

Pro Gradu -tutkielma

Integriini β 3:n liitetyn vihreää fluoresoivan proteiinin vaikutus solujen tarttumiseen

Henna Puromäki



**Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteen laitos
Solubiologia
2.7.2009**

Alkusanat

Tämä työ on tehty Jyväskylän yliopistossa, bio- ja ympäristötieteen laitoksella solu- ja molekyylibiologian osastolla, Jari Ylänteen tutkimusryhmässä. Työ ajoittui kaikenkaikkiaan ajalle 1.10.2008-31.3.2009.

Kiitos professori Jari Ylänteelle hyvästä ja asiantuntevasta ohjauksesta. Kiitos myös koko solubiologian osaston henkilökunnalle, erityiskiitos Heikki Takalalle neuvoista ja avusta laboratoriotöissä. Samoin kiitos Arja Mansikkaviidalle avusta ja kärsivällisyydestä vastata kysymyksiini. Kiitokset perheelleni tuesta opintojen aikana. Kiitos myös Suomen Akatemialle rahoituksesta.

Tekijä: Henna Puromäki
Tutkielman nimi: Integriini $\beta 3$:n liitetyn vihreää fluoresoivan proteiinin vaikutus solujen tarttumiseen.
English title: Effects of Green Fluorescent Protein Tagged to Integrin $\beta 3$ on Cell Adhesion
Päivämäärä: 2.7.2009 **Sivumäärä:** 37
Laitos: Bio- ja ympäristötieteen laitos
Oppiaine: Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t): prof. Jari Yläne

Tiivistelmä:

Integriinit ovat heterodimeerisiä solukalvon läpäiseviä tarttumisreseptoreja, jotka koostuvat α - ja β -alaysiköistä. Solun sisällä integriinin β -alaysikön soluliman puoleinen osa tarttuu aktiinitukirankaan useiden proteiinien kautta. α -alaysikön soluliman puoleisella osalla on säätelyrooli. Solun ulkopuolella integriinit tarttuvat soluväliaineen osiin, kuten kollageeneihin, fibronectiiniin, fibrinogeeniin ja vitronektiiniin.

Fokaaliadheesiot ovat viljeltyjen solujen integriinivälitteisiä tarttumisrakenteita. Niiden avulla solut saavat tietoa ympäristöstään ja pystyvät vastaamaan ympäristön muutoksiin. Fokaaliadheesioista on löydetty yli 50 proteiinia. Jotkut niistä toimivat rakenteellisessa tehtävässä integriinien ja aktiinin välisenä liitoksena ja toiset säätelytehtävissä. Fokaaliadheesion muodostumisen ja kehittymisen eri vaiheissa sen molekyyli rakenne vaihtelee.

Tässä työssä selvitettiin, miten vihreää fluoresoivan proteiinin lisääminen integriinin $\beta 3$ -alaysikköön vaikuttaa integriinin toimintaan solujen tarttumisen ja leviämisen aikana. GFP vaikuttaa $\alpha I I \beta 3$ -välitteiseen tarttumiseen fibrinogeenillä, mutta ei $\alpha 5 \beta 1$ -välitteiseen tarttumiseen fibronectiinillä. $\alpha I I \beta 3$ -GFP muodosti kuitenkin proteiinikoostumukseltaan normaaleja fokaaliadheesioita. Lisäksi huomattiin, että GFP todennäköisesti hidastaa fokaaliadheesioiden muodostumista.

GFP on melko suuri proteiini, joka integriinin soluliman puoleisessa osassa todennäköisesti häiritsee integriinin toimintaa. GFP voi häiritä tarttumista vaikuttamalla integriinin aktivaatioon tai hidastamalla fokaaliadheesioiden muodostumista tai uudelleen muodostumista.

Avainsanat: $\alpha I I \beta 3$ -integriini, fokaaliadheesio, GFP

Author: Henna Puromäki
Title of thesis: Effects of Green Fluorescent Protein Tagged to Integrin $\beta 3$ on Cell Adhesion
Finnish title: Integriini $\beta 3$:n liitetyn vihreää fluoresoivan proteiinin vaikutus solujen tarttumiseen.
Date: 2.7.2009 **Pages:** 37
Department: Department of Biological and Environmental Sciences
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): prof. Jari Yläne

Abstract:

Integrins are heterodimeric transmembrane cell adhesion receptors that consist of α - and β -subunits. The cytoplasmic tail of integrin β -subunit attaches to actin cytoskeleton via several adaptor proteins. The cytoplasmic tail of α -subunit has a regulatory role. Integrin ectodomain attaches to extracellular matrix components, such as collagens, fibrinogen, fibronectin and vitronectin.

Focal adhesions (FAs) are integrin-mediated adhesion structures in cultured cells. Via focal adhesions cells collect information about their environment and are able to respond to environmental changes. More than 50 proteins have been characterized in focal adhesions. Some of them function to anchor integrins to actin cytoskeleton and some have regulatory roles. During FA formation and maturation adhesion is mediated by different integrins and molecular complexity of contact varies.

The aim of this thesis was to find out whether integrin- $\beta 3$ fusion protein with green fluorescent protein (GFP) is fully functional in $\alpha I I \beta 3$. Cell adhesion assays on fibrinogen-coated surfaces were used to measure the function of recombinant integrin. GFP reduces $\alpha I I \beta 3$ -mediated adhesion on fibrinogen but not $\alpha 5 \beta 1$ -mediated adhesion on fibronectin and retards focal adhesion formation. $\alpha I I \beta 3$ -GFP mediated focal adhesions were normal by protein composition.

GFP is rather big molecule and it is likely to interrupt integrin function. GFP can disturb cell signaling, focal adhesion formation or turnover.

Keywords: Integrin $\alpha I I \beta 3$, focal adhesion, GFP

Sisällysluettelo

Alkusanat.....	1
Tiivistelmä:.....	1
Abstract:.....	1
Sisällysluettelo.....	1
Lyhenteet.....	1
1. Solun tarttuminen.....	7
1.1. Solu-soluliitokset.....	7
1.2. Solu-soluväliaineliitokset.....	8
1.3. Integriinit solun tarttumisessa.....	9
2. Fokaaliadheesiot.....	11
2.1. Fokaaliadheesioiden proteiinit.....	11
2.1.1 Taliini.....	12
2.1.2. Vinkuliini.....	13
2.1.3. Paksilliini.....	15
2.1.4 Fokaaliadheesiokinaasi (FAK, pp125FAK).....	17
2.2. Fokaaliadheesioiden dynamiikka ja säätely.....	18
3. Työn tarkoitus.....	21
4. Materiaalit ja Menetelmät.....	21
4.1. Lokalisaatiokokeet.....	21
4.2. CHO- α Iib β 3-GFP solulinja.....	22
4.3. Adheesiokokeet.....	23
4.4. α Iib-GFP -konstruktin kloonaukset.....	24
5. Tulokset.....	25
6. Tulosten tarkastelu.....	31
LÄHTEET.....	34

Lyhenteet

CHO	Chinese Hamster Ovary -solut
FA	Fokaaliadheesio
FAK	Fokaaliadheesiokinaasi
GEF	Guaaniinukleotidin vaihtaja
GFP	Vihreää fluoresoiva proteiini
ILK	Integriiniin liittyvä kinaasi
NEAA	Ei-välttämättömät aminohapot
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos

1. Solun tarttuminen

Solujen liitokset voidaan jakaa kolmeen luokkaan: tiiviisiin liitoksiin, ankkuroiviin liitoksiin ja kommunikaatioliitoksiin (Alberts ym., 2008). Tiiviit liitokset ovat solujen välisiä klaudiinien ja okkludiinien välittämiä rakenteita, jotka toimivat diffuusioesteenä epiteelissä (Furuse ym., 2002). Ankkuroivat liitokset voivat liittyä solulimassa aktiinisäikeisiin tai välikokoisiin säikeisiin. Kommunikaatioliitoksia ovat aukkoliitokset, kemialliset synapsit ja kasvien plasmodesmit (Alberts ym., 2008).

Aktiinisäikeisiin liittyvät tarttumisliitokset voivat olla joko solujen välisiä, kuten vyöliitokset, tai solu-soluväliaineliitoksia kuten fokaaliadheesiot. Välikokoisiin säikeisiin liittyviä tarttumisrakenteita taas ovat desmosomit solujen välillä ja hemidesmosomit, jotka liittävät solun soluväliaineeseen. Tarttumista välittäviä proteiineja ovat muun muassa kadheriinit ja integriinit. Kadheriinit välittävät pääosin solu-solutarttumista ja integriinit solun liittymistä soluväliaineeseen (yleiskatsaus Chen ja Cumbiner, 2006). Taulukossa 1 on esitetty yksi esimerkki liitosten jaottelusta.

Taulukko 1.

Eukaryoottisolun liitosten jaottelu.

Tiiviit liitokset	Ankkuroivat liitokset	Kommunikaatioliitokset
	1. Aktiiniin tarttuvat liitokset	1. Aukkoliitokset
	- Solu-soluliitokset (vyöliitokset)	2. Kemialliset synapsit
	- Solu-soluväliaineliitokset (fokaaliadheesiot)	
	2. Välikokoisiin säikeisiin tarttuvat liitokset	
	- Solu-soluliitokset (desmosomit)	
	- Solu-soluväliaineliitokset (hemidesmosomit)	

Tässä tutkielmassa keskitytään tarkastelemaan ankkuroivia liitoksia. Jatkossa pääpaino on erityisesti fokaaliadheesioissa ja niihin osallistuvissa integriinireseptoreissa.

1.1. Solu-soluliitokset

Vyöliitokset ovat kadheriinien välittämiä aktiinisäikeisiin liittyviä solu-soluliitoksia epiteelisoluisissa. Ne sijoittuvat solun yläosaan tiiviiden liitosten alapuolelle ja kiertävät koko solun jatkuvana vyöhykkeenä. Solun ulkopuolella kadheriinit muodostavat Ca^{2+} -riippuvaisen liitoksen. Solun sisällä kadheriineihin tarttuvat p120-, α -, β - ja γ -kateniini. Yhdessä kadheriinit ja kateniinit muodostavat toimivan adheesiomolekyyliparin. Solun sisällä α -

kateniini liittyy kadheriini-kateniini-kompleksin aktiinitukirankaan ja toimii vuorovaikutuksessa aktiinia polymerisoivan formiinin kanssa. Kadheriinivälitteiset liitokset ovat tärkeitä monissa alkion kehityksen vaiheissa, kuten blastokystin muodostumisessa, gastrulaatiossa ja hermostopienen kehityksessä. Niillä on rooli myös signaalivälityksessä (yleiskatsaus Lien ym., 2006).

Integriinit $\alpha M\beta 2$, $\alpha L\beta 2$, $\alpha D\beta 2$ ja $\alpha X\beta 2$ sekä $\alpha 4\beta 1$ ovat solujen välisiä adheesioreseptoreja (yleiskatsaus Hynes 2002). Aktivaation saa aikaan integriinin sitoutuminen toisen solun vastinreseptoriin. Leukosyyttispesifisten $\beta 2$ -integriinien adheesio välittää solujen vaellusta verestä kudoksiin (yleiskatsaus Evans ym., 2009). $\alpha 4\beta 1$ puolestaan välittää leukosyyttien kulkeutumista veri-aivoesteen läpi keskushermostoon (yleiskatsaus Engelhardt, 2008).

Desmosomit ovat solu-soluliitoksia, jotka liittyvät välikokoisiin säikeisiin, erityisesti keratiiniin ja desmiiniin (yleiskatsaus Bazzi ym., 2007). Desmosomeissa solukalvon läpäisevä osa koostuu kadheriineista, desmogleinista ja desmokollineista. Solunsisäisen osan proteiineja ovat desmoplakiinit ja plakoglobiinit (yleiskatsaus Stokes, 2007). Desmosomit antavat soluille tukea ja ovat tärkeitä erityisesti sellaisissa kudoksissa, joiden täytyy kestää mekaanista stressiä. Näitä kudoksia ovat muun muassa iho, sydänlihas ja ruuansulatuskanavan epiteeli. Desmosomaaliset kadheriinit ovat Ca^{2+} -riippuvaisia ja välittävät heterofiilistä tarttumista (Bazzi ym., 2007).

1.2. Solu-soluväliaineliitokset

Solu-soluväliaineliitoksia ovat fokaaliadheesiot ja hemidesmosomit. Molemmat rakenteet ovat integriinivälitteisiä. Fokaaliadheesiot liittävät aktiinitukirangan soluväliaineeseen, hemidesmosomit puolestaan yhdistävät välikokoiset säikeet tyvikalvoon (yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Solu-soluväliaineliitokset ovat hyvin dynaamisia rakenteita. Niiden toimintahäiriöt tai puute voivat aiheuttaa vakavia häiriöitä solun ja kudoksen toiminnassa (yleiskatsaus Geiger ym., 2001).

Hemidesmosomit ovat erikoistuneita liitoksia epiteelisolujen ja tyvikalvon välillä. Tyypin II hemidesmosomien proteiineja ovat integriini $\alpha 6\beta 4$ ja plektiini. Tyypin II hemidesmosomeja on erityisesti yksinkertaisessa epiteelissä, kuten ruuansulatuskanavassa. Plektiini, $\alpha 6\beta 4$ -integriini, tetraspaniini ja bullous pemphigoid antigeenit PBAG-1 ja PBAG-2 ovat tyypin I

hemidesmosomien rakenneosia. Tyypin I hemidesmosomeja on kerrostuneessa epiteelissä, esimerkiksi ihossa (yleiskatsaus Margadant ym., 2008). Dowling ym. (1996) havaitsivat β 4-integriinin olevan oleellisen tärkeä hemidesmosomien muodostumiselle. Hemidesmosomien puutteellinen muodostuminen johtaa vakaviin vaurioihin poistogeenisillä hiirillä. Hiirten iho ja muut kovalle mekaaniselle rasitukselle altistuvat epiteelikudokset eivät tartu alapuolisiin kudoksiin. Hiirten elinaika on vain tunteja. Taudista käytetään nimeä Epidermolysis Bullosa Simplex ja sitä tavataan myös ihmisillä, joskaan ihmisillä oireet eivät ole yhtä radikaaleja (Dowling ym., 1996).

1.3. Integriinit solun tarttumisessa

Integriinit ovat solukalvon läpäiseviä adheesioreseptoreja. Ne ovat heterodimeerejä, jotka koostuvat α - ja β - alayksiköistä. Molemmat alayksiköt läpäisevät solukalvon yhden kerran. β -alayksikön soluliman puoleinen osa välittää sitoutumista aktiinitukirankaan ja alayksiköt yhdessä osallistuvat signalointiin (yleiskatsaus Ginsberg ym., 2005). Ne välittävät solun tarttumista soluväliaineeseen, toimivat solunsisäisten signaalireittien säätelyssä sekä säätelevät muun muassa leukosyyttien liikkeitä ja immuunivasteita (yleiskatsaus Hynes, 2002). Integriinien ligandeja ovat monet soluväliaineen proteiinit, kuten kollageenit, fibrinogeeni, fibronectiini, vitronektiini ja laminiini (yleiskatsaukset Plow ym., 2000, van der Flier ja Sonnenberg, 2001).

Integriineilla on kaksi erilaista peruskonformaatiota, avoin ja suljettu. Avoimessa muodossa integriini on aktiivinen ja suljetussa inaktiivinen. Lisäksi välimuodot ovat mahdollisia (yleiskatsaus Luo ja Springer, 2006). Integriinien aktivaatio tapahtuu joko vasteena solunsisäisille muutoksille sisältä ulospäin (engl. inside-out) tai solun ulkopuoliseen osaan sitoutuvan ligandin vaikutuksesta ulkoa sisälle (engl. outside-in) (yleiskatsaus Ginsberg ym., 2005).

Integriinien ulkoa-sisälle signaloinnissa tärkeä osa on fokaaliadheesiokinaasin (FAK) ja Src-kinaasin suorittama tyrosiinifosforylaatio. Src sitoutuu integriinin soluliman puoleiseen osaan. Ligandin sitoutuminen integriiniin indusoi Src:n aktivaatiota Src inhibiittori Csk:n irtoamisen, Src transfosforylaation tai tyrosiinifosfataasien värväyksen kautta. Src:n välittämä fosforylaatio saa integriinin β -osan soluliman puoleisen osan irtoamaan taliinista, joka voi johtaa fosfatidyli-inositoli-4,5-difosfaatin (PIP2) tuottoon ja paksilliinin, tensiinin ja

p130Cas:n fosforylointiin. Ligandiin sitoutunut integriini voi aktivoida Syk:n fokaalikomplekseissa tai sitoutua tensiiniin, joka johtaa fokaalikompleksien muuttumiseen säiemäisiksi adheesioiksi. Src fosforyloi myös FAK:n, mikä on tärkeä vaihe signaloinnissa. Mekaaniset voimat välitetään biokemiallisiksi signaaleiksi p130Cas-fosforylaation kautta (yleiskatsaus Arnaout ym., 2007). Integriinin sisältä-ulos aktivaatiossa taliiniin sitoutumisella on tärkeä rooli. Sen on osoitettu katkaisevan suolasillan integriinin α - ja β -alayksikköjen väliltä, jolloin soluliman puoleiset osat eroavat toisistaan. Tämä vaikuttaa solun ulkopuolisten osien vuorovaikutukseen ja johtaa integriinin aktivaatioon (Vinogradova ym., 2002).

Kalpaiini on kalsium-riippuvainen proteaasi, joka muokkaa integriinejä. Sen solunsisäisinä substraatteina toimivat muun muassa paksilliini (yleiskatsaus Yamaguchi ym., 1994), fokaaliadheesiokinaasi (Cooray ym., 1996) ja Src (Oda ym., 1993). Kalpaiini pilkkoo β -integriinin alueelta, jota reunustaa NPXY/NXXY-motiivi. Tämä alue on tärkeä signaalivälityksessä ja tarttumisessa solutukirankaan. Kalpaiinin aktivaatio verihiutaleiden pakkautumisen aikana johtaa monien muiden soluliman proteiinien, esimerkiksi filamiinin, taliinin, FAK:n ja Src:n, pilkkomiseen (yleiskatsaus Pfaff ym., 1999). Kalpaiini-inhibitio johtaa solujen integriinivälitteisen liikkumisen vähenemiseen ja adheesiokompleksien stabiloitumiseen, solujen irtoamisen vähenemiseen ja liikkumisen vähenemiseen (yleiskatsaus Franco ja Huttenlocher, 2005).

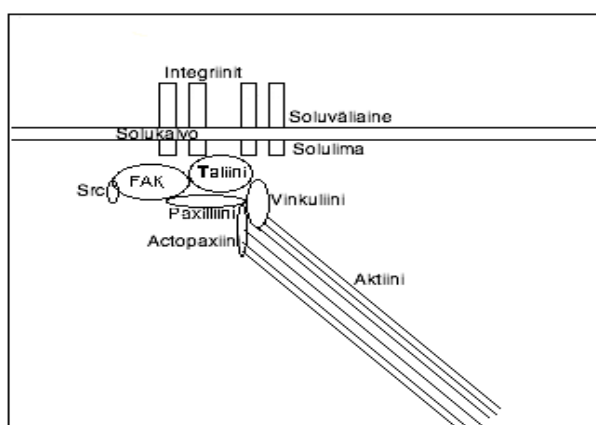
Integriinien mutaatiot tai toimimattomuus aiheuttavat vakavia haittoja solun tarttumiselle ja elion selviytymiselle. Hiirimalleilla on havaittu integriinin poiston aiheuttavan muun muassa alkion kiinnittymisen estymistä, muutoksia leukosyyttien toiminnassa, tulehdusreaktioissa, veren hyytymisessä ja verisuonten muodostumisessa. Monet näistä häiriöistä aiheuttavat alkion kuoleman ennen syntymää (yleiskatsaus Hynes, 2002). Verihiutaleiden integriini α Ib β 3 välittää verihiutaleiden tarttumista toisiinsa ja osallistuu veren hyytymisjärjestelmän muodostamiseen. Tämän integriinin α Ib-osan poisto aiheuttaa verenvuotoa tarttumisen puuttuessa (Tronik-Le Roux ym., 2000). Integriini α 5:n poiston on huomattu aiheuttavan mesodermin ja verisuonten rakennehäiriöitä sekä lihasten rakenteellisia poikkeamia. Alkiot kuolivat ennen syntymää (Yang ym., 1993). Alkionkehityksen aikana α 5-integriinin poisto aiheuttaa pääpuoleisen hermostopienan ja endodermin solujen apoptoosia (Goh ym., 1997). Jos β 1-geeni poistetaan, hiirten alkiot kuolevat pian kiinnittymisen jälkeen (yleiskatsaus Brakebusch ym. 1997). Integriini β 3:n poisto taas aiheuttaa muun muassa munuaisten kehityshäiriöitä, vähentynyttä keuhkoputkien haaroittumista ja lievää ihon hajoamista

(yleiskatsaus Hynes, 2002). Glanzmannin trombastenia on ihmisilläkin esiintyvä verenvuotosairaus, jonka tutkimuksissa $\beta 3$ -poistogeenisiä hiiriä on käytetty. Nämä hiiret ovat elin- ja lisääntymiskykyisiä, mutta niiden selviytyminen on heikompaa johtuen istukan äidinpuoleisten osien heikkoudesta ja verenvuototaipumuksesta (Hodivala-Dilke ym., 1999).

2. Fokaaliadheesiot

Fokaaliadheesiot (FA) ovat viljeltyjen solujen integriinivälitteisiä kontakteja, jotka yhdistävät aktiinitukirangan soluväliaineeseen (kuva 1). Fokaaliadheesiot voidaan jaotella niiden ominaisuuksien ja rakenteen mukaan neljään luokkaan (Nobes ja Hall, 1995, yleiskatsaukset Zamir ym., 1999, Webb ym., 2002):

1. Klassiset FA:t ovat nuolenpään muotoisia ja sisältävät paljon fosfotyrosiinia, paksilliinia ja vinkuliinia, mutta vähän tensiiniä. Ne ovat vakaita rakenteita, jotka pitävät solun paikallaan ja estävät liikettä.
2. Säiemäiset adheesiot ovat pidentyneitä fokaaliadheesioita. Niissä on runsaasti $\alpha 5\beta 1$ -integriiniä, aktopaksiinia, tensiiniä ja fosfotyrosiinia ja ne sijaitsevat solun keskiosissa.
3. Mosaiikki-FA:t ovat klassisten FA:n kaltaisia, mutta niiden molekyyli rakenne on vaihteleva.
4. Fokaalikompleksit ovat pieniä rakenteita solun reunoilla. Ne muodostuvat Rac:n indusoimana ja voivat muuttaa muotoaan ja muodostaa fokaaliadheesioita mekaanisen rasituksen seurauksena. Fokaalikompleksit tuottavat solun nopeat liikkeet.



Kuva 1. Fokaaliadheesiosien kaavamainen rakenne (yleiskatsaus Deakin ja Turner, 2008).

2.1. Fokaaliadheesiosien proteiinit

Fokaaliadheesioiden proteiineihin kuuluu solutukirangan proteiineja, tyrosiinikinaaseja, seriini/treoniinikinaaseja, fosfataaseja, pienten GTPaasien säätelijöitä sekä muita entsyymejä. Kaikkiaan FA:sta on löydetty yli 50 erilaista proteiinia. Monet näistä voivat esiintyä useissa erilaisissa muodoissa riippuen translaation jälkeisestä muokkauksesta, silmikoinnista, proteolyttisestä käsittelystä ja muista modifikaatioista (yleiskatsaus Zamir ja Geiger, 2001). Taulukossa 2. on esitetty fokaaliadheesioiden proteiineja.

Taulukko 2.

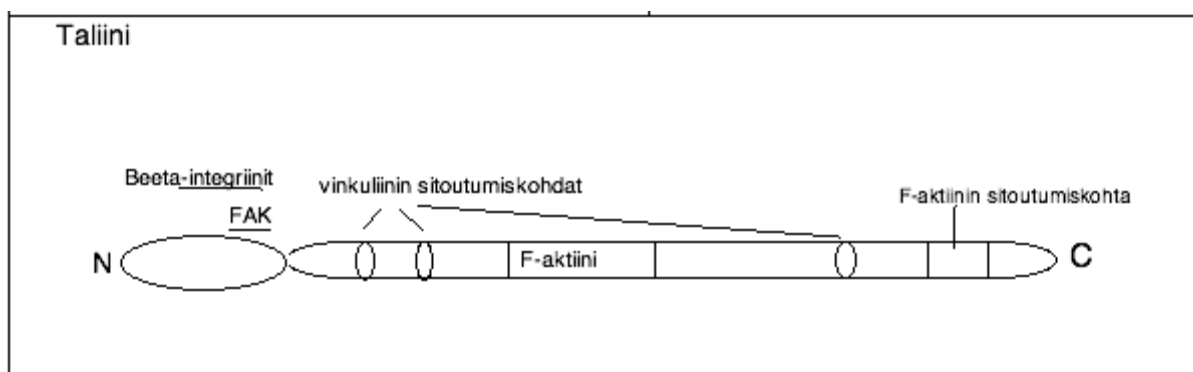
Fokaaliadheesioiden soluliman puoleisia proteiineja (muokattu, Zamir ja Geiger, 2001).

Ryhmä	Proteiini
Solutukirangan proteiinit	- Taliini - Vinkuliini - Parviini/aktopaksiini - Paksilliini - Tensiini - α -aktiniini
Tyrosiinikinaasit	- Fokaaliadheesiokinaasi (FAK) - Src-perheen proteiinit - PYK2
Seriini/treoniinikinaasit	- Integriiniin liittyvä kinaasi (ILK) - Proteiinikinaasi C (PKC) - p21-kinaasi (PAK)
Fosfataasit	- SHP-2 - LAR PTP
Pieniä GTPaaseja säätelevät proteiinit	- ASAP1 - Graf - PSGAP
Muut entsyymit	- Fosfatidyli-inositidi-3 (PI3) -kinaasi - Kalpaiini II

Soluväliaineen tekijöistä muun muassa kollageeni, laminiini, fibronectiini, vitronektiini, fibrinogeeni ja proteoglykaani tarttuvat fokaaliadheesioihin. Integriinien lisäksi solukalvon läpäiseviä reseptoreita ovat LAR proteiinityrosiinifosfataasi, layilin ja syndecan-4. Välittäjäproteiineina toimivat muun muassa paksilliini, p130Cas, kaveoliini ja migfiliini (yleiskatsaus Lo, 2006). Yllämainituista proteiineista käsitellään seuraavaksi taliinia, vinkuliinia, FAK:a ja paksilliinia, koska näiden toiminnasta on eniten tietoa.

2.1.1 Taliini

Taliini on 270 kDa kokoinen proteiini, joka muodostaa homodimeerin ja sitoutuu suoraan integriinin β -osan soluliman puoleiseen osaan, aktiinitukirankaan ja muihin aktiiniin sitoutuviin proteiineihin. Sen rakenne voidaan jakaa pääosaan aminopäässä ja häntäosaan karboksipäässä (yleiskatsaus Critchley, 2000). Pääosa (FERM-domeeni) on kooltaan 47 kDa ja koostuu F0, F1, F2 ja F3 -osista (yleiskatsaukset García-Alvarez ym., 2003 ja Critchley ja Gingras, 2008). Häntäosa on kooltaan 190 kDa ja sisältää pilkkomiskohdan kalpaiini II:lle pää- ja häntäosien liittymiskohdassa (yleiskatsaus Carcía-Alvarez ym., 2003). Integriini sitoutuu F3-osaan, F-aktiini F1, F2 ja F3-osiin ja FAK F2 ja F3-osiin. F-aktiinilla on sitoutumiskohdat sekä pää- että häntäosissa (Bass ym., 1999). Taliinin kaavamainen domeenirakenne on esitetty kuvassa 2.

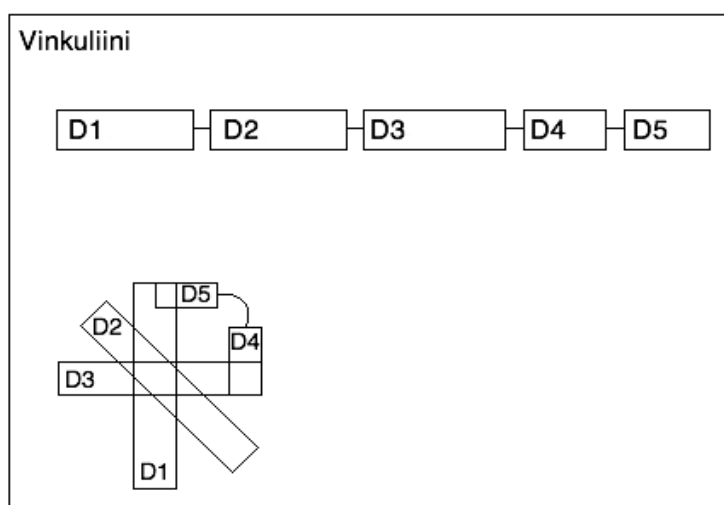


Kuva 2. Taliinin kaavamainen rakenne. Pääosa (FERM-domeeni) on aminopäässä ja sisältää sitoutumiskohdat β -integriineille ja FAK:lle. Häntäosa, johon sitoutuvat vinkuliini ja F-aktiini on karboksipäässä (yleiskatsaus Critchley, 2000).

Taliinin poisto estää α I**b** β 3 -integriinin sisältä-ulos-aktivaation. Taliini on myös tärkeä α 5 β 1-integriinin aktiivisuuden ylläpitäjä (Tadokoro ym., 2003). Taliinin puute ei kuitenkaan vaikuta FAK:n eikä Src-perheen kinaasien (SFK) aktivaatioon fibroblastin kaltaisissa soluissa leviämisen alkuvaiheessa (Giannone ym., 2003). Taliini ei myöskään ole välttämätön integriinivälitteiselle voimasignaloinnille. Sitä vastoin se on välttämätön integriini- ja venytysvälitteisten adheesioiden muodostumiselle, sillä taliinin puuttuessa adheesiorakenteita ei muodostu venytyksen seurauksena kuten taliinin läsnäollessa (Giannone ym., 2003). Taliinin poisto erilaistumattomista alkion kantasoluista johtaa solukalvon rakkulamaiseen rakenteeseen ja lisääntyneeseen makropinosytoottisten vesikkelien määrään. Nämä solut eivät leviä gelatiini- eikä laminiinialustoilla, vaan muodostavat löyhiä pesäkkeitä. Taliinin poisto ei kuitenkaan vaikuta tarttumiseen fibronectiinille (Priddle ym., 1998).

2.1.2. Vinkuliini

Vinkuliini on 116 kDa kokoinen liukoinen ja hyvin konservoitunut proteiini, joka yhdistää aktiinitukirangan soluväliaineeseen tai viereiseen soluun. Se vahvistaa adheesioita ja välittää signaaleja (Chen ym., 2006). Vinkuliinin rakenteessa on viisi domeenia, D1-D5. D1 domeeni on pääosa (Vh) ja D5 häntäosa (Vt) (kuva 3). Taliinin sitoutumiskohta on D1 domeenissa ja paksilliinin sekä F-aktiinin D5-domeenissa (yleiskatsaus Ziegler ym., 2006). Inaktiivisessa muodossaan vinkuliini on pallomainen molekyyli, jonka pää- ja häntäosat ovat liittyneet toisiinsa runsaasti proliinia sisältävän yhdysosan avulla kahdeksalla vetysidoksella (Borgon ym., 2004, Izard ym., 2004, yleiskatsaus Ziegler ym. 2006).



Kuva 3. Vinkuliinin kaavamainen rakenne. Alakuvassa suljettu rakenne. D1-domeeni on pääosa ja D5 häntäosa. Taliini sitoutuu D1-domeeniin ja F-aktiini D5-domeeniin (yleiskatsaus Ziegler ym. 2006).

Vinkuliinin aktivaatio tapahtuu aktiinisäikeiden ja taliinin yhteisvaikutuksesta. Aktivaatiolle on esitetty kaksi mahdollista tapaa (Chen ym., 2006):

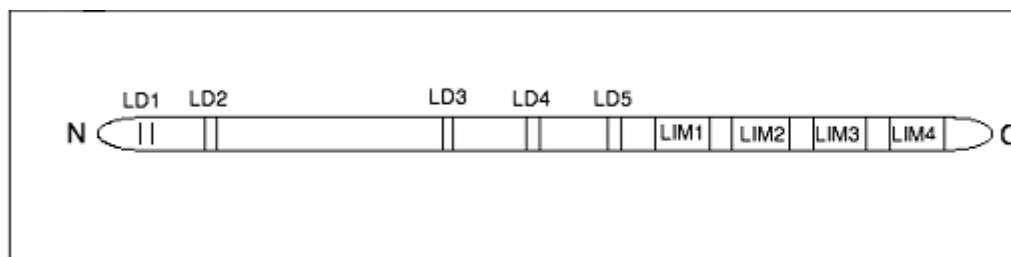
1. On osoitettu, että soluissa on pieni määrä vinkuliinia, joissa häntä- ja pääosa eivät ole liittyneet toisiinsa. Taliini voi sitoutua suoraan vinkuliinin vapaaseen pääosaan. Kuitenkin taliinin sitoutuminen vinkuliinin päähän on heikompaa kuin vinkuliinin sisäinen sitoutuminen, joten irtoaminen on nopeusrajoitteista ja hyvin vähän vinkuliini-taliini komplekseja voi muodostua. Taliinin ja vinkuliinin on myös havaittu muodostavan stabiileja komplekseja, joka ei sovi tähän malliin.
2. Taliinin ja aktiinin sitoutuminen vinkuliiniin paljastaa osittain sitoutumiskohtia. Taliinia ja aktiinia täytyisi tässä tapauksessa olla suuria pitoisuuksia.

Happamat fosfolipidit inhiboivat Vh- ja Vt-domeenien välistä sitoutumista ja paljastavat aktiinin sitoutumiskohdan ja proteiinikinaasi C:n pilkkomiskohdan vinkuliinin hännässä (Weekes ym., 1996).

Xu (1998) tutki vinkuliinigeenin poiston vaikutuksia hiirillä. Tutkimuksessa ei saatu tuotettua eläviä -/- fenotyypin jälkeläisiä. Vinkuliini -/- alkioit eivät selvinneet yli kymmentä päivää ja olivat selvästi pienempiä kuin normaalit alkioit ja niissä oli rakenteellisia poikkeavuuksia. Samassa tutkimuksessa Xu (1998) selvitti hiiren alkion fibroblastien vaeltamista ja tarttumista vinkuliinin poiston seurauksena. Hän totesi, että -/- solut liikkuvat nopeammin kuin normaalit solut ja tarttuivat alustaansa 50 % huonommin. Alustana hän käytti fibronektiiniä, superfibronektiiniä, vitronektiiniä ja laminiinia. Tyypin I kollageenille mutanttisolut eivät tarttuneet lainkaan tai tarttuivat vain vähän. Dominanttien negatiivisten alkioiden kuoleman hän selittää aivohermon ja sydämen kehittymisen häiriöillä. Priddle ym. (1998) selvittivät vinkuliinigeenin poiston vaikutusta alkion kantasoluviijelmään ja totesivat, että poistogeeniset solut muodostivat normaaleihin nähden pyöreämpiä pesäkkeitä gelatiinialustalla. Tällaista ei havaittu fibronektiinialustalla. He saivat samanlaisen tuloksen taliinipoistogeenisillä kantasoluilla. Solut pystyivät muodostamaan aktiinistressisäikeitä, mutta ne eivät päättäneet taliinia sisältäviin fokaaliadheesioihin kuten normaaleissa soluissa (Priddle ym., 1998).

2.1.3. Paksilliini

Paksilliini on 68 kDa kokoinen solutukirangan proteiini, joka lokalisoituu fokaaliadheesioihin aktiinistressisäikeiden kärkiin ja sitoutuu vinkuliiniin karboksipäästään (Turner ym., 1990). Se toimii vuorovaikutuksessa useiden aktiiniin sitoutuvien proteiinien, kuten vinkuliinin ja aktopaksiinin, ja signaaliproteiinien, kuten ILK:n ja FAK:n, kanssa (Jamieson ym., 2005). Paksilliinin rakenteessa on karboksipäässä neljä LIM-domeenia, vinkuliinin ja FAK:n sitoutumiseen vaadittavat domeenit ovat LIM2 ja LIM1 (Turner ym., 1994, Brown ym., 1996) (kuva 4). Paksilliinin aminopäässä on viisi leusiini- ja aspartaattirikasta LD-motiivia, jotka voivat toimia signaalivälityksessä (Tumbarello ym., 2002) (kuva 4).



Kuva 4. Paksilliinin kaavamainen rakenne. LIM1 ja LIM2 -domeenit tarvitaan taliinin ja FAK:n sitoutumiseen (Tumbarello ym., 2002).

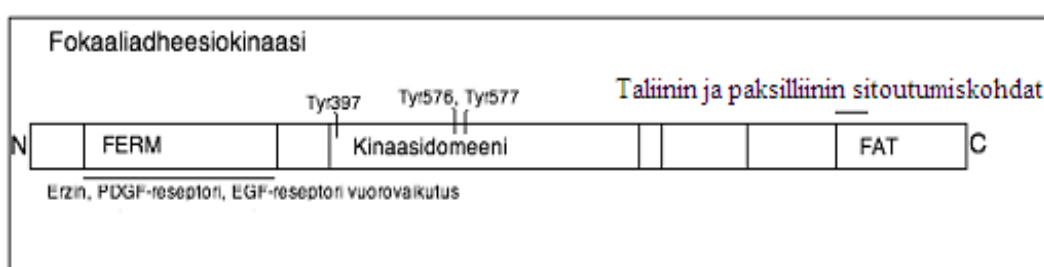
Brown ja Turner (2002) havaitsivat paksilliinin LIM2 ja LIM3 -domeenien toimivan tubuliinin sitoutumiskohtana. He huomasivat myös, että mutaatiot näissä domeeneissa haittaavat FA:n muodostumista ja LIM3 ja LIM4 -domeenit ovat välttämättömiä maksimaaliselle tarttumiselle. Brown ym. (1996) totesivat, että karboksipään LIM-domeenien puute estää paksilliinia lokalisoitumasta fokaaliadheesioihin. He huomasivat myös, että LIM3-domeeni vaaditaan fokaaliadheesioiden muodostumiseen. Vaikka LIM2 ja LIM1 -domeenit sisältävät vuorovaikutuspaikat vinkuliinille ja fokaaliadheesiokinaasille, ne eivät riitä FA:n muodostukseen ilman LIM3:a.

Paksilliinin pääasiallinen tehtävä on välittää signaaleja integriinien ja kasvutekijäreseptoreiden välillä ja yhdistää nämä toisiinsa. Lisäksi paksilliinilla on tärkeä tehtävä tehokkaassa solujen tarttumisessa ja vaelluksessa (Brown ja Turner, 2004). Fokaaliadheesioissa paksilliini värvää signaalivälitysproteiineja solukalvolle. Näihin kuuluvat muun muassa tyrosiinikinaasit FAK, Src ja Abl. FAK ja Src fosforyloivat paksilliinin ja muodostavat sitoutumispaikan muille adaptoriproteiineille, muun muassa Crk:lle. FAK ja Crk värväävät Cas:n, jonka fosforyloinnista vastaa Src. Nämä proteiinit signaloivat MAPK-reitin kautta. Signaalien inaktivaatiossa paksilliini värvää fokaaliadheesioon Csk:n, joka on Src:n sekä proteiinityrosiinifosfataasi PEST:n negatiivinen säätelijä. Tämä johtaa Cas:n defosforylaatioon eikä MAPK-signaalointia tapahdu. Toisaalta paksilliini kiihdyttää kasvutekijäsignalointia ja kommunikaatiota integriinien kanssa (Turner, 2000).

Paksilliini toimii myös aktiinitukirangan säätelyssä sitoutumalla useisiin aktiinia muokkaaviin proteiineihin. Vinkuliini ja aktopaksiini sitoutuvat suoraan paksilliiniin ja toimivat linkkinä paksilliinin ja aktiinitukirangan välillä. Taliini ja α -aktiniini yhdistävät paksilliinin integriineihin mutta eivät sitoudu suoraan paksilliiniin. Solun liikkumisen säätely on riippuvaista paksilliinin sitoutumisesta Crk:iin ja Cas:iin. Fokaaliadheesioiden hajotus on osaksi riippuvaista paksilliinivälitteisestä p21-kinaasi (PAK) värväyksestä ja proteiinityrosiinifosfataasi PEST:n sitoutumisesta paksilliinin LIM-domeeniin. Mikrotubulusten sitoutuminen paksilliiniin voi myös destabiloida fokaaliadheesioita (Turner, 2000). Solun leviämisen säätelyssä paksilliinin LIM-domeeniin sitoutuu proteiinityrosiinifosfataasi PEST, joka on Rac:n negatiivinen säätelijä ja inhiboi solun leviämistä. Proteiinityrosiinifosfataasi PEST inhiboi leviämistä vain paksilliinin läsnäollessa (Jamieson ym., 2005).

2.1.4 Fokaaliadheesiokinaasi (FAK, pp125^{FAK})

Fokaaliadheesiokinaasi on 119 kDa:n kokoinen ei-reseptorityrosiinikinaasi, joka paikallistuu fokaaliadheesioihin (Hanks ym., 1992). Se koostuu aminopään FERM-domeenista, kinaasidomeenista proteiinin keskiosissa, leusiinirikkaista domeeneista ja karboksipään FAT-domeenista, joka kohdistaa FAK:n fokaaliadheesioihin (yleiskatsaus Mitra ym., 2005) (kuva 5). Karboksipäässä on myös sitoutumispaikat muun muassa taliinille ja paksilliinille (Toutant ym., 2002). Kinaasitoiminnan on arveltu sijoittuvan konservoituneisiin kysteiniitähteisiin 456 ja 459 (Nowakowski ym., 2002).



Kuva 5. Fokaaliadheesiokinaasin kaavamainen rakenne (yleiskatsaus Mitra ym., 2005).

Fokaaliadheesiokinaasi on tärkeä tekijä solun liikkumisessa. Sieg ym. (2000) tutkivat FAK:n vaikutusta verihiutaleiden kasvutekijä (PDGF, engl. platelet-derived growth factor) -signaaloinnissa ja totesivat, että FAK muodostaa kompleksin verihiutaleiden kasvutekijäreseptorin (PDGFR, engl. platelet-derived growth factor receptor) kanssa ja kasvutekijän indusoima solun liikkuminen vaatii FAK:n läsnäoloa. FAK^{-/-} solut eivät liikkuneet kasvutekijöiden läsnäollessa kuten normaalisti FAK:a tuottavat solut. Samalla he tutkivat epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR, engl. epidermal growth factor) signalointia ja totesivat FAK:n muodostavan kompleksin myös tämän kasvutekijän kanssa. FAK:n puute vaikutti epidermaalisen kasvutekijän indusoimaan liikkumiseen.

Fokaaliadheesiokinaasin aktivaatiossa fosforylaatiolla on tärkeä merkitys. FAK:n autofosforylaatio välittää sitoutumista Src:n ja säätelee niiden aktiivisuutta. Samalla Src:n SH2 -domeenin sitoutuminen FAK:iin suojaa autofosforyloitua FAK:a proteiinityrosiinifosfataasiaktiivisuudelta. Src:n ja FAK:n sitoutuminen toisiinsa voi nostaa FAK:n aktiivisuutta ja mahdollistaa tensiinin ja paksilliinin fosforylaation (Cobb ym., 1994). Autofosforylaatio tapahtuu Tyr-397 tähteessä aminopään FERM-domeenin ja keskeisen kinaasidomeenin välissä. FAK:n eri silmikointivarianteissa mekanismi on erilainen,

autofosforylaatio voi tapahtua molekyylin sisäisesti tai molekyylien välisesti vaatiin dimerisaation (Toutant ym., 2002, Lietha ym., 2007).

2.2. Fokaaliadheesioiden dynamiikka ja säätely

Solun liikkuminen edellyttää tarttumisrakenteiden hajotusta ja uudelleen muodostumista (engl. turn-over). Fokaaliadheesion (FA) dynamiikka voidaan jakaa muodostumisvaiheeseen, stabiiliin vaiheeseen ja hajotukseen. FA:n muodostuminen alkaa pienistä fokaalikomplekseista. Fokaalikompleksit muodostuvat levymäisten valejalkojen eli lamellipodien reunaan (yleiskatsaus Bershadsky ym., 2006). Fokaalikompleksien muodostumista säätelee Rho-perheen G-proteiini Rac. Muutos fokaalikompleksista FA:ksi vaatii Rho-aktivaatiota (yleiskatsaus Geiger ja Bershadsky, 2001). FA:n muodostuessa integriinit saavat aikaan FAK:n ja tensiinin määrän lisääntymisen adheesiokohdassa. Ligandin sitoutuminen integriiniin ja integriinien pakkaantuminen vierekkäin ovat tärkeitä vaiheita. Mikäli jompikumpi jää tapahtumatta taliinin, vinkuliinin ja α -aktiniinin värväys adheesiokohtaan häiriintyy. Mikäli tyrosiinifosforylaatiota ei tapahdu, signaalimolekyylien saapuminen adheesiokohtaan estyy. Eräät signaalimolekyylit kuljetetaan yhdessä muiden proteiinien kanssa, tällaisia ovat muun muassa p21-aktivoitu kinaasi (PAK) ja PIX, jotka tuodaan adheesiokompleksiin yhdessä paksilliinin kanssa (yleiskatsaus Webb ym., 2002).

GTPaasit Rho, Rac ja Cdc42 (Nobes ja Hall, 1995) sekä aktiinin dynamiikka (yleiskatsaus Bershadsky ym., 2006) säätelevät fokaalikompleksien muodostumista. Fokaalikompleksien muodostuessa ja kasvaessa Rac lokalisoituu lamellipodin etureunaan ja aktivoi useita signaalireittejä, jotka johtavat aktiinin polymerisaatioon ja verkottumiseen. Rac vaikuttaa muun muassa fosfatidyli-inositoli-5-kinaasireitin välittämään aktiinin polymerisaatioon, WAVE/Scar-välitteiseen aktiinisäikeen pidentymiseen ja LIM-kinaasi -välitteiseen aktiinin dynamiikkaan. LIM-kinaasireitti vaikuttaa kofiliini-välitteiseen aktiinin depolymerisaatioon, WAVE/Scar -reitti säätelee Arp2/3-välitteistä aktiinin haaroittumista ja fosfatidyli-inositoli-5-kinaasi muodostaa fosfatidyli-inositoli-(4,5)difosfaattia, joka vaikuttaa aktiinin polymerisaatioon. Aktiinisäikeiden pidentyminen johtaa solukalvon työntymiseen ulospäin ja lamellipodin muodostumiseen (yleiskatsaus Geiger ja Bershadsky, 2001). Pian tämän jälkeen aktiinin virta fokaalikompleksien takana vähenee paikallisesti, joka johtaa uuden FA:n muodostumiseen. Kypsyvät fokaalikompleksit ottavat paikkansa aktiinivirran mukaan vyöhykkeessä, joka on nopean ja hitaan aktiinidynamiikan välillä (yleiskatsaus Bershadsky

ym., 2006). Rho:n rooli FA:n muodostumisessa on toimia aktivaattorina Rho-liittyneen kinaasin (ROCK) ja Dia -signaalireiteille. ROCK-reitin merkitys on tuottaa solun liike ja supistusvoima myosiini II:n välityksellä. Dia-reitti puolestaan indusoi aktiinin polymerisaatiota Dia1:n välityksellä. Dia-reitillä on myös mikrotubuluksia ohjaava tehtävä (yleiskatsaus Geiger ja Bershadsky, 2001).

Mikrotubulusten tehtävänä on kuljettaa adheesion muodostumiselle ja aktiinitukirangan muokkaukselle tärkeitä proteiineja. Lisäksi mikrotubulukset voivat säädellä aktiinitukirangan joustavuutta (yleiskatsaus Geiger ja Bershadsky, 2001). Cdc42 aktivoi Rac:n ja Rho:n sekä indusoi lamellipodian muodostumista (Nobes ja Hall, 1995). Laukaitis ym. (2001) tutkivat adheesioiden muodostumista ja dynamiikkaa käyttäen paksilliinia, α -aktiniinia ja α 5-integriiniä. Adheesion muodostuessa paksilliini muodostaa pieniä ryhmiä lähelle lamellipodien etureunaa ennen α -aktiniinia ja α 5-integriiniä. Nämä paksilliiniadheesiot ovat hyvin dynaamisia, ne hajoavat ja muodostuvat uudelleen nopeasti solukalvon työntyessä ulospäin. Paksilliiniryhmiä ei kuitenkaan muodostu integriinin puuttuessa. Kun solukalvon liike hidastuu, α -aktiniini paikallistuu lamellipodien reunaan. Nämä rakenteet ovat suurempia ja ne muodostavat säiemäisiä rakenteita solun keskiosia kohti eivätkä pyri hajoamaan nopeasti (Laukaitis ym., 2001).

Myös FAK kuuluu adheesioiden muodostumisen varhaisiin tekijöihin. Sen autofosforylaatio välittää integriiniryhmien muodostumista, joka on tärkeää adheesion muodostumisen alkuvaiheissa (Toutant ym., 2002). FAK:n autofosforylaatio tyrosiini-397 -tähteessä saattaa olla adheesioiden kierrätystä säätelevä tekijä. Tyr-397 -tähde toimii myös sitoutumiskohtana Src:lle, joka voi myös säädellä adheesion kierrätystä. Paksilliini on FAK-Src-kompleksin substraatti, joka saattaa säädellä adheesion hajotusta: paksilliinin puute hidastaa adheesioiden hajotusta. Paksilliinin fosforylaatio puolestaan säätelee solun liikkumista ja siten mahdollisesti adheesioiden dynamiikkaa (yleiskatsaus Webb ym., 2004).

Integriinien rooli adheesiosignaaloinnissa on aktivoida Rac ja Cdc42. Integriiniaktivaation seurauksena monet proteiinityrosiinikinaasit, muun muassa FAK ja Src, aktivoidaan. Tästä seuraa nukleotidinvaihtajien (GEF, engl. guanine nucleotide exchange factor) aktivointi. Nukleotidinvaihtajat DOCK180 ja PIX aktivoidaan adaptoriproteiinien, kuten paksilliini tai p130Cas, kautta. Vaihtoehtoisesti GEF voidaan aktivoida suoraan proteiinityrosiinikinaaseilla. Aktivoituneet GEF:t aktivoivat Rac:n, Rho:n ja Cdc42:n (yleiskatsaus DeMali ym., 2003). Ballestrem ym. (2001) tutkivat β 3-integriinin dynamiikkaa fokaaliadheesioissa ja totesivat,

että tyypillinen integriiniryhmä muodostuu lähelle lamellipodian etureunaa pian tarttumisen jälkeen ja säilyy muutamia minutteja ennen hajoamista. Solun niissä osissa, joissa solukalvo supistuu sisäänpäin, integriiniryhmät liukuvat solun sisäosia kohti. Lamellipodian fokaaliadheesiot puolestaan ovat vakaita. He huomasivat myös, että solunsisäinen jännitys lisää integriinien määrää fokaaliadheesiossa ja solunsisäisen jännityksen puute vähentää adheesiotiheyttä (Ballestrem ym., 2001).

Adheesioiden kypsymistä tapahtuu eniten solun etureunalla ja hajotusta solun keskiosissa ja takareunalla. Pienet kypsymättömät adheesiot voidaan muodostumisensa jälkeen hajottaa tai ne voivat muuttaa muotoaan. Muodonmuutoksessa FAK toimii paikallisena säätelijänä. Se on FA:n muodostumisen varhaisvaiheen proteiini, joka välittää integriinien ryhmittymistä. Paikallisen Ca^{2+} -pitoisuuden nousun on havaittu lisäävän adheesioiden hajotusta (Giannone ym., 2004). Cavalcanti-Adam ym. (2007) puolestaan osoittivat, että integriinien ligandit, erityisesti RGD-ligandit, säätelevät fokaaliadheesioiden muodostumista ja dynamiikkaa. He huomasivat suuremman RGD-tiheyden kasvatusalustalla nostavan lamellipodian etureunan liikettä ulos- ja sisäänpäin. He kertovat RGD-pitoisuuden luultavasti olevan tärkeä tekijä stabiilien adheesioiden muodostuksessa (Cavalcanti-Adam ym., 2007).

Kypsät adheesiot voidaan hajottaa mikrotubuluksista riippuvaisella menetelmällä tai ne voivat muuttua säiemäisiksi adheesioiksi. Kontaktit voivat liukua stressisäikeitä pitkin liikkeen mukana solun takaosaa kohti. Mikäli niitä ei hajoteta, ne lopulta irtoavat venyttävien voimien vuoksi solusta tai irtoavat soluväliaineesta. Adheesioiden kohtalo on erilainen solun eri osissa, sillä solun polarisaatio vaatii epäsymmetristä tarttumista (yleiskatsaus Webb ym., 2002). Adheesioiden liukuminen solun takaosaa kohti on yleinen tapahtuma, joka vaatii Rho-aktivaatiota. Sen on arveltu olevan MIIA-myosiini-isoformin välittämää. Adheesio-destabiloinnin ja irtoamisen on ajateltu olevan samankaltainen tapahtuma kuin adheesio-kierrätys solun etureunalla (yleiskatsaus Broussard ym., 2008).

Kalpaiini säätelee solun liikkumista muokkaamalla adheesioiden rakennetta. Kalpaiinin inhibiitio estää endoteelisolujen, lymfosyyttien ja NIH3T3-solujen leviämisen, mutta stabiloi fokaaliadheesioita CHO-soluissa ja fibroblasteissa, hidastaa niiden liikkumista ja vähentää solun takareunan tarttumista (yleiskatsaus Perrin ja Huttenlocher, 2002).

Mikrotubulusvälitteinen adheesion destabilointi alkaa paikallisella Rho:n inaktivaatiolla ja myosiini-jännityksen loppumisella tai kalpainenivälitteisellä proteolyysillä. Sen seurauksena stressisäikeet rentoutuvat. Toisessa vaiheessa adheesion rakenteelliset osat päätyvät solun sisään dynamiiniriippuvaisen endosytoosin kautta. Samalla adheesiot voidaan vetää alustasta irti stressisäikeitä pitkin vasteena mikrotubulusten depolymerisaatiolle. Mikrotubulusten depolymerisaatio on seurausta Rho GEF:n vapauttamisesta (yleiskatsaus Broussard ym., 2008). Myosiini IIA (MIIA) ja IIB (MIIB) toimivat solun etureunalla lamellipodien muodostumisen säätelijänä. Myosiini II:n poisto lisää kalvon ulostyöntymistä ja inhiboi etureunalla varhaisten adheesioiden kypsymistä (Vicente-Manzanares ym., 2007).

3. Työn tarkoitus

Integriinit α IIB β 3 ja α 5 β 1 tarttuvat soluväliaineessa eri proteiineihin. α IIB β 3 käyttää ligandinaan fibrinogeeniä ja α 5 β 1 fibronektiiniä. Tämän työn tarkoitus on selvittää vaikuttaako β 3-integriinialayksikköön liitetty GFP α IIB β 3-integriinin välittämään tarttumiseen CHO-soluissa.

4. Materiaalit ja Menetelmät

4.1. Lokalisaatiokokeet

Työssä käytetyt plasmidikonstruktit olivat hiiren pCDNA3- β 3-GFP (Ballestrem ym., 2001), pCDM8- α IIB (Loftus ym., 1990) ja ihmisen β 3-GFP, jossa CD3a -plasmidista on liitetty β 3 GFP:n sisältävään pCDNA3 -plasmidiin siten, että väliin jää liitossekvenssi SPVATM (Heikki Takala). Transfektioissa käytettiin Fugene 6 transfektioagenssia (Roche, Basel, Sveitsi). Valmistajan ohjeen mukaan. Transfektion jälkeen soluja kasvatettiin kuusi tuntia DMEM-kasvatusliuoksessa (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), johon oli lisätty 1 % ei-välttämättömiä aminohappoja (Non-Essential AminoAcids NEAA, Gibco) ja 1 % penisilliini-streptomysiini-amfoterisiiniB -antibioottia (Gibco). Kuuden tunnin jälkeen kasvatusliuos vaihdettiin ja tilalle vaihettiin DMEM, jossa oli 10 % vastasyntyneen naudan seerumia (FCS, ThermoFisher, Erembodegem, Belgia), 1 % NEAA ja 1 % antibiootteja. Soluja kasvatettiin vuorokausi, jonka jälkeen ne siirrettiin päällystetyille peitinlaseille ja annettiin tarttua kaksi tai neljä tuntia seerumivapaassa kasvatusliuoksessa.

Peitinlasien päällystäminen suoritettiin yön yli +4 °C:ssa. Päällystämiseen käytettiin fibrinogeenia (Kordia Lifesciences, Leiden, Alankomaat), jonka pitoisuus oli 30 µg/ml fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (PBS, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, pH 7,4). Päällystyksen jälkeen fibrinogeeniliuos poistettiin ja lasia käsiteltiin 1 % naudan seerumin albumiinilla (BSA, Sigma) PBS:ssä tunti huoneenlämmössä. Lasit pestiin kahdesti PBS:ssä ennen solujen siirtoa.

4.2. CHO-αIIbβ3-GFP solulinja

Stabiilin solulinjan tekemiseksi CHO-soluille tehtiin transfektio käyttäen Fugene 6 -transfektioagenssia. Soluihin transfektoitavat DNA:t olivat pCDM8-plasmidi, jossa αIIb-integriini ja neomysiini selektiogeneeni (Loftus ym., 1990) sekä ihmisen β3-GFP (Heikki Takala). Vuorokauden kuluttua transfektioista solut irrotettiin maljalta trypsiinillä (0,05 % trypsiini, 0,2 g/l EDTA, Gibco), pestiin kerran seerumia sisältävällä kasvatusliuoksella ja siirrettiin uuteen seerumia sisältävään kasvatusliukseen, jossa oli 0,75 mg/ml genetisiiniä (Geneticin G418 sulphate, Gibco). Solut siirrettiin 96-kuoppalevylle siten, että jokaiseen kuoppaan tuli noin 300 solua tilavuuden ollessa noin 100 µl. Loput solut pakastettiin 1 ml:ssa DMEM-kasvatusliuosta, joka sisälsi 10 % vastasyntyneen naudan seerumia, 1 % NEAA, 1 % penisilliini-streptomysiini-ampfoterisiiniB :asekä 10 % dimetyylisulfoksidia (DMSO). Sulatettaessa soluja selekoitiin ensin halkaisijaltaan 10 cm viljelymaljalla viikon ajan ennen siirrostamista 96-kuoppalevylle. 96-kuoppalevylle solut siirrettiin siten, että jokaiseen kuoppaan tuli yksi solu. Yksittäisten solujen annettiin kasvaa viikon ajan. Sen jälkeen yksittäisistä pesäkkeistä valikoitiin fluoresoivat solut Zeiss Cell Observer -mikroskoopin avulla (Carl Zeiss, Jena, Saksa). Positiiviset pesäkkeet irrotettiin trypsinoimalla ja siirrettiin kasvatukseen ensin 12-kuoppamaljalle ja myöhemmin 6-kuoppamaljalle. 6-kuoppamaljan ollessa täynnä solut irrotettiin ja fluoresenssitaso mitattiin virtausytometrillä (FACS Calibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Pesäkkeet, joissa fluoresenssitaso oli suurin, siirrettiin ylöskasvatukseen. Soluja kasvatettiin DMEM-kasvatusliuoksessa, jossa oli 10 % vastasyntyneen naudan seerumia, 1 % NEAA, 1 % penisilliini-streptomysiini-ampfoterisiiniB:tä sekä 0,75 mg/ml genetisiiniä. αIIb-transfektio onnistuminen selvitettiin värjäämällä solut PL98DF6 -primaarivasta-aineella (Ylänne ym., 1988) ja rodamiini-sekundaarivasta-aineella (Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK). Solut kiinnitettiin 15 minuuttia jäähauteella 4 % paraformaldehydillä, pestiin kahdesti PBS:llä. PL98DF6-vasta-ainetta ei laimennettu. Vasta-ainetta annettiin vaikuttaa 30 minuuttia huoneenlämmössä. Solut

pestiin kahdesti PBS:ssä ennen sekundaarivasta-aineen lisäystä. Sekundaarivasta-aine laimennettiin 1:50, sitoutumisaika oli 30 minuuttia huoneenlämmössä. Ennen petausta Mowioliin (Calbiochem) solut pestiin kahdesti PBS:llä.

Virtaussytometriaa varten solut irrotettiin maljalta trypsiinillä, pestiin kerran seerumia sisältävässä kasvatusliuoksessa ja pelletit sekoitettiin PBS:ään. Virtaussytometrikokeissa kontrollina käytettiin transfektoimattomia CHO-soluja. Solut säilytettiin jäähauteella ja soluaggregaatit poistettiin suodattamalla nylonverkon (Sefar, Heiden, Sveitsi) läpi ennen mittausta.

Lokalisaatiokokeita varten stabiilit CHO- α IIB β 3-GFP -solut siirrettiin fibrinogeenilla päällystetylle 6-kuoppamaljalle siten, että kuopassa oli 400 000 solua ja neljä päällystettyä peitinlasia. Solujen annettiin tarttua neljä tuntia +37 °C 5 % CO₂ -pitoisuudessa seerumivapaassa kasvatusliuoksessa. Tarttuneet solut pestiin kahdesti PBS:llä ja kiinnitettiin jäähauteella 4 % paraformaldehydi, 0,5 % Triton X-100 (Sigma) -liuoksella PBS:ssä 15 minuuttia. Liuos poistettiin ja solut pestiin kahdesti PBS:llä. Primaarivasta-aineina käytettiin vinkuliini- (VII F6, Glukhova ym., 1990, laimennos 1:10), taliini- (8d4, Sigma, laimennos 1:100), paksilliini- (Millipore, laimennos 1:1000), fokaaliadheesiokinaasi- (2A7, Millipore, laimennos 1:100) ja fosfotyrosiini (4G10, Millipore, laimennos 1:500) -vasta-aineita. Vasta-aineen annettiin sitoutua 30 minuuttia huoneenlämmössä, sen jälkeen solut pestiin kahdesti PBS:llä. Sekundaarivasta-aineena käytettiin AlexaFluor594 IgG -konjugoitua vuohen vasta-ainetta hiiren immunoglobuliinia vastaan (Molecular Probes, Carlsbad, USA), joka laimennettiin 1:200 (loppupitoisuus 10 μ g/ml). Sekundaarivasta-aineen annettiin sitoutua 30 minuuttia huoneenlämmössä, jonka jälkeen solut pestiin kahdesti PBS:llä. Peitinlasit pedattiin Mowiolilla objektilaseille.

Mikroskooppityöt tehtiin Zeiss Cell Observer fluoresenssimikroskoopilla (Zeiss Cell Observer HS -mikroskooppi, AxioVision Ral. 4.7 ohjelmisto). Käytetyt aallonpituudet olivat GFP:lle 470 nm ja Alexa594 sekundaarivasta-aineelle 555 nm. LED -valon intensiteettinä käytettiin 100 %. Kuvat otettiin Zeiss AxioCam HRm-kameralla. Mikroskooppikuvat käsiteltiin ImageJ-ohjelmistolla (versio 1.41) (Rasband 1997-2008).

4.3. Adheesiokokeet

Adheesiokokeita varten CHO- α IIB β 3 (Ylänne ym., 1995) ja CHO- α IIB β 3-GFP solut siirrettiin fibrinogeenilla tai fibronektiinillä (Sigma, Missouri, USA) päällystetyille 96-kuoppalevyille siten, että kuopassa oli 40 000 solua 100 μ l:n tilavuudessa. Fibronektiinipitoisuudet olivat 0-1 μ g/ml ja fibrinogeenipitoisuudet 0-30 μ g/ml neljänä rinnakkaisena sarjana molempia solulinjoja kohden. Solujen annettiin tarttua 30 minuuttia +37 °C:ssa. Sen jälkeen soluja pestiin monikanavapipettiä käyttäen kuusi kertaa HEPES-puskuroidulla suolaliuoksella (150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7,4). Solut hajotettiin lisäämällä jokaiseen kuoppaan 100 μ l 50 mM NaCH₃COO, 1 % Triton X-100, 6 mg/ml p-nitrofenyylifosfaatti -liuosta, pH 5,0. Hajotusaika oli tunti +37 °C:ssa 5 % CO₂-pitoisuudessa. Sen jälkeen kuoppiin lisättiin 50 μ l 1 M natriumhydroksidia ja mitattiin absorbanssi 405 nm:ssä (Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter -fotometri ja Wallac 1420 Manager -ohjelma, PerkinElmer). Absorbanssiarvoista laskettiin keskiarvo, joista vähennettiin nollanäytteiden keskiarvo. Adheesioprosentti saatiin vertaamalla absorbanssiarvoja 40 000 solun antamaan arvoon. Kaikki arvot laskettiin ja kuvaajat piirrettiin Microsoft Excel -taulukkolaskentaohjelmalla.

4.4. α IIB-GFP -konstruktion kloonaukset

α IIB-GFP-plasmidi tehtiin pilkkomalla hiiren β 3-GFP-plasmidi BaeI-restriktioentsyymillä (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) yön yli huoneenlämmössä. Pilkkomisen jälkeen plasmidille tehtiin PCR-puhdistus (QiaGen GmbH). Tämän jälkeen pilkkomista jatkettiin +37 °C:ssa AgeI ja KpnI -restriktioentsyymeillä (New England Biolabs) yön yli. Toisen pilkkomisen jälkeen plasmidi puhdistettiin GeneClean-puhdistuskitillä (Q-Biogene, Strasbourg, Ranska). α IIB-geeni monistettiin MyCycler PCR-laitteella (BioRad, Richmond, USA) pCDM8-plasmidista käyttäen Phusion DNA-polymeraasia (Finnzymes, Espoo, Suomi). DNA pitoisuus reaktiossa oli 21,2 ng/ μ l. Käytetyt alukkeet olivat 5' TATATAGGTACCATGGCCAGAGCTTTGTGTCCACTG koodittavalla juosteella ja 5' TATATATACCGGTCACCTCCCCTCTTCCCATCGTGCGGGTTG vastinjuosteella. PCR:n jälkeen α IIB-palalle tehtiin geelieristys ja PCR-puhdistus (QIAQuick geelieristyskiti, QiaGen) ja se pilkottiin KpnI ja AgeI -restriktioentsyymeillä. Monistettu α IIB liitettiin T4-ligaasilla (New Englands Biolabs) pilkottuun, GFP:n sisältävään pCDNA3-plasmidiin huoneenlämmössä kahden tunnin aikana. Saatu plasmidi siirrettiin Inoue-ultrakompetentteihin DH5 α -soluihin 90 sekunnin lämpöshokilla (Sambrook ja Russel, 2001). Soluja kasvatettiin yön yli maljoilla, joiden ampicilliinipitoisuus oli 200 μ g/ml. Pesäkkeet maljoilta siirrettiin kasvamaan yön yli LB-kasvatusliuoksessa 200 μ g/ml ampicilliinipitoisuudessa +37 °C:ssa

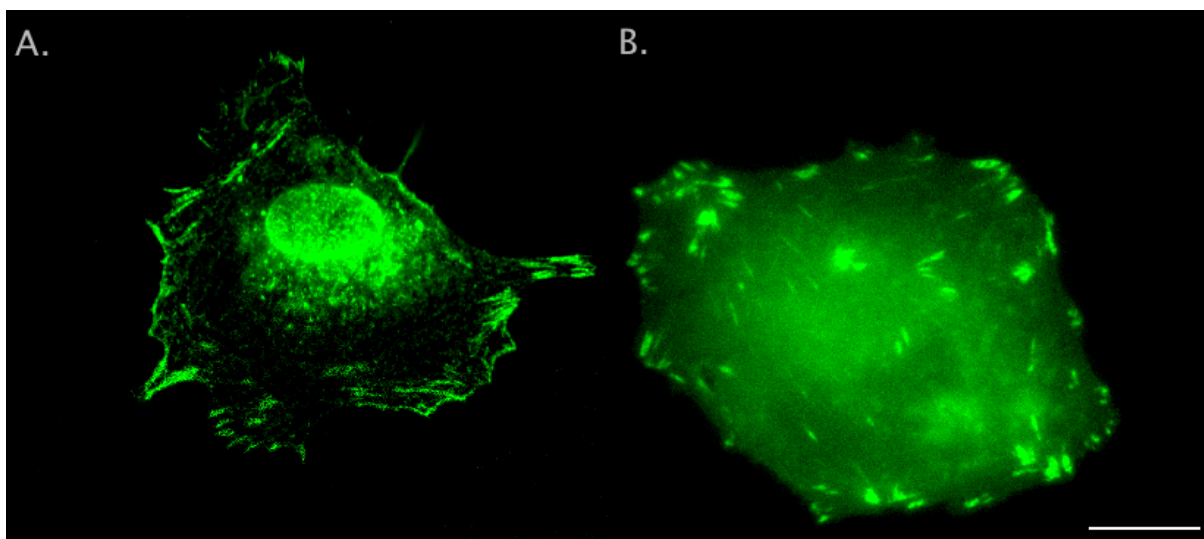
200 rpm ravistelussa. Plasmidit puhdistettiin QiaGen-plasmidi miniprep-kitillä ja PCR-puhdistuksella sekvensointia varten. Plasmideille tehtiin tarkistuspilkkonta ensin AgeI ja KpnI -restriktioentsyymeillä (New England Biolabs) ja kolme oikeankokoisen tuotteen tuottanutta plasmidia vielä AgeI, KpnI ja XhoI -entsyymeillä. Näistä kaksi valittiin sekvensoitaviksi.

α Iib-GFP -plasmidin sekvensointi suoritettiin MyCycler-PCR-laitteella (BioRad) ja Abi-Prism 3100 -sekvensointilaitteella (Applied Biosystems). Sekvenssilinjaukset α Iib-GFP -plasmille tehtiin Geneious -ohjelmalla (versio 4.6.2.) (Drummond ym., 2009).

α Iib-GFP-plasmidin testaamisen soluissa teki Heikki Takala. Transfektio tehtiin SAOS-soluille Fugene 6 -transfektioagenssilla valmistajan ohjeen mukaan. Solut siirrettiin vitronektiinillä (naudan vitronektiini, Immunodiagnosics, Hämeenlinna, Suomi) päällystetyille peitinlaseille ja annettiin tarttua vuorokauden. Vitronektiinipitoisuus oli 5 μ g/ml.

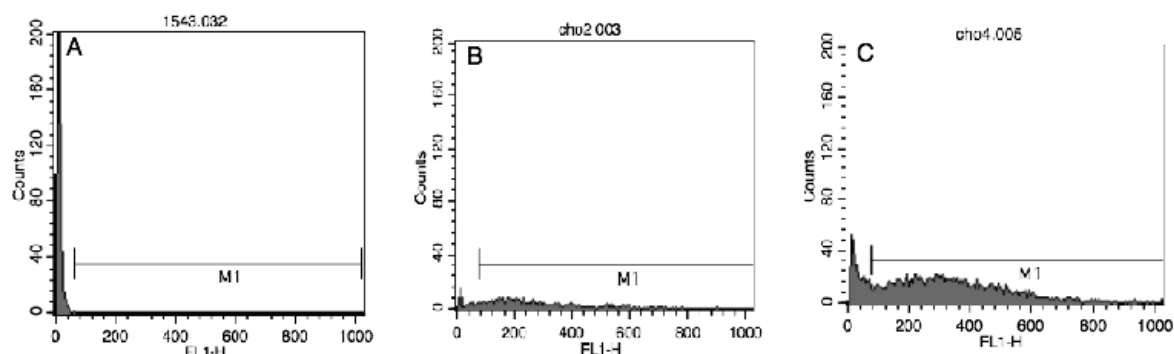
5. Tulokset

Aluksi haluttiin tietää paikallistuvatko hiiren ja ihmisen β 3-GFP:t fokaaliadheesioihin CHO-soluissa. Solut transfektoitiin hiiren ja ihmisen β 3-GFP:tä koodittavilla plasmideilla, siirrettiin fibrinogeenilla päällystetyille peitinlaseille ja kuvattiin GFP:n lokalisaatio. Näissä olosuhteissa ihmisen β 3-GFP lokalisoitui fokaaliadheesioihin paremmin kuin hiiren β 3-GFP. Ihmisen β 3-GFP:tä käytettäessä levinneitä soluja oli enemmän ja fokaaliadheesiot olivat selvempiä ja tarkkarajaisempia (kuva 6B) kuin hiiren β 3-GFP:tä käytettäessä (kuva 6A). Tästä syystä päätettiin jatkotutkimuksissa käyttää ihmisen β 3-GFP:tä.



Kuva 6. Hiiren (A) ja ihmisen (B) β 3-GFP:n lokalisoituminen fokaaliadheesioihin. Hiiren β 3-GFP transfektoitu väliaikaisesti CHO-soluihin. Ihmisen β 3-GFP transfektio on pysyvä. Kuvassa A käytetty Leica DM R/BE -fluoresenssimikroskooppia, 100x öljyobjektiveja ja Spot RT kameraa, kuvassa B Zeiss CellObserver mikroskooppia, 100x öljyobjektiveja ja AxioCam HRm -kameraa. Mittajana 10 μ m.

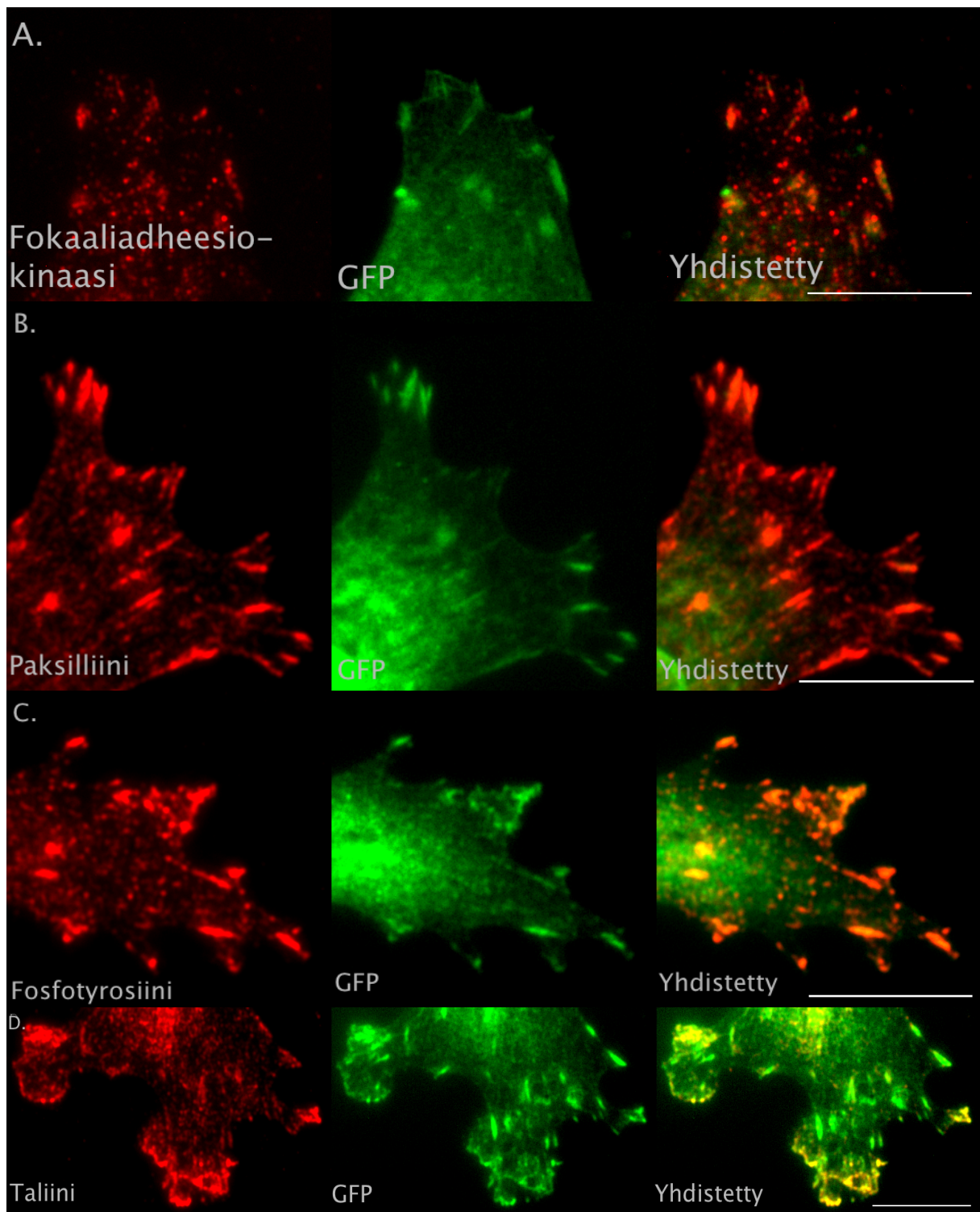
Koska lyhytaikaisissa transfektioissa GFP:n määrä vaihteli suuresti solujen välillä, päätettiin tehdä stabiileja solulinjoja, jotka ilmentävät α IIB:tä ja β 3-GFP:tä. CHO- α IIB β 3-GFP -soluista tarkastettiin virtausytometrillä β 3-GFP-transfektion ilmentymisprosentti. Solulinjan 2 ilmentymisprosentti oli 86,5 % ja solulinjan 4 82,14 % (kuva 7). Molemmat linjat ilmensivät α IIB:tä PL98DF6-värijäyksen perusteella mikroskopiassa. Jatkotutkimuksissa käytettiin solulinjaa 2.

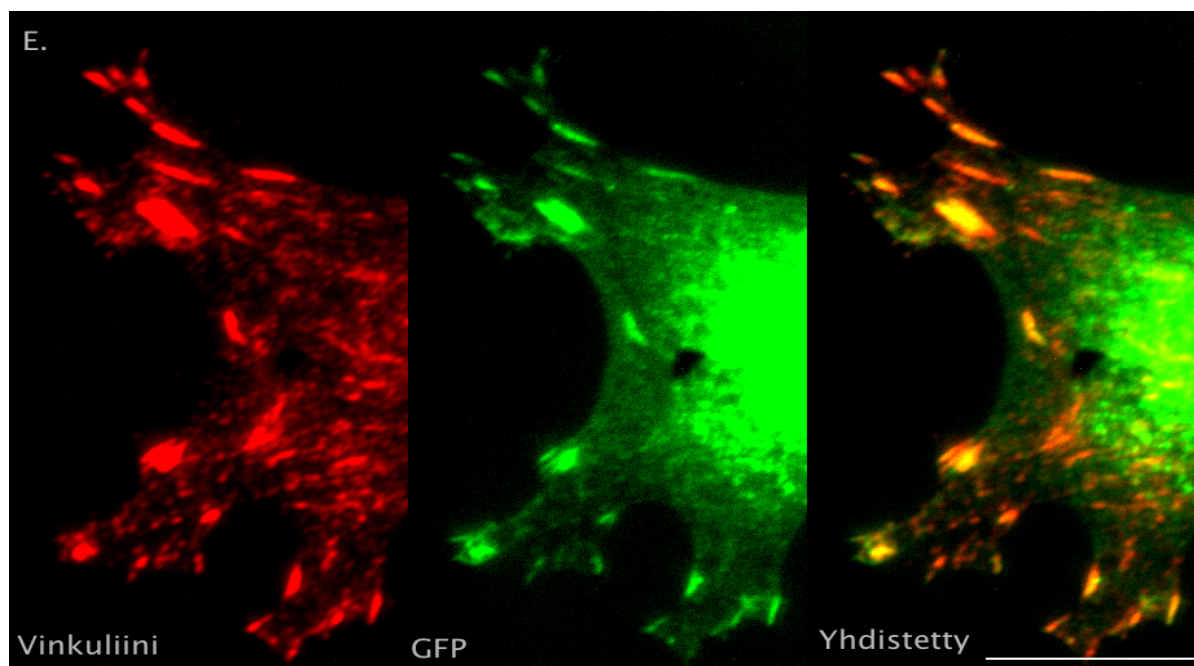


Kuva 7. Virtausytometrihistogrammit CHO- α IIB β 3-GFP -solulinjan pesäkkeistä. Kuvassa A kontrollisolut, kuvassa B tämän työn kokeissa käytetyt solut ja kuvassa C linjan 4 solut.

Seuraavaksi haluttiin selvittää, olivatko ihmisen β 3-GFP:tä sisältävät fokaaliadheesiot normaaleja muiden tunnettujen fokaaliadheesiokomponenttien suhteen. CHO- α IIB β 3-GFP -soluista värjättiin vasta-ainein vinkuliini, taliini, paksilliini, FAK ja fosfotyrosiini. Sekundaarivasta-aineena käytettiin Alexa594 -sekundaarivasta-ainetta (kuva 8). Kaikki GFP-positiiviset fokaaliadheesiot olivat positiivisia myös kaikilla näillä vasta-aineilla värjättäessä.

Kokeen perusteella β 3-GFP:tä sisältävät fokaaliadheesiot ovat proteiinikoostumukseltaan normaaleja.

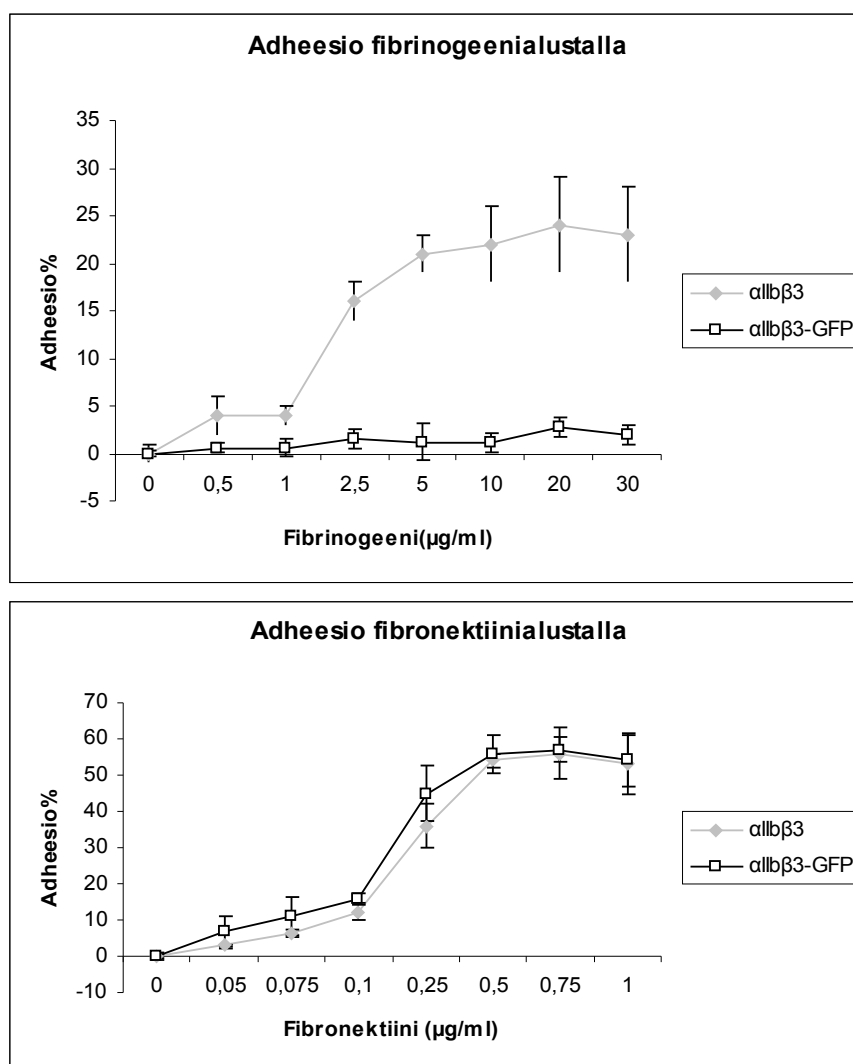




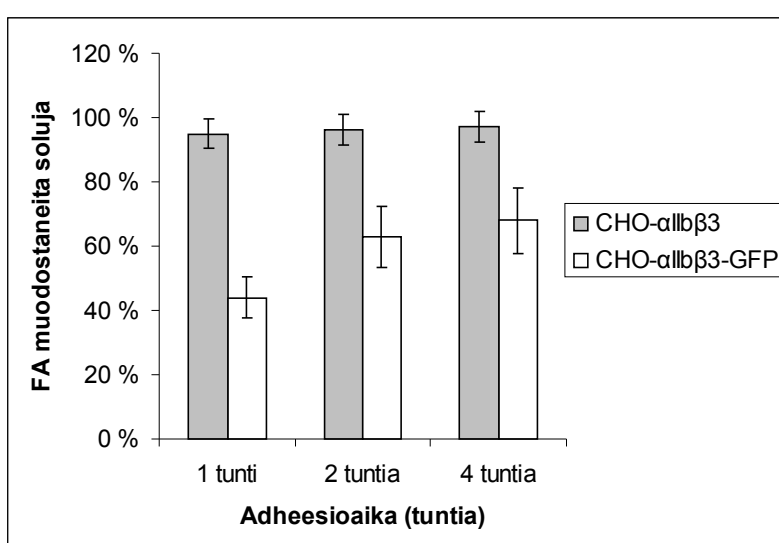
Kuva 8. α IIb β 3-GFP:n lokalisoituminen fokaaliadheesioihin. CHO- α IIb β 3-GFP -soluista on värjätty muita FA-proteiineja: A. FAK, B. paksilliini, C. fosfotyrosiini, D. taliini ja E. vinkuliini. Mittajanat 10 μ m.

Aiempien tulosten perusteella β 3-GFP:tä ilmentävät solut pystyvät muodostamaan normaaleja fokaaliadheesioita. Jotta β 3-GFP:tä voitiin verrata normaaliin β 3-integriiniin, solujen annettiin tarttua fibrinogeenillä ja fibronectiinillä päällystetylle alustalle 30 minuutin ajan. β 3-GFP:tä ilmentävät solut tarttuivat fibrinogeenille selvästi huonommin kuin solut, jotka eivät tuota GFP:tä. Sen sijaan fibronectiinillä tarttumisessa ei ollut eroja (kuva 9). β 3-GFP välittää huonommin tarttumista fibrinogeenillä, mutta ei vaikuta α 5 β 1-välitteiseen tarttumiseen fibronectiinillä.

Molemmista solutyypeistä värjättiin lisäksi vinkuliini tunnin, kahden tunnin ja neljän tunnin adheesion jälkeen ja laskettiin fokaaliadheesioita muodostaneiden solujen määrä. Värjäys tehtiin neljälle peitinlasille solutyypistä kohti jokaisessa aikapisteessä. Tunnin adheesion jälkeen CHO- α IIb β 3-GFP -soluista keskimäärin 44 %:ssa oli fokaaliadheesioita, kun CHO- α IIb β 3 -soluissa osuus oli 95 %. Neljän tunnin jälkeen luvut olivat 68 % ja 97 % (kuva 10).

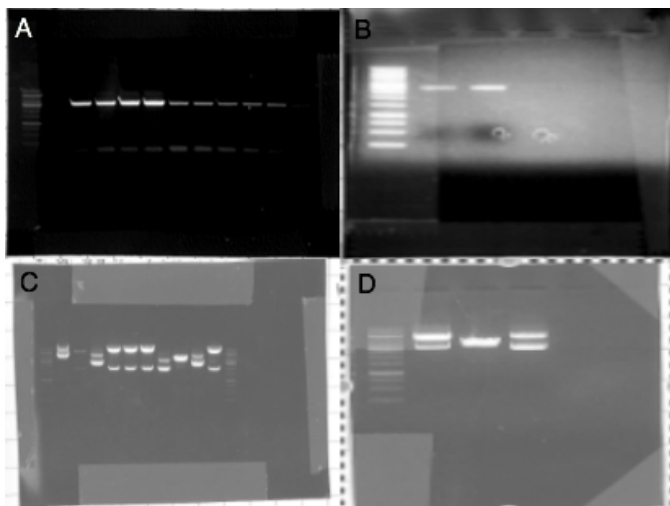


Kuva 9. CHO- α IIb β 3-GFP -solut tarttuvat huonommin fibrinogeenialustalle kuin CHO- α IIb β 3 -solut. Tarttumisessa ei ole eroa fibronectiinalustalla. Tulokset on laskettu neljän kokeen keskiarvona. Jokaisessa kokeessa tehtiin neljä rinnakkaista käsittelyä.

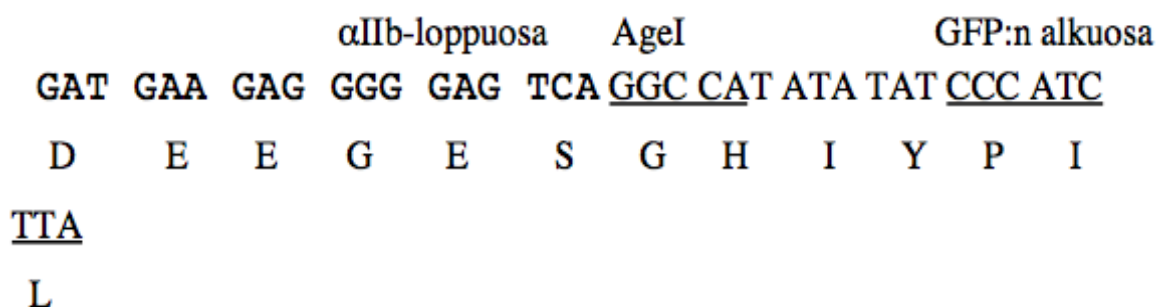


Kuva 10. Fokaaliadheesioita muodostaneiden solujen määrä eri aikapisteissä. CHO- α IIb β 3-GFP -solut muodostivat fokaaliadheesioita selvästi hitaammin kuin CHO- α IIb β 3 -solut.

Seuraavaksi haluttiin tietää, vaikuttaako α Ib:n liitetty GFP solujen tarttumiseen samoin kuin β 3:n liitetty GFP. Tätä varten suunniteltiin α Ib-GFP-konstrukti (kuva 12). α Ib-cDNA monistettiin PCR-reaktiolla ja siirrettiin β 3:n paikalle β 3-GFP -plasmidiin. Oikean palan sisältävät plasmidit tunnistettiin katkaisueentsyymikartoituksella (kuva 11).

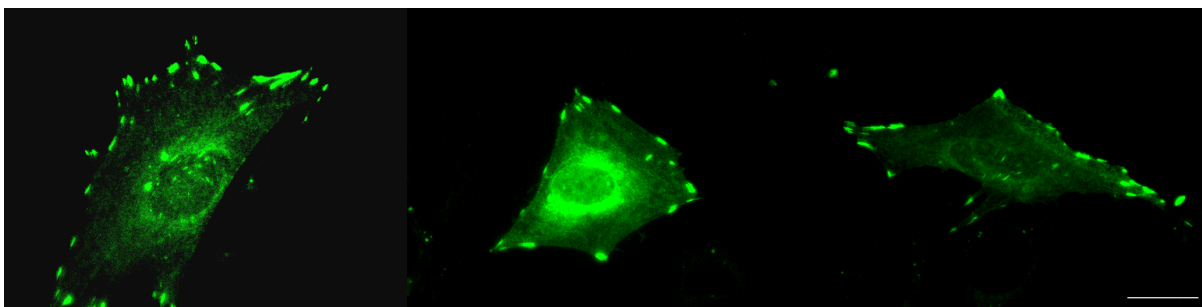


Kuva 11. α Ib-GFP -plasmidin puhdistus. A. PCR-reaktiotuote (α Ib-GFP) ennen puhdistusta. Ylempi vyöhyke on kooltaan noin 3500 emäsparia. B. α Ib-GFP PCR-tuote puhdistuksen jälkeen, vyöhyke on samankokoinen kuin puhdistamaton tuote C. Tarkistuspilkonta kasvatuksen ja puhdistuksen jälkeen. Pilkkominen tehtiin AgeI ja KpnI -entsyymeillä. Kaivossa 1 LMW-kokostandardi, sen jälkeen bakteeripesäkkeistä 1-10 puhdistetut plasmidit. Pesäkkeistä 2, 8 ja 9 puhdistetut plasmidit (kaivot 3, 9 ja 10) näyttivät oikeilta. D. Plasmidit 2, 8 ja 9 pilkottuna AgeI, KpnI ja XhoI -entsyymeillä. XhoI-entsyymin tuottama pala on liian pieni näkyäkseen geelissä, kaivojen 2 ja 4 DNA:t näyttävät pilkkoutuneen samalla lailla ja ne valittiin sekvensoitaviksi. Kaikissa geeleissä on käytetty LMW-kokostandardia (GeneRuler 1kb DNA-ladder, New England Biolabs).



Kuva 12. Suunnitellun α Ib-GFP-konstruktin liitososa. Sekä pCDNA3 -plasmidi että α Ib-insertti pilkottiin KpnI ja AgeI -katkaisueentsyymeillä. α Ib:n lopetuskodoni muutettiin seriiniksi (TCA).

α Ib-GFP -plasmidin toiminta testattiin transfektoimalla SAOS-soluja lyhytaikaisesti ja antamalla niiden tarttua vitronektiinille 24 tunnin ajan (kuva 13, Heikki Takala). α Ib-GFP paikallistuu fokaaliadheesioihin soluissa. Tästä voidaan päätellä, että α Ib-GFP toimii. Tarkempia tutkimuksia ei kuitenkaan aikarajojen puitteissa ehditty tehdä.



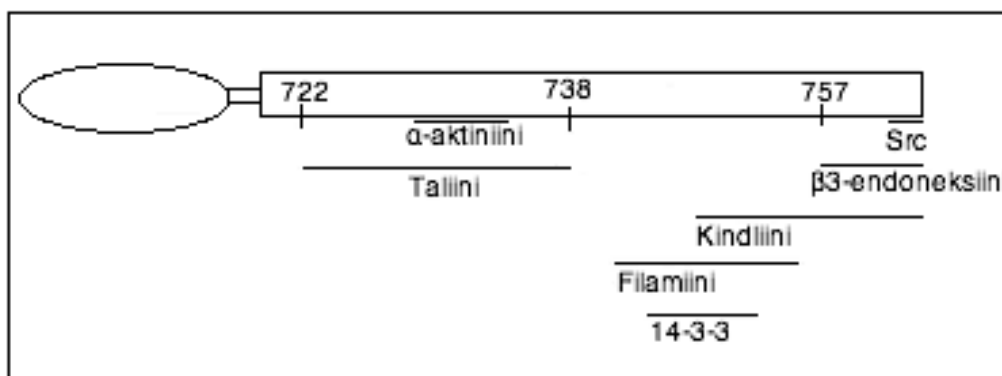
Kuva 13. α IIb-GFP:n lokalisaatio tarttumirakenteisiin SAOS-soluissa vitronektiinillä päällystetyillä peitinlaseilla 24 tunnin tarttumisen jälkeen. Kuvat Heikki Takala. Mittajana 10 μ m.

6. Tulosten tarkastelu

Tässä tutkimuksessa selvisi, että hiiren β 3-integriini toimi huonommin ihmisen α IIb:n kanssa kuin ihmisen β 3. CHO- α IIb β 3-GFP -solut muodostivat proteiinkoostumukseltaan normaaleja fokaaliadheesioita, mutta tarttuivat fibrinogeenilla päällystetylle alustalle huonommin kuin α IIb β 3:a ilmentävät solut. Fokaaliadheesiot myös muodostuivat hitaammin CHO- α IIb β 3-GFP -soluissa kuin normaaleissa CHO- α IIb β 3 -soluissa.

On mahdollista, että hiiren β 3 dimerisoituu huonommin ihmisen α IIb:n kanssa kuin ihmisen β 3 vaikka onkin havaittu, että ihmisen β 3 dimerisoituu ongelmitta hamsterin α IIb:n kanssa (Chen ym., 1995). Kvantitatiivista analyysiä ei tässä tutkimuksessa tehty ihmisen α IIb:n ja hiiren β 3:n lajispesifisestä dimerisoinnista. GFP voi heikentää solujen tarttumista vaikuttamalla integriinin aktivaatioon, fokaaliadheesioiden tai fokaalikompleksien muodostumiseen tai niiden uudelleen muodostumiseen.

Todennäköisesti GFP häiritsee β 3:n soluliman puoleiseen osaan sitoutuvien proteiinien, erityisesti kindliinin, Src:n ja β 3-endoneksiinin toimintaa. Se voi myös vaikuttaa soluliman puoleisen osan kalpainenvälitteiseen katkaisuun. Integriinin β -alaysikön soluliman puoleiseen osaan sitoutuvia proteiineja on esitetty kuvassa 9 (muokattu, yleiskatsaukset Liu ym., 2000, Harburger ja Calderwood, 2009). Näistä proteiineista tässä tutkimuksessa oli mukana vain taliini.



Kuva 14. β -integroinin soluliman puoleiseen osaan sitoutuvien proteiinien sitoutumiskohtia. Numeroin merkitty muutamia aminohappotähteitä (yleiskatsaus Harburger ja Calderwood, 2009).

Taliini on välttämätön adheesioiden muodostumiselle ja tärkeä integriinien sisältä-ulos-signaloinnin säätelijä (Giannone ym., 2003). Toinen integriinien aktivaatiota säätelevä tekijä on kindliini, joka sitoutuu β -integroinin karboksipäähän. Kindliinin sitoutumisen estäminen johtaa integriinin aktivaation estymiseen. Taliinin ja kindliinin yhteisvaikutus puolestaan aktivoi integriinejä (yleiskatsaus Harburger ja Calderwood, 2009). Taliinin on havaittu paikallistuvan β -GFP:n kanssa fokaalikomplekseihin (Zaidel-Bar ym., 2003). Tässä tutkimuksessa huomattiin β -GFP:n muodostavan fokaaliadheesioita ja vasta-ainevärjäys osoitti taliinin paikallistuvan niihin yhdessä GFP:n kanssa. Taliinin aktivaatiota ei kuitenkaan tutkittu, joten lopullisia päätelmiä ei voida tehdä.

β -endoneksiinin sitoutuu spesifisesti β -integroinin soluliman puoleiseen osaan ja sen on todettu lisäävän α I**b** β 3:n ligandinsitomisasiivisuutta (yleiskatsaus Liu ym., 2000). Se on myös tärkeä tekijä solujen leviämisessä ja integriinisignaloinnissa. Mutaatio β -integroinin soluliman puoleisen osan aminohappotähteessä 752 johtaa solujen heikentyneeseen tarttumiseen ja samalla heikentää β -endoneksiinin sitoutumista (Kashiwagi ym., 1997). GFP voi häiritä β -endoneksiinin toimintaa ja siten heikentää solujen tarttumista.

Src-kinaasi säätelee α I**b** β 3-integroinin ulkoa-sisälle aktivaatiota ja fokaaliadheesioiden uudelleen muodostumista (Oberfell ym., 2002, Webb ym., 2002). Src-inhibitio ja Src:n poisto johtaa solujen leviämisen estymiseen (Oberfell ym., 2002). Arias-Salgado ym. (2003) huomasivat, ettei α 5 **β** 1-integroini yhteissaostu c-Src:n kanssa ja päättelivät c-Src:n vuorovaikutuksen olevan tyypillinen β -integroinille. Mikäli GFP vaikuttaisi Src:n toiminnalle tärkeisiin osiin integriinissä, ei integriinin ulkoa-sisälle aktivaatiota tapahtuisi tai se tapahtuisi heikommin. Tämä voisi olla selitys heikentyneelle tarttumiselle. Src:n ja β -integroinin välisen vuorovaikutuksen spesifisyys taas selittäisi sen, ettei GFP vaikuta α 5 **β** 1-välitteiseen tarttumiseen.

Kalpaiini on proteaasi, joka säätelee integriinivälitteisten adheesioiden dynamiikkaa pilkkomalla useita adheesiorakenteiden proteiineja. Kalpaiiniaktiivisuuden esto estää soluja irtoamasta alustastaan (Perrin ja Huttenlocher, 2002). Pilkkominen poistaa tarttumiselle ja kaksisuuntaiselle signaloinnille tärkeät aminohappotähteet ja säätelee siten β 3-integriinin toimintaa (Du ym., 1995).

Tämän työn perusteella ei voida tehdä lopullisia johtopäätöksiä siitä, miksi GFP haittaa solujen tarttumista. Aiemmin on havaittu integriinin toimivan normaalisti GFP:stä huolimatta (Plancon ym., 2001). Jatkotutkimuksissa α Ib-GFP -plasmidin avulla voitaisiin selvittää vaikuttaako GFP samoin myös α -alaysikköön liitettynä. Myös tutkimalla GFP:n vaikutusta Src:n ja kalpaiinin toimintaan voitaisiin saada lisätietoa mekanismista, jolla GFP häiritsee tarttumista. Tarkempaa tietoa saataisiin myös selvittämällä kindliinin ja β 3-endoneksiinin sitoutumista integriiniin sekä taliinin, kindliinin ja β 3-endoneksiinin aktivaatiota.

LÄHTEET

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts ja P. Walter. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. Garland Science.
- Arias-Salgado, E.G., S. Lizano, S. Sarkar, J.S. Brugge, M.H. Ginsberg ja S.J. Shattil. 2003. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100:13298-302.
- Arnaout, M.A., S.L. Goodman ja J.-P. Xiong. 2007. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:495-507.
- Ballestrem, C., B. Hinz, B.A. Imhof, B. ja Wehrle-Haller. 2001. Marching at the front ja dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* 155:1319-32.
- Bass, M.D., B.J. Smith, S.A. Prigent ja D.R. Critchley. 1999. Talin contains three similar vinculin-binding sites predicted to form an amphipathic helix. *Biochem. J.* 341:257-63.
- Bazzi, H. ja M. Christano. 2007. Broken hearts, woolly hair, and tattered skin: when desmosomal adhesion goes awry. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:515-20.
- Bershadsky, A.D., C. Ballestrem, L. Carramusa, Y. Zilberman, B. Gilquin, S. Khochbin, A.Y. Alexandrova, A.B. Verkhovskiy, T. Shemesh ja M.M. Kozlov. 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur. J. Cell Biol.* 85:165-73.
- Borgon, R.A., C. Vonrhein, G. Bricogne, P.R.J. Bois ja T. Izard. 2004 Crystal structure of human vinculin. *Structure*. 12:1189-97.
- Brakebusch, C., E. Hirsch, A. Potocnik ja R. Fässler. 1997. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J. Cell Sci.* 110:2895-904.
- Broussard, J.A., D.J. Webb ja I. Kaverina. 2008. Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20:85-90.
- Brown, M.C., J.A. Perrotta ja C.E. Turner. 1996. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell Biol.* 135:1109-23.
- Brown, M.C. ja C. Turner. 2002. Roles for the tubulin- and PTP-PEST-binding paxillin LIM domains in cell adhesion and motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:855-63.
- Brown, M.C. ja C.E. Turner. 2004. Paxillin: adapting to change. *Physiol. Rev.* 84:1315-39.
- Cavalcanti-Adam, E.A., T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger ja J.P. Spatz. 2007. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys. J.* 92:2964-74.
- Chen, Y.P., T.E. O'Toole, L. Leong, B.Q. Liu, F. Diaz-Gonzalez ja M.H. Ginsberg. 1995. Beta 3 integrin-mediated fibrin clot retraction by nucleated cells: differing behavior of alpha IIB beta 3 and alpha v beta 3. *Blood*. 86:2606-15.
- Chen, H., D.M. Choudhury ja S.W. Craig. 2006. Coincidence of actin filaments and talin is required to activate vinculin. *J. Biol. Chem.* 281:40389-98.
- Chen, X. ja B.M. Gumbiner. 2006. Crosstalk between different adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:572-8.
- Cobb, B.S. M.D. Schaller, T.H. Leu ja J.T. Parsons. 1994. Stable association of pp60src ja pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol. Cell Biol.* 14:147-55.
- Cooray, P., Y. Yuan, S.M. Schoenwaelder, C.A. Mitchell, H.H. Salem ja S.P. Jackson. 1996. Focal adhesion kinase (pp125^{FAK}) cleavage and regulation by calpain. *Biochem. J.* 318:41-47.
- Critchley, D. 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:133-139.

- Critchley, D.R. ja A.R. Gingras. 2008. Talin at a glance. *J. Cell Sci.* 121:1345-7.
- Deakin, N. ja C. Turner. 2008. Paxillin comes of age. *J. Cell Sci.* 121: 2435-44.
- DeMali, K., K. Wennerberg ja K. Burridge. 2003. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:572-82.
- Dowling, J., Q.C. Yu ja E. Fuchs. 1996. Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell. Biol.* 134:559-72.
- Drummond AJ, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones-Havas S, Thierer T, Wilson A. 2009. Geneious v4.6, Available from <http://www.geneious.com/>
- Du, X., T.C. Saïdo, S. Tsubuki, F.E. Indig, M.J. Williams ja M.H. Ginsberg. 1995. Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. *J. Biol. Chem.* 270:26146-51.
- Engelhardt, B. 2008. Immune cell entry into the central nervous system: involvement of adhesion molecules and chemokines. *J. Neurol. Sci.* 274:23-6.
- Evans, R., I. Patzak, L. Svensson, K. De Filippo, K. Jones, A. McDowall ja N. Hogg. 2009. Integrins in immunity. *J. Cell Sci.* 122:215-25.
- Franco, S.J. ja A. Huttenlocher. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell. Sci.* 118:3829-38.
- Furuse, M., M. Hata, K. Furuse, Y. Yoshida, A. Haratake, Y. Sugitani, T. Noda, A. Kubo ja S. Tsukita. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156:1099-111.
- García-Alvarez, B., J.M. de Pereda, D.A. Calderwood, T.S. Ulmer, D. Critchley, I.D. Campbell, M.H. Ginsberg ja R.C. Liddington. 2003. Structural Determinants of Integrin Recognition by Talin. *Mol. Cell.* 11:49-58.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov ja K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:793-805.
- Geiger, B. ja A. Bershadsky 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:584-92.
- Giannone, G., G. Jiang, D.H. Sutton, D.R. Critchley ja M.P. Sheetz. 2003. Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J. Cell Biol.* 163:409-19.
- Giannone, G., P. Rondé, M. Gaire, J. Beaudouin, J. Haiech, J. Ellenberg ja K. Takeda. 2004. Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J. Biol. Chem.* 279:28715-23.
- Ginsberg M.H., A. Partridge ja S.J. Shattil. 2005. Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:509-16.
- Glukhova M.A., M.G. Frid ja V.E. Kotliansky. 1990. Developmental changes in expression of contractile and cytoskeletal proteins in human aortic smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 265:13042-6.
- Goh, K.L. J.T. Yang ja R.O. Hynes. 1997. Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin-null embryos. *Development.* 124: 4309-19.
- Hanks, S.K., M.B. Calalb, M.C. Harper ja S.K. Patel. 1992. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:8487-91.
- Harburger, D.S. ja D.A. Calderwood. 2009. Integrin signalling at a glance. *J. Cell. Sci.* 122:159-63.
- Hodivala-Dilke, K.M., K.P. McHugh, D.A. Tsakiris, H. Rayburn, D. Crowley, M. Ullman-Culleré, F.P. Ross, B.S. Collier, S. Teitelbaum ja R.O. Hynes 1999. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J. Clin. Invest.* 103:229-38.

- Hynes, R.O. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*. 110:673–687.
- Izard, T., G. Evans, R.A. Borgon, C.L. Rush, G. Bricogne ja P.R.J. Bois. 2004. Vinculin activation by talin through helical bundle conversion. *Nature*. 427:171-5.
- Jamieson, J.S., D.A. Tumbarello, M. Hallé, M.C. Brown, M.L. Tremblay ja C.E. Turner. 2005. Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker. *J. Cell Sci*. 118:5835-47.
- Kashiwagi, H., M.A. Schwartz, M. Eigenthaler, K.A. Davis, M.H. Ginsberg ja S.J. Shattil. 1997. Affinity modulation of platelet integrin α IIb β 3 by β 3-endonexin, a selective binding partner of the β 3 integrin cytoplasmic tail. *J. Cell Biol*. 137:1433-43.
- Laukaitis, C.M. D.J. Webb ja D.A.F. Horwitz. 2001. Differential dynamics of α 5 integrin, paxillin, and α -actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J. Cell Biol*. 153:1427-40.
- Lien, W.H. O. Klezovitch ja V. Vasioukhin. 2006. Cadherin-catenin proteins in vertebrate development. *Curr. Opin. Cell Biol*. 18:499-506.
- Lietha, D., X. Cai, D.F.J. Ceccarelli, Y. Li, M.D. Schaller ja M.J. Eck. 2007. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell* 129:1177-87.
- Liu S., D.A. Calderwood ja M.H. Ginsberg. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J. Cell Sci*. 113:3563-71.
- Lo, S.H. 2006. Focal adhesions: what's new inside. *Dev. Biol*. 294:280-91.
- Loftus, J.C., T.E. O'Toole, E.F. Plow, A. Glass, A.L. Frelinger ja M.H. Ginsberg. 1990. A β 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science*. 249:915-918.
- Luo, B.H. ja T.A. Springer 2006. Integrin structures ja conformational signaling. *Curr. Opin. Cell Biol*. 18:579-86.
- Margadant, C., E. Frijns, K. Wilhelmssen ja A. Sonnenberg. 2008. Regulation of hemidesmosom disassembly by growth factor receptors. *Curr. Opin. Cell Biol*. 20:589-96.
- Mitra, S.K., D.A. Hanson ja D.D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: in commja and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 6:56-68.
- Nobes, C.D. ja A. Hall. 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.
- Nowakowski, J., C.N. Cronin, D.E. McRee, M.W. Knuth, C.G. Nelson, N.P. Pavletich, J. Rogers, B.C. Sang, D.N. Scheibe, R.V. Swanson ja D.A. Thompson. 2002. Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure*. 10:1659-67.
- Obergfell, A., K. Eto, A. Mocsai, C. Buensuceso, S.L. Moores, J.S. Brugge, C.A. Lowell ja S.J. Shattil. 2002. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]II\beta$ 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J. Cell Biol*. 157:265-75.
- Oda, A., B.J. Druker, H. Ariyoshi, M. Smith ja E.W. Salzman. 1993. pp60src is an endogenous substrate for calpain in human blood platelets. *J. Biol. Chem*. 268:12603-8.
- Perrin, B.J. ja A. Huttenlocher. 2002. Calpain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 34:722-5.
- Pfaff M., X. Du ja M.H. Ginsberg. 1999. Calpain cleavage of integrin β cytoplasmic domains. *FEBS Lett*. 460:17-22.
- Plançon, S., M.C. Morel-Kopp, E. Schaffner-Reckinger, P. Chen ja N. Kieffer. 2001. Green fluorescent protein (GFP) tagged to the cytoplasmic tail of α IIb or β 3 allows the expression of a fully functional integrin α IIb(β 3): effect of β 3GFP on α IIb(β 3) ligand binding. *Biochem. J*. 357:529-36.

- Plow, E.F. T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus ja J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275:21785-8.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008.
- Sambrook, J. ja D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, volume 1. Third Edition. Gold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sieg, D.J., C.R. Hauck, D. Ilic, C.K. Klingbeil, E. Schaefer, C.H. Damsky ja D.D. Schlaepfer. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* 2:249-56.
- Tadokoro, S., S.J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R.C. Liddington, J.M. de Pereda, M.H. Ginsberg ja D.A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science.* 302:103-6.
- Toutant, M., A. Costa, J.-M. Studler, G. Kadaré, M. Carnaud ja J.-A. Girault. 2002. Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 22:7731-43.
- Tronik-Le Roux, D., V. Roullot, C. Poujol, T. Kortulewski, P. Nurden ja G. Marguerie. 2000. Thrombasthenic mice generated by replacement of the integrin alpha(IIB) gene: demonstration that transcriptional activation of this megakaryocytic locus precedes lineage commitment. *Blood.* 96:1399-408.
- Stokes, D. 2007. Desmosomes from a structural perspective. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:565-71.
- Tumbarello, D.A., M.C. Brown ja C.E. Turner. 2002. The paxillin LD motifs. *FEBS Lett.* 513:114-8.
- Turner, C.E., J.R. Glenney ja K. Burridge. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* 111:1059-68.
- Turner, C.E. ja J.T. Miller. 1994. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 ja SH3 domain binding motifs ja multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *J. Cell Sci.* 107:1583-91.
- Turner, C.E. 2000. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* 2: E231-6.
- van der Flier, A. ja A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-98.
- Vicente-Manzanares, M., J. Zareno, L. Whitmore, C.K. Choi ja A.F. Horwitz. 2007. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J. Cell Biol.* 176:573-80.
- Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow ja J. Qin. A structural mechanism of integrin alpha(IIB)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. 2002. *Cell.* 110:587-97.
- Webb, D.J., J.T. Parsons ja A.F. Horwitz. 2002. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* 4:E97-100.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons ja A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK ja MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol.* 6:154-61.
- Weekes, J., S.T. Barry ja D.R. Critchley. 1996. Acidic phospholipids inhibit the intramolecular association between the N- ja C-terminal regions of vinculin, exposing actin-binding and protein kinase C phosphorylation sites. *Biochem. J.* 314:827-32.
- Xu, W. 1998. Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development.* 125:327-337.
- Yamaguchi, R., M. Maki, M. Hatanaka ja H. Sabe. 1994. Unphosphorylated and tyrosine-phosphorylated forms of a focal adhesion protein, paxillin, are substrates for calpain II in vitro: implications for the possible involvement of calpain II in mitosis-specific degradation of paxillin. *FEBS Lett.* 356:114-6.
- Yang, J.T., H. Rayburn ja R.O. Hynes. 1993. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development.* 119:1093-105.

- Yläne, J., M. Hormia, M. Järvinen, T. Vartio ja I. Virtanen. 1988. Platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in cultured cells. Localization in focal adhesion sites in spreading HEL cells. *Blood*. 72:1478-86.
- Yläne J., J. Huuskonen, T.E. O'Toole, M.H. Ginsberg, I. Virtanen ja C.G. Gahmberg. 1995. Mutation of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. Differential effects on cell spreading, recruitment to adhesion plaques, endocytosis, and phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 270:9550-7.
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam ja B. Geiger. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* 116:4605-13.
- Zamir, E., B.-Z. Katz, S. Aota, K.M. Yamada, B. Geiger ja Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 112:1655-1669.
- Zamir, E. ja B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 114:3583-90.
- Ziegler, W.H., R.C. Liddington ja D.R. Critchley. 2006. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 16:453-60.