



Filamiinin ja pernan tyrosiinikinaasin sitoutuminen sekä vuorovaikutuksen merkitys verihiutaleiden signaloinnissa

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

Susanna Sinisaari-Kaislo

5.5.2013

Alkusanat

Tämä pro gradu -tutkimus tehtiin Jyväskylän yliopistossa Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella solu- ja molekyylibiologian osastolla professori Jari Ylänteen tutkimusryhmässä syksystä 2012 alkutalveen 2013.

Haluan kiittää professori Jari Yläntettä mahdollisuudesta työskennellä ja tehdä tutkimus hänen ryhmässään sekä ohjauksesta tämän projektin aikana.

Kiitoksin haluan muistaa ”Group Yläntettä”, eli Jonne Seppälää, Ritika Sethiä ja laboratoriomestari Arja ”Allu” Mansikkaviitaa, lukemattomasta määrästä neuvoja, ohjeita, opastusta sekä kannustusta ja kaveruutta. Teidän ansiostanne oli välillä haastavakin tie kevyt kulkea!

Kiitokset kuuluvat myös omalle perheelle, vanhemmille, papalle sekä muille läheisille ja ystäville tuesta koko opintomatalla.

Tästä on hyvä jatkaa matkaa kohti tulevaa mielessä Ellen Johnson Sirleafin sanat ”If your dreams do not scare you, they are not big enough”.

Susanna Sinisaari-Kaislo

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Tekijä: Susanna Sinisaari-Kaislo

Tutkielman nimi: Filamiinin ja pernan tyrosiinikinaasin sitoutuminen sekä vuorovaikutuksen merkitys verihiutaleissa

English title: Binding and Interactions between Filamin A and Spleen Tyrosine Kinase in Platelets

Päivämäärä: 5.5.2013

Sivumäärä: 27+1

Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Oppiaine: Solu- ja molekyylibiologia

Tutkielman ohjaaja(t): professori Jari Yläne, FT

Tiivistelmä:

Hyytymän muodostuminen tapahtuu verisuoneen kohdistuneen vaurion seurauksena verenvuodon tyrehtyttämiseksi. Hyytymä voi muodostua myös verisuonen pinnalle silloinkin kun verenvuotoa ei esiinny. Irrotessaan verenvuodon mukaan hyytymä voi olla hengenvaarallinen. Erilaiset hyytymän muodostamat veritulpat ovat merkittävä kuolinsyy vuosittain.

Verihiutaleet ovat keskeinen tekijä tässä tapahtumassa. Niiden aktivaatio tapahtuu kalvoreseptoreiden ja solun sisäisen signaloinnin monimutkaisesta vuorovaikutuksesta. Tämän tutkimuksen kohteina ovat pernan tyrosiinikinaasi ja filamiini A, joiden välinen vuorovaikutus on tärkeää verihiutaleiden toiminnalle. Verihiutaleet, joissa tämä vuorovaikutus on häiriintynyt, ovat morfologisesti epänormaaleja eivätkä toimi normaalilla tavalla hyytymän muodostumisessa.

Pernan tyrosiinikinaasi, Syk (engl. *spleen tyrosine kinase*) on ei-reseptorityyppinen solun signalointiin liittyvä proteiini. Se esiintyy solussa sekä solulimassa että tumassa. Syk on osallisena monissa solun fysiologisissa tapahtumissa, esimerkiksi morfogeneesissä, solun kasvussa, migraatiossa ja solun tukirangan uudelleen järjestäytymisessä.

Filamiini on kookas solutukirangan proteiini. Filamiinin tiedetään vuorovaikuttavan useiden muiden proteiinien kanssa monissa eri rooleissa. Se liittyy solussa aktiivisäikeitä verkostoksi, se ankkuroi kalvoproteiineja solun tukirankaan ja toimii solussa sekä signaalivälitysproteiinien telineenä että mekaanisena tukena.

Tässä työssä tutkittiin filamiini A:n ja Syk:n sitoutumista ja sen affiniteettia. Erityisenä kysymyksenä oli selvittää, vaikuttaako filamiinin neljännen immunoglobuliinin kaltaisen domeenin läheinen vuorovaikutus viidennen domeenin kanssa Syk:n sitoutumiseen viidennen domeeniin. Alustavissa kokeissa havaittiin Syk:n sitoutuminen viidennen domeeniin eikä neljännellä domeenilla havaittu olevan vaikutusta sitoutumiseen. Hankaluudet Syk:n tuottamisessa *E.coli*-bakteerisoluisissa rajoittivat tutkimusta. Kun Syk:n tuotto-ongelmat saadaan ratkaistua, voidaan suorittaa jatkotutkimuksia sitoutumisen mekanismista.

Avainsanat: Syk, filamiini

Author: Susanna Sinisaari-Kaislo

Title of thesis: Binding and Interactions between Filamin A and Spleen Tyrosine Kinase in Platelets

Finnish title: Filamiinin ja pernan tyrosiinikinaasin sitoutuminen sekä vuorovaikutuksen merkitys verihiutaleissa

Date: 5.5.2013

Pages: 27+1

Department: Department of Biological and Environmental Science

Chair: Cell and Molecular Biology

Supervisor(s): Professor Jari Yläne, PhD

Abstract:

Platelet thrombi are essential to stop bleeding. While thrombi are formed occasionally without the need to stop bleeding, a loose clot in the circulation may cause morbidity and mortality. Activation of platelets is a complicated process including an interplay of cell surface receptors and intracellular signalling networks. Spleen tyrosine kinase and the acting binding protein filamin are a part of this process.

Spleen tyrosine kinase (Syk) is a cytosolic non-receptor tyrosine kinase, which is highly expressed in haematopoietic cells. Syk is known to have a crucial role in signalling. It plays some role in cellular functions like morphogenesis, cell growth, migration and cytoskeletal reorganization.

Filamin is part of a family of three proteins that are products of distinct genes. They are large actin cross-linking proteins, but they are also known to interact with a wide variety of binding partners. Filamin serves as an integrator of cell mechanics and signalling.

The aim of the study was to confirm the binding between filamin and Syk and to determine the affinity of the binding. The special interest was to observe whether the filamin domain 4 has an effect on binding between filamin domain 5 and Syk, because a structure analysis has revealed that there is a novel type of domain-domain interaction in the structure of domain pair 4-5.

Initial binding assay studies indicated a binding between filamin domain 5 and Syk. Filamin domain 4 had no apparent effect on the binding. For future studies it is at first necessary to resolve the challenges with the expression and purification of Syk. After that, more binding assay studies can be executed in order to determine the affinity of the binding.

Keywords: spleen tyrosine kinase, filamin

Sisällysluettelo

Alkusanat	2
Lyhenteet	6
1. Johdanto.....	7
2. Tutkimuksen tarkoitus	14
3. Materiaali ja menetelmät	15
3.1. Kloonaus ja Syk-kinaasidomeenin tuottaminen ja käsittely.....	15
3.2. Filamiinidomeenien tuottaminen ja puhdistaminen	16
3.3. Sitoutumiskokeet	17
3.3.1 Filamiinidomeenien ja Syk:n sitoutuminen pintaplasmoniresonanssimittauksella	17
3.3.2. Sitoutumiskokeet glutationiaffiniteetikromatografialla.....	18
4. Tulokset	18
4.1. Filamiinidomeenien ja Syk:n sitoutuminen pintaplasmoni- resonanssimittauksella	18
4.2. Syk-kinaasidomeenin kloonaus, tuottaminen ja sitoutumiskokeet.....	20
5. Tulosten tarkastelu.....	21

Liite

Lyhenteet

FLNA	filamiini A
FLNA4	filamiini A:n domeeni 4
FLNA5	filamiini A:n domeeni 5
FLNA4-5	filamiini A:n domeenipari 4-5
GST	glutathioni-S-transferaasi, engl. <i>glutathione-S-transferase</i>
ITAM	tyrosiiniperusteinen immunoreseptorin aktivointimotiivi, engl. <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi, engl. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PCR	polymeraasiketjureaktio, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
SDS	natriumdodekyylisulfaatti, engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SPR	pintaplasmoniresonanssi, engl. <i>surface plasmon resonance</i>
Syk	pernan tyrosiinikinaasi, engl. <i>spleen tyrosine kinase</i>
VWD	von Willebrandin tauti, engl. <i>von Willebrand disease</i>
VWF	von Willebrandin tekijä, engl. <i>von Willebrand factor</i>

1. Johdanto

Trombin eli verihyytymän muodostuminen verisuonen rikkoonnuttua on keskeinen osa hemostaasia eli elimistön reaktiota verenvuotoon. Trombin tarkoituksena on tyrehdyttää verenvuoto muodostamalla hyytymä tukkeeksi. Trombi saattaa syntyä silloinkin, kun verisuonen pinta on vaurioitunut ilman ulkoista verenvuotoa (ks. yleiskatsaus Ruggeri 1997 ja 2009, yleiskatsaus Andrews ja Berndt, 2004). Tällöin syntynyt trombi on turha ja jopa henkeä uhkaava, etenkin jos trombi irtoaa ja lähtee kulkemaan verenkierron mukana (ks. yleiskatsaus Ruggeri 1997). Trombin muodostuminen aiheutuu monimutkaisesta ja tarkoin säädellystä tapahtumasarjasta, jossa yhtenä päätekijöistä esiintyvät verihiutaleet.

Verihiutaleet ovat solukalvon ympäröimiä tumattomia kiekonmallisia solunkappaleita. Verihiutaleet syntyvät luuytimessä syntyneistä megakaryosyyteistä (ks. yleiskatsaus Schulze ja Shivdasani, 2005). Ne sisältävät erilaisia jyväsiä, soluelimiä ja solutukirakenteita (ks. yleiskatsaus Huebsch ja Harker ym., 1981). Verihiutaleiden ulkokalvolla esiintyy erilaisia glykoproteiinireseptoreita. Verihiutaleiden elinkierto kestää noin kymmenen päivää, jolloin ne kiertävät irtonaisina kappaleina verenkierron mukana. Verihiutaleet tuhotaan pääosin pernassa, jos ne eivät tule sitä ennen aktivoituiksi (Nienstedt ym., 1989). Verihiutaleiden aktivointi tapahtuu verisuonen vaurioitumisen seurauksena paljastuneiden rakenteiden erittämien molekyylien vaikutuksesta (ks. yleiskatsaus Huebsch ja Harker ym., 1981 ja yleiskatsaus Ruggeri, 2009). Aktivoinnin seurauksena ne tarttuvat vaurioituneeseen pintaan ja toisiinsa (ks. yleiskatsaus Huebsch ja Harker, 1981 ja yleiskatsaus Ruggeri, 2009). Yksi verihiutaleiden aktivoijista on von Willebrand -tekijä (VWF, engl. *von Willebrand factor*) (Asazuma ym., 1997). Verihiutaleiden aktivoinnin ja aggregaation kanssa samanaikaisesti käynnistyy myös veren hyytymisjärjestelmän signalointisarja, minkä seurauksena muodostuu fibrinogeenistä fibriiniverkkoa verenvuotoa tukkimaan (Nienstedt ym., 1989).

Von Willebrand -tekijä (VWF) on veren plasmassa, verisuonten pinnassa ja verihiutaleissa esiintyvä glykoproteiini (ks. yleiskatsaus Huebsch ja Harker, 1981, Nilsson ym., 1979), jota syntetisoidaan endoteelisoluisissa ja megakaryosyyteissa (ks. yleiskatsaus Ruggeri 1997, yleiskatsaus Ruggeri ja Ware, 1993). Monimutkaisessa solusisäisessä tapahtumasarjassa VWF:stä katkaistaan signaalipeptidi, mikä johtaa ensimmäiseen VWF:n dimerisaatioon (ks.

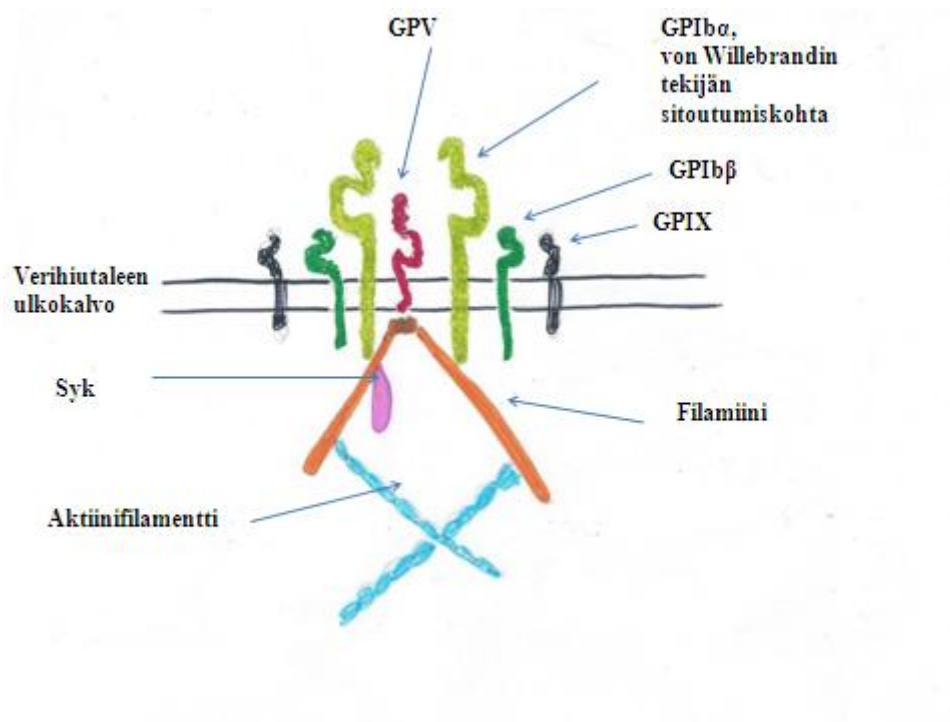
yleiskatsaus Ruggeri, 1997). Dimeerit muodostavat erikokoisia VWF-oligomeerejä varastoitaviksi tai veren plasman mukana kiertämään (ks. yleiskatsaus Ruggeri 1997, yleiskatsaus Ruggeri ja Ware, 1993). Tämänkaltaisen rakenteen monimuotoisuus on hyödyllinen, koska silloin VWF-molekyylissä on monia sitoutumiskohtia sekä verihiutaleiden reseptoreille että endoteelisolujen rakenteille (ks. yleiskatsaus Ruggeri 2009, ks. yleiskatsaus Kadir ym., 2012). Plasman VWF on tärkeä ensitoimija trombin muodostumisessa, koska endoteelisoluissa on erilaisia määriä VWF:ää ja verihiutaleista VWF erittyy vasta aktivoinnin jälkeen (ks. yleiskatsaus Ruggeri 1997).

von Willebrandin tekijän fysiologinen merkitys havaitaan ihmisillä, joilla on VWF:ää määrällisesti liian vähän tai se on laadullisesti puutteellista (ks. yleiskatsaus Franchini ym., 2007). Von Willebrand -tauti (VWD, engl. *von Willebrand disease*) on yleisin perinnöllisistä verenvuotosairauksista (ks. yleiskatsaus Kadir ym., 2012). Se periytyy väistyvästi ja on sukupuolesta riippumaton sairaus (ks. yleiskatsaus Kadir ym., 2012). VWD:tä sairastavalla esiintyy eritasoisia ongelmia verenvuodon hyytymisessä (ks. yleiskatsaus Franchini ym., 2007). VWD jaetaan kolmeen luokkaan 1, 2 ja 3 (ks. yleiskatsaus Kadir ym., 2012). Luokissa 1 ja 3 ongelmana on VWF:n osittainen tai täydellinen puutos ja luokassa 2 sen laadullinen heikkous (ks. yleiskatsaus Kadir ym., 2012). VWD potilaita hoidetaan akuuteissa tilanteissa joko antamalla VWF:ää sisältävää verivalmistetta tai desmopressiini-hormonilla, mikä vapauttaa kudosten omaa VWF:ää (ks. yleiskatsaus Franchini ym., 2007). Koska VWF toimii myös hyytymistekijän VIII:n kantajaproteiinina, sen puutos vaikuttaa myös muutoin kuin verihiutaleiden kautta hyytymismekanismin toimintaan (ks. yleiskatsaus Ruggeri ja Ware, 1993).

Verisuonen vaurioitumisen seurauksena paljastuneeseen kollageeniin tarttuu multimeerinen VWF kytkien verihiutaleita itseensä ja samalla aktivoiden niitä (ks. yleiskatsaus Ruggeri 1997). Aktivoidut verihiutaleet tarttuvat toisiinsa, jolloin syntyy verihiutaleaggregaatteja (Ruggeri ym., 2006, yleiskatsaus Huebsch ja Harker, 1981). VWF:n ja verihiutaleen pinnan glykoproteiinireseptorin sitoutuminen on nopeaa (ks. yleiskatsaus Ruggeri 1997). Verihiutaleaggregaatit myös irtaantuvat nopeasti VWF:stä (Ruggeri ym., 2006). Ne pyöriävät VWF:n pinnalla sitoutuen aina uuteen kohtaan VWF:ää, kunnes aktivoinnin edistyessä sitoutuvat myös verihiutaleen pinnan toissijaiseen glykoproteiinireseptoriin (integriini α IIb β 3) (Ruggeri ym., 2006). Voimakkaan verenvirtauksen aiheuttama paine edesauttaa vetolujuuden

syntymistä sekä VWF:ssä että verihiutaleissa, joissa tapahtuu sitoutumisen myötä konformaatiomuutos (Razdan ym., 1994).

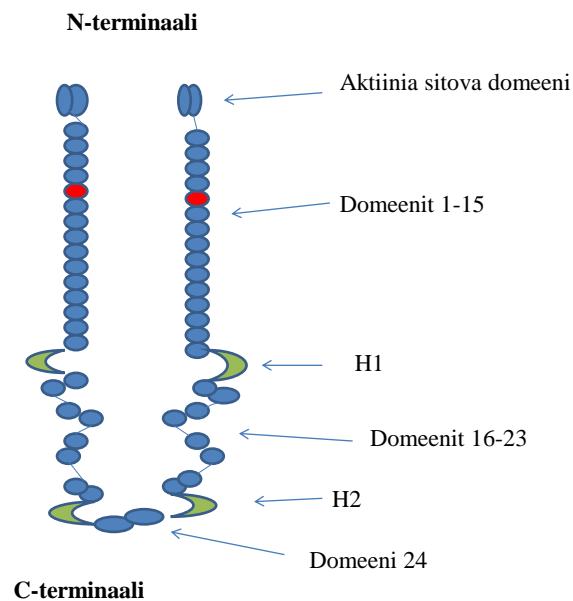
Verihiutaleiden sitoutuminen VWF:ään tapahtuu ensisijaisesti niiden pinnan glykoproteiinireseptorin GPIIb/IIIa-V kautta. Tämä reseptori koostuu neljästä erilaisesta verihiutaleen ulkokalvon läpäisevästä glykoproteiiniyksiköstä, jotka ovat GPIIb α ja β , GPIIb ja GPIIc (kuva 1) (Nakamura ym., 2006, Cranmer ym., 2005). Reseptorikompleksi on kiinnittynyt useisiin verihiutaleiden sisäpuolisiin proteiineihin ja näiden välityksellä aktiivisiksi (Okita ym., 1985). VWF:n ja verihiutaleiden sitoutuminen saa aikaan useiden reseptorikompleksien kasautumisen (Meyer ym., 1997). Näin kompleksiin liittyvät signaalintyrosiinit aktivoivat toisiaan ja aloittavat verihiutaleita aktivoivan tapahtumasarjan (Feng ym., 2003). Aktivaatiossa tapahtuu monia vaiheita mm. verihiutaleiden fibrinogeenireseptorit aktivoituvat ja niiden solutukiranka muuttuu. Aktivoituneet verihiutaleet muuttuvat pienistä kiekkomaisista monihaaraisiksi laajan tarttumapinnan omaaviksi rakenteiksi (ks. yleiskatselmus Andrews ja Berndt, 2004). Lisäksi niiden sisältämät rakkulat alkavat erittää ympäristöön (ks. yleiskatselmus Andrews ja Berndt, 2004, Huebsch ja Harker, 1981). Tässä tutkimuksessa keskitytään etenkin kahteen reseptorikompleksin kasautumaan ja signaalinvälitykseen liittyvään proteiiniin: filamiini A:han (FLNA) ja pernan tyrosiinikinaasiin (Syk, engl. *spleen tyrosine kinase*).



Kuva 1 Verihiutaleiden GPIIb-IX-V -reseptorikompleksi ja siihen liittyneet FLNA, Syk ja aktiinisäikeet. Von Willebrandin tekijän sitoutumiskohta on reseptorissa GPIIb. GPIIb α -yksiköt ovat väriltään vaaleanvihreitä. Tummanvihreän värisiä ovat GPIIb β -yksiköt. Reseptorin GPIIX-yksiköt ovat väriltään mustia. GPV-yksikkö on väriltään punainen. Verihiutaleen soluliman puolella FLNA:han sitoutunut Syk on väriltään vaaleanpunainen ja FLNA esitetään oranssina. Aktiinisäikeet ovat turkooseja. Kuva on piirretty käyttäen mallina artikkelin Kobsar ja Eigenthaler (2006) kuvaa

Filamiini on solutukirangan proteiini, joka järjestää aktiinisäikeitä verkostoiksi (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Sen tiedetään vuorovaikuttavan yli 30 erilaisen proteiinin kanssa monenlaisissa rooleissa (ks. yleiskatsaus Feng ja Walsh, 2004). Filamiini ankkuroi kalvoreseptoreita aktiinisäikeisiin, se toimii signalointireiteillä ko-lokalisaatiotekijänä ja on mekaanisena elementtinä solutukirangassa (ks. yleiskatsaus Popowicz ym., 2006). Ihmisillä on kolme filamiinigeeniä, jotka koodittavat filamiinejä A, B ja C: FLNA, FLNB ja FLNC (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Rakenteeltaan filamiinit ovat dimeerejä. Ne rakentuvat kahdesta peptidiketjusta, joissa kummassakin on aktiinia sitova domeeni ja 24 immunoglobuliinin kaltaista domeenia (kuva 2) (ks. yleiskatsaus Feng ja Walsh, 2004). Domeenien 15–16 ja 23–24 väleihin sijoittuvat joustavat saranakohdat (H1 ja H2) (ks. yleiskatsaus van der Flier ja Sonnenberg, 2001). Filamiini vuorovaikuttaa pääsääntöisesti isojen reseptorien kaltaisten proteiinien kanssa domeenien 16–24 välityksellä ja pienten signalointireittien proteiinien kanssa domeenien 1-15 välityksellä (ks. yleiskatsaus Stossel ym., 2001). Immunoglobuliinin kaltaiset domeenit koostuvat seitsemästä β -säierakenteesta (A-G) (ks. yleiskatsaus Nakamura ym., 2011). Filamiini toimii mekanosensorina reagoitten mekaanisiin ärsykkeisiin konformaatiomuutoksin

(ks. yleiskatsaus Razinia ym., 2012). Konformaatiomuutoksen seurauksena paljastuu ligandien sitoutumispaikkoja (ks. yleiskatsaus Razinia ym., 2012, Rognoni ym., 2012, Ehrlicher ym., 2011). Voimakkaita mekaanisia voimia kohdistuu filamiinin ja verihiutaleiden tarttumisreseptoreiden vuorovaikutuksessa erityisesti valtimoissa ja kapillaareissa (Du, 2007).



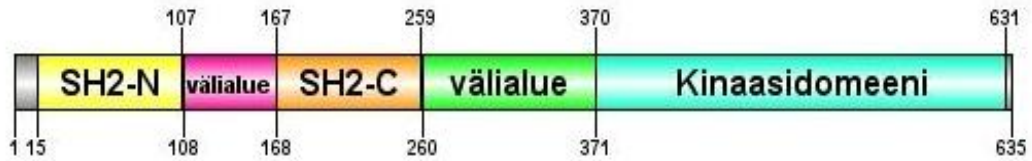
Kuva 2 Filamiinin rakenne Kuvassa on esitetty filamiinidimeerin rakenne. Aminopäässä (N-terminaali) sijaitsee aktiinia sitova domeeni. Seuraavaksi ovat domeenit 1-15. Kuvassa on punaisella väritetty Syk:n sitoutumiskohta domeeni 5. Sarana-alueet H1 ja H2 ovat joustavia. Niiden välissä ovat domeenit 16- 23. Filamiinidimeerin muodostuminen tapahtuu domeenien 24 avulla karboksyylipäässä (C-terminaali). Kuva on piirretty käyttäen esikuvana artikkelin Pudas ym., 2005 kuvaa.

Verihiutaleiden morfologialle ja niiden osallistumiselle normaaliin hyytymän muodostumiseen on erittäin tärkeää FLNA:n ja GPIb-IX-V -reseptorikompleksin vuorovaikutus (Cranmer ym., 2005). Vuorovaikutus säätelee positiivisesti VWF-reseptorin toimintaa (ks. yleiskatsaus Falet, 2012). FLNA:n domeeni 17 sitoutuu tiukasti reseptorikompleksin GPIb α -yksikön soluliman puoleisen osan kanssa ja edelleen FLNA:n välityksellä solutukirangan aktiinisäikeisiin (Nakamura ym., 2006, 2007, yleiskatsaus Nakamura ym., 2011). Tämä vuorovaikutus toimii niin lepotilassa olevilla kuin aktivoituissa verihiutaleissakin (ks. yleiskatsaus Nakamura ym., 2011). GPIb–FLNA -vuorovaikutuksen toimimattomuus, johtuu se sitten erilaisista mutaatioista GPIb:n soluliman puoleisessa hännässä tai FLNA:ssa, aiheuttaa häiriöitä verihiutaleiden toiminnassa. Verihiutaleiden toimintahäiriöt esiintyvät joko veren hyytymisen häiriöinä eli pidentyneinä verenvuotoaikoina

tai sitten kohonneena riskinä muodostua aiheettomia trombeja (ks. yleiskatsaukset Andrews ja Berndt, 2004 sekä Nakamura ym., 2011).

Pernan tyrosiinikinaasi (Syk engl. *spleen tyrosine kinase*) on ei-reseptorityyppinen proteiinikinaasi, joka kuuluu Src-perheen kinaaseihin (ks. yleiskatsaus Sada ym., 2001). Syk on nimetty pernan tyrosiinikinaasiksi, koska ensimmäiseksi se saatiin eristettyä pernasta ja verihiutaleista (ks. yleiskatsaus Sada ym., 2001). Syk koostuu kahdesta Src-kinaasityypin 2 kaltaisesta (SH2, engl. *Src homology 2*) -domeenista sekä katalyyttisesti aktiivisesta kinaasidomeenista. SH2-domeenien ja kinaasidomeenin välissä on kaksi rakenteellisesti joustavaa välialuetta (kuva 2) (Atwell ym., 2004 ja yleiskatsaus Sada ym., 2001). Syk on signaalointiproteiini, joka toimii signaalikytkimen tapaan (ks. yleiskatsaus Lowell, 2011). Sitä tavataan erilaisten solujen solulimassa, mutta myös tumassa. Syk on osallisena signaalointireiteillä, fysiologisissa rooleissa esimerkiksi solutukirangan uudelleenjärjestäytymisessä (ks. yleiskatsaus Sada ym., 2001, Fargier ym., 2013).

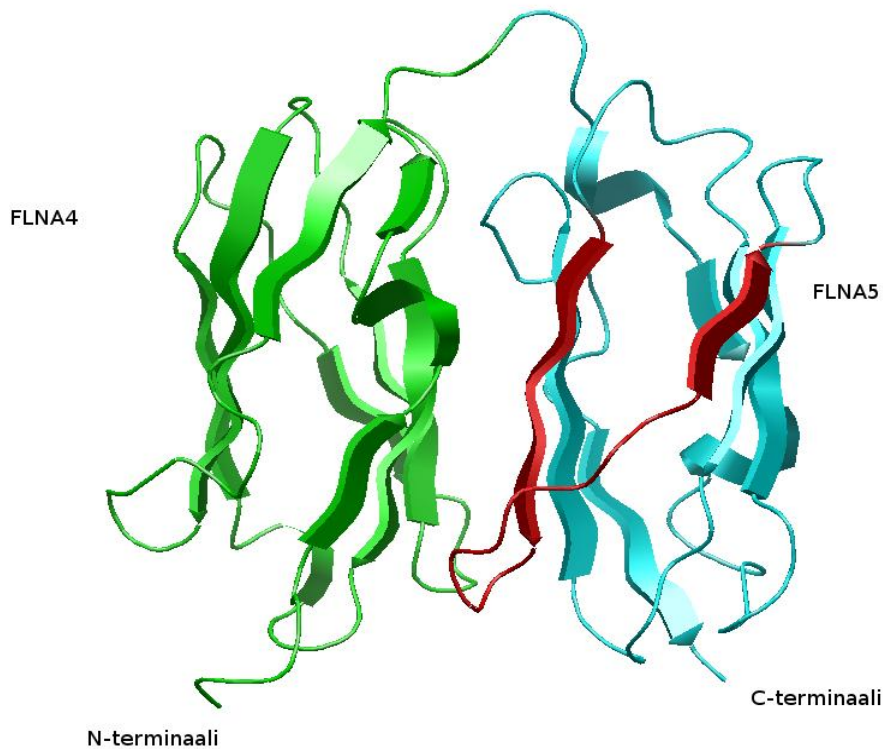
Syk:n aktivointi tapahtuu sen SH2 domeenien sitoutumisella joko difosforyloituihin tyrosiiniperusteisten immunoreseptoreiden aktivointimotiivisekvensseihin (ITAM engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) tai niiden suoralla tyrosiinifosforylaatiolla (Grädler ym., 2012, yleiskatsaus Lowell ym., 2011, yleiskatsaus Sada ym., 2001). Syk:n sitoutuminen ITAM-reseptoriin aiheuttaa konformaatiomuutoksia paljastaen fosforylaatiokohtia (Grädler ym., 2012). Syk:n lopullinen aktivaatio tapahtuu joko muiden Src-kinaasien toimesta tai Syk:n itsensä toimesta autofosforylaatiolla (Grädler ym., yleiskatsaus Bradshaw, 2007). Aktivoiduttuaan Syk voi heti vuorovaikuttaa erilaisten signaalintimolekyylien kanssa (ks. yleiskatsaus Zarbock ja Ley, 2011). Farmakologisesti Syk:n toimintaa voidaan inhiboida erilaisilla tyrosiinikinaasi-inhibiittoreilla, jotka sitoutuvat kinaasidomeenin ATP:tä sitovaan kohtaan. Esimerkiksi Abl-kinaasin inhibiittoriksi kehitetty syöpälääke Gleevec inhiboi Syk-kinaasia (Grädler ym., 2012).



Kuva 3 Kokopitkän Syk-proteiinin rakenne SH2-N (keltainen) ja SH2-C (oranssi) ovat Src- kinaasin kaltaisia domeeneja. Ensimmäinen välialue sijaitsee SH-domeenien välissä (fuksianpunainen). Karboksyylipään välialue on yhdistävä alue (vihreä) ennen katalyyttisesti aktiivista kinaasidomeenia (turkoosi). Syk-domeenien rajat ovat UniProt. Knowledgebase (P43405) -tiedostosta ja rakenne on tehty käyttäen Domain Graph version 2 -ohjelmaa (Ren ym., 2009).

Verihiutaleissa filamiinin ja Syk:n vuorovaikutus säätelee ITAM- motiivien välityksellä esimerkiksi Fc-reseptoreiden toimintaa (Poole ym., 1997). VWF:n sitoutuminen GPIb-IX -reseptoriin aiheuttaa ITAM-reseptoreiden tyrosiinien fosforylaation (ks. yleiskatsaus Du, 2007). FLNA:n domeeni 5 (FLNA5) sitoo Syk:n lähelle verihiutaleiden ulkokalvoa samaan kompleksiin glykoproteiinireseptorin ja VWF:n kanssa (Falet ym., 2010). Verihiutaleissa, joista puuttuu FLNA, esiintyy sekä morfologisia muutoksia että vaikeita toiminnallisia puutoksia (Falet ym., 2010). Nämä muutokset näkyvät GPIb-IX -kompleksin toiminnassa ja myös verihiutaleiden kyvyssä reagoida G-proteiinivälitteisiin signaaleihin (esimerkiksi trombiiniin), GPVI-reseptorivälitteisiin signaaleihin sekä Fc- reseptorisignaaleihin (Falet ym., 2010, yleiskatsaus Mocsai ym., 2010, yleiskatsaus Sada ym., 2001). Tarkkaa mekanismia, miten Syk-kinaasi näihin liittyy, ei tiedetä. Kaikissa reiteissä kuitenkin tarvitaan tyrosiinifosforylointia (Falet ym., 2010). Tästä syystä filamiinin ja Syk:n vuorovaikutuksen tutkiminen on mielenkiintoista.

Tutkimusryhmässämme on äskettäin saatu uutta tietoa filamiinin Syk:a sitovan domeeni 5:n rakenteesta. On todettu, että domeeni 5 muodostaa tiukan vuorovaikutuksen domeeni 4:n kanssa (kuva 4) (Sethi ja Yläne, julkaisematon tulos, Proteiinitietokanta (Pdb, engl. *Protein Data Bank*) rakenne 3V80). Tämän domeeniparin rakenne poikkeaa aikaisemmin karakterisoiduista domeenipareista, jotka ovat mekaanisesti säädeltyjä (Rognoni ym., 2012, ks. yleiskatsaus Razinia ym., 2012). Mielenkiintoista rakenteessa on, että domeeni 5:n C ja D β -säikeiden muodostama pinta on osittain suljetussa konformaatioissa (kuva 4), mikä saattaa estää samankaltaisen sitoutumisen kuin muissa filamiinidomeeneissa on havaittu (Kiema ym., 2006, yleiskatsaus Popowicz ym., 2006, yleiskatsaus Nakamura ym., 2011, Rognoni ym., 2012).



Kuva 4 Filamiinin 4-5 -domeenikompleksin rakenne Kuvassa on pallomainen FLN4-5 -domeenikompleksi. Vihreällä on väritetty filamiinin domeeni 4 ja sinisellä domeeni 5. Punaisella on merkitty domeeni 5:n CD β -säikeet, jotka yleensä toimivat ligandiproteiinien sitoutumiskohtina filamiinin domeeneissa. Kuva on tehty käyttäen Bodil-4653 -ohjelmaa. Rakenne on Ritika Sethin julkaisematon tulos (Protein Data Bank, Pdb, rakenne 3V80).

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tämän pro gradu tutkielman tarkoituksena oli todetaan filamiinin immunoglobuliinin kaltaisen domeeni viiden ja verihiutaleiden Syk:n sitoutuminen toisiinsa. Erityisenä mielenkiintona oli selvittää vaikuttaako filamiinin immunoglobuliinin kaltaisen neljännen domeenin läheinen vuorovaikutus viidennen domeenin kanssa Syk:n sitoutumiseen viidenteen domeeniin. Lisäksi tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää filamiinin ja Syk:n sitoutumisen affiniteettia. Edellä mainittuja tutkimuksen kohteita varten tarkoituksena oli tuottaa Syk-proteiinia *E.coli*- bakteereissa glutationi-S- transferaasi (GST, engl. *glutathione-S-transferase*) fuusioproteiininä ja puhdistaa sitä affiniteettikromatografian avulla.

3. Materiaali ja menetelmät

3.1. Kloonaus ja Syk-kinaasidomeenin tuottaminen ja käsittely

Syk-cDNA (tuotenumero RC200413 Origene Technologies Inc. Rockville, Maryland, Yhdysvallat) transformoitiin XL10 Gold -ultrakompetentteihin *E. coli* -soluihin (Agilent Technologies Laurel, Maryland, Yhdysvallat). Plasmidi eristettiin bakteerikasvustosta, puhdistettiin kahdesti käyttäen Qiaquick Plasmid DNA purification ja PCR purification -sarjoja (Qiagen Sciences Inc. Germantown, Maryland, Yhdysvallat). Puhdistettu plasmidi toimi templaattina kun Syk-kinaasidomeeni (aminohapposekvenssit 356–635) monistettiin käyttäen polymeerasiketjureaktio (PCR) -menetelmää. Alukkeina olivat: SYK_KD_LIC_fw (TACTTCCAATCCATGGAGGAGATCAGGCCCAAG) ja SYK_KD_LIC_rv (TATCCACCTTTACTGTTAGTTCACCACGTCATAGTAGTAATTGCG) (Oligomer Oy, Helsinki, Suomi).

Monistettu Syk-kinaasidomeeni-insertti liitettiin pGTvL-1 -vektoriin (Structural Genomics Consortium; Oxford, Iso-Britannia) ligaatiosta riippumattomalla kloonaustekniikalla (LIC engl. *ligation independent cloning*) (Savitsky ym., 2010). Käytetyssä vektorissa mukana saatiin glutationi-S-transferaasi-osa (GST, engl. *glutathione-S-transferase*) ja tupakan ruostevirus proteaasin katkaisukohta. Kaikissa tällä vektorilla tuotetuissa proteiineissa on aminopäässä proteaasikatkaisun jälkeen aminohapposekvenssi SM. Plasmidit transformoitiin One Shot TOP10 -kompetentteihin *E. coli* -soluihin (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat) ja maljattiin Luria-Bertani (LB) -maljoille, jotka sisälsivät 100 µg/ml ampisilliinia (Applichem Omaha, Nebraska, Yhdysvallat) ja 5 % sakkaroosia. Maljoilta valittiin muutama pesäke ja niille tehtiin pesäke-PCR, jolla varmistettiin, että plasmidi sisältää halutun insertin. Plasmidi puhdistettiin kahdesti käyttäen Qiaquick Plasmid DNA purification ja PCR purification -sarjoja, DNA:n pitoisuus määritettiin Nano Drop® -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Yhdysvallat). Plasmidi sekvensointiin käyttäen 5' ja 3' pGEX -alukkeita (Sigma Genosys, Spring, Teksas, Yhdysvallat). Sekvensointi suoritettiin ABI DNA 3130X Sequencer -laitteella (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, Yhdysvallat). Syk-kinaasidomeenin sekvenssitarkistus tehtiin kohdennusalgoritmin (BLAST engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) avulla.

Vertailuun käytettiin ihmisen Syk mRNA:n sekvenssiä (Human spleen tyrosine kinase (SYK) transcript variant 1, mRNA NM_003177.5).

Syk-kinaasidomeeninproteiinia tuotettiin BL21 Gold *E.coli* -soluissa, jotka oli tehty kompetenteiksi Inoue-menetelmällä (Sambrook ja Russel, 2001). Bakteerien nestekasvatus tapahtui LB-kasvatusalustassa, jossa oli 100 µg/ml ampicilliinia. Bakteerikasvusto indusoitiin tuottamaan Syk-kinaasidomeenia lisäämällä isopropyli-beta-D-tiogalaktopyranosidia (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) (IPTG engl. *isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside*) loppupitoisuuteen 0,4 mM. Tuotto suoritettiin + 37 °C kahden tunnin ajan. Bakteerikasvusto sentrifugoitiin 15 minuuttia 6400 x g + 4 °C Sorvall RC 6+ -sentrifugilla F9S-4X1000Y15 -roottorilla (Thermo Fisher Scientific). Solupelletti liuotettiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (PBS, engl. *Phosphate buffered saline*; 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3) 4 ml solupellettigrammaa kohden.

Solut hajotettiin French Press -laitteella (Thermo Electron Corporation Needham Heights, Massachusetts, Yhdysvallat) 2 kPa:n paineessa. Solulysaattiin lisättiin 2 % Triton X-100 (Fluka Chemical Corporation, Milwaukee, Wisconsin, Yhdysvallat) sekä proteaasi-inhibiittori (mini-EDTA free protease inhibitor cocktail, Roche Applied Science, Penzberg, Saksa). Soluliuos sentrifugoitiin sakan erottamiseksi supernatantista 45000 x g 30 min + 4 °C Sorvall RC 6+ -sentrifugilla F21S-8X50Y -roottorilla.

3.2. Filamiinidomeenien tuottaminen ja puhdistaminen

Filamiinidomeenien tuottamiseen tarvittavat plasmidit (pGTvL-1-FLNA4 ja pGTvL-1-FLNA5) transformoitiin BL21 Gold *E.coli* -soluihin. Domeenien aminohapporajat ovat: FLNA4 aminohapot 566- 658 ja FLNA5 aminohapot 662- 758 (ks. yleiskatselmus Van der Flier ym., 2001). Plasmidit antoi käyttöön tohtorikoulutettava Jonne Seppälä (Jyväskylän Yliopisto).

Filamiinidomeenien tuottaminen ja jatkokäsittely tapahtuivat samoin kuin Syk-kinaasidomeenilla, poikkeuksena ainoastaan tuottoaika. Filamiinidomeenien tuottoaika oli 4 tuntia + 37 °C -asteessa. Filamiinidomeenit puhdistettiin ensin affiniteetikromatografian avulla. GST-osan omaavat filamiiniproteiinit sidottiin Protino-glutathioniagarosiin 4B. Tämä vaihe tehtiin Econo-pylväässä (Bio-Rad Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat). Filamiinidomeenista katkaistiin GST-osa tupakan ruostevirus proteaasin avulla, mitä lisättiin

1 ml ($c = 1$ mg/ml) Econo-pylvääseen. Proteolyyttinen katkaisu tapahtui $+ 21$ °C noin 16 tunnin ajan. Pylväästä uutettiin PBS:llä filamiinidomeeni ulos. Uutettujen näytteiden absorbanssi mitattiin Nano Drop -spektrofotometrillä. Filamiinidomeenien puhdistuksen seuraava vaihe tapahtui geelisuodatuksena Äkta Prime -laitteella Superdex 26/60 -pylväällä (GE Healthcare Waukesha, Wisconsin, Yhdysvallat). Geelisuodatuspuskurina käytettiin 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5 ja 1 mM ditiotreitoliä (DTT). Puhdistetut filamiinidomeenit konsentroititiin (Amicon Millipore 10K concentration tube, Millipore corporation, Billerica, Massachusetts, Yhdysvallat), jäähdytettiin nestetyypellä ja säilytettiin pakastimessa ($- 80$ °C).

Filamiinidomeenipari 4-5 (aminohapot 566- 758) oli tuotettu ja puhdistettu kuten edellä kerrottiin. Näytteet antoi käyttöön laboratoriomestari Arja Mansikkaviita (Jyväskylän Yliopisto).

3.3. Sitoutumiskokeet

3.3.1 Filamiinidomeenien ja Syk:n sitoutuminen pintaplasmoniresonanssimittauksella

Pintaplasmoniresonanssimittaukset (SPR, engl. *surface plasmon resonance*) Biacore™ -laitteella (GE Healthcare Waukesha, Wisconsin, Yhdysvallat) tehtiin Tampereen Yliopiston Biolääketieteellisen Teknologian yksikössä dosentti Vesa Hytösen opastuksessa. Syk-proteiinille (tuotenumero ACMO31196, Active Motif, Carlsbad, Kalifornia, Yhdysvallat) suoritettiin puskurin vaihto 50 mM natrium-asetaatipuskuriin (pH 5,6) suolanpoistopylväällä (Protein desalting spin column, Thermo Fisher Scientific). Syk sidottiin kovalenttisesti aminoryhmästä karboksimeetyloituun (CM, engl. *carboxymethylated*) dekstraaniin detektiosirun pinnalle (sensor chip CM5, GE Healthcare Waukesha, Wisconsin, Yhdysvallat). Pinta aktivoitiin 0,4 M 1-etyyli-3-dimetyyliaminopropyylikarbodiimiidillä (EDC engl. *1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide*) ja 0,1 M N-hydroksyyliisukkinimidillä (NHS, engl. *N-hydroxysuccinimide*). Natrium-asetaatipuskurissa olevaa Syk-proteiinia syötettiin siruun. Lopuksi siru käsiteltiin 1 M -etanoliamiinilla (pH 8,5), jolla inaktivoidaan ne karbonyyliryhmät sirun pinnalla, joihin ei ligandia ole sitoutunut (kaikki GE Healthcare Waukesha, Wisconsin, Yhdysvallat, amino coupling kit). Syk-proteiinia saatiin kiinnitettyä sirun pintaan noin 600 resonanssiyksikköä (RU, engl. *resonance unit*). Resonanssiyksikkö tarkoittaa sattumanvaraista yksikköä, joka on valittu siten, että 1 RU vastaa muutosta, jonka taiteterroinindeksi on 10^{-6} (GE Healthcare Biacore Analysis Book 2001-2008).

SPR-mittauksia varten filamiini A:n domeenit laimennettiin noin 100 μM :n pitoisuuteen. Laimennokset tehtiin 10 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7,5 -puskuriin.

3.3.2. Sitoutumiskokeet glutationiaffiniteettikromatografialla

Omat sitoutumiskokeet tehtiin ns. kiinteän kantajan avulla. Syk-kinaasidomeenia sidottiin glutationiagarosiin 4B (Protino Macherey-Nagel Inc. Dueren, Saksa). 20 μl glutationiagarosia ja 5 ml Syk-kinaasidomeenia sisältävää solulysaattisupernatanttia pyöritettiin 2 tuntia + 4 °C. Samoin meneteltiin GST-solusupernatanttilysaatin kanssa. Syk-kinaasidomeenia sisältävään glutationiagarosiin ja GST:tä sisältävään glutationiagarosiin lisättiin FLNA5:tä, jonka pitoisuus oli 100 μM . Näitä sitoutettiin toisiinsa pyörittäen +21° C tunnin ajan. Näytteet eluoiitiin 10 μl :lla 5 X SDS-PAGE -näytepuskuria (Sambrook ja Russel, 2001) ja keitettiin 5 min. Lopuksi näytteet ajettiin itse tehdyille 12 % SDS-PAGE -geelille (Bio-Rad Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat). Ajon jälkeen geeli värjättiin käyttäen Bio-Radin (Hercules, Kalifornia, Yhdysvallat) hopealeimausreagensseja noudattaen sovellettua hopealeimauskäytäntöä (Modified Silver Stain Protocol).

4. Tulokset

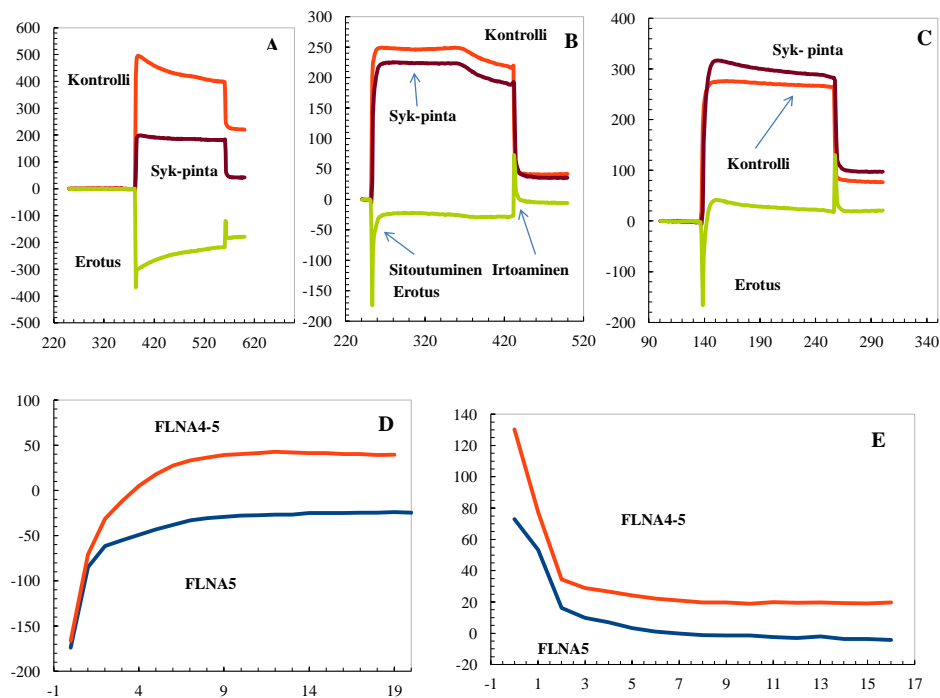
4.1. Filamiinidomeenien ja Syk:n sitoutuminen pintaplasmoni-resonanssimittauksella

Filamiinidomeenien ja Syk:n sitoutumista toisiinsa mitattiin ensin pintaplasmoniresonanssilaitteella (SPR, engl. *surface plasmon resonance*) (Biacore TM). Kokeessa kaupallinen kokopitkä Syk-proteiini kiinnitettiin detektiosirun pintaan ja puhdistettuja filamiinidomeeneja annettiin virrata pinnan yli. FLNA4 sai aikaan nopean SPR-signaalin muutoksen niin Syk- kuin kontrollipinnalla, johon ei ollut kiinnitetty proteiinia (kuva 1A). Näiden signaalien erotuskuva osoitti hitaan SPR-signaalin nousun, muttei minkäänlaista irtoamista huuhtelun aikana. Myös FLNA5 sai aikaan nopean signaalin nousun sekä Syk- että kontrollipinnalla. Erotuskuvaaja näyttää ensimmäisen 30 sekunnin kuluessa spesifisen signaalin lisääntymisen (kuva 1B). Sen jälkeen signaali tasoittui. Huuhtelun jälkeen

nähtiin hidas signaalin lasku lähelle nollatasoa. Kahden domeenin pala FLNA4-5 käyttäytyi samaan tapaan kun FLNA5 (kuva 1C).

Vertailtaessa FLNA5:n ja FLNA4-5:n sitoutumiskinetiikkaa havaittiin, että FLNA4-5:n SPR-signaali oli voimakkaampi, mutta maksimaalinen signaali saavutettiin yhtä nopeasti myös FLNA5:n kohdalla (kuva 1D). Irtoamiskinetiikka oli myös hyvin samanlainen FLNA5:n ja FLNA4-5:n välillä (kuva 1E). Kuvassa nähdään puskurin vaihdon aiheuttama nopea muutos noin 2 s ajan. Sen jälkeen hidas irtoaminen noin 10 s ajan. FLNA5:n osalta alkutaso jäi hieman korkeammalle tasolle, kun taas FLNA4-5:n kohdalla signaali palautui alkutasolle (kuva 1E).

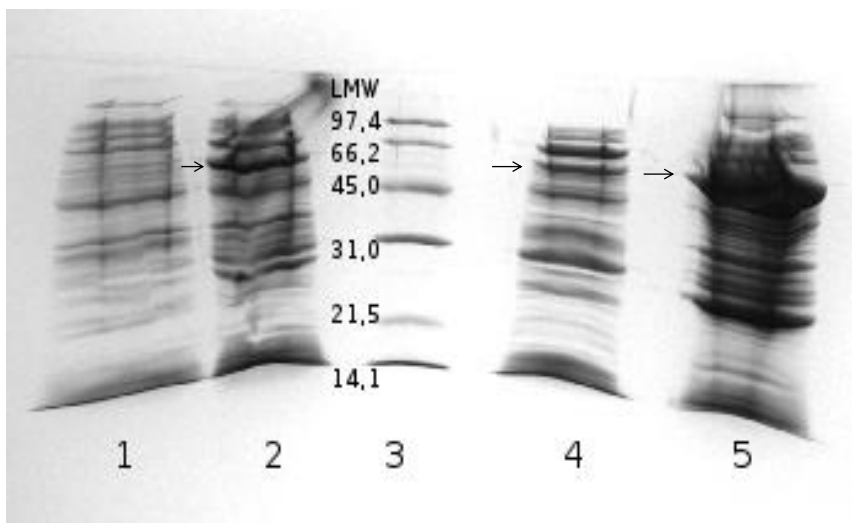
SPR-mittaukset antoivat viitteitä, että FLNA5 ja FLNA4-5 sitoutuvat spesifisesti kokopitkään Syk-proteiiniin. FLNA4:n kohdalla sitoutumista ei havaittu.



Kuva 5 Filamiinidomeenien sitoutuminen Syk-proteiiniin SPR-laitteella mitattuna. Kaikissa kuvissa x-akselilla on aika sekunteina (s) ja y-akselilla resonanssiyksiköt (RU). Kuvissa A-C on kontrollikanavan kuvaaja esitetty oranssilla, Syk-kanavan tummanpunaisella ja näiden erotus vihreänä. Kuvassa A ovat FLNA4-5:n SPR-signaalit. Kuvassa B ovat FLNA5:n SPR-signaalikuvaajat. Vasemmalla nuolella on osoitettu FLNA5:n ja Syk:n sitoutuminen ja oikeanpuoleisella nuolella irtaantuminen. Kuvassa C ovat FLNA4-5:n mitatut SPR-signaalit. Kuvassa D ovat vertailtavina FLNA4-5:n (oranssi) ja FLNA5:n (sininen) sitoutumisvaiheen signaalit tarkemmin esitettyinä niin, että injektioaikapiste on nollakohtana. Kuvassa E ovat vertailtavina FLNA 4-5:n ja FLNA5:n irtoamisvaiheen signaalit tarkemmin esitettyinä, samoin kuten edellä mainittu.

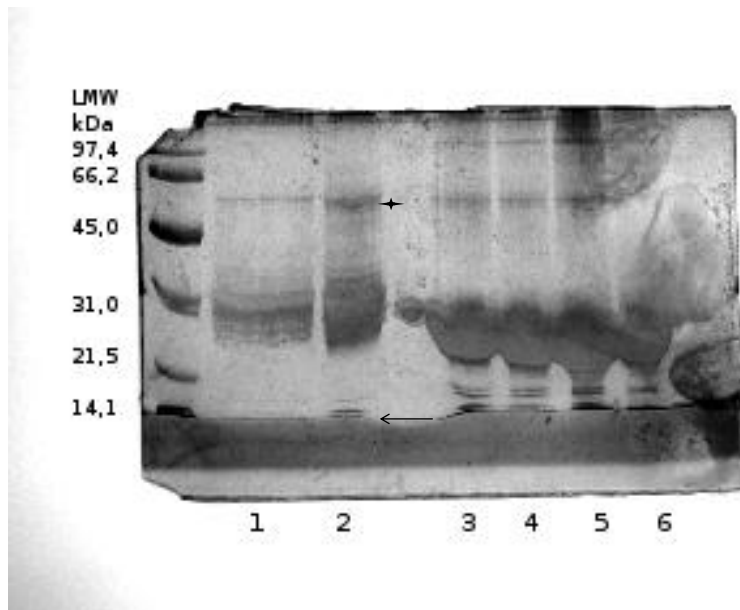
4.2. Syk-kinaasidomeenin kloonaukseen, tuottaminen ja sitoutumiskokeet

Seuraavaksi haluttiin testata filamiinidomeenien sitoutumista Syk-kinaasidomeeniin. Syk-kinaasidomeeni monistettiin Syk cDNA:sta. Se siirrettiin tuotto-plasmidiin ja sen DNA tarkistettiin sekvensoimalla (liite 1). IPTG:n lisäyksen jälkeen bakteerit tuottivat halutun kokoista GST-fuusioproteiinia (kuva 6, näyte 2). Pieni osa proteiinista oli liukoista 2 % Triton X-100 kanssa, mutta suurin osa jäi solupellettiin (kuva 6, näytteet 4 ja 5).



Kuva 6 Syk-kinaasidomeenin tuottaminen SDS-PAGE -geelillä ovat näytteet bakteerikasvustosta. Näyte 1 bakteerikasvusto ennen indusointia IPTG:llä. Näyte 2 on bakteerikasvustosta indusoinnin jälkeen. Kohdassa kolme geelin keskellä on molekyylipainostandardi. Näyte 4 on solujen lyaattisupernatantti. Näyte 5 on soluista jäljelle jäänyt lyaattipelletti. Nuolet kuvassa osoittavat GST-Syk-kinaasidomeenin kokovyöhykettä, noin 60 kDa.

Sitoutumiskokeilla tutkittiin Syk-kinaasidomeenia sisältävän supernatantin ja FLNA5:n keskinäistä sitoutumista. Koska Syk-kinaasidomeenin ekspressio *E.coli* -soluissa oli vain kohtalainen ja liukoisuus supernatanttiin oli ongelma, päädyttiin sitoutumiskokeissa käyttämään supernatanttia sen sijaan, että Syk-kinaasidomeenia olisi yritetty puhdistaa. Sitoutumiskokeissa Syk-kinaasidomeeni sidottiin GST-osan avulla kiinteään kantajaan, glutationiagarosiin. Sen jälkeen GST-Syk-kinaasidomeenin annettiin sitoutua 100 μ M FLNA5-domeenin kanssa. Spesifistä sitoutumista GST-Syk-kinaasidomeeniin ei havaittu, vaan noin 10 kDa:n kokoista proteiinia oli yhtä paljon kaikissa näytteissä (kuva 7).



Kuva 7 Syk-kinaasidomeenin - FLNA5:n välinen sitoutumiskoe SDS-PAGE -geelillä. Näytteissä 1 ja 2 on GST-Syk-kinaasidomeeniagarosinäyte FLNA5:n kanssa. Näytteissä 3 ja 4 on GST yhdessä FLNA 5:n kanssa. Näytteissä 5 ja 6 on pelkkä GST. Tähti kuvassa on noin 60 kDa:n kohdalla, mikä on GST-Syk-kinaasidomeenin koko. Nuoli kuvassa osoittaa FLNA 5:n, jonka koko on noin 10 kDa.

5. Tulosten tarkastelu

Tämän Pro Gradu -työn yhtenä tavoitteena oli varmistaa FLNA5:n ja Syk:n sitoutuminen. Mielenkiinnon kohteena oli myös, vaikuttaako FLNA4-domeeni FLNA5:n ja Syk:n vuorovaikutukseen.

SPR-mittauksissa saatiin viitteitä FLNA5:n ja kokopitkän Syk-proteiinin sitoutumisesta. Alustavista tuloksista voidaan myös päätellä, ettei FLNA4 vaikuta FLNA5:n ja Syk:n sitoutumiseen.

Kokopitkää Syk-proteiinia saatiin kiinnitettyä detektiosirun pinnalle 600 resonanssiyksikköä (RU engl. *resonance unit*). Kokopitkän Syk-proteiinin koko on noin 104 kDa. Tyypillisesti 50–150 kDa:n kokoista proteiinia saadaan kiinnitettyä detektiosirun pinnalle noin 7000–15000 RU (Biacore concentration Analysis book, 2001–2008) ja tämän perusteella saatiin detektiosirun pintaan kiinnitettyä vain melko pieni Syk-proteiinikerros. Kokopitkä Syk-proteiini päädyttiin sitomaan kovalenttisesti aminoliittimen avulla detektiosirun pintaan.

Valitun sitomistyylin haittapuoli oli se, ettei ollut mahdollista todentaa, millaisessa asennossa Syk oli sitoutunut detektiosirun pintaan. Syk-proteiinin orientaatio oli siis sattumanvarainen. Mittauksien onnistumisen johdosta voidaan todeta, ettei Syk:n kiinnittymisen suuntaus ollut ongelma. Toisenlainen Syk:n kiinnittäminen detektiosirun pintaan olisi mahdollista, esimerkiksi Forte-bio -laitteella mitattaessa voitaisiin Syk:n GST-häntää hyväksikäyttäen sitoa se anti-GST -pintaan. Tällöin optimaalisesta suuntautumisesta voitaisiin olla varmempia.

Analyysikuvaajassa havaittiin aluksi nopea FLNA5:n sitoutuminen Syk:iin, mikä myöhemmin tasoittui. Samanlainen, mutta voimakkaampi SPR-signaali saatiin tutkittaessa FLNA4-5 -domeeniparin ja Syk-proteiinin sitoutumista. Voimakkaampi SPR-signaali FLNA4-5:llä kuin FLNA5:llä johtuu todennäköisesti FLNA4-5:n suuremmasta molekyylipainosta. Kuvaajan muotoon ei kiinnitetyn ligandin määrä vaikuta, mutta signaalivaste on sitä voimakkaampi, mitä enemmän kiinnitettyä ligandia on detektiosirun pinnalla. Mittaustuloksissa proteiineilla CM5-detektiosirulla yksi resonanssiyksikkö (RU) vastaa 1 pg/mm^2 konsentraation muutosta sirun pinnalla (GE Healthcare Biacore® Sensor Surface Handbook 2005-2007). Voidaan kuitenkin todeta, että SPR-signaalin vaste olisi rajoitettu, vaikka Syk:n pitoisuus detektiosirun pinnalla olisi ollut parempi, koska Syk:n koko suhteessa FLNA 5:een on suuri. Optimaalisemmassa tutkimusasetelmassa molekyylipainoltaan kevyempi FLNA5 olisi ligandina detektiosirun pinnassa ja molekyylipainoltaan suuremman Syk:n annettaisiin virrata yli analyytinä ja sitoutua ligandiin. Koska Syk-proteiini oli kaupallista alkuperää ja sen määrä oli rajallinen, jouduttiin tutkimus toteuttamaan tietoisesti huonommalla tavalla.

Vertaamalla FLNA4-5:n ja FLNA5:n sitoutumista Syk:iin haluttiin selvittää, vaikuttaako FLNA4 sitoutumiseen. Tulokset viittaavat siihen, ettei FLNA4 vaikuta Syk:n sitoutumiseen positiivisesti tai negatiivisesti. Tästä voidaan vetää johtopäätös, että Syk:n sitoutumispaikka FLNA5:ssä ei sijaitse FLNA4:n ja FLNA5:n välisellä interaktiopinnalla eikä sen välittömässä läheisyydessä. Kysymykseen, sitoutuuko Syk FLNA5:n CD β -säikeiden rajaamaan pintaan, nämä kokeet eivät anna vastausta. FLNA5:n rakenne antaa olettaa, että CD-pinta ei olisi mahdollinen sitoutumispaikka (ks. yleiskatsaus Nakamura ym. 2011, Sethi ym. julkaisematon käsikirjoitus), mutta sen selvittäminen vaatii yksityiskohtaisempia kokeita. Asiaa voitaisiin tutkia kohdennetulla mutageneesillä tai esimerkiksi ydinmagneettiresonanssispektroskopian (NMR engl. nuclear magnetic resonance spectroscopy) avulla, jos puhdistettua Syk-proteiinia olisi käytettävissä riittävä määrä.

Syk:n ja FLNA5:n sitoutumisaffiniteetin määrittämiseksi mittausolosuhteita pitäisi optimoida ja mittauksia suorittaa useilla erilaisilla FLNA5:n pitoisuuksilla. Ongelmana SPR-mittauksissa esiintyi taustakanavassa tapahtuvan epäspesifisen sitoutumisen antama signaali. Olosuhteiden optimointi voisi vähentää epäspesifistä sitoutumista. Tätä voidaan tehdä mm. muuttamalla pH:ta. Eri pH-olosuhteita voisi testata välillä 3,5–8,25. Nämä raja-arvot siksi, että pH 8,5:ssä on Syk:n isoelektrinen piste, jolloin sen varaus muuttuu positiivisesta neutraaliksi ja pH:n ollessa 3,5 tai alle on dekstraanin pinta varaukseltaan negatiivinen (Biacore concentration Analysis book, 2001–2008).

Tutkimuksen toinen päämäärä oli saada tuotettua ja puhdistettua Syk-kinaasidomeenia ja selvittää, sitoutuuko se FLNA5:een. Syk-kinaasidomeenin kloonaus ja transformointi tuottovektoriin onnistuivat. Sen sijaan Syk-kinaasidomeenin tuottaminen *E.colissa* osoittautui haasteelliseksi. Tuotto-ongelmien johdosta Syk-kinaasidomeenin sitoutuminen FLNA5:een jäi kuitenkin todentamatta.

Syk-kinaasin tuoton aikana otetuista SDS-PAGE -näytteistä saadaan geelille oikeankokoinen vyöhyke (GST-Syk-kinaasi noin 60 kDa). Syk-kinaasidomeenia saatiin sidottua glutationiagarosiin, mutta puhdistettua sitä ei saatu merkittäviä määriä. Tuottamisvaiheessa kokeiltiin erilaisia tuottamisolosuhteita ja -aikoja tuloksetta (Hammarström ym., 2001). Proteiinia bakteerikasvustosta eristettäessä todettiin Syk-kinaasidomeenin heikko liukoisuus. Liukoisuusongelmaa yritettiin lievittää käyttäen eri yhdistelmiä erilaisia detergenttejä, proteaasi-inhibiittoreita ja myös eri puskureita (Tao ym., 2009). Ongelmat proteiinin laskostumisessa bakteerisoluisissa aiheuttavat liukoisuusongelmia. Laskostumattomat proteiinit muodostavat liukenemattomia proteiinisaostumia, jotka jäävät solupellettiin (Hammarström ym., 2001). Lopullista varmuutta sille, että SDS-PAGE -geelin 60 kDa:n kokoinen vyöhyke olisi juuri GST-Syk-kinaasifuusioproteiinia, ei saatu.

Sitoutumiskokeita tehtiin proteiinin tuotto- ja liukoisuusongelmista huolimatta. GST-Syk-kinaasidomeenin sitoutumiskokeet FLNA5:n kanssa epäonnistuivat. Tehdyssä sitoutumiskokeessa, jossa FLNA5:n pitoisuus oli 100 μ M, SDS-PAGE -geelillä tulokset jäävät suuren taustan alle. Sitoutumiskokeet erilaisilla FLNA5:n pitoisuuksilla GST-Syk-kinaasiin jäivät tekemättä. Sitoutumiskokeiden SDS-PAGE -geelien värjäys tehtiin Bio Radin hopealeimaustekniikalla. Menetelmään päädyttiin sen Coomassie Brilliant Blue:ta

huomattavasti suuremman herkkyuden vuoksi (Bio Rad Silver Stain US/EG Bulletin 1089 REV C) (Walker, 2002, Chevallet ym., 2006).

Koska usein on haasteellista tuottaa eukaryoottiproteiineja *E.coli* -bakteereissa, voisi Syk-kinaasidomeenia tai kokopitkää Syk-proteiinia tuottaa esimerkiksi hyönteissoluissa. Useimmissa Syk-tutkimuksissa on käytetty eläinsoluissa tuotettua Syk-proteiinia. Joissain tapauksissa fuusioproteiinien tuotto- ja liukoisuusongelmia on ratkaistu vaihtamalla ligandiosaa, GST:n tilalla voisi käyttää vaikkapa histidiiniosaa (engl. His-tag) tai histidiiniä yhdessä maltoosia sitovan proteiinin kanssa (His-MBP engl. His-maltose binding protein tag) (Nallamsetty ja Waugh, 2007, Saurabh ym., 2012)

Alustavia tuloksia Syk:n ja FLNA5:n sitoutumisesta näissä tutkimuksissa saatiin todennettua. Syk:n tai Syk-kinaasidomeenin tuottamisen onnistuminen poistaisi sen roolin tutkimusta rajoittavana minimitekijänä ja siten mahdollistaisi jatkotutkimuksia sen ja FLNA5:n sitoutumisen kinetiikasta ja affiniteetista.

6. Lähdeluettelo

- Andrews, R.K. ja M.C. Berndt. 2004. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb.Res.* 114:447-453.
- Asazuma, N., Y. Ozaki, K. Satoh, Y. Yatomi, M. Handa, Y. Fujimura, S. Miura ja S. Kume. 1997. Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets. *Blood.* 90:4789-4798.
- Atwell, S., J.M. Adams, J. Badger, M.D. Buchanan, I.K. Feil, K.J. Froning, X. Gao, J. Hendle, K. Keegan, B.C. Leon, H.J. Muller-Dieckmann, V.L. Nienaber, B.W. Noland, K. Post, K.R. Rajashankar, A. Ramos, M. Russell, S.K. Burley ja S.G. Buchanan. 2004. A novel mode of Gleevec binding is revealed by the structure of spleen tyrosine kinase. *J.Biol.Chem.* 279:55827-55832.
- Bradshaw, J.M. 2010. The Src, Syk, and Tec family kinases: distinct types of molecular switches. *Cell.Signal.* 22:1175-1184.
- Chevallet, M., S. Luche ja T. Rabilloud. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat.Protoc.* 1:1852-1858.
- Cranmer, S.L., I. Pikovski, P. Mangin, P.E. Thompson, T. Domagala, M. Frazzetto, H.H. Salem ja S.P. Jackson. 2005. Identification of a unique filamin A binding region within the cytoplasmic domain of glycoprotein Ibalpha. *Biochem.J.* 387:849-858.
- Du, X. 2007. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex. *Curr.Opin.Hematol.* 14:262-269.
- Ehrlicher, A.J., F. Nakamura, J.H. Hartwig, D.A. Weitz, and T.P. Stossel. 2011. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature.* 478:260-263.
- Falet, H., A.Y. Pollitt, A.J. Begonja, S.E. Weber, D. Duerschmied, D.D. Wagner, S.P. Watson ja J.H. Hartwig. 2010. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J.Exp.Med.* 207:1967-1979.
- Falet, H. 2012. New insights into the versatile roles of platelet FlnA. *Platelets Month* 2012, 1-5
- Fargier, G., C. Favard, A. Parmeggiani, A. Sahuquet, F. Merezegue, A. Morel, M. Denis, N. Molinari, P.H. Mangeat, P.J. Coopman ja P. Montcourrier. 2013. Centrosomal targeting of Syk kinase is controlled by its catalytic activity and depends on microtubules and the dynein motor. *Faseb j.* 27:109-122.
- Feng, S., J.C. Resendiz, X. Lu ja M.H. Kroll. 2003. Filamin A binding to the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha regulates von Willebrand factor-induced platelet activation. *Blood.* 102:2122-2129.
- Feng, Y. ja C.A. Walsh. 2004. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat.Cell Biol.* 6:1034-1038.
- Franchini, M., G. Targher ja G. Lippi. 2007. Prophylaxis in von Willebrand disease. *Ann.Hematol.* 86:699-704.
- GE healthcare Biacore concentration analysis handbook 2001-2008 General Electric Company 100sivua
- GE Healthcare Biacore sensor surface handbook 2005-2007 General Electric Company 100sivua
- Grädler, U., D. Schwarz, V. Dresing, D. Musil, J. Bomke, M. Frech, H. Greiner, S. Jakel, T. Rysiok, D. Muller-Pompalla ja A. Wegener. 2013. Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. *J.Mol.Biol.* 425:309-333.
- Hammarstrom, M., N. Hellgren, S. van Den Berg, H. Berglund ja T. Hard. 2002. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in Escherichia coli. *Protein Sci.* 11:313-321.
- Huebsch, L.B. ja L.A. Harker. 1981. Disorders of platelet function: mechanisms, diagnosis and management. *West.J.Med.* 134:109-127.

- Kadir, R.A., L.A. Sharief ja C.A. Lee. 2012. Inherited bleeding disorders in older women. *Maturitas*. 72:35-41.
- 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.
- Kobsar, A. ja Eigenthaler, M. 2006. The Cytoskeleton of the platelet. *Advances in Molecular and Cell Biology, Volume 37, 2006, Pages 1-23*
- Lowell, C.A. 2011. Src-family and Syk kinases in activating and inhibitory pathways in innate immune cells: signaling cross talk. *Cold Spring Harb Perspect.Biol.* 3:10.1101/cshperspect.a002352.
- Meyer, S.C., S. Zuerbig, C.C. Cunningham, J.H. Hartwig, T. Bissell, K. Gardner ja J.E. Fox. 1997. Identification of the region in actin-binding protein that binds to the cytoplasmic domain of glycoprotein IB α . *J.Biol.Chem.* 272:2914-2919.
- Mocsai, A., J. Ruland ja V.L. Tybulewicz. 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat.Rev.Immunol.* 10:387-402.
- Nakamura, F., O. Heikkinen, O.T. Pentikäinen, T.M. Osborn, K.E. Kasza, D.A. Weitz, O. Kupiainen, P. Permi, I. Kilpeläinen, J. Yläne, J.H. Hartwig ja T.P. Stossel. 2009. Molecular basis of filamin A-FilGAP interaction and its impairment in congenital disorders associated with filamin A mutations. *PLoS One*. 4:e4928.
- Nakamura, F., T.M. Osborn, C.A. Hartemink, J.H. Hartwig ja T.P. Stossel. 2007. Structural basis of filamin A functions. *J.Cell Biol.* 179:1011-1025.
- Nakamura, F., R. Pudas, O. Heikkinen, P. Permi, I. Kilpeläinen, A.D. Munday, J.H. Hartwig, T.P. Stossel ja J. Yläne. 2006. The structure of the GPIb-filamin A complex. *Blood*. 107:1925-1932.
- Nakamura, F., T.P. Stossel ja J.H. Hartwig. 2011. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell.Adh Migr.* 5:160-169.
- Nallamsetty, S. ja D.S. Waugh. 2007. Mutations that alter the equilibrium between open and closed conformations of Escherichia coli maltose-binding protein impede its ability to enhance the solubility of passenger proteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 364:639-644.
- Nienstedt, W., O. Hänninen, A. Arstila, S-E. Björkqvist. Ihmisen fysiologia ja anatomia, Kuudes painos, WSOY SHKS, Porvoo 1989 635sivua
- Okita, J.R., D. Pidard, P.J. Newman, R.R. Montgomery ja T.J. Kunicki. 1985. On the association of glycoprotein Ib and actin-binding protein in human platelets. *J.Cell Biol.* 100:317-321.
- Poole, A., J.M. Gibbins, M. Turner, M.J. van Vugt, J.G. van de Winkel, T. Saito, V.L. Tybulewicz ja S.P. Watson. 1997. The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *Embo j.* 16:2333-2341.
- 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.
- Pudas, R., T.R. Kiema, P.J. Butler, M. Stewart ja J. Yläne. 2005. Structural basis for vertebrate filamin dimerization. *Structure*. 13:111-119.
- Razdan, K., J.D. Hellums ja M.H. Kroll. 1994. Shear-stress-induced von Willebrand factor binding to platelets causes the activation of tyrosine kinase(s). *Biochem.J.* 302: 681-686.
- Razinia, Z., T. Mäkelä, J. Yläne ja D.A. Calderwood. 2012. Filamins in mechanosensing and signaling. *Annu.Rev.Biophys.* 41:227-246.
- Ren, J., L. Wen, X. Gao, C. Jin, Y. Xue ja X. Yao. 2009. DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. *Cell Res*.19: 271-273.

- Rognoni, L., J. Stigler, B. Pelz, J. Yläne ja M. Rief. 2012. Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 109:19679-19684.
- Ruggeri, Z.M. 2009. Platelet adhesion under flow. *Microcirculation.* 16:58-83.
- Ruggeri, Z.M. 1997. von Willebrand factor. *J.Clin.Invest.* 100:S41-6.
- Ruggeri, Z.M., J.N. Orje, R. Habermann, A.B. Federici ja A.J. Reininger. 2006. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood.* 108:1903- 1910.
- Ruggeri, Z.M. ja J. Ware. 1993. von Willebrand factor. *Faseb J.* 7:308-316.
- Sada, K., T. Takano, S. Yanagi ja H. Yamamura. 2001. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J.Biochem.* 130:177-186.
- Sambrook, J. ja D.W Russel. Molecular cloning A Laboratory Manual Third Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press New York 2001 799 sivua
- Saurabh, M., Raghu B., Nagasuma C., Namperumalsamy V., Haryadi R, Parthasarathi A. Cloning, expression, purification, and biochemical characterisation of the FIC motif containing protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Protein Expression and Purification Volume 86, Issue 1, November 2012, Pages 58–67.
- Savitsky, P., J. Bray, C.D. Cooper, B.D. Marsden, P. Mahajan, N.A. Burgess-Brown ja O. Gileadi. 2010. High-throughput production of human proteins for crystallization: the SGC experience. *J.Struct.Biol.* 172:3-13.
- Schulze, H. ja R.A. Shivdasani. 2005. Mechanisms of thrombopoiesis. *J.Thromb.Haemost.* 3:1717-1724.
- Sethi, R., M. Ylilauri, S. Ruskamo, O.T. Pentikäinen ja J. Yläne. 2012. Structure of Filamin C domains 4 and 5(unpublished manuscript)
- 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.
- Tao, H., W. Liu, B.N. Simmons, H.K. Harris, T.C. Cox ja M.A. Massiah. 2010. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *Biotechniques.* 48:61-64.
The Bio-Rad Silver stain bulletin 1089 US/EG REV C 8sivua
- Walker J.M., The Protein Protocols Handbook, Second Edition, Humana Press Inc. Totowana, New Jersey, 2002
- van der Flier, A. ja A. Sonnenberg. 2001. Structural and functional aspects of filamins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1538:99-117
- Zarbock, A. ja K. Ley. 2011. Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Arch.Biochem.Biophys.* 510:112-119.

Liite 1

```

plasmidi GST-Syk-KD          GST          ATGGAGGAGATCAGGCCCAAGGAGGTTTACCTGGACCGAAAGCTGCTGACG
                                     M E E I R P K E V Y L D R K L L T
Uniprot P43405, aminohapot 356-631    E E I R P K E V Y L D R K L L T
CTGGAAGACAAAGAAGCTGGGCTCTGGTAATTTTGGAACTGTGAAAAAGGGCTACTACCAAATGAAAAAAGTTGTGAAAACCGTGGCTGTG
L E D K E L G S G N F G T V K K G Y Y Q M K K V V K T V A V
L E D K E L G S G N F G T V K K G Y Y Q M K K V V K T V A V
AAAATACTGAAAAACGAGGCCAATGACCCCGCTCTTAAAGATGAGTTATTAGCAGAAGCAAATGTCATGCAGCAGCTGGACAACCCGTAC
K I L K N E A N D P A L K D E L L A E A N V M Q Q L D N P Y
K I L K N E A N D P A L K D E L L A E A N V M Q Q L D N P Y
ATCGTGCGCATGATCGGGATATGCGAGGCCGAGTCTGGATGCTAGTTATGGAGATGGCAGAACTTGGTCCCCTCAATAAGTATTTGCAG
I V R M I G I C E A E S W M L V M E M A E L G P L N K Y L Q
I V R M I G I C E A E S W M L V M E M A E L G P L N K Y L Q
CAGAACAGACATGTCAAGGATAAGAACATCATAGAAGTGGTTCATCAGGTTTCCATGGGCATGAAGTACTTGGAGGAGAGCAATTTTGTG
Q N R H V K D K N I I E L V H Q V S M G M K Y L E E S N F V
Q N R H V K D K N I I E L V H Q V S M G M K Y L E E S N F V
CACAGAGATCTGGCTGCAAGAAATGTGTTGCTAGTTACCCAACATTATGCCAAGATCAGTGATTTCCGACTCTCCAAGCACTGCGTGCT
H R D L A A R N V L L V T Q H Y A K I S D F G L S K A L R A
H R D L A A R N V L L V T Q H Y A K I S D F G L S K A L R A
GATGAAAAGTACTACAAGGCCAGACCCATGGAAAGTGGCCTGTCAAGTGGTACGCTCCGGAATGCATCAACTACTACAAGTTCTCCAGC
D E N Y Y K A Q T H G K W P V K W Y A P E C I N Y Y K F S S
D E N Y Y K A Q T H G K W P V K W Y A P E C I N Y Y K F S S
AAAAGCGATGTCTGGAGCTTTGGAGTGTTGATGTGGGAAGCATTCTCCTATGGGCAGAAGCCATATCGAGGGATGAAAGGAAGTGAAGTC
K S D V W S F G V L M W E A F S Y G Q K P Y R G M K G S E V
K S D V W S F G V L M W E A F S Y G Q K P Y R G M K G S E V
ACCGCTATGTTAGAGAAAGGAGAGCGGATGGGGTGCCTGCAGGTTGTTCAAGAGAGATGTACGATCTCATGAATCTGTGCTGGACATAC
T A M L E K G E R M G C P A G C P R E M Y D L M N L C W T Y
T A M L E K G E R M G C P A G C P R E M Y D L M N L C W T Y
GATGTGGAAGAACAGGCCCGGATTGCGAGCAGTGGAACTGCGGCTGCGCAATTACTACTAT
D V E N R P G F A A V E L R L R N Y Y Y
D V E N R P G F A A V E L R L R N Y Y Y

```

Liite 1 GST-Syk-kinaasidomeenifuusioproteiinin sekvenssien vertailu tietokantaan.

Ylimmällä rivillä on sekvensoidun GST-Syk-kinaasidomeeniplasmidin DNA-sekvenssit. Keskimmaisella rivillä on niiden käänös aminohapoiksi. Alimmalla rivillä on tietokannasta saatu Syk-kinaasidomeenin aminohaposekvenssit.