domeeneista on kuitenkin löydetty selvää homologiaa eukaryoottien vWA-domeenien kanssa. Prokaryoottien vWA-proteiinien, jotka muistuttavat eukaryoottien proteiineja, arvellaan siirtyneen eukaryooteista prokaryooteille lateraalisten geenin siirtymisten seurauksena (Ponting ym., 1999, ks. yleiskatsaus Whittaker ja Hynes, 2002).

Kasvien ja bakteerien viherhiukkaset sisältävät fotosynteesiin osallistuvia magnesium- ja kobolttikelataaseja, joissa on vWA-domeeni. Kelataasien olemassaolo on elintärkeää sekä yhteyttävälle bakteereille että kasveille. Ne muistuttavat erittäin paljon toisiaan, minkä vuoksi magnesiumkelataasien arvellaan siirtyneen prokaryooteilta eukaryooteille viherhiukkasten endosymbioosin yhteydessä lateraalisen geenin siirtymänä (Ponting ym., 1999, ks. yleiskatsaus Whittaker ja Hynes, 2002).

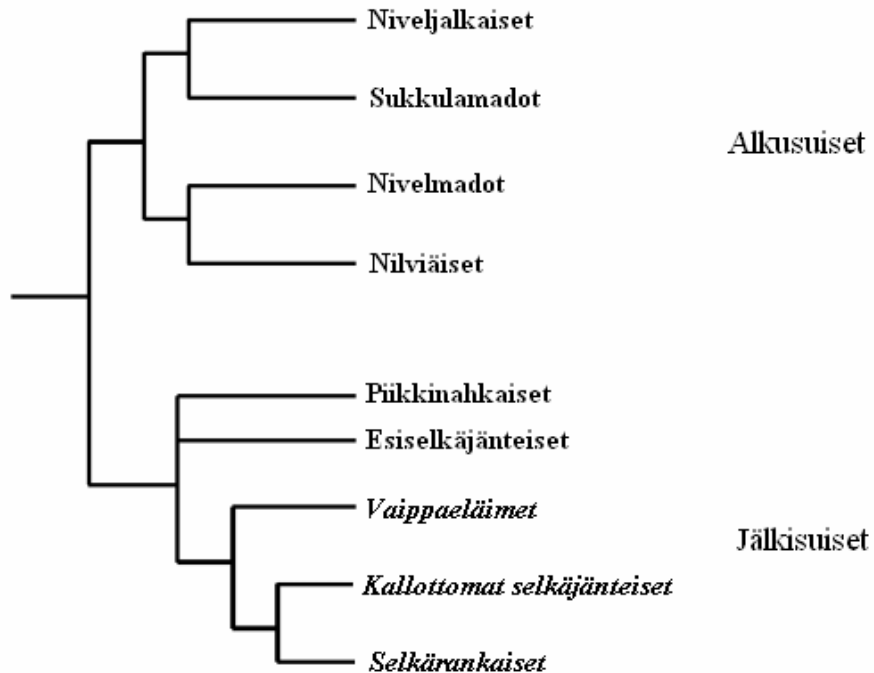
vWA-domeenin uskotaan kehittyneen alkeellisessä eukaryootissa Rossmannin taitoksesta, sillä kaikki *Saccharomyces cerevisiae* -leivinihiivan ja *Drosophila melanogaster* -banaanikärpäsen vWA-domeenit ovat ortologisia ihmisen ja hiiren vWA-domeenien kanssa. Myös useat *Arabidopsis thaliana* -lituruohon vWA-domeenit kuuluvat tähän samaan ortologisten proteiinidomeenien ryhmään. Ensimmäisten vWA-domeenien uskotaan toimineen solunsisäisten proteiinien osana. Kasveissa ja sienissä tämä solunsisäisten vWA-proteiinien perhe on huomattavasti laajentunut ja nykyäänkin kaikki niiden vWA-domeenilliset proteiinit ovat solun sisällä toimivia proteiineja (ks. yleiskatsaus Whittaker ja Hynes, 2002).

Eläimillä vWA-domeenit toimivat enimmäkseen soluväliaineen proteiineissa ja osallistuvat proteiinien sitoutumiseen ympäristöönsä (Colombatti ja Bonaldo, 1991). Kaikilla monisoluisilla eläimillä (*Metazoa*) on vWA-domeeneja. vWA-domeeneihin kuuluvia integriinien β I-domeeneja ja hemisentiinejä on löydetty kaikista monisoluisista eläimistä, mikä viittaa niiden kehittyneen heti ensimmäisten monisoluisien eläinten kehityttyä (Hughes, 2001, ks. yleiskatsaukset Hutter ym., 2000, Whittaker ja Hynes, 2002). Suuri osa monisoluisien eläinten vWA-domeenin sisältävistä proteiineista on kuitenkin kehittynyt vasta selkäjänteisten historiallisessa esimuodossa, sillä niitä ei ole löydetty alkukantaisemmista eläimistä kuten sukkulamadosta (Huhtala ym., 2005, Miyazawa ym., 2001, ks. yleiskatsaus Whittaker ja Hynes, 2002).

1.4. Integriinien evoluutio

Integriinejä on havaittu olevan kaikilla monisoluisilla eläimillä. Sekä kaikilta kaksikytkisiltä eläimiltä (*Bilateria*) että alkeellisimpien monisoluisien, kuten sienieläinten (*Porifera*) ja polttiaiseläinten (*Cnidaria*), genomeista on löydetty niitä koodittavia alueita (ks. Kuva 3). Sen sijaan prokaryooteilla, kasveilla ja sienillä ei uskota olevan integriinejä solukalvoillaan (ks. yleiskatsaus Burke, 1999). Integriinien levinneisyys monisoluisien eläinten keskuudessa antaa viitteitä niiden merkittävästä roolista solujen tarttuessa ympäristöönsä ja

muodostaessa yhä suurempia ja monimutkaisempia kokonaisuuksia, kuten kudoksia ja elimiä.



Kuva 3 Kaksikylykisten eläinten suhteita kuvaava puu, jossa selkäjänteiset on merkitty *kursiivilla*. Kaikilla kuvassa näkyvien pääjaksojen eläimillä on kahdenlaisia integriinejä: laminiini- ja RGD-reseptoreita, sillä integriinit kehittyivät jo jossakin varhaisessa monisoluisessa eläimessä. α I-domeenilliset integriinit kehittyivät vasta jossakin varhaisessa selkäjänteisessä (Hughes, 2001, Huhtala ym., 2005). Kuva on muokattu Dehal ym., 2002 -artikkelin pohjalta.

1.4.1. β -alaysikön evoluutio

Selkärankaisten β -alaysiköt jakautuvat fylogeneettisen analyysin perusteella kolmeen ryhmään. β 1-ryhmään kuuluvat β 1-alaysikön lisäksi β 2- ja β 7-alaysiköt. Tämä ryhmä sisältää alaysiköitä muun muassa pallokalalta (*Takifugu rubripes*), hiireltä (*Mus musculus*) ja ihmiseltä, mikä viittaa näiden alaysiköiden ortologisuuteen (Hughes, 2001, Huhtala ym., 2005). Pallokalen genomista on löydetty kuitenkin vain β 1-alaysikkö, jonka arvellaan sen vuoksi monistuneen vasta luukalojen erkaantumisen jälkeen (Hughes, 2001, Huhtala ym., 2005). Viimeaikaisissa tutkimuksissa on havaittu, että β 1-alaysiköiden ryhmään sijoittuu

myös selkäjänteisiin vaippaeläimiin kuuluvan *Ciona intestinalis* -suolimeritupen genomista löydetty β 1-alayksikkö, jonka myös todettiin olevan ortologinen ihmisten β 1-ryhmän alayksiköiden kanssa (Ewan ym., 2005).

β 3-alayksiköiden ryhmään kuuluvat β 3:n lisäksi β 5-, β 6- ja β 8-alayksiköt. *Xenopus tropicalis* -kynsisammakolta on löydetty vain β 3-alayksikön geeni, mutta pallokalalla on havaittu olevan kaikki ihmisen β -alayksiköitä vastaavat geenit. Fylogeneettisissä analyyseissä yhdestäkään selkärangattomasta ei ole löytynyt integriinin β -alayksiköitä, jotka olisivat ortologisia tämän ryhmän alayksiköiden kanssa (Hughes, 2001).

β 4-alayksiköt, joilla on suurehko sytoplasminen domeeni, muodostavat oman haaransa fylogeneettisessä puussa. Tähän ryhmään kuuluvia alayksiköitä on löydetty useilta selkärangaisilta, kuten pallokalalta, hiireltä ja ihmiseltä (Hughes, 2001, Huhtala ym., 2005). Lisäksi suolimeritupen β 5-alayksikön on havaittu kuuluvan tähän ortologisten β 4-alayksiköiden ryhmään (Ewan ym., 2005).

Pääsääntöisesti, suolimeritupen β 1- ja β 5-alayksikköjä lukuun ottamatta, tähän asti tutkitut selkärangattomien β -alayksiköt muodostavat fylogeneettisessä puussa oman haaransa. Tähän selkärangattomien ryhmään kuuluvat muun muassa molemmat niveljalkaisiin kuuluvan banaanikärpäsen (*Drosophila melanogaster*) β -alayksiköt ja sukkulamadon (*Caenorhabditis elegans*) yksi β -alayksikkö. Sen lisäksi vaippaeläimiin kuuluvien *Halocynthia* β -alayksiköiden ja *Cionan* neljän β -alayksikön on havaittu sijoittuvan tähän selkärangattomien β -alayksiköiden ryhmään, jonka jäsenet eivät ole ortologisia selkärankaisten β -alayksiköiden kanssa, eli niillä ei uskota olevan yhteistä kantamuotoa selkärankaisten β -alayksiköiden kanssa. Selkärankaisten β -alayksiköiden kantamuodon arvellaan kehittyneen vasta jälkisuisten (*Deuterostomata*) ja alkusuisten (*Protostomata*) erkaantumisen jälkeen, sillä yhdenkään alkusuisiin kuuluvan lajin genomista ei ole löydetty β -alayksiköitä, jotka olisivat ortologisia selkärankaisten β -alayksiköiden kanssa (Ewan ym., 2005, Huhtala ym., 2005).

1.4.2. α -alaysikön evoluutio

Integriinin α -alaysiköt muodostavat fylogeneettisen analyysin mukaan viisi eri ryhmää, joista yhden ryhmän alaysiköillä on I-domeeni. I-domeenittomat α -alaysiköt jaetaan banaanikärpäsestä (*Drosophila melanogaster*) löydettyjen alaysiköiden mukaan kolmeen ryhmään, joita ovat α PS1, α PS2 ja α PS3. Sen lisäksi ainoastaan selkärankaisilta löydetty α 4- ja α 9-alaysiköt muodostavat fylogeneettisessä puussa oman haaransa (Hughes, 2001, Huhtala ym., 2005).

Banaanikärpäsen α PS1-alaysikön mukaan nimetyn ryhmän tiedetään toimivan soluissa laminiinireseptoreina (Sonnenberg, 1993). Siihen kuuluvat banaanikärpäsen α PS1-alaysikön ja selkärankaisten α 3- α 6- ja α 7-alaysiköiden lisäksi muun muassa *Caenorhabditis elegans* -sukkulamadon α 2-alaysikkö, minkä vuoksi α PS1-ryhmän α -alaysiköiden arvellaan erkaantuneen muista integriinin α -alaysiköistä jo ennen alkusuisten, esimerkiksi hyönteisten, erkaantumista jälkisuisista. Lisäksi fylogeneettisestä puusta voidaan päätellä selkärankaisten α 3-alaysikön erkaantuneen ensin, mitä seurasi α 6- ja α 7-alaysiköiden erkaantuminen. Sekä pallokalan (*Takifugu rubripes*) että kynsisammakon (*Xenopus tropicalis*) genomeista on löydetty kaikki kolme selkärankaisille tyypillistä α PS1-ryhmään kuuluvaa alaysikköä, mikä viittaa siihen, että alaysiköt erkanivat toisistaan jo ennen luukalojen ja sammakkoeläinten erkaantumista omiksi ryhmikseen (Hughes, 2001, Huhtala ym., 2005).

α PS2-ryhmän alaysiköitä on löydetty banaanikärpäsen lisäksi muun muassa *Geodia cydonium* -sienieläimen, *Caenorhabditis elegans* -sukkulamadon, *Cionan* ja *Halocynthia* genomeista sekä selkärankaisilta. Tähän ryhmään kuuluvat selkärankaisten α 5-, α 8-, α V- ja α IIB-alaysiköt, joiden tiedetään tunnistavan soluväliaineen proteiinien arginiini-glysiini-aspartaatti (RGD) -aminohapposekvenssin (ks. yleiskatsaus Sonnenberg, 1993). α PS2-ryhmän alaysiköistä α IIB:n arvellaan erkaantuneen ensimmäisenä, muiden alaysiköiden erkaantumisjärjestyttä ei tähänastisten tutkimusten perusteella pystytä määrittelemään (Hughes, 2001).

Banaanikärpäsien α PS3-alayksikön mukaan nimetty ryhmä sisältää α PS3:n lisäksi vain kaksi muuta banaani-kärpäsien α -alayksikköä: α PS4:n ja α PS5:n. Tämä viittaa siihen, että kyseinen geeni monistui banaani-kärpäsien genomissa, mutta katosi kokonaan tarpeettomana muilta eläinlajeilta (Hughes, 2001).

On selvää, että integriinit kehittyivät vastaamaan solun tarpeisiin kiinnittyä ympäristöönsä monisoluisissa eläimissä. α -alayksiköiden fylogeneettisen analyysin perusteella pystytään päättämään, että jossakin alkukantaisessa monisoluisessa eläimessä kehittyi kaksi ligandeiltaan erilaista α -alayksikköä. Toinen pystyi sitoutumaan soluväliaineen proteiineihin RGD-sekvenssin välityksellä ja toinen toimi reseptorina laminiineille. Nämä kaksi alayksikköä monistuivat evoluution edetessä muodostaen kaksi fylogeneettisesti erillistä ryhmää α -alayksiköitä: laminiini-reseptorit ja RGD-reseptorit (ks. yleiskatsaus Hynes ja Zhao, 2000).

1.4.3. α I-domeenin evoluutio

Kaikkien tähän asti tutkittujen selkärankaisten I-domeenilliset α -alayksiköt voidaan luokitella ihmisen I-domeenillisten α -alayksiköiden kanssa samaan ryhmään muodostaen ortologisen ryhmän. Ihmisen I-domeenilliset α -alayksiköt jakautuvat fylogeneettisessä analyysissä kahteen alaryhmään: kollageenireseptoreihin, johon kuuluvat α 1-, α 2-, α 10- ja α 11-alayksiköt, ja vain leukosyyteissä esiintyviin α -alayksiköihin. Leukosyyttispesifisten alayksiköiden haaran fylogeneettisessä puussa muodostavat α M, α L, α X ja α D. Lisäksi melko lähelle tämän ryhmän alayksiköitä luokitellaan myös I-domeenin sisältävä α E-alayksikkö (Hughes, 2001).

1.4.3.1. Selkärankaisten α I-domeenit

Luukaloihin kuuluvan *Takifugu rubripes* -pallokalan genomista löytyvät kaikki ihmisen kollageenireseptoreita vastaavat α -alayksikön geenit. Lisäksi pallokalalla α 10- ja α 11-

alayksiköt ovat monistuneet kahdeksi kappaleeksi. Pallokalan α I-domeenien MIDAS ja sitä ympäröivän alueen sekvenssit sekä α C-heliksi muistuttavat huomattavasti ihmisen kollageenireseptorin vastaavia sekvenssejä. Sen vuoksi arvellaan, että myös pallokalan α 1- ja α 2I-domeenit sekä molemmat kopiot α 10- ja α 11-alayksiköiden I-domeeneista sitoutuvat kollageeneihin samalla mekanismilla kuin ihmisen kollageenireseptori-integriinit (Huhtala ym., 2005).

Samaan kollageenireseptorien ryhmään sijoittuvat fylogeneettisessä analyysissä myös muun muassa *Xenopus tropicalis* -kynsisammakon α 11-alayksikkö, kanan (*Gallus gallus*) α 1-alayksikkö sekä hiiren (*Mus musculus*) α 2-, α 10- ja α 11-alayksiköt. Selkärankaisten kollageenireseptori-integriinien α -alayksiköiden ortologisuus antaa viitteitä siitä, että integriinien kollageenin tunnistamis- ja sitomismekanismit ovat konservoituneita selkärankaisten kesken ja että tämä mekanismi kehittyi yhteisessä kantamuodossa jo ennen luukalojen erkaantumista nelijalkaisista (*Tetrapoda*) (Huhtala ym., 2005).

Leukosyyttispesifiset α -alayksiköt, jotka sisältävät I-domeenin, ovat merkittävässä roolissa immuunijärjestelmän toiminnassa. Niiden tiedetään toimivan reseptoreina muun muassa komplemettijärjestelmän C3b:lle ja ICAM:lle (Dickeson ja Santoro, 1998). Kaikki selkärankaisten genomeista löydetty leukosyyttispesifiset I-domeenilliset α -alayksiköt voidaan luokitella fylogeneettisessä analyysissä samaan ortologiseen ryhmään. Luukaloihin kuuluvan pallokalan (*Takifugu rubripes*) genomista kuitenkin puuttuvat kokonaan sekä leukosyyttispesifiset α -alayksiköt että niiden kanssa heterodimeerin muodostava β 2-alayksikkö. Toisen luukalan, karpin (*Cyprinus carpio*), genomista on kuitenkin löydetty ihmisen leukosyyttispesifisten α -alayksiköiden ortologeja. Lisäksi esimerkiksi kynsisammakon (*Xenopus tropicalis*) ja hiiren (*Mus musculus*) genomit sisältävät leukosyyttispesifisten integriinien α -alayksiköitä, jotka kuuluvat myös tähän samaan haaraan fylogeneettisessä puussa. Näiden tutkimusten perusteella arvellaan, että leukosyyttispesifiset α -alayksiköt erkanivat kollageenireseptorien alayksiköiden ryhmästä jo ennen luukalojen erkaantumista nelijalkaisista. Lisäksi voidaan olettaa, että luukudosta omaavien selkärankaisten yhteisellä kantamuodolla oli sekä β 2-alayksikkö että vähintään

yksi leukosyyttispesifinen α -alayksikkö, joka myöhemmin monistui. Joidenkin selkärankaisten lajien genomeista nämä immuunijärjestelmässä toimivat integriinit ovat kuitenkin myöhemmin kadonneet (Fujiki ym., 2001, Huhtala ym., 2005).

1.4.3.2. Selkärangattomien α I-domeenit

Yhdenkään alkusuisiin kuuluvan lajin genomista ei ole löydetty I-domeenillista α -alayksikköä, josta voidaan päätellä I-domeenillisten α -alayksiköiden kehittyneen vasta alkusuisten ja jälkisuisten erkaannuttua noin 600 miljoonaa vuotta sitten. Sen sijaan selkäjänteisiin vaippaeläinten (*Urochordata*) alajaksoon kuuluvien *Cionan* ja *Halocynthian* genomeista on löydetty α -alayksiköitä, joilla on I-domeeni. Meritupprien I-domeenilliset α -alayksiköt muodostavat kuitenkin fylogeneettisessä analyysissä oman erillisen ryhmänsä, eivätkä ne ole ortologisia selkärankaisten I-domeenillisten α -alayksiköiden kanssa. Selkärangattomat meritupet ovat mielenkiintoisessa asemassa, sillä ne ovat tähän asti tutkituista eläimistä alkukantaisimpia, joiden integriineissä on havaittu olevan α I-domeeni (Ewan ym., 2005, Miyazawa ym., 2001).

Halocynthian ainoa I-domeenillinen α -alayksikkö, α Hr1 sisältää 209 aminohappoa pitkän I-domeenin, joka, kuten selkärankaisten α -alayksiköissäkin, silmukoituu β -potkurin toisen ja kolmannen lavan välistä. α Hr1-alayksikkö sisältää myös konservoituneen MIDAS:n. Tutkimusten mukaan α Hr1-alayksikkö ilmentyy erityisesti *Halocynthian* fagosytoottisissa verisoluissa, minkä vuoksi sen uskotaan olevan osa immuunijärjestelmää. Meritupprien primitiivisen komplementtijärjestelmän on havaittu toimivan samansuuntaisesti kuin ihmisen komplementtijärjestelmä ja α Hr1-alayksikön arvellaan toimivan tämän reaktioketjun osana sitoutumalla komplementtijärjestelmän C3b-fragmenttiin (Miyazawa ym., 2001, Nonaka ja Azumi, 1999).

1.4.3.3. *Ciona intestinalis* integriinien α I-domeenit

Ciona intestinalis eli suolimerituppi on vaippaeläimiin kuuluva selkäjänneinen, jonka genomista on löydetty kahdeksan integriinin α -alaysikköä, jotka sisältävät I-domeenin. Nämä kahdeksan *Cionan* α -alaysikköä muodostavat fylogeneettisessä analyysissä yhdessä *Halocynthia* α I-domeenin kanssa oman selkärankaisten alaysiköistä erillisen haaransa. *Cionan* I-domeenillisistä α -alaysiköistä ainakin neljän uskotaan olevan syntynyt äskettäin geenien monistumisen seurauksena. *Cionan* α I-domeenillisten alaysiköiden on havaittu ilmentyvän erityisesti verisoluissa, mikä viittaa niiden mahdolliseen rooliin immuunijärjestelmän osana (Ewan ym., 2005, Huhtala ym., 2005).

Cionan α I-domeenit silmukoituvat selkärankaisten α I-domeenien tavoin β -potkurin toisen ja kolmannen lavan välistä ja laskostuvat Rossmannin taitokseksi. Myös *Cionan* α I-domeenit sisältävät MIDAS:n, jonka aminohappojen on todettu olevan konservoituneita kaikissa *Cionan* α I-domeeneissa α 5I-domeenia lukuun ottamatta. α 5I-domeenissa konservoituneen DxSxS-sekvenssin toinen seriinitähde on korvautunut treoniinilla (Ewan ym., 2005).

Cionan α I-domeeneista on havaittu puuttuvan selkärankaisten kollageenireseptoreina toimiville α I-domeeneille tyypillinen α C-heliksi, joka ei kuitenkaan ole välttämätön kollageenien sitomisessa (Dickeson ym., 1999, Emsley ym., 2000, Käpylä ym., 2000). α C-heliksi puuttuu myös selkärankaisten leukosyyttispesifisiltä α I-domeeneilta. *Cionan* α I-domeenien β E-levyn ja α 6-heliksin välinen silmukka, joka selkärankaisten kollageenireseptoreina toimivilla α I-domeeneilla laskostuu α C-heliksiksi, on yhdeksän tai kymmenen aminohappotähdettä lyhyempi kuin kollageenireseptoreilla. Lyhyytensä vuoksi silmukka ei voi laskostua α -heliksiksi (Tulla ym. käsikirjoitus).

Ciona α II-domeenin on havaittu sitoutuvan tyypin IX kollageeniin, jota tavataan säikeitä muodostavien kollageenien pinnalla (Tulla ym. käsikirjoitus). Tyypin IX kollageeni poikkeaa muista tutkituista kollageenireseptori α I-domeenien tunnistamista kollageeneista,

sillä siitä ei ole löydetty yleisesti tunnettuja tunnistusmotiiveja kuten GFOGER-motiivia tai sen johdannaisia, joiden välityksellä α I-domeenit yleensä sitoutuvat kollageeneihin (Käpylä ym., 2004). Huomattavaa on, että *Cionan* genomista on löydetty ihmisen kollageenityyppiä IX vastaava geeni ja proteiinin on todettu muistuttavan huomattavasti ihmisen tyypin IX kollageenia (Vizzini ym., 2002).

Cionan α 1I-domeenin sitoutuminen tyypin IX kollageeniin on metalli-ionista riippumatonta (Tulla ym. käsikirjoitus). Ihmisen kollageenireseptori-integriinin α I-domeenien tiedetään sitoutuvan tyypin IX kollageeniin eri mekanismilla kuin säikeitä muodostaviin kollageeneihin (Käpylä ym., 2004). *Cionan* α 1I-domeenin tyypin IX kollageenin sitomismekanismi poikkeaa kuitenkin myös ihmisen α I-domeenien tavasta sitoa tyypin IX kollageenia, sillä ihmisen α I-domeenien ja tyypin IX kollageenin sitoutuminen vaatii metalli-ionin läsnäolon (Käpylä ym., 2004, Tulla ym. käsikirjoitus).

Ciona integriinin α 1I-domeenin ei ole havaittu sitoutuvan ihmisen tyypin I-III säikeitä muodostaviin kollageeneihin eikä tyvikalvossa esiintyvään tyypin IV kollageeniin, vaikka esimerkiksi tyypin IV kollageenia vastaavat genit on löydetty myös *Cionan* genomista. *Cionan* α 1I-domeeni ei sitoudu kollageenien GFOGER-motiivin tai sen johdannaisiin, eikä *Cionan* α 1I-domeeni myöskään sisällä selkärankaisten kollageenireseptori-integriineistä löydettyjä α I-domeenien konservoituneita aminohappotähteitä, jotka muodostavat sidokset kollageenien tunnistussekvenssien aminohappojen kanssa (Tulla ym. käsikirjoitus).

2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Ciona intestinalis -suolimerituppi on yhdessä *Halocynthia roretzi* -meritupen kanssa alkeellisimpia eläimiä, joiden integriinien α -alaysiköissä on havaittu olevan I-domeeni. *Halocynthian* ainoan I-domeenillisen α -alaysikön (α Hr1) arvellaan toimivan komplementtiresptorina ja sitoutuvan C3b komplementtiin (Miyazawa ym., 2001). *Cionan* genomista on löydetty kahdeksan α I-domeenillista alaysikköä, jotka eivät kuitenkaan ole ortologisia ihmisten α I-domeenillisten alaysiköiden kanssa (Ewan ym., 2005). Ryhmämme aikaisemmissa tutkimuksissa on havaittu, että *Cionan* α 1I-domeeni sitoutuu metalli-ionista riippumattomalla tavalla tyypin IX kollageeniin mutta ei esimerkiksi tyypin I ja IV kollageeneihin (Tulla ym. käsikirjoitus).

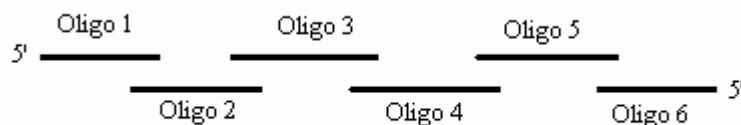
Tämän tutkimuksen tarkoitus oli selvittää *Cionan* integriini α 2I-domeenin (ci0100149446) mahdollisia ligandeja kokoamalla geeni 18 oligonukleotidista polymeerasiketjureaktiota käyttäen ja kloonata se proteiinin tuottoa varten pGEX-2T-vektoriin. Geenisekvenssin oikeellisuuden varmistamisen jälkeen *Cionan* α 2I-domeenia oli tarkoitus tuottaa glutationi-S-transferaasi (GST) -fuusioproteiinina *Escherichia coli* -bakteerituotokannassa. Proteiinin puhdistus tehtiin affiniteettikromatografialla GST-sefaroosipylväässä ja puhtauden arvioinnissa käytettiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesia (SDS-PAGE).

Tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää tunnettujen I-domeenien ligandien sitoutumista tuotettuun *Ciona* α 2I-domeeniin kiinteäfaasisitoumiskokeilla käyttäen europium-leimattua GST-vasta-ainetta ja aikaerotteista fluoresenssia. Tavoitteena oli tutkia eri tyypin kollageenien, kuten tyyppien I, II, III, IV ja IX sekä laminiinin ja C3b-komplementin sitoutumista *Cionan* α 2I-domeeniin.

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1. Geenin kokoaminen PCR:n avulla

Cionan integriinin nukleotidisekvenssin (Ci0100149446) pohjalta suunniteltiin 18 oligonukleotidia (oligonukleotidit 1-18), joista muodostuu koko $\alpha 2I$ -domeenin 687 emäsparin pituinen geeni (sekvenssi liitteenä). Oligonukleotidien suunnittelu tehtiin DNA Builder -tietokoneohjelman (<http://www.evolvingcode.net/codon/#dnabuilder>) avulla ja sen suoritti Jarmo Käpylä. Oligonukleotidien kumpaankin päähän suunniteltiin restriktioentsyymille leikkauskohta, joiden avulla geeni pystytään liittämään plasmidiin. Koska *E. coli* -bakteerilla on omanlaisensa siirtäjä-RNA-molekyylit, kodonit muutettiin *E. coli* kodoneja vastaaviksi, siten että aminohappojärjestys säilyi ennallaan, mutta proteiinin tuotto onnistuisi paremmin.



Kuva 4 Osittain sekvensseiltään päällekkäisistä 18 oligonukleotideista koottiin PCR:n avulla kokonainen geeni.

Oligonukleotidien (Oligomer, Helsinki, Suomi) sekvenssien päällekkäisyys (ks. Kuva 4) mahdollistaa geenin kokoamisen PCR:n avulla DNA Building -menetelmää käyttäen, sillä oligonukleotidit pariutuvat komplementaaristen osien kohdalta reaktion aikana, kun lämpötila lasketaan 50 °C:een. Reaktioon lisättävä *Taq*-polymeraasi täyttää puuttuvat DNA-juosteen osat kaksijuosteiseksi pitenemisvaiheen aikana. Geenin kokoaminen suoritettiin kahdessa osassa siten, että ensimmäisellä PCR-kierroksella koottiin geenin alkuosa oligonukleotideista 1-9 ja loppuosa oligonukleotideista 10–18 eri putkissa, minkä jälkeen näiden PCR-tuotteet yhdistettiin toisella kierroksella yhdeksi kokopitkäksi DNA-juosteeksi.

3.1.1. PCR:n suorittaminen

Ensimmäisen kierroksen PCR-reagenssit:

| | |
|--|--------------|
| <i>Taq</i> -polymeraasi (5 U/ μ l)(Fermentas, Burlington, Ontario, Kanada) | 0,5 μ l |
| dNTP-seos (2 mM) | 10,0 μ l |
| <i>Taq</i> :in kymmenkertainen puskuri ilman MgCl ₂ (Fermentas) | 5,0 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas) | 3,0 μ l |
| Oligonukleotidiseos 1-9 /10-18 (25 μ M; 2,778 μ M kutakin) | 2,0 μ l |
| H ₂ O | 29,5 μ l |
| Yhteensä: | 50 μ l |

Toisen kierroksen PCR-reagenssit:

| | |
|--|--------------|
| <i>Taq</i> -polymeraasi | 0,5 μ l |
| dNTP-seos (2 mM) | 0,0 μ l |
| <i>Taq</i> :in kymmenkertainen puskuri ilman MgCl ₂ | 3,3 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2,0 μ l |
| 1. kierroksen tuote reaktiosta oligonukleotideilla 1-9 | 8,0 μ l |
| 1. kierroksen tuote reaktiosta oligonukleotideilla 10-18 | 8,0 μ l |
| Oligonukleotidi 1 (50 μ M) | 1,0 μ l |
| Oligonukleotidi 18 (50 μ M) | 1,0 μ l |
| H ₂ O | 16,2 μ l |
| Yhteensä: | 50 μ l |

Kolmannen kierroksen PCR-reagenssit:

| | |
|--|--------------|
| <i>Taq</i> -polymeraasi | 0,5 μ l |
| dNTP-seos (2 mM) | 10,0 μ l |
| <i>Taq</i> :in kymmenkertainen puskuri ilman MgCl ₂ | 3,0 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3,0 μ l |
| Oligonukleotidi 1 (50 μ M) | 1,0 μ l |
| Oligonukleotidi 18 (50 μ M) | 1,0 μ l |

| | |
|-----------------------------|----------|
| Toisen kierroksen PCR-tuote | 1,25 µl |
| H ₂ O | 28,25 µl |
| Yhteensä: | 50 µl |

PCR-ohjelma:

94 °C 1 min; 50 °C 1,5 min; 72 °C 1 min

Sykli toistettiin 30 kertaa.

Kaikki PCR:t tehtiin PCR Sprint -laitteella (Hybaid, Hemel Hempstead, Iso-Britannia).

3.1.2. Geenin eristys agarosigeeliltä

PCR:ien toimivuus tarkistettiin ajamalla toisen ja kolmannen kierroksen PCR-tuotteet agarosigeelillä, jonka agarosipitoisuus oli 1 g/100 ml ja puskurina käytettiin tris-asetattietyyleenidiaminitetraetikkahappopuskuria. Lisäksi geeliin lisättiin 0,5 µg/ml etidiumbromidia. Geelijaio suoritettiin Mini-sub Cell GT -ajolaitteella (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat) 100 voltin jännitteellä noin tunnissa. Näytteeseen lisättiin näytepuskuri (Fermentas) ennen geelin kaivoihin pipetoimista. PCR-tuotteen emäsparien lukumäärä pääteltiin GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus -kokostandardin (Fermentas) avulla. Noin 700 emäsparin pituinen PCR-tuote eristettiin geeliltä ja puhdistettiin UltraFree-DA-pylväässä (Millipore, Billerica, Massachusetts, Yhdysvallat) valmistajan ohjeen mukaisesti.

3.2. Eristetyn PCR-tuotteen päiden tekeminen tylpiksi

Kootun geenin päät tehtiin tylpiksi PCR:ää käyttäen, jotta sen liittäminen pGEM-T Easy -vektoriin onnistuisi. Reaktiossa käytettiin *Pfu*-polymeraasia (Promega, Madison, Wisconsin, Yhdysvallat), jolla on 3' → 5' -oikolukuaktiivisuus. Alukkeina reaktiossa käytettiin geenin kokoamisessa käytettyjä 5'-pään ja 3'-pään oligonukleotideja (numerot 1 ja 18) ja templaattina noin 700 emäsparin pituista kolmannen PCR-kierroksen tuotetta.

PCR-reagenssit:

| | |
|---|-------|
| <i>Pfu</i> :n kymmenkertainen puskuri | 5 µl |
| dNTP-seos (2 mM) | 10 µl |
| 5' aluke (50 mM) | 1 µl |
| 3' aluke (50 mM) | 1 µl |
| Templaatti-DNA | 3 µl |
| H ₂ O | 29 µl |
| <i>Pfu</i> -polymeraasi (3 U/µl)(Promega) | 1 µl |
| Yhteensä: | 50 µl |

PCR-ohjelma:

94 °C 5 min, 1 sykli
 94 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 1 min, 30 sykliä
 72 °C 10 min, 1 sykli

3.3. Geenin siirtäminen pGEM-T Easy -vektoriin

pGem-T Easy (Promega) on kaksijuosteinen plasmidivektori, joka on linearisoitu. Sen 5'-päissä on yksijuosteiset ylimääräisistä tyymiinimäksen sisältävistä nukleotideista koostuvat hännät. Kun insertti-DNA:n 3'-päihin vastaavasti lisätään adeniinimäksen sisältäviä nukleotideja, pGEM-T Easy -vektori ja insertti voidaan liittää toisiinsa komplementaaristen alueiden ja ligaasientsyymien avulla.

3.3.1. Adeniininukleotidien lisääminen insertin 3'-päihin

Taq-polymeraasi lisää kaksijuosteisen DNA-juosteen 3'-pään adeniinimäksen sisältäviä nukleotideja reaktiossa, jossa ei tarvita templaattijuostetta. Nukleotidien lisäämiseen tarvitaan *Taq*-polymeraasin ja dATP:n lisäksi kaksijuosteinen DNA-molekyyli, jonka päät ovat tylpät.

Reaktioseos:

| | |
|---|--------|
| Tylppöpäinen insertti-DNA | 150 µl |
| dATP (100 mM) | 4 µl |
| H ₂ O | 6 µl |
| <i>Taq</i> :in 10-kertainen puskuri ilman MgCl ₂ | 20 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 16 µl |
| <i>Taq</i> -polymeraasi | 4 µl |
| Yhteensä: | 200 µl |

Reaktio suoritettiin +72 °C:ssa tunnin aikana.

3.3.2. Insertin ligoatio pGEM-T Easy -vektoriin

Insertti, jonka tylppiin päihin oli lisätty adeniininukleotidejä, liitettiin pGEM-T Easy -vektoriin ligoatioreaktiossa.

Reaktioseos:

| | |
|--|-------|
| Nopea kaksinkertainen T4 DNA -ligaasipuskuri (Promega) | 5 µl |
| pGEM-T Easy -vektori (50 ng) (Promega) | 1 µl |
| Insertti-DNA | 1 µl |
| T4 DNA-ligaasi (3 U/µl) (Promega) | 1 µl |
| H ₂ O | 2 µl |
| Yhteensä: | 10 µl |

Ligaatioseosta pidettiin ensin +25 °C:ssa 30 minuuttia ja sen jälkeen +4 °C:ssa 16 tuntia.

3.3.3. Transformaatio

Transformaatioissa käytettiin 20 µl kompetentteja *E. coli* JM109-soluja (Promega) ja plasmidi-DNA:na käytettiin 2 µl pGEM-T Easy -vektoria, johon oli ligoitu oligonukleotideista koottu *Clonan* integriinin $\alpha 2$ I-domeeni. Bakteerisolut sulatettiin jäähauteella, minkä jälkeen ligaatioseos ja solut pipetoitiin esijäähdytettyihin putkiin. Seoksen annettiin olla jäähauteella 20 minuuttia, minkä jälkeen soluille annettiin 45 sekunnin lämpöshokki (+42 °C). Lämpöshokin jälkeen soluja jäähdytettiin kaksi minuuttia. Sen jälkeen soluille annettiin 950 µl SOC-mediumia (2 % tryptoni; 0,5 % hiivauute; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM glukoosi). Solujen annettiin toipua 1,5 tuntia ravistelijassa (250 rpm) +37 °C:ssa.

Toipumisen jälkeen *E. coli* -solut maljattiin Luria-Bertani medium -maljalle, joka sisälsi ampisilliinia 100 µg/ml, ja annettiin kasvaa +37 °C:ssa 16 tunnin ajan. Lisäksi maljalle oli levitetty 100 µl 100 mM isopropyylibeta-D-tiogalaktopyranosidia (IPTG) ja 50 µl Blue-Gal-reagenssia (20 mg/ml), jotka mahdollistavat sini-valkoselektion pesäkkeiden seulonnassa. IPTG on laktoosianalogi, joka sitoutuu *lac*-repressoriin ja inhiboi sitä induoiden *lacZ*-geenin ilmentymistä. Toimiessaan *lacZ*-geeni tuottaa β-galaktosidaasia, joka pilkkoo Blue-Gal-reagenssin muodostaen maljalle sinisen sakan. pGEM-T Easy -vektori on katkaistu *lacZ*-geenin keskeltä, jolloin insertti-DNA katkaisee geenin ja estää siten sen toiminnan, mikäli ligaatio on onnistunut. Bakteeripesäkkeen värin perusteella pystytään siis erottamaan ne pesäkkeet, joiden solut sisältävät plasmidin, joissa on insertti.

3.4. PCR bakteeripesäkkeestä

Pesäke-PCR:llä seulottiin maljalla kasvavista bakteeripesäkkeistä ne, joissa oli haluttu geeni. PCR:ään poimittiin transformaatiomaljalta vaaleita bakteeripesäkkeitä ja alukkeina käytettiin 5'-pään (1) ja 3'-pään (18) oligonukleotideja.

Reaktioseos:

| | |
|--|--------|
| <i>Taq</i> :in kymmenkertainen puskuri ilman MgCl ₂ | 2 µl |
| dNTP-seos (2 mM) | 5 µl |
| 5' aluke (50 mM) | 0,5 µl |
| 3' aluke (50 mM) | 0,5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2,5 µl |
| H ₂ O | 8,0 µl |
| <i>Taq</i> -polymeraasi | 0,5 µl |
| Bakteeripesäke | 1 |
| Yhteensä: | 20 µl |

Bakteeripesäke siirrettiin ensin maljalta pieneen määrään fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS, *engl. phosphate buffered saline*) siirrostussilmukan avulla. Sen jälkeen PCR-reagenssit pipetoitiin jäähauteella putkeen, johon lisättiin bakteereja PBS:stä.

Pesäke-PCR-ohjelma:

95 °C 5 min, 1 sykli
 95 °C 30 s; 52 °C 30 s; 72 °C 45 s, 30 sykliä
 72 °C 10 min, 1 sykli

Pesäke-PCR:n tulos tarkistettiin agarosigeelielektroforeesin avulla kuten kohdassa 3.1.3.

3.5. Plasmidin eristys ja sekvensointi

Plasmidi eristettiin JM109-bakteeripesäkkeestä, jonka bakteereilla pesäke-PCR:n mukaan oli *Ciona* α2I-domeenin geeni plasmidissaan. Pesäkkeen bakteereja kasvatettiin aluksi 4 ml:ssa Luria-Bertani-mediumia, johon oli lisätty ampisilliinia (100 µg/ml), +37 °C:ssa ravistelijassa (250 rpm) yön yli, minkä jälkeen plasmidi eristettiin käyttämällä QIAprep®

Spin Miniprep -pakettia (Qiagen, Hilden Germany). Eristys tehtiin valmistajan ohjeen mukaan.

Eristetystä plasmidista sekvensoitiin *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geeni, jota verrattiin suunniteltuun nukleotidisekvenssiin. Sekvensoinnissa käytettiin SP6 ja T7-alukkeita ja sekvensoinnin suoritti laboratoriomestari Eila Korhonen.

3.6. Geenin kloonaminen pGEX-2T-vektoriin

Ciona $\alpha 2I$ -domeenin geeni kloonattiin pGEX-2T-vektoriin (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, New York, Yhdysvallat). pGEX-2T-vektorissa on tac-promoottorin säätelyn alaisena GST-geeni ja heti sen jälkeen restriktiokatkaisukohtat muun muassa EcoR1 ja BamH1 -restriktioentsyymeille, minkä vuoksi I-domeenin geeni voidaan liittää plasmidiin siten, että I-domeeni on mahdollista tuottaa GST-fuusioproteiinina.

3.6.1. Insertin ja vektorin katkaisu sekä eristys agarosigeeliltä

Koska geenin kokoamiseen tarvittavia oligonukleotideja suunniteltaessa *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geenin 5'-päähen suunniteltiin BamHI-katkaisukohta (5'-GGATCC-3') ja 3'-päähen EcoRI-katkaisukohta (5'-GAATTC-3'), voitiin edellä mainittuja restriktioentsyymejä käyttää katkaisemaan geeni irti pGEM-T Easy -plasmidista.

Reaktioseos:

| | |
|--|-------------|
| Multicore kymmenkertainen puskuri (Promega) | 3 μ l |
| EcoRI (10 U/ μ l)(Promega) | 2 μ l |
| BamHI (10 U/ μ l)(Promega) | 2 μ l |
| Naudan seerumin albumiini (BSA, <i>engl. bovine serum albumin</i>) (10 mg/ml)(Promega) | 0,3 μ l |
| DNA (pGEX-2T-vektori/insertti) | 20 μ l |

| | |
|------------------|--------|
| H ₂ O | 2,7 µl |
| Yhteensä: | 30 µl |

Katkaisu suoritettiin +37 °C:ssa kahdessa tunnissa.

Katkaistut DNA:t ajettiin agarosigeelille ja geeliltä eristettiin katkennut *Ciona* α2I-domeeni (noin 700 emäsparia) ja pGEX-2T-vektori. Agarosigeelielektroforeesi ja eristys tehtiin kuten kohdassa 3.1.3. Sekä insertti- (77 µg/ml) että vektoriliuoksen (50 µg/ml) DNA-konsentraatiot mitattiin GeneQuant -laitteella (Pharmacia, Uppsala, Ruotsi) käyttämällä 260 nm aallonpituutta.

3.6.2. Ligaatio ja transformaatio

Ligaatiossa insertti eli *Ciona* α2I-domeenin geeni ja pGEX-2T-vektori liitettiin toisiinsa käyttämällä DNA-ligaasientsyymiä. Ligaatiossa käytettiin 100 ng vektoria, 43 ng inserttiä, 1 µl T4 DNA -ligaasia, 1 µl kymmenkertaista ligaatiopuskuria (Promega) sekä vettä. Ligaatio suoritettiin +15 °C:ssa 16 tunnissa. Ligaatiotuote transformoitiin *E. coli* JM109-soluihin kuten kohdassa 3.3.3 ja niistä eristettiin plasmidi-DNA kuten kohdassa 3.5.

3.7. Kohdennettu mutageneesi

Kohdennettu mutageneesi tehtiin sekvenssissä havaittujen mutaatioiden korjaamiseksi PCR:n avulla QuikChange-menetelmää käyttäen. Menetelmä perustuu oligonukleotidialukkeisiin, jotka poikkeavat templaatti-DNA:sta, saaden aikaan halutun mutaation. PCR:ssä käytetään *Pfu*-polymeraasia, jolla on 3'→5' oikolukuaktiivisuus. *Pfu* irtoaa +68 °C:ssa plasmidi-DNA:sta yhden täyden kierroksen jälkeen eli syntetisoituaan siitä yhden kopion. PCR:n jälkeen reaktiotuote katkaistiin DpnI-restriktioendonukleasilla, joka pilkkoo vain metyloitua DNA:ta. DpnI-entsyymien katkaisukohta on 5'-G^{Me}ATC-3', jonka

adeniinimäs on metyloitu. Vain parentaalinen eli templaatti-DNA on metyloitu, joten DpnI-digestion jälkeen jäljelle jää vain vasta syntetisoitu metyloimaton eli mutatoitu DNA.

3.7.1. Oligonukleotidialukkeet sekä PCR:n suorittaminen

Kootun geenin mutaatioiden korjaamiseen QuikChange-menetelmällä käytettiin kahdeksaa oligonukleotidialukeparia (Oligomer; Thermo, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat), jotka olivat 18–29 nukleotidia pitkiä.

PCR-reaktioseos:

| | |
|---------------------------------------|-------|
| H ₂ O | 30 µl |
| <i>Pfu</i> :n kymmenkertainen puskuri | 5 µl |
| dNTP-seos (2 mM) | 5 µl |
| Mutaatioaluke (forw) (20 µM) | 4 µl |
| Mutaatioaluke (rev) (20 µM) | 4 µl |
| Templaatti-DNA | 1 µl |
| <i>Pfu</i> -polymeraasi (3 U/µl) | 1 µl |
| Yhteensä: | 50 µl |

PCR-ohjelma:

95 °C 2 min 1 sykli

95 °C 30 s; 48 °C 1 min; 68 °C 15 min 20 sykliä

3.7.2. DpnI-katkaisu ja transformaatio

DpnI-katkaisun reaktioseokseen pipetoitiin 10 µl PCR-tuotetta ja 1 µl DpnI-restriktioentsyymiä (10 U/µl)(Promega). Seosta pidettiin +37 °C:ssa 1-2 tuntia. Katkaisun jälkeen plasmidi transformoitiin *E. coli* JM109-soluihin, joita kasvatettiin plasmidin eristystä varten kuten edellä. Mutaatioiden korjauksen jälkeen geeni sekvensoitiin uudelleen

nukleotidisekvenssin oikeellisuuden varmistamiseksi. Sekvensointi teetettiin Turun yliopiston lääketieteellisen genetiikan osaston sekvensointipalvelussa.

3.8. *Ciona* α 2I-domeenin tuotto *E. coli* BL21- ja Tuner-soluissa

Cionan integriinin α 2I-domeenin tuottamiseen GST:n kanssa fuusioproteiinina käytettiin *E. coli* -bakteerien BL21- ja Tuner-kantoja, jotka ovat erityisesti proteiinituottoon soveltuvia solukantoja.

3.8.1. Transformaatio

BL21- ja Tuner-soluja kasvatettiin 16 tuntia 4 ml:ssa 2xYT-mediumia (Sambrook ym., 1989) +37 °C:ssa ravistelijassa (250 rpm). Sen jälkeen kasvatus laajennettiin 50 ml:ksi ja kasvatusta jatkettiin kunnes liuoksen absorbanssi 600 nm:n aallonpituudella (A_{600}) mitattuna oli noin 0,5, jonka jälkeen solut sentrifugoitiin pohjaan Heraeus Megafuge 1.0R -sentrifuugilla (2500 x g, 10–15 min, +4 °). Solut suspensoitiin jäällä 5 ml:an kylmää TSS-puskuria (PEG 0.2 %, DMSO 0.01 %, MgCl₂ 10 mM).

BL21- ja Tuner-soluihin transformoitiin sekvensoitu pGEX-2T-plasmidi, joka sisälsi *Ciona* α 2I-domeenin geenin. Transformaatioissa käytettiin 1 ml soluja ja 3 μ l (143 ng/ μ l) plasmidia, joita pidettiin jäähauteella 45 minuuttia. Jäähdytetyille soluille annettiin kahden minuutin lämpöshokki +42 °C:ssa, jonka jälkeen soluja jäähdytettiin hetki jäällä. 150 μ l soluja siirrettiin 900 μ l:an SOC-mediumia ja annettiin kasvaa tunti +37 °C ravistelijassa (250 rpm). Tämän jälkeen solut sentrifugoitiin pohjalle ja suspensoitiin 100 μ l:an SOC-mediumia. Solut maljattiin Luria-Bertani-maljoille, joissa oli ampisilliinia 100 μ g/ml, ja annettiin kasvaa 16 tuntia +37 °C:ssa.

3.8.2. *Ciona* α 2I-domeenin tuoton optimointi

Ciona α 2I-domeenin tuottamista BL21- ja Tuner-tuottokannoissa testattiin ensin eri klooneilla 2 ml:n kasvatuksilla 2xYT-mediumissa, jossa ampicilliinia 100 μ g/ml, jota kasvatettiin +37 °C:ssa ravistelijassa (250 rpm) kunnes absorbanssi 600 oli noin 0,8. Sen jälkeen solujen proteiinin tuottoa indusoitiin 0,1 mM, 0,4 mM tai 1 mM IPTG:llä ja soluja kasvatettiin ravistelijassa kaksi tuntia. Solut saatiin erilleen kasvatusmediumista sentrifugoimalla niitä Centrifuge 5415C -sentrifuugilla (Eppendorf, Hampuri, Saksa) (13000 x g) viiden sekunnin ajan, jonka jälkeen soluja säilytettiin -70 °C:ssa.

GST-*Ciona* α 2I-domeeni -fuusioproteiinin puhdistus aloitettiin suspensoimalla jäähauteella solut 300 μ l:an kylmää PBS:ää, jonka jälkeen solut rikottiin sonikaattorilla (Branson Sonic Power. Co., Danbury, Connecticut, Yhdysvallat) käyttämällä mikrokärkeä ja sonikointiohjelmaa, jossa sonikoidaan yhden sekunnin ajan 30 %:n teholla ja sen jälkeen pidetään sekunnin tauko toistaen yhteensä minuutin ajan. Sonikoinnin jälkeen proteiinit eroteltiin solun muista osista sentrifugoimalla viiden minuutin ajan Centrifuge 5415C -sentrifuugilla (13000 x g) +4 °C:ssa. Supernatanttiin lisättiin 20 μ l 50 % glutathionisefaroosia (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences) ja sekoitettiin viiden minuutin +25 °C:ssa. Sefaroosia pestiin kolme kertaa kylmällä PBS:llä, jonka jälkeen GST eluoiitiin irti pylvästä PBS:än tehdyllä 30 mM pelkistetyllä glutationilla (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Yhdysvallat) sentrifugoimalla viisi minuuttia.

Puhdistuksen jälkeen proteiininäytteitä, joihin oli lisätty β -merkaptoetanolia sisältävää näytenäytteenä, keitettiin viisi minuuttia ja ajettiin SDS-PAGE Phast System -geelin ajolaitetta (Pharmacia) käyttäen. Geelielektroforeesissa käytettiin kaupallisia PhastGel gradienttigeelejä (8-25 %) (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Ruotsi) ja PhastGel SDS Buffer strips -puskereita (GE Healthcare Bio-Sciences). Geeli värjättiin Phast System -laitteella käyttäen PhastGel Blue R -väriainetta (Pharmacia).

3.8.3. *Ciona* α 2I-domeenin tuottaminen

Ciona α 2I-domeenin tuottamista varten BL21-/ Tuner-soluja kasvatettiin 16 tuntia viidessä millilitrassa 2xYT-mediumissa +37 °C:ssa ravistelijassa (250 rpm), jonka jälkeen kasvatus laajennettiin 200–500 ml:an 2xYT-mediumia. Soluja kasvatettiin kunnes A_{600} oli 0,5; 0,6; 0,8 tai 1, jonka jälkeen bakteerien proteiinituotantoa indusoiitiin 10 minuutin jäähauteella jäädyttämisen jälkeen 0,4 mM IPTG:llä ja kasvatusta jatkettiin 2-5 tuntia tai 16 tuntia. Indusoinnin aikana kasvatuspulloja pidettiin ravistelijassa (200 rpm) +18 °C:ssa, +25 °C:ssa, +30 °C:ssa tai +37 °C:ssa. Tuoton päätteeksi solut sentrifugoitiin (Sorvall RC5, GSA-roottori, 5000 x g, 5 min, +4 °C) ja säilytettiin -70 °C:ssa. Ennen indusointia ja tuoton päätteeksi kasvatuksesta otettiin 1 ml:n SDS-PAGE-näyte, jonka solut sentrifugoitiin pohjaan ja suspensoitiin 200 μ l:an β -merkaptotetanolia sisältävään näytepuskuriin.

3.8.4. *Ciona* α 2I-domeenin puhdistus

Pakastetut solut suspensoitiin jäähauteella kylmään PBS:än 50 μ l/ml kasvatusmediumia ja sonikoitiin edellä mainitulla ohjelmalla. Rikottujen solujen päälle laitettiin 20 % Triton X-100:a niin, että loppukonsentraatio oli 1 % ja sekoitettiin 30 minuuttia +4 °C:ssa. Sen jälkeen isot kappaleet sentrifugoitiin pohjaan Sorvall RC5 -sentrifuugilla käyttäen SS-34-roottoria (17000 rpm, 10 min, +4 °C). Sekä supernatantista että pelletistä otettiin SDS-PAGE:a varten näytteet. Supernatanttiin lisättiin 1-2 ml glutationisefarsoosia (4B Fast Flow) ja sekoitettiin tunnin ajan +4 °C:ssa. Glutationisefarsoosia pestiin kylmällä PBS:llä sentrifugoimalla (Heraeus Megafuge 1.0R) kolme kertaa 500 x g, 5 min, +4 °C:ssa, jonka jälkeen glutationisefarsoosi siirrettiin Chromatography Columns -pylvääseen (Bio-Rad). GST-Ci α 2I-fuusioproteiini eluoitiin irti pylväästä PBS:än tehdyllä 30 mM pelkistetyllä glutationilla. Proteiinikonsentraatio määriteltiin Protein Assay -reagenssin (Bio-Rad) ja BSA-standardisuoran avulla valmistajan ohjeen mukaan ja proteiinin puhtaus tarkistettiin Phast System SDS-PAGE:n avulla kuten edellä.

3.9. *Ciona* α 2I-domeenin geenin lyhentäminen

Ciona integriinin α 2I-domeenin geeniä lyhennettiin 15 aminohapolla eli 45 nukleotidilla 5' - päästä (lyhennetty sekvenssi liitteenä) käyttämällä PCR:ää ja lyhennystä varten suunniteltuja alukkeita. Templaattina käytettiin aikaisemmin koottua ja pGEX-2T-plasmidiin ligoitua pitkää geeniä.

Lyhennysalukkeet:

5'-pään aluke: 5'- aag atc gga tcc ccg atc atc gat -3'

3'-pään aluke: 5'- cac gat gaa ttc cca acc gaa ggc -3'

Reaktioseos:

| | |
|--|--------------|
| <i>Pfu</i> -polymeraasi (3 U/ μ l) | 1,0 μ l |
| dNTP-seos (2 mM) | 10,0 μ l |
| <i>Pfu</i> -puskuri (kymmenkertainen) | 5,0 μ l |
| 5' -aluke (20 pmol/ μ l, Oligomer) | 5,0 μ l |
| 3' -aluke (20 pmol/ μ l, Oligomer) | 5,0 μ l |
| Templaatti-DNA (153 ng/ μ l) | 1,0 μ l |
| H ₂ O | 23,0 μ l |
| Yhteensä: | 50 μ l |

PCR-ohjelma:

95 °C 5 min, 1 sykli

95 °C 30 s; 48 °C 30 s; 72 °C 45 s, 25 sykliä

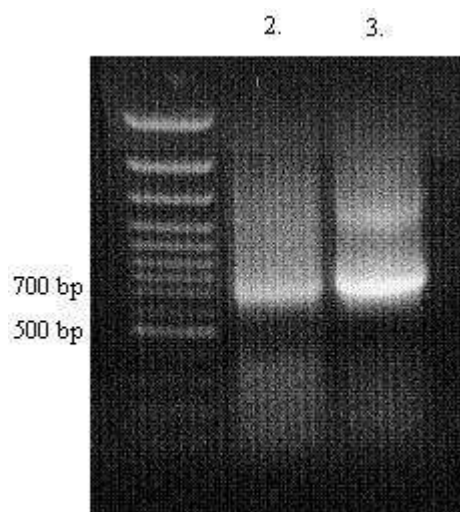
72 °C 10 min 1 sykli

PCR:n onnistuminen varmistettiin agarosigeelielektroforeesilla, jonka jälkeen *Cionan* α 2I-domeeni ligoitiin pGEM-T Easy -vektorin kautta pGEX-2T-vektoriin ja transformoitiin *E. coli* JM109-soluihin. Sekvenssin oikeellisuus varmistettiin sekvensoimalla lyhennetty geeni Turun yliopiston lääketieteellisen genetiikan sekvensointipalvelussa, jonka jälkeen proteiinia tuotettiin ja puhdistettiin kuten pidempää *Ciona* α 2I-domeenia.

4. TULOKSET

4.1. *Ciona* α 2I-domeenin geenin kokoaminen oligonukleotideista

Cionan integriinin α 2I-domeenin geenin kokoaminen tehtiin 18 oligonukleotidista PCR:ää käyttäen. Kokoaminen suoritettiin osissa siten, että ensimmäisen kierroksen aikana koottiin geenin alkupää oligonukleotideista 1-9 ja loppupää oligonukleotideista 10–18 erillisissä reaktioissa. Näiden reaktioiden tuotteet yhdistettiin toisella kierroksella, jonka jälkeen ajetussa agarosigeelielektroforeesissa näkyy selkeästi noin 700 emäsparin pituinen DNA-juoste. Kolmannella kierroksella toisen kierroksen tuotetta monistettiin edelleen DNA-konsentraation kasvattamiseksi, mikä näkyy myös geelillä voimakkaampana juovana (ks. Kuva 5).



Kuva 5 Agarosigeeli I-domeenin geenin kokoamisesta toisen (2.) ja kolmannen (3.) PCR-kierroksen jälkeen. Vasemmalla DNA-kokostandardi.

4.2. Geenin siirtäminen välivektorin kautta pGEX-2T-vektoriin

Koska PCR-tuotteen katkaisu ei suoraan onnistunut, *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geeni siirrettiin ensin pGEM-T EASY -välivektoriin. Transformaatioissa hyödynnettiin sinivalkoselektiomenetelmää, jossa bakteeripesäkkeen väristä nähdään, sisältääkö kyseisen pesäkkeen bakteerien plasmidit geenin. Transformaatiotehokkuus oli hyvä, sillä maljalla oli yli 100 bakteeripesäkettä, joista noin 80 % oli valkoisia. Valkoisesta bakteeripesäkkeestä tehtiin vielä PCR, jonka tuote ajettiin agarosigeelielektroforeesilla. Pesäkkeen plasmidi sisälsi noin 700 emäsparin pituisen *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin, joka siirrettiin edelleen pGEX-2T-vektoriin. Myös tässä transformaatiotehokkuus oli hyvä, sillä bakteeripesäkkeitä oli yli 100 kpl/malja. Plasmidi eristettiin, jolloin DNA-konsentraatioksi saatiin 150 $\mu\text{g/ml}$.

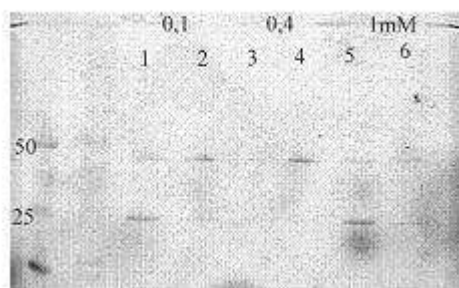
Sekvensoinnissa paljastui kuusi yhden tai kahden emäksen pituista aminohappojärjestykseen vaikuttavaa pistemutaatiota ja yksi siihen vaikuttamaton pistemutaatio kootussa *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geenissä.

4.3. Mutaatioiden korjaus QuikChange-menetelmällä

Ciona $\alpha 2I$ -domeenissa havaitut mutaatiot korjattiin QuikChange-menetelmällä yksitellen käyttäen kahdeksaa aluketta. DpnI-katkaisun aikana metyloity, vanha DNA pilkottiin ja vain uusi mutatoitu eli tässä tapauksessa korjattu DNA jäi jäljelle. Transformaatiotehokkuus oli näissä DpnI-katkaisun jälkeisissä transformaatioissa melko huono, sillä maljalla oli yleensä vain 10–30 bakteeripesäkettä, joissa suurimmassa kuitenkin oli mutatoitu DNA. Kaikkien korjausten jälkeen tehdyssä sekvensoinnissa *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geeni todettiin virheettömäksi ja sen todettiin olevan oikeassa lukuraamissa.

4.4. *Ciona* α 2I-domeenin tuoton optimointi *E. coli* -tuottokannoissa

Sekvensoitu *Ciona* α 2I-domeeni pGEX-2T-vektorissa transformoitiin *E. coli* BL21-soluihin. Transformaatiotehokkuus oli kohtalainen: maljalla oli keskimäärin 50 bakteeripesäkettä. Optimointiin valittiin kymmenen eri bakteerikloonia, joiden tuottamat proteiinit puhdistettiin ja ajettiin SDS-PAGE:ssa. Kloonien välillä oli huomattavia eroja tuottavuudessa. Parhaaksi arvioitu klooni valittiin jatko-optimointiin. Toisella optimointikerralla testattiin toimivinta IPTG-konsentraatiota, joista SDS-PAGE:n perusteella todettiin parhaaksi 0,4 mM IPTG (ks. Kuva 6). Optimoinnissa havaittiin tuottuvan jonkin verran myös pelkkää GST:tä.



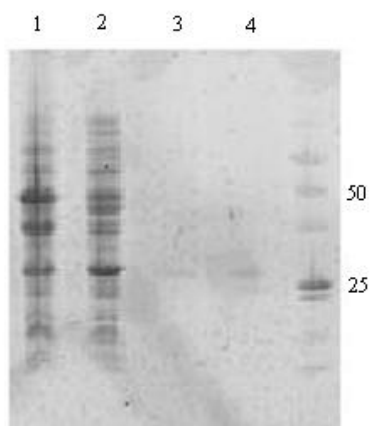
Kuva 6 Optimointituotoista ajettu SDS-PAGE Phast-geeli, jossa IPTG-konsentraatiot näkyvät ylhäällä ja oikealla on molekyylipainostandardi, jossa yksiköt ovat kilodaltonneina. GST:n molekyylipaino on 25 kDa ja GST-*Ciona* α 2I -fuusioproteiinin 50 kDa.

Pieniä 2 ml:n tuottoja kokeiltiin myös *E. coli* Tuner-tuottokannassa, jolla ei kuitenkaan saatu yhtä hyviä tuloksia kuin BL21-kannalla.

4.5. *Ciona* α 2I-domeenin tuottaminen ja puhdistus

Ciona α 2I-domeenin tuottamista yritettiin monissa eri olosuhteissa sekä BL21- että Tuner-tuottokannoissa. Kasvatuksia tehtiin 200–500 ml:n tilavuuksissa. Proteiinin tuotto indusoidiin eri bakteeritiheyksissä, esimerkiksi, kun A_{600} oli 0,5; 0,6; 0,8 tai 1. Indusoinnin aikana kasvatuksen lämpötilaa laskettiin 37 °C:sta 30 °C:en, 25 °C:en tai jopa 18 °C:en liukenemattomien proteiinikasaumien syntymisen estämiseksi. Tuotoissa kokeiltiin kahden,

kolmen, neljän ja 16 tunnin indusointia. Mikään näistä toimenpiteistä ei kuitenkaan vaikuttanut liukoisena tuottuvan GST-*Ciona* $\alpha 2I$ -fuusioproteiinin määrään, joka puhdistuksen jälkeen oli lähes olematon. Ajettaessa SDS-PAGE tuotto- ja puhdistusnäytteistä fuusioproteiinin havaittiin olevan enimmäkseen liukenemattomassa muodossa (ks. Kuva 7).



Kuva 7 SDS-PAGE Phast-geeli GST-*Ciona* $\alpha 2I$ -fuusioproteiinin puhdistuksen aikana ja sen jälkeen otetuista näytteistä. GST:n molekyylipaino on noin 25 kDa ja GST-*Ciona* $\alpha 2I$ -fuusioproteiinin 50 kDa. Oikealla molekyylipainostandardi, jossa yksiköt merkitty kilodaltonneina. Näyte 1 ei-liukoiset proteiinit, näyte 2 liukoiset proteiinit, näytteet 3 ja 4 lopputuote puhdistuksen jälkeen.

4.6. *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geenin lyhentäminen

Epäonnistuneiden tuottoyritysten takia *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geeniä lyhennettiin 15 aminohapolla geenin 5'-pästä PCR:llä käyttämällä sitä varten suunniteltuja alukkeita. Alukkeiden suunnittelu onnistui hyvin ja PCR:n toimivuus tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla, jossa näkyi selkeästi alle 700 emäsparin pituinen DNA-juoste. Geenin ligoimisen jälkeen se sekvensoitiin ja sekvenssi sekä lukuraami todettiin oikeiksi. *Cionan* $\alpha 2I$ -domeenin geeni ligoituna pGEX-2T-vektoriin transformoitiin *E. coli* BL21 ja Tuner-tuottokantoihin, jolloin transformaatiotehokkuus oli kohtalainen, noin 50 pesäkettä maljalla. Lyhyemmänkään *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin tuottaminen liukoisena GST-fuusioproteiininä ei onnistunut vaan proteiinisaannot jäivät olemattomiksi. *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin tuotto-ongelmien takia sitoutumiskokeita ei voitu suorittaa.

5. TULOSTEN TARKASTELU

Integriinejä tiedetään olevan kaikkien monisoluisien eläinten solukalvoilla, mutta viimeaikoihin asti on arveltu, että vain joissakin selkärankaisten integriinien α -alalyksiköissä on I-domeeni (ks. yleiskatsaus Burke, 1999). Selkäjännteisiin kuuluvien *Ciona intestinalis* ja *Halocynthia roretzi* -merituppien genomeista on kuitenkin löydetty α -alalyksiköitä, joilla on ligandeja sitova α I-domeeni (Ewan ym., 2005, Miyazawa ym., 2001). Merituppien I-domeenilliset α -alalyksiköt muodostavat fylogeneettisessä analyysissä oman erillisen ryhmänsä eli niiden ei uskota olevan ortologisia ihmisen ja muiden selkärankaisten I-domeenillisten α -alalyksiköiden kanssa. Rakenteeltaan *Cionan* α I-domeenit muistuttavat kuitenkin ihmisen α I-domeeneja, sillä nekin laskostuvat Rossmannin taitokseksi ja sisältävät MIDAS:n (Ewan ym., 2005, Huhtala ym., 2005).

Ihmisen α I-domeenien ligandeja ovat muun muassa kollageenit, laminiinit, ICAM:t ja komplementtijärjestelmän C3b-fragmentti (ks. Taulukko 1). Merituppien I-domeenillisten α -alalyksiköiden on havaittu ilmentyvän erityisesti hemosyyteissä, mikä viittaa niiden rooliin komplementtireseptoreina (Ewan ym., 2005, Miyazawa ja Nonaka, 2004). *Halocynthia* ainoan I-domeenillisen α -alalyksikön on havaittu sitoutuvan komplementti C3b-fragmenttiin (Ewan ym., 2005, Huhtala ym., 2005, Miyazawa ja Nonaka, 2004). *Cionan* kahdeksasta α I-domeenista ainoan tutkitun I-domeenin, α II:n on todettu ryhmämme aiemmissä tutkimuksissa sitoutuvan tyypin IX kollageeniin, mutta ei säikeitä muodostaviin kollageeneihin (Tulla ym., käsikirjoitus).

Tässä tutkimuksessa *Cionan* α 2I-domeenin geeni koottiin oligonukleotideista PCR:n avulla käyttäen kaikilla kolmella kierroksella *Taq*-polymeraasientsyymiä. *Taq*-polymeraasi on altis virheille, minkä vuoksi kootussa *Ciona* α 2I-domeenin geenissä oli useita pistemutaatioita, joita korjattiin myöhemmin QuikChange-mutageneesilla. 3'→5' -oikolukuaktiivisuuden omaavan polymeraasin, kuten *Pfu*:n, käyttäminen olisi vähentänyt virheiden lukumäärää geenissä. Ryhmämme aiempi kokemus vastaavanlaisen geenin kokoamisesta on, että *Pfu*-

polymeraasi ei toimi geenin kokoamisreaktiossa ilmeisesti juuri sen oikolukuaktiivisuuden takia.

GST-*Ciona* $\alpha 2I$ -fuusioproteiinin tuottaminen *E. colissa* osoittautui erittäin ongelmalliseksi. Proteiinisaanto jäi olemattomiksi, vaikka tuotto-olosuhteita muunneltiin eri tavoin. Proteiinin tuoton ja puhdistuksen aikana otetut näytteet ajettiin SDS-PAGE:lla, josta havaittiin, että proteiinia tuottuu, mutta se on liukenemattomassa muodossa. Fuusioproteiinin arveltiin muodostavan soluissa liukenemattomia proteiinkerääntymiä eli niin kutsuttuja inkluusiobodeja, mikä saattaa johtua proteiinin liian nopeasta ja runsaasta tuotosta bakteereissa. Liukenemattomuusongelmaa pyrittiin ratkaisemaan hidastamalla proteiinin tuottoa laskemalla lämpötilaa indusoinnin jälkeen ja lopulta lyhentämällä *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin geeniä 15 aminohapolla. Joissakin tapauksissa konstruktin pituuden on havaittu vaikuttavan fuusioproteiinin liukoisuuteen. Tuotto-ongelmaa ei kuitenkaan saatu ratkaistua tähän tutkielmaan varatun ajan puitteissa, eikä näin ollen *Cionan* integriini $\alpha 2I$ -domeenin sitoutumiskokeita voitu suorittaa.

Liukoisen *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin tuottaminen GST-fuusioproteiinina *E. coli* -bakteerisoluiissa voisi olla mahdollista käyttämällä paremman ilmaston mahdollistavaa laboratorionkokoluokan fermentoria, jossa myös lämpötilan säätely on tehokkaampaa. Tutkimuksen aikana kokeilimme myös pienentää kasvatuksen tilavuutta pienentämättä kuitenkaan kasvatuspullon kokoa, jolloin ilmaston pitäisi parantua ravistelun aikana. Tilavuuden muuttaminen ei kuitenkaan parantanut tuoton saantoa.

Ciona $\alpha 2I$ -domeenin tuottoa *E. coli* -soluissa on yritetty ainoastaan GST-fuusioproteiinina. On mahdollista, että GST aiheuttaa proteiinin liukenemattomuuden, jolloin ratkaisu saattaisi olla toisen merkkigeenin (*engl. tag*) käyttäminen. Esimerkiksi maltoosiin sitoutuvan proteiinin (*engl. maltose binding protein*) tiedetään olevan GST:tä liukoisempi ja useimmissa tapauksissa maltoosiin sitoutuvan proteiinin on havaittu tuottuvan liukoisena myös osana fuusioproteiinia. Toinen paljon rekombinanttiproteiinien tuotoissa ja puhdistuksissa käytetty merkkimolekyylä on pieni, useimmiten kuudesta histidiinitähteestä

koostuva His-Tag, joka muodostaa sidoksia muun muassa nikkeliin ja voidaan siten puhdistaa nikkelin avulla. Tämän tutkimuksen sitoutumiskokeet oli suunniteltu tehtävän käyttäen leimattua GST-vasta-ainetta, mikä ei merkkigeenin vaihtamisen jälkeen enää ole mahdollista. Sitoutumisen tutkimiseen voidaan kuitenkin käyttää muita menetelmiä.

Ciona $\alpha 2I$ -domeenin liukenemattomuus saattoi myös johtua sen vääränlaisesta laskostumisesta *E. coli* -soluissa. Yksi vaihtoehto liukoisuusongelman ratkaisemiseksi on käyttää tuoton yhteydessä toisia proteiineja oikeanlaisessa laskostumisessa avustavia kaperoneja (*engl. chaperones*), joiden toimintaan perustuvia tuotteita on saatavana myös kaupallisesti. Nämä ovat useiden eri kaperonien geenejä sisältäviä plasmideja, jotka transformoidaan soluun ennen proteiinin tuottamista, jolloin kaperoneja voidaan tuottaa yhdessä rekombinanttiproteiinin kanssa. Proteiineja on mahdollista myös laskostaa uudelleen denaturoivan käsittelyn jälkeen. Denaturaatiossa käytetään yleensä vahvaa guanidiinihydrokloridi- tai urealiuosta, jonka jälkeen proteiini laskostetaan uudelleen esimerkiksi kaperonien tai foldaasientsyymien avulla. Denaturaatiolla saattaa kuitenkin olla vaikutuksia proteiinin sitoutumisaktiivisuuteen, minkä vuoksi uudelleen laskostaminen ei välttämättä olisi toimiva vaihtoehto tässä tapauksessa.

Bakteerit, kuten *E. coli*, eivät tee tuottamiinsa proteiineihin translaation jälkeisiä muokkauksia, joita tumallisten solujen tiedetään tekevän. Niinpä *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin tuottaminen tumallisissa soluissa, esimerkiksi jossakin hiivalajissa, saattaisi onnistua. Tässä tapauksessa kootun geenin aminohappokodonit on suunniteltu juuri *E. coli* -lajille hyvin sopiviksi, joten geeni pitäisi koota uudelleen ja oligonukleotidit suunnitella juuri kyseisen lajin siirtäjä-RNA-molekyylien mukaan.

Bakteerisolujen ja tumallisten solujen lisäksi proteiinien tuottaminen on mahdollista myös ilman soluja eli niin kutsuttuna *in vitro* -translaationa. Näitä soluvapaita proteiinin tuotto - koneistoja on kehitetty useiden eri organismien, kuten *E. coli*, vehnänalkion ja kanin retikulosyyttilysaattien pohjalta. *In vitro* -translaation avulla myös *Ciona* $\alpha 2I$ -domeenin tuottaminen liukoisena saattaisi olla mahdollista, sillä tuotto-olosuhteita on helpompi

kontrolloida ja erilaisia laskostumista tehostavia apumolekyylejä voidaan käyttää. *In vitro* translaatioissa myös tilavuus on suurempi, jolloin proteiinien liukenemattomuus ei yleensä ole ongelmana. Kun käytetään eukaryoottien pohjalta kehitettyjä soluvapaita proteiinisynteesi -koneistoja, myös translaation jälkeisten muokkausten on havaittu toteutuvan kuten tumallisissa soluissa.

6. LÄHTEET

Adair, B.D., Xiong, J.P., Maddock, C., Goodman, S.L., Arnaout, M.A. ja Yeager, M. 2005. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin alpha V beta 3 in a complex with fibronectin. *J.Cell Biol.* 168:1109-1118.

Ahrens, I., Bode, C. ja Peter, K. 2005. Inhibition of platelet activation and aggregation. *Handb.Exp.Pharmacol.* (170):443-462.

Ajrout, K., Sugimori, T., Goldmann, W.H., Fathallah, D.M., Xiong, J.P. ja Arnaout, M.A. 2004. Binding Affinity of Metal Ions to the CD11b A-domain Is Regulated by Integrin Activation and Ligands. *J.Biol.Chem.* 279:25483-25488.

Arnaout, M.A., Goodman, S.L. ja Xiong, J.P. 2002. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14:641-651.

Bentley, D.R. 1986. Primary structure of human complement component C2. Homology to two unrelated protein families. *Biochem.J.* 239:339-345.

Bergelson, J.M., Shepley, M.P., Chan, B.M., Hemler, M.E. ja Finberg, R.W. 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science.* 255:1718-1720.

Bill, H.M., Knudsen, B., Moores, S.L., Muthuswamy, S.K., Rao, V.R., Brugge, J.S. ja Miranti, C.K. 2004. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol.Cell.Biol.* 24:8586-8599.

Bilsland, C.A., Diamond, M.S. ja Springer, T.A. 1994. The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. Activation by a heterologous beta subunit and localization of a ligand recognition site to the I domain. *J.Immunol.* 152:4582-4589.

Burke, R.D. 1999. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int.Rev.Cytol.* 191:257-284.

Calderwood, D.A., Tuckwell, D.S., Eble, J., Kuhn, K. ja Humphries, M.J. 1997. The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J.Biol.Chem.* 272:12311-12317.

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.

Cambi, A., Joosten, B., Koopman, M., de Lange, F., Beeren, I., Torensma, R., Fransen, J.A., Garcia-Parajo, M., van Leeuwen, F.N. ja Figdor, C.G. 2006. Organization of the Integrin LFA-1 in Nanoclusters Regulates Its Activity. *Mol.Biol.Cell.* 17:4270-4281.

Campbell, I.D. ja Ginsberg, M.H. 2004. The talin-tail interaction places integrin activation on FERM ground. *Trends Biochem.Sci.* 29:429-435.

Chen, J., Salas, A. ja Springer, T.A. 2003. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nat.Struct.Biol.* 10:995-1001.

Colombatti, A. ja Bonaldo, P. 1991. The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood.* 77:2305-2315.

Corbi, A.L., Kishimoto, T.K., Miller, L.J. ja Springer, T.A. 1988. The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. *J.Biol.Chem.* 263:12403-12411.

Cruz, M.A., Yuan, H., Lee, J.R., Wise, R.J. ja Handin, R.I. 1995. Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF A domain polypeptides. *J.Biol.Chem.* 270:19668.

Danen, E.H. ja Sonnenberg, A. 2003. Integrins in regulation of tissue development and function. *J.Pathol.* 201:632-641.

Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R.K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D.M., Harafuji, N., Hastings, K.E., Ho, I., Hotta, K., Huang, W., Kawashima, T., Lemaire, P., Martinez, D., Meinertzhagen, I.A., Necula, S., Nonaka, M., Putnam, N., Rash, S., Saiga, H., Satake, M., Terry, A., Yamada, L., Wang, H.G., Awazu, S., Azumi, K., Boore, J., Branno, M., Chin-Bow, S., DeSantis, R., Doyle, S., Francino, P., Keys, D.N., Haga, S., Hayashi, H., Hino, K., Imai, K.S., Inaba, K., Kano, S., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Lee, B.I., Makabe, K.W., Manohar, C., Matassi, G., Medina, M., Mochizuki, Y., Mount, S., Morishita, T., Miura, S., Nakayama, A., Nishizaka, S., Nomoto, H., Ohta, F., Oishi, K., Rigoutsos, I., Sano, M., Sasaki, A., Sasakura, Y., Shoguchi, E., Shin-i, T., Spagnuolo, A., Stainier, D., Suzuki, M.M., Tassy, O., Takatori, N., Tokuoka, M., Yagi, K., Yoshizaki, F., Wada, S., Zhang, C., Hyatt, P.D., Larimer, F., Detter, C., Doggett, N., Glavina, T., Hawkins, T., Richardson, P., Lucas, S., Kohara, Y., Levine, M., Satoh, N. ja Rokhsar, D.S. 2002. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science.* 298:2157-2167.

Dickeson, S.K., Mathis, N.L., Rahman, M., Bergelson, J.M. ja Santoro, S.A. 1999. Determinants of ligand binding specificity of the alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. *J.Biol.Chem.* 274:32182-32191.

Dickeson, S.K. ja Santoro, S.A. 1998. Ligand recognition by the I domain-containing integrins. *Cell Mol.Life Sci.* 54:556-566.

Emsley, J., King, S.L., Bergelson, J.M. ja Liddington, R.C. 1997. Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1. *J.Biol.Chem.* 272:28512-28517.

Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W. ja Barnes, M.J. 2004. Structure of the integrin alpha2beta1-binding collagen peptide. *J.Mol.Biol.* 335:1019-1028.

Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J. ja Liddington, R.C. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 101:47-56.

Estelle S., Harris, Thomas M., McIntyre ja Stephen M. Prescott ja Guy A. Zimmerman. 2000. The Leukocyte Integrins. *Journal of Biological Chemistry.* 275:23409-23412.

Ewan, R., Huxley-Jones, J., Mould, A.P., Humphries, M.J., Robertson, D.L. ja Boot-Handford, R.P. 2005. The integrins of the urochordate *Ciona intestinalis* provide novel insights into the molecular evolution of the vertebrate integrin family. *BMC Evol.Biol.* 5:31.

Faull, R.J. ja Ginsberg, M.H. 1996. Inside-out signaling through integrins. *J.Am.Soc.Nephrol.* 7:1091-1097.

Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E. ja Chan-Hui, P.Y. 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J.Cell Biol.* 134:793-799.

- Fujiki, K., Bayne, C.J., Shin, D.H., Nakao, M. ja Yano, T. 2001. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) C-type lectin and pentraxin by use of suppression subtractive hybridisation. *Fish Shellfish Immunol.* 11:275-279.
- Ginsberg, M.H., Partridge, A. ja Shattil, S.J. 2005. Integrin regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17:509-516.
- Grzesiak, J.J. ja Bouvet, M. 2006. The alpha2beta1 integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines. *Br.J.Cancer.* 94:1311-1319.
- Hogg, N. ja Bates, P.A. 2000. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol.* 19:211-222.
- Hughes, A.L. 2001. Evolution of the integrin alpha and beta protein families. *J.Mol.Evol.* 52:63-72.
- Huhtala, M., Heino, J., Casciari, D., de Luise, A. ja Johnson, M.S. 2005. Integrin evolution: insights from ascidian and teleost fish genomes. *Matrix Biol.* 24:83-95.
- Huizinga, E.G., Martijn van der Plas, R., Kroon, J., Sixma, J.J. ja Gros, P. 1997. Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. *Structure.* 5:1147-1156.
- Hutter, H., Vogel, B.E., Plenefisch, J.D., Norris, C.R., Proenca, R.B., Spieth, J., Guo, C., Mastwal, S., Zhu, X., Scheel, J. ja Hedgecock, E.M. 2000. Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science.* 287:989-994.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Hynes, R.O. ja Zhao, Q. 2000. The evolution of cell adhesion. *J.Cell Biol.* 150:F89-96.
- Ignatius, M.J., Large, T.H., Houde, M., Tawil, J.W., Barton, A., Esch, F., Carbonetto, S. ja Reichardt, L.F. 1990. Molecular cloning of the rat integrin alpha 1-subunit: a receptor for laminin and collagen. *J.Cell Biol.* 111:709-720.
- Jones, J.L. ja Walker, R.A. 1999. Integrins: a role as cell signalling molecules. *Mol.Pathol.* 52:208-213.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P.H. ja Downward, J. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* 16:2783-2793.
- Knight, C.G., Morton, L.F., Peachey, A.R., Tuckwell, D.S., Farndale, R.W. ja Barnes, M.J. 2000. The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. *J.Biol.Chem.* 275:35-40.
- Koller, E., Winterhalter, K.H. ja Trueb, B. 1989. The globular domains of type VI collagen are related to the collagen-binding domains of cartilage matrix protein and von Willebrand factor. *EMBO J.* 8:1073-1077.
- Käpylä, J., Ivaska, J., Riikonen, R., Nykvist, P., Pentikäinen, O., Johnson, M. ja Heino, J. 2000. Integrin alpha(2)I domain recognizes type I and type IV collagens by different mechanisms. *J.Biol.Chem.* 275:3348-3354.
- Käpylä, J., Jääliinoja, J., Tulla, M., Ylöstalo, J., Nissinen, L., Viitasalo, T., Vehviläinen, P., Marjomäki, V., Nykvist, P., Saamanen, A.M., Farndale, R.W., Birk, D.E., Ala-Kokko, L. ja Heino, J. 2004. The fibril-associated collagen IX provides a novel mechanism for cell adhesion to cartilaginous matrix. *J.Biol.Chem.* 279:51677-51687.

- Lankhof, H., van Hoeij, M., Schiphorst, M.E., Bracke, M., Wu, Y.P., Ijsseldijk, M.J., Vink, T., de Groot, P.G. ja Sixma, J.J. 1996. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb.Haemost.* 75:950-958.
- Lee, J. ja Jacobson, K. 1997. The composition and dynamics of cell-substratum adhesions in locomoting fish keratocytes. *J.Cell.Sci.* 110 (Pt 22):2833-2844.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A. ja Liddington, R. 1995. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell.* 80:631-638.
- Li, W., Metcalf, D.G., Gorelik, R., Li, R., Mitra, N., Nanda, V., Law, P.B., Lear, J.D., Degrado, W.F. ja Bennett, J.S. 2005. A push-pull mechanism for regulating integrin function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:1424-1429.
- Loeser, R.F. 1997. Growth factor regulation of chondrocyte integrins. Differential effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor beta on alpha 1 beta 1 integrin expression and chondrocyte adhesion to type VI collagen. *Arthritis Rheum.* 40:270-276.
- Luo, B.H. ja Springer, T.A. 2006. Integrin structures and conformational signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 18:579-586.
- Martel, V., Racaud-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.
- McFall, A., Ulku, A., Lambert, Q.T., Kusa, A., Rogers-Graham, K., ja Der, C.J. 2001. Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol.Cell.Biol.* 21:5488-5499.
- Meredith, J.E., Jr, Fazeli, B. ja Schwartz, M.A. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol.Biol.Cell.* 4:953-961.
- Michishita, M., Videm, V. ja Arnaout, M.A. 1993. A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell.* 72:857-867.
- Miranti, C.K. ja Brugge, J.S. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat.Cell Biol.* 4:E83-90.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K. ja Yamada, K.M. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J.Cell Biol.* 131:791-805.
- Miyazawa, S., Azumi, K. ja Nonaka, M. 2001. Cloning and characterization of integrin alpha subunits from the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J.Immunol.* 166:1710-1715..
- Miyazawa, S. ja Nonaka, M. 2004. Characterization of novel ascidian beta integrins as primitive complement receptor subunits. *Immunogenetics.* 55:836-844.
- Mould, A.P., Askari, J.A., Barton, S., Kline, A.D., McEwan, P.A., Craig, S.E. ja Humphries, M.J. 2002. Integrin activation involves a conformational change in the alpha 1 helix of the beta subunit A-domain. *J.Biol.Chem.* 277:19800-19805.

- Nishida, N., Sumikawa, H., Sakakura, M., Shimba, N., Takahashi, H., Terasawa, H., Suzuki, E.I. ja Shimada, I. 2003. Collagen-binding mode of vWF-A3 domain determined by a transferred cross-saturation experiment. *Nat.Struct.Biol.* 10:53-58.
- Nobes, C.D. ja Hall, A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nonaka, M. 2001. Evolution of the complement system. *Curr.Opin.Immunol.* 13:69-73.
- Nonaka, M. ja Azumi, K. 1999. Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev.Comp.Immunol.* 23:421-427.
- Nonaka, M., Azumi, K., Ji, X., Namikawa-Yamada, C., Sasaki, M., Saiga, H., Dodds, A.W., Sekine, H., Homma, M.K., Matsushita, M., Endo, Y. ja Fujita, T. 1999. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J.Immunol.* 162:387-391.
- Nykvist, P., 2004. Integrins as Cellular Receptors for Fibril-forming and Transmembrane Collagens. *Jyvaskylä Studies in Biological and Environmental Science* 137. p. 39-43.
- Nymalm, Y., Puranen, J.S., Nyholm, T.K., Käpylä, J., Kidron, H., Pentikäinen, O.T., Airene, T.T., Heino, J., Slotte, J.P., Johnson, M.S. ja Salminen, T.A. 2004. Jararhagin-derived RKKH peptides induce structural changes in alpha1I domain of human integrin alpha1beta1. *J.Biol.Chem.* 279:7962-7970.
- Ponting, C.P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. ja Koonin, E.V. 1999. Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *J.Mol.Biol.* 289:729-745.
- Pugacheva, E.N., Roegiers, F. ja Golemis, E.A. 2006. Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 18:507-515.
- Pytelä, R. 1988. Amino acid sequence of the murine Mac-1 alpha chain reveals homology with the integrin family and an additional domain related to von Willebrand factor. *EMBO J.* 7:1371-1378.
- Ricard-Blum, S. ja Ruggiero, F. 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol.Biol.(Paris).* 53:430-442.
- Ridley, A.J. ja Hall, A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 70:389-399.
- Romijn, R.A., Westein, E., Bouma, B., Schiphorst, M.E., Sixma, J.J., Lenting, P.J. ja Huizinga, E.G. 2003. Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J.Biol.Chem.* 278:15035-15039.
- Ruggeri, Z.M. 1997. von Willebrand factor. *J.Clin.Invest.* 100:S41-6.
- Rytömaa, M., Martins, L.M. ja Downward, J. 1999. Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. *Curr.Biol.* 9:1043-1046.
- Sadler, J.E., Shelton-Inloes, B.B., Sorace, J.M., Harlan, J.M., Titani, K. ja Davie, E.W. 1985. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82:6394-6398.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Seelen, M.A., Roos, A. ja Daha, M.R. 2005. Role of complement in innate and autoimmunity. *J.Nephrol.* 18:642-653.
- Serini, G., Valdembrì, D. ja Bussolino, F. 2006. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp.Cell Res.* 312:651-658.
- 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.
- Sloan, E.K., Pouliot, N., Stanley, K.L., Chia, J., Moseley, J.M., Hards, D.K. ja Anderson, R.L. 2006. Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res.* 8:R20.
- Smith, L.C., Azumi, K. ja Nonaka, M. 1999. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology.* 42:107-120.
- Sonnenberg, A. 1993. Integrins and their ligands. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 184:7-35.
- 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.
- Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T. ja Springer, T.A. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell.* 110:599-511.
- Tapley, P., Horwitz, A., Buck, C., Duggan, K. ja Rohrschneider, L. 1989. Integrins isolated from Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts. *Oncogene.* 4:325-333.
- Tulla, M., Pentikäinen, O.T., Viitasalo, T., Käpylä, J., Impola, U., Nykvist, P., Nissinen, L., Johnson, M.S. ja Heino, J. 2001. Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J.Biol.Chem.* 276:48206-48212.
- Turner, D.C., Flier, L.A. ja Carbonetto, S. 1987. Magnesium-dependent attachment and neurite outgrowth by PC12 cells on collagen and laminin substrata. *Dev.Biol.* 121:510-525.
- Ueda, T., Rieu, P., Brayer, J. ja Arnaout, M.A. 1994. Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:10680-10684.
- Vidal, F., Aberdam, D., Miquel, C., Christiano, A.M., Pulkkinen, L., Uitto, J., Ortonne, J.P. ja Meneguzzi, G. 1995. Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *Nat.Genet.* 10:229-234.
- Vinogradova, O., Vaynberg, J., Kong, X., Haas, T.A., Plow, E.F. ja Qin, J. 2004. Membrane-mediated structural transitions at the cytoplasmic face during integrin activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:4094-4099.
- 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.

- Vizzini, A., Arizza, V., Cervello, M., Cammarata, M., Gambino, R. ja Parrinello, N. 2002. Cloning and expression of a type IX-like collagen in tissues of the ascidian *Ciona intestinalis*. *Biochim.Biophys.Acta.* 1577:38-44.
- Whittaker, C.A. ja Hynes, R.O. 2002. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol.Biol.Cell.* 13:3369-3387.
- Wiseman, P.W., Brown, C.M., Webb, D.J., Hebert, B., Johnson, N.L., Squier, J.A., Ellisman, M.H. ja Horwitz, A.F. 2004. Spatial mapping of integrin interactions and dynamics during cell migration by image correlation microscopy. *J.Cell.Sci.* 117:5521-5534.
- 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.
- 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.
- Yang, W., Shimaoka, M., Salas, A., Takagi, J. ja Springer, T.A. 2004. Intersubunit signal transmission in integrins by a receptor-like interaction with a pull spring. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:2906-2911.
- Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K.M., Katz, B.Z., Lin, S., Lin, D.C., Bershadsky, A., Kam, Z. ja Geiger, B. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat.Cell Biol.* 2:191-196.
- Zhang, W.M., Käpylä, J., Puranen, J.S., Knight, C.G., Tiger, C.F., Pentikäinen, O.T., Johnson, M.S., Farndale, R.W., Heino, J. ja Gullberg, D. 2003. alpha 11beta 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *J.Biol.Chem.* 278:7270-7277.
- Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J.C. ja Ruoslahti, E. 1995. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:6161-6165.
- Zhao, J., Bian, Z.C., Yee, K., Chen, B.P., Chien, S. ja Guan, J.L. 2003. Identification of transcription factor KLF8 as a downstream target of focal adhesion kinase in its regulation of cyclin D1 and cell cycle progression. *Mol.Cell.* 11:1503-1515.

LIITTEET

Ciona intestinalis integriinin pidemmän α 2I-domeenin geenin nukleotidisekvenssi:

ggttctacttgggccccgggtccggagactaacaagatccgctgtccgatcatc gatctggatatgctgttcgtgctggatggttctgg
 ttctgtgggtaaggataacttcgagatcgtgaagaactggactatcaaggtggccaactctttcgatatctctgatggttatactcaggt
 ggtgtgatccagtattctactattgggccactgagccgctggataagcagtcttatcaagactgaggtgccgctgggtaagtac
 gcaacaagcaggagtctctgccgccgtgcgcaacatctctgcacgagtatactacttatactgccacgccctgaacaagactgt
 gttcgattccagcagtctctcgtggaaccgccgaagacttcaaggtgctgatcctgctgactgatggtctgtctactgataagca
 gctgctgccgtctctgccaaactatgtgcgctcttgaacatcactcttccgccgtgggtgtgggtgaggccaacgagaaggagctg
 caggagatcgccaacggtcagggtactaacgagcgcgtgtattatacttcaacttcgccggtctgaacaagatcgtgtctcagctgc
 gctctgccatcctgaacttcgtgctggagggtgccaacgccaactctactgtgtctgccttcggttgg

Ciona intestinalis integriinin lyhyemmän α 2I-domeenin geenin nukleotidisekvenssi:

ccgatcatc gatctggatatgctgttcgtgctggatggttctggttctgtgggtaaggataacttcgagatcgtgaagaactggactac
 aaggtggccaactctttcgatatctctgatggttatactcaggtgggtgtgatccagtattctactattgggccactgagccgctggat
 aagcagtcttatcaagactgaggtgccgctgggtaagtacgcaacaagcaggagtctctgccgccgtgcgcaacatctctctgc
 acgagtatactacttatactgccacgccctgaacaagactgtgttcgattccagcagtctctcgtggaaccgccgaagactct
 aaggtgctgatcctgctgactgatggtctgtctactgataagcagctgctgccgtcttctgccaaactatgtgcgctcttgaacatcact
 actttcgccgtgggtgtgggtgaggccaacgagaaggagctgcaggagatcgccaacggtcagggtactaacgagcgcgtgtatt
 atacttcaacttcgccggtctgaacaagatcgtgtctcagctgcgctctgccatcctgaacttcgtgctggagggtgccaacgccaac
 tctactgtgtctgccttcggttgg