

**Filamiini A:n domeenien 16-21 vuorovaikutus
dopamiinireseptorin kanssa**

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologian osasto

19.10.2009

Emilia Horttana

ALKUSANAT

Tähän pro gradu -tutkielmaan liittyvä työ tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen solu- ja molekyylibiologian osastolla professori Jari Ylänteen ryhmässä. Tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin huhti-syyskuussa 2008.

Haluan kiittää Jari Ylänettä pro gradu -paikan myöntämisestä sekä tutkimuksen mahdollistamisesta. Kiitokset kuuluvat myös ohjaajilleni Ulla Pentikäiselle ja Salla Ruskamolle, laboratoriomestari Arja Mansikkaviidalle sekä Heikki Takalalle heidän antamistaan korvaamattomista ohjeista ja neuvoista. Lisäksi kiitän kärsivällisyydestä kaikkia muita laitoksen henkilökuntaan kuuluvia, jotka joutuivat toistuvasti tarjoamaan apuaan ja vastailemaan kysymyksiini.

Tekijä:	Emilia Horttana
Tutkielman nimi:	Filamiini A:n domeenien 16-21 vuorovaikutus dopamiinireseptorin kanssa
English title:	Interaction of Filamin A Domains 16-21 with Dopamine Receptor
Päivämäärä:	19.10.2009 Sivumäärä: 49
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Molekyylibiologia
Tutkielman ohjaajat:	FT, Dos Ulla Pentikäinen ja FM Salla Ruskamo

Tiivistelmä:

Filamiinit ovat suuria, kahdesta samanlaisesta peptidiketjusta koostuvia aktiinia verkostoiksi liittäviä proteiineja. Ne sitovat useita toiminnallisesti erilaisia proteiineja, muun muassa kalvorseptoreja, viestinvälittäjämolekyylejä, ionikanavia sekä entsyymejä ja yhdistävät ne aktiinitukirankaan. Soluissa filamiinien ja niiden ligandien välisten vuorovaikutusten säätely tapahtuu reseptorien muiden ligandien sitoutumisen, fosforylaation, proteolyysin tai mekaanisen voiman avulla. Filamiinit koostuvat molekyylin aminopäähän sijoittuvasta aktiinia sitovasta domeenista, 24 immunoglobuliinien kaltaisesta, β -levyrakenteita muodostavasta domeenista sekä kahdesta, domeenien 15 ja 16 sekä 23 ja 24 väliin sijoittuvasta sarana-alueesta. Viimeinen 24. domeeni osallistuu filamiinimonomeerien dimerisaatioon ja sarana-alueiden välille jäävät domeenit filamiinien ligandien sitomiseen. Domeenit 18-21 järjestäytyvät siten, että parillisten domeenien A-säikeet ovat vuorovaikutuksessa niitä seuraavien parittomien domeenien C- ja D-säikeiden kanssa. Tässä työssä tutkittiin analyyttisen geelisuodatuksen sekä sitoutumiskokeiden avulla, vaikuttavako filamiini A:n domeenien 18 tai 20 A-säikeisiin tehdyt mutaatiot domeeneista 16-21 koostuvan proteiinin konformaatioon tai dopamiinireseptorin sitoutumiseen domeeniin 19. Proteiinin konformaatio pysyi muuttumattomana ja domeeniin 18 sijoittuvan mutaation havaittiin lisäävään ligandin sitoutumista. Tulokset ovat yhteneväisiä aikaisempien tutkimusten kanssa, joissa on todettu domeeniparien 18-19 ja 20-21 olevan rakenteeltaan samankaltaisia sekä domeenin 20 A-säikeen peittävän integriinien sitoutumiskohdan domeenissa 21. Lisäksi domeenin 20 A-säikeen ja domeenin 21 CD-pinnan välisen vuorovaikutuksen tuhoavan mutaation on havaittu johtavan domeeniin 21 sitoutuvan ligandin sitoutumisaffiniteetin nousuun. Tässäkin työssä havaittu vierekkäisten filamiinidomeenien ligandien sitoutumista estävä vaikutus toimii mahdollisesti yleisenä mekanismina filamiinien ja niiden ligandien välisten vuorovaikutusten säätelyssä.

Author: Emilia Horttana
Title of thesis: Interaction of Filamin A Domains 16-21 with Dopamine Receptor
Finnish title: Filamiini A:n domeenien 16-21 vuorovaikutus dopamiinireseptorin kanssa
Date: 19.10.2009 **Pages:** 49

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular Biology
Supervisors: Ph.D., Docent Ulla Pentikäinen and M.Sc. Salla Ruskamo

Abstract:

Filamins are large homodimeric actin-crosslinking proteins. They interact with various other proteins including transmembrane receptors, signaling molecules, ion channels and enzymes and connect them to actin cytoskeleton. In cells filamin-ligand interactions are regulated via receptor occupancy, phosphorylation, proteolysis or mechanical force. Filamins consist of N-terminal actin binding domain, 24 domains adopting an immunoglobulin-like fold and two hinge regions, which are located between domains 15 and 16 and between domains 23 and 24. The last 24th domain is involved in filamin dimerization and the domains situated between hinge regions bind ligands. Domains 18-21 are organized so that the A-strands of even domains interact with C- and D-strands of the next odd domains. This study was performed to examine if mutations in the A-strands of filamin A domains 18 or 20 affect the conformation of a protein construct consisting of domains 16-21 or binding of dopamine receptor to domain 19. The mutations did not have an effect on the protein conformation but the mutation in domain 18 enhanced ligand binding to domain 19. These results are in agreement with earlier studies which showed that domain pairs 18-19 and 20-21 adopt similar structures and that the A-strand of domain 20 covers an integrin binding site in domain 21. It is also shown that disturbing this interaction between the A-strand of domain 20 and the CD-face of domain 21 with mutation increases ligand binding. The auto-inhibition of ligand binding which was observed in this study as well may be a general mechanism to regulate interactions between filamins and their ligands.

Keywords: filamin, dopamine receptor, filamin-dopamine receptor interaction

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	8
1.1. Filamiinien isomuodot ja ilmentäminen.....	8
1.2. Filamiinien rakenne.....	8
1.2.1. Aktiinia sitovan domeenin rakenne ja toiminta.....	10
1.2.2. Immunoglobuliinien kaltaisten domeenien rakenne.....	11
1.3. Filamiinien dimerisaatio.....	14
1.4. Filamiinit ja aktiiniverkostojen muodostaminen.....	15
1.4.1. Aktiiniverkostojen muodostamisen säätely.....	17
1.5. Filamiinien vuorovaikutuskumppanit.....	18
1.5.1. Kalvoproteiinit.....	19
1.5.2. Viestinvälittäjä-molekyylit	25
1.6. Filamiinivuorovaikutusten säätely	26
1.6.1. Reseptorien muiden ligandien sitoutuminen.....	26
1.6.2. Fosforylaatio.....	27
1.6.3. Proteolyysi.....	27
1.6.4. Mekaaninen voima	28
1.7. Filamiinien rooli ihmisten sairauksissa.....	29
1.7.1. Periventrikulaarinen nodulaarinen heterotopia.....	29
1.7.2. Otopalatodigitaalinen oireyhtymä, Melnick-Needlesin oireyhtymä ja frontometaphyseaalinen dysplasia.....	31
1.7.3. Autoimmuunisairaudet.....	32
1.7.4. Emery-Dreifussin lihasrappeuma ja Barthin oireyhtymä	32
2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	33
3. MATERIAALI JA MENETELMÄT.....	34
3.1. Mutageneesi ja proteiinien tuotto.....	34
3.2. Proteiinien puhdistus	35
3.3. Analyttinen geelisuodatus.....	35
3.4. Sitoutumiskokeet.....	35

4. TULOKSET.....	37
4.1. Mutaatioiden suunnittelu.....	37
4.2. Mutaatioiden vaikutus proteiinin konformaatioon.....	37
4.3. Mutaatioiden vaikutus dopamiinireseptoripeptidien sitoutumiseen	39
5. TULOSTEN TARKASTELU.....	41
6. LÄHDELUETTELO.....	44

LYHENTEET

ABD	aktiinia sitova domeeni, engl. <i>actin binding domain</i>
CH-domeeni	kalponiinihomologiadomeeni, engl. <i>calponin homology domain</i>
FLNA	filamiini A
FLNB	filamiini B
FLNC	filamiini C
H1	sarana-alue 1, engl. <i>hinge 1</i>
H2	sarana-alue 2, engl. <i>hinge 2</i>
IgFLN	filamiinin immunoglobuliinien kaltainen sauvadomeeni
Pak1	p21-aktivoitu kinaasi 1, engl. <i>p21-activated kinase 1</i>
PDB	Protein Data Bank
PVNH	periventrikulaarinen nodulaarinen heterotopia, engl. <i>periventricular nodular heterotopia</i>

1. JOHDANTO

1.1. Filamiinien isomuodot ja ilmentäminen

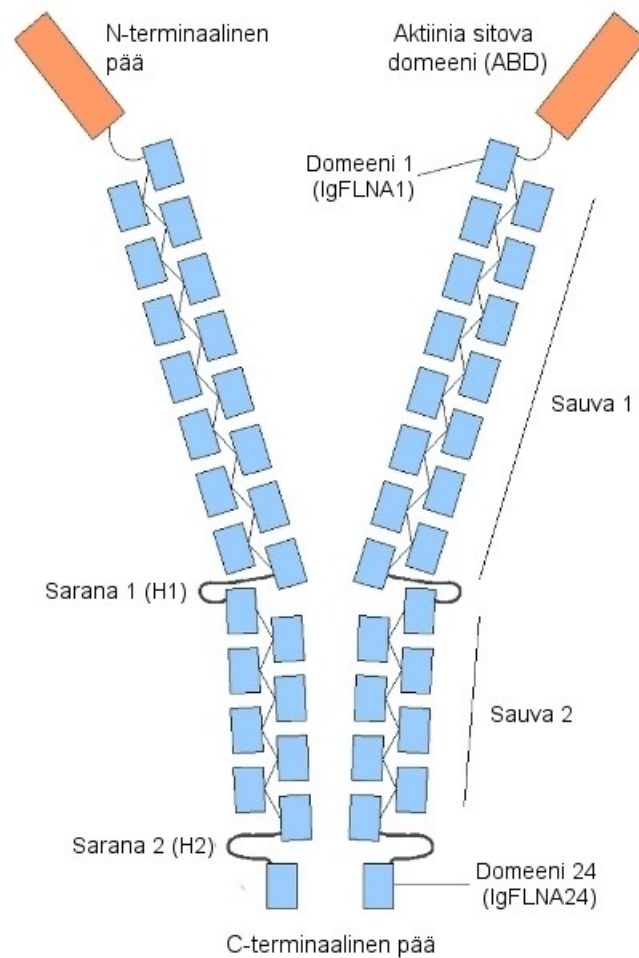
Ihmisillä on kolme homologista geeniä, jotka koodittavat filamiiniproteiineja A (FLNA), B (FLNB) ja C (FLNC, ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001; ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Ihmisen filamiinit ovat sekvenssiltään 70 % identtisiä (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Poikkeuksen eri filamiini-isomuotojen sekvenssien samankaltaisuuteen tekevät noin 30 aminohappotähteestä koostuvat joustavat silmukat, joita kutsutaan sarana-alueiksi 1 ja 2 (H1, H2, engl. *hinge 1*, *hinge 2*, kuva 1). Lisäksi FLNC:n domeeni 20 sisältää 81 ylimääräistä aminohappoa, joita ei löydy FLNA:sta tai FLNB:stä (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001).

X-kromosomin koodittama FLNA on ihmisen filamiineista eniten ilmenetty. FLNA:ta ja FLNB:tä ilmenetään kaikkialla elimistössä, FLNC:tä luusto- ja sydänlihaksessa (Thompson ym., 2000). Luustoliuksessa suurin osa FLNC:stä sijaitsee Z-levyissä, jotka liittävät solukalvon ja myofibrillit toisiinsa sitoutumalla γ - ja δ -sarkoglygaaneihin, sekä lihas-jänneliitoksissa, mutta sitä voidaan havaita matalina pitoisuuksina myös solukalvolla aktiinitukirangan yhteydessä. Sydänlihaksessa FLNC:tä esiintyy Z-levyissä ja kytkylevyissä (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Viljellyissä soluissa filamiinia on pääasiassa aktiinistressisäikeissä ja kortikaalisissa aktiiniverkostoissa, mutta sitä voidaan havaita myös vaeltavien solujen kalvoröyhelöiden pohjalta (Chiang ym., 2000; van der Ven ym., 2000). Jakautuvissa soluissa filamiini keskittyy jakautumisuurteeseen (Nunnally ym., 1980).

1.2. Filamiinien rakenne

Selkärankaisten filamiinit ovat karboksyyliapäistään toisiinsa yhteydessä olevia, kahdesta 240-280 kDa:n (FLNA 280 kDa) kokoisesta peptidiketjusta muodostuvia dimeerejä (kuva 1, Gorlin ym., 1990). Peptidiketjun aminopäässä on noin 275 aminohaposta rakentuva aktiinia sitova domeeni (ABD, engl. *actin binding domain*). Loppuosuus filamiinista koostuu 24 toistuvasta noin 100 aminohapon sekvenssistä (IgFLNA1-24), jotka

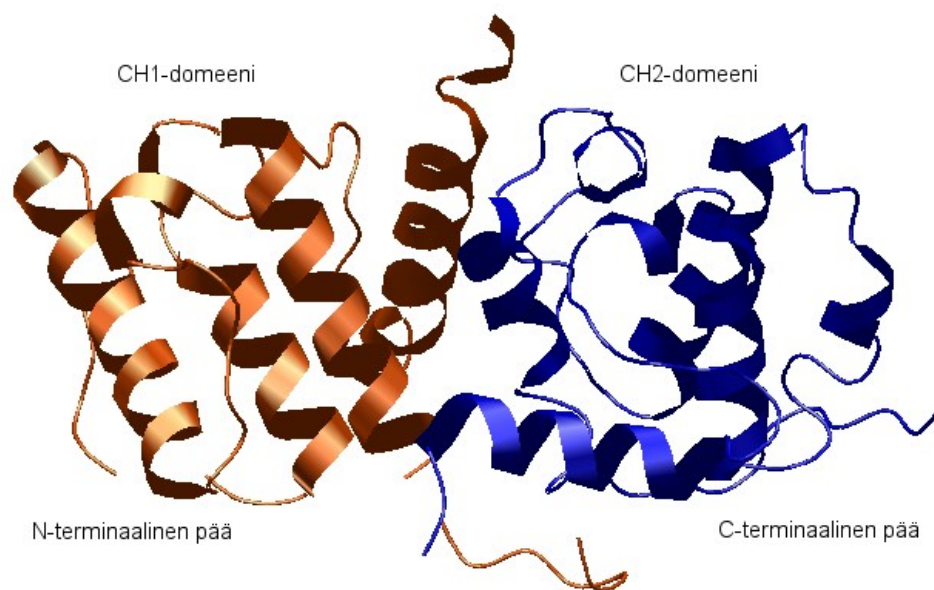
muodostavat sauvan muotoon asettuvia vastakkaissuuntaisia β -levyrakenteita (Gorlin ym., 1990; Hock ym., 1990). Lyhyet, domeenien 15 ja 16 sekä 23 ja 24 välissä sijaitsevat H1- ja H2-alueet jakavat filamiinisauvan kahteen osaan (sauvat 1 ja 2, ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Lähimpänä karboksyylipäätä sijaitseva 24. domeeni osallistuu filamiinimonomeerien dimerisaatioon, joka on ratkaisevan tärkeää filamiinin välityksellä tapahtuvan aktiiniverkostojen muodostamisen kannalta (Pudas ym., 2005).



Kuva 1. FLNA:n kaavamainen rakenne. (Kuva muokattu yleiskatsauksen Stossel ym., 2001 perusteella)

1.2.1. Aktiinia sitovan domeenin rakenne ja toiminta

Filamiinit sitovat kaikkia aktiinin isomuotoja, ja filamiinien sitoutumiskohtat aktiinissa on paikannettu aminohappotähteiden 105-120 ja 360-372 alueille (Méjean ym., 1992). Kaikki α -aktiiniiniperheeseen kuuluvat proteiinit vuorovaikuttavat samalla tavalla aktiinin kanssa – filamiinien, α -aktiinin, spektriinin, nesprinien, plektiinin, dystrofiinin ja fimbriinin aktiinia sitovat domeenit rakentuvat kahdesta kalponiinihomologiadomeenista (CH-domeeni, engl. *calponin homology domain*), jotka muodostavat yhdessä globulaarisen α -helikaalisen domeenin (kuva 2, Gimona ym., 2002a; Franzot ym., 2005). Yksi 110 aminohappotähteestä koostuva CH-domeeni rakentuu neljästä pitkien silmukoiden yhdistämästä 11-18 aminohappotähteen α -heliksistä sekä kahdesta tai kolmesta lyhyestä ja vähemmän symmetrisestä α -heliksistä (kuva 2, Norwood ym., 2000). Kolme pitempää α -heliksiä muodostavat kimpun, jota vasten aminopään α -heliksi pakkautuu pystysuorassa asennossa.



Kuva 2. FLNB:n ABD:n rakenne. Protein Data Bank (PDB) -koodi 3FER (Kuzin ym., 2009). CH1-domeeni on esitetty oranssilla ja CH2-domeeni sinisellä.

α -aktiniinin kaltaisten proteiinien ABD:sta on löydetty kolme mahdollista aktiinin sitoutumiskohtaa (Norwood ym., 2000). ABD:n aminopäässä sijaitsevan CH1-domeenin viimeiseen α -heliksiin sijoittuvan konservoituneen hydrofobisen alueen (filamiinin aminohappotähteet 121-147) on todettu olevan ratkaisevan tärkeä aktiinin sitoutumisen kannalta. ABD:n karboksyyli-päässä sijaitsevan CH2-domeenin ensimmäinen α -heliksi osallistuu aktiinin sitomiseen siten, että CH1- ja CH2-domeenit sitoutuvat aktiiniin suuremmalla affiniteetillä kuin CH1-domeeni yksin (Gorlin ym., 1990; ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001).

Ca^{2+} -ioneja sitovan proteiinin kalmoduliinin on havaittu säätelevän FLNA:n ABD:n sitoutumista aktiiniin. Kalmoduliini- Ca^{2+} -kompleksin sitoutuminen FLNA:n ABD:iin irrottaa FLNA:n aktiinista, mikä johtaa FLNA-aktiinigeelien hajoamiseen (Nakamura ym., 2005). ABD:ssa kalmoduliini sitoutuu CH1-domeenin aminohappotähteiden 50 ja 96 välille. Kalmoduliinin ja kokonaisen ABD:n välistä vuorovaikutusta ei ole kuitenkaan pystytty havaitsemaan, joten kalmoduliini saattaa käyttää ABD:ssa sijaitsevaa piilossa olevaa sitoutumiskohtaa, joka paljastuu vasta ABD:n sitouduttua aktiinisäikeeseen (Nakamura ym., 2005).

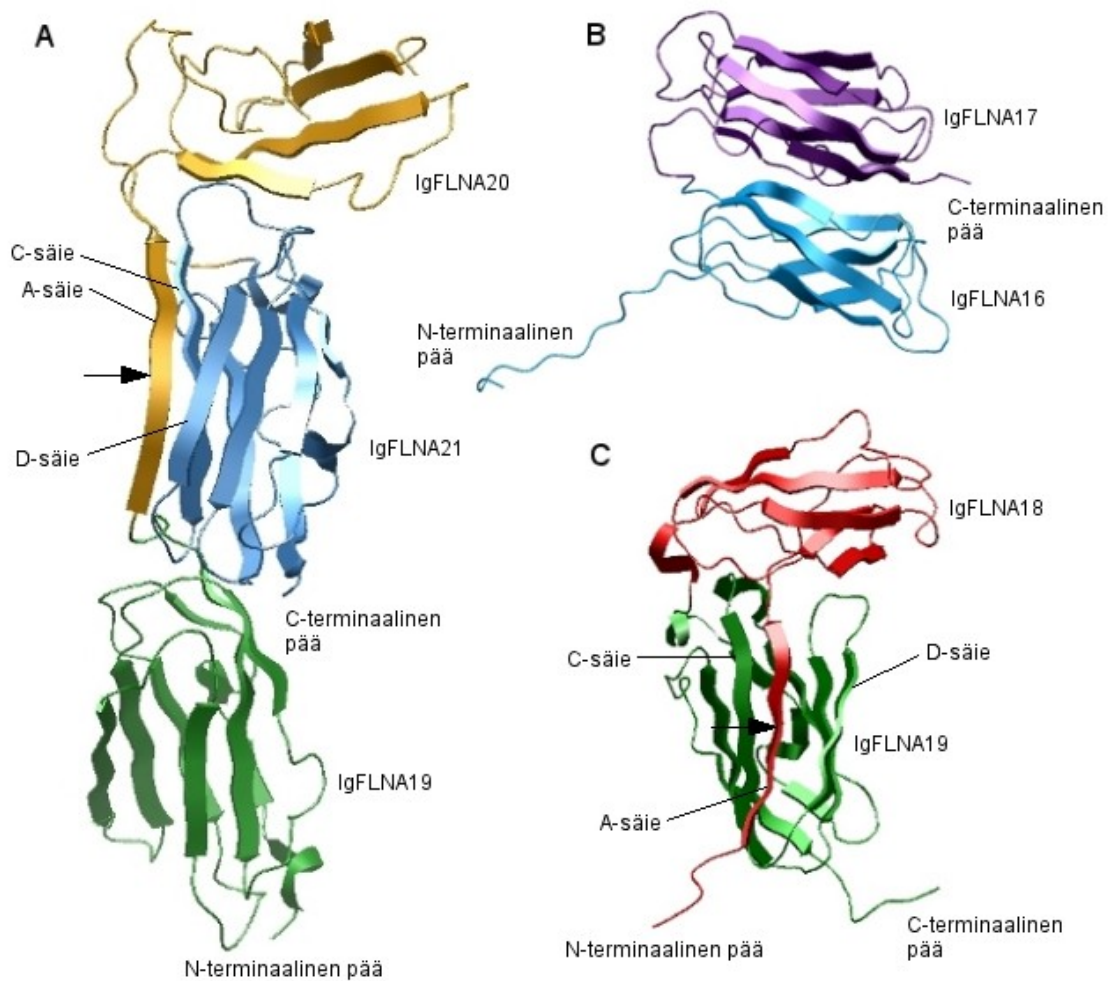
1.2.2. Immunoglobuliinien kaltaisten domeenien rakenne

Ihmisen filamiinien aminopäässä sijaitsevan ABD:n ja molekyylin karboksyyli-pään väliin jää alue, joka käsittää 24 immunoglobuliinien kaltaista, noin 100 aminohappotähteestä rakentuvaa domeenia (kuva 1, Gorlin ym., 1990). Yksittäinen domeeni koostuu useista 6-9 aminohapon pituisista β -säikeistä, joita erottaa 3-4 aminohapon mittaiset alueet ja jotka järjestäytyvät β -levyiksi (kuva 3, Noegel ym., 1989; Gorlin ym., 1990).

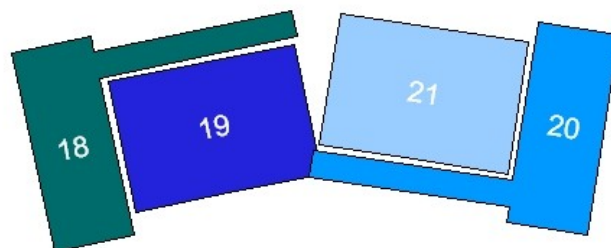
Domeenien 15 ja 16 (27 aminohappotähdettä) sekä 23 ja 24 (35 aminohappotähdettä) välissä sijaitsevat H1- ja H2-alueet mahdollistavat filamiinidimeerien joustavuuden (kuva 1, Hartwig ym., 1980). Muita domeeneja yhdistävät proliinirikkaat alueet ovat lyhyitä ja koostuvat ainoastaan muutamista aminohappotähteistä. Vierekkäisten domeenien välillä on havaittu esiintyvän myös satunnaisia suolasiltoja (ks. yleiskatsaus Popowicz ym., 2006).

Röntgensädekristallografian avulla selvitetty rakenne FLNA:n domeenien 19-21 rakenteesta osoittaa IgFLNA19:n ja IgFLNA21:n olevan rakenteeltaan samankaltaisia toistensa ja muiden FLNA:n parittomien domeenien kanssa (kuva 3A, Lad ym., 2007). Sen sijaan IgFLNA20:n rakenne on osittain avautunut, ja sen ensimmäinen säie sitoutuu IgFLNA21:n CD-pinnalle (kuva 3A). IgFLNA18-19:n on havaittu omaksuvan vastaavanlaisen rakenteen, jossa domeenin 18 A-säie vuorovaikuttaa domeenin 19 C- ja D-säikeiden kanssa (kuva 3C, Heikkinen ym., 2009). Myös domeenit 16 ja 17 ovat vuorovaikutuksessa keskenään, mutta domeenit järjestäytyvät päällekkäin, eikä domeenin 17 CD-pinta ole piilossa kuten domeenien 19 ja 21 CD-pinnat (kuva 3B, Heikkinen ym., 2009).

IgFLNA19-21 fragmentti omaksuu pitkänomaisen muodon, mutta domeenien järjestys ei ole peräkkäinen, vaan IgFLNA19:aa seuraa IgFLNA21 ja viimeisenä on IgFLNA20 (kuvat 3A ja 4, Lad ym., 2007). IgFLNA19:n ja IgFLNA21:n β -säikeet asettuvat likimäärin fragmentin akselin mukaisesti, kun taas suurin osa IgFLNA20:sta asettuu kohtisuoraan IgFLNA21:een nähden. IgFLNA20 ei laskostu täysin immunoglobuliinien kaltaisesti, vaan vuorovaikuttaa erikoisella tavalla IgFLNA21:n kanssa. IgFLNA20:n A-säie asettautuu IgFLNA21:n C-, F- ja G-säikeistä koostuvan β -levyn viereen ja loppu IgFLNA20:sta sijoittuu IgFLNA21:n päälle vuorovaikuttaen pääasiassa IgFLNA21:n BC-silmukan kanssa (kuva 3A, Lad ym., 2007).



Kuva 3. IgFLNA19-21:n, IgFLNA16-17:n ja IgFLNA18-19:n rakenteet. A: IgFLNA19-21 (PDB-koodi 2J3S, Lad ym., 2007). IgFLNA19 on esitetty vihreällä, IgFLNA20 keltaisella ja IgFLNA21 sinisellä. Tässä työssä IgFLNA20:een tehdyn mutaation sijainti on merkitty nuolella. B: IgFLNA16-17 (PDB-koodi 2K7P, Heikkinen ym., 2009). IgFLNA16 on esitetty turkoosilla ja IgFLNA17 violetilla. C: IgFLNA18-19 (PDB-koodi 2K7Q, Heikkinen ym., 2009). IgFLNA18 on esitetty punaisella ja IgFLNA19 vihreällä. Tässä työssä IgFLNA18:een tehdyn mutaation sijainti on merkitty nuolella.



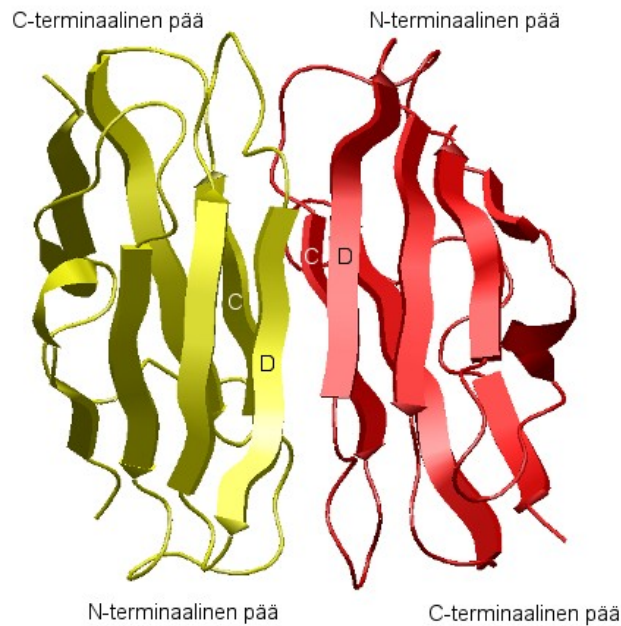
Kuva 4. Hypoteettinen malli ihmisen FLNA:n domeenien 18-21 rakenteesta. (Kuva muokattu Lad ym., 2007 perusteella)

1.3. Filamiinien dimerisaatio

Filamiinimonomeerien dimerisaation on havaittu olevan välttämätöntä filamiinin välityksellä tapahtuvan aktiiniverkoston muodostamisen kannalta (Pudas ym., 2005). Ihmisen filamiinien dimerisaatio tapahtuu viimeisen 24. domeenin välityksellä, joka on rakenteeltaan samanlainen kuin muutkin domeenit (kuva 5, Himmel ym., 2003). Ihmisen filamiinien dimeerit omaksuvat v-muodon ja järjestäytyvät samansuuntaisesti toisiinsa nähden (kuva 1, Gorlin ym., 1990).

Ihmisen filamiinien monomeerit muodostavat dimeerejä siten, että molempien monomeerien viimeisten domeenien β -levyt venyvät muodostaen pidentyneen β -levyn (Pudas ym., 2005). Seurauksena syntyy suuri rakenne, jonka toisella puolella on kuusi β -säiettä ja toisella puolella kahdeksan β -säiettä (kuva 5). Kaikkien ihmisen filamiinimonomeerien välisten dimerisaatiopintojen voidaan olettaa olevan samankaltaisia kuin FLNC:ssä (Pudas ym., 2005). Hypoteesin paikkansapitävyys on todistettu FLNA:n tapauksessa – sen dimeerirakenteen on havaittu olevan lähes identtinen FLNC-dimeerin kanssa (Seo ym., 2009). FLNA- ja FLNC-dimeerien RMSD-arvo (engl. *root mean square deviation*), jolla mitataan molekyylien alfahiilien välistä etäisyyttä, on 0,7 Å (identtisille rakenteille RMSD-arvo on 0, Seo ym., 2009).

FLNC-monomeerien dimerisaatiopinta (1109 Å) on pienempi kuin ameeba *Dictyostelium discoideum*in filamiinimonomeerien dimerisaatiopinta (4500 Å), mistä voidaan päätellä selkärankaisten filamiinien dimerisaatiomekanismin olevan heikompi kuin *D. discoideum*in filamiinin (Pudas ym., 2005). Alempien organismien filamiinimonomeerien välinen jäykkä ja voimakas vuorovaikutus on korvautunut evoluution kuluessa joustavammilla, heikommilla ja monimutkaisemmilla mekanismeilla. Ihmisen filamiinien viimeistä domeenia edeltävän H2-alueen päätehtävä on todennäköisesti mekaaninen – se sallii filamiinien joustavuuden ja rakenteellisen mukautuvuuden, mutta H2-alue saattaa osallistua myös dimerisaation säätelyyn (Himmel ym., 2003; Pudas ym., 2005).



Kuva 5. FLNA:n dimerisaatiodomeenin (IgFLNA24) rakenne. PDB-koodi 3CNK (Seo ym., 2009). Toisen monomeerin IgFLNA24 on esitetty keltaisella ja toisen monomeerin IgFLNA24 punaisella.

1.4. Filamiinit ja aktiiviverkostojen muodostaminen

Aktiinitukirangalla on keskeinen rooli solun muodon ylläpitämisessä, solun jakautumisessa, kiinnittymisessä, liikkumisessa sekä viestinvälityksessä ja proteiinien lajittelussa. Säiemuotoisen aktiinin sijoittelu solussa ja liittäminen kimpuiksi sekä verkostoiksi tapahtuu useiden solutukirangan proteiinien välityksellä, joilla on α -aktiiniin kaltainen konservoitu ABD. Kolmiulotteiset suorakulmaiset verkostot, joita aktiinkin muodostaa, lisäävät elastisuutta, sisällyttävät itseensä vettä, liuennaita aineita ja pieniä soluelimiä, vastustavat heikkoja osmoottisia ja hydrostaattisia nestevirtauksia, toimivat tukirakenteina heikoille supistuksille, rajoittavat suurten soluelinten liikkeitä sekä paikallistavat viestinvälitysreaktioita ja muita solunsisäisiä reaktioita (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

Filamiinia sisältävien aktiinigeelien ominaisuuksiin kuuluvat lisääntynyt elastisuus ja pysyvä viskositeetti (ks. yleiskatsaus Popowicz ym., 2006). Samanlaisia ominaisuuksia on havaittu polymerisoitaessa aktiinia korkeissa pitoisuuksissa, joten filamiinin voidaan sanoa säästävän aktiinia – ilman filamiinia aktiinia tarvittaisiin enemmän vastaavanlaisten

aktiiniverkostojen rakentamiseen. Muut aktiinia yhteen liittävät proteiinit, kuten α -aktiniini, eivät saa aikaan tällaisia ominaisuuksia (Janssen ym., 1996). Filamiinin domeenien 15 ja 16 välille sijoittuvan H1-alueen on havaittu ylläpitävän em. aktiiniverkostojen viskoelastisia ominaisuuksia (Gardel ym., 2006). Aktiiniverkostoisiin, joissa on käytetty H1-alueetonta rekombinanttifilamiinia, kohdistettu voima aiheuttaa verkoston jäykistymistä ja verkostot särkyvät paljon vähäisemmän kuormituksen alaisina kuin villityypin filamiinia sisältävät verkostot.

FLNA:n on todettu olevan tehokkain aktiinia verkostoiksi liittävä proteiini, sillä hyytelöitymisen aikaansaamiseksi tarvitaan ainoastaan yksi FLNA-molekyyli yhtä aktiinisäiettä kohti (Ito ym., 1992). FLNA:n tehokkuus verrattuna muihin aktiiniverkostoja muodostaviin proteiineihin selittyy filamiini-aktiiniverkkojen geometrialla. Verkoston haarojen kulmat ovat suuria ja haarojen väliset etäisyydet ovat käänteisiä suhteessa filamiinikonsentraatioon (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Haaroittumiskohdissa aktiinisäikeen terävä pää risteää toisten säikeiden kanssa muodostaen T:n, X:n tai L:n muotoisia rakenteita. Mekanismia, jolla filamiini edistää aktiinisäikeiden järjestäytymistä verkostoiksi, ei ole vielä onnistuttu selvittämään täysin. Kuitenkin tiedetään, että osallistuakseen aktiiniverkostojen muodostamiseen filamiinin täytyy esiintyä dimeerinä ja sen ABD:ien on oltava ehjiä (Weihing, 1988; Bresnick ym., 1990; Bresnick ym., 1991).

Aktiinisäikeiden järjestäytyminen verkostoiksi tai kimpuiksi riippuu paikallisen filamiinikonsentraation lisäksi filamiinivariantin rakenteesta – eri lähteistä eristetyt filamiinit eroavat aktiiniverkostojen muodostamisominaisuuksiltaan (Brotschi ym., 1978). Erityisesti lihaksissa esiintyvät sarana-alueettomat variantit rajoittavat domeenien joustavuutta ja muodostavat siten pakkautuneita filamiinidimeerejä, jotka järjestävät aktiinia jäykiksi kimpuiksi. Filamiinin sitoutumisaffiniteetti aktiiniin *in vitro* ($K_d \approx 2 \times 10^{-6}$ M) ja kylläisyystaso (8-10 aktiinimonomeeriä/filamiinidimeeri) ovat vastaavat kuin muilla aktiinia sitovilla proteiineilla, kuten α -aktiniinilla ja tropomyosiinilla (Wang ja Singer, 1977; Hartwig ja Stossel, 1981; Gorlin ym., 1990).

1.4.1. Aktiiniverkostojen muodostamisen säätely

Seitsemästä polypeptidistä koostuvan Arp2/3-kompleksin arvellaan osallistuvan yhdessä filamiinien ja muiden aktiinia verkostoiksi liittävien proteiinien kanssa aktiiniverkostojen muodostamiseen. Arp2/3 kasvattaa haaroittuvaa aktiinisäiettä jo olemassa olevan säikeen pluspäästä noin 70 asteen kulmassa (Kelleher ym., 1998). Filamiinittomissa melanoomasoluissa on runsaasti Arp2/3-komplekseja, mutta ne eivät pysty vakauttamaan solukalvoa tai edistämään solujen liikkumista, eikä yksistään aktiinipolymeerien haaroittuminen riitä polymeerien hyytelöitymiseen (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Pelkän Arp2/3:n avulla aikaansaaduissa haaroittuneissa säikeissä ei näy kolmiulotteisten verkostojen muodostumiselle välttämättömiä rakenteita, joita esiintyy filamiinia sisältävissä haaroittuneissa säikeissä (Niederman ym., 1983; Blanchoin ym., 2000). Arp2/3 lisää aktiinisäieliuosten elastisuutta, mutta vastaavan elastisuuden saavuttamiseksi Arp2/3:a tarvitaan huomattavasti enemmän suhteessa aktiiniin kuin filamiinia (Janmey ym., 1990; Kelleher ym., 1998). Arp2/3:n muodostamat aktiinisäikeiden väliset liitokset ovat metastabiileja ja hajoavat helposti, kun taas filamiinin ja aktiinisäikeiden väliset liitokset ovat kestäviä pitkällä aikavälillä (Janmey ym., 1990; Pantaloni ym., 2000). Joissakin tapauksissa aktiinisäikeet liittyvät soluissa toisiinsa 70 asteen kulmassa, mikä on tyypillistä Arp2/3:n yhdistämille säikeille. Tämä ei kuitenkaan päde aina, mikä viittaa siihen, että Arp2/3 aloittaa aktiinisäikeiden haaroittumisen ja filamiini vakauttaa haarautumiskohdat sekä hitsaa yhteen pisteet, joissa kasvavat säikeet risteävät toisensa (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001).

1.5. Filamiinien vuorovaikutuskumppanit

Filamiinien domeenien 14-24 on havaittu sitovan useita toiminnallisesti erilaisia proteiineja (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001; ks. yleiskatsaus Robertson, 2005a). Osa FLNA:n ligandeista on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. FLNA:n vuorovaikutuskumppaneita. (Taulukko muokattu yleiskatsausten van der Flier ja Sonnenberg, 2001 ja Robertson, 2005a perusteella)

Proteiinin toiminta	Proteiini
Veren hyytyminen	glykoproteiini Iba kudostekijä
Ionikanava	kaliumkanava Kv4.2
Solu-solu- ja solu-soluväliainekiinnittyminen	integroinit $\beta 2$, $\beta 1A$, $\beta 1D$, $\beta 3$, $\beta 7$
Immuunisäätely	SEK-1 ^{a)}
Viestinvälitys	kaveoliini 1 proteiinikinaasi C RhoA ^{b)} , Rac1 ^{c)} , Cdc42 ^{d)} SMAD:it ^{e)} TRAF2 ^{f)}
Proteaasi	grantsyymi B preseniliinit 1 ja 2
Kalvoreseptori	asetylikoliinireseptori dopamiinireseptorit D ₂ ja D ₃ furiinireseptori metabotrooppinen glutamaattireseptori 7b μ -opioidireseptori Toll-reseptori
Hormonireseptori	androgenireseptori insuliinireseptori kilpirauhasta stimuloiva hormonireseptori
Soluväliaineen proteiini	dekoriini
Tuman toimintoihin liittyvä proteiini	BRCA2 ^{g)} cv-lämpöshokkiproteiini
Solujen polarisuuteen ja vaellukseen vaikuttava proteiini	FILIP ^{h)} migfiliini
Solutukirangan proteiini	FLNB säikeinen aktiini

a) engl. *stress-activated protein kinase (SAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase 1*

b) engl. *Ras homolog A*

c) engl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

d) engl. *cell division cycle 42, GTP binding protein*

e) engl. *Sma and Mad-related proteins*

f) engl. *tumor necrosis receptor-associated factor 2*

g) engl. *breast cancer type 2 susceptibility protein*

h) engl. *FLNA interacting protein*

1.5.1. Kalvoproteiinit

Filamiinit toimivat tukirakenteina useille kalvoproteiineille muodostaen yhteyden solukalvon ja aktiinisolutukirangan välille. Parhaiten tunnetaan FLNA:n ja FLNB:n sekä von Willebrandin tekijän reseptorin glykoproteiini Iba α -alayksikön välinen vuorovaikutus. Von Willebrandin tekijän sitoutuminen reseptoriinsa aiheuttaa verihiutaleiden aktivoitumisen, mikä johtaa solutukirangan uudelleenjärjestäytymiseen, solun muodon muuttumiseen ja verihiutaleiden kerääntymisen aiheuttavien α -granuloiden erittymiseen (Andrews ja Fox, 1992). Glykoproteiini Iba α sitoutuu FLNA:n domeenin 17 C- ja D-säikeiden väliin (Nakamura ym., 2006).

FLNC:n on havaittu sitoutuvan γ - ja δ -sarkoglygaaneihin vahvistaen siten dystrofiini-glykoproteiinikompleksin dystrofiinivälitteistä liittymistä aktiinisolutukirankaan (Thompson ym., 2000). Myopaattisissa lihaksissa, joissa dystrofiini-glykoproteiinikompleksin ilmentäminen on heikentynyt, on havaittu filamiinin määrän lisääntymistä solukalvolla, mikä voi viitata siihen, että filamiini osallistuu mekaaniselta stressiltä suojaamiseen (Glogauer ym., 1998). Lisääntynyt filamiinin ilmentäminen solukalvolla kompensoi mahdollisesti dystrofiini-glykoproteiinikompleksin vähentyntä ilmentämistä ja tarjoaa soluille mekaanista kestävyyttä ulkoista stressiä vastaan.

FLNA:ta ilmentämättömiä melanoomasoluja tutkimalla on havaittu FLNA:n olevan tärkeässä roolissa kortikaalisen aktiinisolutukirangan ja ionikanavien välisessä vuorovaikutuksessa. Filamiinit osallistuvat kaliumkanavien aktiivisuuden ja kystisen fibroosin ionikanavien kloridijohtavuuden säätelyyn sekä mekaanisesti aktivoituvien kalsiumkanavien turruttamiseen (Cantiello, 1997; Glogauer ym., 1998; Prat ym., 1999).

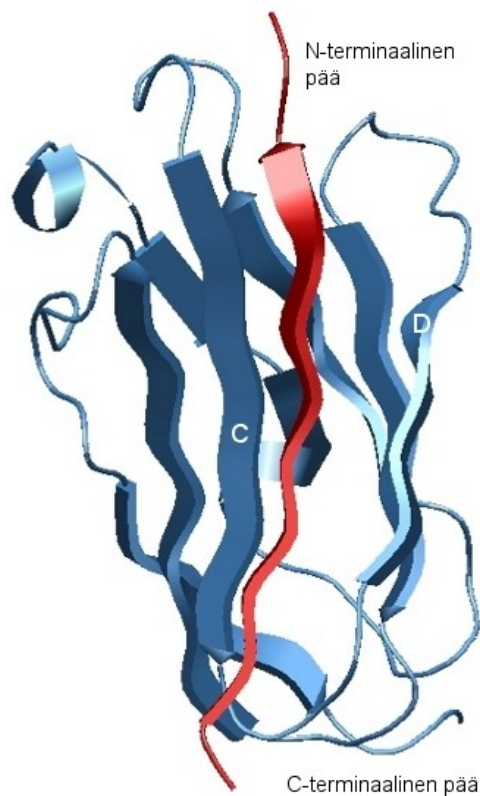
Kaveoliproteiini kaveoliini-1:n on havaittu sitoutuvan sekä lihasspesifisiin että ei-lihasspesifisiin filamiineihin, mahdollisesti domeenien 23 ja 24 väliselle H2-alueelle (Stahlhut ja van Deurs, 2000). Aktiinistressisäikeiden muodostumisen aikana kaveoliinia sisältävien rakenteiden ja stressisäikeiden välille syntyy fyysinen yhteys, jonka välittäjinä filamiinit toimivat (Stahlhut ja van Deurs, 2000). On myös mahdollista, että filamiinit osallistuvat kaveoleiden solun sisään siirtymisen säätelyyn.

FLNA osallistuu mahdollisesti myös androgeenireseptorin liikennöintiin kohti tumaa sekä furiinireseptorin kiertoon (Liu ym., 1997; Ozanne ym., 2000). Muita filamiinien kanssa vuorovaikuttavia kalvoproteiineja ovat mm. hermosolujen transmembraaniset peptidaasit, preseniliinit, Fc-gammareseptori I, kudostekijä sekä asetyylikoliinireseptori (Ohta ym., 1991; Shadiack ja Nitkin, 1991; Ott ym., 1998; Guo ym., 2000).

Integriinit ja migfiliini

Solujen ja soluväliaineen välinen yhteys on ratkaisevan tärkeässä roolissa monissa fysiologisissa ja patofysiologisissa prosesseissa. Tämän yhteyden välittäjinä toimivat pääasiassa integriinit, jotka ovat heterodimeerisiä α - ja β -alayksiköistä koostuvia kalvoreseptoreja (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Integriinit kiinnittyvät soluväliaineeseen solun ulkopuolisten domeeniensa välityksellä ja aktiinitukirankaan solun sisäisten sytoplasmisten häntiensä avulla. Integriinien kyky sitoa vuorovaikutuskumppaneitaan on säädelty integriinien sytoplasmisten häntien kautta solun sisältä ulospäin suuntautuvan viestinvälityksen kautta (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Sisältä ulospäin suuntautuvassa viestinvälityksessä integriini vastaanottaa sytoplasmisella hännällään solunsisäisen signaalin, joka siirtyy integriinin solun ulkopuoliseen domeeniin muuttaen reseptorin matalan affiniteetin tilasta korkean affiniteetin tilaan. Tätä siirtymää kutsutaan integriinin aktivaatioksi.

FLNA:n domeenin 21 (IgFLNA21) on havaittu olevan pääasiallinen integriinien sitoutumiskohta filamiinissa (Kiema ym., 2006). Filamiini-integriinikompleksien kautta aktiinisolutukiranka pystyy reagoimaan solun ulkopuolelta tuleviin ärsykkeisiin. Toiminnanmenetyks- ja toiminnanlisäysmutaatioiden avulla on havaittu integriinien β -häntien säätelevän mm. solujen vaellusta (Calderwood ym., 2001). IgFLNA21- β 7-integriinipeptidikompleksissa IgFLNA21 muodostaa samanlaisen kahdesta neljä tai kolme säiettä käsittävästä β -levystä koostuvan rakenteen kuin muutkin FLNA:n immunoglobuliinien kaltaiset domeenit (kuva 6). β 7-integriinipeptidi on kosketuksissa IgFLNA21:n kolmanteen ja neljänteen säikeeseen (C- ja D-säikeet), mikä saattaa olla esimerkki yleispätevästä mallista filamiinien ja niiden ligandien välisestä vuorovaikutuksesta, sillä myös muiden FLNA:n domeenien ligandien on havaittu sitoutuvan samaan kohtaan (Kiema ym., 2006).



Kuva 6. IgFLNA21- β 7-integriinipeptidikompleksin rakenne. PDB-koodi 2BRQ (Kiema ym., 2006). IgFLNA21 on esitetty sinisellä ja β 7-integriinipeptidi punaisella.

Ydinmagneettisen resonanssin ja biokemiallisten analyysien avulla on havaittu, että domeenien 20 ja 21 välinen vuorovaikutus estää integriinin β -häntää sitoutumasta IgFLNA21:een, kun taas tätä vuorovaikutusta häiritsevät mutaatiot lisäävät integriinien sitoutumista (Lad ym., 2007). IgFLNA20:n A-säie asettuu IgFLNA21:n C-, F- ja G-säikeet käsittävän β -levyn viereen kuten β 7-integriinipeptidi ja peittää samalla integriinien sitoutumiskohdan (kuva 3A, Lad ym., 2007). Vaikka IgFLNA21:een sitoutuvan β 7-integriinipeptidin osan ja IgFLNA20:n aminohapposekvenssien välillä ei ole juurikaan samankaltaisuutta, omaksuvat ne toisiaan muistuttavan rakenteen sitoutuessaan IgFLNA21:een (kuvat 3A ja 6). IgFLNA20 ja β 7-integriinihäntä sitoutuvat samaan kohtaan IgFLNA21:ssä (D-säikeessä sijaitseva Ile²²⁸⁴) ja kilpailevat keskenään sitoutumisesta IgFLNA21:een. IgFLNA20:n A-säikeeseen tehdyn pistemutaation (I2144E, Ile²¹⁴⁴ vastaa rakenteellisesti β 7-integriinihännän aminohappoa Ile⁷⁸²) vaikutuksesta β 7-integriinipeptidin sitoutuminen IgFLNA21:een lisääntyy, mahdollisesti koska domeenien 20 ja 21 välisen vuorovaikutuksen häiritseminen paljastaa IgFLNA21:n integriiniä sitovan CD-pinnan (Lad ym., 2007). Soluissa domeeniparien välinen ligandien sitoutumista estävä vuorovaikutus voidaan vapauttaa lähetti-RNA:n vaihtohtoisen silmikoinnin, aminohappotähteiden fosforylaation tai proteiinin konformaation muutokseen johtavan mekaanisen kuormituksen avulla (Lad ym., 2007; Pentikäinen ja Yläne, 2009).

Taliini on suuri solujen sekä solujen ja soluväliaineen välisissä liitoskohdissa (fokaaliadheesiot) esiintyvä proteiini, joka liittää integriinit niiden sytoplasmisten häntien välityksellä aktiinitukirankaan (ks. yleiskatsaus Critchley, 2000). Taliinin sitoutuminen integriinien β -alaysiköiden sytoplasmisiin häntiin johtaa integriinien aktivaatioon (Vinogradova ym., 2002; Wegener ym., 2007). Filamiinin ja taliinin sitoutumiskohdat integriinien β -hännissä ovat päällekkäiset, joten filamiinin sitoutuminen integriineihin estää taliinin ja integriinien välisen vuorovaikutuksen (Kiema ym., 2006). Filamiinin voidaan siis katsoa toimivan integriinien aktivaation negatiivisena säätelijänä.

Migfiliini on fokaaliadheesiodien säätelyproteiini, joka on yhteydessä aktiinisolutukirankaan FLNA:n välityksellä ja osallistuu integriinivälitteisen solutukirangan uudelleenjärjestäytymisen, solun muodon muutosten sekä soluvaelluksen säätelyyn (Tu ym., 2003; ks. yleiskatsaus Wu, 2005). Migfiliini rakentuu kolmesta

karboksyyliipään Lin-11/Isl-1/Mec-3-domeenista (tunnetaan yleisesti LIM-domeenina), molekyylin keskelle jäävästä proliinirikkaasta alueesta sekä aminopään alueesta, jonka aminohapot 1-85 käsittävä kohta tunnistaa FLNA:n ja FLNC:n domeenin 21 (Tu ym., 2003; ks. yleiskatsaus Wu, 2005).

Migfiliini ja β -integriinien sytoplasmiset hännät sitoutuvat samaan C- ja D-säikeiden väliseen uurteeseen IgFLNA21:ssa (kuva 6) huolimatta migfiliinin aminopään alueen ja β -integriinien sytoplasmisten häntien välisestä vähäisestä sekvenssi-identtisyydestä (Kiema ym., 2006; Lad ym., 2008). Migfiliinin on havaittu sitoutuvan myös IgFLNA19:een ja IgFLNA22:een, mutta sen vuorovaikutus näiden domeenien kanssa on heikompi kuin IgFLNA21:n kanssa (Lad ym., 2008). Migfiliinin ja IgFLNC21:n välinen vuorovaikutus on affiniteetiltaan yhtä kertaluokkaa voimakkaampi kuin integriinien ja IgFLNC21:n välinen vuorovaikutus, joten migfiliinin sitoutuminen IgFLNC21:een irrottaa filamiinin integriineistä mahdollistaen taliinin ja integriinien välisen vuorovaikutuksen ja integriinien aktivaation (Ithychanda ym., 2009). Migfiliini toimii siten molekulaarisena kytkimenä säädellen integriinien aktivaatiota ja soluväliaineen sekä aktiinin välistä yhteyttä.

Migfiliinin sijoittuminen fokaaliadheesioihin tapahtuu migfiliiniä värväävän proteiinin kindliini-2:n välityksellä (Tu ym., 2003). Kindliini-2 on solutukirangan proteiini, joka kuuluu taliinille tyypillisen *4.1/ezrin/moesin*-domeenin (tunnetaan yleisesti FERM-domeenina) sisältävien kindliiniproteiinien (kindliini-1, 2 ja 3) perheeseen. Sekä kindliini-2:n että kindliini-3:n on havaittu osallistuvan myös taliinivälitteisen integriiniaktivaation säätelyyn (ks. yleiskatsaus Larjava ym., 2008). Kindliini-2 ja taliini sitoutuvat β 3-integriinien sytoplasmisiin häntiin ja aikaansaavat yhdessä integriinien aktivaation. Siten filamiini, migfiliini ja kindliinit toimivat useamman proteiinin muodostamana koneistona säädellen yhteistyössä integriinien aktivaatiota. Migfiliinillä saattaa olla kaksoisrooli tällä reitillä: (1) se sitoutuu aminopäänsä välityksellä filamiiniin edistäen integriinien aktivaatiota estävän filamiinin irtoamista integriineistä, mikä johtaa taliinin ja integriinien väliseen vuorovaikutukseen ja integriinien aktivaatioon, (2) se sitoutuu karboksyyliipäänsä LIM-domeenien välityksellä kindliini-2:een tai kindliini-3:een edistäen kindliinien sitoutumista β 3-integriinien sytoplasmisiin häntiin ja siten edelleen vahvistaen taliinin vaikutusta integriinien aktivaatiossa (Ithychanda ym., 2009).

Dopamiinireseptorit

GTP:tä sitoviin proteiineihin kytkeytyvien reseptorien superperheeseen kuuluvat dopamiinireseptorit (D₁, D₂, D₃, D₄ ja D₅) säätelevät elintärkeitä neurobiologisia ja umpieritykseen liittyviä prosesseja dopaminergisen, eli dopamiinin avulla stimuloituvan, viestinvälityksen kautta. Häiriöt dopaminergisessä viestinvälityksessä ovat tyypillisiä useissa neuropsykiatrisissa ja motorisissa sairauksissa, kuten skitsofreniassa ja Parkinsonin taudissa (ks. yleiskatsaus Civelli ym., 1993).

D₂-, D₃- ja D₄-dopamiinireseptorit osallistuvat solunsisäisiin viestinvälitysketjuihin sitoutumalla joukkoon heterotrimeerisiä GTP:tä sitovia proteiineja. D₂-, D₃- ja D₄-reseptorien kautta tapahtuvan viestinvälityksen on havaittu estävän adenyylaattisyklaasia, säätelevän natrium-, kalium- ja kalsiumkanavien, fosfolipaasi C:n ja mitogeneeniaktivoituvan proteiinikinaasin toimintaa sekä arakidonihapon vapautusta (ks. yleiskatsaus Missale ym., 1998). D₂-, D₃- ja D₄-reseptorien aktivaation on todettu liittyvän myös solujen muodon kehittymiseen (morfogeneesi) ja hermosolujen rakenteen ylläpitoon (Benes ym., 1983; Benes ym., 1985; Uranova ym., 1991; Swarzenski ym., 1994).

D₂- ja D₃-reseptorien on havaittu sitoutuvan karboksyylihäidensä kolmansien sytoplasmisten silmukoiden välityksellä FLNA:n domeeniin 19 (Li ym., 2000; Lin ym., 2001, Li ym., 2002). FLNA ja D₂-reseptorit paikallistuvat aivojuovion (*striatum*) hermosoluihin ja astrosyytteihin, mikä tukee oletusta FLNA:n ja dopamiinireseptorien välisestä vuorovaikutuksesta nisäkkäiden aivoissa (Lin ym., 2001). Tämän vuorovaikutuksen toiminnallinen merkitys on vielä selvittämättä, mutta D₂- ja D₃-reseptorien liittyminen aktiinitukirankaan FLNA:n välityksellä saattaa auttaa reseptorien sijoittumisessa synapsien läheisyyteen, sillä FLNA:n on havaittu vaikuttavan D₂-reseptorien paikantumiseen soluissa. FLNA:n läsnä ollessa D₂-reseptorit sijaitsevat solukalvolla ryppäinä, kun taas FLNA:ta ilmentämättömissä melanoomasoluissa D₂-reseptorit ovat hajaantuneena tasaisemmin solun pinnalle tai jäävät kokonaan solun sisälle (Li ym., 2000; Lin ym., 2001).

Toinen mahdollinen selitys FLNA:n ja D₂-reseptorien väliselle vuorovaikutukselle on FLNA:n toimiminen telakkaproteiinina, joka kerää dopamiinin kautta tapahtuvaan viestinvälitykseen osallistuvia molekyylejä yhteen lisäten siten reseptorien ja niihin sitoutuvien vaikuttajamolekyylien välisiä kytköksiä (Li ym., 2000). Tätä teoriaa tukevat havainnot siitä, että FLNA lisää D₂- ja D₃-reseptorien kautta tapahtuvaa viestinvälitystä, mutta FLNA:ta ilmentämättömissä melanoomasoluissa adenyylaattisyklaasia estävä vaikutus on heikentynyt (Li ym., 2000; Li ym., 2002).

Dimeerirakenteensa ansiosta FLNA saattaa osallistua myös dopamiinireseptorien järjestämiseen. D₂- ja D₃-reseptorien on todettu esiintyvän homodimeereinä ja kykenevän muodostamaan heterodimeerejä muiden GTP:tä sitoviin proteiineihin kytkeytyvien reseptorien kanssa. FLNA voisi siten edistää dopamiinireseptorimonomeerien yhteenliittymistä tai epäsuoraa vuorovaikutusta filamiinisillan välityksellä (Lin ym., 2001).

1.5.2. Viestinvälittäjä molekyylit

Filamiinit osallistuvat erilaisten viestinvälittäjä molekyyliden, kuten pienten GTPaasien, ankkurointiin (Ohta ym., 1999). Useiden Ras-GTPaasien on havaittu sitoutuvan filamiinin karboksyyliin domeeneihin, jotka toimiessaan GTPaasien telakoitumisalueena mahdollistavat GTPaasien ja muiden aktiinin nukleatoin, aktiindynamiikkaan sekä vesikkelikuljetukseen tarvittavien säätelytekijöiden oikean sijoittumisen soluissa (Ueda ym., 1992).

Seriini-/treoniinikinaasi p21-aktivoitu kinaasi 1 (Pak1, engl. *p21-activated kinase 1*) kontrolloi aktiinisolutukirangan ja kalvoröyhelöiden muodostumista (Sells ym., 1997; Edwards ym., 1999). Pak1 sitoutuu FLNA:n domeeniin 23 ja fosforyloi FLNA:n Ser²¹⁵²-aminohappotähteen, minkä jälkeen FLNA vuorovaikuttaa Pak1:n kanssa kalvoröyhelöissä (Vadlamudi ym., 2002). Pak1:n toimintaan liittyvää kalvoröyhelöiden muodostumista tapahtuu ainoastaan FLNA:ta ilmentävissä soluissa, joten FLNA on Pak1:n aikaansaaman solutukirangan uudelleenjärjestäytymisen kannalta välttämätön. FLNA osallistuu myös Pak1:n säätelyyn, sillä FLNA:n sitoutumisen Pak1:n *Cdc42/Rac interactive binding*-domeeniin (tunnetaan yleisesti CRIB-domeenina) on havaittu lisäävän Pak1:n

aktiivisuutta (Vadlamudi ym., 2002). FLNA toimii tukirakenteena myös mitogeneeniaktivoituvalle *stress-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase* kinaselle, eli SEK-1-kinaasille, joka puolestaan aktivoi useita stressiaktivoituvia proteiinikinaaseja (Marti ym., 1997).

Lisäksi filamiini osallistuu TNF-superperheeseen kuuluvien proteiinien viestinvälitykseen, sillä filamiinia ilmentämättömissä soluissa ei tapahdu TNF α -vastetta (Marti ym., 1997). FLNA:n vuorovaikutus *tumor necrosis receptor-associated factor 2*:n, eli TRAF2:n, kanssa on tärkeä stressiaktivoituvien proteiinikinaasien ja transkriptiotekijä NF- κ B:n TNF α -reseptorivälitteisen aktivaation kannalta (Leonardi ym., 2000). Myös *Drosophila*-kokeissa on havaittu yhteys filamiinin ja TNF-viestinvälitykseen välillä. Toll-reseptorin kautta tapahtuva viestinvälitys määrittää *Drosophilan* vatsa- ja selkäpuolen polaarisuuden. Toll-reseptorin ligandin, spätzlen, sitoutuminen laukaisee viestinvälitysreitit, johon osallistuvat mm. tube- ja cactus-proteiinit, pelle-kinaasi sekä NF- κ B-perheen transkriptiotekijä dorsal. Filamiini vuorovaikuttaa toll-reseptorin ja tube-proteiinin kanssa toimien tukirakenteena useille viestinvälityskomplekseille (Edwards ym., 1997).

1.6. Filamiinivuorovaikutusten säätely

1.6.1. Reseptorien muiden ligandien sitoutuminen

Se, kuinka filamiinien vuorovaikutus aktiinin ja muiden ligandien kanssa on säädelty, on vielä enimmäkseen selvittämättä. Reseptoreina toimivien kalvoproteiinien muiden ligandien sitoutumisen on havaittu vaikuttavan filamiinin sitoutumiseen kyseisiin reseptoreihin. Esimerkiksi immunoglobuliinien sitoutuminen Fc-gammareseptori I:een vähentää sen vuorovaikutusta FLNA:n kanssa (Ohta ym., 1991). Vapaan Fc-gammareseptori I:n on arveltu olevan filamiinin kautta kytköksissä kortikaaliseen aktiinitukirankaan pitäen solun pinnan stabiilina. Immunoglobuliinimolekyylin sitoutuminen Fc-gammareseptori I:een vapauttaa sen ankkuriproteiinina toimivasta FLNA:sta, mikä johtaa solutukirangan uudelleenjärjestäytymiseen (Ohta ym., 1991).

1.6.2. Fosforylaatio

Soluissa filamiini esiintyy voimakkaasti fosforyloituna, mikä vaikuttaa sen vuorovaikutukseen useiden proteiinien, kuten GTPaasien, kanssa (Yada ym., 1990; Ueda ym., 1992). Fosforylaatio vaikuttaa myös filamiinin sitomiskapasiteettiin ja sen aktiivisuuteen järjestää aktiinia verkostoiksi (Zhuang ym., 1984; Ohta ja Hartwig, 1995). Useiden kasvutekijöiden, esim. EGF:n ja lysofosfatidihapon, on havaittu aikaansaavan filamiinin seriini-/treoniinitähteiden fosforylaation. Filamiinia fosforyloivia proteiinikinaaseja ovat mm. p90 ribosomaalinen S6-proteiinikinaasi 2, cAMP-kinaasi, proteiinikinaasi C ja Ca²⁺-kalmoduliiniriippuvainen proteiinikinaasi II (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Myös filamiinin vuorovaikutuskumppaneiden fosforylaation on havaittu osallistuvan filamiinin ja sen ligandien välisten vuorovaikutusten säätelyyn. Seriinien fosforylaatiota jäljittelevät pistemutaatiot kudostekijän ja dopamiinireseptori D₂:n sytoplasmisissa päissä lisäävät tai vähentävät niiden vuorovaikutusta filamiinin kanssa (Ott ym., 1998; Li ym., 2000).

1.6.3. Proteolyysi

Filamiinit ovat hyvin alttiita proteolyysille. FLNA:ssa on kaksi kalpaiinin katkaisukohtaa: yksi H1-alueella ja toinen H2-alueella (Gorlin ym., 1990). Kalpaiinivälitteinen katkaisu H2-alueella sijaitsevasta kohdasta johtaa 240 kDa:n kokoisen aminopään raskaan merofilamiinifragmentin ja 10 kDa:n kokoisen karboksyylipään kevyen merofilamiinifragmentin muodostumiseen, mikä estää FLNA:ta liittämästä aktiinisäikeitä verkostoiksi. H1-alueella tapahtuva proteolyytinen katkaisu johtaa 100 kDa:n kokoisen fragmentin syntymiseen (Loy ym., 2003). Kyseinen luontaisesti esiintyvä fragmentti siirtyy tumaan, jossa se ehkäisee transkriptiotekijänä toimivan androgeenireseptorin transaktivaatiota.

Filamiinien proteolyysin epäillään olevan säädelty fosforylaation kautta, jolloin fosforylaatio vaikuttaisi filamiinien alttiuteen joutua kalpaiinin katkaisemaksi (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). FLNA, FLNB ja FLNC sisältävät konservoituneen cAMP-kinaasin konsensusalueen (Ser²¹⁵², Ser²¹⁰⁷, Ser²¹²⁶, vastaavasti),

jonka fosforylaation on havaittu muuttavan FLNA:n stabiiliksi ja vastustuskykyiseksi H1-alueella aminohappotähteiden 1761 ja 1762 välistä tapahtuvalle kalpainikatkaisulle (Wang ja Singer, 1977; Gorlin ym., 1990).

Filamiinin proteolyyttistä katkaisua tapahtuu myös verihiutaleiden aktivaation ja myogeneesin aikana. FLNA:n ja glykoproteiini I β :n välinen yhteys tuhoutuu verihiutaleiden aktivoituessa, kun kalsiumriippuvainen proteaasi katkaisee FLNA-molekyylin (Fox, 1985).

Kanan myoblastien erilaistuminen myotuubeiksi *in vitro* on kytköksissä lisääntyneeseen m-kalpaiiniaktiivisuuteen ja filamiinin katkaisuun. Kalpaiinin inhibiitio vähentää kyseistä solutukirangan uudelleenjärjestäytymisestä johtuvaa myoblastien yhdistymistä (Kwak ym., 1993). Myös kaspasista riippumattoman apoptoosiin liittyy filamiinin proteolyttinen katkaisu grantsyymi B:n välityksellä (Browne ym., 2000).

1.6.4. Mekaaninen voima

FLNA:n H1- ja H2-alueiden välillä sijaitsevien parillisten domeenien A-säikeiden ja parittomien domeenien CD-pinnan välisen vuorovaikutuksen on todettu estävän ligandien sitoutumista parittomiin domeeneihin, ja tämän vuorovaikutuksen purkaminen soluissa edellyttää suurta muutosta proteiinin rakenteessa (Lad ym., 2007; Pentikäinen ja Yläne, 2009). Mekaanisen voiman kohdistamisen domeeneista 18-19, 20-21 ja 19-21 koostuviin FLNA-fragmentteihin on havaittu paljastavan sekä domeenin 19 että domeenin 21 CD-pinnoilla sijaitsevat ligandien sitoutumiskohdat vaikuttamatta sitoutumiskohtien konformaatioon (Pentikäinen ja Yläne, 2009). Sitoutumiskohtien paljastumiseen johtava FLNA-molekyylin venyminen tapahtuu parillisten domeenien A-säikeiden siirtymisen ja domeenien välisten vuorovaikutusten rikkoutumisen välityksellä.

1.7. Filamiinien rooli ihmisten sairauksissa

1.7.1. Periventrikulaarinen nodulaarinen heterotopia

Normaalissa aivokuoren kehityksessä hermokantasolut jakautuvat voimakkaasti synnyttäen suuren määrän hermosoluja, jotka lopulta muodostavat aivokuoren. Näiden postmitoottisten solujen täytyy vaeltaa aivojen sivukammioiden (*ventriculus lateralis*) alueelta aivokuoreen ja jäädä oikeille paikoilleen eri kerroksiin, joissa ne erilaistuvat eri hermosolutyypeiksi ja muodostavat yhteyksiä toisiin hermosoluihin (ks. yleiskatsaus Nadarajah ja Parnavelas, 2002). *FLNA*-geenissä tapahtuvien lukuraaminsiirrosmutaatioiden tai kodonin lopetuskodoniksi muuttavien pistemutaatioiden on havaittu aiheuttavan X-kromosomiin liittyvää dominanttia häiriötä, jossa hermosolujen vaellus aivokuoreen epäonnistuu ja solut jäävät kyhmyiksi reunustamaan aivojen sivukammioita (Fox ym., 1998; Poussaint ym., 2000). Tätä sairautta kutsutaan periventrikulaariseksi nodulaariseksi heterotopiaksi (PVNH, engl. *periventricular nodular heterotopia*). PVNH:aan liittyviä mutaatioita on tunnistettu yhteensä 16 ja ne sijaitsevat tasaisesti pitkin *FLNA*-geeniä (ks. yleiskatsaus Robertson, 2004).

Suurin osa mutanttialleelin suhteen homotsygoottisista miehistä kuolee aikaisen sikiönkehityksen aikana (Eksioglu ym., 1996; Fox ym., 1998). Enemmistö heterotsygoottisista naisista on älykkyydeltään normaaleja ja osalla sairaus on täysin oireeton, mutta osa potilaista kärsii epileptisistä kohtauksista ja useista keskushermostoon liittymättömistä oireista erityisesti verenkiertoelimistössä. Näihin oireisiin kuuluvat mm. avoimeksi jääneet valtimotiehyet, taipumus aivoinfarktiin, nivelten yliliikkuvuus sekä ruuansulatuskanavan liikkuvuuden häiriöt (Eksioglu ym., 1996). Elossa syntyneet miehet kuolevat yleensä pian syntymän jälkeen laajaan verenvuotoon, jonka patofysiologia on vielä toistaiseksi tuntematon (Fox ym., 1998; Moro ym., 2002).

Filamiini osallistuu mahdollisesti hermosolujen muotoa ja sijaintia koskevien viestien yhdistämiseen, mikä selittäisi *FLNA*-geenissä tapahtuvien mutaatioiden aiheuttamat PVNH:lle tyypilliset häiriöt hermosolujen vaelluksessa. Rotilla *FLNA*:n määrä aivojen sivukammioita ympäröivällä alueella säätelee hermosolujen polaarisuutta ja asemoitumista

ennen neokorteksin (*neocortex*, aivokuoren sensoriset, motoriset ja assosiatiiiviset alueet) muodostumiseen johtavaa soluvaellusta (Nagano ym., 2004). Filamiinin määrää hermosoluissa säätelevillä proteiineilla on todennäköisesti keskeinen rooli tässä toiminnassa, sillä niiden ylenmääräisen ilmentämisen on havaittu johtavan FLNA:n hajotukseen sekä estävän hermosolujen vaelluksen sivukammioiden alueelta (Nagano ym., 2002; Sato ja Nagano, 2005). FLNA:ta ilmentämättömät melanosyytit eivät pysty liikkumaan vastena tekijöihin, jotka FLNA:ta ilmentävissä soluissa laukaisevat liikkumisen. Tämä voi johtua FLNA:n ja β -integriinien välisen yhteyden tuhoutumisesta, jonka on todettu vaikuttavan hermosolujen vaellukseen (ks. yleiskatsaus Lu ja Sheen, 2005).

PVNH ei ole kuitenkaan välttämättä pelkän solujen liikkuvuusongelman syytä, sillä filamiinin on havaittu osallistuvan myös solujen adheesioon (ks. yleiskatsaus Lu ja Sheen, 2005). *FLNA*-geenin ilmentäminen on voimakasta aivokammioita reunustavassa epiteelissä, joka on tuhoutunut PVNH-aivoissa. Adheesio-ongelmat endopyymissä voivat mahdollistaa jakautuvien solujen pääsyn läpi epiteelin ja heterotopian aiheutumisen tai vaihtoehtoisesti neuroepiteelin tuhoutuminen saattaa vaikuttaa radiaalisten gliasolujen viejähaarakkeisiin ja heikentää vaeltavien hermosolujen kiinnittymistä ennen niiden siirtymistä aivokuoreen (ks. yleiskatsaus Lu ja Sheen, 2005).

1.7.2. Otopalatodigitaalinen oireyhtymä, Melnick-Needlesin oireyhtymä ja frontometaphyseaalinen dysplasia

FLNA-geenin tietyille alueille kerääntyneiden aminohapon vaihtumiseen johtavien pistemutaatioiden on havaittu aiheuttavan otopalatodigitaalisen oireyhtymän tyyppisiä 1 ja 2, Melnick-Needlesin oireyhtymää sekä frontometaphyseaalista dysplasiaa. Näille taudeille on tyypillistä kallon, kasvojen sekä luustorakenteiden poikkeamat (esim. ulkoneuva otsa, etäiset silmät, pitkien luiden vääntyminen, skolioosi, käsien ja sormien epämuodostumat sekä sisäkorvan kuuloluiden epämuodostumista johtuva kuurous), virtsa- ja sukupuolielinten epämuodostumat (esim. virtsanjohdinten tukkeumat), sydänviat, poikkeamat sisäelimissä (esim. keuhkoputkien ahtaumat) sekä keskushermostolliset viat (esim. hydrokefalia ja pikkuaivojen hypoplasia, ks. yleiskatsaus Robertson, 2005a).

FLNA:n ABD:n CH2-domeenin alueelle osuvat, aminohapon toiseksi muuttavat pistemutaatiot aikaansaavat otopalatodigitaaliselle oireyhtymälle ominaiset fenotyypit (Robertson ym., 2003). CH2-domeeni ei sido aktiinia *in vitro*, joten CH2-alueen mutaatiot eivät vaikuta suoraan aktiinin sitoutumiseen (Gimona ym., 2002a). *FLNA*:n ja α -aktiniinin CH2-domeenien on kuitenkin havaittu sitovan fosfatidyli-inositoli(4,5)-bisfosfaattia (Furuhashi ym., 1992; Fukami ym., 1996). Normaalisti fosfatidyli-inositoli(4,5)-bisfosfaatti tehostaa α -aktiniinin aktiinisäikeiden yhteenliittämiskiivisuutta, mutta mutaatiot CH2-alueella estävät fosfatidyli-inositoli(4,5)-bisfosfaatin sitoutumisen α -aktiniiniin (Fukami ym., 1992). Vuorovaikutus fosfatidyli-inositoli(4,5)-bisfosfaatin kanssa saattaa siten säädellä myös filamiinin ABD:n toimintaa, ja otopalatodigitaalista oireyhtymää aiheuttavat mutaatiot voivat häiritä tätä vuorovaikutusta.

Melnick-Needlesin syndrooman oireiden taustalla on *FLNA*:n domeeniin 10 osuvat mutaatiot (Robertson ym., 2003). Suurimmalla osalla tutkituista potilaista on todettu toinen kahdesta mutaatiosta, G3562A tai C3596T. Frontometaphyseaaliseen dysplasiaan liittyvien mutaatioiden sijainti *FLNA*-geenissä vaihtelee – aminohappojen muutoksia on löydetty *FLNA*:n ABD:sta sekä domeeneista 3, 10 ja 14 (ks. yleiskatsaus Robertson 2005a).

1.7.3. Autoimmuunisairaudet

Filamiineihin liittyvät poikkeamat saattavat olla kytköksissä myös joihinkin autoimmuunisairauksiin. Myasthenia gravis -lihasheikkoutta sairastavien potilaiden sekä krooniseen munuaiskerästulehdukseen (glomerulonefriitti) johtavasta elinsiirteen hylkimisreaktiosta kärsivien hiirten verestä on löytynyt korkeita filamiinivastainepitoisuuksia (Yamamoto ym., 1987; Peutz-Kootstra ym., 2000).

1.7.4. Emery-Dreifussin lihasrappeuma ja Barthin oireyhtymä

Mutaatiot *FLNA*-geenissä osallistuvat mahdollisesti kahden perinnöllisen myopatian, Emery-Dreifussin lihasrappeuman sekä Barthin oireyhtymän, aiheuttamiseen (Gorlin ym., 1990). Päätelmä perustuu tietoon *FLNA*-geenin sijainnista samalla kromosomialueella dystrofiinin kanssa sekä filamiinin ja puuttuessaan vastaavanlaisia lihasrappeumasairauksia aiheuttavan dystrofiinin rakenteelliseen samankaltaisuuteen.

2. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tämän pro gradu -tutkielman tavoitteena oli FLNA:n domeenien 18 ja 20 A-säikeisiin sijoittuvien mutaatioiden suunnitteleminen domeeneista 18-19, 20-21 ja 16-21 koostuviin proteiinikonstrukteihin, näiden mutaatioiden toteuttaminen sekä mutanttiproteiinien tuottaminen ja puhdistaminen. Ensisijainen tavoite oli saada aikaan sopivia mutanttiproteiineja käytettäväksi jatkokokeissa, joiden avulla tutkitaan domeenien rakenteen käyttäytymistä em. kuudesta domeenista koostuvassa FLNA-fragmentissa sekä vierekkäisten domeenien vaikutusta ligandien sitoutumiseen. Tämän tutkielman puitteissa selvitettiin, vaikuttavatko tehdyt mutaatiot proteiinin konformaatioon ja pystyvätkö mutanttiproteiinit sitomaan dopamiinireseptoripeptidejä tai onko mutaatioilla vaikutusta mahdolliseen dopamiinireseptorien sitoutumiseen. Työ toimi perustana myöhemmille tutkimuksille, joissa mutaatioiden vaikutusta proteiinin rakenteeseen ja FLNA:n ligandien sitoutumiseen selvitetään tarkemmin sekä pienkulmaröntgensirontamittauksin että perusteellisempien sitoutumiskokeiden avulla.

3. MATERIAALI JA MENETELMÄT

3.1. Mutageneesi ja proteiinien tuotto

Mutageneesi IgFLNA18-19, IgFLNA20-21 ja IgFLNA16-21 pGEX-4T3 TEV-plasmideihin suoritettiin PCR:n avulla käyttäen Phusion High-Fidelity DNA-polymeraasia (Finnzymes). Käytetyt alukkeet ja toteutetut mutaatiot sijainteineen on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Mutageneesissä käytetyt alukkeet ja toteutetut mutaatiot.

FLNA-domeeni	Mutaatio	Aluke 1	Aluke 2
18	L1963E	5'-G CGT ATG TCC CAC GAA AAG GTC GGC TCT GCT GC-3'	5'-GC AGC AGA GCC GAC CTT TTC GTG GGA CAT ACG C-3'
20	I2144E	5'-GG GTG AAA GAG AGC GAG ACC CGC AGG CGT CGG-3'	5'-CCG ACG CCT GCG GGT CTC GCT CTC TTT CAC CC-3'
20	S2152E	5'-GG CGT CGG GCT CCT GAA GTG GCC AAC GTT GG-3'	5'-CC AAC GTT GGC CAC TTC AGG AGC CCG ACG CC-3'

Plasmidit pilkottiin DpnI-restriktioentsyymillä (20 000 U/ml, Biolabs) ja transformoitiin kalsiumkloridimenetelmällä kompetenteiksi muutettuihin *Escherichia coli* DH5 α -soluihin. Tämän jälkeen plasmidit eristettiin ja puhdistettiin DNA Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kitin sekä Qiagen QIAquick PCR Purification Kitin avulla. DNA-konsentraatiot mitattiin NanoDrop -spektrofotometrillä (Thermo Scientific).

Mutaatioiden onnistuminen ja oikea sijainti varmistettiin DNA-sekvensoinnin (ABI 3130 DNA Sequencer) avulla. Sekvensointia varten suoritettussa DNA:n leimausreaktiossa käytettiin BigDye Terminator v 3.1 Sequencing Premixiä, 5 x BigDye Terminator Sequencing Bufferia sekä viittä erilaista aluketta (pGEX 5', pGEX 3' ja kolme IgFLNA16-21-fragmentille spesifistä väliäluuketta).

Proteiinit tuotettiin kalsiumkloridimenetelmällä kompetenteiksi muutetuissa *E. coli* BL21 Gold -soluissa ja PBS:ään liuotetut solut säilytettiin -80 °C:ssa.

3.2. Proteiinien puhdistus

Solususpensio sulatettiin +37 °C vesihauteessa ja solut hajotettiin French Press -laitteella (2000 PSI, Thermo Scientific). Hajotetuista soluista talteen otettu supernatantti käsiteltiin proteaasi-inhibiittorilla (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), minkä jälkeen proteiinit puhdistettiin GST-sefaroosi-affiniteettikromatografian (Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare) avulla. GST-osa irrotettiin tobacco etch virus -proteaasilla yön yli dialysoiden +4 °C:ssa (puskuri 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Tris pH 8.0). Dialyysin jälkeen irronnut GST-osa poistettiin toisen GST-sefaroosipylvään avulla ja puhdistusta jatkettiin geelisuodatuksella, joka toteutettiin ÄKTA Prime -nestekromatografilla (pylväs Hiload 26/60 Superdex 75 pg, puskuuri 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Tris pH 8.0). Lopuksi proteiiniliuos konsentroidiin siten, että pitoisuudeksi saatiin 35-45 mg/ml.

3.3. Analyttinen geelisuodatus

Analyttinen geelisuodatus suoritettiin ÄKTA Prime -nestekromatografilla (pylväs Superdex 200 HR 10/30, puskuuri 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM Tris pH 8.0, geelisuodatusstandardi Gel Filtration Standard, Bio-Rad). Kromatogrammeista saadut retentioajat normalisoitiin tulosten vertailua varten jakamalla ajetun proteiinin retentioaika samana päivänä ajetun geelisuodatusstandardin retentioajalla.

3.4. Sitoutumiskokeet

IgFLNA16-21-mutanttiproteiinien ja villityypin proteiinin sitoutuminen D₂- ja D₃-dopamiinireseptoripeptideihin testattiin pitämällä *N*-hydroksisukkinimidiaktivoituun sefaroosiin (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare) liitettyjä dopamiinireseptoripeptidejä (EZBiolab Custom Peptide D2, sekvenssi Ac-KIYIVLRRRRKRVTNKRSSR-NH₂, molekyylipaino 2627,21 g/mol, EZBiolab Custom Peptide D3, sekvenssi Ac-RIYVVLKQRRRKRLTRQNSQ-NH₂, molekyylipaino 2753,32 g/mol) mutanttiproteiinin tai villityypin IgFLNA16-21:n kanssa 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween -puskurissa (kokonaistilavuus ~100 µl) 30 min huoneen lämmössä.

Tämän jälkeen sefaroosi pestiin kolme kertaa 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % Tween -puskurilla. Proteiinit liuotettiin kaksinkertaiseen SDS-PAGE-latauspuskuriin, eroteltiin 12 % SDS-PAGE:lla (Hoefler Mighty Small) ja värjättiin Coomassie Brilliant Blue G-250 -värillä (Merck). Molekyylipainostandardina käytettiin Low Molecular Weight Markeria (Amersham Biosciences). Sitoutumisintensiteettien kvantitatiivinen määrittäminen suoritettiin Quantity One -ohjelmalla (BioRad).

4. TULOKSET

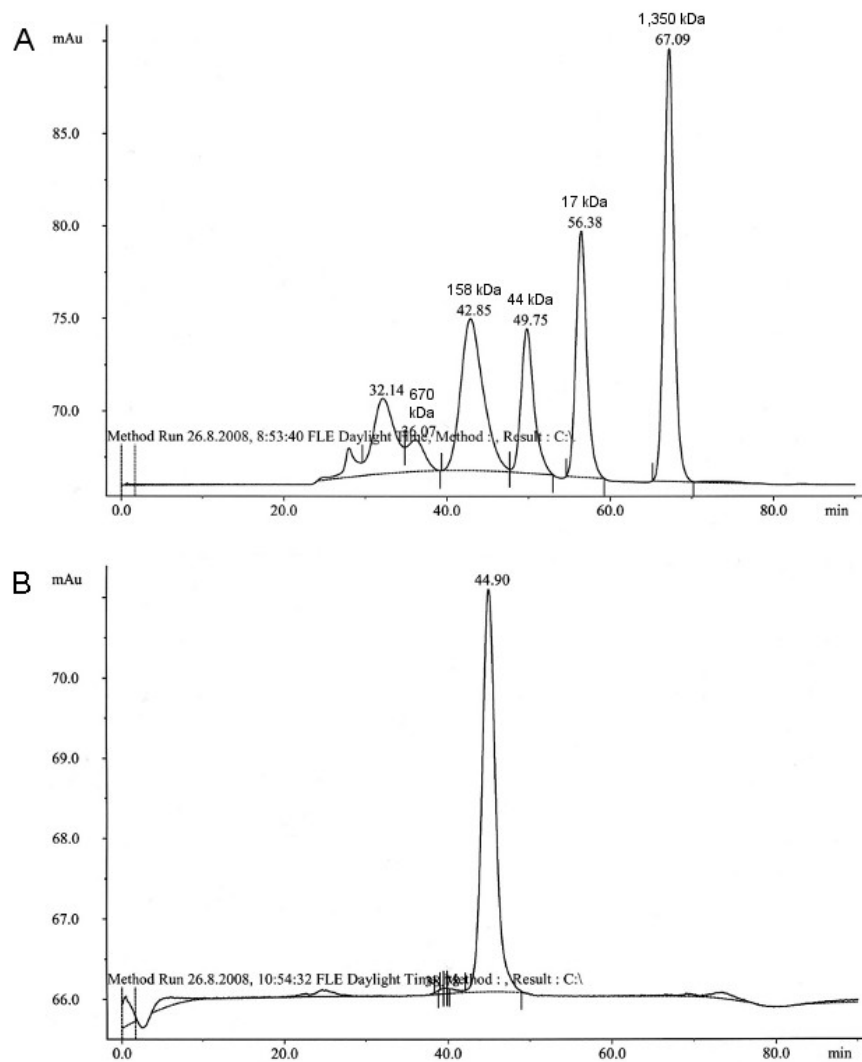
4.1. Mutaatioiden suunnittelu

Mutaatio IgFLNA18-19- ja IgFLNA16-21-konstruktien domeeniin 18 (L1963E, taulukko 2) suunniteltiin siten, että mutaatio sijoittuu domeenin 18 A-säikeeseen, joka on vuorovaikutuksessa domeenin 19 CD-pinnan kanssa (kuva 3C). Mutaatiossa neutraali, hydrofobisella sivuketjulla varustettu aminohappo (leusiini) korvattiin negatiivisesti varautuneella glutamaatilla. Myös IgFLNA20-21- ja IgFLNA16-21-konstruktien domeeniin 20 suunnitellussa mutaatiossa (I2144E, taulukko 2, Lad ym., 2007) hydrofobisen aminohapon (isoleusiini) tilalle vaihdettiin glutamaatti. Mutaatio sijoittuu domeenin 20 A-säikeeseen, joka puolestaan vuorovaikuttaa domeenin 21 C- ja D-säikeiden kanssa (kuva 3A). Lisäksi IgFLNA20-21- ja IgFLNA16-21-konstruktien domeeniin 20 toteutettiin mutaatio, jossa potentiaalisena fosforylaatiokohteena toimiva seriini vaihdettiin glutamaatiksi (S2152E, taulukko 2). Jatkossa mutaation sisältävistä proteiinikonstrukteista käytetään nimityksiä IgFLNA16-21 18* (mutaatio L1963E domeenissa 18), IgFLNA16-21 20* (mutaatio I2144E domeenissa 20) ja IgFLNA16-21 20S* (mutaatio S2152E domeenissa 20). IgFLNA16-21 18+20*:^llla tarkoitetaan proteiinikonstruktiota, jossa on mutaatio sekä domeenissa 18 (L1963E) että domeenissa 20 (I2144E).

4.2. Mutaatioiden vaikutus proteiinin konformaatioon

Villityypin IgFLNA16-21-proteiinista ja mutanttiproteiineista ajettiin analyyttinen geelisuodatus, jotta nähtäisiin, vaikuttavatko domeenien 18 ja 20 A-säikeisiin tehdyt mutaatiot (taulukko 2, kuvat 3A ja 3C) proteiinin konformaatioon. Analyyttisiä geelisuodatuksia ajettiin useampana päivänä, joten tulosten vertailun mahdollistamiseksi IgFLNA16-21-villityypin ja mutanttiproteiinien retentioajat normalisoitiin jakamalla proteiinin retentioaika samana päivänä ajetun geelisuodatusstandardin retentioajalla (taulukko 3, kuva 7A). Kuva 7B edustaa tyypillistä analyyttisestä geelisuodatuksesta saatua kromatogrammia, jossa on nähtävissä yksi kapea piikki 44-45 minuutin kohdalla. Kromatogrammeissa piikkien puolikorkeuden leveys pysyi likimain samana verrattaessa villityypin proteiinia mutanttiproteiineihin, eivätkä villityypin proteiinin ja

mutanttiproteiinien normalisoidut retentioajat (taulukko 3) poikenneet merkittävästi toisistaan, mistä voidaan päätellä proteiinien konformaation pysyvän muuttumattomana mutaatioista huolimatta.



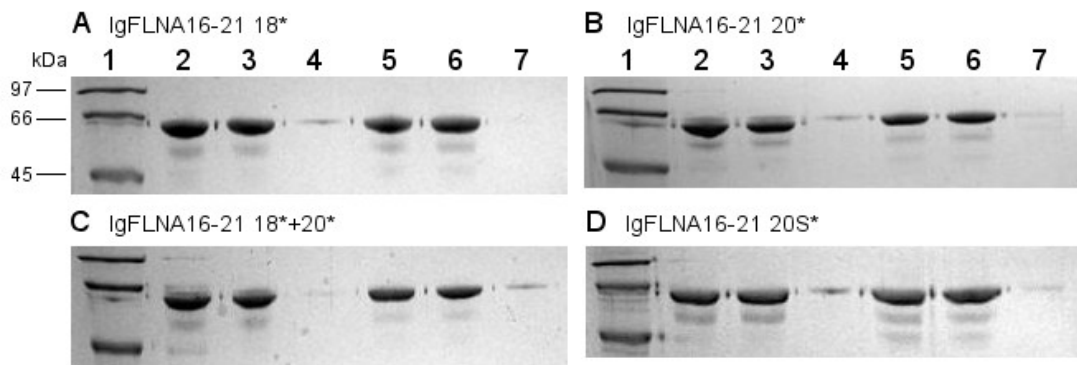
Kuva 7. Geelisuodatusstandardin ja IgFLNA16-21-villityypin (WT) retentioajat analyttisessä geelisuodatuksessa. A: Geelisuodatusstandardi, piikki 1 (32.14 min): tyhjä tilavuus, piikki 2 (36.07 min): tyreoglobuliini, piikki 3 (42.85 min): naudan gammaglobuliini (IgG), piikki 4 (49.75 min): kanan ovalbumiini, piikki 5 (56.38 min): hevosen myoglobuliini, piikki 6: (67.09 min) syankobalamiini (B12-vitamiini). B: IgFLNA16-21 WT, piikki 44.90 min. Tyypillinen kromatogrammi kaikille ajetuille proteiineille.

Taulukko 3. IgFLNA16-21 WT:n ja IgFLNA16-21-mutanttiproteiinien retentioajat ja normalisoidut retentioajat analyyttisessä geelisuodatuksessa.

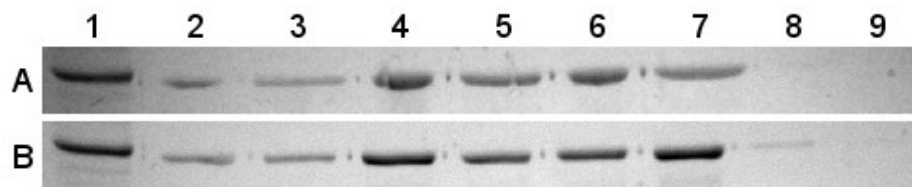
Proteiini	Retentioaika (min)	Normalisoitu retentioaika (proteiinin retentioaika/geelisuodatusstandardin retentioaika)
IgFLNA16-21 WT	44,9	1,05
IgFLNA16-21 18*	45,13	1,05
IgFLNA16-21 20*	44,46	1,04
IgFLNA16-21 18*+20*	44,27	1,04
IgFLNA16-21 20S*	45,13	1,05

4.3. Mutaatioiden vaikutus dopamiinireseptoripeptidien sitoutumiseen

Sitoutumiskokeiden avulla haluttiin selvittää, sitoutuvatko D₂- ja D₃-dopamiinireseptoripeptidit FLNA:n domeenit 16-21 käsittävään proteiinkonstruktioon ja vaikuttavatko domeenien 18 ja 20 A-säikeisiin tehdyt mutaatiot (taulukko 2, kuvat 3A ja 3C) sitoutumisintensiteettiin. D₂- ja D₃-dopamiinireseptoripeptidien sekvenssien välinen ero (ks. materiaali ja menetelmät, s. 35) on niin pieni, että niiden sitoutumisen voidaan olettaa tapahtuvan samalla tavalla. Dopamiinireseptoripeptidien havaittiin sitoutuvan sekä villityypin proteiiniin että mutanttiproteiineihin (kuvat 8 ja 9), mutta pelkän kvalitatiivisen arvioinnin perusteella mahdollisia eroja dopamiinireseptorien sitoutumisintensiteetissä villityypin proteiiniin ja mutanttiproteiineihin ei pystytä havainnoimaan luotettavasti. Työlle annetun aikarajan takia sitoutumisintensiteettien tarkempi kvantitointi suoritettiin ainoastaan IgFLNA16-21 18*-mutanttiproteiinille (kuva 9). Kvantitatiivisen määrityksen perusteella dopamiinireseptoripeptidi D₂ sitoutuu IgFLNA16-21 18*:een keskimäärin 1,55 kertaa voimakkaammin kuin villityypin proteiiniin (taulukko 4).



Kuva 8. Dopamiinireseptori D₂:n ja IgFLNA16-21 mutanttiproteiinien sitoutumiskokeiden SDS-PAGE-analyysi. A: IgFLNA16-21 18*, kaivo 1: molekyylipainostandardi, kaivo 2: IgFLNA16-21 18* 1 μM, kaivo 3: IgFLNA16-21 18* 1 μM, kaivo 4: IgFLNA16-21 18* 1 μM kontrolli, kaivo 5: IgFLNA16-21 WT 1 μM, kaivo 6: IgFLNA16-21 WT 1 μM, kaivo 7: IgFLNA16-21 WT 1 μM kontrolli. B: IgFLNA16-21 20*, järjestys sama kuin kuvassa 8A. C: IgFLNA16-21 18*+20*, järjestys sama kuin kuvassa 8A. D: IgFLNA16-21 20S*, järjestys sama kuin kuvassa 8A.



Kuva 9. Dopamiinireseptori D₂:n ja IgFLNA16-21 18*:n sitoutumiskokeiden SDS-PAGE-analyysi rinnakkaiskokeista. Kaivo 1: molekyylipainostandardi, kaivo 2: IgFLNA16-21 18* 0,2 μM, kaivo 3: IgFLNA16-21 WT 0,2 μM, kaivo 4: IgFLNA16-21 18* 0,4 μM, kaivo 5: IgFLNA16-21 WT 0,4 μM, kaivo 6: IgFLNA16-21 18* 0,8 μM, kaivo 7: IgFLNA16-21 WT 0,8 μM, kaivo 8: IgFLNA16-21 18* 1 μM kontrolli, kaivo 9: IgFLNA16-21 WT 1 μM kontrolli.

Taulukko 4. Dopamiinireseptori D₂:n ja IgFLNA16-21 18*:n sitoutumisen kvantitatiivisesti määritetyt intensiteetit.

Proteiini	Konsentraatio	Sitoutumisintensiteetti kuva 9A	Sitoutumisintensiteetti kuva 9B
IgFLNA16-21 18*	0,2 μM	3319	2628
IgFLNA16-21 WT	0,2 μM	2028	1600
IgFLNA16-21 18*	0,4 μM	3768	4836
IgFLNA16-21 WT	0,4 μM	2329	2904
IgFLNA16-21 18*	0,8 μM	2589	3197
IgFLNA16-21 WT	0,8 μM	2238	5448

5. TULOSTEN TARKASTELU

Filamiinien ja niiden ligandien välisten vuorovaikutusten selvittämisessä sekä filamiinidomeenien rakennetutkimuksissa on käytetty pääsääntöisesti proteiinkonstruktteja, jotka koostuvat yhdestä, kahdesta tai kolmesta domeenista, esim. IgFLNA17, IgFLNA16-17, IgFLNA18-19, IgFLNA20-21 ja IgFLNA19-21 (Nakamura ym., 2006; Lad ym., 2007; Heikkinen ym., 2009). Tämä pro gradu -tutkielma on osa laajempaa projektikonaisuutta, jonka tavoitteena on selvittää, kuinka vierekkäiset domeenit vaikuttavat ligandien sitoutumiseen pidemmässä FLNA-konstruktissa, joka käsittää kuusi domeenia (IgFLNA16-21). Työn pääpaino olikin IgFLNA16-21-mutaatioiden suunnittelemisessa sekä mutanttiproteiinien tuottamisessa ja puhdistamisessa jatkokokeita varten.

Mutaatiot suunniteltiin mukailleen Lad ym. (2007) tutkimusta, jossa osoitettiin domeenin 20 A-säikeeseen sijoittuvan pistemutaation (I2144E, kuva 3A) lisäävän $\beta 7$ -integriinipeptidin sitoutumista domeeniin 21. Tässä työssä IgFLNA20-21- ja IgFLNA16-21-konstruktien domeeniin 20 tehtiin täsmälleen sama mutaatio kuin Lad ym. (2007) tutkimuksessa. IgFLNA18-19- ja IgFLNA16-21-konstruktien domeeniin 18 toteutetussa mutaatiossa glutamaatiksi muutettu leusiini (Leu¹⁹⁶³, kuva 3C) vastaa domeenissa 20 glutamaatiksi muutettua isoleusiinia (Ile²¹⁴⁴, kuva 3A). IgFLNA20-21- ja IgFLNA16-21-konstruktien domeeniin 20 tehtiin myös mutaatio, jossa mahdollisena fosforylaatiokohteena toimiva seriini (Ser²¹⁵²) korvattiin glutamaatilla. Työn ensisijainen tavoite täyttyi, sillä haluttujen mutaatioiden tekeminen FLNA-konstruktteihin onnistui. Mutanttiproteiinit tuottivat ongelmitta *E. coli* -soluissa ja niiden puhdistaminen sujui ilman vaikeuksia, sillä proteiinit pysyivät liukoisina.

Analyttisen geelisuodatuksen tulosten perusteella voidaan todeta IgFLNA16-21-mutanttiproteiinien konformaation pysyvän muuttumattomana mutaatioista huolimatta. Mutanttiproteiinien retentioajat (taulukko 3) eivät eronneet merkittävästi villityypin proteiinin retentioajasta, eikä kromatogrammeissa (kuva 7B) piikkien puolikorkeuksien leveydet poikenneet juurikaan toisistaan. Erot retentioajoissa ja piikkien puolikorkeuksien leveydessä olisivat kertoneet mahdollisesta rakenteen hajoamisesta. Mutanttiproteiinit olivat siis rakenteeltaan villityypin proteiinin kaltaisia, minkä ansiosta niitä pystyttiin

käyttämään dopamiinireseptoripeptidien sitoutumisen tutkimiseen. Tässä tutkielmassa esitellyille proteiineille myöhemmin tehdyt pienkulmaröntgensirontamittaukset tukevat analyttisen geelisuodatuksen tuloksia, sillä niidenkään perusteella ei saatu viitteitä IgFLNA16-21-mutanttiproteiinien mahdollisista konformaatiomuutoksista (Ruskamo ym., julkaisemattomia tuloksia).

Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu D₂- ja D₃-dopamiinireseptoripeptidien sitoutuvan villityypin FLNA:n domeeniin 19 (Lin ym., 2001). Lisäksi ydinmagneettiseen resonanssiin perustuvat mittaukset ovat osoittaneet IgFLNA18-19:n rakenteen muistuttavan IgFLNA20-21:n rakennetta, jossa domeenin 20 A-säie peittää domeenin 21 CD-pinnalla sijaitsevan integriinien sitoutumiskohdan (kuvat 3A ja 3C, Lad ym., 2007; Heikkinen ym., 2009). Sitoutumiskokeiden tuloksista (kuvat 8 ja 9) käy ilmi, että D₂- ja D₃-dopamiinireseptoripeptidit pystyvät sitoutumaan IgFLNA16-21:een. Sitoutuminen edellyttää proteiinin rakenteessa tapahtuvaa laajamittaista muutosta, sillä ligandia sitomattomassa tilassa domeenin 18 A-säie peittää dopamiinireseptoripeptidien sitoutumiskohdan domeenissa 19 (kuva 3C). Olettamuksena olikin, että mutaatio domeenin 18 A-säikeessä (L1963E, kuva 3C) heikentää A-säikeen vuorovaikutusta domeenin 19 kanssa ja edistää siten dopamiinireseptoripeptidien sitoutumista domeeniin 19.

Sitoutumiskokeiden tulosten (kuva 8) kvalitatiivisen arvioinnin perusteella ei kuitenkaan voida tehdä päätelmiä mutaatioiden vaikutuksesta dopamiinireseptori D₃:n sitoutumisintensiteettiin, vaan tämä vaatisi menetelmän optimointia epätarkkuutta aiheuttavien vaiheiden (esim. pipetointi ja pesut) osalta, sitoutumiskokeiden toistamista useampaan kertaan sekä kokeita sitoutumisaffiniteetin (K_d) määrittämiseksi. Näitä jatkokokeita ei pystytty suorittamaan tämän tutkielman puitteissa ajan puutteen vuoksi, ja sitoutumisintensiteettien kvantitatiivinen analyysi ehdittiin suorittamaan ainoastaan IgFLNA16-21 18*-mutanttiproteiinille (kuva 9, taulukko 4).

FLNA16-21-konstruktin domeenin 18 A-säikeeseen sijoittuvan mutaation vaikutuksia dopamiinireseptori D₂:n sitoutumiseen tutkittiin määrittämällä sitoutumisen intensiteetit sitoutumiskokeiden SDS-PAGE-analyysin tuloksista (kuva 9) kvantitatiivisesti. Määritettyjen sitoutumisintensiteettien (taulukko 4) mukaan mutaatio IgFLNA16-21-

konstruktiin domeenin 18 A-säikeessä lisää D_2 -dopamiinireseptorin sitoutumista domeeniin 19, mikä oli odotettavissa Lad ym. (2007) kokeiden ja Heikkinen ym. (2009) rakennetutkimusten tulosten perusteella. Nämä tutkimukset osoittivat domeenin 20 A-säikeen ja domeenin 21 CD-pinnan välisen vuorovaikutuksen tuhoamisen mutaation avulla johtavan ligandin sitoutumisaffiniteetin nousuun sekä FLNA:n domeeniparien 20-21 ja 18-19 rakenteiden muistuttavan toisiaan. Kyseisten tulosten perusteella arveltiin vierekkäisten FLNA-domeenien ligandien sitoutumista estävän vaikutuksen olevan yleinen mekanismi filamiinien ja niiden ligandien välisten vuorovaikutusten säätelyyn. Myös tässä työssä käytetyille IgFLNA16-21-konstruktille myöhemmin tehtyjen pienkulmaröntgensirontamittausten tuloksista käy ilmi, että domeenien 18 tai 20 A-säikeisiin tehdyt mutaatiot lisäävät D_3 -dopamiinireseptoripeptidin sitoutumista domeeniin 19 tai migfiliinin ja integriinien sitoutumista domeeniin 21 (Ruskamo ym., julkaisemattomia tuloksia).

Pienkulmaröntgensirontamittausten tulokset osoittivat myös, että IgFLNA16-21 18*:n ja IgFLNA16-21 20*:n konformaatiot muuttuvat rajusti domeeneihin 19 tai 21 sitoutuvien ligandien läsnä ollessa (Ruskamo ym., julkaisemattomia tuloksia). Villityypin proteiinin kohdalla konformaation muutos oli huomattavasti mutanttiproteiineilla havaittua pienempi. FLNA:n domeenien 18 ja 20 A-säikeisiin tehdyt mutaatiot siis edesauttavat domeeneissa 19 ja 21 sijaitsevien ligandien sitoutumiskohtien paljastumista. Soluissa näiden sitoutumiskohtien paljastuminen tapahtuu mahdollisesti filamiinimolekyyliä venyttävän mekaanisen voiman välityksellä (Pentikäinen ja Yläne, 2009).

Yhteenvedona tämän työn tulosten perusteella voidaan todeta, etteivät mutaatiot IgFLNA16-21-konstruktiin domeenien 18 ja 20 A-säikeissä vaikuta proteiinin rakenteeseen merkittävästi, ja että IgFLNA16-21 kykenee sitomaan D_2 - ja D_3 -dopamiinireseptoripeptidejä, mikä edellyttää proteiinin rakenteessa tapahtuvaa suurta muutosta. Mutaatio IgFLNA16-21-konstruktiin domeenin 18 A-säikeessä lisää D_2 -dopamiinireseptorin sitoutumista domeeniin 19 heikentämällä vuorovaikutusta domeenin 18 A-säikeen ja domeenin 19 CD-pinnalla sijaitsevan ligandien sitoutumiskohdan välillä. Tämä todennäköisesti helpottaa domeenin 18 A-säikeiden siirtymistä pois paikoiltaan ja selittää siten mutaation vaikutuksen sitoutumisintensiteetin nousuun.

6. LÄHDELUETTELO

- Andrews, R.K. ja J.E. Fox. 1992. Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex that binds to purified actin-binding protein. *J.Biol.Chem.* 267:18605-18611.
- Benes, F.M., P.A. Paskevich, J. Davidson ja V.B. Domesick. 1985. Synaptic rearrangements in medial prefrontal cortex of haloperidol-treated rats. *Brain Res.* 348:15-20.
- Benes, F.M., P.A. Paskevich ja V.B. Domesick. 1983. Haloperidol-induced plasticity of axon terminals in rat substantia nigra. *Science.* 221:969-971.
- Blanchoin, L., K.J. Amann, H.N. Higgs, J.B. Marchand, D.A. Kaiser ja T.D. Pollard. 2000. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature.* 404:1007-1011.
- Bresnick, A.R., P.A. Janmey ja J. Condeelis. 1991. Evidence that a 27-residue sequence is the actin-binding site of ABP-120. *J.Biol.Chem.* 266:12989-12993.
- Bresnick, A.R., V. Warren ja J. Condeelis. 1990. Identification of a short sequence essential for actin binding by Dictyostelium ABP-120. *J.Biol.Chem.* 265:9236-9240.
- Brotschi, E.A., J.H. Hartwig ja T.P. Stossel. 1978. The gelation of actin by actin-binding protein. *J.Biol.Chem.* 253:8988-8993.
- Browne, K.A., R.W. Johnstone, D.A. Jans ja J.A. Trapani. 2000. Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J.Biol.Chem.* 275:39262-39266.
- Calderwood, D.A., A. Huttenlocher, W.B. Kiosses, D.M. Rose, D.G. Woodside, M.A. Schwartz ja M.H. Ginsberg. 2001. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat.Cell Biol.* 3:1060-1068.
- Cantiello, H.F. 1997. Role of actin filament organization in cell volume and ion channel regulation. *J.Exp.Zool.* 279:425-435.
- Chiang, W., M.L. Greaser ja G.E. Lyons. 2000. Filamin isogene expression during mouse myogenesis. *Dev.Dyn.* 217:99-108.
- Civelli, O., J.R. Bunzow ja D.K. Grandy. 1993. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 33:281-307.
- Critchley, D.R. 2000. Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:133-139.
- Edwards, D.C., L.C. Sanders, G.M. Bokoch ja G.N. Gill. 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat.Cell Biol.* 1:253-259.
- Edwards, D.N., P. Towb ja S.A. Wasserman. 1997. An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development.* 124:3855-3864.
- Eksioglu, Y.Z., I.E. Scheffer, P. Cardenas, J. Knoll, F. DiMario, G. Ramsby, M. Berg, K. Kamuro, S.F. Berkovic, G.M. Duyk, J. Parisi, P.R. Huttenlocher ja C.A. Walsh. 1996. Periventricular heterotopia: an X-linked dominant epilepsy locus causing aberrant cerebral cortical development. *Neuron.* 16:77-87.
- Fox, J.E. 1985. Identification of actin-binding protein as the protein linking the membrane skeleton to glycoproteins on platelet plasma membranes. *J.Biol.Chem.* 260:11970-11977.

- Fox, J.W., E.D. Lamperti, Y.Z. Eksioğlu, S.E. Hong, Y. Feng, D.A. Graham, I.E. Scheffer, W.B. Dobyns, B.A. Hirsch, R.A. Radtke, S.F. Berkovic, P.R. Huttenlocher ja C.A. Walsh. 1998. Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron*. 21:1315-1325.
- Franzot, G., B. Sjöblom, M. Gautel ja K. Djinovic Carugo. 2005. The crystal structure of the actin binding domain from alpha-actinin in its closed conformation: structural insight into phospholipid regulation of alpha-actinin. *J.Mol.Biol.* 348:151-165.
- Fukami, K., K. Furuhashi, M. Inagaki, T. Endo, S. Hatano ja T. Takenawa. 1992. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature*. 359:150-152.
- Fukami, K., N. Sawada, T. Endo ja T. Takenawa. 1996. Identification of a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site in chicken skeletal muscle alpha-actinin. *J.Biol.Chem.* 271:2646-2650.
- Furuhashi, K., M. Inagaki, S. Hatano, K. Fukami ja T. Takenawa. 1992. Inositol phospholipid-induced suppression of F-actin-gelating activity of smooth muscle filamin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 184:1261-1265.
- Gardel, M.L., F. Nakamura, J.H. Hartwig, J.C. Crocker, T.P. Stossel ja D.A. Weitz. 2006. Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:1762-1767.
- Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, W.J. Kranewitter ja S.J. Winder. 2002a. Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett.* 513:98-106.
- Glogauer, M., P. Arora, D. Chou, P.A. Janmey, G.P. Downey ja C.A. McCulloch. 1998. The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J.Biol.Chem.* 273:1689-1698.
- Gorlin, J.B., R. Yamin, S. Egan, M. Stewart, T.P. Stossel, D.J. Kwiatkowski ja J.H. Hartwig. 1990. Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J.Cell Biol.* 111:1089-1105.
- Guo, Y., S.X. Zhang, N. Sokol, L. Cooley ja G.L. Boulianne. 2000. Physical and genetic interaction of filamin with presenilin in *Drosophila*. *J.Cell.Sci.* 113 Pt 19:3499-3508.
- Hartwig, J.H. ja T.P. Stossel. 1981. Structure of macrophage actin-binding protein molecules in solution and interacting with actin filaments. *J.Mol.Biol.* 145:563-581.
- Hartwig, J.H., J. Tyler ja T.P. Stossel. 1980. Actin-binding protein promotes the bipolar and perpendicular branching of actin filaments. *J.Cell Biol.* 87:841-848.
- Heikkinen, O.K., S. Ruskamo, P.V. Konarev, D.I. Svergun, T. Iivanainen, S.M. Heikkinen, P. Permi, H. Koskela, I. Kilpeläinen ja J. Yläne. 2009. Atomic structures of two novel immunoglobulin-like domain-pairs in the actin cross-linking protein filamin. *J.Biol.Chem.*
- Himmel, M., P.F. Van Der Ven, W. Stocklein ja D.O. Furst. 2003. The limits of promiscuity: isoform-specific dimerization of filamins. *Biochemistry.* 42:430-439.
- Hock, R.S., G. Davis ja D.W. Speicher. 1990. Purification of human smooth muscle filamin and characterization of structural domains and functional sites. *Biochemistry.* 29:9441-9451.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Ithychanda, S.S., M. Das, Y.Q. Ma, K. Ding, X. Wang, S. Gupta, C. Wu, E.F. Plow ja J. Qin. 2009. Migfilin, a molecular switch in regulation of integrin activation. *J.Biol.Chem.* 284:4713-4722.

- Ito, T., A. Suzuki ja T.P. Stossel. 1992. Regulation of water flow by actin-binding protein-induced actin gelatin. *Biophys.J.* 61:1301-1305.
- Janmey, P.A., S. Hvidt, J. Lamb ja T.P. Stossel. 1990. Resemblance of actin-binding protein/actin gels to covalently crosslinked networks. *Nature.* 345:89-92.
- Janssen, K.P., L. Eichinger, P.A. Janmey, A.A. Noegel, M. Schliwa, W. Witke ja M. Schleicher. 1996. Viscoelastic properties of F-actin solutions in the presence of normal and mutated actin-binding proteins. *Arch.Biochem.Biophys.* 325:183-189.
- Kelleher, J.F., R.D. Mullins ja T.D. Pollard. 1998. Purification and assay of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba castellanii*. *Methods Enzymol.* 298:42-51.
- Kiema, T., Y. Lad, P. Jiang, C.L. Oxley, M. Baldassarre, K.L. Wegener, I.D. Campbell, J. Yläne ja D.A. Calderwood. 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol.Cell.* 21:337-347.
- Kuzin, A.P., M. Abashidze, R. Seetharaman, R. Shastry, S. Sahdev, C. Ciccocanti, R. Xiao, J.K. Everett, Y. Huang, T. Acton, B. Rost, G.T. Montelione, L. Tong ja J.F. Hunt. 2009. Northeast Structural Genomics Consortium (NESG).
- Kwak, K.B., J. Kambayashi, M.S. Kang, D.B. Ha ja C.H. Chung. 1993. Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts. *FEBS Lett.* 323:151-154.
- Lad, Y., P. Jiang, S. Ruskamo, D.S. Harburger, J. Yläne, I.D. Campbell ja D.A. Calderwood. 2008. Structural basis of the migfilin-filamin interaction and competition with integrin beta tails. *J.Biol.Chem.* 283:35154-35163.
- Lad, Y., T. Kiema, P. Jiang, O.T. Pentikäinen, C.H. Coles, I.D. Campbell, D.A. Calderwood ja J. Yläne. 2007. Structure of three tandem filamin domains reveals auto-inhibition of ligand binding. *EMBO J.* 26:3993-4004.
- Larjava, H., E.F. Plow ja C. Wu. 2008. Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep.* 9:1203-1208.
- Leonardi, A., H. Ellinger-Ziegelbauer, G. Franzoso, K. Brown ja U. Siebenlist. 2000. Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J.Biol.Chem.* 275:271-278.
- Li, M., J.C. Bermak, Z.W. Wang ja Q.Y. Zhou. 2000. Modulation of dopamine D(2) receptor signaling by actin-binding protein (ABP-280). *Mol.Pharmacol.* 57:446-452.
- Li, M., C. Li, P. Weingarten, J.R. Bunzow, D.K. Grandy ja Q.Y. Zhou. 2002. Association of dopamine D(3) receptors with actin-binding protein 280 (ABP-280). *Biochem.Pharmacol.* 63:859-863.
- Lin, R., K. Karpa, N. Kabbani, P. Goldman-Rakic ja R. Levenson. 2001. Dopamine D2 and D3 receptors are linked to the actin cytoskeleton via interaction with filamin A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:5258-5263.
- Liu, G., L. Thomas, R.A. Warren, C.A. Enns, C.C. Cunningham, J.H. Hartwig ja G. Thomas. 1997. Cytoskeletal protein ABP-280 directs the intracellular trafficking of furin and modulates proprotein processing in the endocytic pathway. *J.Cell Biol.* 139:1719-1733.
- Loy, C.J., K.S. Sim ja E.L. Yong. 2003. Filamin-A fragment localizes to the nucleus to regulate androgen receptor and coactivator functions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100:4562-4567.
- Lu, J. ja V. Sheen. 2005. Periventricular heterotopia. *Epilepsy Behav.* 7:143-149.

- Marti, A., Z. Luo, C. Cunningham, Y. Ohta, J. Hartwig, T.P. Stossel, J.M. Kyriakis ja J. Avruch. 1997. Actin-binding protein-280 binds the stress-activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and is required for tumor necrosis factor-alpha activation of SAPK in melanoma cells. *J.Biol.Chem.* 272:2620-2628.
- Méjean, C., M.C. Lebart, M. Boyer, C. Roustan ja Y. Benyamin. 1992. Localization and identification of actin structures involved in the filamin-actin interaction. *Eur.J.Biochem.* 209:555-562.
- Missale, C., S.R. Nash, S.W. Robinson, M. Jaber ja M.G. Caron. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol.Rev.* 78:189-225.
- Moro, F., R. Carrozzo, P. Veggiotti, G. Tortorella, D. Toniolo, A. Volzone ja R. Guerrini. 2002. Familial periventricular heterotopia: missense and distal truncating mutations of the FLN1 gene. *Neurology.* 58:916-921.
- Nadarajah, B. ja J.G. Parnavelas. 2002. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat.Rev.Neurosci.* 3:423-432.
- Nagano, T., S. Morikubo ja M. Sato. 2004. Filamin A and FILIP (Filamin A-Interacting Protein) regulate cell polarity and motility in neocortical subventricular and intermediate zones during radial migration. *J.Neurosci.* 24:9648-9657.
- Nagano, T., T. Yoneda, Y. Hatanaka, C. Kubota, F. Murakami ja M. Sato. 2002. Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat.Cell Biol.* 4:495-501.
- Nakamura, F., J.H. Hartwig, T.P. Stossel ja P.T. Szymanski. 2005. Ca²⁺ and calmodulin regulate the binding of filamin A to actin filaments. *J.Biol.Chem.* 280:32426-32433.
- Nakamura, F., R. Pudas, O. Heikkinen, P. Permi, I. Kilpeläinen, A.D. Munday, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, and J. Yläne. 2006. The structure of the GPIIb-filamin A complex. *Blood.* 107:1925-1932.
- Niederman, R., P.C. Amrein ja J. Hartwig. 1983. Three-dimensional structure of actin filaments and of an actin gel made with actin-binding protein. *J.Cell Biol.* 96:1400-1413.
- Noegel, A.A., S. Rapp, F. Lottspeich, M. Schleicher ja M. Stewart. 1989. The Dictyostelium gelation factor shares a putative actin binding site with alpha-actinins and dystrophin and also has a rod domain containing six 100-residue motifs that appear to have a cross-beta conformation. *J.Cell Biol.* 109:607-618.
- Norwood, F.L., A.J. Sutherland-Smith, N.H. Keep ja J. Kendrick-Jones. 2000. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure.* 8:481-491.
- Nunnally, M.H., J.M. D'Angelo ja S.W. Craig. 1980. Filamin concentration in cleavage furrow and midbody region: frequency of occurrence compared with that of alpha-actinin and myosin. *J.Cell Biol.* 87:219-226.
- Ohta, Y. ja J.H. Hartwig. 1995. Actin filament cross-linking by chicken gizzard filamin is regulated by phosphorylation in vitro. *Biochemistry.* 34:6745-6754.
- Ohta, Y., T.P. Stossel ja J.H. Hartwig. 1991. Ligand-sensitive binding of actin-binding protein to immunoglobulin G Fc receptor I (Fc gamma RI). *Cell.* 67:275-282.
- Ohta, Y., N. Suzuki, S. Nakamura, J.H. Hartwig ja T.P. Stossel. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:2122-2128.
- Ott, I., E.G. Fischer, Y. Miyagi, B.M. Mueller ja W. Ruf. 1998. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J.Cell Biol.* 140:1241-1253.

- Ozanne, D.M., M.E. Brady, S. Cook, L. Gaughan, D.E. Neal ja C.N. Robson. 2000. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin. *Mol.Endocrinol.* 14:1618-1626.
- Pantaloni, D., R. Boujemaa, D. Didry, P. Gounon ja M.F. Carlier. 2000. The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat.Cell Biol.* 2:385-391.
- Pentikäinen, U. ja J. Yläne. 2009. The Regulation Mechanism for the Auto-Inhibition of Binding of Human Filamin A to Integrin. *J.Mol.Biol.* 393:644-657.
- Peutz-Kootstra, C.J., K. Hansen, E. De Heer, C.K. Abrass ja J.A. Bruijn. 2000. Differential expression of laminin chains and anti-laminin autoantibodies in experimental lupus nephritis. *J.Pathol.* 192:404-412.
- Popowicz, G.M., M. Schleicher, A.A. Noegel ja T.A. Holak. 2006. Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends Biochem.Sci.* 31:411-419.
- Poussaint, T.Y., J.W. Fox, W.B. Dobyns, R. Radtke, I.E. Scheffer, S.F. Berkovic, P.D. Barnes, P.R. Huttenlocher ja C.A. Walsh. 2000. Periventricular nodular heterotopia in patients with filamin-1 gene mutations: neuroimaging findings. *Pediatr.Radiol.* 30:748-755.
- Prat, A.G., C.C. Cunningham, G.R. Jackson Jr, S.C. Borkan, Y. Wang, D.A. Ausiello ja H.F. Cantiello. 1999. Actin filament organization is required for proper cAMP-dependent activation of CFTR. *Am.J.Physiol.* 277:C1160-9.
- Pudas, R., T.R. Kiema, P.J. Butler, M. Stewart ja J. Yläne. 2005. Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure.* 13:111-119.
- Robertson, S.P. 2005a. Filamin A: phenotypic diversity. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 15:301-307.
- Robertson, S.P. 2004. Molecular pathology of filamin A: diverse phenotypes, many functions. *Clin.Dysmorphol.* 13:123-131.
- Robertson, S.P., S.R. Twigg, A.J. Sutherland-Smith, V. Biancalana, R.J. Gorlin, D. Horn, S.J. Kenwrick, C.A. Kim, E. Morava, R. Newbury-Ecob, K.H. Orstavik, O.W. Quarrell, C.E. Schwartz, D.J. Shears, M. Suri, J. Kendrick-Jones, A.O. Wilkie ja OPD-spectrum Disorders Clinical Collaborative Group. 2003. Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat.Genet.* 33:487-491.
- Sato, M. ja T. Nagano. 2005. Involvement of filamin A and filamin A-interacting protein (FILIP) in controlling the start and cell shape of radially migrating cortical neurons. *Anat.Sci.Int.* 80:19-29.
- Sells, M.A., U.G. Knaus, S. Bagrodia, D.M. Ambrose, G.M. Bokoch ja J. Chernoff. 1997. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr.Biol.* 7:202-210.
- Seo, M.D., S.H. Seok, H. Im, A.R. Kwon, S.J. Lee, H.R. Kim, Y. Cho, D. Park ja B.J. Lee. 2009. Crystal structure of the dimerization domain of human filamin A. *Proteins.* 75:258-263.
- Shadiack, A.M. ja R.M. Nitkin. 1991. Agrin induces alpha-actinin, filamin, and vinculin to co-localize with AChR clusters on cultured chick myotubes. *J.Neurobiol.* 22:617-628.
- Stahlhut, M. ja B. van Deurs. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol.Biol.Cell.* 11:325-337.
- Stossel, T.P., J. Condeelis, L. Cooley, J.H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher ja S.S. Shapiro. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:138-145.

- Swarzenski, B.C., L. Tang, Y.J. Oh, K.L. O'Malley ja R.D. Todd. 1994. Morphogenic potentials of D2, D3, and D4 dopamine receptors revealed in transfected neuronal cell lines. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:649-653.
- Thompson, T.G., Y.M. Chan, A.A. Hack, M. Brosius, M. Rajala, H.G. Lidov, E.M. McNally, S. Watkins ja L.M. Kunkel. 2000. Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J.Cell Biol.* 148:115-126.
- Tu, Y., S. Wu, X. Shi, K. Chen ja C. Wu. 2003. Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation. *Cell.* 113:37-47.
- Ueda, M., C. Oho, H. Takisawa ja S. Ogihara. 1992. Interaction of the low-molecular-mass, guanine-nucleotide-binding protein with the actin-binding protein and its modulation by the cAMP-dependent protein kinase in bovine platelets. *Eur.J.Biochem.* 203:347-352.
- Uranova, N.A., D.D. Orlovskaya, K. Apel, A.J. Klintsova, U. Haselhorst ja H. Schenk. 1991. Morphometric study of synaptic patterns in the rat caudate nucleus and hippocampus under haloperidol treatment. *Synapse.* 7:253-259.
- Vadlamudi, R.K., F. Li, L. Adam, D. Nguyen, Y. Ohta, T.P. Stossel ja R. Kumar. 2002. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat.Cell Biol.* 4:681-690.
- van der Flier, A. ja A. Sonnenberg. 2001. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1538:99-117.
- van der Ven, P.F., W.M. Obermann, B. Lemke, M. Gautel, K. Weber ja D.O. Furst. 2000. Characterization of muscle filamin isoforms suggests a possible role of gamma-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell Motil.Cytoskeleton.* 45:149-162.
- Vinogradova, O., A. Velyvis, A. Velyviene, B. Hu, T. Haas, E. Plow ja J. Qin. 2002. A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell.* 110:587-597.
- Wang, K. ja S.J. Singer. 1977. Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:2021-2025.
- Wegener, K.L., A.W. Partridge, J. Han, A.R. Pickford, R.C. Liddington, M.H. Ginsberg ja I.D. Campbell. 2007. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell.* 128:171-182.
- Weihing, R.R. 1988. Actin-binding and dimerization domains of HeLa cell filamin. *Biochemistry.* 27:1865-1869.
- Wu, C. 2005. Migfilin and its binding partners: from cell biology to human diseases. *J.Cell.Sci.* 118:659-664.
- Yada, Y., Y. Okano ja Y. Nozawa. 1990. Enhancement of GTP gamma S-binding activity by cAMP-dependent phosphorylation of a filamin-like 250 kDa membrane protein in human platelets. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 172:256-261.
- Yamamoto, T., T. Sato ja H. Sugita. 1987. Antifilamin, antivinculin, and antitropomyosin antibodies in myasthenia gravis. *Neurology.* 37:1329-1333.
- Zhuang, Q.Q., S. Rosenberg, J. Lawrence ja A. Stracher. 1984. Role of actin binding protein phosphorylation in platelet cytoskeleton assembly. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 118:508-513.