

Pro gradu – tutkielma

GFP-vinkuliinin funktio epiteelisoluissa

Kirsi-Maria Hollanti

Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
2008

Alkusanat

Tämän työn kokeellinen osuus tehtiin Oulun yliopiston patologian laitoksella vuosina 2003-2004. Haluan lämpimästi kiittää dosentti Sinikka Eskelistä työni ohjaamisesta ja hyvästä opastuksesta solubiologian, tieteen ja tutkimuksen kiehtovaan maailmaan. Suuret kiitokset avusta ja kärsivällisyydestä näiden vuosien aikana.

Kiitokset FM Essi Myrskylle avusta työn aloitusvaiheessa. Kiitos FM Riikka Knuutille yhteistyöstä tutkimuksen teossa. Kiitos myös tutkimusryhmän tutkijakollegoille FM Hanna Suikille, LL Mira Rahikkalalle ja FM Linda Rosberg-Kulhalle. Suuret kiitokset FT Johanna Veijolalle avusta alukkeiden suunnittelussa. Haluan kiittää myös projekti-insinööri Antti Viklundia avusta tietotekniikan ja kuvankäsittelyn ihmeellisessä maailmassa.

Kiitokset patologian laitokselle mahdollisuudesta työskennellä laitoksen tiloissa. Haluan kiittää laitoksen henkilökuntaa, erityisesti laboratoriomestareita Marja-Liisa Marttia ja Marja Tolppasta kaikesta avusta ja opastuksesta laboratoriotyössä.

Suuret kiitokset vanhemmille tuesta ja kannustuksesta opiskeluvuosina. Erityiskiitokset Samille ja Sallalle. Tämän työn loppuun saattaminen on vaatinut teiltä hyvin paljon kärsivällisyyttä!

Kirsi Hollanti

Tekijä: Kirsi-Maria Hollanti
Tutkielman nimi: GFP-vinkuliinin funktio epiteelisoluissa
English title: Role of GFP-vinculin in epithelial cells
Päivämäärä: 28.5.2008 **Sivumäärä:** 56+2

Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t): Sinikka Eskelinen

Tiivistelmä: Vinkuliini on solun tukirangan proteiini. Se osallistuu alkionkehitykseen, soluliitoksiin epiteelisoluissa ja lihaksen toimintaan erityisesti sydänlihassoluissa. Epiteelisoluissa vinkuliinia on vyöliitoksissa ja fokaaliadheesioissa. Vinkuliiniproteiini koostuu kolmesta osasta. Siinä on pallomainen pää, proliinirikas saranaosa ja taipuisa häntä. Molekyylillä on havaittu olevan ainakin kaksi erilaista konformaatiota. Suljetussa konformaatiossa pää ja häntä ovat sitoutuneet toisiinsa ja molekyylillä on inaktiivinen. Avoin konformaatio vallitsee molekyylin ollessa aktiivinen ja kykenevä sitoutumaan adheesiokomplekseihin. Vinkuliinilla on useita sitoutumiskumppaneita sekä vyöliitoksissa että fokaaliadheesiossa. Vinkuliinissa tapahtuvat konformaatiomuutokset ja happamat fosfolipidit säätelevät vinkuliinin sitoutumista eri ligandeihin.

Vinkuliinin ylläpitämiä adheesiorakenteita tutkittiin transfektoimalla naudan munuaisen (MDBK) epiteelisoluja ja hiiren alkion fibroblasteja (3T3) plasmidilla, jossa on GFP-vinkuliinia koodaava sekvenssi. GFP-vinkuliinin lokalisaatiota ja sen aiheuttamia morfologisia muutoksia kuvannettiin ajan funktiona. Solut transfektoitiin mikroinjektoimalla. MDBK-soluissa GFP-vinkuliini lokalisoitui vyöliitoksiin ja fokaaliadheesioihin kuten endogeeninen vinkuliini. 3T3-soluissa GFP-vinkuliini lokalisoitui fokaaliadheesioihin.

Koska solun elektrofysiologisten olosuhteiden tiedetään säätelevän vinkuliinin konformaatiota ja interaktioita, GFP-vinkuliinin jakautumaa MDBK-soluissa ja 3T3-soluissa analysoitiin happamassa solunsisäisessä pH:ssa tai depolarisoivissa olosuhteissa. MDBK-soluissa matala pH lisäsi vinkuliinin määrää vyöliitoksissa, kun taas depolarisaatio irrotti vinkuliinin adheesiorakenteista. 3T3-soluissa depolarisaatio irrotti vinkuliinin fokaaliadheesioista. Niin ollen vinkuliinin interaktiot näyttäisivät olevan herkkiä elektrofysiologisen ympäristön muutoksille, siten että vinkuliini-vyöliitos vahvistui alhaisessa pH:ssa. Tässä suhteessa vinkuliinin käyttäytyminen vyöliitoksissa poikkesi täysin fokaaliadheesioista.

Jotta vinkuliinin interaktioita ja sitoutumiskumppaneita epiteelisoluissa voitiin analysoida, GFP-vinkuliiniin tuotettiin mutaatio, josta lipidejä sitova alue ja yksi aktiinia sitovista alueista oli poistettu. Mutaatiolla poistettiin aminohapot 1016-1066. MDBK-soluihin transfektoituna mutaatiokonstrukti aiheutti fokaaliadheesioiden hajoamisen ja vinkuliinin kertymisen solun sisäisiin kasautumiin, mikä vuorostaan aiheutti solujen irtoamisen alustasta. Siksi aktiinin ja happamien fosfolipidien sitominen näyttäisi kontrolloivan vinkuliinin interaktioita fokaaliadheesioissa ja vyöliitoksissa.

Avainsanat: Vinkuliini, epiteeli, vyöliitos, fokaaliadheesio, depolarisaatio, pH

Author: Kirsi-Maria Hollanti
Title of thesis: Role of GFP-vinculin in epithelial cells
Finnish title: GFP-vinkuliinin funktio epiteelisoluissa
Date: 28.5.2008 **Pages:** 56+2

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Sinikka Eskelinen

Abstract: Vinculin is a cytoskeletal protein. It has a role in embryogenesis, in cell junctions and in muscle function, especially in cardiac muscle. In epithelial cells vinculin localizes at adherens junctions and at focal adhesions. Vinculin consists of three parts. It has a round head, a proline-rich hinge region and a flexible tail. The molecule has at least two conformations. In a closed conformation the molecule is inactive. An open conformation predominates when the molecule is active and enables its binding to junctional complexes. Vinculin has several binding partners both at focal adhesions and adherens junctions of cultured cells. Its interactions with these partners are regulated by conformational changes and acidic phospholipids.

In order to analyze the role of vinculin in the maintenance of cell junctions of epithelial cells and fibroblasts, we transfected epithelial Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells and mouse embryo fibroblasts (3T3 cells) with a plasmid containing GFP-linked vinculin sequence and monitored the distribution of expressed GFP-vinculin and the morphological changes of cells as function of time. The transfection was carried out by microinjection. In MDBK cells GFP-vinculin localized at focal adhesions and adherens junctions as endogenous vinculin. In 3T3 cells GFP-vinculin localized at focal adhesions.

Since the electrophysiological conditions within a cell are known to regulate the vinculin conformation and its binding properties, we analyzed the distribution of GFP-vinculin in MDBK cells and in 3T3 cells at low intracellular pH or in depolarizing conditions. In MDBK cells low pH induced accumulation of vinculin into adherens junctions, whereas depolarization completely released vinculin from focal adhesions and adherens junctions. In 3T3 cells depolarization released vinculin from focal adhesions. Hence, vinculin interactions seem to be very sensitive to electrophysiological environment, especially the vinculin accumulation to adherens junctions was increased at acidified conditions. In this respect, the interactions at adherens junctions and focal adhesions are completely different.

In order to analyze the vinculin interactions and binding partners in epithelial cells, we generated a mutation where lipid binding domain and one actin binding domain were deleted from the vinculin construct. The deletion comprised of aminoacids 1016-1066. In MDBK cells transfected with this mutated construct, deletion of lipid binding domain and actin binding domain caused disruption of focal adhesions and accumulation of vinculin to intracellular aggregates. This caused detachment of the cells from the substratum. Lack of these two binding partners caused vinculin accumulation to lateral walls but no adherens junctions were seen. Hence, binding to actin and to acidic phospholipids seem to control vinculin interactions at focal adhesions and adherens junctions.

Keywords: Vinculin, epithelia, adherens junction, focal adhesion, depolarization, pH

Sisällysluettelo

Lyhenteet

I KIRJALLINEN OSA

1. Johdanto	9
1.1. Epiteelisolut	10
1.2. Epiteelisolujen liitokset	10
1.3. Vinkuliini	11
1.3.1. Vinkuliinin rakenne	11
1.3.2. Vinkuliinin konformaatio	12
1.4. Interaktiot	13
1.4.1. Taliini	14
1.4.2. Kateniinit	15
1.4.3. α -aktiniini	15
1.4.4. VASP	16
1.4.5. Vineksiini	16
1.4.6. Ponsiini	16
1.4.7. Arp2/3-kompleksi	17
1.4.8. Aktiini	17
1.4.9. Happamat fosfolipidit	18
1.4.10. Paksilliini	20
1.5. Vinkuliinin aktivaatio	21
1.6. Vinkuliinin funktio	24
1.6.1. Poistogeeniset hiiret	24
1.6.2. Funktio solutasolla	24
1.6.3. Vinkuliini ja metavinkuliini lihassoluissa	26

II KOKEELLINEN OSA

2. Tutkimuksen tarkoitus	30
3. Materiaalit ja menetelmät	31
3.1. MDBK-solut ja 3T3-solut	31
3.2. GFP-vinkuliiniplasmidi	32
3.3. Plasmidin tuotto	33
3.3.1. Transformaatio kompetentteihin soluihin	33

3.3.2. Plasmidin eristys bakteerisoluista	33
3.3.3. Plasmidi-DNA:n geelielektroforeesi	34
3.4. GFP-vinkuliinin mutaatio	34
3.4.1. Insertin tuotto PCR-tekniikalla	34
3.4.2. Insertin puhdistus	35
3.4.3. Insertin ja vektorin digestio	35
3.4.4. Ligaatio ja transformaatio	36
3.4.5. Mutaation tarkistus sekvensoimalla	36
3.5. Solujen transfektio mikroinjeksiolla	37
3.6. Kalvopotentialin ja solunsisäisen pH:n muutokset	38
3.6.1. Fysiologisten olosuhteiden merkitys	38
3.6.2. Solujen depolarisointi	38
3.6.3. Solujen pH:n alentaminen	39
3.7. Immunofluoresenssivärjäys	39
3.7.1. Solujen fiksaus ja värjäys	39
3.7.2. Vasta-aineet	39
3.8. Fluoresenssimikroskopia	40
3.9. Konfokaalimikroskopia	40
4. Tulokset	41
4.1. Plasmidin tuotto ja transfektio soluihin	41
4.1.1. GFP-vinkuliiniplasmidi	41
4.1.2. Mutaatio vinkuliinigeenissä	41
4.1.3. Transfektiot	41
4.2. GFP-vinkuliinin lokalisaatio	43
4.2.1. Kuvantaminen	43
4.2.2. GFP-vinkuliinin lokalisaatio soluissa	43
4.2.3. Depolarisaatio	43
4.2.4. pH:n alentaminen	44
4.2.5. Muunnellun GFP-vinkuliinin lokalisaatio epiteelisoluissa	44
5. Tulosten tarkastelu	49
6. Lähdeluettelo	52
Liite 1. Liuosten valmistusohjeita	57

Lyhenteet

Arp2/3-kompleksi	Actin-related proteins 2 and 3 complex
BSA	Naudan seerumin albumiini
GFP	Vihreänä fluoresoiva proteiini
MDBK	Madin-Darby naudan munuaisen solut
MEF	Hiiren alkion fibroblasti
NAP-kompleksi	Nektiin-afadiini-ponsiini-kompleksi
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos
PIP ₂	Fosfatidyli-inositoli-4,5-bisfosfaatti
PTEN	Fosfataasi ja tensiini homologi
VASP	Vasodilaattorin stimuloima fosfoproteiini

I KIRJALLINEN OSA

1. Johdanto

Vinkuliini on solun tukirangan proteiini. Se osallistuu solu-soluliitosten ja solusoluväliaineliitosten muodostamiseen. Liitoksissa vinkuliini toimii eräänlaisena siltana liitoskompleksien ja solutukirangan välillä. Vinkuliinilla on useita sitoutumiskumppaneita erilaisissa adheesiorakenteissa, ja sen sitoutuminen on tarkasti säädeltyä. Vinkuliinin funktiota ei ole yksiselitteisesti selvitetty, mutta sen arvellaan toimivan sekä rakenteellisissa että toiminnallisissa tehtävissä, ehkä myös signaalinvälityksessä.

Vinkuliinin molekyylipaino on 117 kDa ja se sisältää 1066 aminohappoa. Sekvenssiltään vinkuliini on hyvin konservoitunut proteiini. Vinkuliinilla on erilaisen silmikoitumisen tuloksena syntyvä isoformi metavinkuliini, jota esiintyy lähinnä lihassoluissa.

Rakenteeltaan vinkuliini muistuttaa narun päässä olevaa ilmapalloa; sillä on pallomainen pää ja pitkä häntä. 90 kDa:n painoinen pää sisältää molekyylin N-terminaalisen osan ja proliinipitoisen sarana-alueen, joka erottaa pään ja 35 kDa:n hännän toisistaan. Proliinirikas sarana-alue on herkkä proteaaseille.

Molekyyli voi esiintyä ainakin kahdessa eri konformaatiossa: avoimessa ja suljetussa. Suljetussa konformaatiossa molekyylin pää ja häntä ovat sitoutuneet toisiinsa, ja sarana-alue on laskostunut niiden väliin. Tällöin useimmat ligandinsitomispaikat ovat inaktiivisia. Suljettu konformaatio vallitsee vinkuliinin ollessa liukoisessa muodossa sytoplasmassa. Vinkuliinin aktivoituessa molekyylin konformaatio avautuu, jolloin ligandinsitominen mahdollistuu ja vinkuliini sitoutuu adheesiorakenteisiin.

Eri solutyypeissä vinkuliini osallistuu erilaisten adheesiorakenteiden muodostamiseen. Epiteelisoluissa vinkuliinin on osoitettu sitoutuvan vyöliitoksiin ja fokaaliadheesioihin. Eri lihassolutyypin adheesiorakenteissa vinkuliinia esiintyy metavinkuliinin ohella.

1.1. Epiteelisolut

Epiteelisolujen muodostamat epiteelikudokset peittävät elimistön ja ympäristön välisiä rajapintoja. Ne reunustavat kudoksia ja tiehyitä. Epiteelisolut ovat polaarisia, ja niiden pinnat eroavat ominaisuuksiltaan toisistaan. Epiteelikudoksen toiminnan kannalta epäsymmetrinen rakenne on välttämätön, koska epiteelisolujen läpi tapahtuu monenlaista absorptio- ja sekreetiotoimintaa epiteelikudoksen paikasta riippuen. Pintoja on kolme: apikaalinen, lateraalinen ja basaalinen. Epiteelisolujen apikaalipinta reunustaa tiehyiden onteloita. Apikaalipinta on poimuinen ja siinä voi olla mikrovilluksia tai muita rakenteita, jotka lisäävät solun apikaalista pinta-alaa, mikä on tarpeen epiteelikudoksen toiminnalle. Basaalipinta kiinnittää solun sidekudoksen puolella olevaan tyvikalvoon. Lateraalilla pinnalla sijaitsevat vierekkäisiä soluja yhdistävät solu-soluliitokset. Niiden välityksellä solut kiinnittyvät lujasti toisiinsa muodostaen yhtenäisiä pintoja

1.2. Epiteelisolujen liitokset

Tyypillisessä epiteelisolukerroksessa on solujen välissä järjestäytynyt solu-soluliitoskompleksi. Liitoskompleksissa lähinnä apikaalipintaa on tiivis liitos eli zonula occludens. Se sulkee solujen väliin jäävän tilan tiiviisti estäen molekyylien kulkeutumisen solujen välistä. Tiivis liitos erottaa solun apikaali- ja basolateraalipinnan toisistaan. Tiiviin liitoksen basaalipuolella sijaitsee vyöliitos eli zonula adherens. Se kiertää solun ympäri vyömäisenä rakenteena. Liitoskompleksin kolmannen osan muodostavat desmosomit. Desmosomit ovat pistemäisiä liitoksia, jotka liittyvät solun tukirangan välikokoisiin säikeisiin. Vyöliitokset ja desmosomit ovat ankkuroivia eli vahvistavia liitoksia. Solu-soluliitokset liittyvät solutukirankaan, mikä mahdollistaa vierekkäisten solujen toimimisen yhteistyössä koordinoituna kudoksena. Liitoskompleksin lisäksi solujen välillä on konneksiinien muodostamia aukkoliitoksia, joiden välityksellä kemialliset viestit siirtyvät solusta toiseen. Epiteelisolujen basaalipinnalla on fokaaliadheesioita ja hemidesmosomeja, joiden avulla solut kiinnittyvät sidekudokseen. Näiden liitosten avulla solun tukiranka liittyy solun ulkopuolisiin rakenteisiin, esimerkiksi tyvikalvoon. Vinkuliini on solun tukirangan proteiinina tärkeä rakenneosana vyöliitoksissa ja fokaaliadheesioissa.

1.3. Vinkuliini

Vinkuliini löydettiin vuonna 1980. Benjamin Geiger työtovereineen eristi uuden, ennestään tuntemattoman proteiinin kanan kivipiirasta. Tutkimusryhmä totesi proteiinin lokalisoituvan solukalvoon sellaisissa kohdissa joissa mikrofilamentit kohtasivat solukalvon. Uuden proteiinin oletettiin liittävän aktiinisäikeitä solukalvoon, joten proteiini nimettiin sen oletetun tehtävän mukaan vinkuliiniksi (*vinculum* = linkki, lat.) (Geiger ym., 1980). Kesti kuitenkin pitkään ennen kuin vinkuliinin sitoutuminen aktiiniin lopulta osoitettiin (Menkel ym., 1994).

Ihmisen, kanan, porsaan ja sukkulamadon vinkuliinisekvenssi on selvitetty. Sekvenssien vertailu osoittaa, että vinkuliini on erittäin konservoitunut proteiini, joka sisältää 1066 aminohappoa. Samasta geenistä erilaisen silmikoitumisen kautta syntyvässä meta-vinkuliinissa on 68 aminohappoa enemmän. Vinkuliinin molekyylipaino on 117 kDa, metavinkuliinin 124 kDa. Vinkuliinin aminohapposekvenssit ovat ihmisellä ja kanalla yli 95 % yhteneviä, nukleotidisekvenssit 82 % yhteneviä. Suurimmat erot ilmenevät aminohappojen 259-289 välillä. N- ja C-terminaaliset päät ovat hyvin konservoituneet ja sisältävät proteiinin toiminnan kannalta tärkeitä alueita (Price ym., 1989; Weller ym., 1990).

1.3.1. Vinkuliinin rakenne

Elektronimikroskoopilla tarkasteltuna vinkuliini näyttää narun päässä olevalta ilmapallolta. Vinkuliini koostuu kolmesta rakenteellisesta osasta, joita ovat pää, sarana-alue ja häntä. N-terminaalisen pään ja sarana-alueen muodostama pallomainen pää koostuu neljästä globulaarisesta lohokosta, jotka ovat järjestäytyneet litistyneen tetraedrin muotoon. Häntä näyttää helminauhamaiselta (Winkler ym., 1996; Winkler ja Jockusch, 2001).

Bakolitsa ym. (1999) selvitti ensimmäisenä vinkuliinin hännän kristallirakenteen. Vinkuliinin häntä, eli aminohapot 879-1066, on rakenteeltaan heliksien muodostama kimppu. Hännän viisi heliksiä (H1-H5) ovat järjestäytyneet antiparalleelisti ylös-alas

kulkien siten että kimpun keskusta on hydrofobinen ja ulkopuoli hydrofiilinen. Positiiviset varaukset ovat molekyylin pinnalla kasautuneet kahdelle alueelle, tikapuoksi (basic ladder) kolmannen heliksin kohdalle ja kaulukseksi (basic collar) C-terminaalisen hännänpään ympärille. C-terminaalinen hännänpää sulkee heliksikimpun pohjan. Se voidaan jakaa kolmeen osaan: taipuisa luoppi (aminohapot 1047-1052), β -levy (1053-1061) ja hydrofobinen hiusneula (1062-1066).

Vinkuliinin N-terminaalinen pää (aminohapot 1-258) koostuu seitsemästä amfipaattisesta α -heliksistä (α 1-7), jotka ovat järjestäytyneet kahdeksi neljän heliksin kimpuksi; N-terminaaliseksi (α 1-4) ja C-terminaaliseksi (α 4-7). Inaktiivisessa molekyyliässä nämä ovat järjestäytyneet peräkkäin. Keskelle sijoittuva pitkä heliksi α 4 ulottuu molempien kimppujen läpi sitoen kimput yhteen (Izard ym., 2004; Izard ja Vornhein, 2004).

Kokonainen vinkuliinimolekyyli koostuu seitsemästä neljän heliksin kimpusta ja yhdestä viiden heliksin kimpusta. Heliksikimput ovat järjestäytyneet neljäksi pariksi. Ensimmäinen pari muodostaa vinkuliinin pään. Toinen, kolmas ja neljäs pari muodostavat sarana-alueen ja hännän. Ensimmäisen, toisen ja kolmannen parin rakenne on hyvin samankaltainen; ne koostuvat seitsemästä heliksistä α 1-7, jotka muodostavat kaksi neljän heliksin kimppua, joita yhdistää kimput lävistävä pitkä heliksi α 4. Neljännen parin ensimmäinen heliksikimppu sisältää neljä heliksiä, niitä seuraa proliinirikas alue ja viiden heliksin kimppu joka on vinkuliinin häntä. Kokonaisuutena heliksit ovat järjestäytyneet globulaariseksi molekyyliksi (Bakolitsa ym., 2004; Borgon ym., 2004).

1.3.2. Vinkuliinin konformaatio

Vinkuliinilla on todettu kaksi erilaista konformaatiota, avoin ja suljettu. Suljettu konformaatio, jossa pää ja häntä ovat kiinni toisissaan, on vallitseva vinkuliinin ollessa monomeerimuodossa sytoplasmassa. Suljetussa konformaatiossa molekyyli on inaktiivinen. Pään aminohapot 181-226 sitoutuvat molekyylin hännän aminohappoihin 1009-1038. Sitoutuminen on luonteeltaan voimakkaasti ionista; pään alue on emäksinen ja hännän alue hapan. Interaktio on erittäin voimakas ($K_d \sim 50$ nM). Pään ja hännän välinen

sidos on herkkä ionivahvuuden ja lämpötilan nousulle, mikä osoittaa että sekä elektrostaattiset että hydrofobiset interaktiot ovat tärkeässä roolissa (Miller ym., 2001). Aktivoituessaan vinkuliini avautuu: pään ja hännän välinen sidos katkeaa, jolloin pää ja häntä irtoavat toisistaan molekyylin sarana-alueen suoristuessa. Konformaation avautuminen mahdollistaa ligandien sitomisen ja dimerisaation. Ligandeihin sitoutumalla vinkuliini liittyy erilaisiin adheesiorakenteisiin. Pää-häntä liitos heikkenee, jos pH on alle 7, mikä on havaittu kokonaisella vinkuliinimolekyylillä sekä V8-proteaasilla sarana-alueelta katkaistulla molekyylillä (Miller ym., 2001). Korkea suolakonsentraatio aiheuttaa molekyylin sisäisten sidosten katkeamisen, jolloin molekyylien välisten sidosten osuus kasvaa ja syntyy 4-6 vinkuliiniproteiinia sisältäviä multimeereja (Winkler ym., 1996). Lisäksi eräiden lipidien on havaittu lisäävän pään ja hännän dissosiaatiota (Johnson ja Craig, 1995b). Useimmat vinkuliinin ligandinsitomiskohdista sijaitsevat lähellä pään ja hännän sitoutumispaikkoja. Paikkojen läheisyydestä voi olettaa että ligandinsitomisen säätely ja pään ja hännän väliset interaktiot liittyvät läheisesti toisiinsa.

1.4. Interaktiot

Vinkuliinilla on adheesiorakenteissa useita eri ligandeja. Globulaarisesta N-terminaalista päästä on karakterisoitu taliinin, kateniinin, a-aktiniinin ja hännän sitoutumispaikka. Proliinipitoisella sarana-alueella on VASPin, ponsiinin, vineksiinin ja Arp2/3-kompleksin sitoutumispaikka. Hännässä sijaitsee paksilliinin, aktiinin, happamien fosfolipidien ja pään sitoutumispaikka. Vinkuliinin aminohapposekvenssistä karakterisoidut sitoutumisalueet on koottu taulukkoon 1.

Taulukko 1. Sitoutumisalueet vinkuliinin aminohapposekvenssissä.

Aminohapposekvenssi	Sitoutumisalueet		Kirjallisuusviite
Aminoterminaalinen pää 1-850	Taliini	1-208 1-258 1-167 1-850	Jones ym., 1989 Gilmore ym., 1992 Bass ym., 1999 Weiss ym., 1998 Hazan ym., 1997
	α -kateniini	1-170	
	β -kateniini	1-850	Kroemker ym., 1994
	α -aktiniini	181-226	Johnson ja Craig, 1994
	Vinkuliinin häntä		
Sarana-alue 837-877	VASP	839-850	Brindle ym., 1996
	Ponsiini	839-893	Mandai ym., 1999
	Vineksiini	849-893	Kioka ym., 1999
	Arp2/3	850-881	DeMali ym., 2002
Karboksi-terminaalinen häntä 858-1066	Paksilliini	978-1000	Wood ym., 1994
	Happamat fosfolipidit	916-970	Johnson ym., 1998
	Aktiini	893-985	Hüttelmaier ym., 1997
		1016-1066	Hüttelmaier ym., 1997
	PIP2	916-970	Gilmore ja Burrigge, 1996
			Weekes ym., 1996
	Vinkuliinin pää	1009-1038	Miller ym., 2001

1.4.1. Taliini

Taliini on 270 kDa:n painoinen fokaaliadheesioiden proteiini. Se sitoo integriinien sytoplasmiset domeenit solun aktiinitukirankaan. Taliini on välttämätön fokaaliadheesioiden syntymiselle (ks. yleiskatsaus Critchley, 2000). Taliinissa on kolme erillistä vinkuliinia sitovaa aluetta, jotka ovat biokemiallisilta ominaisuuksiltaan yhteneviä (Bass ym., 1999; Bass ym., 2002). Vinkuliinimolekyylissä taliinin sitoutumispaikka sijaitsee vinkuliinin N-terminaalissa globulaarisessa päässä (Jones ym., 1989; Price ym., 1989). Sitoutumiseen osallistuvat eri tutkimusten mukaan aminohapot 1-258 tai 1-131 (Gilmore ym., 1992; Bass ym., 2002).

Aikaisemmin oletettiin, että vinkuliinin pään ja hännän välinen interaktio säätelee taliinin sitoutumista vinkuliiniin siten, että häntä inhiboi taliinin sitoutumista. Tämä perustui havaintoon, että pelkällä pääfragmentilla ilman häntää on 3-4 kertaa suurempi affiniteetti taliinille kuin kokonaisella vinkuliinimolekyylillä (Johnson ja Craig, 1994). Uusimpien tutkimustulosten mukaan taliini säätelee vinkuliinin aktivoitumista. Taliinin sitoutuminen vinkuliinin päähän aiheuttaa merkittäviä konformaatiomuutoksia vinkuliinin rakenteessa. Nämä muutokset aiheuttavat hännän irtoamisen päästä, jolloin vinkuliini aktivoituu (Izard ym., 2004).

1.4.2. Kateniinit

Epiteelisolujen vyöliitoksissa vinkuliini sitoo α - ja β -kateniinien kanssa aktiinisäikeitä kadheriineihin. Vinkuliinin α -kateniinia sitova paikka sijaitsee vinkuliinin N-terminaaliosassa, aminohapoissa 1-850 (Hazan ym., 1997; Weiss ym., 1998). α -kateniinin sitoutuminen lisää vinkuliinin ja aktiinin välistä affiniteettia (Bakolitsa ym., 2004).

1.4.3. α -aktiniini

α -aktiniini on aktiinia sitova proteiini, johon vinkuliinin on osoitettu sitoutuvan erilaisissa soluliitoksissa (Belkin ja Kotliansky, 1987). Vinkuliiniproteiinin α -aktiniinia sitova kohta sijaitsee vinkuliinin N-terminaaliosassa. Aminohappojen 1-107 on todettu osallistuvan sitoutumiseen. Tutkimuksen mukaan vinkuliinin pääfragmentti yksinään sitoo α -aktiniinia tehokkaammin kuin kokonainen vinkuliiniproteiini. Ilmeisesti vinkuliinin pään ja hännän interaktio säätelee pään sitoutumista α -aktiniiniin. Toisin sanoen vinkuliiniproteiinin täytyy ensin aktivoitua ja avautua voidakseen sitoa α -aktiniinia (Kroemker ym., 1994).

1.4.4. VASP

VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) on fokaaliadheesioiden, solu-soluliitosten ja lamellipodien eli levyjalkojen proteiini, joka säätelee aktiinisäikeiden järjestäytymistä. Sen on osoitettu sitoutuvan vinkuliinin proliinipitoiselle sarana-alueelle aminohappoihin 389-850 (Brindle ym., 1996). PIP₂ lisää VASP:in sitomista aktivoimalla vinkuliinia, jolloin pään ja hännän interaktio katkeaa ja VASP:in sitoutumispaikka paljastuu (Hüttelmaier ym., 1998).

1.4.5. Vineksiini

Vineksiini on fokaaliadheesioiden ja vyöliitosten proteiini, joka sitoutuu vinkuliinin proliinipitoiselle sarana-alueelle aminohappoihin 849-893. GFP-vineksiiniä ekspressoivissa soluissa on havaittu lisääntyntä vinkuliinin määrää fokaaliadheesioissa. Mahdollisesti vineksiini joko lisää vinkuliinin määrää tai sitten stabiloii sen rakennetta (Kioka ym., 1999).

1.4.6. Ponsiini

Ponsiini sitoutuu vinkuliinin sarana-alueen proliinirikkaalle alueelle yhdellä tai useammalla SH3-domeenilla. Vinkuliini ja ponsiini ovat sitoutuneena epiteelisolujen vyöliitoksissa ja fokaaliadheesioissa ja sydänlihassolujen kytkelyvyissä (Mandai ym., 1999). Vinkuliinin ja α -kateniinin välityksellä mahdollistuu nektiini-afadiini-ponsiinikompleksin liittäminen kadheriinivälitteisiin vyöliitoksiin. Nekiinin on todettu säätelevän solu-soluliitosten syntyä, ja tätä kautta solujen liikettä ja proliferaatiota (Sakisaka ym., 2007).

1.4.7. Arp2/3-kompleksi

Arp2/3-kompleksi (actin-related proteins 2 and 3 complex) on seitsemän proteiinin muodostama kompleksi, joka säätelee aktiinisäikeiden haarautumista erityisesti fibroblastien lamellipodeissa. Lamellipodien fokaalikomplekseissa vinkuliinin on havaittu sitoutuvan Arp2/3-kompleksiin. Sitoutuminen on hyvin transientti tapahtuma, jota nähdään ainoastaan juuri syntyneissä fokaalikomplekseissa solujen reuna-alueilla. Valmiissa fokaaliadheesioissa tätä sitoutumista ei enää havaita. Arp2/3:en sitoutumispaikka vinkuliinissa on lokalisoitu aminohappoihin 850-881 eli vinkuliinin sarana-alueelle (DeMali ym., 2002).

Arp2/3-kompleksin sitoutuminen vinkuliiniin on tärkeää joissakin integriinien ohjaamissa tapahtumissa. Tätä on tutkittu MEF-soluilla, joista puuttuu vinkuliini. MEF-solut ovat hiiren alkion fibroblasteja (Mouse Embryo Fibroblast). Kun MEF-soluissa uudelleen ilmennetään vinkuliinia, niin solut ovat leveitä ja litteitä. Jos Arp2/3-kompleksin ja vinkuliiniin sitoutuminen estetään mutatoimalla sitoutumispaikkaa, MEF-solut ovat pitkänomaisia ja kapeita, samankaltaisia kuin villin tyyppin solut. Ne leviävät huonosti ja tekevät vain pieniä, harvoja lamellipodimaisia ulokkeita. Migraatioon ja solujen adheesioon mutaatiolla ei ole vaikutusta. Mutantti sitoo muita sarana-alueen proteiineja eli vineksiiniä, ponsiinia ja VASPIa normaalisti. Sitoutuminen vinkuliiniin auttaa Arp2/3-kompleksia lokalisoitumaan uusiin adheesiokomplekseihin. Näin aktiinin polymerisaatiokoneisto saadaan liitettyä syntyviin adheesiokomplekseihin (DeMali ym., 2002).

1.4.8. Aktiini

Vinkuliinin hännän on osoitettu sitoutuvat aktiiniisäikeisiin (Menkel ym., 1994). Pään ja hännän interaktio kuitenkin inhiboi sitoutumista (Johnson ja Craig, 1995a). Pelkkä häntäfragmentti sitoutuu aktiiniin, mikä tukee ajatusta että pää-häntäinteraktio normaalisti peittää aktiinia sitovan alueen (Weekes ym., 1996).

Hännästä on identifioitu kaksi aktiinia sitovaa aluetta, mikä teoriassa mahdollistaisi kahden aktiinifilamentin sitoutumisen yhteen vinkuliinimolekyyliin. Ligandinsitomispaikat on lokalisoitu sekvenssin aminohappoihin 893-985 ja 1016-1066 (Hüttelmaier ym., 1997). Tehokkaaseen aktiinin sitomiseen tarvitaan todennäköisesti molemmat sitoutumispaikat. Jälkimmäisen alueen on todettu osallistuvan vinkuliinimolekyylien oligomerisoitumiseen, mikä voisi tuoda paikalle lisää aktiivista vinkuliinia aktiinin sitomisen tehostamiseksi. Bakolitsan ym. (1999) tutkimusten mukaan hännän C-terminuksella ei ole vaikutusta aktiinin sitomiseen: häntäfragmentti josta on poistettu aminohapot 1052-1066 sitoo aktiinia normaalisti. Aktiininsitominen aiheuttaa hännässä rakenteellisia muutoksia, koska hännän proteaasiherkkyys lisääntyy sen ollessa sitoutuneena aktiiniin.

Uusien rakennetutkimusten perusteella näyttää siltä, että kokonaisen vinkuliiniproteiinin aktiininsitomiskyky ei ole kovin hyvä, mutta se paranee α -kateniinin avulla (Janssen ym., 2006). Ryhmän tutkimustulokset tukevat aiempia havaintoja, joiden mukaan aktiini aktivoi vinkuliinin dimerisaation (Johnson ja Craig, 2000). Janssenin ym. (2006) tutkimusten mukaan vinkuliinin häntä voi dimerisoitua vain aktiinia sitoessaan. Tällöin vinkuliini voi muodostaa ristsidoksia aktiinisäikeiden välille. Aktiininsitomisen aiheuttamat konformaatiomuutokset hännässä ovat hienovaraisia ja paikallisia, ne lähinnä ohjaavat eri aktiinifilamentteihin sitoutuneet vinkuliinimolekyylit oikeaan asemaan mahdollistaen niiden sitoutumisen toisiinsa.

1.4.9. Happamat fosfolipidit

Proteiiniligandien lisäksi vinkuliini voi sitoutua happamiin fosfolipideihin. Tämä mahdollistaa vinkuliinin toimimisen linkkinä aktiinin ja solukalvon välillä (Ito ym., 1983; Niggli ym., 1986). Happamat fosfolipidit lokalisoituvat pääasiassa solukalvon lipidikaksoiskerroksen sisempään lehteen. Vinkuliinin lipideihin sitoutuva alue on C-terminaalisessa hännässä (Johnson ja Craig, 1995a, b). Interaktio solukalvon fosfolipidien kanssa stabiloi vinkuliinin paikalleen ja helpottaa sen interaktiota muiden liitoskomponenttien kanssa. Solukalvoon sitoutuminen mahdollistaa vinkuliinin hännänpään työntymisen solukalvon sisälle vahvistamaan adheesiokompleksia (Johnson

ym., 1998). Uusimpien tutkimusten mukaan vinkuliinin sitoutuminen solukalvoon on hyvin dynaamista; fokaaliadheesioissa sitoutuminen on erittäin voimakasta ja nopeasti vaihtelevaa, kun taas vyöliitoksissa vinkuliini on heikosti sitoutunut solukalvon proteiineihin (Yamada ym., 2005).

Vinkuliinin hännän lipidejä sitova alue sijaitsee heliksissä H3. Helikaalinen hiuspinnirakenne sisältää aminohapot 916-970. Rakenne on konservoitunut kaikissa vinkuliineissa ja on mukana myös sukulaisproteiini α -kateniinin lipidisitomiskohdassa. Alue sisältää kaksi itsenäistä lipidisitomiskohtaa, jotka toimivat yhteistyössä ja muodostavat amfipaattisen heliksi-turn-heliksi-rakenteen (Johnson ja Craig, 1995a, b; Johnson ym., 1998).

Vinkuliinin hännänpään sitoutumista happamiin fosfolipideihin on tutkittu mutaatioiden avulla. Jos hännänpään hiusneula ja sitä edeltävä β -levyrakenne eli aminohapot 1052-1066 poistetaan, häntäfragmentti laskostuu edelleen normaalisti. Deleetio kuitenkin estää hännän sitoutumisen happamiin fosfolipidivesikkeleihin fysiologisissa olosuhteissa. pH:ta alentamalla hännän sitoutumiskyky voidaan palauttaa (Bakolitsa ym., 1999). Tämä osoittaa että C-terminaalinen hännänpää on välttämätön, jotta häntä voisi sitoutua solukalvoon fysiologisissa olosuhteissa. Tutkittaessa happamiin fosfolipideihin sitoutumisen vaikutusta hännän konformaatioon, huomattiin että fosfolipidien läsnäollessa tapahtui enemmän proteolyysiä sekä hännän että deleetiomutanttiin (pH \leq 6) ollessa kyseessä (Bakolitsa ym., 1999). Ilmeisesti sitoutuminen happamiin fosfolipideihin paljastaa vinkuliinin pää-häntä sidoksen peittämiä alueita, jotka yleensä ovat proteaasien ulottumattomissa.

Happamat fosfolipidit, erityisesti PIP₂ eli fosfatidyylinoosi-4,5-bisfosfaatti, inhiboivat pään ja hännän välistä assosiaatiota. Neutraaleilla lipideillä, esimerkiksi fosfatidyylkoliinilla tai fosfatidylseriinillä, ei ole tällaista vaikutusta molekyyliin (Weekes ym., 1996). PIP₂ säätelee useita aktiinia sitovia proteiineja, myös vinkuliinia. Se inhiboi pään ja hännän assosiaatiota paljastaen taliinin ja aktiinin sitomiskohdat. Taliinin sitomista PIP₂ lisäsi nelinkertaisesti ja aktiinin sitomista kolminkertaisesti. Paksilliinin sitomista PIP₂ hieman vähensi (Gilmore ja Burridge, 1996). PIP₂ lisää VASPin

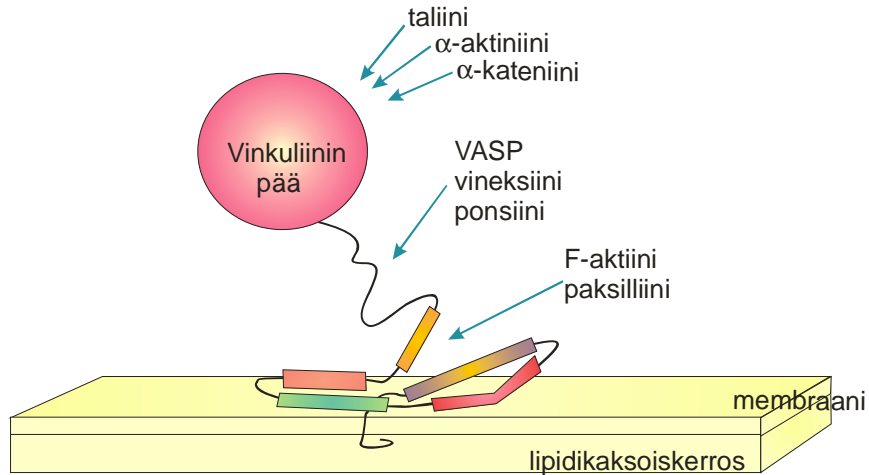
sitoutumista vinkuliiniin ja indusoi hännän oligomerisoitumista. PIP₂:n määrän lisääminen lisää myös oligomeerien määrää (Hüttelmaier ym., 1998).

Polyfosfoinositidien on havaittu estävän vinkuliinin ja aktiinifilamenttien väliset interaktiot *in vitro*. PIP₂:n sitoutuminen vinkuliiniin aukaisee sen konformaation ja paljastaa vinkuliinin päässä sijaitsevat ligandinsitomiskohdat. Happamien fosfolipidien ja aktiinin sitoutumispaikat sijaitsevat kuitenkin osittain päällekkäin, joten aktiinin sitominen estyy (Steimle ym., 1999).

1.4.10. Paksilliini

Fokaaliadheesioissa vinkuliini sitoutuu paksilliiniin (Turner ym., 1990). Paksilliinin sitoutumiskohta sijaitsee vinkuliinin C-terminaaliossa hännässä. Sitoutumiseen osallistuvat aminohapot 978-1000 (Wood ym., 1994). Alue 1000-1028 sisältää sekvenssin, joka kohdentaa molekyylin fokaaliadheesioihin. Koko tämä 50 aminohapon sekvenssi (978-1028) on hyvin konservoitu ihmisen ja kanan vinkuliineissa, ja todennäköisesti tärkeä fokaaliadheesioiden järjestäytymisen säätelyssä (Wood ym., 1994). Paksilliinin sitominen ei vaadi lipidien läsnäoloa, PIP₂ hieman vähentää sitoutumista (Gilmore ja Burrige, 1996). Kuvassa 1 on esitetty kaavakuva vinkuliinimolekyylistä ja sen eri alueiden molekyylien sitoutumiskohdista.

Vinkuliini



Kuva 1. Vinkuliinin rakenne ja interaktiokohdat.

1.5. Vinkuliinin aktivaatio

Vinkuliinilla on ainakin kaksi erilaista konformaatiota, avoin ja suljettu. Suljettu konformaatio vallitsee vinkuliinin ollessa sytoplasmassa. Aktivoituessaan vinkuliini avautuu ja sitoutuu eri adheesiorakenteisiin, joissa vinkuliinilla on osoitettu olevan useita eri sitoutumiskumppaneita.

Vinkuliinin mahdollisesta aktivoitumismekanismista on esitetty hypoteettisia malleja. Johnson ja Craig (1994) esittivät, että jokin syntyvästä fokaaliadheesiosta tuleva signaali aktivoi vinkuliinin, jolloin sen affiniteetti taliinille ja muille liitoskomponenteille kasvaa. Tämän seurauksena vinkuliini sitoutuu järjestäytyvään liitoskompleksiin.

Bakolitsan ym. (1999) esittämän mallin mukaan vinkuliinin pää kontrolloi ligandinsitomista allosteerisesti stabiloimalla hännän heliksikimppua ja estämällä sen avautumisen. Tällöin useimmat ligandinsitomispaikat ovat piilossa. Solukalvon happamien fosfolipidien läheisyydessä elektrostaattiset vuorovaikutukset vetävät hännän positiivisesti varautuneita osia (basic ladder ja basic collar) kohti negatiivisesti varautunutta solukalvoa. Bakolitsan teorian mukaan PIP_2 :n sitoutuminen vinkuliiniin voisi aiheuttaa C-terminaalisen hiusneularakenteen työntymisen solukalvoon. Tämä vuorostaan laukaisisi hännän heliksikimppun avautumisen, jolloin pään ja hännän interaktio katkeaa ja useat ligandinsitomispaikat tulevat esiin. Hännän heliksit hakeutuvat solukalvon läheisyyteen ja sarana-alue, joka oli laskostunut pään ja hännän väliin, tulee taipuisaksi ja ligandinsitominen mahdollistuu. Elektronimikroskooppikuivissa näkyvät ”helmet” voisivat edustaa heliksien muodostamia rakenteita tällaisessa avautuneessa konformaatioissa. Hännän aktivoituessa sen PIP_2 -sitova alue voisi samanaikaisesti sitoutua aktiinisäikeiden distaalsiin päihin ja rekrytoida lisää aktiivisia vinkuliinimolekyylejä paikalle oligomerisoitumalla. Aktiivisen vinkuliinin konsentraation kasvu voisi vetää yhteensitoutuneita aktiinisäikeitä tiiviiksi kimpuiksi. Samanaikaisesti aktivoitunut pää voisi kiinnittyä syntyvään fokaaliadheesioon suuren taliiniaffiniteettinsa vuoksi. Näiden tapahtumien säätelijänä saattaa toimia PIP_2 -tason vaihtelu, vinkuliinin ja muiden komponenttien fosforylaatio (Schwienbacher ym., 1996) tai vinkuliinin liittyminen signaalinvälitysreitteihin esimerkiksi VASP:n kautta (Brindle ym., 1996).

Johnsonin ja Craigin (2000) teorian mukaan vinkuliinin aktivoitumiseen liittyy molekyylin dimerisaatio. Janssenin ym. (2006) tutkimus tukee havaintoa. Aktiinin sitoutuminen vinkuliiniin aktivoi hienoisten konformaatiomuutosten avulla vinkuliinin hännän dimerisoitumisen paljastamalla molekyylin dimerisaatiokohdat. On mahdollista että dimerisaatio stabiloii vinkuliinin aktivoitunutta avointa muotoa ja estää vinkuliinimolekyylin siirtymisen takaisin suljettuun muotoonsa. Aktivoitunut vinkuliini sitoutuu toiseen aktiiviseen vinkuliiniin, jolloin aktiinifilamenteista syntyy kimppuja. Johnsonin ja Craigin (2000) tutkimusten mukaan myös happamien fosfolipidien (PIP_2) sitoutuminen johtaa vinkuliinin dimerisaatioon.

Bass ym. (2002) havaitsi vinkuliinin aktivoituvan taliinin vaikutuksesta. Uusimpien tutkimustulosten mukaan taliinilla on merkittävä rooli vinkuliinin aktivaatiossa. Kristallisoidusta taliini-vinkuliinikompleksista on huomattu, että taliinin sitoutuminen aiheuttaa vinkuliinin päässä huomattavia helikaalisen rakenteen konformaatiomuutoksia (Izard ym., 2004; Izard ja Vornhein, 2004). Heliksit järjestäytyvät uudelleen tehden tilaa taliinille, joka osittain tunkeutuu vinkuliinin heliksien väliin. Tämä johtaa vinkuliinin aktivoitumiseen. Taliinissa on kolme peräkkäistä vinkuliininsitomispaikkaa, joista jokainen kykenee aktivoimaan vinkuliinin. Teoriassa tämä mahdollistaisi kolmen vinkuliinimolekyylin aktivoitumisen yhden taliinimolekyylin välityksellä, mikä voisi vahvistaa integriinisignalointia ja edistää nopeita muutoksia aktiinitukirangassa (Izard ja Vornhein, 2004).

Papagrigorioun ym. (2004) mallin mukaan vinkuliini vahvistaa fokaaliadheesiota sitoutuen yhtä aikaa taliiniin ja aktiinisäikeisiin. Sekä vinkuliinissa että taliinissa tapahtuu suuria rakennemuutoksia taliinin tunkeutuessa vinkuliinin heliksien keskelle. Tämän seurauksena molemmat proteiinit stabiloivat toistensa rakenteita ja näin taliinin ja aktiinisäikeen liitos fokaaliadheesiossa vahvistuu. Havainto taliinin aiheuttamasta vinkuliinin pään heliksien huomattavasta uudelleenjärjestäytymisestä oli täysin odottamaton. Aikaisemmin oli ajateltu että vinkuliinin tehtävä on olla passiivinen, joustamaton ´tukiasema´. Uuden tiedon perusteella vinkuliini on rakenteellisesti dynaaminen proteiini, joka taipuu ja joustaa sopeutuakseen eri ligandeja ja funktioita varten (Izard ym., 2004).

1.6. Vinkuliinin funktio

Vinkuliinin funktiota ja merkitystä on tutkittu useilla keinoilla sekä solutasolla että poistogeenisissä hiirissä.

1.6.1. Poistogeeniset hiiret

Vinkuliinin funktiota alkionkehityksessä on tutkittu poistogeenisten hiirten avulla. Vinkuliinin geeni inaktivoitiin homologisella rekombinaatiolla. Yhtään homotsygoottista vinkuliini -/- hiirtä ei syntynyt elävänä, vaan alkiot kuolivat varhaisessa vaiheessa (E8-E10). Alkioissa todetut huomattavimmat vammat liittyivät hermoston ja sydämen kehitykseen. Alkiot olivat 30-40 % normaalia pienempiä ja niiden somiittien eli alkujaokkeiden ja raajojen kehitys oli jälkeenjäänyttä. Ektodermaaliset kudokset olivat ohuita ja hauraita. Sikiöistä eristetyt fibroblastit olivat fenotyypiltään samankaltaisia kuin F9 hiiren alkion karsinoomasolut (Xu ym., 1998a).

1.6.2. Funktio solutasolla

Vinkuliinin on todettu liittyvän solujen normaalin käytöksen säätelyyn. Vinkuliinin pään ja hännän väliset interaktiot säätelevät soluadheesiota, solujen leviämistä, lamellipodien muodostumista ja liikkumista.

Vinkuliinin määrä vaikuttaa solun muotoon ja liikkuvuuteen. Vinkuliinin yliekspressio fibroblasteissa stabiloii fokaaliadheesioita lisäten niiden määrää ja kokoa ja samalla vähentäen solujen liikkuvuutta huomattavasti (Rodríguez Fernández ym., 1992a). Vinkuliinin määrän vähentäminen voi aiheuttaa transformoiduille solulinjoille ominaisia muutoksia, eli fokaaliadheesioden määrän vähentymistä ja lisääntynyttä liikkuvuutta (Rodríguez Fernández ym., 1993). Erilaisiin syöpäsolulinjoihin transfektoitu vinkuliini vähentää solujen tuumorigeenisyyttä. Injektoituna hiiriin näiden solujen aiheuttamien kasvainten muodostuminen vähentyy (Rodríguez Fernández ym., 1992b).

Homologisella rekombinaatiolla valmistetut vinkuliinittomat F9 solut ja sikiön kantasolut ovat muodoltaan pyöreämpiä kuin villin tyyppin solut. Niiden adheesiokyky ja leviäminen on heikentynyt, ja lamellipodien syntyminen vähentynyt. Vinkuliinin puuttuessa solujen liikkuminen lisääntyi 2,4 kertaisesti (Coll ym., 1995).

Hiiren F9 solulinjan avulla on tutkittu vinkuliiniproteiinin puuttumisen vaikutusta soluihin. Solulinja 5.51 on mutatoitu hiiren F9 embryon karsinomasolulinja, joka ei ilmennä vinkuliinia eikä erilaistu polaariseksi epiteeliksi. Tämän mallin avulla on tutkittu, kuinka vinkuliini vaikuttaa tukirangan ja solujen muodonmuutoksiin verrattuna villin tyyppin F9 solulinjaan ja vinkuliinitransfektoituihin klooneihin (Samuels ym., 1993). 5.51 solut eivät kykene muodostamaan lamellipodeja eivätkä stressisäikeitä. Fokaaliadheesio-kompleksien muodostuminen vaikeutuu, soluadheesio ja solujen leviäminen estyvät. Solut myös ekspressoivat vähemmän α -aktiniinia ja paksilliinia, mikä saattaa johtaa stressisäikeiden muodostumisen estymiseen. Vinkuliinin puuttuessa integriini-solutukiranka-liitoksen mekaaninen lujuus laskee. Kun vinkuliinia transfektoidaan soluihin, niin stressisäikeiden muodostumisteho, α -aktiniinin ja paksilliinin määrä ja integriini-solutukiranka-liitosten mekaaninen lujuus palautuvat lähelle villityypin tasoa (Ezzel ym., 1997). Vinkuliinin yliekspressio vuorostaan vähentää solujen adhesiivisuutta, ehkä ylistabiloimalla stressisäikeitä ja vaikuttamalla aktiinifilamenttien uudelleenjärjestymiseen. Vinkuliinin voidaan ajatella edistävän solujen leviämistä stabiloimalla fokaaliadheesioita ja välittämällä mekaanista stressiä, joka ohjaa solun tukirangan uudelleenmuovautumista. (Samuels ym., 1993; Ezzel ym., 1997).

Vinkuliinin eri osien vaikutusta solun muotoon ja toimintaan on tutkittu solulinjoilla, joista puuttuu vinkuliini. On todettu, että kokonainen ehjä vinkuliiniproteiini tarvitaan lamellipodien aikaansaamiseksi, pelkkä pää/häntä tai ne yhdessä ei riitä (Goldmann ja Ingberg, 2002). Vinkuliini osallistuu solun tukirangan mekaanisen yhtenäisyyden ja muodon ylläpitoon sitoutumalla yhtäaikaaisesti useisiin fokaaliadheesioproteiineihin. Tämän interaktion tehokkuus voimistuu, kun pään ja hännän sitoutumiskohdat ovat toistensa välittömässä läheisyydessä samassa molekyylissä. Tehokas rakenteellinen liitos integriinien ja tukirangan välillä saattaa olla vaatimus myös signaalinvälityksessä. Injektoitaessa soluihin aktiivista *rac*-GTPaasia, sen indusoimia lamellipodeja syntyi vain

soluissa, jotka ilmensivät kokonaista vinkuliiniproteiinia. Tämä osoittaa että vinkuliini voi muokata solun signaalinvälityskoneistoa, erityisesti pienten G-proteiinien signalointia (Goldmann ja Ingber, 2002). Vinkuliinin pää aiheuttaa muutoksia solujen liikkumisessa. Pääfragmentin vaikutuksesta solut liikkuvat kaksi kertaa nopeammin kuin solut, jotka eivät ilmennä vinkuliinia lainkaan. Hännän ilmentäminen sen sijaan vähentää solujen liikkumiskykyä. Kokonaisen vinkuliinimolekyylin ilmentäminen palauttaa solut villin tyypin kaltaisiksi. Hännän ja pään ilmentäminen ilman niiden välistä kovalenttista sidosta palauttaa solut osittain kohti villin tyypin fenotyyppiä (Xu ym., 1998b).

Injektoidun vinkuliinin on todettu aiheuttavan epiteelisoluissa muutoksia: injektoitu kanan vinkuliini saa aikaan vyöliitosten ja tiiviiden liitosten fragmentoitumisen, joka johtaa 5-13 tumaa sisältävien polykaryonien muodostumiseen tunnin kuluessa injektioista (Palovuori ja Eskelinen, 2000). Vinkuliinin pää aiheuttaa fuusioiden sijasta solujen irtoamisen alustasta, ehkä voimakkaan taliiniaffiniteetin vuoksi. Hänällä ei ole havaittavaa vaikutusta solujen morfologiaan. Vinkuliinin ylimäärä ehkä irrottaa soluliitokset solun tukirangasta, mikä johtaa liitoskompleksien fragmentoitumiseen ja solufuusiioihin (Palovuori ja Eskelinen, 2000).

Vinkuliinin funktiota E-kadheriinipohjaisissa vyöliitoksissa on tutkittu esimerkiksi rintasyöpäsolulinjalla MDA-MB-468. Tutkimuksen perusteella oletetaan, että vinkuliini liittyy solu-solukontaktien kypsymiseen. Kun vinkuliini osallistuu kadheriinien ja solutukirangan ankkuroimiseen, niin α -kateniini saa aikaan pysyvämmän adheesion. Siirtyminen vinkuliinipohjaisesta liitoksesta α -kateniinipohjaiseen liitokseen voi olla mekanismi, jolla siirrytään alkuperäisestä liitoksesta kestävämpään vyöliitokseen (Hazan ym., 1997).

1.6.3. Vinkuliini ja metavinkuliini lihassoluissa

Vinkuliinin isoformi metavinkuliini eroaa hiukan rakenteeltaan vinkuliinista. Metavinkuliinissa on 68 aminohapon insertti molekyylin C-terminaaliosassa. Insertti koostuu vaihtelevasta ja konservoituneesta osasta. Aminohappokoostumukseltaan se on

voimakkaasti hapan, kun vinkuliinin häntä on hyvin emäksinen. Metavinkuliini ja vinkuliini syntyvät samasta geenistä erilaisen silmikoitumisen tuloksena. Vinkuliinin sekvenssissä insertti sijoittuu aminohappojen 915-916 väliin. Metavinkuliinin paino on 124 kDa (Strasser ym., 1993).

Vinkuliini ja metavinkuliini kolokalisoituvat lihassolujen adheesiorakenteissa. Näitä ovat esimerkiksi kytkylevyt ja kostameerit. Kytkeytyvät yhdistävät sydänlihassoluja toisiinsa. Kostameerit ovat rakenteita, jotka ympäröivät myofibrillejä ja ankkuroivat sarkomeerit sarkolemmaan ja soluväliaineeseen. Ne auttavat lihassoluja toimimaan supistumiskoneistona johtamalla lihassupistusta edelleen muihin lihassoluihin.

Vinkuliinilla ja metavinkuliinilla ajatellaan olevan funktionaalinen rooli kardiogeneesissä ja sydänlihassolujen supistumismekaniikassa. Sydänlihassolujen täytyy toimia synkronisesti, joten sydänlihassolujen kytkylevyjen heikkeneminen vähentää sydämen supistumistehoa. Vinkuliinin rooli sydämen toiminnassa onkin ilmeisen tärkeä. Tätä ajatusta tukee havainto että metavinkuliinin puute tai sen mutaatio aiheuttaa perinnöllistä kardiomyopatiaa (Maeda ym., 1997).

Vinkuliini ja metavinkuliini eroavat aktiinisitomiskyvyssään. Epiteelisoluihin transfektoitu metavinkuliinin häntä aiheuttaa aktiinin diffuusia verkkomaista järjestäytymistä, ei kimpumaisia rakenteita kuten vinkuliinin häntä (Rüdiger ym., 1998). Happamasta insertistä johtuen metavinkuliinin häntä sitoutuu vinkuliinia heikommin happamiin fosfolipideihin. Metavinkuliinin dimerisointiskyky on heikompi kuin vinkuliinilla. Saattaa olla, että metavinkuliini aktivoituu vinkuliinin sitoutuessa siihen. Vinkuliini ja metavinkuliini muodostavat yhdessä heterodimeerejä. Tämä voimistaa adheesiorakenteita mahdollistaen useampien ligandien sitoutumisen (Witt ym., 2004).

Metavinkuliinin rooli on spesifinen lihassoluissa. Kytkeytyvät ja kostameerit ovat pysyviä rakenteita eivätkä dynaamisia kuten fokaaliadheesiot. Metavinkuliinin varsinainen funktio saattaaakin liittyä aktiinifilamenttien ja kytkylevyjen yhteenliittämiseen (Rüdiger ym., 1998). Mutaatiot metavinkuliinin hännässä vaikuttavat aktiinin organisoitumiseen ja

muuttavat kytkylevyjen rakennetta, mikä on todettu myös kardiomyopatiasta kärsivien potilaiden näytteistä (Olson ym., 2002).

Toistaiseksi ei ole identifioitu metavinkuliinille spesifejä ligandeja. Vastikään löydetty ligandi raver1 on ensimmäinen, jolla on suurempi affiniteetti metavinkuliinille kuin vinkuliinille. Aktiini ja raver1 eivät vaadi metavinkuliini-inserttiä sitoutuakseen, joten metavinkuliini-insertin vaikutus todennäköisesti kohdistuu vinkuliinin konformaatioon, ei niinkään ligandinsitomiseen (Hüttelmaier ym., 2001).

On osoitettu, että sileässä lihaksessa supistumisärsyke aiheuttaa vinkuliinin siirtymisen solukalvolle (Opazo Saez ym., 2004). Lihasten adheesiorakenteissa vinkuliini ja metavinkuliini toimivat yhteistyössä. Aktivoituessaan metavinkuliini vaatii vinkuliinin koaktivaattorikseen, vinkuliini-metavinkuliini heterodimeerien muodostuminen voi säädellä mikrofilamenttien ankkuroitumista (Witt ym., 2004). Metavinkuliinin puutteen aiheuttama kardiomyopatia puhkeaa aikuisiässä, joten oletettavasti metavinkuliinin puutosta voidaan sietää pitkän aikaa, mutta vuosikymmenien mekaaninen stressi saa aikaan myopatian (Witt ym., 2004).

Vinkuliinigeenin heterotsygoottinen inaktivaatio aiheuttaa hiirille stressin indusoimaa kardiomyopatiaa. Vin+/- hiiret kehittyvät ja lisääntyvät normaalisti ja niiden sydämen perustoiminnot ja histologia ovat normaaleja. Myosyyttien ja kytkylevyjen rakenne on kuitenkin epänormaali. Alle puoleen vähentynyt vinkuliinin ja metavinkuliinin tuotanto aiheuttaa sen, että sydän ei siedä äkillistä hemodynaamista stressiä; sydämen toimintahäiriöt ja hiirten kuolleisuus lisääntyvät (Zemljic-Harpe ym., 2004).

Vinkuliinilla on tärkeä rooli myös *Caenorhabditis elegans* -sukkulamadon normaaleissa lihastoiminnoissa. Vinkuliinigeenin mutaatiot aiheuttavat sikiöiden halvaantumista ja kehitysongelmia. Halvaantuminen oletettavasti johtuu siitä, että vinkuliinia tarvitaan funktionaalisen lihaksen järjestäytymiseen (Barstead ja Waterston, 1991).

II KOKEELLINEN OSA

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksella oli kaksi päätavoitetta. Ensimmäinen tavoite oli tutkia vinkuliiniproteiinin lokalisaatiota epiteelisoluissa erilaisissa fysiologisissa olosuhteissa. Kuvantamisessa hyödynnettiin vinkuliiniin liitettyä vihreänä fluoresoivaa proteiinia eli GFP:tä. Tutkimuksen toisena tavoitteena oli muuttaa vinkuliinin rakennetta mutaation avulla ja havainnoida mutaation vaikutus solutasolla.

Käytössä oli GFP-vektori, johon oli liitetty vinkuliinia koodaava insertti. GFP-vinkuliiniplasmidia vietiin epiteelisoluihin mikroinjektion avulla. Vuorokauden kuluttua solujen tuottama GFP-vinkuliiniproteiini havainnoitiin elävistä epiteelisoluista fluoresenssimikroskoopilla.

Vinkuliiniin tehtiin mutaatio, jossa sen hännästä poistettiin 50 aminohappoa. Mutaation seurauksena vinkuliinin oletettiin olevan jatkuvasti avoimessa konformaatioissa, eli kykenemätön muodostamaan sidosta hännän ja pään välille. Konformaatioiden vaihtelun estyessä vinkuliinin oletettiin sitoutuvan poikkeavalla tavalla vyöliitoksiin ja fokaaliadheesioihin.

GFP-vinkuliinia kuvattiin elävien solujen lisäksi fiksatuissa soluissa. Soluista värjättiin jokin vinkuliiniin liittyvä proteiini. GFP-vinkuliinin ja värjätyn proteiinin paikantumista soluissa tarkasteltiin joko fluoresenssimikroskoopilla tai konfokaalimikroskoopilla.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. MDBK-solut ja 3T3-solut

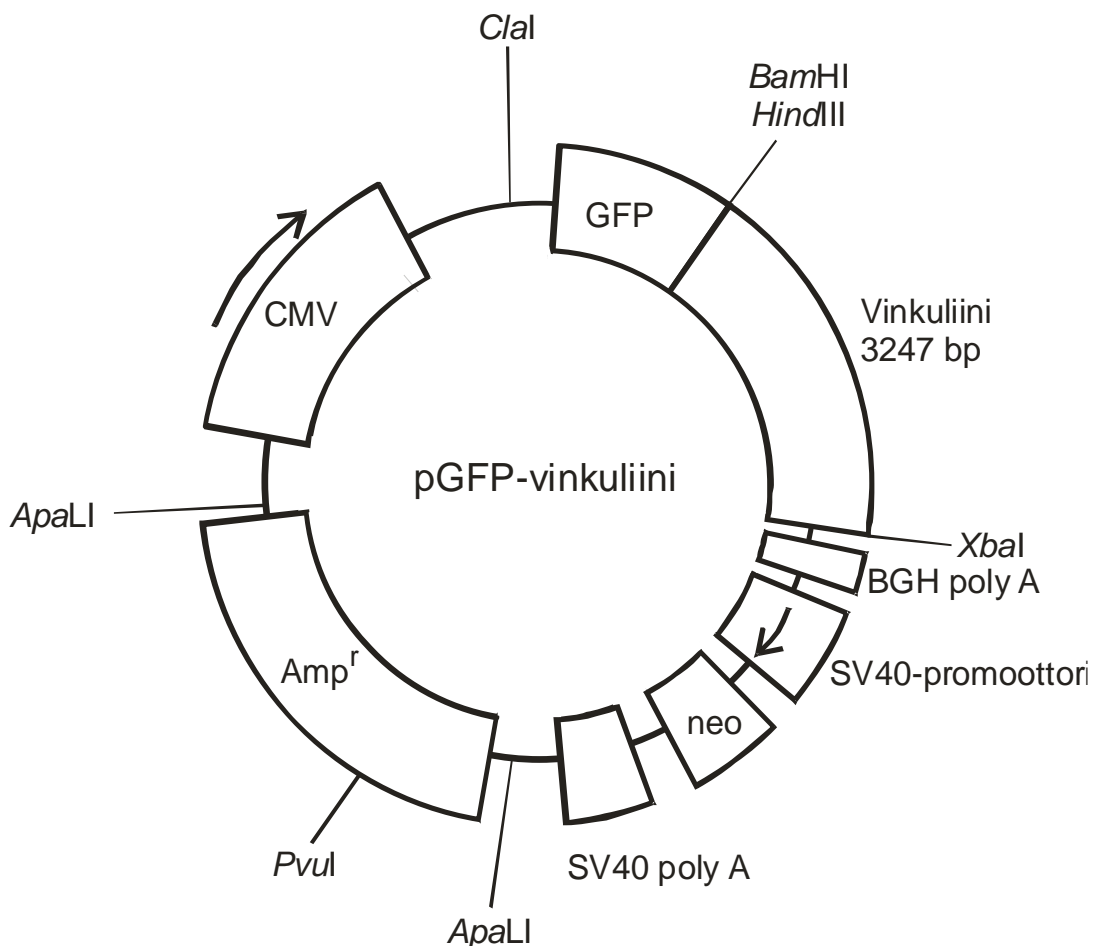
Tutkimus suoritettiin käyttäen naudan munuaisen epiteelisoluja eli MDBK-soluja (Madin-Darby Bovine Kidney-solut; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Nämä solut ovat osoittautuneet hyviksi kohteiksi tutkittaessa injektoidun vinkuliiniproteiinin käyttäytymistä (Palovuori ym., 2000; Palovuori ym., 2004). MDBK-solut ovat muodoltaan litteitä, ja ne muodostavat hyviä solu-solukontakteja. Litteästä muodosta johtuen mikroinjektioneula voidaan ohjata soluun tumaa vahingoittamatta. Solut kestävät mikroinjektioista syntyvän paineaallon ilman että soluliitokset rikkoutuvat, ja toipuvat mikroinjektioista nopeasti. Epiteelisolujen lisäksi käytettiin 3T3-soluja, jotka ovat hiiren alkion fibroblasteja (BALB/3T3 Clone A31; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

Molemmat solulinjat kasvatettiin samanlaisissa elatusaineissa ja olosuhteissa. Solut kasvoivat Dulbecco's Modified Eagle Mediumissa (D-MEM; Gibco), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (FBS; HyClone, Gibco) ja antibiootteja. Soluja kasvatettiin +37°C:ssa soluviljelykaapissa (Forma), jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5 %.

Injektiokokeita varten solut kasvatettiin ruudutetuilla peitinlaseilla (Bellco, Vineland, NJ, USA). Numeroita ja kirjaimia sisältävä ruudukko helpotti transfektoitujen solujen löytämistä maljalta injektiota seuraavana päivänä. Ennen käyttöä ruudutetut peitinlasit kiinnitettiin hammasvahalla \varnothing 6 cm:n maljoihin. Maljoihin oli etukäteen tehty reikä peitinlasia varten. Tällöin maljan muovinen pohja ei häiritse mikroskopointia vaan soluja päästään kuvaamaan elävinä käänteismikroskoopilla peitinlasin läpi.

3.2. GFP-vinkuliiniplasmidi

Tutkimuksessa käytetty GFP-vinkuliiniplasmidi (Kuva 2) on saatu lahjoituksena professori Benjamin Geigerilta Weizmann-instituutista Israelista. GFP-vektoriin on liitetty vinkuliinia koodaava insertti. Nisäkässoluihin siirrettynä plasmidi tuottaa GFP-vinkuliinin fuusioproteiinia, jossa GFP on liitetty vinkuliinin N-terminaaliseen päähän. FM Essi Myrskyn pro gradu-työn yhteydessä (Oulun yliopisto, Biokemian laitos, 2003) vinkuliinin hännästä on sekvensoitu osa, jonka avulla tehdyn sekvenssivertailun perusteella on todettu kyseessä olevan kanan vinkuliinia (EMBL: GGVINX J014126).



Kuva 2. GFP-vinkuliiniplasmidin kaavakuva.

3.3. Plasmidin tuotto

3.3.1. Transformaatio kompetentteihin soluihin

GFP-vinkuliiniplasmidi transformoitiin kompetentteihin *E. coli* TOP10-soluihin (100mM CaCl₂, 15 % glyseroli). TOP10-solut saatiin käyttöön bioprosessitekniikan laitokselta (FT Johanna Veijola, Bioprosessitekniikan laitos, Oulun yliopisto). Transformaatiossa solut sulatettiin nopeasti, vorteksoitiin ja asetettiin jäähautteeseen 10 minuutiksi. Solususpensioon (100µl) lisättiin 100ng plasmidia ja tätä seosta pidettiin jäähautteessa 30 minuuttia. Transformaatioseokselle annettiin lämpöshokki (45s, 42°C), jolloin DNA menee solujen sisään. Lämpöshokin jälkeen soluja pidettiin jäähautteessa 2 minuuttia. Soluille lisättiin 1ml kasvatuslientä (LB) ja kasvatettiin +37°C:ssa ravistelijassa 1h. Tänä aikana vektorin antibioottiresistenssigeeni ehtii ekspressoitua. Solut maljattiin LB-ampisilliinimaljoille, joilla vain transformoituneet bakteerisolut kykenevät kasvamaan ampisilliiniresistenssin ansiosta. Transformoituneita bakteereja kasvatettiin maljoilla lämpökaapissa yön yli.

3.3.2. Plasmidin eristys bakteerisoluista

Maljoilta poimittiin toisistaan erillään olevia bakteeripesäkkeitä 3ml:aan LB-ampisilliinilientä. Bakteereja kasvatettiin +37°C:ssa ravistelijassa yön yli. Plasmidi eristettiin bakteereista kaupallisella kitillä (NucleoSpin® Plasmid QuickPure, Macherey-Nagel, Düren, Saksa) valmistajan ohjeen mukaan ja eluoitiin lopuksi steriilillä vedellä.

3.3.3. Plasmidi-DNA:n geelielektroforeesi

Eristetty plasmidi-DNA analysoitiin agarosigeelielektroforeesin avulla. 1 % agarosigeeli valmistettiin 1xTAE-puskuriin. Analysointia varten plasmidia digestoitiin kahdella restriktioentsyymillä, jotka molemmat katkaisevat plasmidin yhden kerran. Digestioreaktioon käytettiin *XbaI*- ja *EcoRV*-restriktioentsyymejä (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Geeliin ladattiin molekyylipainomarkkeria (GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas, Saksa) sekä digestoitua ja digestoimatonta GFP-vinkuliiniplasmidia. Geeliä ajettiin 80V:n jännitteellä noin tunti. Geeliltä tarkistettiin plasmidin koko ja katkeaminen, jotta voitiin päätellä oliko eristetty plasmidi oikea. GFP-vinkuliiniplasmidin koko on noin 10 000 emäsparia, josta vinkuliinin osuus on 3247 emäsparia. Restriktioentsyymien katkaiseman palan pituus on noin 1900 emäsparia.

3.4. GFP-vinkuliinin mutaatio

3.4.1. Insertin tuotto PCR-tekniikalla

Aminohappojen 1016-1066 poistamista varten suunniteltiin PCR-alukkeet, joissa hyödynnettiin vinkuliinin sekvenssistä löytyvää *EcoRV*- ja vektorista heti vinkuliinigeenin jälkeen löytyvää *XbaI*-restriktioentsyymien katkaisukohtaa (Taulukko 2). Näin vinkuliinin geeniin voitaisiin vaihtaa osa, joka koodaa halutun mutaation. Koodaavan juosteen *EcoRV*-katkaisukohtaan suunniteltiin 5'→3'-aluke (sense-aluke) ja mutaatiokohtaan 3'→5'-aluke (antisense-aluke). Antisense-alukkeeseen tehtiin stop-kodoni (TGA) aminohapon 1016 kohdalle ja sen perään *XbaI*-entsyymien katkaisukohta (TCTAGA). Mutaatioinsertti tuotettiin PCR-tekniikalla polymeraasin valmistajan ohjeen mukaan (Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes, Helsinki, Suomi).

Taulukko 2. Työssä käytetyt alukkeet

Aluke	Sekvenssi
Sense +1280	ATTGTGTGAGGAGCCTAAAG
Antisense -3066	CTAGTCTAGATCATTCTTCATCGCTGATGTTA

3.4.2. Insertin puhdistus

PCR-tekniikalla tuotetun insertin koko tarkistettiin geielektroforeesilla. Insertin pituus on noin 1900 emäsparia. Insertti puhdistettiin liuoksesta puhdistuskitillä valmistajan ohjeen mukaan (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences, NJ, USA).

3.4.3. Insertin ja vektorin digestio

Sekä insertti että GFP-vinkuliinivektori digestoitii *EcoRV*- ja *XbaI*- restriktioentsyymeillä valmistajan ohjeen mukaan. Näin saatiin kohessiiviset päät ligaatiota varten. Vektorin digestoituminen tarkistettiin geielektroforeesilla (Kuva 3). Oikea fragmentti puhdistettiin geelistä kitillä (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences, NJ, USA) ja käytettiin ligaatioreaktioon.



Kuva 3. GFP-vinkuliinin ja pcr-tuotteen koon tarkistus agarosigeelielektrofooresilla. Vektori ja insertti on digestoitu *EcoRV*- ja *XbaI*-restriktioentsyymeillä ja puhdistettu. Molekyylipainomarkkerina (st) on GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Mix, Fermentas. Digestoidun vektorin (A, B) koko on noin 7,5 kb. Digestoidun PCR-tuotteen (D) koko on noin 1,9 kb. Kuvassa myös toinen (C) eri kohtaan suunniteltu mutaatioinsertti.

3.4.4. Ligaatio ja transformaatio

Digestion jälkeen insertti ja vektori liitettiin yhteen T4-ligaasilla (New England Biolabs, MA, USA) valmistajan ohjeen mukaan. Ligaatioseos transformoitiin kompetentteihin *E. coli* TOP 10-soluihin ja maljattiin LB-ampisilliinimaljoille. Transformoituja bakteereja kasvatettiin maljoilla lämpökaapissa +37°C:ssa yön yli.

3.4.5. Mutaation tarkistus sekvensoimalla

Maljoilta poimittiin toisistaan erillään olevia bakteeripesäkkeitä 3ml:aan kasvatuslientä (LB). Bakteereja kasvatettiin yön yli ja niistä eristettiin plasmidit. Useita klooneja tarkastettiin ensin geelielektroforeesilla ja oikeiden kloonien löytämiseksi lupaavimmat sekvensoitiin. Sekvensoinnissa käytettiin kittiä (DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing kit, Amersham Biosciences, NJ, USA). Sekvensointi suoritettiin Oulun yliopiston lääketieteellisen biokemian laitoksella automaattisella sekvenaattorilla. Geelijaon suoritti laboratoriohoitaja Outi Laurila. Mutaation onnistuminen tarkastettiin sekvenssistä. Onnistuneita klooneja oli useita. Mutaation sisältävistä klooneista eristettiin plasmidit transfektiokokeita varten.

3.5. Solujen transfektio mikroinjeksiolla

Koska epiteelisolut ovat differentioituneita ja niillä on selkeät solu-soluliitokset, niitä on vaikea transfektoida liposomien tai kalsiumfosfaattipresipitaation avulla solujen vaurioitumatta. Tästä johtuen menetelmäksi valittiin mikroinjektio.

Mikroinjektio suoritettiin Eppendorfin mikromanipulaattorilla 5171 ja mikroinjektorilla 5246 (Eppendorf, Hampuri, Saksa) asennettuna Axiovert 405 M käänteismikroskooppiin (Zeiss, Oberkochen, Saksa). Mikroinjektiokokeita varten solut kasvatettiin peitinlaseilla, joissa oli numeroita ja kirjaimia sisältävä ruudukko. Ruudukon tarkoituksena oli helpottaa transfektoitujen solujen löytämistä seuraavana päivänä. Injektiota varten plasmidit laimennettiin injektiopuskuriin (100mM KCl, 5mM HEPES, pH 7.25) pitoisuuteen 50ng/μl ja suodatettiin, jotta mikroinjektioneula ei tukkeutuisi. Oikean pH:n ylläpito injektion aikana on tärkeää, koska solut halutaan säilyttää mahdollisimman hyväkuntoisina. Tästä johtuen injektion ajaksi kasvatusmediumin tilalle vaihdettiin Medium 199 Hanksin suoloilla (Gibco), joka on tarkoitettu pitämään pH neutraalina avoimessa ilmakehässä. Yhden mikroinjektiokokeen aikana injektioitiin 1-2 ruutua eli noin 100-200 solua. Injektoitavat solut valittiin niin, etteivät solusaarekkeet ehtisi kasvaa seuraavan vuorokauden aikana liian tiheiksi. Mikroinjektion jälkeen solut laitettiin kasvatusmediumissaan takaisin soluviljelykaappiin toipumaan injektioista. Vuorokauden kuluttua injektioituja soluja tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla.

3.6. Kalvopotentialin ja solunsisäisen pH:n muutokset

3.6.1. Fysiologisten olosuhteiden merkitys

Vinkuliinin konformaatio ja interaktiot erityisesti lipidien kanssa riippuvat ympäristön pH:sta ja solun membraanipotentialista (Miller ja Ball, 2001; Palovuori ym., 2004). Solujen pH:n ja membraanipotentialin muutokset liittyvät sikiökautiseen kehitykseen, jossa vinkuliinilla oletetaan olevan tärkeä rooli. Tutkimuksissa on havaittu, että poistogeeniset hiiret, joilta puuttuu vinkuliini, kuolevat varhaisessa vaiheessa sikiönkehityksen aikana (Xu ym., 1998a). Siksi GFP-vinkuliinin lokalisaatiota MDBK-soluissa haluttiin tarkastella myös depolarisoivissa ja happamissa olosuhteissa.

3.6.2. Solujen depolarisointi

Nigerisiini on ionofori, joka vaihtaa K^+ - ja H^+ -ioneja solukalvon läpi niin, että niiden konsentraatio solun sisällä on yhtä suuri kuin solun ulkopuolella. Sen avulla voidaan vaikuttaa solunsisäiseen pH-arvoon ja toisaalta solun membraanipotentialiin. Kun solun ulkopuolen K^+ -ionien konsentraatio nousee ja solukalvo on ioneja läpäisevä, solukalvon membraanipotentiali lähenee nollaa. Solukalvo depolarisoituu ja sen varaukset neutraloituvat.

Mikroinjektoimalla transfektoituja soluja tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla. Solut depolarisoitiin vaihtamalla injektiopuskurin tilalle KCl-nigerisiinipuskuri (140mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 0,5mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 5 μ M nigerisiini, pH 7,5). Tällöin solunsisäinen pH pysyy neutraalina, mutta kalvopotentiali lähenee nollaa ja solukalvo depolarisoituu. Depolarisaation vaikutusta GFP-vinkuliinin lokalisaatioon kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla.

3.6.3. Solujen pH:n alentaminen

GFP-vinkuliinin lokalisaatiota soluissa tutkittiin myös alentamalla solujen sisäistä pH:ta. pH:ta muutettiin KCl-nigerisiinipuskurilla, jonka pH oli 5,5. Nigerisiinin vaikutuksesta solunsisäinen pH laskee ja solukalvo depolarisoituu. Soluliman happamoitumisen vaikutusta GFP-vinkuliinin lokalisaatioon seurattiin elävillä soluilla fluoresenssimikroskoopilla.

3.7. Immunofluoresenssivärjäys

3.7.1. Solujen fiksaus ja värjäys

Fluoresenssimikroskopiaa varten transfektoituja soluja fiksoitiin ja värjättiin. Ennen fiksausta solut pestiin Hanksin suolaliuoksella huoneenlämmössä. Soluja fiksattiin 15 minuuttia 1 %:lla paraformaldehydillä (PFA), joka oli laimennettu fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS). PFA pestiin pois PBS:llä. Fiksaation jälkeen soluja permeabilisoitiin 0,2 %:lla Triton-liuoksella 15 minuuttia (Triton X-100 PBS-puskurissa). Soluja pestiin kylmällä PBS:llä. Primäärivasta-aineen annettiin sitoutua 30 minuuttia +4°C:ssa. Vasta-aineen ylimäärä pestiin pois PBS-glysiinillä. Fluoroforiin liitetyn sekundäärisen vasta-aineen annettiin vaikuttaa 30 minuuttia +4°C:ssa. Lopuksi solut pestiin PBS-glysiinillä ja vielä vedellä. Solujen päälle kiinnitettiin peitinlasi petausaineella (Shandon Immu-Mount, Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA, USA).

3.7.2. Vasta-aineet

Transfektoiduista soluista värjättiin proteiineja, jotka paikantuvat soluliitoksissa yhdessä vinkuliinin kanssa. Vyöliitoksista värjättiin transmembraaniproteiini kadheriini kanin polyklonaalisella anti-pankadheriinivasta-aineella (ZyMed, South San Francisco, CA, USA). Fokaaliadheesioista värjättiin endogeeninen vinkuliini hiiren monoklonaalisella

anti-vinkuliinilla (Sigma), ja α -kateniini monoklonaalisella vasta-aineella, jonka oli ystävällisesti lahjoittanut Margaret Wheelock (Eppley Institute, University of Nebraska, Omaha, USA). Sekundäärisinä vasta-aineina käytettiin Texas-Red anti-kania, sekä Alexa 488 anti-hiirtä ja Texas-Red anti-hiirtä (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Vasta-aineet laimennettiin PBS-glysiiniin suhteessa 1:100. Aktiinifilamentit värjättiin Alexa 568 falloidiinilla (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

3.8. Fluoresenssimikroskopia

GFP-vinkuliini havainnoitiin epiteelisoluista fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss Axiovert 405M), johon on liitetty CoolSnap-videokamera (Roper Scientific Inc., Duluth, GA, USA) ja MetaMorph-kuvantamisohjelma (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA) käyttäen 40x ja 100x suurennoksia tai Olympus Cell M videomikroskoopilla (Olympus Europe, Hampuri, Saksa) käyttäen 40x vesi-immersio-objektiivia.

3.9. Konfokaalimikroskopia

Fiksoidut näytteet kuvattiin Olympus FluoView 1000 – konfokaalimikroskoopilla käyttäen 60x öljyimmersion-objektiivia.

4. Tulokset

4.1. Plasmidin tuotto ja transfektio soluihin

4.1.1. GFP-vinkuliiniplasmidi

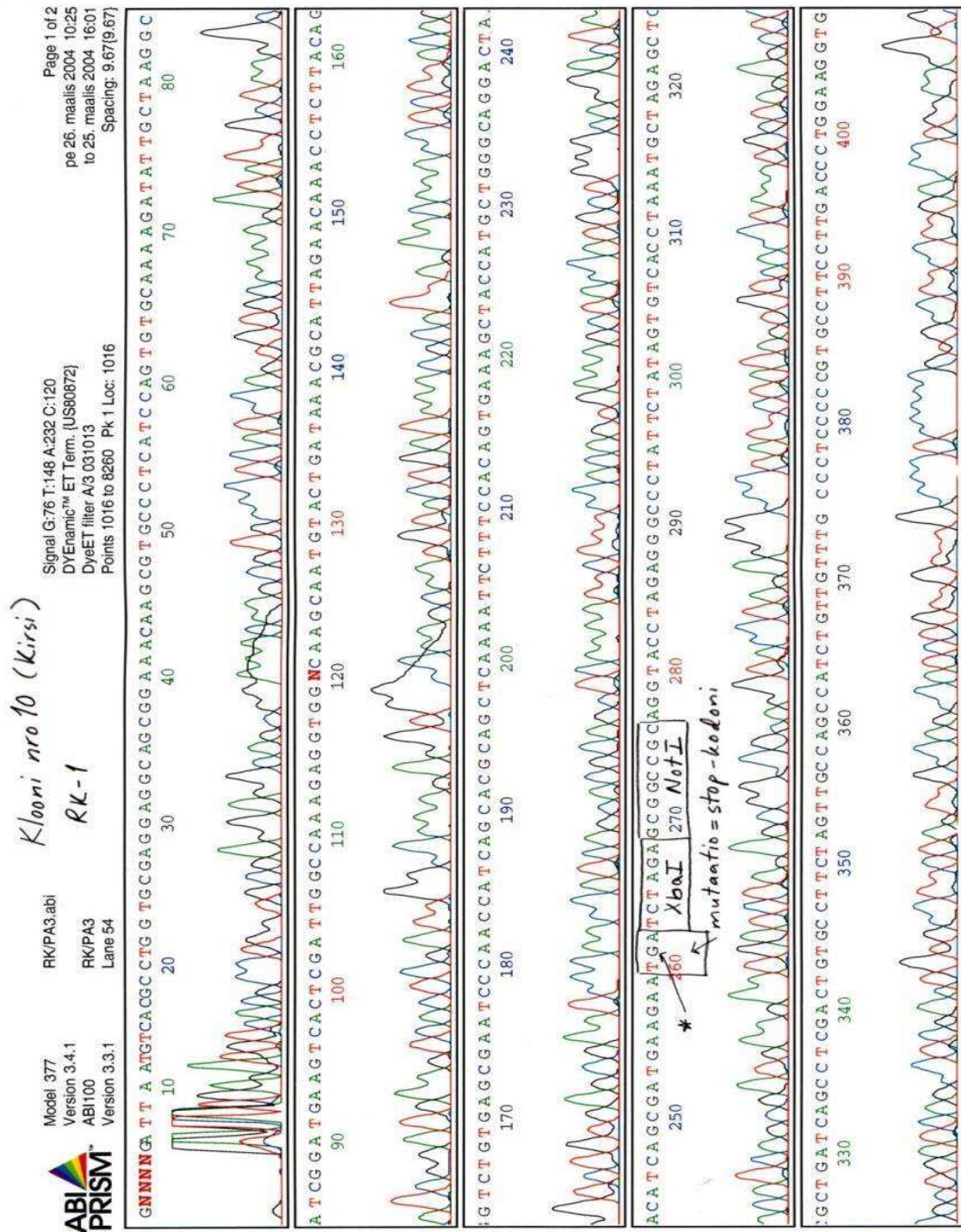
Weizmann-instituutista saatua GFP-vinkuliiniplasmidia tuotettiin bakteerisoluihin. Plasmidista tarkistettiin sellaisten katkaisukohtien löytyminen, joita aiottiin hyödyntää mutaation tuottamisessa.

4.1.2. Mutaatio vinkuliinigeenissä

Vinkuliinin häntään suunniteltu mutaatio tuotettiin PCR-tekniikalla ja liitettiin vinkuliinigeeniin. Mutaation onnistuminen tarkistettiin sekvensoimalla. Halutussa kohdassa eli aminohapon 1016 jälkeen sekvenssissä oli stop-kodoni joten mutaatio oli onnistunut ja proteiinista puuttui viimeiset 50 aminohappoa (kuva 4).

4.1.3. Transfektiot

Mikroinjektio osoittautui toimivaksi transfektio menetelmäksi sekä epiteelisoluille että fibroblasteille.



Kuva 4. Kanan vinkuliinisekvenssi, johon on osoitettu mutaatiokohta aminohapon 1016 jälkeen. Stop-kodonin jälkeen sekvenssissä sijaitsee *XbaI*-restriktioentsyymien katkaisukohta, jota työssä hyödynnetään.

4.2. GFP-vinkuliinin lokalisaatio

4.2.1. Kvanttaminen

Transfektoituja soluja kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla. Soluja kuvattiin sekä elävinä että fiksattuina ja värjättyinä. Soluista havainnoitiin GFP-vinkuliinin liittymistä erilaisiin adheesiorakenteisiin. Ensin kuvattiin endogeenisen vinkuliinin lokalisaatio MDBK-soluissa (kuva 5). Vinkuliinia esiintyi fokaaliadheesioissa ja solu-soluliitoksissa, missä se kolokalisoitui aktiinin ja kadheriinin kanssa.

4.2.2. GFP-vinkuliinin lokalisaatio soluissa

Epiteelisoluissa GFP-vinkuliini lokalisoitui vyöliitoksiin ja fokaaliadheesioihin kuten endogeeninen vinkuliinikin (kuvat 5. ja 6.). Vyöliitoksissa se kolokalisoitui aktiinin, kadheriinien ja α -kateniinin kanssa (kuva 6.). Fibroblasteissa GFP-vinkuliini lokalisoitui fokaaliadheesioihin (kuva 8).

4.2.3. Depolarisaatio

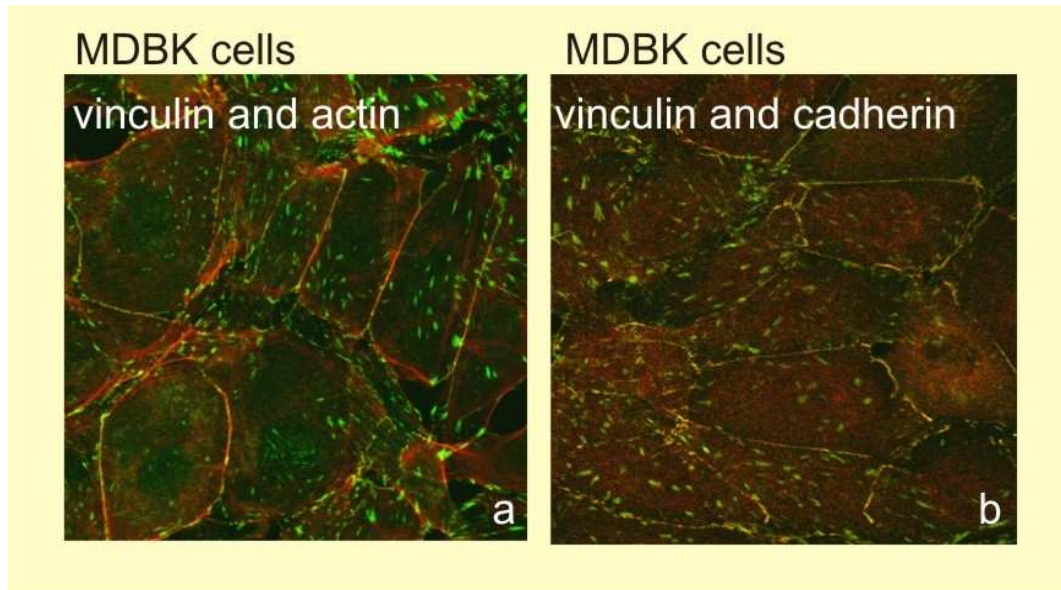
GFP-Vinkuliinin vaikutusta soluissa tutkittiin myös erilaisissa elektrofysiologisissa olosuhteissa. Kun transfektoitujen MDBK-solujen solukalvot depolarisoitiin KCl-nigerisiiniliuoksella, huomattiin, että fokaaliadheesioihin sitoutunut GFP-vinkuliini alkoi irrota jo melko pian depolarisaation jälkeen, eikä enää sitoutunut takaisin fokaaliadheesioihin (kuva 7B). 3T3-soluilla depolarisaatio myös aiheutti GFP-vinkuliinin irtoamisen fokaaliadheesioista (kuva 8B). Siten ilmiö ei ollut riippuvainen solutyypistä.

4.2.4. pH:n alentaminen

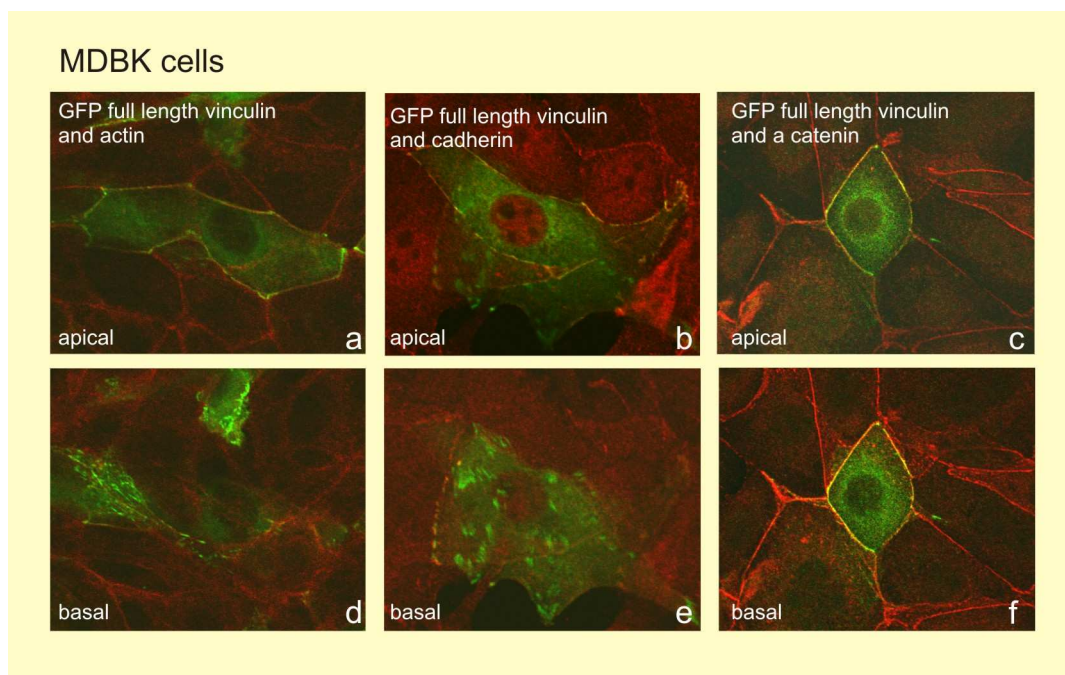
Kun MDBK-solujen pH alennettiin, GFP-vinkuliini assosioitui voimakkaasti solu-soluliitoksiin ja GFP-vinkuliinin määrä vyöliitoksissa kasvoi koko seuranta-ajan, 120 minuuttia (kuva 7C).

4.2.5. Muunnellun GFP-vinkuliinin lokalisaatio epiteelisoluissa

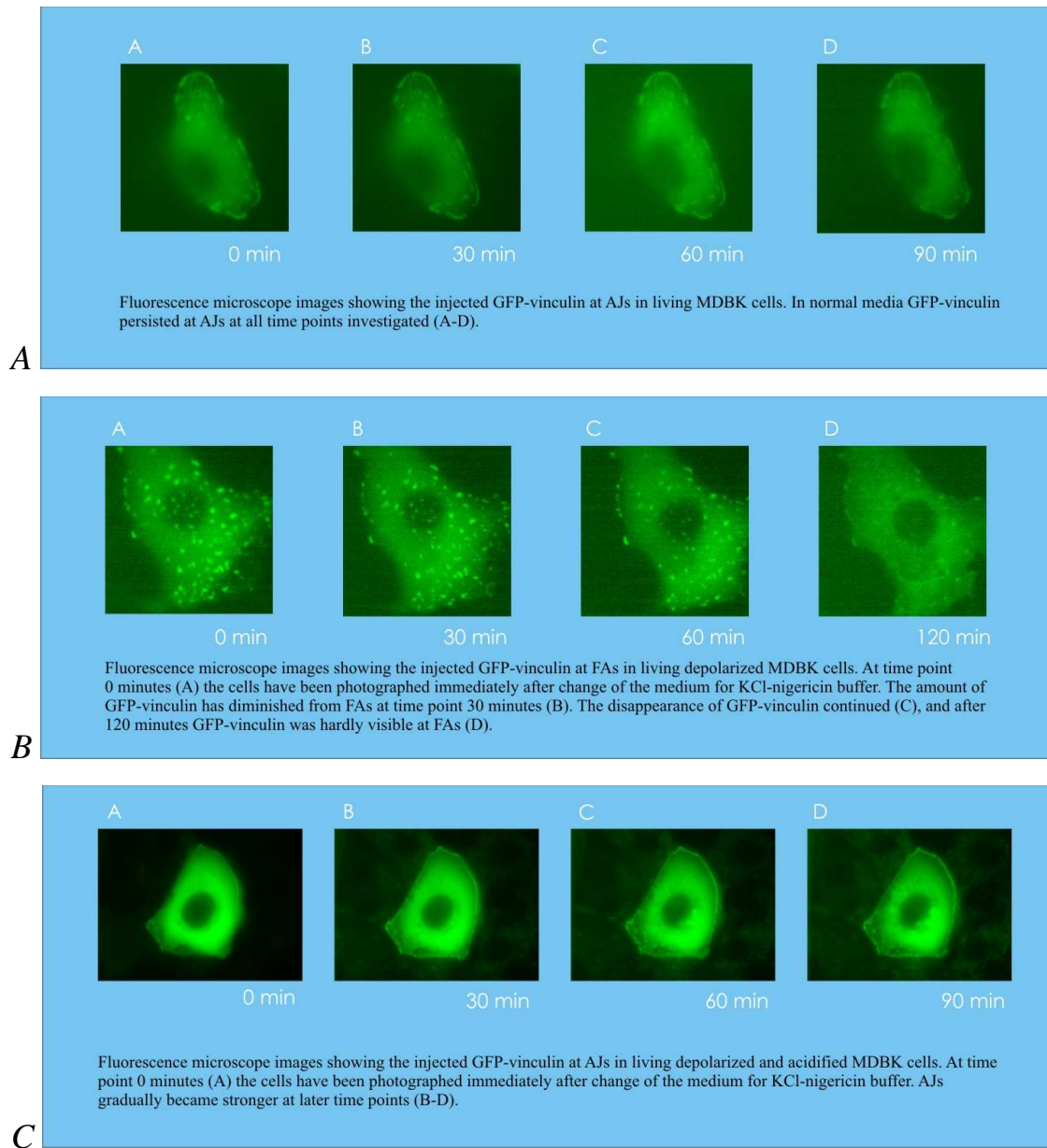
Mutatoitua GFP-vinkuliinia transfektoitiin MDBK-soluihin ja tarkasteltiin sen sitoutumista adheesiorakenteisiin elävissä soluissa. Mutatoitu GFP-vinkuliini assosioitui fokaaliadheesioihin ja aiheutti niiden irtoamisen solualustasta ja kertymisen solun sisälle. Solu-matriksisidosten rikkoutuminen aiheutti myös solujen irtoamisen alustasta. Sen sijaan solu-soluliitokset näyttivät säilyvän pidempään ehjinä (kuva 9).



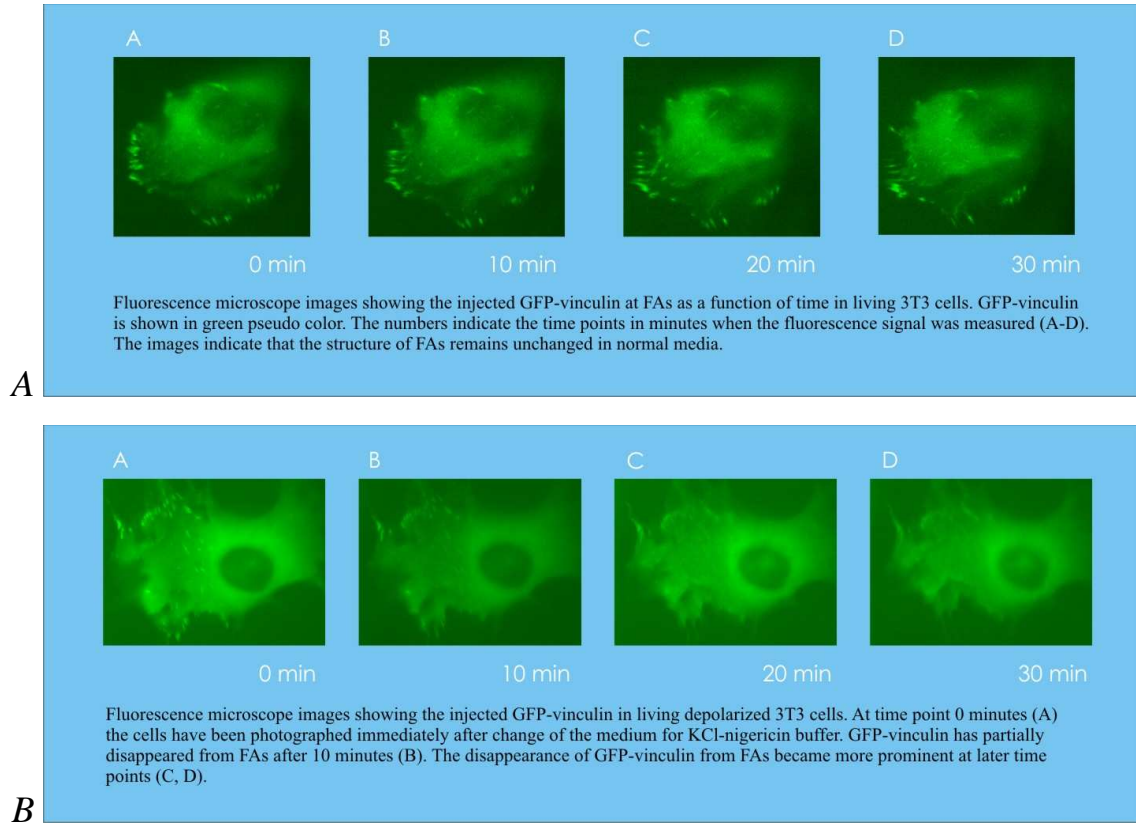
Kuva 5. Konfokaalimikroskooppikuvat MDBK-soluista, joissa on kuvattu endogeenisen vinkuliinin kolokalisaatio aktiinin kanssa (a) ja kadheriinin kanssa (b). Vinkuliini näkyy vihreänä, muut proteiinit punaisena ja niiden kolokalisaatio keltaisena.



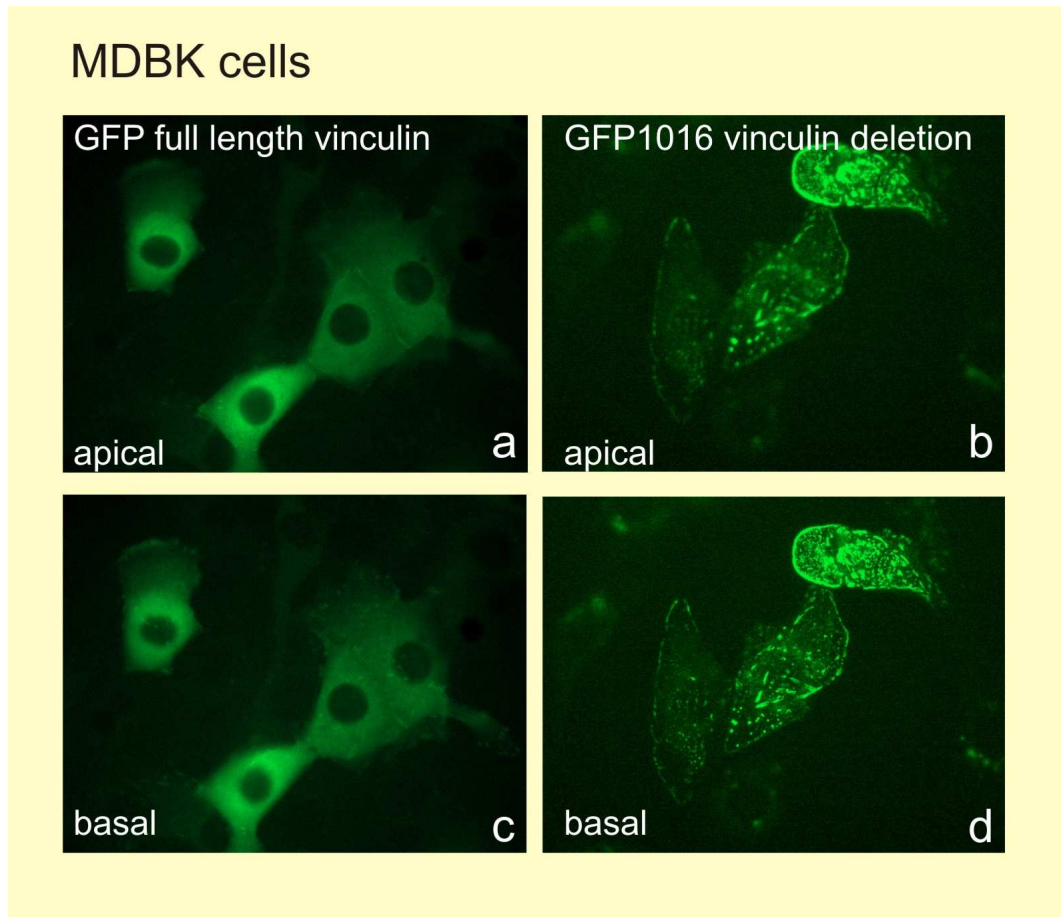
Kuva 6. Konfokaalimikroskooppikuvat MDBK-soluista, joissa on kuvattu transfektoidun GFP-vinkuliinin kolokalisaatio aktiinin kanssa (a, d), kadheriinin kanssa (b, e) ja α -kateniini kanssa (c, f). Vinkuliini näkyy vihreänä, muut proteiinit punaisena ja niiden kolokalisaatio keltaisena. Soluista on kuvattu apikaalinen kerros (a, b, c) ja basaallinen kerros (d, e, f).



Kuva 7. GFP-vinkuliinin sijainti elävissä MDBK-soluissa kuvattuna fluoresenssimikroskoopilla eri aikapisteissä mediumin vaihdon jälkeen. A: Kontrollinäyte normaalimediuimissa. B: Depolarisoiva medium. C: Depolarisoiva hapan medium.



Kuva 8. GFP-vinkuliinin sijainti elävissä 3T3-soluissa kuvattuna fluoresenssimikroskoopilla eri aikapisteissä mediumin vaihdon jälkeen. A: Kontrollinäyte normaalimediuissa. B: Depolarisoiva medium.



Kuva 9. GFP-vinkuliinin (a, c) ja mutatoitun GFP-vinkuliinin (b, d) sijainti elävissä MDBK-soluissa kuvattuna fluoresenssimikroskoopilla vuorokausi transfektion jälkeen. Soluista on kuvattu apikaalinen kerros (a, b) ja basaalin kerros (c, d).

5. Tulosten tarkastelu

Solu-soluliitoskohtien proteiinien sitoutumisesta solun sisäiseen tukirankaan on viime vuosina saatu paljon uutta tietoa. On osoitettu, että liitokset ovat hyvin dynaamisia ja proteiinien vuorovaikutukset jatkuvassa muutoksessa. Drees ym. (2005) on osoittanut, että α -kateniini toimii näiden vuorovaikutusten säätelijänä. He osoittivat, että monomeerinen α -kateniini sitoutuu voimakkaammin E-kadheriini- β -kateniinikompleksiin, kun taas dimeerinen α -kateniini sitoutuu aktiinifilamentteihin. Sama ryhmä on osoittanut, että α -kateniini ei sitoudu samanaikaisesti aktiinifilamenttien ja E-kadheriini-kateniinikompleksin kanssa (Yamada ym., 2005). He osoittivat myös, että GFP-vinkuliinin sitoutuminen solu-soluliitoksiin oli paljon dynaamisempi kuin fokaaliadheesioihin (Yamada ym., 2005). Capaldo ja Macara (2007) ovat jopa osoittaneet, että MDCK-solujen epiteelinen morfologia säilyy, vaikka E-kadheriinin ilmentyminen on estetty, kun taas α -kateniinin ilmentymisen esto rikkoi solu-soluliitokset ja muutti solut mesenkymaalisen muotoisiksi. Näin perinteinen stabiilien vyöliitoskompleksien rooli epiteelikudoksen ylläpidossa on osoitettu liian yksinkertaiseksi ja liitokset ovat paljon dynaamisempia kuin on oletettu. Kadheriinikompleksin lisäksi on myös muita solu-soluliitoksia ylläpitämässä epiteelikudoksen yhtenäisyyttä. Tällaisista komplekseista tärkeimpiä ovat tiiviit liitokset ja nektiini-afadiini-ponsiini-(NAP)-kompleksi (Sakisaka ym., 2007).

Vinkuliini osallistuu sekä NAP-kompleksin että kadheriinikompleksin rakentumiseen sitomalla sekä α -kateniinia ja ponsiinia että aktiinia ja α -aktiniinia. Mielenkiintoinen uusi komponentti solu-solukontaktien synnyssä on myosiini VI, joka auttaa epäkypsiä kadheriinikontakteja vahvistumaan jatkuviksi vahvoiksi liitoksiksi (Maddugoda ym., 2007). Vinkuliinin on osoitettu osallistuvan tähän muutokseen järjestämällä aktiinitukirangan ja kadheriinikompleksien välisiä myosiini VI:n välittämiä muutoksia. Siten vinkuliini voi sitoutua kadheriinikompleksiin sekä α -kateniinin että myosiini VI:n välityksellä (Maddugoda ym., 2007).

Vinkuliinilla on rooli myös tuumorigeneesissä. On osoitettu, että vinkuliini (-/-) soluista puuttuu tuumorisuppressorimolekyylä PTEN (phosphatase and tensin homolog), joka on fosfodiesteräasi ja säätelöe fosfoinositoli-3-kinaasi/Akt signaalireittiä (Subauste ym., 2005). PTEN sitoutuu vyöliitoksissa MAGI2-proteiiniin (membrane associated guanylate kinase inverted 2), joka vuorostaan sitoutuu β -kateniiniin. Tekijät osoittivat, että vinkuliini säätelöe PTEN-proteiinin määrää estämällä sen hajoamista pitämällä sen MAGI2-kompleksissa. Siten vinkuliinilla on tärkeä tehtävä myös solusignaloinnissa fosfoinositoli-3-kinaasireitillä. Subauste ym. (2005) ei kuitenkaan osoittanut mekanismia, millä vinkuliini säätelöe β -kateniini-MAGI2-PTEN-kompleksia.

Suurin osa vinkuliinitutkimuksesta käsittelee solu-matriksikontakteja. Tässä työssä halusimme tutkia solu-solukontakteja ja vinkuliinin tehtäviä ja käyttäytymistä vyöliitoksissa. GFP-vinkuliini toimii MDBK-soluissa samalla tavalla kuin solun endogeeninen vinkuliini. Solun tuottama GFP-vinkuliini sitoutuu samoihin rakenteisiin. Ainakaan vinkuliinin N-terminaaliseen päähän liitettynä GFP ei häiritse vinkuliinin sitoutumista. Toisinaan GFP-vinkuliini aiheutti soluissa fuusioita ja polykaryonien syntymistä. Sama ilmiö on havaittu transfektoitaessa soluja TAMRA-vinkuliinilla (Palovuori ym., 2004). GFP-vinkuliinin fuusioita indusoiva vaikutus ei kuitenkaan ollut yhtä voimakas. Eron saattaa selittää se, että TAMRA-vinkuliini injektioitiin soluihin proteiinina ja GFP-vinkuliini plasmidina. Ilmeisesti suuri määrä vapaata vinkuliiniproteiinia vaikutti solujen fuusioitumisherkkyteen. Solun itse tuottaessa proteiinin sitä ei muodostu niin nopeasti ylimäärin, jolloin fuusioherkkyyskin pienenee. Toki mikroinjektio itsessään voi myös indusoida fuusioita (Palovuori ym., 2004).

Koska vinkuliinilla on niin paljon interaktoivia partnereita ja sen konformaatio muuttuu ympäristön vaikutuksesta, halusimme selvittää, miten solun fysikokemialliset muutokset vaikuttavat vinkuliinin sitoutumiseen solu-solukontaktikohtiin. Solun kalvopotentialilla oli selkeä vaikutus ja vinkuliini irtosi fokaaliadheesioista depolarisoivissa olosuhteissa. Bakolitsa ym. (1999) ehdotti, että elektrostaattiset vuorovaikutukset vetävät vinkuliinin hännän positiivisesti varautuneita osia kohti negatiivisesti varautunutta solukalvoa. Depolarisaatio neutraloi solukalvon lipidien varaukset ja mahdollisesti työntää vinkuliinin hännän ulos kalvosta. Vinkuliinin konformaatio voi palata takaisin suljettuun muotoon tai

sen aktiinin tai jonkun muun interaktoivan partnerin sitomiskyky heikkenee muuttuneiden olosuhteiden vaikutuksesta. Sen sijaan happamissa olosuhteissa vinkuliini säilyi ja jopa näytti kertyvän vyöliitoksiin. On osoitettu, että pää-häntäsidos heikkenee, jos pH on <7 , mikä edistää vinkuliinin sitoutumista mm. aktiiniin (Miller ym., 2001). Myös hännänpään lipidisitomiskyky paranee alhaisessa pH:ssa (Bakolitsa ym., 1999). Palovuoren ym. (2004) tutkimusten mukaan MDBK-solujen depolarisaatio irrottaa endogeenisen vinkuliinin ja aktiinin toisistaan ja lateraalista seinämistä hyvin nopeasti. Jos soluja pidetään depolarisoivissa olosuhteissa pidempään, endogeeninen vinkuliini häviää seiniltä kokonaan, samoin kuin fokaaliadheesioista. Ympäristön happamoituminen lisää vinkuliinin sitoutumista lipideihin tai muihin sitoutumispartnereihin vyöliitoksissa.

Mutatoitu GFP-vinkuliini aiheutti fokaaliadheesioiden järjestäytymisessä häiriöitä. Hännän aktiinin ja lipidin sitoutumispaikkojen puuttuminen ilmeisesti heikentää liitoskomplekseja niin huomattavasti, etteivät ne enää pysy koossa. Fokaaliadheesioiden rakenne on häiriintynyt ja ne eivät ole kiinni matriksissa, vaan kertyvät solu sisäosiin. Yleensä fokaaliadheesiot ovat järjestäytyneet solujen laitamille. Puutteellinen kiinnittäytyminen alustaan vaikuttaa myös solujen muotoon estäen solujen normaalin levittäytymisen alustalleen. Chandrasekar ym. (2005) on myös tutkinut vinkuliinin häntäosan mutaatioiden vaikutusta fokaaliadheesioihin. He poistivat pistemutaatioilla vinkuliinin hännästä lipidejä sitovat emäksiset alueet aktiinin sitomisen pysyessä ennallaan. Lipidiensitomisen estyminen vähensi solujen liikkumiskykyä, ja solujen fokaaliadheesioiden määrä kasvoi ja niiden rakenne stabiloitui. Vaikutukset olivat siis lievempiä kuin tässä työssä tehdyllä mutaatiolla, jossa sekä lipidien että yksi aktiinin sitomiskohta poistettiin.

Janssen työtovereineen (2006) on tutkinut aktiini-vinkuliinikompleksin rakennetta lähes atomitasolla. He ovat osoittaneet, että aktiini-vinkuliinikompleksin syntyminen on monivaiheinen prosessi. Täyspitkä vinkuliini sitoo aktiinia huonosti. Sen sijaan aktiini ja α -kateniini yhdessä aikaansaavat vinkuliinin vähittäisen aktivoitumisen ja voimakkaan sitoutumisen aktiiniin. Koska α -kateniini on keskeinen molekyyli epiteelikerroksen ylläpidossa (Capaldo ja Macara, 2007), vinkuliini- α -kateniini vuorovaikutus voi olla merkittävä kudosten kehittämisessä ja toiminnassa.

6. Lähdeluettelo

- Bakolitsa, C., D.M. Cohen, L.A. Bankston, A.A. Bobkov, G.W. Cadwell, L. Jennings, D.R. Critchley, S.W. Craig, and R.C. Liddington. 2004. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*. 430:583-586.
- Bakolitsa, C., J.M. de Pereda, C.R. Bagshaw, D.R. Critchley and R.C. Liddington. 1999. Crystal structure of the vinculin tail suggests a pathway for activation. *Cell*. 99:603-613.
- Barstead, R.J. and R.H. Waterston. 1991. Vinculin is essential for muscle function in the nematode. *J. Cell Biol.* 114:715-724.
- Bass, M.D., B. Patel, I.G. Barsukov, I.J. Fillingham, R. Mason, B.J. Smith, C.R. Bagshaw, and D.R. Critchley. 2002. Further characterization of the interaction between the cytoskeletal proteins talin and vinculin. *Biochem J.* 362:761-768.
- Bass, M.D., B.J. Smith, S.A. Prigent, and D.R. Critchley. 1999. Talin contains three similar vinculin-binding sites predicted to form an amphipathic helix. *Biochem J.* 341:257-263.
- Belkin, A.M. and V.E. Kotliansky. 1987. Interaction of iodinated vinculin, metavinculin and α -actinin with cytoskeletal proteins. *FEBS Lett.* 220:291-294.
- Borgon, R.A., C. Vornheim, G. Bricogne, P.R.J. Bois, and T. Izard. 2004. Crystal structure of human vinculin. *Structure* 12:1189-1197.
- Brindle, N.P.J., M.R. Holt, J.E. Davies, C.J. Price, and D.R. Critchley. 1996. The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochem J.* 318:753-757.
- Capaldo, C.T. and I.G. Macara. 2007. Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Moll Biol Cell.* 18:189-200.
- Chandrasekar, I., T.E. Stradal, M.R. Holt, F. Entschladen, B.M. Jockusch, and W.H. Ziegler. 2005. Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover. *J Cell Sci.* 118:1461-1472.
- Coll, J.-L., A. Ben-Ze'ev, R.M. Ezzell, J.L. Rodriguez Fernandez, H. Baribault, R.G. Oshima, and E.D. Adamson. 1995. Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:9161-9165.
- Critchley, D.R. 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:133-139. Katsausartikkeli.
- DeMali, K.A., C.A. Barlow, and K. Burridge. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J. Cell Biol.* 159:881-891.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 123:903-915.
- Ezzell, R.M., W.H. Goldmann, N. Wang, N. Parasharama, and D.E. Ingber. 1997. Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 231:14-26.

- Geiger, B., K.T. Tokuyasu, A.H. Dutton, and S.J. Singer. 1980. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 4127-4131.
- Gilmore, A.P. and K. Burridge. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature*. 381:531-535.
- Gilmore, A.P., P. Jackson, G.T. Waites, and D.R. Critchley. 1992. Further characterisation of the talin-binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J. Cell Sci.* 103:719-731.
- Goldmann, W.H. and D.E. Ingber. 2002. Intact vinculin protein is required for control of cell shape, cell mechanics, and *rac*-dependent lamellipodia formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290:749-755.
- Hazan, R.B., L. Kang, S. Roe, P.I. Borgen, and D.L. Rimm. 1997. Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex. *J. Biol. Chem.* 272:32448-32453.
- Hüttelmaier, S., P. Bubeck, M. Rüdiger, and B.M. Jockusch. 1997. Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur. J. Biochem.* 247:1136-1142.
- Hüttelmaier, S., S. Illenberger, I. Grosheva, M. Rüdiger, R.H. Singer, and B.M. Jockusch. 2001. Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J. Cell Biol.* 155:775-785.
- Hüttelmaier, S., O. Mayboroda, B. Harbeck, T. Jarchau, B.M. Jockusch, and M. Rüdiger. 1998. The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr. Biol.* 8:479-488.
- Ito, S., D.K. Werth, N.D. Richert, and I. Pastan. 1983. Vinculin phosphorylation by the *src* kinase. Interaction of vinculin with phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 258:14626-14631.
- Izard, T., G. Evans, R.A. Borgon, C.L. Rush, G. Bricogne, and P.R.J. Bois. 2004. Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature*. 427:171-175.
- Izard, T., and C. Vornheim. 2004. Structural basis for amplifying vinculin activation by talin. *J. Biol. Chem.* 279:27667-27678.
- Janssen, M.E., E. Kim, H. Liu, L.M. Fujimoto, A. Bobkov, N. Volkmann, and D. Hanein. 2006. Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Moll Cell.* 21:271-281.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1994. An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J. Biol. Chem.* 269:12611-12619.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1995a. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature*. 373:261-264.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1995b. The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210:159-164.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 2000. Actin activates a cryptic dimerization potential of the vinculin tail domain. *J. Biol. Chem.* 275:95-105.
- Johnson, R.P., V. Niggli, P. Durrer, and S.W. Craig. 1998. A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers. *Biochemistry*. 37:10211-10222.
- Jones, P., P. Jackson, G.J. Price, B. Patel, V. Ohanion, A.L. Lear, and D.R. Critchley. 1989. Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J. Cell Biol.* 109:2917-2927.

- Kioka, N., S. Sakata, T. Kawauchi, T. Amachi, S.K. Akiyama, K. Okazaki, C. Yaen, K.H. Yamada, and S. Aota. 1999. Vinexin: A novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.* 144:59-69.
- Kroemker, M., A.-H. Rüdiger, B.M. Jockusch, and M. Rüdiger. 1994. Intramolecular interactions in vinculin control α -actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett.* 355:259-262.
- Maddugoda M.P., M.S. Crampton, A.M. Shewan, and A.S. Yap. 2007. Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol.* 178:529-540.
- Maeda, M., E. Holder, B. Lowes, S. Valent, and R.D. Bies. 1997. Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculin. *Circulation.* 95:17-20.
- Mandai, K., H. Nakanishi, A. Satoh, K. Takahashi, K. Satoh, H. Nishioka, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1999. Ponsin/SH3P12: An 1-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J. Cell Biol.* 144:1001-1007.
- Menkel, AR., M. Kroemker, P. Bubek, M. Ronsiek, G. Nikolai, and BM. Jockusch. 1994. Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. *J. Cell Biol.* 126:1231-1240.
- Miller, G.J., and E.H. Ball. 2001. Conformational change in the vinculin C-terminal depends on a critical histidine residue (His-906). *J Biol Chem.* 276(31):28829-43.
- Miller, G.J., S.D. Dunn, and E.H. Ball. 2001. Interaction of the N- and C-terminal domains of vinculin. *J. Biol. Chem.* 276:11729-11734.
- Myrsky, E. 2003. Vinkuliinin funktio epiteelisoluissa. Oulun yliopisto, Biokemian laitos, pro gradu.
- Niggli, V., D.P. Dimitrov, J. Brunner, and M. Burger. 1986. Interaction of the cytoskeletal component vinculin with bilayer structures analyzed with a photoactivatable phospholipid. *J. Biol. Chem.* 261:6912-6918.
- Olson, T.M., S. Illenberger, N.Y. Kishimoto, S. Huttelmaier, M.T. Keating, and B.M. Jockusch. 2002. Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 105:431-437.
- Opazo Saez, A., W. Zhang, Y. Wu, C.E. Turner, D.D. Tang, and S.J. Gunst. 2004. Tension development during contractile stimulation of smooth muscle requires recruitment of paxillin and vinculin to the membrane. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286:C433-C447.
- Palovuori, R., and S. Eskelinen. 2000. Role of vinculin in the maintenance of cell-cell contacts in kidney epithelial MDBK cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79:961-974.
- Palovuori, R., E. Myrsky, and S. Eskelinen. 2004. Membrane potential and endocytic activity control disintegration of cell-cell adhesion and cell fusion in vinculin-injected MDBK cells. *J Cell Physiol.* 200:417-427.
- Papagrigoriou, E., A.R. Gingras, I.L. Barsukov, N. Bate, I.J. Fillingham, B. Patel, R. Frank, W.H. Ziegler, G.C. Roberts, D.R. Critchley and J. Emsley. 2004. Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle. *EMBO J.* 23:2942-51.
- Price, G.J., P. Jones, M.D. Davidson, B. Patel, R. Bendori, B. Geiger, D.R. Critchley. 1989. Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochem. J.* 259:453-461.
- Rodríguez Fernández, J.L., B. Geiger, D. Salomon, and A. Ben-Ze'ev. 1992a. Overexpression of vinculin suppresses cell motility in BALB/c 3T3 cells. *Cell Motil. Cytoskel.* 22:127-134.

- Rodríguez Fernández, J.L., B. Geiger, D. Salomon, and A. Ben-Ze'ev. 1993. Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *J. Cell Biol.* 122:1285-1294.
- Rodríguez Fernández, J.L., B. Geiger, D. Salomon, I. Sabanay, M. Zöller, and A. Ben-Ze'ev. 1992b. Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J. Cell Biol.* 119:427-438.
- Rüdiger, M., N. Korneeva, C. Schwienbacher, E.E. Weiss, and B.M. Jockusch. 1998. Differential actin organization by vinculin isoforms: implications for cell type-specific microfilament anchorage. *FEBS Lett.* 431:49-54.
- Sakisaka, T., W. Ikeda, H. Ogita, N. Fujita, and Y. Takai. 2007. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 19:593-602. Katsausartikkeli.
- Samuels, M., R.M. Ezzel, T.J. Cardozo, D.R. Critchley, J.-L. Coll, and E.D. Adamson. 1993. Expression of chicken vinculin complements the adhesion-defective phenotype of a mutant mouse F9 embryonal carcinoma cell. *J. Cell Biol.* 121:909-921.
- Schwienbacher, C., B.M. Jockusch, and M. Rüdiger. 1996. Intramolecular interactions regulate serine/threonine phosphorylation of vinculin. *FEBS Lett.* 384:71-74.
- Steimle, P.A., J.D. Hoffert, N.B. Adey, and S.W. Craig. 1999. Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274:18414-18420.
- Strasser, P., M. Gimona, M. Herzog, B. Geiger, and J.V. Small. 1993. Variable and constant regions in the C-terminus of vinculin and metavinculin. *FEBS Lett.* 317:189-194.
- Subauste, M.C., P. Nalbant, E.D. Adamson, and K.M. Hahn. 2005. Vinculin controls PTEN protein level by maintaining the interaction of the adherens junction protein beta-catenin with the scaffolding protein MAGI-2. *J Biol Chem.* 280:5676-81.
- Turner, C.E., J.R. Glenney, and K. Burridge. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* 111:1059-1068.
- Weekes, J., S.T. Barry, and D.R. Critchley. 1996. Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- and C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem. J.* 314:827-832.
- Weiss, E.E., M. Kroemker, A.-H. Rüdiger, and B.M. Jockusch. 1998. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between α -catenin and vinculin. *J. Cell Biol.* 141:755-764.
- Weller, P.A., E.P. Orgyzko, E.B. Corben, N.I. Zhidkova, B. Patel, G.J. Prize, N.K. Spurr, V.E. Koteliansky, and D.R. Critchley. 1990. Complete sequence of human vinculin and assignment of the gene to chromosome 10. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:5667-5671.
- Winkler, J., and B.M. Jockusch. 2001. 3-Dimensional organization of the N-terminal vinculin head fragment. *Eur. J. Cell Biol.* 80:201-206.
- Winkler, J., H. Lünsdorf, and B.M. Jockusch. 1996. The ultrastructure of chicken gizzard vinculin as visualized by high-resolution electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 116:270-277.
- Witt, S., A. Zieseniss, U. Fock, B.M. Jockusch, and S. Illenberger. 2004. Comparative biochemical analysis suggests that vinculin and metavinculin cooperate in muscular adhesion sites. *J. Biol. Chem.* 279:31533-31543.

- Wood, C.K., C.E. Turner, P. Jackson, and D.R. Critchley. 1994. Characterisation of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J. Cell Sci.* 107:709-717.
- Xu, H., H. Baribault, and E.D. Adamson. 1998a. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development.* 125:327-337.
- Xu, H., J.-L. Coll, and E.D. Adamson. 1998b. Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J. Cell Sci.* 111:1535-1544.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weiss, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell.* 123:889-901
- Zemljic-Harpf, A.E., S. Ponrartana, R.T. Avalos, M.C. Jordan, K.P. Roos, N.D. Dalton, V.Q. Phan, E.D. Adamson, and R.S. Ross. 2004. Heterozygous inactivation of the vinculin gene predisposes to stress-induced cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* 165:1033-1044.

Liite 1.

Liuosten valmistusohjeita

LB-liemi

1 % tryptoni
0,5 % hiivauute
0,5 % NaCl

LB-ampisilliiniliemi

1 % tryptoni
0,5 % hiivauute
0,5 % NaCl
100µg/ml ampisilliini

LB-ampisilliinimaljat

1 % tryptoni
0,5 % hiivauute
0,5 % NaCl
1,5 % agar
100µg/ml ampisilliini

KCl-nigerisiinipuskuri

140mM KCl
2mM CaCl₂
1mM MgCl₂
0,5mM KH₂PO₄
20mM HEPES
5µM nigerisiini
pH 7,5 tai 5,5

1xTAE-puskuri

0,04M Tris-asettaatti

0,001M EDTA

pH 8,0

PBS

0,01M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$

145mM NaCl

pH 7,2

Injektiopuskuri

100mM KCl

5mM HEPES

pH 7,25

Hanksin suolaliuos

5mM KCl

0,3mM KH_2PO_4

138mM NaCl

4mM NaHCO_3

0,3mM Na_2HPO_4

5,6mM D-glukoosi