

## TIIVISTELMÄ

Heiska, Leena

Esriinin merkitys syövässä

Jyväskylä: Jyväskylän yliopisto, 2014, 69 s.

Yhteenveto: Esriinin merkitys syövässä

Lisensiaatintutkimus.

Tutkimukseni selvittää esriinin tehtäviä ja säätelyä erityisesti syövän kannalta. Esriini kuuluu ERM-proteiiniperheeseen (esriini/radiksiini/moesiini). Nämä proteiinit tarttuvat toisaalta solun aktiinitukirankaan, toisaalta solukalvon reseptoreihin. Esriini vaikuttaa solutukirangan järjestäytymiseen ja solun kortikaalisiin muodonmuutoksiin. Voimistunut esriinin ekspressio korreloi tiettyjen syöpätyyppien maligniteettiin ja erityisesti metastointikykyyn. Esriinin tiedetään esimerkiksi olevan välttämätön osteosarkooman metastaasissa.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää Src-kinaasin katalysoiman fosforyloinnin merkitystä esriinin toiminnalle syöpään liittyvissä ilmiöissä, esim. invaasiossa ja migraatiossa. Tutkimme soluja, jotka eivät ilmennä endogeenistä esriiniä (poistogeenisistä hiiristä tuotetut solulinjat). Solulinjoissa ilmennettiin esriiniproteiinin erilaisia mutanttiversioita ja solujen käyttäytymistä verrattiin toisiinsa Src-kinaasiin liittyvissä funktionaalisissa kokeissa. Solujen proliferaatiokyvyn, adheesiokyvyn ja migraatiokyvyn havaittiin olevan keskenään verrannollisia normaaleissa kaksikulotteisissa viljelyolosuhteissa. Jos soluja kuitenkin kasvatettiin kolmiulotteisten matriksien sisällä tai päällä, saatiin mielenkiintoisia tuloksia. Tällaiset kasvatusolosuhteet muistuttavat fysiologisia kasvuolosuhteita, joita kasvainsolut kudoksissa kohtaavat. Villityyppisen esriinin ilmentäminen antoi soluille selvän kasvuedun sekä ns. soft agar -kokeessa, jossa soluja kasvatetaan kiinteän agarin sisällä, että Matrigel-kokeissa, joissa solut kasvavat hiiren tuumorista uutetun tyvikalvomatriksin päällä tai sisällä. Sitä vastoin esriinin Y477F-mutanttimuoto ei kasva näissä olosuhteissa esriiniä ilmentämätöntä vektorikontrollia paremmin. Villityyppisen esriinin antama kasvu oli lisäksi Src-kinaasista riippuvainen, koska ilman aktiivista Src-kinaasia solut eivät kasvaneet näissä oloissa esriinistä huolimatta. Samankaltaisia tuloksia saimme kollageenimatriksilla kasvatetuilla solusferoideilla. Nämä tulokset viittaavat siihen, että esriinin Src-välitteisen fosforylaation merkitys liittyy nimenomaan fosforylaation solulle antamaan kykyyn selviytyä paremmin kolmiulotteisissa kasvuoloissa, kuten kudoksissa.

Hakusanat: Esriini; kasvaimet; etäpesäkkeet; fosforylaatio.

*Leena Heiska, Jyväskylän yliopisto, Bio- ja ympäristötieteiden laitos, PL 35, 40014  
Jyväskylän yliopisto, Suomi*

**Tekijän osoite**      *Leena Heiska*  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
PL 35  
40014 Jyväskylän yliopisto  
leena.heiska@gmail.com

**Ohjaajat**            Prof. Matti Vuento  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
PL35  
40014 Jyväskylän yliopisto

Prof. Olli Carpén  
PL 52  
20521 Turku

**Tarkastajat**        Prof. Jari Yläne  
Jyväskylän yliopisto  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
PL 35  
40014 Jyväskylän yliopisto

LKT, ylilääkäri Jan Böhm  
Keski-Suomen sairaanhoitopiiri  
Keskussairaalantie 19  
40620 Jyväskylä

# SISÄLTÖ

## ALKUPERÄISJULKAISU

### LYHENTEET

1	JOHDANTO JA KIRJALLISUUSKATSAUS .....	9
1.1	Syöpäsolujen ominaisuudet ja syövän tunnusmerkit .....	9
1.1.1	Riippumattomuus ulkoisista kasvusignaaleista .....	10
1.1.2	Kasvua estävien signaalien välttäminen .....	12
1.1.3	Ohjelmoidun solukuoleman välttäminen .....	13
1.1.4	Kyky jakautua rajattomasti .....	13
1.1.5	Verisuonten uudismuodostus .....	14
1.1.6	Kyky tunkeutua kudokseen ja muodostaa etäpesäkkeitä .....	14
1.1.7	Syövän syntyä edesauttavat tekijät .....	16
1.1.8	Kasvaimen mikroympäristö.....	17
1.2	Esriini ja ERM-proteiinit .....	18
1.2.1	Esriinin rakenne ja ERM-proteiiniperhe .....	18
1.2.2	Esriinin ekspressio soluissa ja kudoksissa .....	20
1.2.3	Esriinin säätely .....	21
1.2.4	Esriini ja merliini.....	23
1.3	Esriini ja syöpä .....	24
1.3.1	Esriini ja syövän tunnusmerkit: riippumattomuus kasvu- signaaleista .....	26
1.3.2	Esriini ja syövän tunnusmerkit: kasvua estävien signaalien välttäminen.....	29
1.3.3	Esriini ja syövän tunnusmerkit: ohjelmoidun solukuoleman välttäminen.....	31
1.3.4	Esriini ja syövän tunnusmerkit: kyky jakautua rajattomasti ja verisuonten uudismuodostus .....	32
1.3.5	Esriini ja syövän tunnusmerkit: kyky tunkeutua kudokseen ja muodostaa etäpesäkkeitä .....	33
1.3.5.1	Metastaattisen solun irtautuminen primaari- kasvaimesta ja tunkeutuminen kudokseen .....	34
1.3.5.2	Uuteen paikkaan kulkeutuminen, ekstravasaatio ja kolonisaatio .....	38
1.3.5.3	Metastaasitutkimuksen haasteita .....	42
2	TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	45
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	46
3.1.1	Solulinjat .....	46
3.1.2	Vasta-aineet, reagenssit ja immunopresipitaatio .....	46
3.1.3	Solujen proliferaatiokoe.....	47
3.1.4	Soluadheesion analysointi.....	47
3.1.5	Mikroskopiamenetelmät.....	47
3.1.6	Sferodien muodostaminen ja solujen hajaantumiseen liittyvät	

kokeet .....	48
3.1.7 Soluviljely soft agarilla ja suspensiossa.....	48
3.1.8 Invaasiokoe ja soluviljely Matrigel-matriksissa .....	48
3.1.9 Virtaussytometria .....	49
4 TULOKSET JA POHDINTA .....	50
4.1.1 Esriinipoistogeenisen hiiren alkion fibroblasteja voidaan käyttää mallina esriinin toiminnan tutkimiseen .....	50
4.1.2 Esriiniä ei tarvita Src-kinaasin aiheuttamiin solumuutoksiin, kun soluja kasvatetaan kaksikulotteisilla pinnoilla .....	51
4.1.3 Esriinin läsnäolo ja tyrosiini 477:n fosforylaatio on välttämätön Src-kinaasin aiheuttamissa pahanlaatuisissa muutoksissa, kun soluja kasvatetaan kolmiulotteisissa malleissa tai suspensiossa .....	51
5 PÄÄTELMÄT .....	54
<i>KIITOKSET</i> .....	57
LÄHTEET .....	58

## ALKUPERÄISJULKAISU

Lisensiaattitutkielma perustuu seuraavaan alkuperäisjulkaisuun, johon viitataan tekstissä roomalaisella numerolla I.

- I Heiska L., Melikova M, Zhao F., Saotome I., MacClatchey A.I. & Carpén O. 2011. Ezrin is key regulator of Src-induced malignant phenotype in three-dimensional environment. *Oncogene* 30: 4953–4962.

Tutkimuksessa Leena Heiska suunnitteli ja toteutti useimmat kokeet, analysoi niiden tulokset ja kirjoitti käsikirjoituksen. Maria Melikova oli mukana yhden kokeen suunnittelussa ja toteutti sen. Fang Zhao auttoi kolmiulotteisessa kuvantamisessa. Ichiko Saotome ja Andrea MacClatchey loivat esriinipoistogeenisen hiiren ja tuottivat niistä hiiren alkion fibroblastit, joihin kaikki kokeet perustuivat. Olli Carpén johti tutkimusryhmää ja toimi työn ohjaajana.

## LYHENTEET

<i>4E-BP1</i>	eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1
<i>AMPK</i>	AMP-activated protein kinase
<i>AKT</i>	AKT8 retrovirus oncogene
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli (protein)
<i>Bcl</i>	B cell lymphoma (protein)
<i>bFGF</i>	basic fibroblast growth factor
<i>CD44</i>	cluster of differentiation-44
<i>CDC42</i>	cell division control protein homolog 42
<i>CDK4, CDK5</i>	cyclin dependent kinase-4, 5
<i>C-ERMAD</i>	C-terminal ezrin-radixin-moesin association domain
<i>E2</i>	17 $\beta$ -estradiol
<i>EGF (R)</i>	epidermal growth factor (receptor)
<i>EMT</i>	epithelial-mesechymal transition
<i>eNOS</i>	endothelial nitric acid oxide
<i>ERM</i>	ezrin-radixin-moesin
<i>FAK</i>	focal adhesion kinase
<i>FAS</i>	fatty acid synthase
<i>FERM</i>	four point one - ezrin - radixin -moesin
<i>FGF</i>	fibroblast growth factor
<i>GDP</i>	guanosine diphosphate
<i>HER2/neu</i>	human epithelial growth factor-2
<i>HIF</i>	hypoxia inducible factor
<i>ICAM</i>	intercellular adhesion molecule
<i>LKB1</i>	liver kinase B1
<i>MAPK</i>	mitogen activated protein kinase
<i>mTOR</i>	mammalian target of rapamycin
<i>N-CAM</i>	neural cell adhesion molecule
<i>N-ERMAD</i>	N-terminal ezrin-radixin-moesin association domain
<i>NHERF-1/EBP50</i>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger regulatory factor-1/ezrin binding protein-50
<i>p130Cas</i>	Crk (CT10 regulator of kinase) associated substrate 130 kD
<i>PDGF</i>	platelet derived growth factor
<i>PI3K</i>	phosphoinositide 3-kinase
<i>PI(4,5)P<sub>2</sub></i>	phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate
<i>PKC</i>	protein kinase C
<i>pRb</i>	retinoblastoma protein
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog
<i>PTHrP</i>	parathyroid hormone related protein
<i>Rac1</i>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate-1
<i>Rho</i>	Ras homolog
<i>Rho GDI</i>	Rho GDP dissociation inhibitor
<i>S6K1</i>	p70 ribosomal protein S6 kinase

<i>shRNA</i>	short hairpin RNA
<i>siRNA</i>	small interfering RNA
<i>Smad4</i>	Sma and Mad related family
<i>SOS</i>	son of sevenless (protein)
<i>Src</i>	Rous sarcoma virus oncogene protein
<i>TGF<math>\beta</math></i>	transforming growth factor beta
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	tumour necrosis factor alpha
<i>TSC1</i>	tuberous sclerosis protein-1 (hamartin)
<i>VEGF</i>	vascular endothelial growth factor





# 1 JOHDANTO JA KIRJALLISUUSKATSAUS

## 1.1 Syöpäsolujen ominaisuudet ja syövän tunnusmerkit

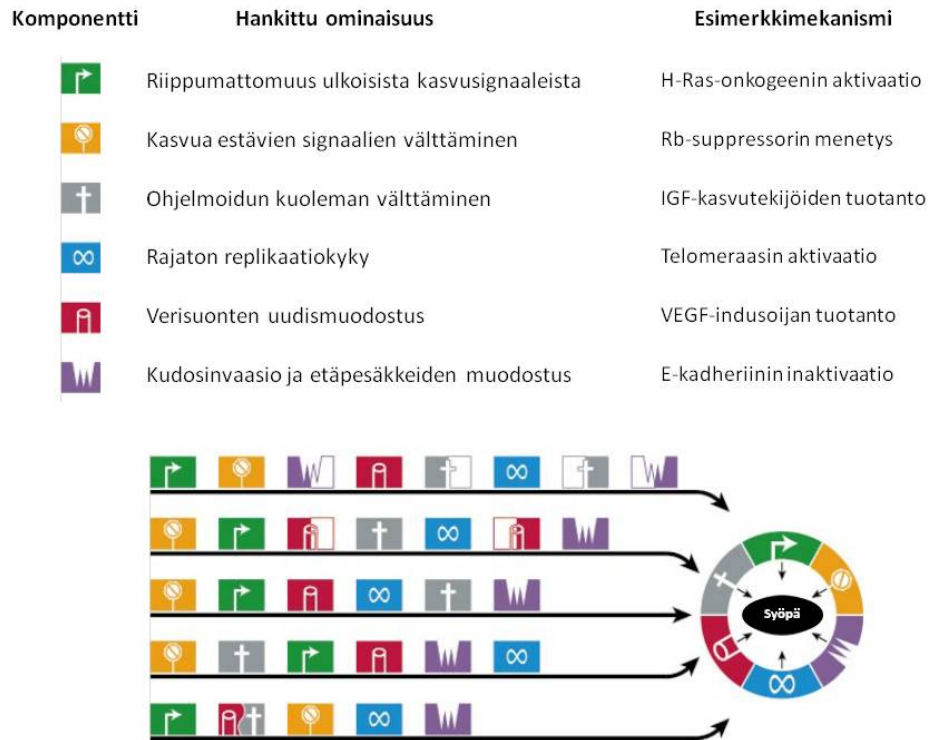
Tiedelehti Cell julkaisi vuosituhatosen 2000 ensimmäisessä numerossaan tulevaisuuteen suuntautuneita katsausartikkeleita keskeisiltä tutkimusaloilta. Syöpätutkijat Douglas Hanahan ja Robert A. Weinberg kirjoittivat artikkelin, jossa he käsittelivät syövän kehittymistä ja etsivät olennaisia tekijöitä, jotka liittyisivät pahanlaatuiseen kasvuun syöpätyypistä riippumatta. He esittivät uuden ajatuksen syövän kuudesta tunnusmerkistä, jotka normaalin solun täytyy vaiheittain saavuttaa muuttuakseen invasiiviseksi syöpäsoluksi (Hanahan & Weinberg 2000). Artikkelista tuli nopeasti alan siteeratuin julkaisu. Ajatus eri syöpätyypeille ja kasvainten kudosspesifisille alatyypeille yhteisistä tunnusmerkeistä on osoittautunut kiinnostavaksi ajatusmalliksi syöpätutkimukselle. Vuonna 2011 Hanahan ja Weinberg julkaisivat artikkelista päivitetyn ja laajennetun version, jossa he käsittelivät kahta uutta syövän tunnusmerkkiä ja syövän syntymiseen yleisesti myötävaikuttavia tekijöitä (Hanahan & Weinberg 2011).

Elimistön syöpää estävä puolustus on yleisesti ottaen hyvä, ja solun kehittyminen syöpäsoluksi on harvinainen tapahtuma. Hanahan ja Weinberg pohtivat artikkeleissaan, kuinka monen säätelypiiristön täytyy häiriytyä, ennen kuin solu muuttuu normaalista solusta syöpäsoluksi. He ehdottavat kuutta olennaista muutosta, jotka esiintyvät lähes kaikissa ihmisen syöpätyypeissä:

- 1) riippumattomuus ulkoisista kasvusignaaleista
- 2) kasvua estävien signaalien välttäminen
- 3) ohjelmoidun solukuoleman välttäminen
- 4) kyky jakautua rajattomasti
- 5) verisuonten uudismuodostus
- 6) kyky tunkeutua kudokseen ja muodostaa etäpesäkkeitä.

Eri syöpätyypit saavat vaiheittain kaikki nämä hankitut ominaisuudet, mutta niiden ilmaantumisjärjestys ja -aika saattavat vaihdella (ks. kuvio 1). Toisaalta kasvaimet ovat monimutkaisia kudoksia, joissa eri tyyppiset solut ovat

toistensa kanssa heterotyypisessä vuorovaikutuksessa. Tämän vuoksi pelkkien syöpäsolujen ominaisuuksien tunteminen ei riitä, vaan myös kasvaimen mikroympäristö vaikuttaa kasvaimen kehittymiseen.



KUVIO 1 Syövän kuusi tunnusmerkkiä ja esimerkkejä niiden mekanismeista. Mukaelma artikkelista Hanahan ja Weinberg, 2000.

Seuraavissa luvuissa käsittelen tarkemmin Hanahanin ja Weinbergin ehdottamia tunnusmerkkejä heidän kahteen artikkeliinsa perustuen (Hanahan & Weinberg 2000; Hanahan & Weinberg 2011). Tässä esittelyosiossa esitettyjen tutkimustulosten tarkat viitetiedot löytyvät näistä kahdesta artikkelista.

### 1.1.1 Riippumattomuus ulkoisista kasvusignaaleista

Normaalisolut eivät kykene lisääntymään ilman kasvua stimuloivia signaaleja. Nämä mitogeeniset signaalit saavat solun poistumaan lepotilasta aktiivisesti lisääntyviksi. Tällaisina signaaleina voivat toimia vapaasti diffundoituvat kasvutekijät, solunulkoisen väliaineen osat tai solujen kiinnittymismolekyylit. Kasvainsoluissa tarve ulkoisille kasvusignaaleille on voimakkaasti vähentynyt, jolloin kudoksen tasapainoa (homeostaasia) ylläpitävä mekanismi häiriytyy.

Kasvainsolut muuttuvat kasvusignaalien suhteen autonomisiksi erilaisten mekanismien kautta: itse solunulkoiset kasvusignaalit muuttuvat, näitä signaaleja soluun välittävät tekijät muuttuvat tai ne solunsisäiset säätelypiirit muuttuvat, jotka muuttavat signaalit toiminnaksi. Normaalikudoksissa eri solujen välillä esiintyy heterotyypistä signalointia. Syöpäsoluilla taas on usein

kyky syntetisoida itse samoja kasvutekijöitä, joille solu on vastaanottavainen. Näin syntyy positiivinen takaisinkytkentä (autokriininen stimulaatio), jolloin solu ei enää tarvitse kudoksen muiden solujen tuottamia kasvutekijöitä. Esimerkkeinä tällaisista kasvutekijöistä voidaan mainita verihitalekasvutekijä PDGF ja transformoiva kasvutekijä TGF $\alpha$ .

Solun pintareseptorit välittävät kasvua stimuloivia signaaleja solun sisälle. Monet syöpäsolut ilmentävät reseptoreita liiallisesti normaalisoluihin verrattuina, jolloin kasvainsolut saattavat tuottaa hypervasteen normaaleillekin kasvusignaaleille. Reseptorit saattavat muuttua myös ligandista riippumattomiksi esimerkiksi mutaation tai rakennemuutoksen kautta, jolloin reseptori välittää signaalin, vaikka siihen ei olisi fysiologista tarvetta. Lisäksi syöpäsoluilla on havaittu muuttuneita reseptorikokoonpanoja, jotka suosivat kasvua edistäviä signaaleja välittäviä reseptoreita. Solupinnan reseptorit ovat usein kalvon lävistäviä tyrosiinikinaaseja, jotka välittävät kasvusignaaleja solunsisäisen osansa entsyymitoiminnan kautta. Esimerkkejä syövissä liiallisesti ilmennetyistä tai mutatoituneista reseptoreista ovat epidermaalisen kasvutekijän reseptorit EGF-R ja HER2/*neu*.

Riippumattomuus kasvusignaaleista saattaa syntyä myös sellaisen solunsisäisen säätelypiirin häiriöstä, joka vastaanottaa kasvua edistäviä signaaleja ja prosessoi ne toiminnaksi. Esimerkiksi SOS-Ras-Raf-MAPK-kaskadi on erityisen tärkeä syöpien syntymekanismissa. Viime aikoina yleistyneet genomiset tehoseulontatekniikat ovat osoittaneet ihmiskasvaimissa sellaisia mutaatioita, jotka todennäköisesti aktivoivat kasvutekijäreseptorien signalointipiirejä. Hanahan ja Weinberg olettavatkin, että kasvusignaalien reitit ovat itse asiassa häiriytyneet kaikissa ihmisen syövissä. Osa häiriöistä saattaa johtua myös signalointia vaimentavien negatiivisten takaisinkytkentämekanismien heikentymisestä (esimerkkeinä Ras-GTPaasin toiminnan väheneminen tai PTEN-fosfataasin ekspresion väheneminen). Eri signaalikaskadit lisäksi yhdistyvät toisiinsa monimutkaisilla, ristiin vaikuttavilla yhteyksillä. Näin solun ulkopuolelta tulevat signaalit saattavat tuottaa monia sellulaarisia vaikutuksia. Tästä monimutkaisuudesta on kiinnostavana esimerkkinä mTOR-kinaasireitti, jota käsitellään jäljempänä eserin yhteydessä tarkemmin. Hanahan ja Weinberg toteavat, että kun mTOR sijaitsee PI3K-reitillä sekä ylä- että alavirtaan, syöpähoitona tapahtuva mTOR:n farmakologinen inaktivoiminen rapamysiinillä estää kyllä PI3K-signalointia, mutta tähän liittyvä negatiivisen takaisinkytkennän häviäminen johtaakin PI3K:n lisääntyneeseen aktiivisuuteen, mikä estää hoidon vaikutusta.

Vaikka tämä signaalireittien moninaisuuskin lisää kompleksisuutta, viime aikoina tutkimus on painottanut kasvainten mikroympäristöä ja myös kasvainta ympäröivien normaalisolujen vaikutusta kasvainsolujen kasvuun. Kasvusignaalit saattavat olla peräisin kasvainta ympäröivältä solukolta (parakriininen signalointi). Näin voidaan ajatella, että kasvainsolut ovat onnistuneet ottamaan ympäristön normaalit solut omaan käyttöönsä mukauttamalla ne kasvua edistävien signaalien vapauttamiseen. Itse asiassa myös tulehdussolut voivat edistää kasvaimen kasvupotentiaalia. Nämä mekanismit lisäävät syöpäsolujen riippumattomuutta kudoksen tavanomaisista säätelykeinoista.

### 1.1.2 Kasvua estävien signaalien välttäminen

Kasvusignaalien lisäksi solujen lepotilaan ja kudoshomeostaasiin liittyvät kasvua estävät tekijät. Nämäkin voivat olla joko liukoisia tai liukenemattomia (esimerkiksi solunulkoisen väliaineen komponentteja tai solujen pintarakenteita). Kuten kasvusignaaleillekin, myös näille kasvua inhiboiville tekijöille on omat pintareseptorinsa ja niihin kytkeytyvät solunsisäiset signalointireitit.

Kasvua inhiboivat signaalit vaikuttavat kahden eri mekanismin kautta. Solut voidaan joko pakottaa lisääntymissyklistä lepotilaan tai solut muutetaan pysyvästi postmitoottiseen tilaan, mihin usein liittyy solujen erilaistuminen. Normaalisolujen vaste kasvua estäville signaaleille liittyy erityisesti siihen, mitä solulle tapahtuu jakautumissyklinsä G1-vaiheessa. Tässä vaiheessa ympäristöstä saadut signaalit vaikuttavat siihen, etenevätkö solut lisääntymissykliin, jäävätkö ne lepotilaan vai etenevät postmitoottiseen tilaan. Molekyylitasolla tähän ilmiöön vaikuttavat keskeisesti retinoblastoomaproteiinit (pRb, p107 ja p130), jotka vaikuttavat transkriptiotekijöiden kautta solun etenemiseen solusyklin G1-vaiheesta eteenpäin.

Transformoiva kasvutekijä TGF $\beta$  on parhaiten tunnettu kasvua estävä liukoinen signaali, joka vaikuttaa pRb-reittiin. Syöpäsoluissa TGF $\beta$ -vaste saattaa muuttua esimerkiksi TGF $\beta$ -reseptorien vähenemisen tai mutatoitumisen kautta. Signaalia reseptorista eteenpäin välittävien solunsisäisten proteiinien toiminta saattaa myös muuttua tai puuttua kokonaan mutaatioiden vuoksi (esim. Smad4, CDK4). Myös itse retinoblastoomaproteiinin toiminta saatetaan menettää, joskus virusten onkoproteiinien kautta (ihmisen papilloomaviruksen E7-proteiini).

Kasvainsoluissa integriinit ja muut solun adheesiomolekyylit muuttuvat siten, että niiden kasvua edistävät muodot vallitsevat. Oletettavasti tämäkin muutos vaikuttaa Rb-reitin kautta solusyklin etenemiseen.

Soluviljelyssä on jo kauan on tunnettu kontakti-inhibition nimellä tunnettu ilmiö, jossa epiteelilähtöisten solujen väliset kontaktit estävät soluja lisääntymästä enempää. Kahden tuumorisuppressorigeenin tiedetään vaikuttavan ainakin osaksi solukontakteja voimistamalla. Esriinin läheisen sukulaisproteiinin merliinin yksi kasvua rajoittava ominaisuus voimistaa solujen välistä adheesiota E-kadheriinin kautta. Toinen kontakti-inhibitiossa vaikuttava kasvunrajoiteproteiini on LKB1. Kasvainsoluissa ominaisuus kuitenkin katoaa eikä kontakti-inhibitio enää vaikuta.

Kasvainsolut pystyvät myös välttämään erilaistumisen ja postmitoottiset tilat. Tässä keskeinen tekijä on transkriptiotekijää koodaava *c-myc*-onkogeeni, jota ilmennetään kasvainsoluissa usein enemmän kuin normaalisoluihin. Tämä siirtää tasapainoa kasvun edistämiseen ja erilaistumisen vähenemiseen. Toinen esimerkki syöpämekanismista on APC/ $\beta$ -kateniini-reitin inaktivoituminen paksusuolen karsinogeneesin aikana, jolloin enterosyyttien eteneminen postmitoottiseen tilaan estyy.

### 1.1.3 Ohjelmoidun solukuoleman välttäminen

Kudoshomeostaasiin ja syövän syntyyn vaikuttaa solujen lisääntymisen lisäksi myös solujen poistuma. Keskeinen mekanismi solujen hallitussa poistamisessa elimistöstä on apoptoosi (ohjelmoitu solukuolema), jota nykykäsityksen mukaan esiintyy latentissa muodossa kaikissa soluissa. Apoptoosin aktivoituessa solut hajotetaan tarkasti ajoitetuissa ja toisiaan seuraavissa vaiheissa niin, että elimistössä ei synny haitallisia reaktioita.

Apoptoosin osatekijät voidaan jakaa kahteen luokkaan, sensoreihin ja efektooreihin. Sensorit seuraavat sekä solunulkoista että -sisäistä tilaa ja säätelevät sen mukaisesti efektorien toimintaa. Sensoreita ovat monet solupintareseptorit, jotka sitovat eloonjäämiseen tai apoptoosiin liittyviä tekijöitä (esimerkkeinä IGF-1/IGF-2 ja vastaava reseptori tai FAS-ligandi ja vastaava reseptori). Solun sisällä on omat sensorit, jotka seuraavat esim. DNA-vaurioita tai signaloinnin epätasapainoa, hypoksiaa jne. Myös solujen vuorovaikutus solunulkoisen väliaineen ja muiden solujen kanssa vaikuttaa eloonjäämissignaaleihin.

Signaalit muutetaan toiminnaksi mitokondrioissa Bcl-proteiiniperheen monimutkaisen säätelyn kautta. Tuumorisuppressoriproteiini p53 on tärkeä Bcl-perheen säätelijä, joka välittää tietoja DNA-vaurioista. Kun mitokondriot alkavat vapauttaa sytokromi c:tä, apoptoosin lopulliset efektorit eli kaspasientsyymit aktivoituvat ja ohjelmoitu solukuolema lähtee toimintaan täsmällisessä järjestyksessä.

Liiallisesti ilmennetty tai aktivoitunut onkogeeni (esimerkiksi *myc*) voi laukaista apoptoosin. Hanahan ja Weinberg esittävät, että apoptoosi saattaa itse asiassa olla ensisijainen keino aktivoituneita onkogenejä kantavien solujen poistamiseen. Näin ollen apoptoottisen koneiston osien muuttuminen vaikuttaa huomattavasti kasvaimen kasvuun. Syöpäsolut ovat hyvin resistenttejä apoptoosille: esimerkiksi p53-proteiinin toiminnallinen inaktivoituminen havaitaan yli puolessa ihmisen syövästä, jolloin tärkeä DNA-vaurioita, hypoksiaa ja onkogeenien hyperekspressiota havaitseva komponentti puuttuu. Myös eloonjääntisignaaleja välittävä PI3-kinaasi-AKT-reitti vaikuttaa apoptoosin välttämiseen monissa kasvaimissa.

### 1.1.4 Kyky jakautua rajattomasti

Hanahan ja Weinberg toteavat, että vaikka edellä olevat kolme ominaisuutta irrottavatkin solun kasvuohjelman ympäristöstä tulevista signaaleista, tämä ei vielä riitä makroskooppisten kasvainten syntymiseen. Nisäkässoluissa on sisäinen autonominen kontrolli, joka rajoittaa solujen kahdentumista. Useimmat normaalisolut kykenevät noin 60–70 jakautumiseen. Tämä kyllä riittäisi suurten kasvainmassojen syntymiseen, ellei niissä tapahtuisi koko ajan myös massiivista apoptoosia ja solujen poistumaa. Kromosomien päiden (telomeerien) etenevä lyheneminen jokaisen solusyklin aikana johtaa siihen, että kromosomien päitä ei enää voida suojata ja syntyy kromosomaalisia häiriöitä, jotka lopulta aiheuttavat solun kuoleman.

Lähes kaikissa pahanlaatuisissa soluissa telomeerit kuitenkin säilyvät ja solut pystyvät välttämään vanhenemisen ja muuttumaan immortaaleiksi. Tämä tapahtuu joko telomeraasientsyymiä yliekspressoimalla tai muulla mekanismilla. Näin normaalien solujen rajallinen replikaatiokyky muuttuu rajoittamattomaksi syöpäsoluissa. Rintasyövän kehitysvaiheiden vertailevissa analyysissä onkin havaittu telomeraasin vähittäistä aktivoitumista ja telomeerien pitenemistä. Viimeaikaisissa tutkimuksissa telomeraasilla on havaittu olevan myös muita funktioita, jotka saattavat liittyä solujen lisääntymiseen ja siten kasvainten syntyyn.

### **1.1.5 Verisuonten uudismuodostus**

Verisuoniston kuljettamat happi ja ravinteet ovat ratkaisevia solun toiminnalle ja eloonjäämiselle. Kun kudosis muodostuu, uusien verisuonten kasvu on väliaikaista ja tarkkaan säänneltyä. Myös muodostuvat kasvaimet ovat riippuvaisia kapillaarisuonista, ja kasvainten onkin kehitettävä angiogeneesiä aikaansaava kyky kasvaakseen suuremmiksi. Toisiaan tasapainottavat positiiviset ja negatiiviset signaalit säätelevät verisuonten uudismuodostusta. Tärkeitä positiivisia mekanismeja ovat liukoiset tekijät ja niiden endoteelisoluissa sijaitsevat tyrosiinikinaasireseptorit (esim. VEGF ja FGF-1/2 ja niiden reseptorit). Estävistä tekijöistä tunnetuin on trombospondiini-1, jonka reseptori CD36 kytkeytyy Src-tyyppisiin kinaaseihin. Angiogeneesiä sääteleviä tekijöitä tunnetaan useita kymmeniä.

Myös integriinien kautta tulevat signaalit vaikuttavat verisuonten uudismuodostukseen. Lepotilaisissa verisuonissa ilmennetään tiettyä integriiniryhmää ja kasvavissa verisuonissa toista. Soluadheesio ja siihen liittyvät solunulkoiset proteaasit vaikuttavat siis solujen angiogeneettiseen ohjelmointiin. Proteaasit voivat ohjata angiogeenisten aktivaattorien ja inhibiittorien biologista saatavuutta esimerkiksi vapauttamalla bFGF-kasvutekijää solunulkoisesta väliaineesta.

Verisuonten uudismuodostuksen merkityksestä syövässä on olemassa paljon vakuuttavia hiirimalleja. Ne yhdessä eri vaiheen syöpien histologisten analyysien kanssa osoittavat, että angiogeneesin indusoituminen on useimmiten aikainen tapahtuma syövässä. Kyseessä on angiogeneesiä edistävien ja estävien tekijöiden tasapainon siirtyminen uudismuodostusta suosivaksi. Tämän prosessin tarkkoja mekanismeja ei vielä tunneta. Koska verisuonten uudismuodostus on ilmeisen houkutteleva kohde syöpähoidoille, ala on erittäin intensiivisen tutkimuksen kohteena.

### **1.1.6 Kyky tunkeutua kudokseen ja muodostaa etäpesäkkeitä**

Edellä olevat viisi syövän tunnusmerkkiä pätevät sekä hyvänlaatuisiin että pahanlaatuisiin kasvaimiin. Kyky irtautua kasvainmassasta, tunkeutua kudokseen ja edetä kaukaisiin paikkoihin ja alkaa siellä uusi kasvu on nimenomaan pahanlaatuisen soluun liittyvä ominaisuus. Kudosisinvaasio ja etäpesäkkeiden eli metastaasien muodostaminen ovat viimeisinä kehittyvät

syöpäsolun tunnusmerkit. Koska metastaasit aiheuttavat jopa 90 % ihmisen syöpäkuolemista, näiden ilmiöiden ymmärtäminen ja hoitaminen on keskeistä syöpäbiologiassa.

Invaasio- ja metastaasiprosessit ovat mekanistisesti toisiinsa läheisesti liittyneitä. Solujen fysikaalinen kytkeytyminen mikroympäristöönsä muuttuu ja solunulkoiset proteaasit aktivoituvat. Solujen kiinnittymiseen liittyviä signaaleja välittävät integriinit ja erilaiset solu-solu-adheesion molekyylit muuttuvat. Tyypillinen invaasioon liittyvä muutos tapahtuu epiteelisolujen E-kadheriinissa, joka yhdistää soluja toisiinsa homotyypisesti, mikä tuottaa normaalisoluisissa kasvua estäviä signaaleja. E-kadheriini auttaa epiteelisolukerrosten muodostumista ja lepotilan ylläpitämistä epiteelisoluissa. Monissa epiteelisyövissä E-kadheriinin toiminta on hävinnyt eri mekanismien kautta. E-kadheriinia pidetään siten invaasiota ja metastaasia estävänä tekijänä.

N-CAM-adheesiomolekyylin ilmentyminen syöpäsoluissa vähenee ja molekyyli myös muuttuu erittäin adheesiivisesta muodosta heikosti adheesiiviseen muotoon. Myös integriinien alayksiköissä tapahtuu siirtymiä. Integriinigeenien ja erilaisten heterodimeerien suuri määrä tuottaa valtavan monimuotoisuuden, jolloin tuloksena voi olla joko invaasiota estävä tai edistävä signaali. Karsinoomasoluissa integriinien ekspressio muuttuu invaasiota helpottavaan suuntaan.

Yleinen kudosisnvaasion ja metastaattisen kyvyn mekanismi käsittää solunulkoisia proteaaseja. Niiden ilmentyminen saattaa lisääntyä, niiden inhibiittorien ilmentyminen saattaa vähentyä tai niiden inaktiiviset tsymogeenimuodot saattavat aktivoitua. Näitä entsyymejä on solun pinnalla, integraalisina solukalvoproteiineina tai integriineihin liittyneenä. Myös kasvainta ympäröivät stroomasolut sekä tulehdussolut tuottavat solunulkoisia proteaaseja.

Viime aikoina on tutkittu paljon solujen säätelyohjelmaa, jota kutsutaan epiteeli-mesenkyyymi-muutokseksi (EMT). Epiteelisolut voivat saada kyvyn tunkeutua ympäröivään kudokseen muuttamalla mesenkymaalisten solujen suuntaan tiettyjen transkriptiotekijöiden toiminnan kautta. Tähän liittyy solujen vyöliitosten häviäminen, muutos kulmikkaista soluista sukkulamaisiksi, solujen väliainetta hajottavien entsyymien ilmentäminen, lisääntynyt liikkuvuus ja lisääntynyt vastustuskyky apoptoosille. EMT-ilmiön merkitys muissa syövissä kuin epiteelistä peräisin olevissa karsinoomissa on vielä epäselvä. Myös muita invaasiomuotoja on havaittu. Näissä solut etenevät kudoksiin joko suurempana massana (kollektiivinen invaasio) tai ameebamaisesti, jolloin yksittäinen solu ei niinkään etene mesenkymaalisesti ja entsyymitoiminnalla itselleen reittiä avaten, vaan ennemminkin yksittäin soluväliaineen läpi pujahtamalla. Kasvainsolut saattavat myös erittää kemoattraktanteja, jotka kutsuvat paikalle tulehdussoluja, jotka auttavat invaasioprosessissa.

Itse etäpesäkkeen synty edellyttää mikrometastaasin syntymistä vieraassa ja yleensä kasvultaan normaalissa kudospäristössä (kolonisaatio). Mikrometastaasit eivät aina kasva makroskooppisiksi kasvaimiksi tai kasvavat vasta primaarikasvaimen poistamisen jälkeen, joko heti tai vasta pitkän ajan kuluttua. Etäpesäkkeen syntyyn liittyykin monia kudoksen mikroympäristön tekijöitä, jotka vaikuttavat esimerkiksi invasoivien solujen ravinteiden saantiin,

uudisverisuonituksen aktivointiin tai soluväliaineen kasvua estäviin aineisiin jne. Tulehdussolut saattavat auttaa etäpesäkkeen synnylle sopivan ympäristön kehittymistä. Viime aikoina onkin määritetty geenien sarjoja (metastatic signatures), joiden ilmentyminen näyttää korreloivan makroskooppisten etäpesäkkeiden syntymiseen. Kasvainta ympäröivien stroomasolujen vaikutus on ilmeisesti erittäin suuri etäpesäkkeen kasvun sallivan mikroympäristön muodostumisessa.

### 1.1.7 Syövän syntyä edesauttavat tekijät

Uudemmassa artikkelissaan Hanahan ja Weinberg käsittelevät myös syövän syntymistä edistäviä tekijöitä ja esittävät kaksi uutta esiin nousutta syöpäsolujen piirrettä.

Solut muuttuvat syöpäsoluiksi eri kasvaintyypeissä erilaisten mekanismien kautta, ja muutokset tapahtuvat eri aikoina kasvaimen syntyprosessin aikana. Muutokset mahdollistaa perimän epävakauden kehittyminen. Tämä lisää harvinaisia geneettisiä tapahtumia, kuten mutaatioita ja kromosomien uudelleenjärjestäytymisiä. Spontaanien mutaatioiden määrät ovat tavallisesti erittäin pieniä, koska genomia ylläpitävä järjestelmä kykenee havaitsemaan virheet DNA:ssa ja korjaamaan ne. Syöpäsolussa tämä genomien eheyttä puolustava järjestelmä on häiriytynyt. Eri kasvaintyypeillä näyttää olevan niille ominaiset mutaatiomallit.

Toinen kasvainten kehittymistä edistävä seikka on tulehdustila, johon vaikuttaa sekä synnynnäinen että hankinnainen immuniteetti. Tulehdus tuottaa kasvaimen ympäristöön kasvutekijöitä, solujen eloonjääntiin ja verisuonten uudismuodostukseen liittyviä tekijöitä sekä soluväliainetta muuttaviin entsyymeihin vaikuttavia tekijöitä. Lisäksi tulehdussolut vapauttavat mm. reaktiivisia happiyhdisteitä, jotka ovat sinänsä mutageenisia.

Esiin nousseena uutena syöpäsoluominaisuutena Hanahan ja Weinberg mainitsevat energiametabolian. Normaalisolut tuottavat energiaa tehokkaasti hapen läsnäollessa hajottamalla glukoosia mitokondrioissa tapahtuvassa sitruunahappokierrossa ja sitä seuraavassa oksidatiivisessa fosforylaatioissa. Kun happea ei riitä, käytetään anaerobista glykolyysiä, joka on aerobista energiantuotantoa tehottomampaa. Syöpäsolut voivat muuttaa energiantuotantoaan siten, että ne tuottavat aerobisissakin oloissa ATP:tä anaerobisella glykolyysillä, ja tämän tehottomuutta kompensoidaan esimerkiksi glukoosia kuljettavien proteiinien määrää lisäämällä. Monissa kasvainsoluissa esiintyy hapen niukkuutta (hypoksiaa), joka myös aikaansaa glukoosin kuljettajien ja glykolyysireitin entsyymien lisäävää säätelyä. Sekä Ras-onkoproteiinin että hypoksian tiedetään lisäävän tiettyjen HIF-transkriptiotekijöiden määriä, jotka puolestaan pystyvät lisäämään glykolyysiä.

Energiantuotannon muuttumisen merkitys syöpäsoluille on epäselvä, mutta se voisi liittyä glykolyyttisten väliyhdisteiden tuottamiseen erilaisille biosynteesireiteille, jolloin uusien solujen muodostumisessa tarvittavia aineosia olisi saatavana.



Toinen esiin noussut uusi ominaispiirre on immuunipuolustuksen välttäminen. Immuunijärjestelmän on katsottu kykenevän puolustamaan elimistöä useimmilta syntyviltä mikrokasvaimilta; tämä pitää ilmeisesti paikkansa ainakin virusten aiheuttamissa kasvaimissa. Hyvinkin immunogeeniset syöpäsolut pystyvät välttymään immuunijärjestelmän aiheuttamalta tuholta erittämällä immunosuppressiivisia tekijöitä tai rekrytoimalla immunosuppressiivisia tulehdussoluja. Viime aikoina syöpähoidon uudeksi kiinnostavaksi kohteeksi onkin tullut T-solujen koreseptori PD-1, jonka kautta kasvaimiin kohdistuvaa immuniteettia yritetään lisätä (esim. katsaus Topalian *et al.* 2012).

### 1.1.8 Kasvaimen mikroympäristö

Kasvaimia ei enää ajatella suhteellisen homogeenisten syöpäsolujen kokoelmana, vaan ennemminkin monimutkaisena erilaisten solutyyppeiden verkostona. Esimerkiksi karsinoomissa epiteelisolut muodostavat parenkyymin, jota mesenkymaaliset solut ympäröivät. Syöpäsolut ovat kasvainten kasvun alkaessa suhteellisen homogeenisiä; myöhemmin kasvaimen kehittyessä ilmaantuu syöpäsolujen alapopulaatioiden erillisiä klooneja. Ihmiskasvaimet sisältävätkin histopatologisesti hyvin erilaisia alueita, jotka edustavat erilaisia erilaistumisen, lisääntymisen, verisuonituksen, tulehduksen ja kudokseen tunkeutumisen asteita.

Viime vuosina on lisäksi havaittu, että kasvaimissa esiintyy syövän kantasoluja. Ne määritellään soluiksi, jotka kykenevät tehokkaasti kylvämään uusia kasvaimia, kun niitä siirretään vastaanottajakudokseen. Tällaista kantasolumääritelmää tukee se, että syövän kantasolujen transkriptiomallit ovat osittain samanlaisia kuin normaaliin kudosten kantasoluissa. Näyttää siltä, että esimerkiksi edellä mainittu epiteeli-mesenkyyymi-muutos EMT saattaa indusoida syövän kantasolut jakautumaan. Tarkemmat tiedot syövän kantasolujen määrästä ja ominaisuuksista ovat puutteellisia, mutta näiden kantasolujen katsotaan kuitenkin olevan vastustuskykyisempiä tavallisesti käytettäville kemoterapeuttisille lääkeaineille. On mahdollista, että kantasolujen muovautuvuus edesauttaa heterogeenisen kasvainmassan syntymistä. Saman kasvaimen eri osista mikrodissektiotekniikan avulla saadut genomitiedot osoittavat, että kasvaimen sisällä on suurta heterogeenisyyttä myös perimän tasolla.

Esriinistä on vuosien mittaan julkaistu mittava määrä tutkimusartikkeleita, ja monissa niistä on havaittu yhteyksiä syöpään tai onkogeeneihin proteiineihin. Näiden moninaisten artikkelien sisältämän tiedon jäsentämiseksi sovellan tässä Hahananin ja Weinbergin artikkeleita lähtökohtana, kun pohdin esriinin väitettyä osuutta syövän syntyyn. Miten solun tukirankaa ja solukalvoa yhdistävä pieni proteiini voi liittyä kasvaimiin ja etäpesäkkeisiin?

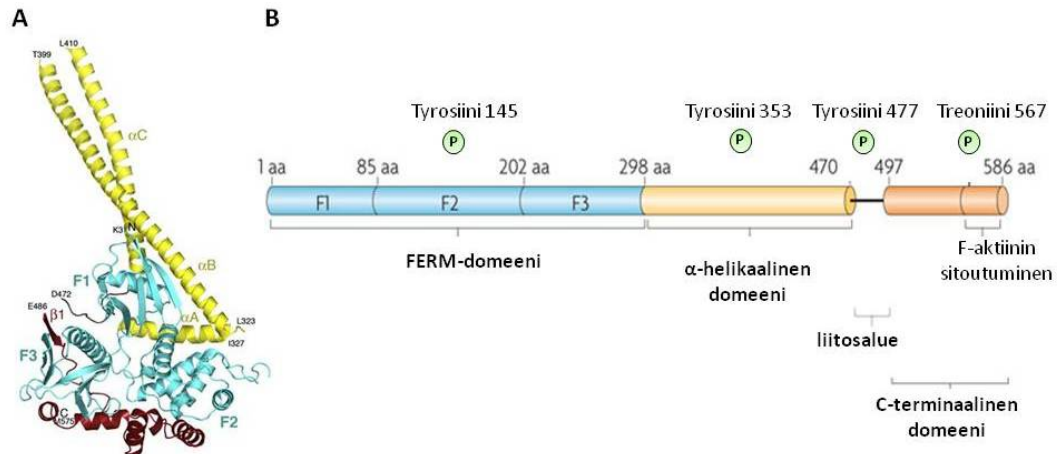
## 1.2 ESRIINI JA ERM-proteiinit

Esriini (tunnetaan myös nimellä sytovilliini) löydettiin samoihin aikoihin kahdessa eri laboratoriossa. Suomalainen tutkijaryhmä tunnisti esriinin mikrovillusrakenteita värjäävän vasta-aineen antigeeninä (Suni *et al.* 1984). Sama proteiini oli tunnistettu tärkeäksi fosforyloituvaksi proteiiniksi, kun A431-soluja stimuloitiin epidermaalaisella kasvutekijällä (EGF) (Hunter & Cooper 1981). Esriinistä on tämän jälkeen julkaistu satoja artikkeleita ja katsauksia, jotka käsittelevät sen rakennetta, toimintaa ja säätelyä.

### 1.2.1 Esriinin rakenne ja ERM-proteiiniperhe

Esriini on esriini-radiksiini-moesiini (ERM) -proteiiniperheen ensimmäisenä kuvattu jäsen. Ihmisen esriinin, radiksiinin ja moesiinin aminohapposekvenssit ovat n. 73–81-prosenttisesti identtisiä (Turunen *et al.* 1998). Kaikilla ERM-proteiineilla erotetaan kolme domeenia: noin 300 aminohapon N-terminaalinen domeeni, noin 190 aminohapon alfahelikaalinen keskidomeeni ( $\alpha$ -domeeni) ja noin 100 aminohapon C-terminaalinen domeeni. ERM-proteiinien N-terminaalisen domeenin röntgenkristallografiamenetelmällä saatuja atomisia rakenteita (kiderakenteita) on julkaistu yksin tai ligandin kanssa (Hamada *et al.* 2003; Smith *et al.* 2003; Edwards & Keep 2001; Hamada *et al.* 2000), ja myös moesiinin N- ja C-terminaalisten domeenien ei-kovalenttisen kompleksin rakenne on selvitetty (Pearson *et al.* 2000). Lopulta saatiin selville myös yhden hyönteislajin (*Spodoptera frugiperda*) kokonaisen ERM-proteiinin kiderakenne, jolloin voidaan paremmin arvioida alfahelikaalisen rakenteen vaikutusta molekyylin aktivoitumiseen (Li *et al.* 2007). Kaavamainen molekyyli-rakenne esitetään kuviossa 2.

N-terminaalinen domeeni on samankaltainen kuin Band 4.1. -perheen proteiineilla, ja tämän domeenin nimeksi on vakiintunut FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) (Chishti *et al.* 1998) tai N-ERMAD (N-terminaalinen ERM-assosiaatidomeeni, (Bretscher *et al.* 1995)). FERM-domeeni on hyvin yleinen domeenirakenne proteiineissa (ks. esim. Takeuchi *et al.* 1994). Kiderakenteiden perusteella on päätelty, että domeeni muodostaa apilanlehtimäisen, kolmelohkoisen rakenteen. Esriinin FERM-domeeni välittää sitoutumista solukalvolla oleviin reseptoreihin tai adaptoriproteiineihin, esimerkiksi solujen toisiinsa kiinnittymistä välittäviin ICAM-proteiineihin (Yonemura *et al.* 1998; Heiska *et al.* 1998; Serrador *et al.* 1997), hyaluronihappoa sitovaan CD44-solupintareseptoriin (Tsukita *et al.* 1994), CD43-glykoproteiiniin (Serrador *et al.* 1998) ja NHERF-1/EBP50-adaptoriproteiiniin (Reczek *et al.* 1997).



KUVIO 2A *Spodoptera frugiperdan* moesiinin 3,0 Å:n kiderakenne (Li *et al.* 2007). Alfahelikaalinen rakenne esitetty keltaisena, FERM-domeeni sinisenä ja C-terminaalinen domeeni (C-ERMAD) punaisena. B. Kaavamainen kuva esriinimolekyylistä, sen tunnetuista fosforylaatiokohdista ja F-aktiinin sitoutumiskohdasta (mukaeltu julkaisusta Fehon 2010). P = fosforyloitava aminohappo.

Alfahelikaalinen domeeni koostuu kolmesta pitkästä heliksistä. Hyönteisen moesiinin kiderakenne paljasti yllättäen, että alfahelikaalinen domeeni muodostaa paljon kontakteja FERM-domeenin kanssa ja peittää lepotilaisen molekyylin sitoutumiskohtia yhdessä C-terminaalisen domeenin kanssa. Kontaktipintojen aminohapot ovat erittäin konservoituneita. Alfahelikaalisen domeenin ja C-pään väliin jää lyhyt liitosalue, joka sisältää esriinissä ja radiksiinissa polyproliinisekvenssejä, jotka muodostavat klassisen tyypin II polyproliiniheliksin (Li *et al.* 2007, ks. myös kuvio 2A).

C-terminaalinen domeeni (C-ERMAD eli C-terminaalinen ERM-assosiaatidomeeni (Bretscher *et al.* 1995)) on sitoutuneena FERM-domeeniin, silloin kun proteiini on epäaktiivinen, ts. kun molekyylin sisäinen laskostuminen peittää ligandien sitoutumiskohdat. N-C-sitoutumisen katsotaan siis pitävän ERM-proteiinin lepotilassa. C-ERMAD:ssa on solun ehkä tärkeää tukiranka-proteiinia, aktiinia, sitova kohta (noin 30 viimeistä aminohappoa) (Gary & Bretscher 1995; Turunen *et al.* 1994). Kun esriini on aktiivisessa tilassaan, se on konformaationaalisesti avoin ja yhdistää siten solukalvoproteiineja solun tukirankaan.

ERM-proteiinit ovat rakenteellisesti hyvin samankaltaisia keskenään. Esriini poikkeaa muista ERM-proteiineista erityisesti tiettyjen tyrosiinien suhteen, joita ei esiinny muissa perheen proteiineissa. Nämä tyrosiinit ovat solujen signaalijärjestelmän kannalta mielenkiintoisia, koska tyrosiini-fosforylaatio on yksi tärkeimmistä solujen keinoista tuottaa ja välittää signaaleja.

Vasta-aineiden ristireagointi haittaa varsinkin alkuaikojen ERM-proteiinitutkimusten arviointia. Myös solun signaalijärjestelmiä käsittelevissä tutkimuksissa tämä on pulma, koska spesifisiksi ajatellut, fosfoproteiineja tunnistavat vasta-aineet saattavat hyvinkin tunnistaa myös muita proteiini-perheen jäseniä. ERM-proteiinit ovat myös molekyylimassaltaan melko

samankokoisia ja ajautuvat elektroforeettisesti lähellä toisiaan, mikä saattaa osaltaan vaikeuttaa eri artikkeleissa esitettyjen tulosten tulkintaa.

### 1.2.2 Esriinin ekspressio soluissa ja kudoksissa

Esriini on solunsisäinen proteiini, jota useimmiten havaitaan kortikaalisella alueella. Esriiniä esiintyy aktiivisissa solukalvon osissa, kuten mikrovilluksissa, filopodioissa ja kalvon poimuissa. Esriiniä saattaa esiintyä myös solu-solukontakteissa, lymfosyyttien uropodirakenteissa tai hermosolujen kasvualueilla; toisaalta esriini voi lokalisoitua myös diffuusisti koko solun alueelle (omat havainnot). Joissakin julkaisuissa esriiniä on osoitettu myös tumassa. Tumalokalisaatio liittyy TNF- $\alpha$ -stimulaatioon, joka saa esriinin siirtymään tumaan ja repressoimaan sykliini A:n ilmentymistä sen promoottorialueeseen sitoutumalla (Kishore *et al.* 2005b). Myös osteosarkoomasoluissa on nähty fosforyloituneiden muotojen tumalokalisaatiota (Di Cristofano *et al.* 2010).

Eläimissä esriiniä ilmennetään erityisesti epiteelisoluissa ja imukudoksen soluissa. Toisaalta lähes kaikissa *in vitro* viljellyissä soluissa esiintyy vastaaineilla tunnistettavia määriä esriiniä, joskin määrä saattaa olla vähäinen (prof. Carpén, julkaisematon tieto). Esriinin läsnäolo ei siis häiritse solujen elinkykyä ainakaan viljelyolosuhteissa. Viljellyillä soluilla tehtyjen tutkimusten tuloksia tulkittaessa on muistettava, että useimmiten näissä soluissa on myös endogeenistä esriiniä soluun vietyjen kokeellisten konstruktien lisäksi. Tämän lisäksi solut saattavat ilmentää myös jotain toista ERM-proteiinia. Poistogeenisen hiiren solut tai poistogeeniseksi käsitellyt viljelmäsolut ovat ainoita tutkimuksissa käytettyjä soluja, joissa ei esiinny endogeenistä esriiniä.

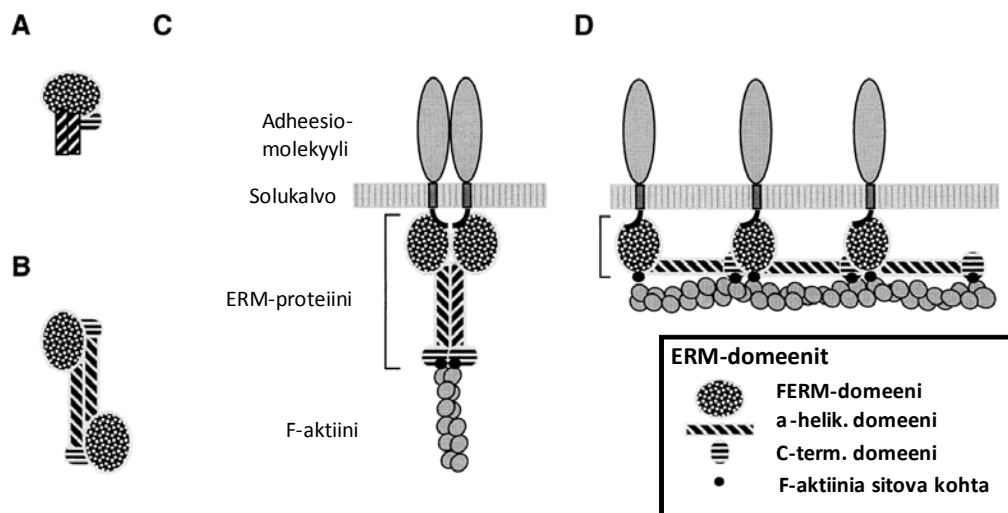
Kudostasolla esriiniä esiintyy maha-suolikanavan epiteelisoluissa kaikissa ihmisen kehitysvaiheissa, erityisesti suolinukan sukasauma-alueella. Lisäksi esriiniä havaitaan munuaisten, pernan, imusolmukkeiden ja kerrostuneen levyepiteelin kaikkien kehitysvaiheiden aikana sekä lisämunuaisten tietyillä alueilla (Xie *et al.* 2011b). Esriinin ekspressio on sekä ajallisesti että paikallisesti tarkkaan säädeltyä. Poistogeenisillä hiirillä tehdyissä tutkimuksissa havaittiin, että esriini on välttämätön maha-suolikanavan epiteelin järjestäytymisessä ja suolinukan kehittymisessä (Saotome *et al.* 2004). Vaikka poistogeeniset hiiret syntyvätkin, esriinin puuttuminen johtaa poikasten kuolemaan ennen vieroitusta. Esriinin puuttuminen aiheuttaa myös silmän verkkokalvon mikrovillusten vähenemistä ja valoreseptorien kehittymisen hidastumista (Bonilha *et al.* 2006). Esriinin toiminta näyttää siten liittyvän erityisesti solukalvorakenteiden organisointiin. Kun esriini poistetaan indusoitavan poistogeenin menetelmällä aikuisen hiiren suolen epiteelistä, suolen apikaalinen rakenne rikkoutuu ja villusmuodostus häiriytyy. Esriini vaikuttaa siten myös kypsän suolen homeostaasiin (Casaletto *et al.* 2011).

Eri ERM-proteiinien ilmentymisestä eri kudoksissa ei ole julkaistu kattavaa vertailevaa tutkimusta. Pääpiirteittäin eri ERM-proteiinit esiintyvät eri kudoksissa. Esriiniä esiintyy epiteelisolujen apikaalisissa nukkalisäkkeissä, kun taas moesiinia havaitaan pääasiassa endoteelisoluissa (Berryman *et al.* 1993; Schwartz-Albiez *et al.* 1995). Radiksiinia on erityisesti maksasoluissa (Amieva *et*

al. 1994). Vaikka esriiniä ilmennetään runsaasti imukudoksen prekursorisoluisa, poistogeenisellä hiirellä lymfoidikudoksen esriini on kuitenkin korvattavissa, nähtävästi moesiinin kautta (Shaffer *et al.* 2010). Ilmeisesti ERM-proteiinit voivat omaksua ainakin jonkin verran toistensa tehtäviä (Kitajiri *et al.* 2004). *Drosophilassa* on vain yksi ERM-homologi, Dmoesin, jonka puuttuminen johtaa kehityksen ja morfologian häiriöihin (Jankovics *et al.* 2002; Polesello *et al.* 2002).

### 1.2.3 Esriinin säätely

Koska ERM-molekyylit voivat siis olla konformaatioltaan aktiivisessa tai inaktiivisessa tilassa suhteessa ligandehinsa, proteiinien funktionaalinen säätely on erityisesti kiinnostanut tutkijoita. Proteiinin vaihteleva sijainti sytosolissa (hyvin konsentroitunut vs. diffuusi, mahdollinen tumalokalisatio) viittaa siihen, että esriinin kulloisetkin sitoutumiskumppanit ja/tai konformaatio vaikuttavat esriinin sijaintiin ja sitä kautta toimintaan. Lisäksi jo esriinin varhaisissa biokemiallisissa karakterisoinneissa havaittiin myös dimeerisiä ja oligomeerisiä muotoja proteiinista, joita esiintyi myös *in vivo* (Bretscher *et al.* 1995; Berryman *et al.* 1995). Näiden muotojen merkitys ja säätely on edelleen epäselvä (ks. yksi mahdollinen malli eri muodoista, kuvio 3). Fluoresenssiresonanssienergia-tekniikalla on kuitenkin havaittu, että mahalaukun parietaalisoluissa esriinin oligomeerinen muoto solukalvolla edustaa lepäävää, inaktiivista proteiinia (Zhu *et al.* 2005). Myös ERM-proteiinien välinen heterodimerisaatio voidaan osoittaa viljellyistä soluista erilaisilla affiniteettisaostustekniikoilla, mutta tämän merkitys saattaa olla todellisuudessa pieni, koska luonnossa ERM-proteiineja ilmennetään lähinnä eri solutyypeissä ainakin normaalikudoksissa.



KUVIO 3. Malleja ERM-proteiinin sitoutumisesta itseensä ja F-aktiiniin (Turunen *et al.* 1998). A. Proteiinin monomeeri (konformaationaalisesti suljettu). B. Vastakkaisuuntainen dimeeri, jonka F-aktiinin sitoutumiskohta on peittynyt. C. Samansuuntainen dimeeri solukalvolla. D. Pää-häntä-oligomeeri solukalvolla. D-kohdassa ajatellaan myös N-terminaalisen kohdan sitovan aktiinia. Mallit ovat edelleen osittain hypoteettisia.

Molekyylin konformationaaliseen aktivoitumiseen vaikuttavat sekä treoniinifosforylaatio että fosfolipidi PI(4,5)P<sub>2</sub>:n sitoutuminen. Koko ERM-perheessä konservoitunut treoniini 567<sup>1</sup> sijaitsee C-ERMAD-domeenissa, ja sen fosforyloitumisen katsotaan johtavan N- ja C-domeenien dissosioitumiseen toisistaan. Toisaalta myös PI(4,5)P<sub>2</sub>:n sitoutuminen FERM-domeenin lohkojen väliin saattaa tuottaa vähäisiä konformaation muutoksia, jotka myötävaikuttavat molekyylin avautumiseen. Näiden tapahtumien keskinäinen järjestys ja merkitys on ollut intensiivisen tutkimuksen kohteena, mutta on jäänyt osittain avoimeksi kysymykseksi (Yonemura *et al.* 2002; Fievet *et al.* 2004; Carvalho *et al.* 2010; Bosk *et al.* 2011). Täyteen aktivoitumiseen tarvitaan luultavasti useita aktivoivia tapahtumia, koska eri säätelykohtien ja sitoutumiskohtien paljastuminen edellyttää suurta konformaatiomuutosta. Kiderakenteen perusteella myös alfa-helikaaliseen domeeniin sitoutuvien proteiinien sitoutuminen edellyttää peittyneiden hydrofobisten aminohappotähteiden paljastumista (Li *et al.* 2007). Toisaalta kokeellisesti nämä proteiinit kykenevät sitoutumaan täysipitkään esriiniin, jonka on katsottu olevan konformationaalisesti epäaktiivinen, joten molekyylin aktivoitumista ei ehkä tarvita ennen sitoutumista (Dransfield *et al.* 1997; Chirivino *et al.* 2011). Esriinin lokalisaatio solukalvolla ei näytä myöskään edellyttävän treoniinin 567:n fosforyloitumista, mutta jos treoniinin dynaaminen fosforylaatio-defosforylaatio estetään, tuloksena on poikkeavia membraanirakenteita (Zhu *et al.* 2008).

Esriinin ja ERM-proteiinien on osoitettu sijaitsevan aktiinitukirankaa säätelevän Rho-proteiiniperheen reitillä sekä ylä- että alavirtaan. ERM-proteiinit toimivat Rho-proteiinin aktiinitukirankavaikutusten efektorina (Mackay *et al.* 1997), ja Rho-kinaasi fosforyloi ERM-proteiinien/esriinin konformaation avaavan (aktivoivan) treoniinitähteen (Matsui *et al.* 1998; Tran Quang 2000). Tästä on julkaistu myös poikkeava tutkimustulos, jonka mukaan Rho-kinaasi ei kuitenkaan suoraan fosforyloi ERM-proteiineja *in vivo*, vaan kyseinen kinaasi on PI4P5K-kinaasi (Matsui *et al.* 1999). Myös PI(4,5)P<sub>2</sub> on Rho-proteiinien efektori, joten esriinin avautuminen ja aktivoituminen liittyy läheisesti Rho-signaali-reitteihin. PI(4,5)P<sub>2</sub>-reitteihin liittyy myös PKC-kinaasi, jonka eri muotojen on myös osoitettu fosforyloivan ERM-molekyylin aktivoivaa treoniinia (Pietromonaco *et al.* 1998; Ng *et al.* 2001; Wald *et al.* 2008).

Esriini havaittiin ensimmäiseksi A431-soluissa tyrosiinifosforyloituvana proteiinina EGF-stimulaation jälkeen (Hunter & Cooper 1981). Tämän fosforylaation kohteena ovat tyrosiinit 145 ja 353. Tyr145 sijaitsee FERM-domeenissa, ja tähde on konservoitunut kaikissa ERM-proteiineissa ja lisäksi joissakin muissa tämän domeenin omaavissa proteiineissa. Näiden muiden proteiinien vastaavasta tyrosiinifosforylaatiosta ei ole kuitenkaan julkaistu raportteja. Tyr353 on sen sijaan ainoastaan esriinissä esiintyvä aminohappotähde. Se sijaitsee alfa-helikaalisessa domeenissa, ja on mahdollista, että fosforyloituminen vapauttaisi alfa-helikaalisen domeenin FERM:stä ja osallistuisi siten esriinin konformatio-

---

<sup>1</sup> Tässä julkaisussa esriinin aminohapposekvenssin numeroinnissa noudatetaan perinteistä julkaisun (Krieg and Hunter, 1992) mukaista numerointia, jossa ensimmäistä (pois pilkkottavaa) metioniinia ei lasketa mukaan.

naaliseen avautumiseen (Li *et al.* 2007). Tästä ei ole kuitenkaan julkaistu mitään kokeellisia tutkimuksia.

Omissa tutkimuksissamme havaitsimme onkogeenisen Src-kinaasin fosforyloivan tyrosiinia 477 (Heiska & Carpén 2005). Tyr477 esiintyy yksinomaan esriinissä, sen liitosalueella, heti polyproliinipitoisen alueen jälkeen. Tämä sijainti on hyvin mielenkiintoinen fosforylaatiotapahtuman kannalta, sillä hyönteismoesiinien kiderakenteen perusteella tämä aminohappotähde kyettäisiin fosforyloimaan molekyylin ollessa suljetussa konformaatioissa, jolloin esriini pystyisi inaktiivisessakin muodossa rekrytoimaan signaalinvälitykseen liittyviä molekyylejä fosforyloituneen Tyr477:n kautta (esim. Fes-kinaasi, ks. julkaisu Naba *et al.* 2008).

Esriini on myös kalpaiiniproteaasin tunnettu substraatti (Yao *et al.* 1993; Shcherbina *et al.* 1999). Kalpaiinin kautta tapahtuva säädelty pilkkominen voisi olla yksi tapa esriinin toimintojen säätelyyn. Esriinin treoniini 567:n kohdalta ei-fosforyloitunut muoto näyttäisi olevan alttiimpi kalpaiinin aiheuttamalle pilkkoutumiselle, ja myös PI(4,5)P<sub>2</sub>:n sitoutuminen vähensi pilkkoutumista (McRobert 2012). Nämä havainnot viittaisivat siihen, että konformationaalisesti suljettu (inaktiivinen) proteiininmuoto olisi kalpaiinisäätelyn pääasiallinen kohde. Itse havaitsin tutkimuksissani, että tyrosiinifosforylaatio lisää esriinin kalpaiiniproteolyysiä (julkaisematon havainto).

#### 1.2.4 Esriini ja merliini

Neurofibromatoosi 2 (NF2) on kromosomissa 22 periytyvä harvinainen sairaus. Mutaatiot *NF2*-geenissä johtavat ääreishermoston hyvänlaatuisiin kasvaimiin, useimmiten molemminpuoliseen kuulohermoston schwannoomaan, joka voi johtaa kuulon menetykseen. Kun sairauden aiheuttava geeni tunnistettiin (Trofatter *et al.* 1993; Rouleau *et al.* 1993), geenin koodaaman tuumorisuppressorin homologia ERM-proteiineihin herätti suurta kiinnostusta, koska tämän ajateltiin helpottavan kasvaimen muodostumismekanismien ymmärtämistä. Lisäksi *NF2*-geeni olisi kasvunrajoitegeeniksi poikkeuksellinen, jos se todella koodaisi solukalvoa ja tukirankaa yhdistävää proteiinia. *NF2*-proteiinin nimeksi annettiin merliini (moesiin-esrin-radixin-like protein, tunnetaan myös nimellä schwannomin). Merliinin suurin rakenteellinen homologia ERM-proteiinien kanssa sijaitsee FERM-domeenissa (n. 60-prosenttisesti homologinen ihmisen esriinin kanssa). Merliinin FERM-domeeni sitoutuu moniin samoihin proteiineihin kuin ERM-proteiinien vastaava domeeni (esim. NHERF-1 ja CD44). Merliinin on myös osoitettu sitovan F-aktiinia. Vaikka merliini saattaa toimia solukalvon ja tukirangan välissä muiden ERM-proteiinien tapaan, merliinillä on myös useita muita toimintoja, jotka voivat suoremmin liittyä sen tuumorisuppressorikykyyn. Näitä ovat esim. solu-soludheesioon, solusykliin tai kasvutekijäreseptorien internalisaatioon liittyvät toiminnot. Kasvaimissa esiintyvät pistemutaatiot esiintyvät hyvin laajalti koko geenissä, ja useat niistä johtavat tyypistyneeseen proteiiniin. Merliini pystyy kokeellisesti sitoutumaan ERM-proteiineihin, mutta tämä ei ehkä ole fysiologisesti merkityksellistä kuin poikkeustapauksissa, koska

proteiineja ilmennetään harvoin samoissa soluissa, ainakaan stoikiometrisesti samoja määriä (Turunen *et al.* 1994; Bretscher 2000; McClatchey 2003).

### 1.3 Esriini ja syöpä

Esriinin esiintymistä erilaisissa kasvaimissa on tutkittu kiihtyvällä tahdilla. Esriiniproteiinin ilmentymistä on kuvattu perinteisillä immunohistokemiallisilla menetelmillä patologisista näytteistä, ja viime aikoina on otettu entistä enemmän käyttöön myös mikrosirumenetelmiä. Lähes kaikissa julkaisuissa on havaittu jonkinlainen korrelaatio esriinin lisääntyvän ilmentymisen ja kasvainmuodostuksen tai -asteen välillä, ja vakuuttavia tuloksia on esitetty esriinin ekspresion yhteyksistä nimenomaan loppuvaiheen kasvaimiin ja erityisesti metastaaseihin. Koska metastaasit aiheuttavat suurimman osan ihmisen syöpäkuolemista, tähän alueeseen kohdistuu erityistä kiinnostusta. Luonnollisesti myös läheisen sukulaisproteiinin, merliinin, toiminta tuumorisuppressorina herättää kysymyksiä siitä, miten esriini voi liittyä pahanlaatuisten kasvainten muodostumiseen.

Seuraavan sivun taulukossa 1 esitetään otos julkaisuista, jotka käsittelevät esriiniä ihmisen kasvaimissa. Merkillepantavaa on, että esriini näyttäisi liittyvän sekä sarkoomiin että karsinomiin. Suurin osa julkaisuista koskee erilaisia karsinomia. Esriinin esiintyminen erityisesti osteosarkoomassa ja sen metastaasissa on osoitettu vakuuttavasti useassa julkaisussa.



TAULUKKO 1 Julkaisuja esriinin esiintymisestä erilaisissa ihmisen kasvaimissa tai etäpesäkkeissä.

Kasvaintyyppi	Esriinin osuus	Viite
> 5 000 erilaista ihmisen syöpää	esriinin ekspressio suurempi sarkoomissa kuin karsinoomissa; selvä assosiaatio sarkoomien etenevään asteeseen ja rintasyövän huonoon hoitotulokseen (kudossiruanalyysi)	Bruce 2007
astroosytooma	lisääntynyt ekspressio korreloi astroosyyttisten kasvainten lisääntyvään maligniteettiin	Geiger 2000
astroosytooma, oligo-astroosytooma	immunovärjäys ja immunopositiivisten solujen määrä korreloi lisääntyvään maligniteettiin (kudossiruanalyysi)	Tynnin 2004
ei-pienisoluihin keuhkokarsinooma	lisääntynyt ekspressio korreloi kasvaimen asteen kanssa ja merkitsevästi imusolmukemetastaasin kanssa	Zhang 2012
GIST	huonoon ennusteeseen liittyvä tekijä	Wei 2009
hepatosellulaarinen karsinooma	ekspressio liittyy invaasioon ja dedifferentaatioon	Yeh 2009
hepatosellulaarinen karsinooma	maksasyöpänäytteiden massaspektrometriset analyysit, Thr567:n hyperfosforylaatio korreloi läheisesti invasiivisen fenotyypin ja huonon ennusteen kanssa	Chen 2011
ihomelanooma	immunovärjäyksen intensiteetti korreloi kasvaimen paksuuteen ja kasvaimen invaasioon	Ilmonen 2005
kapillaarinen hemangioblastooma	ekspressoituu diffuusisti stroomasolujen sytoplasmassa	Böhling 1996
keuhkosyöpä	ekspressio lisääntyy syövässä ja lokalisaatio muuttuu sytoplasmiseksi; ekspressio suurempi primaarikasvaimen invasiivisessa etureunassa ja suurin imusuoniston etäpesäkkeissä	Li 2012
kohdunkaulan syöpä	lisääntynyt ekspressio, merkitsevästi imusolmukemetastaasissa	Tan 2011
kolorektaalikarsinooma	prognostinen merkkiaine, korreloi kasvaimen aggressiivisuuden ja heikon ennusteen kanssa (kudossiruanalyysi)	Patara 2011
kolorektaalisyöpä	tyypillisesti sytoplasmisen värjäytyminen syöpäepiteelissä, huono eloonjääntienuste	Elzagheid 2008
kondrosarkooma	ekspression ja kasvaimen asteen välillä positiivinen korrelaatio	Söderström 2010
mahakarsinooma	ekspressio liittyy mahakarsinooman esiintymiseen ja progressioon	Zhao 2011
mahasyöpä, metastaasit ja myöhäisasteet	merkitsevästi lisääntynyt ekspressio, korreloi huonon ennusteen kanssa	Jin 2012
nenänielukarsinooma	ekspressio riippumaton prognostinen tekijä heikolle ennusteelle	Wang 2011
osteosarkooma	merkitsevä assosiaatio suuren ekspressiotason ja huonon ennusteen välillä osteosarkooma-lapsipotilailla; meta-analyyseissä esriinin voimakas ekspressio liittyy alhaiseen kokonaiselönjääntiin	Khanna 2004, Lun 2014
osteosarkooman metastaasi	esriinin Thr-fosforylaatio dynaamisesti säädeltyä erilaisten metastaasivaiheiden aikana (immunohistokemiallinen värjäys)	Ren 2009
pehmytkudos-sarkooma	positiivinen immunoreaktiivisuus korreloi lyhyempään eloonjääntiin; ekspressio korreloi merkitsevästi metastaasiin	Weng 2005
pehmytkudos-sarkooma	ekspressio ennustaa paikallisten uusiutumien ja metastaasiin kehittymistä (kudossiruanalyysi)	Carneiro 2011
pään ja kaulan alueen karsinooma	sytoplasmisen esriini korreloi huonoon ennusteeseen	Schlecht 2012
rhabdomyosarkooma	ekspressio korreloi kliinisen vaiheen etenemisen kanssa	Yu 2004
rintasyöpä vs. effuusiot	ekspressio merkitsevästi suurempi effuusioissa (siruanalyysi)	Konstantinovsky 2010
rintasyöpä vs. imusolmukemetastaasit	ekspressio lisääntynyt rintasyövässä, erityisesti imusolmukemetastaaseissa, joissa lokalisaatio muuttunut sytoplasmiseksi	Li 2008
rintasyöpä, invasiivinen	muutos esriinin lokalisaatiossa apikaalisesta sytoplasmiseksi liittyy heikkoon ennusteeseen	Sarrio 2006
rintasyöpä, paikallisesti laajalle levinnyt	isokokoisten rintasyöpien esriini voimakkaasti sytoplasmisen; tämä liittyy myös positiiviseen imusolmukestatukseen	Arslan 2012
ruokatorven levyepiteelikarsinooma	korreloi huonoon ennusteeseen	Xie 2011
seroosi munasarjakarsinooma	esriinin katoaminen liittyy heikkoon ennusteeseen	Moilanen 2003
uveamelanooma	esriinivärjäytyvyys korreloi suurempaan mortaliteettiin	Mäkitie 2001

Tässä luvussa käsittelen esriiniä koskevia tutkimustuloksia Hanahanin ja Weinbergin esittelemien syövän tunnusmerkkien kannalta. Koska solujen signalointijärjestelmät ovat niin monimutkaisia ja moniin suuntiin risteäviä, monet tutkimukset voitaisiin sijoittaa useankin tunnusmerkin alle.

### 1.3.1 Esriini ja syövän tunnusmerkit: riippumattomuus kasvusignaaleista

Kasvainsolut eivät tarvitse normaaleja ulkoisia signaaleja jakautumiseen ja solunsisäiset signaalireitit ovat muuntuneita. Monet kasvutekijäreitit liittyvät esriiniin. Koska esriini tunnistettiin tyrosiinifosforyloitavana proteiinina EGF-kasvutekijästimulaation jälkeen, on ilmeistä, että esriini on jollakin reitillä, jota pitkin EGF vaikuttaa solun toimintaan ja lopulta jakautumiseen. Myös maksasolujen kasvutekijä (HGF) välittää esriinin fosforylaatiota, ja esriinin osoitettiin olevan HGF-reseptori-tyrosiinikinaasin (c-Met) suora substraatti (Crepaldi *et al.* 1997). Lisäksi verihiiutalekasvutekijä PDGF:n aiheuttaman solunsisäisen signaalin etenemiseen tarvitaan esriiniä (Sperka *et al.* 2011).

Koska useimmiten ainakin osa solun sisältämästä esriinistä lokalisoituu solun kortikaaliselle alueelle ja voi sitoa hyvin erilaisia molekyylejä, esriini voi välittää signaaleja solun kalvoreseptoreilta solun sisälle ja aktiinitukirankaan ja muodostaa signaalinvälitykseen tarvittavan molekyylikompleksin. Tästä esimerkkinä on SOS-Ras-Raf-MAPK-kaskadi, joka on ehkä parhaiten karakterisoitu signaalivälitysreitti kasvutekijöistä tumaan. Esimerkiksi EGF, PDGF, HGF ja TNF $\alpha$  aktivoivat tämän kaskadin. Kaskadin keskeisen proteiinin, pienen G-proteiini Ras:n, aktivaation tarvitaan SOS-katalysaattoria. Tämän lisäksi kasvutekijän indusoimaan Ras-aktivaation tarvitaan esriiniä, joka tuo yhteenreseptorin koreseptoreineen, Sos- ja Ras-signaalimolekyylit sekä F-aktiinin. Esriinin tiedetään sitovan sekä Ras- että SOS-proteiinia, ja Ras-proteiinin suora interaktio esriinin kanssa on välttämätöntä Ras-aktivaatiolle (Sperka *et al.* 2011). Aiemmassa julkaisussa osoitettiin toisaalta, että merliinin tuumorisuppressori-toiminnalle keskeistä on nimenomaan Ras-signaalin estäminen. Tämä ei kuitenkaan tapahdu Ras- tai SOS-proteiiniin sitoutumalla, vaan ERM-proteiineja estämällä (Morrison *et al.* 2007). Tämä on yksi harvoista julkaisuista, joissa on osoitettu merliinin ja esriinin samanaikaiset vastakkaiset toiminnot solussa.

Esriinin on osoitettu liittyvän samantyyppisen proteiinikompleksin muodostumiseen myös HGF-kasvutekijän signaloinnissa. Esriini sitoutuu CD44-hyaluronaanireseptorin sytoplasmiseen osaan (Yonemura *et al.* 1998; Legg *et al.* 2002). CD44v6-isoformi toimii HGF-reseptorin koreseptorina, ja signaalin eteenpäinvientiin tarvitaan sekä CD44-reseptoria, Ras-aktivaatiota, esriinin sitoutumista että F-aktiinia. ERM-proteiini on Ras-aktivaation edellytys (Orian-Rousseau *et al.* 2007). Näin esriini on keskeinen tekijä, joka yhdistää solun kiinnittymiseen ja solujen jakautumiseen liittyvät solunulkoiset signaalit solunsisäisiin signaali- ja tukirankajärjestelmiin.

Näillä signaalireiteillä esriinistä alaspäin sijaitsevia molekyylejä saattaa olla erilaisia mm. kudosisäisistä ja solutyypistä riippuen. Yksi HGF-stimulaation esriinistä

riippuvainen efektoriproteiini on tyrosiinikinaasi Fes, joka sitoutuu tyrosiinista 477 fosforyloituneeseen esriiniin. Sitoutumisen seurauksena Fes sekä siirtyy solukalvolle että aktivoituu. Fes on kinaasi, joka säätelee solujen kiinnittymistä toisiin soluihin ja soluväliaineeseen. Esriinin ja Fes-kinaasin interaktio on välttämätön solun leviämiseksi ja HGF:n aikaansaamalle solujen levittäytymiselle (scattering) kollageenimatriksilla (Naba *et al.* 2008). Jo aiemmin oli osoitettu HGF:n aiheuttaman esriinin fosforylaation vaikutus polarisoituneiden epiteelisolujen migraatioon ja tubulogeneesiin (Crepaldi *et al.* 1997).

HGF-reseptorin (c-Met) ja esriinin välillä löytyi mielenkiintoinen yhteys, kun havaittiin, että esriini ubikitinyloituu WWP1-ubikitiiniligaasin kautta, jonka määrä lisääntyy rinta- ja eturauhassyövissä. Esriinin ubikitinyloatio ei kuitenkaan johda normaalilla tavalla ubikitinyloidun proteiinin hajottamiseen, vaan itse asiassa HGF-reseptorin ekspresio ja vaste HGF-stimulaatiolle lisääntyvät esriinin kautta. Tähän tarvitaan esriinimolekyylin liitosalueen PPVY<sup>477</sup>-motiivia, johon WWP1 sitoutuu (Zaarour *et al.* 2012). Näin esriinillä on siis säätelevä vaikutus HGF-reitin ylävirran signalointiin. WWP1:llä on aiemmin osoitettu olevan samanlainen vaikutus EGFR- ja ErbB2-reseptoreihin (Chen *et al.* 2008).

Monien eri solukalvoreseptorien signalointiin liittyy solunsisäinen tyrosiinikinaasi Src. Tutkimusryhmämme havaitsi Src-perheen lymfosyyttispesifisen Lck-kinaasin fosforyloivan esriiniä T-soluissa (Autero *et al.* 2003). Tämän jälkeen tutkimusta jatkettiin alustaan kiinnittyvissä soluissa, ja havaitsimme Src:n fosforyloivan esriiniä tyrosiinista 477 (Heiska *et al.* 2005). Myös tyrosiini 145 on osoitettu Src-kinaasin kohteeksi eri solutyypissä (Srivastava *et al.* 2005). Tyr477 esiintyy ainoastaan esriinissä, kun taas Tyr145 sisältyy useisiin FERM-domeeneja sisältäviin proteiineihin. Tyr477:n fosforyloituminen on todettu jo useammassa tutkimuksessa (Naba *et al.* 2008; Mak *et al.* 2012; Zaarour *et al.* 2012). Merkitys saattaa olla otaksuttua tärkeämpikin, sillä monissa aiemmissa julkaisuissa käytetty, fosfotyrosiinille 145 spesifiseksi ajateltu vasta-aine ristireagoi fosfotyrosiini Y477:n kanssa (julkaisematon havainto).

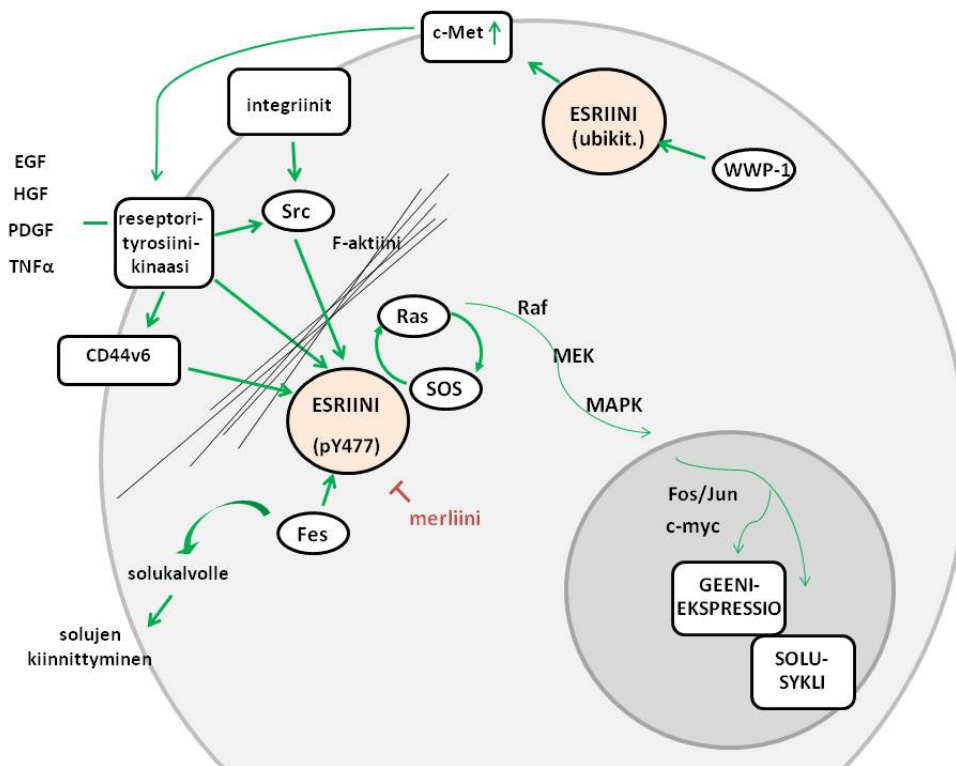
Src-kinaasi oli ensimmäinen löydetty onkogeeni, ja se on liitetty erityisesti metastaaseihin (Irby & Yeatman 2000; Frame 2002). Src:n on osoitettu aktivoituvan esimerkiksi EGFR-, p185HER2/*neu*- ja HGFR-reittien kautta erittäin metastaattisissa koolonkarsinomasoluissa (Mao *et al.* 1997). Src-perheen kinaasit paitsi fosforyloivat esriiniä, myös sitoutuvat siihen SH2-domeeninsa kautta (Naba *et al.* 2008; Srivastava *et al.* 2005). Näin esriini voi tuoda myös aktiivisen tyrosiinikinaasin muodostamiensa proteiinikompleksien osaksi ja yhdistää kompleksin F-aktiinitukirankaan. Esriinin itsensä fosforyloituminen Src:n kautta taas vaikuttaa solujen proliferaatioon 3D-kollageenilla sekä solujen leviämiseen ja fokaaliadheesioiden muodostumiseen fibronektiinillä (Srivastava *et al.* 2005). Aktiivinen Src ja esriini vaikuttavat yhdessä hiiren mammakarsinomasolujen solu-solu-kontaktien heikkenemiseen ja solujen hajaantumiseen (Elliott *et al.* 2004). Itse havaitsimme, että esriinin Tyr477:n fosforyloitumista tarvitaan, jotta solut kasvavat kudosolosuhteita muistuttavissa 3D-viljelyolosuhteissa tai alustaan kiinnittymättöminä (Matrigel-geeli, soft agar tai suspensioviljely) (I).

Signaali esriinistä alavirtaan näytti menevän mTOR-proteiinireitin kautta, jota käsitellään tarkemmin tuonnempana apoptoosin yhteydessä.

Äskettäisessä julkaisussa saatiin samantyyppiset tulokset Tyr477-fosforylaation merkityksestä, kun hiiren makkakarsinomasoluja kasvatettiin 3D-olosuhteissa. Lisäksi esriinin Tyr477-fosforylaation osoitettiin säätelevän solujen metastaattista ja invasiivista potentiaalia ja etäpesäkkeiden muodostumista keuhkoihin *in vivo* hiiren ortotooppisessa kasvainsolujen transplantaatiomallissa (Mak *et al.* 2012). Tämä on merkittävä osoitus yhden ainoan aminohapon merkityksestä keskeisillä signaalireiteillä.

On huomattava, että Src-kinaasi välittää signaaleja paitsi kasvutekijäreseptoreista, myös integriineistä (osittain fokaaliadheesiokinaasin FAK kautta). Src-kinaasista signaali lähtee alavirtaan Ras-reitin lisäksi myös PI3K-reitille, jota käsitellään tarkemmin apoptoosin yhteydessä.

Kuviossa 4 esitetään pääpiirteet esriinin toiminnoista, kun solu muuttuu normaaleista kasvusignaaleista riippumattomaksi.



KUVIO 4 Esriini ja kasvusignaalit. Esriini muodostaa molekyylikomplekseja, joiden kautta Ras-MAPK-reitin signaalit etenevät tumaan. Toisaalta esriini vaikuttaa suoraan solujen kiinnittymiseen ja leviämiseen sekä HGF-reitin reseptori-kinaasi c-Metin ekspressioon.

### 1.3.2 Esriini ja syövän tunnusmerkit: kasvua estävien signaalien välttäminen

Esriini kytkeytyy solusykliin tai solujen erilaistumiseen TGF $\beta$ -pRb-reitin kautta. Kasvunrajoiteproteiini pRb on keskeinen tekijä, joka kontrolloi solun etenemistä solusyklistä. Jos kasvaimiin viedään aktiivista retinoblastoomaproteiinia, solut siirtyvät senesenssitilaan eli poistuvat solusyklistä. Yksittäisessä julkaisussa osoitettiin, että esriinin ilmentyminen lisääntyy retinoblastoomaproteiinin aiheuttaman senesenssin aikana. Samalla CDK5-kinaasi katalysoi esriinin fosforylaatiota, mikä aiheuttaa solumuodon muutoksia esriinin lokalisaatio-muutoksen kautta. Esriinin ajatellaan siten vaikuttavan pRb:n tuumorisuppressoritoiminnassa nimenomaan tukiranka- ja adheesiovaikutustensa kautta (Yang & Hinds 2006). Vaikutus olisi siis kasvainten synnylle vastakkainen. Senesenssiin liittyviä esriinijulkaisuja on kuitenkin hyvin vähän, eikä artikkelin esittämän fosforyloituvan treoniinin (235) säätelystä ole julkaistu muita tutkimuksia.

Kasvainsolut pystyvät ohittamaan pRb:n solusyklikontrollin, mutta myös erilaistumisen. Tässä olennainen tekijä on transkriptiotekijä *c-myc*, joka on mutatoitunut monissa syövässä, mikä johtaa sen konstitutiiviseen aktiivisuuteen. *c-myc*-geenin mutaatio liittyy esimerkiksi eturauhassyövän metastaasiin. Esriiniä ilmennetään eturauhasen epiteelisoluissa androgeenihormonien vaikutuksesta, ja PKC $\alpha$ - ja Src-kinaasi aktivoivat ja fosforyloivat esriinin (Chuan *et al.* 2006). Esriinin ilmentymistä välittää *c-myc*:n sitoutuminen esriinin promoottoriin, ja ilmentyminen on välttämätöntä solujen *c-myc*-riippuvaiselle invaasiokykyille. Toisaalta esriinillä osoitettiin olevan *c-myc*:n proteiinimääriä lisäävä vaikutus (Chuan *et al.* 2010).

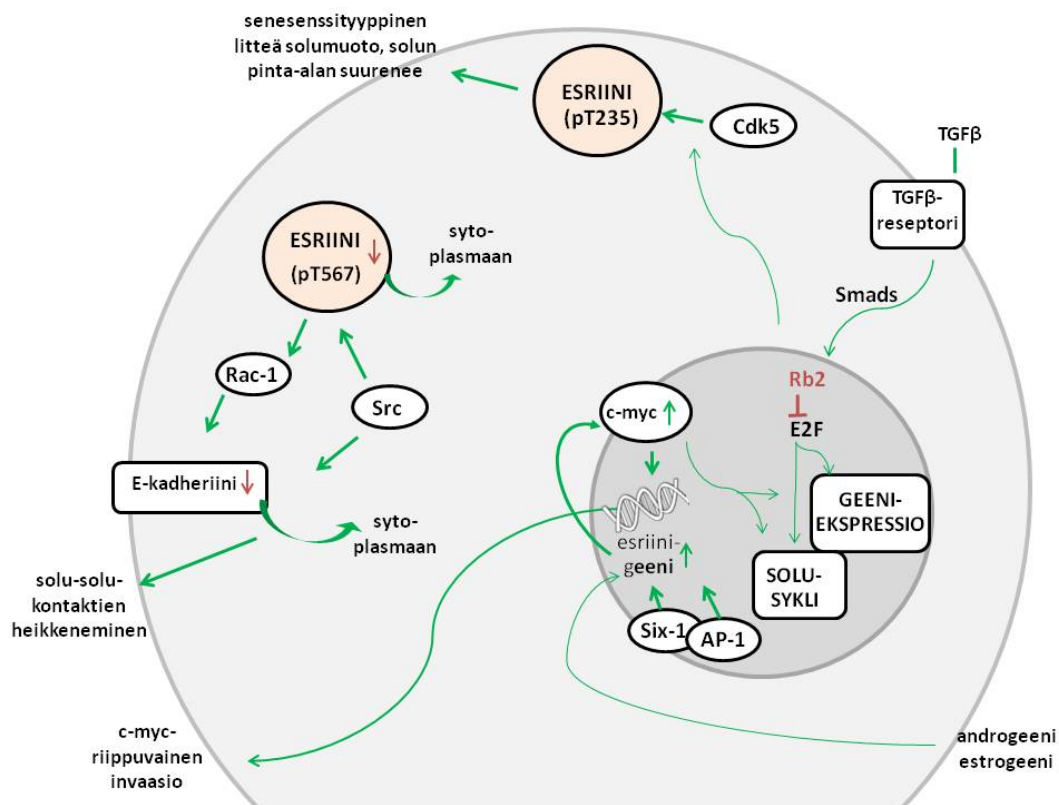
Tässä yhteydessä on kiinnostavaa, että myös estrogeenihormonin on osoitettu lisäävän esriinin ilmentymistä, ja esriinin määrä korreloi munasarjasyöpäsolujen invaasiokykyvyn kanssa (Song *et al.* 2005). Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan tutkittu, mitkä transkriptiotekijät tähän liittyvät. Solujen differentiaatioon ja proliferaatioon ja siten solusykliin liittyviä transkriptiotekijöitä ovat *c-myc*in lisäksi mm. Six-1 ja AP-1. Rhabdomyosarkoomasoluissa Six-1 säätelee suoraan esriinin ilmentymistä, joka on välttämätön solujen metastaasikykyille (Yu *et al.* 2006). AP-1:n taas on osoitettu säätelevän esriinin ekspressiota keuhkosityöpäsoluissa (Gao *et al.* 2009).

Kuten Hanahan ja Weinberg totesivat, tuumorisuppressori merliini vaikuttaa solujen kontakti-inhibitiioon E-kadheriinia säätelemällä. Myös esriinin ja E-kadheriinin suhteesta on ilmestynyt useita julkaisuja. Esriinin konformaatioltaan konstitutiivisesti avoin muoto vähentää E-kadheriinin määrää solukalvolla, E-kadheriinia kertyy solun sisään ja solu-solukontaktit heikkenevät. Tämä vaikutus johtuu Rac1-proteiinin aktivoitumisesta (Pujuguet *et al.* 2003). Myös Src-kinaasin aktivoituminen aiheuttaa E-kadheriinin internalisaatiota (Avizienyte *et al.* 2002). Esriini ja Src yhdessä heikentävät E-kadheriinista riippuvaisia solu-solukontakteja hiiren mammakarsinoomasoluissa (Elliott *et al.* 2004).

Voimakkaasti metastaattisissa rintasyöpäsoluissa esriiniproteiinin määrä on lisääntynyt ja E-kadheriinin vähentynyt, ja esriini on siirtynyt solukalvolta

sytoplasmaan. Esriinin vaimentaminen shRNA:lla vähentää solujen migrointia ja invaasiota, lisää E-kadheriinin ilmentymistä ja vähentää  $\beta$ -kateniinin fosforylaatiota, mahdollisesti Src-kinaasin kautta (Li *et al.* 2008). Lisäksi julkaisussa osoitetaan, että rintasyövän imusolmukemetastaaseissa E-kadheriinin ilmentyminen vähenee, esriinin ilmentyminen lisääntyy ja molemmat siirtyvät solukalvolta sytoplasmaan. Sama tutkimusryhmä sai äskettäin samankaltaisia tuloksia keuhkosityöpäsoluilla ja osoitti lisäksi, että E-kadheriinin ja  $\beta$ -kateniinin määrä ei muutu mRNA-tasolla, vaan muutos liittyy posttranskriptionaaliseen säätelyyn (Li *et al.* 2012). Näin esriini liittyy solujen kasvua estäviin signaaleihin sekä solusykliin että kontakti-inhibitioon osallistumalla.

Kaavakuva esriinin merkityksestä kasvua estävissä signaaleissa esitetään kuviossa 5.



KUVIO 5 Esriini ja kasvua estävät signaalit. Esriini on mukana niin solujen erilaistumisen, solusyklin kuin solu-solukontaktien säätelyssä. Retinoblastoomaproteiinin aiheuttamassa senesenssissä CDK5 fosforyloi esriinin, mikä vaikuttaa solun morfologian muutokseen (yläosa). Solusyklin keskeinen transkriptiotekijä c-myc lisää esriinin ilmentymistä, mikä johtaa positiiviseen takaisinkytkentään (keskellä). c-myc-aktivoituu mm. MAPK-reitin kautta, vrt. kuvio 4. Toisaalta esriini vaikuttaa solu-solukontakteihin E-kadheriinin kautta (vasemmalla).

### 1.3.3 Esriini ja syövän tunnusmerkit: ohjelmoidun solukuoleman välttäminen

Hanahan ja Weinberg totesivat, että apoptoosi saattaa olla tärkein keino aktiivisia onkogeenejä ilmentävien solujen poistamiseen. Esriinin on osoitettu olevan Fas-välitteisen apoptoosin negatiivinen säätelijä T-lymfosyyteissä (Parlato *et al.* 2000; Kuo *et al.* 2010). Toisaalta esriini yhdistettiin jo toistakymmentä vuotta sitten solujen eloonjäämissignaaleihin liittyvään PI3K-Akt-reittiin, joka suojaa kasvainsoluja apoptoosilta. Esriini sitoutuu PI3-kinaasin säätelevään alayksikköön (p85). Sitoutumiseen tarvitaan esriinin tyrosiini 353:n fosforyloitumista, mutta myös esriinin FERM-domeenia. Jos tyrosiini mutatoidaan, PI3-kinaasireitin keskeinen kohde, proteiinikinaasi Akt, ei voi aktivoitua (Gautreau *et al.* 2003). Tämä signaalireitti voi välittää signaaleja suoraan EGF-reseptoreista, koska EGF:n tiedetään aikaansaavan Tyr353:n fosforylaation. PI3K on soluissa hyvin tärkeä tekijä, koska se aktivoituu sekä kasvutekijä- että adheesioreseptorien stimuloinnin kautta. Myös Src-proteiinin tiedetään aktivoivan PI3-kinaasia.

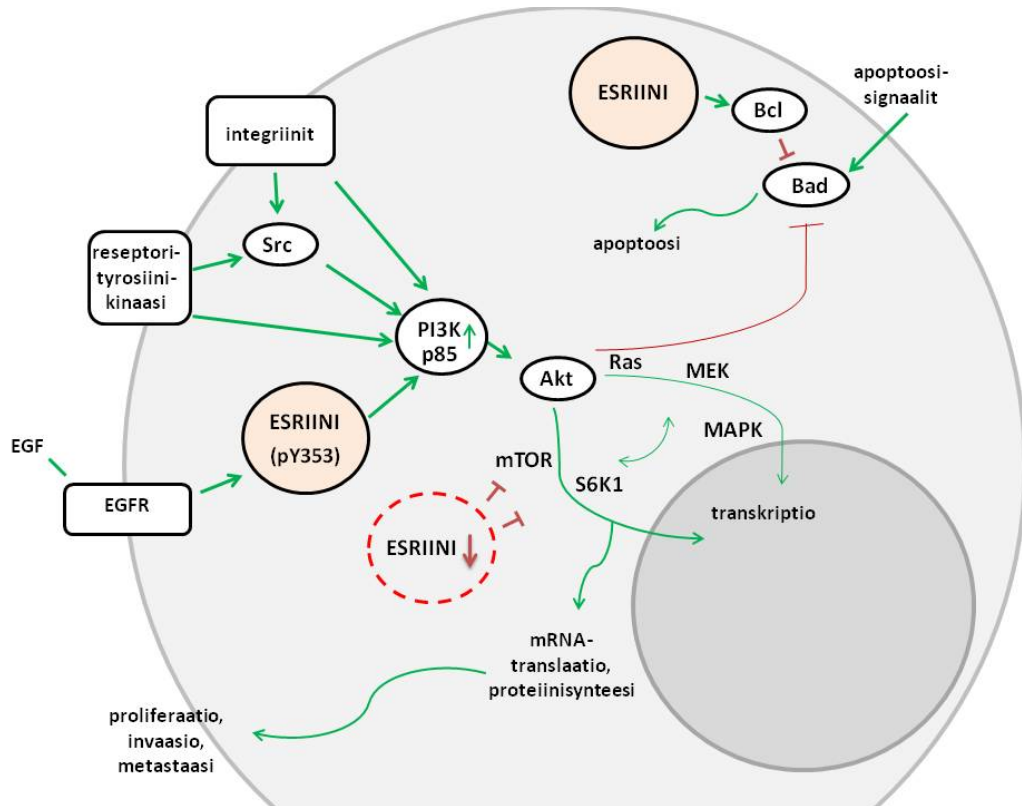
Esriini on välttämätön metastaasille hiiren osteosarkoomamallissa. Esriinin ekspressio antaa keuhkoihin eteneville soluille eloonjäämisedun. Jos esriinin ilmentyminen estetään, Akt:n fosforylaatio eli aktiivisuus vähenee. Esriinivälitteiset varhaiset metastaasit eivät kuitenkaan ole Akt:sta riippuvaisia (Khanna *et al.* 2004). Myöhemmin sama tutkimusryhmä osoitti signaalin etenevän mTOR/S6K1/4E-BP1-reittiä pitkin alavirtaan. mTOR-reitin estäminen rapamysiinillä *in vivo* sekä pidentää hiirten eloonjääntä että estää esriiniriippuvaista metastaasia merkittävästi. Esriinin estäminen (antisense-konstruktin, siRNA-konstruktin tai T567A-mutanttikonstruktin avulla) vaikuttaa sekä S6K1:n ja 4E-BP1:n määrää että niiden fosforyloitumista vähentävästi (Wan *et al.* 2005).

Lisäksi Akt/mTOR-signaalireitin merkitys on osoitettu Ewingin sarkoomasoluissa. Esriini ilmentyy niissä voimakkaasti, mutta Thr567A-mutanttin ilmentäminen hidastaa solujen kasvua. Tämä johtuu lisääntyneestä apoptoosista ja estää myös kokeellisten metastaasien syntyä *in vivo*. Vaikutus välittyy Akt/mTOR-reitin kautta (Krishnan *et al.* 2006). Myös rinta- ja eturauhassoluissa on osoitettu, että esriinin vaimentaminen vähentää Akt:n aktiivisuutta ja solujen invasiivisuutta (Sizemore *et al.* 2007).

Apoptoosimekanismien efektoreja ovat Bcl-proteiiniperheen jäsenet, joita säädellään monimutkaisen mekanismin kautta. Olli Carpénin tutkimusryhmä havaitsi positiivisen korrelaation esriinin ekspression ja antiapoptoottisen Bcl-2:n välillä kondrosarkoomissa (Söderström 2010). Maligneissa ihmisen glioomasoluissa esriinin estäminen ei muuta Akt:n fosforylaatiota, mutta vähentää Bcl-2:n ilmentymistä ja pidentää hiirten eloonjäämistä ksenograftimallissa. Bcl-2:n määrän väheneminen ei kuitenkaan vaikuttanut solujen apoptoosiherkkyteen (Wick *et al.* 2001).

Ras-MAPK- ja PI3K-mTOR-signaalinvälitysreitit ovat keskenään monimutkaisesti ristiinkytettyjä. Niissä esiintyy sekä keskinäistä kompensointia että reitinsisäistä ja reittienvälistä takaisinkytkentää (ks. katsausartikkeli (Mendoza 2011)). Eri julkaisuissa saattaakin esiintyä esriinin suhteen keskenään ristiriitaisia tai vaikeasti kokonaiskuvaan sopivia tuloksia, jotka liittyvät eri

reiteille kuuluvien molekyylien mukanaoloon. Varmaa kuitenkin on, että esriinin on osoitettu kytkeytyvän kummankin reitin hyvin karakterisoiituihin proteiineihin ja signaalinvälitykseen, vaikka näiden keskinäisiä suhteita ei luultavasti koskaan voida yksiselitteisesti osoittaa mm. kudosoerojen vuoksi. Kuviossa 6 esitetään kaavamaisesti, mitä esriinin ja apoptoosin yhteyksistä tällä hetkellä tiedetään.



KUVIO 6 Esriini ja apoptoosin välttäminen. Esriinin tyrosiinin 353 fosforyloitua (vasemmalla) esriini voi sitoutua PI3K-kinaasiin. Tämä aktivoituu ja fosforyloi solun eloonjäämisen keskeisen säätelijän, Akt:n. Useat ristikkäiset reitit johtavat solujen proliferaatioon ja toisaalta syöpäsolujen invaasioon ja metastaasiin. Jos esriiniä estetään kokeellisesti (punainen katkoviiva), mTOR-reitin signaali estyy. Esriini vaikuttaa myös antiapoptoottiseen Bcl-proteiiniin (yläosa).

### 1.3.4 Esriini ja syövän tunnusmerkit: kyky jakautua rajattomasti ja verisuonten uudismuodostus

Esriinin yhteydestä solujen rajattomaan jakautumiseen on hyvin vähän evidenssiä. Esriinin ja telomeraasin suhteista ei ole yhtään julkaisua. Joidenkin tietojen mukaan esriiniä esiintyy myös tumassa, mutta tämän merkityksestä tai tumamuodon toiminnoista on vähän tietoa. Tumalokalisatiota esiintyy kaikilla ERM-proteiineilla, ja sitä säädellään solutiheyden mukaan (Batchelor *et al.* 2004). Esriinin tumalokalisatio on osoitettu myös osteosarkoomapotilaiden kasvainnäytteistä. Näissä tumaan keskittyi erityisesti Tyr353- ja Thr567-fosforyloituneita muotoja (Di Cristofano *et al.* 2010). On tosin epävarmaa, voidaanko fosforylaatio



todella osoittaa tällä resoluutiolla immunokemiallisilla menetelmillä parafiiniin valetuista potilasnäytteistä.

Verisuonten uudismuodostuksessa merkitystä voisi olettaa olevan lähinnä moesiinilla, jota ilmennetään endoteelisoluissa, kun taas esriiniä ilmennetään normaalioloissa epiteelissä (Berryman *et al.* 1993). Joitakin esriiniin liittyviä julkaisuja on kuitenkin ilmestynyt. Tuumorinekroositekijä-alfa (TNF $\alpha$ ) on keskeinen tekijä sekä endoteelisolujen proliferaatiossa että angiogeenisissä. Tekijä vaikuttaa solusyklin säätelijäproteiinia sykliini A:ta vaimentamalla. Yksittäisessä julkaisussa osoitettiin, että TNF $\alpha$  indusoi esriinin siirtymistä tumaan ja sitoutumista sykliini A:n promoottorin repressorielementteihin. Jos esriinin toiminta estetään hiiren iskemiamallissa *in vivo*, tämä lisää endoteelisolujen proliferaatiota ja verisuonten uudismuodostumista (Kishore *et al.* 2005a). Tämän julkaisun mukaan esriinillä on siis lähinnä antiproliferatiivinen eikä niinkään syövän kehittymistä edesauttava vaikutus.

VEGF-kasvutekijän indusoimassa angiogeenisissä osoitettiin kalpaiinin aktivaatio ja kalpaiinin ja esriinin nopeasti tapahtuva kolokalisaatio solukalvolle. Kun esriini sammutettiin RNAi-menetelmällä, VEGF:n vaikutukset vähenivät. Tämä välittyi ilmeisesti AMPK/AKT/eNOS-reitin kautta (Youn *et al.* 2009).

VEGFR-2:n kautta tapahtuva signaalinvälitys on yhdistetty jo aiemmin kasvutekijäsignaaloinnin kohdalla mainittuun CD44v6-solukalvoproteiiniin, joka toimii endoteelisoluissa paitsi HGFR:n, myös VEGFR-2:n koreseptorina. Molempien välittämä signaali edellyttää esriinin sitoutumista CD44:n solunsisäiseen osaan ja CD44v6:n kytkeytymistä solutukirankaan. Näin esriinin muodostama proteiinikompleksi osallistuu endoteelisolujen migraatioon, versomiseen ja tubulusmuodostukseen (Tremmel *et al.* 2009).

### 1.3.5 Esriini ja syövän tunnusmerkit: kyky tunkeutua kudokseen ja muodostaa etäpesäkkeitä

Esriini on liitetty useissa julkaisuissa toisaalta solujen migraatioon ja invaasiokykyyn, toisaalta kasvainten etäpesäkkeisiin (ks. taulukko 1) tai kokeellisiin metastaaseihin. Koemalleina ovat olleet esim. osteosarkooman keuhkometastaasi koirilla (Khanna *et al.* 2004), levyepiteelikarsinoomasolujen luumetastaasi hiirillä (Deng *et al.* 2007), makkarsinoomasolujen erilaiset metastaasit hiirillä (Elliott *et al.* 2005), hepatokarsinoomasolujen metastaasinodulit hiirillä (Chen *et al.* 2011), Ewingin sarkooman keuhkometastaasi hiiren häntäinjektiosta (Krishnan *et al.* 2006) sekä makkarsinoomasolujen lokaalinen invaasio ja metastaasi hiirillä (Mak *et al.* 2012). Etäpesäkkeen syntyyn liittyy monia erilaisia vaiheita, joihin metastaattinen proteiini voi vaikuttaa. Solujen irtautuminen ja liikkuminen primaarikasvaimesta, tunkeutuminen veri- tai imuteihin (intravasaatio), siirtyminen uuteen ympäristöön ja edelleen uuteen kudokseen (ekstravasaatio), sopeutuminen vieraaseen kasvupaikkaan ja uuden kasvun aloittaminen (kolonisaatio) edellyttävät soluilta monia erilaisia ominaisuuksia. Metastaasi on erittäin tehoton prosessi. Arvioidaan, että alle 0,01 % verenkiertoon päätyvistä syöpäsoluista lopulta muodostaa metastaaseja (Chambers *et al.* 2002). Etäpesäkkeen muodostumisen nopeutta rajoittavana

vaiheena ovat mikrometastaasin muodostuminen ja (vielä tätäkin enemmän) makrometastaattinen kolonisaatio. Etäpesäkkeet saattavatkin kehittyä makroskooppisiksi vasta vuosia primaarikasvaimen poisleikkauksen jälkeen. Silti etäpesäkkeet muodostavat ylivoimaisesti suurimman osan syöpäkuolleisuudesta. Koska esriini on liitetty voimakkaasti nimenomaan tähän syövän tunnusmerkkiin, joka on myös syöpähoitojen kannalta erittäin ratkaiseva, käsittelen etäpesäkkeen syntymisen eri vaiheita toisaalta yleisesti, toisaalta esriiniin liittyen. Tämä metastaasin eri vaiheiden jaottelu on osittain keinotekoinen, ja monet esriinitutkimuksista käsittelevätkin yhtä aikaa useita etäpesäkkeisiin liittyviä ilmiöitä.

### 1.3.5.1 Metastaattisen solun irtautuminen primaarikasvaimesta ja tunkeutuminen kudokseen

Jopa aggressiivisten primaarikasvainten sisällä on suhteellisen vähän liikkuvia soluja. Silti kasvaimesta voi vapautua verenkiertoon miljoonia soluja vuorokaudessa (ks. esim. katsausjulkaisu Sahai 2007). Solun irtautumiseen primaarikasvaimesta vaikuttavat kasvaimiin usein liittyvät makrofaagit, jotka tuottavat soluja houkuttelevien molekyylien gradientteja, esim. EGF-gradientteja. EGF-reseptoreja yliekspressoivat solut ovat liikkuvampia kuin kontrollisolut, ja lisäksi tämä korreloi lisääntyneeseen metastaattiseen potentiaaliin (Xue *et al.* 2006).

Primaarikasvaimesta irtoamisessa ja kudokseen tunkeutumisessa adheesioon ja liikkuvuuteen liittyvien reittien merkitys on luonnollisesti suuri. Invasiivien syöpäsolujen on havaittu käyttävän ainakin kolmea erilaista liikkumistapaa: liikkumista solujoukkona, liikkumista yksittäisinä fibroblastoidityyppisinä soluina tai liikkumista pyöreänä, yksittäisenä soluna amebamaisesti (ks. esim. katsaukset Sahai 2007; Alexander & Friedl 2012). Solut kykenevät myös muuttamaan liikkumismuotoa, jos esimerkiksi proteaasiaktiivisuus estetään. Yksittäisissä julkaisuissa esriinin on osoitettu liittyvän kaikkiin näihin syöpäsolujen liikkumistapoihin.

Invaasioprosessiin liittyvää solujen liikkumista ja muotoa säätelevät mm. Rho-perheen pienet G-proteiinit (Rho-, Rac- ja Cdc42-alaperheet) aktiinitukirangan kautta. Näiden G-proteiinien säätelyyn liittyy monimutkainen inhibitoristen ja aktivoivien tekijöiden joukko. Rho-GDP-dissosiaatiotekijä (Rho GDI) muodostaa kompleksin Rho-proteiinien inaktiivisen, GDP-nukleotidiin sitoutuneen muodon kanssa, jolloin Rho:ta aktivoivat tekijät eivät pysty aktivoimaan Rho-proteiinia. ERM-proteiinien FERM-domeenin on osoitettu sitoutuvan RhoGDI-proteiiniin, jolloin sen inhibitorinen vaikutus Rho-proteiiniin nähdessä loppuu ja Rho-reitti aktivoituu (Takahashi *et al.* 1997). Myös Rac1-proteiinin esriinivälitteinen aktivaatio on osoitettu (Pujuguet *et al.* 2003, ks. edellä luku 3.2). Koska Rho-kinaasi näyttää suoraan fosforyloivan esiiniä (ks. luku 2.3), esriini toisaalta säätelee Rho-perheen signaalireittiä, toisaalta on sen kohteena omassa aktivoitumisessaan.

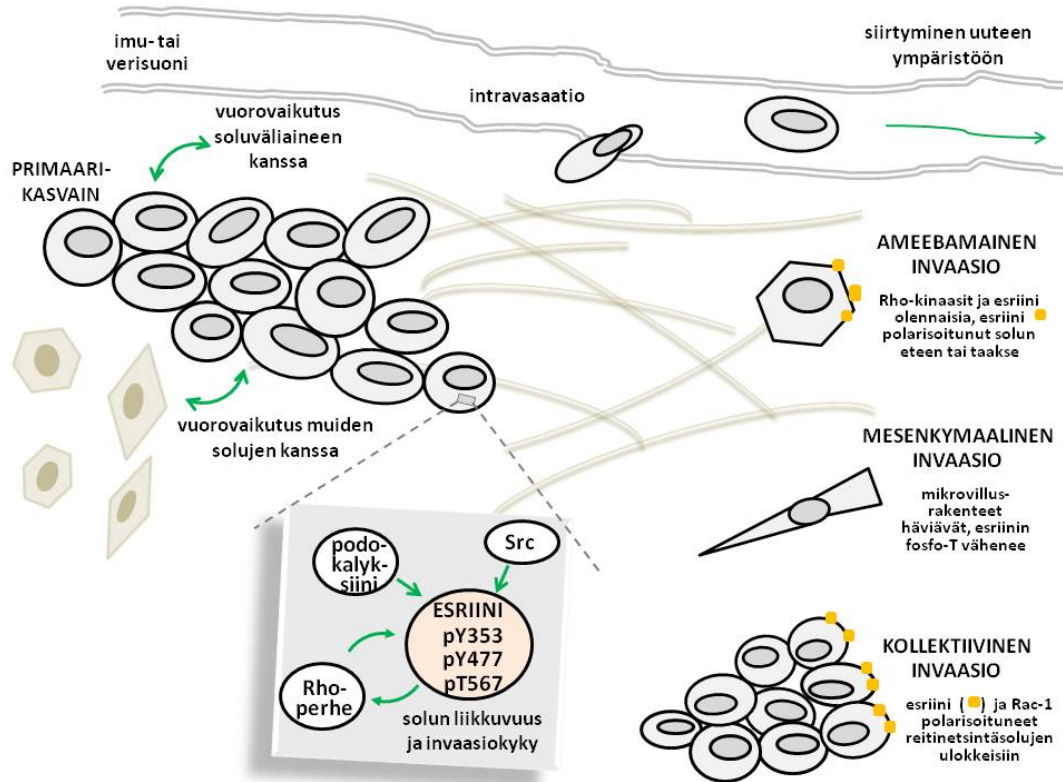
Syöpäsolujen liikkuaessa kollektiivisena ryhmänä solut ovat toisiinsa kiinnittyneitä ja niillä on monisoluinen polariteetti ja kolmiuloitteiset fokaaliadheesiot soluja ympäröivään väliaineeseen. Hidasta kollektiivista

invaasiota, jota patologit havaisevat syöpänäytteistä, ei ole helppoa havaita esim. intravitaalmikroskopialla, koska kuvantamista pitäisi tehdä pitkiä aikoja (Sahai 2007). Solujen liikkumista kollektiivisena massana on tutkittu soluviljelmässä erilaistuneilla hepatosyyteillä. TGF $\beta$ -stimulaation on havaittu aikaansaavan muutoksen niiden integriineissä ( $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integriini alkaa ilmentyä solukalvolla) ja kiinnittymisessä (solut alkavat myös syntetisoida fibronektiiniä, joka on  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-integriinin ligandi). Solut irtoavat viljelyalustasta lähes kokonaan ja muodostavat tiiviin pallon, mutta ajan kuluessa solut leviävät ja kiinnittyvät uudelleen. Solut liikkuvat n. 20–30 solun joukkiona siten, että joukon kärjestä työntyvät reitinetsintäsolut, jotka määräävät liikkeelle jatkuvan ja selvän suunnan. Esriini on polarisoitunut solukalvon ulokkeisiin, jotka ovat liikkeeseen nähden edessä. Tämä esriinin polarisaatio korreloi Rac1:n aktiivisuuteen (Binamé *et al.* 2008).

Liikkuvuuteen ja invaasioon liittyy epiteeli-mesenkymimuutos EMT, jossa epiteelisolujen muuttuvat mesenkymaaliseen suuntaan, jolloin epiteelisolujen polariteetti häviää ja solut muuttuvat sukkulamaisiksi ja erittäin liikkuviksi (ns. fibroblastoidi liikkuvuus). Liikkumiseen vaikuttavat väliainetta hajottavat aktiiviset proteaasit, joiden avulla solut pääsevät vapaammin etenemään soluväliaineessa. EMT:tä välittävät ainakin useat Ras-kinaasista lähtevät signaalireitit. Esriinistä on yksi julkaisu, jossa esriini liitetään EMT:hen, jota mitattiin maksasoluista lähinnä mikrovillusten esiintymisen perusteella. MAP-kinaasin inhibiittorit vähentävät esriiniproteiinin määrää, mutta samaa muutosta ei esiinny RNA-tasolla. Koska esriini liittyy yleisesti mikrovillusrakenteiden organisoitumiseen, esriinin häviäminen epiteelisolujen mikrovillusrakenteiden vähentyessä ei sinänsä ole yllätys. Julkaisussa osoitetaan, että yksi EMT:hen liittyvä mekanismi on esriiniproteiinin MAP-kinaasin kautta välittyvän fosforylaation häviäminen (Lan *et al.* 2006).

Solujen on havaittu etenevän kudoksissa myös ameebamaisella tavalla, jolloin solut eivät käytä etenemiseen proteaasien apua, vaan pujahtavat yksittäin soluväliaineen läpi. Tämä ilmiö ei ole kovin hyvin tunnettu. Nämä solut liikkuvat erittäin nopeasti kollageenisäikeitä pitkin eivätkä muodosta klassisia fokaaliadheesioita, joiden kypsyminen vie minuutteja. Soluilla ei myöskään ole stabiilia polariteettia. Rho-kinaasit ovat keskeisiä ameebamaisessa liikkeessä *in vivo*. Esriini lokalisoituu ameebamaisella tavalla liikkuvissa soluissa voimakkaasti liikkeen suuntaan, ja liike estyy esriiniä tai Rho-signaalireittiä estämällä (Sahai & Marshall 2003). Toisen tutkimuksen mukaan esriiniä tarvitaan melanoomasolujen ameebamaiseen invaasioon, mutta esriini konsentroituu näissä soluissa liikkuvan solun takaosan uropodirakenteeseen (Lorentzen *et al.* 2011).

Kuviossa 7 esitetään yhteenveto syöpäsolujen erilaisista invaasiotavoista ja esriinin osuudesta niissä.



KUVIO 7 Esriini ja kyky tunkeutua kudokseen. Alaosan inserttinelio kuvaa solutason tapahtumia.

Metastaattiseen invaasioon liittyvinä tutkimusmenetelminä on käytetty solujen jakamista kolmiulotteisiin väliaineisiin, joiden on katsottu jäljittelevän kudolosuhteita paremmin kuin solujen kasvatus normaaleilla kaksiulotteisilla viljelyalustoilla (ks. esim. epietisolusta Schmeichel & Bissel 2003; Debnath & Brugge 2005). Näissä julkaisuissa esille tulleet esriinin kanssa vuorovaikutuksessa olevat proteiinit ovat paljolti samoja kuin edellisissä kappaleissa esitellyt. Esimerkiksi rintasyöpäsoluissa on osoitettu, että estrogeeni aiheuttaa esriinin aktivoitumisen (Thr567-fosforylaatio) ja lisää solujen horisontaalista migrointia ja invaasiota kolmiulotteisissa viljelymatrikseissa. Tämä voidaan estää esriinispesifisellä siRNA-menetelmällä (Zheng *et al.* 2011). Esriinistä riippuvainen syöpäsolujen invaasiokyky Matrigel-soluväliaineessa on osoitettu julkaisussa I sekä julkaisuissa Elliott *et al.* 2005; Chuan *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011; ja Mak *et al.* 2012.

Adheesioon ja liikkuvuuteen liittyvien geenien merkitys metastaasissa havaittiin tutkimuksessa, jossa verrattiin rintakarsinomia ja niiden effuusioita (nestepurkautumia) geeniekspressioanalyysillä. Effuusioiden esiintyminen liittyy potilaan nopeaan kuolemaan. Esriinin ilmentymisen havaittiin lisääntyvän effuusioissa merkitsevästi primaarikasvaimiin verrattuna (Konstantinovskiy *et al.* 2010). Kiinnostavasti mTOR-reitin inhibitorinen tekijä TSC1 (tuumorisuppressori-proteiini hamartiini) vastaavasti vähenee. Aiemmin on osoitettu, että esriini ja muut ERM-proteiinit sitoutuvat tähän tuumorisuppressoriin (Lamb *et*

al. 2000). Tämä sitoutuminen tarvitaan Rhon aktivoitumiseen ja fokaali-adheesioiden muodostumiseen. Konstantinovskyn artikkelissa todetaan, että esriinin lisääntynyt ilmentyminen effuusioissa on myös yhteydessä lyhyempään taudittomaan elinaikaan, mutta tuloksia ei esitetä.

Effuusioihin liittyy myös p130Cas-proteiinia ilmentävän *BARC1*-geenin aktivoituminen. Sama tutkimusryhmä julkaisi myöhemmin kiinnostavia tuloksia erittäin metastaattisesta rintasyöpälinjasta, joka pystyy muodostamaan Matrigel-matriksissa invasiivisia kolonioita, jotka lähettävät matriksiin satelliittikolonioita. Samoissa viljelyoloissa ei-metastaattiset rintakudossolut organisoituvat normaalia kudoserakennetta muistuttavaksi rauhasrakkularakenteeksi. Esriinin ilmentyminen lisääntyy metastaattisessa linjassa viljelyn kuluessa, kun taas E-kadheriinia esiintyy vain organisoituneissa soluissa. Metastaattisten solujen invasiivista kykyä voidaan vähentää sammuttamalla p130Cas- ja esriiniproteiinin ekspressio. Esriinin vähentäminen ei kuitenkaan yksistään riittänyt siihen, että rakenteet muuttuisivat takaisin organisoituneiksi (Konstantinovsky *et al.* 2012).

Samantyyppisiä invasiivisia kolonioita muodostuu voimakkaasti metastaattisista hiiren makkarsinoomasolulinjoista. Y477F-esriinikonstruktion yliekspressoiminen (esriinin kokonaismäärä soluissa n. kolminkertainen) estää kolonioiden invaasion matriksiin ja hidastaa migraatiota. Nämä solut eivät myöskään kykene tunkeutumaan ympäröivään stroomaan ja kudokseen *in vivo*, kun soluja ruiskutetaan hiiren makkakudokseen, toisin kuin villityyppistä esriiniä normaalimäärässä ilmentävät solut. Tämä mutaatio vähentää myös keuhkometastaasien määrää, mutta ei vaikuta primaarikasvaimen kasvuun (Mak *et al.* 2012).

Monissa syövässä esriinin lokalisaation havaitaan muuttuvan apikaalisesta diffuusiksi ja sytoplasmiseksi (esimerkiksi keuhkosyöpä, invasiivinen rintasyöpä sekä pään ja kaulan alueen syövät, Li *et al.* 2012, Sarrío *et al.* 2006, Schlecht *et al.* 2012). Tämä muutos voi korreloida myös huonoon ennusteeseen. Esriinin epätyypillistä sytoplasmista lokalisaatiota voidaan jopa pitää isokokoisena, paikallisesti edenneen rintasyövän (LABC) markkerina (Arslan 2012). Toisaalta esriinin määrä lisääntyy yksittäisissä invasiivisissa syöpäsoluissa, syövän invasiivisessa reunassa ja etäpesäkkeissä, ja lokalisaatio voi jälleen muuttua takaisin solukalvolle (Li *et al.* 2012, Elgazheid *et al.* 2008). Näiden lokalisaatiomuutosten mekanismin tunteminen olisi tärkeää esriinin syöpäkytkennän ymmärtämiseksi. Sytoplasmisen esriini todennäköisesti helpottaa syöpäsolun irtautumista ympäristöstään ja mahdollisesti myös liikkumista. Invasiivisessa reunassa esriiniä tarvitaan jälleen aktiinitukirangan ja solukalvon kytkemiseen, kun invasoivat solut etsivät ja avaavat reittiä eteenpäin. Kuten aiemmin todettiin, esriini vaikuttaa esimerkiksi adheesiivisen E-kadheriinin määrään solukalvolla ja  $\beta$ -kateniinin fosforylaatioon Src-kinaasin kautta (Li *et al.* 2008 ja 2012, Srivastava *et al.* 2005), jotka ovat invaasioon ja metastaasiin voimakkaasti liittyviä ilmiöitä. Esriinin lokalisaatioon vaikuttavia tekijöitä ei ole kuitenkaan tutkittu perusteellisesti, vaikka niiden ymmärtäminen voisi auttaa myös invaasiomekanismin ymmärtämistä.

Yksi mahdollinen esriinin lokalisaatioon vaikuttava tekijä on anti-adheesiivinen sialomusiini podokalyksiini, joka on liitetty aggressiivisiin syöpiin

ja muodostaa kompleksin esriinin kanssa. Podokalyksiinin kokeellinen ilmentäminen aiheuttaa esriinin siirtymisen solu-solukontakteihin ja lisää esriinin fosforylaatiota (Tyr353). Yhdessä nämä tapahtumat lisäävät MAPK- ja PI3K-reittien signalointia ja solujen invaasiokykyä (Sizemore *et al.* 2012).

### 1.3.5.2 Uuteen paikkaan kulkeutuminen, ekstravasaatio ja kolonisaatio

Metastaattiset solut etenevät muita soluja helpommin verisuoniin ja kestävät suonissa esiintyvää leikkaavaa virtausrasitusta paremmin (Wyckoff *et al.* 2000). Yleensä solut säilyvät verenkierron enintään muutamia tunteja. Nykykäsityksen mukaan eri metastaattiset kloonit kykenevät kolonisoimaan vain tiettyjä kudostyyppisiä, ja suurin osa verenkiertoon päässeistä soluista kuolee, koska niillä ei ole kudostyyppiin sopivaa oikeaa biologista ohjelmaa, jotta ne etenisivät kaikkien ekstravasaatiovaiheiden läpi (Bustelo 2012). Vielä ekstravasaation jälkeenkin solut saattavat kuolla tai jäädä lepotilaan, jos oikeita biologisia olosuhteita etäpesäkekasvuun ei ole (Bustelo 2012). Tietty syöpäkasvaimet metastasoituvat mieluiten tiettyihin sekundaarikohtiin (tropismi). Tämä ei välttämättä ole pelkästään imu- ja veriteiden mallista riippuvaista. On esimerkiksi havaittu, että TGF $\beta$ -signalointi on voimistunut niissä rintasyöpäsoluissa, jotka metastasoituvat luuhun, mutta ei niissä, jotka kolonisoivat lisämunuaisen (Kang *et al.* 2005). Itse ekstravasaatio on huonosti tunnettu, aktiivinen prosessi. Osa metastaattisista soluista voi proliferoitua jo suonen sisällä, jolloin lisääntyvä massa saattaa rikkoa endoteelin ja solut pääsevät kudokseen. Kolonisaatio on vielä intravasaatiotakin tehottomampaa: arvioidaan, että useimmat solut kuolevat apoptoosin kautta 24 tunnin sisällä ekstravasaatiosta (Chaffer & Weinberg 2011). Kolonisaatiomekanismeja ei juurikaan tunneta. Ratkaisevia vaikuttavat olevan syöpäsolun ja solunulkoisen väliaineen vuorovaikutukset; invaasiokohdan väliaine poikkeaa usein huomattavasti primaarikasvaimen väliaineesta sekä rakenteensa että sisältämiensä kasvutekijöiden suhteen. Myös ympäröivät kudosspesifiset, immuunipuolustukseen liittyvät ja endoteelin solut ovat erilaisia kuin primaarikasvaimen vastaavat (Shibue & Weinberg 2011). On esitetty ajatuksia esim. premetastaattisesta nichestä ja primaarikasvaimeen takaisin palaavista syöpäsoluista, jotka osaltaan 'valmistelevat' tiettyjen syöpäsolutyypin kolonisoitumista tiettyihin kudoksiin, tai kasvainten kantasolujen merkityksestä kolonisaatiossa, mutta nämä ovat suurimmaksi osaksi vielä hypoteesejä. Kudostyyppillä on suuri merkitys syöpätyyppien kehittämisessä mikrometastaasiksi. Vaikka Src-kinaasin aktiivisuutta ei tarvita rintasyöpäsolujen metastasoimisessa luuhun tai keuhkoihin, kinaasin merkitys on ratkaisevaa syöpäsolujen eloonjäännille luussa, mutta ei keuhkoissa. Luuytimessä rintasyöpäsolut kuolevat ilman Src-aktiivisuutta (Zhang *et al.* 2009).

Esriinin merkitys kolonisaatiossa on osoitettu aiemmin mainituissa kokeellisissa metastaasimalleissa, mutta itse mekanismit ovat suurelta osalta tuntemattomia. Osteosarkoomamallissa on tutkittu esriinin treoniini-fosforylaatiota, joka on PKC-kinaasin dynaamisesti säätelämä metastaasin edetessä. Kun metastaasisolut saapuvat keuhkoihin, esriini on aluksi fosforyloitunut (Thr567), mutta vain invasiivisen rintaman etureunassa, jossa myös PKC ilmentyy. Tämä esiintymistapa näyttää pitävän paikkansa myös

ihmispotilaiden keuhkojen etäpesäkenäytteissä. Treoniinifosforylaatio häviää hetkeksi metastaasiprosessin jatkuessa, mutta ilmaantuu uudelleen, kun metastaasi on kasvanut suuremmaksi, edelleen pesäkkeen invasiivisessa etureunassa (Ren *et al.* 2009). Tämä mielenkiintoinen tulos osoittaa, että metastaasi on prosessi, jonka kuluessa solut tarvitsevat erilaisia ominaisuuksia, ja tämä voidaan aikaansaada vain tarkasti säädellyllä tavalla.

Sama tutkimusryhmä jatkoi tätä tutkimusta ekspressoimalla esriinimutantteja, joiden ajatellaan edustavan konstitutiivisesti avointa (T567D) tai konstitutiivisesti suljettua esriinimolekyyliä (T567A). Tulokset eivät ole aivan samantyyppisiä kuin edellä mainitussa tutkimuksessa, sillä kumpikaan konstruktio ei pysty tuottamaan metastaaseja, eikä T567D-konstruktio pysty tuottamaan edes primaarituumoreita. Tämä osoittaa edelleen, että fosforylaation on oltava dynaamista. T567A-konstruktio kantavat solut joutuivat apoptoosiin jo varhain saapuessaan keuhkoihin, ja artikkelissa tämän syyksi osoitetaan hapenkulutuksen ja glykolyysin väheneminen (Ren *et al.* 2012). Tämä on ainoa julkaisu, jossa esriini liitetään suoraan syöpäsolujen energiametaboliaan, joka siis oli Hanahanin ja Weinbergin mukaan yksi uusista, esille nousseista syövän syntyä edesauttavista tekijöistä.

Nykytutkimuksessa voidaan käyttää mikrodisektiotekniikkaa esimerkiksi etäpesäkkeiden analysointiin. Etäpesäkkeelliset ja etäpesäkkeettömät haimasyöpänäytteet eroteltiin mikrodisektiotekniikalla ja näytteiden proteiiniprofiileja verrattiin DIGE-ajossa (differentiaalinen geielektroforeesi), joka analysoitiin massaspektrometrialla (Cui *et al.* 2008). Tulokset varmistettiin perinteisimmillä menetelmillä, ja yllättäen havaittiin, että radiksiinilla ja moesiinilla, mutta ei esriinillä, on merkitsevästi lisääntynyt ekspressiotaso metastaattisissa syövässä. Esriinin kohdalla on kuitenkin kiinnostavaa, että 2D-geelissä havaitaan kaksi täplää, joista happamampi (fosforyloitunut) muoto on vähentynyt ja emäksisempi (ei-fosforyloitunut) lisääntynyt metastaasipositiivisessa haimasyöpäryhmässä. Muilla menetelmillä ei voida erottaa muuta kuin kokonaisproteiinin määrä. Immunohistokemiallisen värjäyksen perusteella esriinimäärä on suuri sekä imusolmukemetastaasin suhteen positiivisissa että negatiivisissa syövässä. Tämäkin tulos osoittaa, miten tärkeää on pystyä havaitsemaan eroja proteiinien funktionaalisissa tiloissa, jotta signaalireiteillä dynaamisesti säädelyjen molekyylien ajallista ja paikallista merkitystä voitaisiin todella arvioida. Tämä on erityisen tärkeää, kun tutkitaan etäpesäkkeiden muodostumista, koska mikroympäristö on niin oleellinen tekijä yksittäisten invasoivien solujen ja mikrometastaasien kohtalolle.

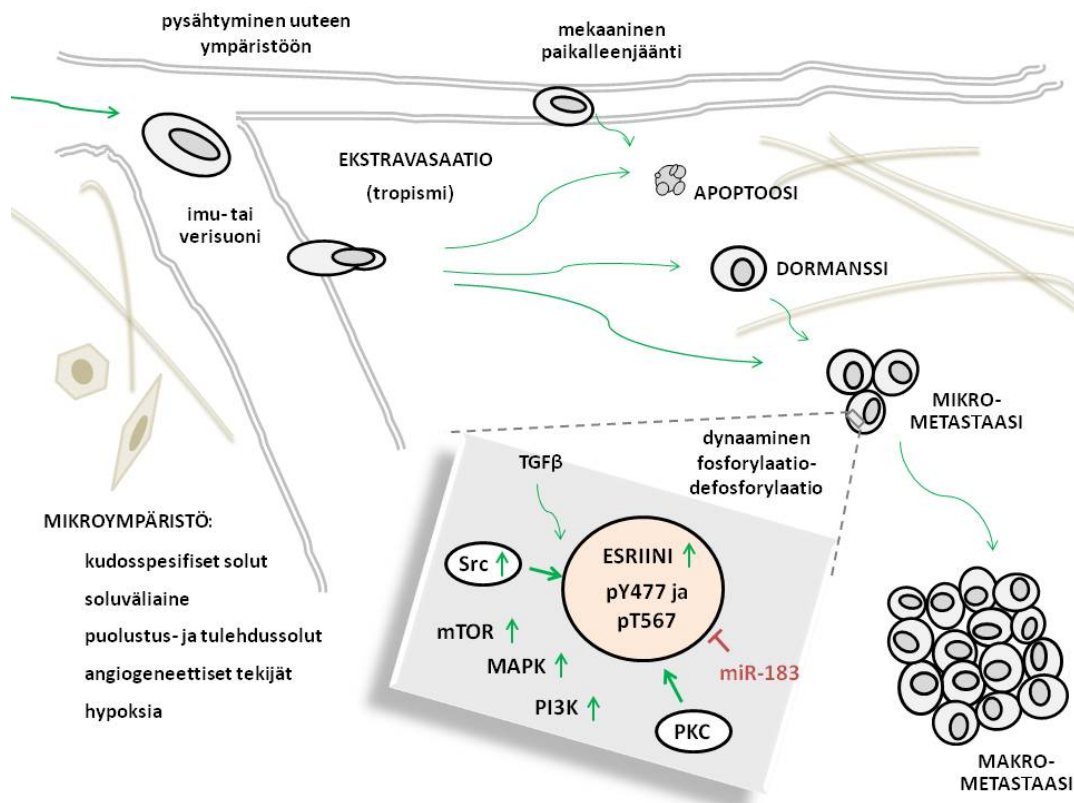
Yhdessä siruanalyysitutkimuksessa on tutkittu solun geeniekspression muuttumista metastaattisessa mikroympäristössä (Deng *et al.* 2007). Keuhkosityöpäsolujen luometastaasia tutkittiin keuhkojen levyepiteelisyöpäsoluilla, joita viljeltiin vastasyntyneen hiiren pääkallossa. Yhdeksän geenin ekspressio lisääntyy, ja näihin kuuluvat mm. CD44, luuta hajottava paratyroidihormonin sukuinen proteiini (PTHrP) ja esriini. Tulokset varmistettiin hiirimallissa, jossa esriinin ja PTHrP:n lisääntyminen luometastaasissa havaitaan myös käänteis-PCR:n ja immunohistokemian tekniikoilla. Myös aikuisen hiiren pitkien luiden kanssa viljellyissä keuhkosityöpäsoluissa esriinimäärä lisääntyy

noin 3,5-kertaiseksi lähtötasoon verrattuna, kun taas munuais- tai maksakudoksen kanssa esriinimäärä ei lisäännä ja keuhkokudoksessa lisäys on noin 1,8-kertainen. TGF $\beta$ -stimulaatio lisää esriinin määrää näissä soluissa, joten on mahdollista, että PTHrP:n luuta hajottava vaikutus vapauttaa tätä kasvutekijää, jolloin esriinin määrä soluissa lisääntyy. Tämä on ainoa tämän tyyppinen tutkimus, jossa on suoraan katsottu mikroympäristön vaikutusta esriinin määrään metastasoivassa solussa.

Lisäksi on ilmestynyt julkaisuja esriinin liittymisestä yleisesti metastaasiin. Viime aikoina on löytynyt yhä enemmän todisteita erilaisten syöpien säätelystä pienten, ei-koodaavien mikro-RNA:iden kautta. Esimerkiksi miR-183:n on osoitettu yliekspressoituvan erilaisissa kasvaintyypeissä, joissa se säätelee mm. EGFR1-reseptoria (Sarver *et al.* 2010). miR-183:n ilmentymisellä on havaittu olevan käänteinen korrelaatio suhde esimerkiksi keuhkosyöpäsolujen metastaattisen kyvyn kanssa, ja miR-183:n ektooppinen ilmentäminen estää erittäin metastaattisten keuhkosyöpäsolujen migraatiota ja invaasiota. miR-183:n kohteena on esriini (Wang *et al.* 2008). Osteosarkoomakudoksissa miR-183:n ilmentyminen on merkitsevästi vähentynyt, mikä korreloi osteosarkooman keuhkometastaasiin ja paikallisen uusiutumisen esiintymiseen. Ektooppisesti ilmentetty miR-183 estää osteosarkoomasolujen migraatiota ja invaasiota. Esriini on näissä soluissa miR-183:n suora kohde, ja esriinin vaimentaminen vähentää fosforyloituneen p44/42:n määrää (Zhu *et al.* 2012). Rintasyöpäsolut ovat kolmas syöpäsolutyyppi, jossa miR-183:n kohteena on esriini. miR-183:n yliekspressio estää rintasyöpäsolujen migrointia, mutta ei vaikuta proliferaatioon tai apoptoosiin (Lowery *et al.* 2010).

Kuviossa 8 esitetään kaavamainen kuva kolonisaatiotapahtumista ja esriinin merkityksestä.





KUVIO 8 Esiini ja kolonisaatio. Alaosan inserttinieliö kuvaa solutasen tapahtumia.

Esiinigeenin epigeneettisen säätelyn yhteys metastaasiin osoitetaan julkaisussa, jossa erittäin metastaattisten rhabdomyosarkoomasolujen suuri esiinipitoisuus liittyy esiinigeenin asetylaatioon ja metylaatioon. Nämä muutokset korreloivat esiinin ilmentymiseen. Vähäisiä esiinimääriä ilmentävien solujen metastaasipotentialia voidaan lisätä hiirissä *in vivo*, kun esiinin ekspressio indusoidaan käsittelemällä kasvainsoluja epigeneettisiä tekijöitä estävillä aineilla (Yu *et al.* 2010).

Yllättäviä tuloksia saatiin tutkimuksesta, jossa verrattiin esiiniä paljon tai vähän ilmentäviä osteosarkoomasoluja cDNA-mikrosirutekniikalla. Samassa tutkimuksessa käytettiin myös proteomiikkamenetelmiä, kun etsittiin kasvainsolulysaateista proteiineja, jotka sitoutuivat esiinin N-päähän. Näiden tuloksena esiinin havaittiin liittyvän ribonukleoproteiiniinikompleksiin ja siten proteiinien translaatiokoneistoon. Koska sama ryhmä oli havainnut esiinin polarisoitumisen metastaasissa, he erottelivat kokeellisesti solujen pseudopodit soluvartalosta ja osoittivat, että myös translaation aloittamiseen tarvittavia proteiineja keskittyi näihin invasoiviin solunosiin esiinin kanssa (Briggs *et al.* 2012). Tässäkin metastaattisen prosessin tutkiminen ja ymmärtäminen näyttäisi edellyttävän toimintojen erottelusta ajallisesti ja paikallisesti hyvinkin pieniin ikkunoihin, joiden tutkiminen vaatii erityistekniikoita.

### 1.3.5.3 Metastaasitutkimuksen haasteita

Viime aikoina on alettu painottaa kasvaimien heterogeenisuutta ja toisaalta ympäröivien solujen vaikutusta kasvaimen muodostumiseen. Myös etäpesäkkeitä muodostavien solujen tropismi tiettyihin kudoksiin tai mikro-metastaasin kasvaminen makroskooppiseksi etäpesäkkeeksi voi riippua mikro-ympäristön tekijöistä. Metastaasien tutkimus kolmiulotteisissa ympäristöissä sekä *in vitro* että *in vivo* on ratkaisevaa yksittäisten syöpäsolujen ja niiden mikro-ympäristön tutkimuksessa. Tarvitaan kuvantamistekniikkoja, jotka voivat erottaa varhaisia muutoksia normaalikudoksessa tai maligneja muutoksia hyvänlaatuisiin muutoksiin verrattuna. Invasiivisten solujen tai solumassojen tunnistaminen olisi lopulta yksi tärkeimmistä tavoitteista syöpäpotilaiden hoidon kannalta.

Näiden tutkiminen vaatii pitkälle kehittyneitä ja herkkiä tekniikoita. Tutkimuksen pitää pystyä erottamaan hyvinkin hienovaraisia muutoksia proteiineissa; esimerkiksi esriinin kokonaismäärän tai edes fosfoproteiinin staattinen tuntemus ei riitä, kun signaalinvälitys (fosforylaatio-defosforylaatio jne.) vaihtelee ajallisesti ja paikallisesti hyvinkin pienissä vaihtelurajoissa ja pieninä kokonaismäärinä. Koska esriini on liitetty niin monissa erilaisissa syövissä invaasiokykyyn ja metastasointiin, mekanismin ymmärtämiseksi tarvittaisiin edelleen nimenomaan mikro-ympäristön huomioivaa tutkimusta.

Aiemmin mainittujen kolmiulotteisten soluviljelytekniikoiden lisäksi on kehitelty mikro-ympäristötekniikoita, joiden avulla voidaan jäljitellä kudosten välipintoja, spatiotemporaalisia kemiallisia gradientteja ja solujen mekaanista ympäristöä muokatussa mikro-ympäristössä. Näin voidaan tutkia kudosspesifistä kontekstia ja lääkeaineiden vaikutusta sirutyypisissä kudosomeleissa (organ-on-chips, ks. Huh *et al.* 2011).

Metastaasitutkimuksissa keskeisiä ovat olleet erilaiset hiirimallit; on käytetty mm. ihmiskasvainien siirteitä immuunipuolustukseltaan puutteellisiin hiiriin. Hiirimallit ovat kuitenkin kalliita ja hitaita, eivätkä ne sovellu tehoseulontasovelluksiin geneettisiä tai farmakologisia seulontoja varten. Lisäksi hiiret poikkeavat huomattavasti ihmisestä mm. solujen transformoitumisen suhteen. Yksi ratkaisu on kehittää viljelymalleja. Khavarin tutkimusryhmä transformoi erilaisia ihmisen normaaleja epiteelisoluja aktivoimalla niissä Ras-reitin ja ohittamalla Rb-välitteiset solusyklirajoitukset. Näitä soluja kasvatettiin kolmiulotteisissa organotyyppisissä *in vitro* -kudosomeleissa, joissa epiteelisoluja kasvatettiin elävien stroomasolujen ja niiden tuottaman solunulkoisen matriksin ja tyvikalvon päällä. Näissä olosuhteissa normaalit epiteelisolut kerrostuvat ja erilaistuvat normaalisti, kun taas transformoituneet solut eivät organisoidu ja läpäisevät tyvikalvon jo 6 päivän kuluessa. Tällaista järjestelmää voidaan käyttää esim. inhiboivien aineiden seulomiseen. Tutkijat estivät invaasion Ras-Raf-MAPK-reitin estäjillä, kun taas PI3K-reitin estäjillä ei ollut vaikutusta. Mikä kiinnostavinta, kun kolmiulotteisesti kasvatetuista soluista tehtiin transkriptomin siruanalyysi, tulokset muistuttivat itse karsinoomista saatuja tuloksia, kun taas normaalissa kaksikulotteisissa viljelmässä kasvatettujen, vastaavasti transfor-

moitujen epiteelisolujen transkriptomi ei osoittanut mitään korrelaatiota *in vivo* esiintyvien syöpien kanssa (Ridky *et al.* 2010).

Esriinin tehtävät solutukirangan ja kalvorakenteiden organisoinnissa vaikuttavat osaltaan solujen biomekaanisiin ominaisuuksiin, kuten jäykkyyteen, elastisuuteen, vetolujuuteen ja supistuvuuteen. Biomekaaniset ominaisuudet taas vaikuttavat suoraan solujen liikkuvuuteen ja invaasiokykyyn. Nämä ominaisuudet vaihtelevat esim. soluväliaineiden mukaisesti, ja ne myös muuttuvat kasvainmuodostuksen ja kasvaimen kehitysvaiheiden aikana. Esim. esriiniin liittyvät Rho- ja EGFR-reitit vaikuttavat biomekaanisiin ominaisuuksiin. Tälläkin alueella vaikuttaa siltä, että normaalissa soluviljelyssä eristetyistä kasvainsoluista saadut tulokset saattavat olla ristiriitaisia *in situ* saatujen tulosten kanssa (ks. katsausartikkeli Yu *et al.* 2011).

Esriinitutkimuksia läpikäydessä voi vain hämmästellä, miten yksi proteiini voi sitoa niin monia proteiineja. Tätä asiaa on käsitelty proteiini-proteiini-interaktiokarttojen solmuproteiinien yhteydessä (Tsai *et al.* 2009). Kyseessä ei ole yksi proteiinirakenne (tai yksi esriinimolekyyli), joka voi sitoa monia proteiineja, vaan oikeastaan sarja eri geenituotteita, jotka edustavat yhtä solmukohtaa (esim. oligomeerit, mutantit, posttranslacionaaliset modifikaatiot, allosteeriset rakenteet). Tähän pitää lisätä vielä aikaulottuvuus (sekä solun normaali-toiminnassa että kasvaimen kehittymisen vaiheissa). Vaikka erilaiset siru-analyysit tuottavat jo itsestään valtavat määrät dataa, tähän pitäisi vielä yhdistää sirujen aikasarjoja, jotta nähtäisiin tapahtumien aikajärjestys, niiden mahdollinen yhtäaikaisuus jne.

Syöpään ja metastaasiin liittyvät monimutkaiset soluprosessit. Esimerkiksi kalvon tyrosiinikinaasit ovat jatkuvassa liikkeessä ja vaihtuvissa vuorovaikutuksissa muiden proteiinien ja kalvon mikrodomeenien kanssa. Ligandin sitoutuminen voi muuttaa diffuusiota ja saattaa laukaista homo- tai hetero-oligomerisaation tai endosytoosin. Biokemiallisilla ja perinteisillä patologisilla menetelmillä on vähäinen spatiaalinen ja temporaalinen resoluutio. Signaalinvälitystapahtumien havaitsemiseen elävissä soluissa tarvitaan reaaliaikaisia ja herkkiä menetelmiä (ks. esim. Lidke & Wilson 2009; Provenzano *et al.* 2009; Sahai 2007). Perinteisen fluoresenssimikroskopian kolokalisaation resoluutio on esimerkiksi >250 nm. FRET (Förster-/fluoresenssi-resonanssi-energian siirto) -menetelmän resoluutio on n. 10 nm, mutta tekniikka on hankalammin hallittava eikä osoita esim. isojen proteiini-kompleksien muodostumista. On kehitelty uusia kuvantamismenetelmiä (esimerkkeinä yhden hiukkasen seuranta (SPT)), jossa käytetään usein apuna kvanttipisteitä. Näillä menetelmillä on esimerkiksi voitu todistaa, että solukalvolla tosiaan on diffuusiota rajoittavia mikrodomeeneja ja että aktiinitukiranka muodostaa fysikaalisen, mutta dynaamisen esteen proteiinien diffuusiolle solun pinnalla. Teknisesti pitkälle kehittyneillä metodeilla on voitu kuvata jopa mikro- tai millisekuntien vuorovaikutuksia. Näin on tutkittu esim. fokaaliadheesiokinaasin, paksilliinin ja vinkuliinin dynamiikkaa fibroblastien adheesiokomplekseissa (Digman 2009). Jos ajatellaan nimenomaan esriinitutkimuksia, osassa invaasiota ja metastaaseja käsittelevistä tutkimuksista (ja muissakin tutkimuksissa) on käytetty esriinin toimintojen estämistä esriinin N-terminaalaisella konstruktilla, jota pidetään

vaikutukseltaan dominantisti negatiivisena. Tämä on kuitenkin varsin epäspesifinen tapa estää esriinin vaikutuksia, kun ottaa huomioon FERM-domeenin laajan esiintymisen eri proteiineissa. Konstruktin aikaansaamien vaikutusten spesifisyyttä on vaikea todentaa. Menetelmien kehittyessä on otettu käyttöön erilaiset RNA-tekniikat (siRNA, shRNA), jotka ovat astetta spesifisempiä, mutta eivät hävitä endogeenistä esriiniä kokonaan. Lisäksi spesifisyyttä on vaikea osoittaa muiden proteiinien tasolla. Esriinipoistogeenisiä soluja on käytetty vasta hyvin harvassa julkaisussa. Yksi tapa on käyttää erilaisia (piste)mutaatio-konstrukteja, jotka kohdistuvat tunnettuihin kohtiin signaalinvälityksessä. Tavallisesti mutaatiot kohdistetaan fosforyloituviin treoniini- tai tyrosiini-tähteisiin, joiden fosforylaatio joko estetään tai sitä jäljitellään toisella aminohapolla korvaamalla. Näissä tapauksissa käytetään konstruktien yli-ekspressoimista, eikä endogeenisen esriinin vaikutuksia voida kontrolloida.

## 2 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää esriinin osuutta pahanlaatuisiin solumuutoksiin liittyvissä tapahtumissa käyttämällä mallia, jossa endogeenisen esriinin osuus voitiin poissulkea. Tarkemmat tavoitteet olivat seuraavat:

1. tutkia, kuinka esriinin poistaminen tai toisaalta läsnäolo vaikuttaa solun syöpään liittyviin ominaisuuksiin
2. määrittää, vaikuttaako kasvuympäristö (normaali soluviljelymalja vs. kolmiulotteinen viljely) esriinistä riippuvaisiin muutoksiin
3. määrittää jo aiemmin tunnettujen mutaatioiden vaikutus soluissa, jotka eivät sisällä endogeenista esriiniä, lisäämällä soluihin joko villityyppisiä tai mutatoituja esriinikonstrukteja ja vertaamalla näin saatujen solujen ominaisuuksia erityisesti metastaattiseen Src-kinaasiin ja esriinin tyrosiinifosforylaatioon liittyen.

## 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 3.1.1 Solulinjat

Esriinin suhteen poistogeenisestä hiirestä (-/-) (Saotome *et al.* 2004) saadut alkion fibroblastit immortalisoitiin spontaanisti laimennossarjoja käyttäen. Laimennosten tuloksena saatiin kaksi toisistaan riippumatonta MEF (mouse embryonic fibroblast) -solulinjaa, joita molempia käytettiin rinnakkain kaikissa kokeissa spontaanien mutaatioiden aiheuttaman variaation vaikutuksen vähentämiseksi. Villityyppinen (WT) esriinikonstruktin ja erilaisia mutatoituja esriinikonstrukteja lisättiin cDNA-muodossa pBABEpuro-ekspressiovektoriin (Morgenstein & Land 1990). 293 Eco Phoenix -retroviruksen pakkaussolulinja transfektoitiin näillä ekspressiokonstrukteilla. Virussupernatanttia käytettiin MEF-solujen transduktioon (Miller *et al.* 1993), ja soluja selektoitiin puromysiinillä (2,5 mg/ml, Sigma-Aldrich). MEF-soluihin vietiin myös Src-kinaasin konstitutiivisesti aktiivinen muoto retroviruskonstruktilla pLXSH-SrcY527F (Cary *et al.* 2002), jolloin positiiviset solut selektoitiin hygromysiini B:llä (Calbiochem). Lisäksi käytettiin rotan epiteelisolulinjaa RK3E ja sen v-Src-transformoitua alalinjaa (Fu *et al.* 2005).

### 3.1.2 Vasta-aineet, reagenssit ja immunopresipitaatio

Fosfotyrosiini detektoitiin monoklonaalisella anti-fosfotyrosiinivasta-aineella, klooni PT-66 (Sigma). Esriinin detektioon käytettiin aiemmin kuvattuja polyklonaalisia vasta-aineita Ez9 ja pY477 (Alfthan *et al.* 2004, Heiska & Carpen 2005). Kontrolleina käytettiin hiiren IgG1:tä (Dako Cytomation) tai kaniinin immunisointia edeltävää seerumia. Aktiivisen Src-kinaasin tunnistukseen käytettiin BioSourcen fosfospesifistä (pY418) vasta-ainetta, ja moesiinin fosforyloitunut T558 tunnistettiin Santa Cruz Biotechnologyn vasta-aineella. Moesiinivasta-aine saatiin Sa. Tsukitalta (Kioton yliopisto, Japani). Hiiren sykliini D, fosfo-p38MAPK, fosfo-p44/42 MAPK, fosfo-p70S6, fosfo-4EBP1, Akt ja fosfo-Akt tunnistettiin Cell Signaling Technologyn vasta-aineella, ja hiiren tubuliinin tunnistava monoklonaalinen vasta-aine oli hankittu Sigmaalta. Sigmaalta saatiin myös Rho-kinaasin inhibiittori Y-27632.

Esriini immunopresipitoitiin hajottamalla solut kylmässä RIPA-puskurissa (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1-prosenttinen NP-40, 0,5-prosenttinen deoksikolaatti, 0,1-prosenttinen natriumdodekyylisulfaatti, 1 mM ortovanadaatti, proteaasi-inhibiittorien seos, pH 7,4). Supernatantteihin lisättiin Ez9-vasta-ainetta ja protein G Sepharose -helmiä (Amersham Pharmacia). Analysointi tehtiin Western blot -menetelmällä sopivia vasta-aineita ja ECL-detektiota (Amersham Pharmacia) käyttäen.

### 3.1.3 Solujen proliferaatiokoe

24-kuoppaiseen soluviljelymaljaan maljattiin  $5 \times 10^3$  solua / kuoppa. Analyysipäivänä kuoppia inkuboitiin 200 µl:ssa fosfaattipuskuroitua keittosuolaliuosta, joka sisälsi 40 mg/ml MTT:tä ([3-(4,5-dimetyyliatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi], Sigma Aldrich). Kolmen tunnin inkuboinnin jälkeen muuttunut väriaine suspensoitiin 200 µl:aan dimetyylisulfoksidia. 100 µl:n erät analysoitiin mikrotiitterilevyjen lukijalla aallonpituudella 550 nm.

### 3.1.4 Soluadheesion analysointi

Soluja kasvatettiin yön ajan ilman seerumia. Sen jälkeen solut irrotettiin trypsiinillä ja maljattiin tiheydessä  $5 \times 10^5$  solua / kuoppa seerumittomassa elatusaineessa 96-kuoppaiseen viljelymaljaan, jonka kuopat oli päällystetty fibronectiinillä (10 µg/ml, SPR). Soluja seurattiin kiinnittymisen aikana valomikroskoopin avulla. Kiinnittyneet solut värjättiin eri aikapisteissä kristallivioletilla. Sitoutunut väriaine uutettiin 0,1-prosenttisellä Triton X-100-liuoksella ja mitattiin mikrotiitterilevyjen lukijalla aallonpituudella 595 nm.

### 3.1.5 Mikroskopiamenetelmät

Solut kasvatettiin peitinlaseilla, kiinnitettiin 3,5-prosenttisessä paraformaldehydissä ja permeabilisoitiin fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa, joka sisälsi 0,1 % Triton X-100:aa. Peitinlaseja inkuboitiin peräkkäin vasta-aineiden kanssa. Sekundaarisina vasta-aineina käytettiin aasin rodamiinikonjugoitua antikaniini- tai anti-hiiri-F(AB')<sub>2</sub>-fragmenttia (Jackson Immunoresearch Laboratories). F-aktiini leimattiin rodamiinikonjugoidulla falloidiinilla (Invitrogen Molecular Probes).

Matrigeelin sisällä kasvavat solut värjättiin julkaisun Debnath *et al.* (2003) mukaisella menetelmällä, jota hieman muunneltiin. Kahdeksankuoppainen lasinen kammio-objektilasi päällystettiin Matrigel-kerroksella (50 µl/kuoppa, BD Biosciences), jonka päälle maljattiin seos, joka sisälsi  $5 \times 10^3$  solua, Matrigeliä (1/3 tilavuudesta) sekä elatusainetta (yht. 100 µl). 24–36 tunnin inkuboinnin jälkeen kuopat kiinnitettiin 3,5-prosenttisessä paraformaldehydissä, permeabilisoitiin fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa, joka sisälsi 0,1 % Triton X-100:aa, ja huuhdeltiin liuoksella 130 mM NaCl, 7 mM Ha<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,5 mM HaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ja 100 mM glysiini. Kuopat peitettiin 10-prosenttisellä sian seerumilla liuoksessa 130 mM NaCl, 7 mM Ha<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,5 mM HaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1-prosenttinen naudan seerumi-

albumiini, 0,2-prosenttinen Triton X-100 ja 0,05-prosenttinen Tween-20. Tämän jälkeen kuoppia inkuboitiin vasta-aineiden läsnäollessa. Objekttilasit peitettiin Mowoililla (Calbiochem), johon oli sekoitettu 1,4-diatsabisyklo-oktaania (Sigma Aldrich, 1:3). Soluja tarkasteltiin epifluoresenssi- tai konfokaalimikroskoopilla (Leica Microsystems).

### 3.1.6 Sferodien muodostaminen ja solujen hajaantumiseen liittyvät kokeet

Solusferoidien muodostamisessa noudatettiin julkaisun Eleveld-Trancikova *et al.* (2002) sisältämää menetelmää. Sferoideja muodostettiin maljaamalla  $5 \times 10^3$  solua U-pohjaisiin mikrotiitterimaljan kuoppiin, jotka oli esivalettu ohuella kerroksella 1-prosenttista agarua. Soluja inkuboitiin 24–48 tuntia, jonka jälkeen sferoidit siirrettiin varovasti 24-kuoppalevyille, johon oli valmiiksi valettu seosta, joka sisälsi 1 mg/ml tyypin I kollageenia (BD Biosciences), 10 % naudan sikiön seerumia ja 50 mM  $\text{NaHCO}_3$ -puskuria. Sferoidien päälle lisättiin elatusaineliuosta, ja niitä tarkkailtiin valomikroskoopin avulla.

### 3.1.7 Soluviljely soft agarilla ja suspensiossa

Esivaletulle 0,6-prosenttiselle agarkerrokselle maljattiin yhteensä  $5 \times 10^4$  solua DMEM-elatusaineessa, joka sisälsi 0,3 % agarua ja 10 % vasikan sikiön seerumia. Solukolonniin määrää ja laatua seurattiin valomikroskoopilla 14–21 vrk. Suspensiokasvatusta varten ympätettiin  $5 \times 10^5$  solua 35 mm:n bakteerikasvatusaljoille, joiden elatusaine sisälsi 0,5 % metyyliiselluloosaa (Sigma Aldrich). Yli 10 solun keräytymät laskettiin valomikroskoopin avulla 7–10 vrk:n kuluttua.

### 3.1.8 Invaasiokoe ja soluviljely Matrigel-matriksissa

Invaasiota mitattiin Matrigel-invaasiokammiossa, jossa kasvutekijöitä oli vähennetyt pitoisuudet (BD Biosciences). Kokeessa käytettiin valmistajan antamaa menetelmää. Kammion sisäosat rehydroitiin 0,5 ml:lla elatusaineliuosta, kammioon ympätettiin  $5 \times 10^4$  solua elatusaineessa, johon oli lisätty 1 % vasikan sikiön seerumia. Maljan kuopat täytettiin 0,75 ml:lla elatusainetta, johon oli lisätty 10 % vastaavaa seerumia. 36 tunnin kuluttua ylimääräiset solut poistettiin kammion yläosasta, invaasiokalvo kiinnitettiin 3,5-prosenttisessä paraformaldehydissä ja värjättiin kristallivioletilla. Kalvon läpi tunkeutuvat solut laskettiin viidestä eri mikroskooppikentästä 20 x suurennoksen avulla.

96-kuoppaiset mikrotiitterimaljoille esivalettiin 50  $\mu\text{l}$  Matrigeliä (laimennos 1:3 D-MEM-elatusaineeseen). Kerroksen päälle valettiin 100  $\mu\text{l}$ :n seos, joka sisälsi  $5 \times 10^3$  solua, Matrigeliä (1/3 tilavuudesta) ja elatusainetta. Kun seos oli geelitynyt, päälle annosteltiin elatusaineliuosta ja soluja inkuboitiin 14 vrk. Matrigel-tulppa kiinnitettiin 3,5-prosenttisessä paraformaldehydissä, jonka jälkeen tulppa muutettiin nestemuotoon jäiden päällä inkuboimalla. Solut laskettiin hemosytometrin avulla.



### 3.1.9 Virtaussytometria

Virtaussytometriakokeet tehtiin FACS Calibur -virtaussytometrilla (Becton-Dickinson). Solut kiinnitettiin 70-prosenttisessä etanolissa ja värjättiin propidiumjodidilla 30 minuutin ajan 37 °C:ssa liuoksessa, joka sisälsi 100 mg/ml RNAasi A:ta. Koetta kohden mitattiin yhteensä 10 000 solua.

## 4 TULOKSET JA POHDINTA

### 4.1.1 Esriinipoistogeenisen hiiren alkion fibroblasteja voidaan käyttää mallina esriinin toiminnan tutkimiseen

Esriinin ja sen fosforylaation tutkimukseen on yleensä käytetty vakiintuneita solulinjoja, jotka kuitenkin sisältävät vaihtelevissa määrin endogeenistä esriiniä, joka saattaa vaikuttaa tuloksiin mm. oligomerisaation kautta. Esriinin poistogeenisen hiiren solut vaikuttivat mielenkiintoiselta mahdollisuudelta tutkia esriinin merkitystä "puhtaassa" ympäristössä. Eritoten tiettyjen fosforylaatiokohtien solutason merkitystä on helpompi tutkia, kun voidaan verrata keskenään soluja, joissa ei joko ilmennetä esriiniä lainkaan tai joissa ilmennetään pelkästään villityyppistä, fosforylaatiolla normaalisti säädeltävää esriiniä tai toisaalta pelkästään eri tavoin fosforylaatiokohdista mutatoituja esriinimolekyylejä.

Poistogeenisen hiiren alkioista tuotettiin kaksi eri fibroblastisolulinjaa (MEF). Käyttämämme esriinivasta-aine osoittautui solulyssaattien perusteella spesifiseksi, koska se tunnisti esriinin kokoisen proteiinivyöhykkeen normaalihiiren alkion fibroblastilysaateista Western blot -analyysissä, mutta ei tunnistanut vastaavaa MEF-linjojen lysaateista. Näissä poistogeenisissä MEF-linjoissa kyettiin viruskonstruktioiden avulla ilmentämään stabiilisti sekä aktiivista Src-proteiinia että erilaisia esriinimuotoja. Immunopresipitaatiotutkimuksilla voitiin todentaa, että aktiivista Src-kinaasia ilmentävissä soluissa esriini oli voimakkaasti tyrosiinifosforyloitunutta (villityyppinen esriini ja Y145F-mutantti), mutta Y477F-mutanttimuoto osoitti vain heikkoa fosforylaatiota. Tämä varmisti aiemmat havainnot siitä, että tyrosiini 477 on Src-kinaasin pääkohde esriinissä (Heiska & Carpén 2005).

Näiden kokeiden perusteella voidaan sanoa, että ensimmäistä kertaa tutkimuksen apuna voitiin käyttää malleina hiiren soluja, jotka eivät sisällä lainkaan endogeenistä esriiniä. Näin proteiinin mutanttimuotoja voitiin tutkia ilman solun oman proteiinin mahdollisesti aiheuttamia vaikutuksia.

#### **4.1.2 Esriiniä ei tarvita Src-kinaasin aiheuttamiin solumuutoksiin, kun soluja kasvatetaan kaksikulotteisilla pinnoilla**

Aktiivisen Src-kinaasin ilmentäminen muutti MEF-solujen morfologiaa ja tukirankaa merkittävästi, kun soluja viljeltiin tavalliseen tapaan peitelaseilla (kaksikulotteisilla pinnoilla). Solut muuttuivat muodoltaan lähes suorakulmaisista soluista runsaasti erilaisia ulokkeita sisältäviksi soluiksi. F-aktiini väkevöityi voimakkaasti ns. podosomi- tai rosettirakenteisiin, jotka ovat tyypillisiä aktivoitunutta Src-kinaasia sisältäville soluille. Näihin rakenteisiin kerääntyi tyypilliseen tapaan myös tukirankaproteiini kortaktiinia. Esriinin puuttuminen tai läsnäolo ei vaikuttanut näihin muutoksiin, eikä esriinin mutanttimuodoillakaan havaittu olevan vaikutusta solun morfologiaan tai Src-kinaasin tai kortaktiinin paikallistumiseen. Sekä villityyppinen esriini että mutanttiesriinit lokalisoituivat soluissa samankaltaisesti, osittain diffuusisti, osittain solukalvon ulokerakenteisiin. Pystyimme siis todentamaan uudessa soluviljelymallissamme Src-kinaasin jo aiemmin osoitetut vaikutukset solun morfologiaan ja tukirankaan. Lisäksi havaittiin, että esriinillä ei ollut merkitystä Src-kinaasin indusoimassa podosomien muodostumisessa.

Src-kinaasin toimintaan liitetään myös lisääntynyt soluproliferaatio ja solujen liikkuvuus sekä nopeampi soluadheesio. MEF-soluissa voitiin havaita nämä aktiivisen Src:n aiheuttamat muutokset pelkällä vektorikonstruktilla transfektoituihin kontrollisoluihin verrattuna. Sen sijaan esriinikonstruktioiden läsnäololla tai puuttumisella ei ollut näihin mitään vaikutusta, oli Src-konstruktin mukana tai ei.

Tutkimuksen perusteella näytti siltä, että tavallisissa soluviljelyolosuhteissa esriinillä ei ole osuutta aktiivisen Src-kinaasin soluissa aiheuttamiin muutoksiin.

#### **4.1.3 Esriinin läsnäolo ja tyrosiini 477:n fosforylaatio on välttämätön Src-kinaasin aiheuttamissa pahanlaatuisissa muutoksissa, kun soluja kasvatetaan kolmiulotteisissa malleissa tai suspensiossa**

Aiemmissä tutkimuksissa on saatu todisteita esriinin merkityksestä munuais-solujen tai syöpäsolujen liikkumiselle erilaisissa kolmiulotteisissa matrikseissa. Kun MEF-solujamme kasvatettiin kolmiulotteisessa Matrigel-väliaineessa, villityypin esriiniä ilmentävissä soluissa esriini polarisoitui voimakkaasti solukalvon alapuolisiin kertymiin. Sensijaan Y477F-mutanttimuoto pysyi diffuusina sytoplasmassa eikä paikantunut solukalvolle tai ulokkeisiin. Aktiivinen Src-kinaasi paikantui myös solukalvon alle. Tähän lokalisaatioon esriini ei vaikuttanut.

Tämä tulos viittasi siihen, että kolmiulotteisessa viljelyssä esriinin tyrosiini-fosforylaatiolla saattaisi olla erityistä merkitystä. Tätä tukivat myös kokeet, joissa solujen annettiin muodostaa pallomaisia solusferoideja, jotka sitten siirrettiin kollageeniin sisään. Kun pallosta erkanevia soluja tarkkailtiin valomikroskoopilla, villityypistä esriiniä sisältävät solut säilyivät pitempään elinvoimaisina. Sferoidista kollageeniin liikkuvat solut olivat pyöreitä muistuttaen julkaisun Sahai & Marshall (2003) ameebamaista liikkuvuutta, kun taas Y477F-mutanttia

sisältävät solut näyttivät liikkuvan pitkänomaisina. Kuten aiemmassakin julkaisussa, Rho-kinaasin estäminen inhibiittorilla muutti villityyppiset liikkuvat solut myös pitkänomaisiksi. Src-kinaasin estäminen taas hajotti koko sferoidirakenteen, eivätkä solut säilyttäneet elinkelpoisuuttaan kollageenissa.

Yksi syöpäsolujen ominaisuuksista on kyky kasvaa soft agarissa. Jos kasvatimme soft agarissa soluja, jotka sisälsivät villityyppistä esriiniä, mutta ei aktiivista Src-kinaasia, solut eivät pystyneet muodostamaan kolonioita. Jos soluissa oli aktiivista Src-kinaasia, mutta ei esriiniä, muodostui jonkin verran solukolonioita. Sitä vastoin sekä villityyppistä esriiniä että aktiivista Src-kinaasia sisältävät solut muodostivat muutamassa päivässä suuria ja monisoluisia kolonioita. Jos esriiniä oli läsnä, noin kahden viikon jälkeen solujen määrä oli noin nelinkertainen pelkkää Src-kinaasia sisältäviin soluihin verrattuna. Sekä Y477F-mutanttiesriini että Src-kinaasin estäminen inhibiittorilla hävittivät kolonioiden kasvun lähes kokonaan.

Syöpäsoluilla on normaalisoluihin verrattuna parempi kyky invasoida kudoksia ja kokeellisia matrikseja. Tämän vuoksi teimme kokeen, jossa testasimme solujemme kykyä lävistää huokoisen kalvon päälle valettu Matrigel-kerros. Villityyppinen esriini auttoi selvästi solujen migraatiota kolmiulotteisen väliaineen läpi aktiivisen Src-kinaasin läsnäolosta riippuen, kun taas Y477F-mutantilla tällaista ei havaittu.

Normaalit fibroblastit tarvitsevat myös adheesiota solukasvuun, kun taas syöpäsolut pystyvät kasvamaan jopa suspensiossa. Kun MEF-solujamme testattiin suspensiokasvatuksessa, sekä villityyppisen esriinin että aktiivisen Src-kinaasin ilmentäminen edisti solukasvua moninkertaisesti pelkkään Src-kinaasiin verrattuna. Toisaalta Y477F-mutanttilä ilmentäminen ei auttanut solujen suspensiokasvua. Myös virtaussytometrinen analyysi osoitti, että suspensiossa kasvaneista villityyppistä esriiniä sisältävistä soluista merkittävästi suurempi osa oli jakautuvia (S + G2-vaiheessa). Kun suspensiossa kasvaneiden solujen lysaateista analysoitiin eri signaalinvälitysreittien merkkiaineita, fosforyloituneiden 4E-BP1- ja p70S6K-proteiinien määrässä nähtiin ero villityyppisen ja mutanttilinjan välillä. Tämä viittaa mTOR-reitin merkitykseen villityyppisen esriinin vaikutusmekanismina.

Nämä kokeet osoittivat selvästi esriinin ja sen Src-fosforylaation merkityksen ominaisuuksissa, jotka liittyvät hiiren fibroblastilinjojen pahanlaatuisiin muutoksiin. Lisäksi vaikutukset voitiin paikantaa Src-kinaasin pääkohteeseen, tyrosiiniin 477. Halusimme vielä testata, voitaisiinko vastaavia ilmiöitä havaita myös epiteelisolumalleissa, koska esriini on nimeltään epitelialinen proteiini. Tähän käytimme rotan epiteelilinjaa, joihin oli viety v-Src-proteiini (Fu *et al.* 2005). v-Src aikaansai esriinin fosforyloitumisen, jonka pääkohteena oli tyrosiini 477. Tämä fosforylaatio edesauttoi solujen kasvua Matrigel-väliaineessa. Vaikuttaa siltä, että samat mekanismit toimivat myös epiteelisoluissa. Tämän varmistamiseksi on tulevaisuudessa kuitenkin vielä kehitettävä epiteelisoluja, joissa ei ole endogeenistä esriiniä.

Tutkimus varmisti aiemman löydöksemme (Heiska & Carpén 2005) siitä, että esriinin Y477 on Src-kinaasin kohteena. Sen lisäksi saimme yllättävän selvän osoituksen siitä, miten yhden proteiinin yhden aminohapon fosforyloitumisella

voi olla merkitystä koko solun käyttäytymisen kannalta. Erityisen mielenkiintoista on se, että solujen kokeelliset kasvuolosuhteet vaikuttavat suuresti tuloksiin, joita saadaan syöpään liittyviä soluilmioita testattaessa. Tällä on suuri merkitys tutkimuksen kannalta, koska kokeellisten kasvuolosuhteiden on selvästikin jäljiteltävä mahdollisimman hyvin solujen kolmiulotteista kasvuympäristöä. Varsinkin syöpään liittyvä tutkimus olisi hyvä tehdä nykyistä useammin monimutkaisemmissa tutkimusolosuhteissa, jotta tulokset edustaisivat todellisia, elimistössä tapahtuvia ilmiöitä.

## 5 PÄÄTELMÄT

Hanahanin ja Weinbergin luokittelemat syövän tunnusmerkit auttavat jäsentämään valtavaa määrää kirjallisuutta, joka liittyy esriinin merkitykseen syövässä. Silti aineisto tuntuu hajanaiselta, yhtä monimutkaiselta kuin syöpä ilmiönä. Esriini voidaan liittää useimpiin näistä tunnusmerkeistä, mutta kuten syövän hoidossakin on huomattu, monet signaalireitit ovat moninkertaisesti päällekkäisiä ja risteäviä, ja vaikuttaakin siltä, että soluissa on aina runsaasti korvaavia reittejä tai proteiineja. Esriini on kuitenkin epiteelin tärkeä organisoiva proteiini, ja kun noin 90 % syöivistä on epitelialaista alkuperää (Horner 2010), esriinin merkitystä on syytä pohtia.

Kuten signaalivälitysreittejä sivuavilla proteiineilla voisi kuvitellakin, esriinin on osoitettu olevan osallisena hyvin monissa kasvaimen ja etäpesäkkeen syntymiseen vaikuttavissa mekanismeissa. Esriinin toiminta liittyy solukalvon rakenteisiin, solun tukirankaan ja solun kiinnittymiseen, jotka kaikki muuttuvat jollakin tavalla, kun solukasvun muuttuu patologiseksi. Monimutkaisessa ilmiössä on vaikea enää erotella syitä tai seurauksia. Koska esriini on mukana erilaisten kasvainten tai etäpesäkkeiden kehittymiseen vaikuttavien proteiinikompleksien muodostumisessa, esriinin molekyyli-tason muutokset tai sitoutumiset vaikuttavat osaltaan signaalien etenemiseen ja siihen, miten solun reagoi niin ulkoisiin kuin sisäisiin ärsykkeisiin. Toisaalta esriinillä voi olla merkitystä myös syövän parenkyymien muuttumisessa esimerkiksi invaasiota, intravasaatiota, ekstravasaatiota tai kolonisaatiota suosivaksi, mutta tämä syöpäbiologian tutkimusalue on melko uusi, eikä yksityiskohtaisia tietoja vielä ole.

Eniten todisteita on esriinin vaikutuksesta etäpesäkkeiden syntyyn. Metastaasien aikainen havaitseminen ja ehkäisy on syöpäpotilaiden kannalta ratkaisevan tärkeää. On huomattava, että kun potilaat saapuvat primaarikasvaimen vuoksi hoitoon, useimmiten heidän verenkierrössään ja kaukaisissa kudoksissaan on jo kylväytyneitä kasvainsoluja. Primaarikasvaimen kohdistettu hoito ei useinkaan sanottavammin tehoa metastaattisiin soluihin (ks. esim. Valastyan & Weinberg 2011). Siten on erittäin tärkeää kehittää aineita, jotka vaikuttavat nimenomaan näiden primaarikasvaimesta jo irtautuneiden kasvain-

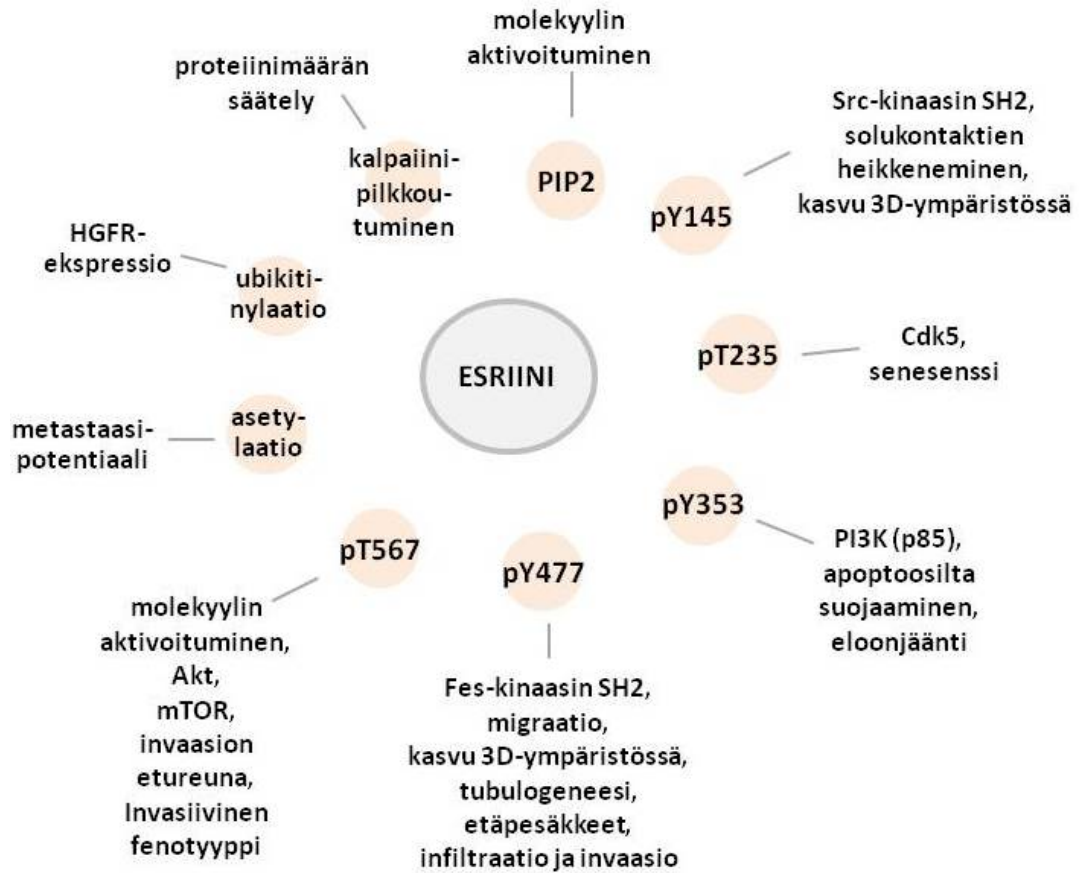
solujen kehittymiseen ja eloonjääntiin. Tällaisia aineita on jo kliinisissä tutkimuksissa (esimerkiksi esriiniä fosforyloivaa Src-kinaasia estävät dasatinib ja saracatinib, joita kokeillaan sarkoomien metastaasien estämiseen). Hoito voi kohdistua myös metastaasin mikroympäristöön, esimerkkinä luuhun vaikuttava bisfosfonaatti.

Olisiko vaikkapa esriinistä metastaasin estämisen tai hoidon kohde-molekyyliksi? Esriiniin sitoutuvia pieniä estäviä yhdisteitä on kyllä etsitty johtoyhdisteeksi. Khannan ja Urenin tutkimusryhmä löysi kaksi molekyylä, jotka sitoutuvat esriiniin mikromolaarisella affiniteetilla. Ne estävät endogeenisen esriinin treoniinin 567 fosforylaation, aktiinin sitoutumisen esriiniin sekä kasvainsolujen invaasion istukan endoteelisolukerroksen läpi. Molemmat vaikuttavat seeprakalojen solujen liikkuvuuteen ja siten kalan fenotyyppiin. Molemmat pystyvät myös estämään metastaattisten nodulien syntymisen hiiren keuhkokudosiseläimessä sekä estämään esriinivälitteisen keuhkometastaasin *in vivo*. Molekyyleillä on vaikutus- ja kinetiikkaeroja, jotka viittaavat erilaisiin toimintamekanismeihin, mutta ei kuitenkaan synergististä etua (Bulut *et al.* 2012). Tästä on tietenkin äärimmäisen pitkä matka käytännön hoitosovellutuksiin, mutta esriinitutkijalle tämä on silti sydäntä lämmittävä tutkimustulos.

Toinen tutkimusryhmä on tutkinut baicalein-flavonoidia, jota esiintyy kiinalaisen rohdosopin tuntemassa yrtissä *Scutellaria baicalensis*. Baicalein vähentää esriinin ja fosfoesriinin (Thr567) määrää levyepiteelikarsinomasoluissa sekä solujen liikkuvuutta ja invaasiokykyä annos- ja aikariippuvaisella tavalla. Vaikutusta ei esiinny, jos soluissa ilmennetään T567A-mutanttia, jolloin liikkuvuus ja invaasiokyky vähenee jo muutenkin huomattavasti. Tutkijat päättelivät, että estävä vaikutus on siis esriinin fosforylaatiosta (avautumisesta) riippuvainen (Wu 2011).

Jos ajatellaan hoitoa, on kuitenkin mietittävä, mitä proteiinin muotoa tai toimintoa halutaan estää tai vähentää. Koska kyse on dynaamisista prosesseista, pelkän "perusmolekyylin" estäminen tai vähentäminen ei ehkä anna toivottua tulosta. Solujen tärkeimpien signaaliproteiinien poistaminen kokonaan ei välttämättä aiheuta suurtakaan muutosta solujen toimintoihin mm. redundanssin takia. Esimerkiksi integriinien "adhesomissa" Src on yksi 156 komponentin ja 690 interaktion keskipisteproteiineista (hub) (Zaidel-Bar *et al.* 2007). Silti Src-geenin poistaminen hiiriltä ei vaikuta solujen yleiseen elinkykyisyyteen, vaan vaikuttaa lähinnä vain luun muotoutumiseen (Soriano *et al.* 1991). Toisaalta monet syöpää estävät lääkeaineet aiheuttavat monenlaisia sivuvaikutuksia, koska ne vaikuttavat muihinkin prosesseihin kuin vain tiettyyn syöpäominaisuuteen.

Esriinimolekyylin monet toiminnot liittyvät fosforylaatio- ja muihin säätelytapahtumiin, jotka aktivoivat tai inaktivoivat tiettyjä proteiini-interaktioita tai proteiininsisäisiä sitoutumiskohtia. Kuten havaittiin, monet näistä molekyylitaso tapahtumista on yhdistetty syöpäsoluominaisuuksiin (ks. kuvio 9). Jos esriinin osuutta etäpesäkkeiden muodostumisessa halutaan estää, on tiedettävä tarkkaan, mitä molekyylimuotoa pitäisi estää, ja tunnettava, miten tämä vaikuttaa esriinin muihin toimintoihin tai muihin aktivoitumis- tai sitoutumiskohtiin.



KUVIO 9 Esriinimolekyylin tunnettuja säätelykohtia, joiden on osoitettu liittyvän syöpäsolujen ominaisuuksiin.

Ajatus solun tukirankaa ja solukalvoa yhdistävän proteiinin osallisuudesta syöpään ei siis olekaan niin mahdoton kuin aluksi voisi päätellä. Ihmisen geenikokoelma olikin odotettua suppeampi, joten geenituotteilla on kompleksisemmat tehtävät kuin mitä "yksi geeni – yksi proteiini" -malli edellytti. Syöpä taas on todella monimuotoinen ryhmä sairauksia, joihin esriini voi monella tapaa liittyä dynaamisen säätelynsä kautta.



*Kiitokset*

Kiitokset kuuluvat minua tiedemaailmaan opastaneelle Matti Vuennolle. Hänen ansiostaan jatkoin luonnontieteellisen leipäpuun parissa. Toinen tärkeä ihminen on Olli Carpén, jonka ryhmässä opettelin tutkimuksen tekemistä. Hänen kanssaan oli ilo löytää tien varrelta joitakin kultahippuja. Lämpimät kiitokset! Kiitän myös kaikkia rakkaita lähimmäisiä, joiden ansiosta tämäkin puuhastelu oli mahdollista.

Tekijä ottaa vastuun kaikista tässä julkaisussa olevista mahdollisista virheistä.

## LÄHTEET

- Alexander, S. & Friedl, P. 2012. Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends Mol Medic* 18: 13–26.
- Amieva M.R., Wilgenbus K.K. & Furthmayr H. 1994. Radixin is a component of hepatocyte microvilli in situ. *Exp Cell Res* 210: 140–144.
- Alfthan, K., Heiska, L., Gronholm, M., Renkema, G.H. & Carpen, O. 2004. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates merlin at serine 518 independently of p21-activated kinase and promotes merlin-ezrin heterodimerization. *J Biol Chem* 279: 18559–18566.
- Arslan, A.A., Silvera D., Arju R., Giashuddin S., Belitskaya-Levy I., Formenti SC. & Schneider R.J.. 2012. Atypical ezrin localization as a marker of locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 134: 981–988.
- Autero M., Heiska L., Ronnstrand L., Vaheri A., Gahmberg C.G. & Carpen O. 2003. Ezrin is a substrate for Lck in T cells. *FEBS Lett* 535: 82–86.
- Avizienyte E., Wyke A.W., Jones R.J., McLean G.W., Westhoff M.A., Brunton V.G. & Frame M.C. 2002. Src-induced de-regulation of E-cadherin in colon cancer cells requires integrin signalling. *Nat Cell Biol* 4: 632–638.
- Batchelor C.L., Woodward A.M. & Crouch D.H. 2004. Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import. *Exp Cell Res* 296: 208–222.
- Berryman M., Gary R. & Bretscher A. 1995. Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *J Cell Biol* 131: 1231–1242.
- Berryman M., Franck Z. & Bretscher A. 1993. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci* 105: 1025–1043.
- Binamé F. 2008. Transforming growth factor beta controls the directional migration of hepatocyte cohorts by modulating their adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell* 19: 945–956.
- Bonilha V.L., Rayborn M.E., Saotome I., McClatchey A.I. & Hollyfield J.G. 2006. Microvilli defects in retinas of ezrin knockout mice. *Exp Eye Res* 82: 720–729.
- Bosk, J., Braunger J.A., Gerke V. & Steinem C. 2011. Activation of F-actin binding capacity of ezrin: synergism of PIP2 interaction and phosphorylation. *Biophys J* 100: 1708–1717.
- Bretscher A.A. 2000. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16 (2000): 113–143.
- Bretscher A., Gary R. & Berryman M. 1995. Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry* 34: 16830–16837.
- Briggs J.W., Ren L., Nguyen R., Chakrabarti K., Cassavaugh J., Rahim S., Bulut G., Zhou M., Veenstra T.D., Chen Q., Wei J.S., Khan J., Uren A. & Khanna C. 2012. The Ezrin Metastatic Phenotype Is Associated with the Initiation of Protein Translation. *Neoplasia* 14: 297–310.

- Bruce B., Khanna G., Ren L., Landberg G., Jirstrom K., Powell C., Borczuk A., Keller E.T., Wojno K.J., Meltzer P., Baird K., McClatchey A., Bretscher A., Hewitt S.M. & Khanna C. 2007. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clin Exp Metastasis* 24: 69–78.
- Bulut G., Hong S-H., Chen K., Beauchamp E.M., Rahim S., Kosturko G.W, Glasgow E., Dakshnamurthy S., Lee H-S., Daar I., Toretsky J.A., Khanna C. & Uren A. 2012. Small molecule inhibitors of ezrin inhibit the invasive phenotype of osteosarcoma cells. *Oncogene* 31: 269–281.
- Bustelo X.R. 2012. Intratumoral stages of metastatic cells: A synthesis of ontogeny, Rho/Rac GTPases, epithelial-mesenchymal transitions, and more. *Bioessays* 34: 748–759.
- Böhling T., Turunen O., Jääskeläinen J., Carpen O., Sainio M., Wahlström T., Vaheri A. & Haltia M. Ezrin expression in stromal cells of capillary hemangioblastoma. An immunohistochemical survey of brain tumors.1996 *Am J Pathol* 148: 367–373.
- Carneiro A., Bendahl P.O., Åkerman M., Domanski H.A., Rydholm A., Engellau J. & Nilbert M. 2011. Ezrin expression predicts local recurrence and development of metastases in soft tissue sarcomas. *J Clin Pathol* 64: 689–694.
- Carvalho, K., Khalifat N., Maniti O., Nicolas C., Arold S., Picart C. & Ramos L. 2010. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-induced conformational change of ezrin and formation of ezrin oligomers. *Biochemistry* 49: 9318–9327.
- Cary, L.A., Klinghoffer, R.A., Sachsenmaier, C. & 2002. SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading. *Mol Cell Biol* 22: 2427–2440.
- Casaletto J.B. 2011. Ezrin-mediated apical integrity is required for intestinal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11924–11929.
- Chaffer, C.L. & Weinberg, R.A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331: 1559–1564.
- Chambers, A.F., Groom A.C. & MacDonald I.C. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev Cancer* 2: 563–572.
- Chen, C., Zhou Z., Liu R, Li Y., Azmi P.B. & Seth A.K. 2008. The WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 upregulates ErbB2 and EGFR through RING finger protein 11. *Oncogene* 27: 6845–6855.
- Chen, Y., Wang D., Guo Z., Zhao J., Wu B., Deng H., Zhou T., Xiang H., Gao F., Yu X., Liao J., Ward T., Xia P., Emenari C., Ding X., Thompson W., Ma K., Zhu J., Aikhionbare F., Dou K., Cheng S.Y. & Yao X. 2011. Rho kinase phosphorylation promotes ezrin-mediated metastasis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 71: 1721–1729.
- Chirivino D., Del Maestro L., Formstecher E., Hupe P., Raposo G., Louvard D. & Arpin M. 2011. The ERM proteins interact with the HOPS complex to regulate the maturation of endosomes. *Mol Biol Cell* 22: 375–385.
- Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchnan, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, P.S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., Chasis, J.A., Conboy, J.G., Gascard, P., Takakuwa, Y., Huang, S.C., Benz, E.J., Jr, Bretscher, A., Fehon, R.G., Gusella, J.F., Ramesh, V., Solomon, F., Marchesi, V.T., Tsukita, S., Tsukita, S., &

- Hoover, K.B. 1998. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 23: 281–282.
- Chuan Y. 2010. Ezrin mediates c-Myc actions in prostate cancer cell invasion. *Oncogene* 29: 1531–1542.
- Chuan Y. 2006. Androgen Induction of Prostate Cancer Cell Invasion Is Mediated by Ezrin. *J Biol Chem* 281: 29938–29948.
- Crepaldi T., Gautreau A., Comoglio P.M., Louvard D. & Arpin M. 1997. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol* 138: 423–434.
- Cui, Y., Wu J., Zong M., Song G., Jia Q.J., Jinbo J. & Han J. 2009. Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. *Int J Cancer* 124: 1614–1621.
- Debnath, J., Muthuswamy, S.K. & Brugge, J.S. 2003. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 30: 256–268.
- Debnath J. & Brugge J.S. 2005. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 5: 675–688.
- Deng X., Tannehill-Gregg S.H., Nadella M.V., He G., Levine A., Cao Y. & Rosol T.J. 2007. Parathyroid hormone-related protein and ezrin are up-regulated in human lung cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* 24: 107–119.
- Di Cristofano C., Leopizzi M., Miraglia A., Sardella B., Moretti V., Ferrara A., Petrozza V. & Della Rocca C. 2010. Phosphorylated ezrin is located in the nucleus of the osteosarcoma cell. *Mod Pathol* 23: 1012–1020.
- Digman, M.A., Wiseman, P.W., Choi, C., Horwitz, A.R. & Gratton, E. 2009. Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2170–2175.
- Dransfield D.T., Bradford A.J., Smith J., Martin M., Roy C., Mangeat P.H. & Goldenring J.R. 1997. Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *EMBO J* 16: 35–43.
- Edwards S.D. & Keep N.H. 2001. The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry* 40: 7061–7068.
- Elzagheid, A., Korkeila E., Bendardaf R., Buhmeida A., Heikkilä S., Vaheri A., Syrjänen K., Pyrhönen S. & Carpén O. 2008. Intense cytoplasmic ezrin immunoreactivity predicts poor survival in colorectal cancer. *Hum Pathol* 39: 1737–1743.
- Eleveld-Trancikova, D., Kudela, P., Majerciak, V., Regendova, M., Zelnik, V., Pastorek, J., Pastorekova, S. & Bizik, J. 2002. Suppression subtractive hybridisation to isolate differentially expressed genes involved in invasiveness of melanoma cell line cultured under different conditions. *Int J Oncol* 20: 501–508.
- Elliott B.E., Qiao H., Louvard D. & Arpin M. 2004. Co-operative effect of c-Src and ezrin in deregulation of cell-cell contacts and scattering of mammary carcinoma cells. *J Cell Biochem* 92: 16–28.
- Elliott B.E., Meens J.A., SenGupta S.K., Louvard D. & Arpin M. 2005. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res* 7: R365–73.

- Fehon R.G. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 276–287.
- Fievet B.T., Gautreau A., Roy C., Del Maestro L., Mangeat P., Louvard D. & Arpin M. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* 164: 653–659.
- Frame M.C. 2002. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602: 114–130.
- Fu S.-L., Huang Y.-J., Lieng F.-P., Huang Y.-F., Chuang C.-F. & Wang S.-W. 2005. Malignant transformation of an epithelial cell by v-Src via tv-a-mediated retroviral infection: a new cell model for studying carcinogenesis. *Biochem Biophys Res Comm* 338: 830–838.
- Gao S. 2009. Identification of Elements and Transcription Factors for ezrin Basal Transcriptional Activity in Lung Cancer Cells. *Prog Biochem Biophys* 36: 288–296.
- Gary R. & Bretscher A. 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell* 6: 1061–1075.
- Gautreau A., Fievet B.T., Brault E., Antony C., Houdusse A., Louvard D. & Arpin M. 2003. Isolation and characterization of an aggresome determinant in the NF2 tumor suppressor. *J Biol Chem* 278: 6235–6242.
- Geiger K.D., Stoldt P., Schlote W. & Derouiche A. 2000. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 157:1785–1793.
- Hamada K., Shimizu T., Yonemura S., Tsukita S. & Hakoshima T. 2003. Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *EMBO J* 22: 502–514.
- Hamada K., Shimizu T., Matsui T., Tsukita S. & Hakoshima T. 2000. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* 19: 4449–4462.
- Hanahan D. & Weinberg R. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646–674.
- Heiska L. & Carpen O. 2005. Src phosphorylates ezrin at tyrosine 477 and induces a phosphospecific association between ezrin and a kelch-repeat protein family member. *J Biol Chem* 280: 10244–10252.
- Heiska L., Alfthan K., Gronholm M., Vilja P., Vaheri A. & Carpen O. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273: 21893–21900.
- Hunter T. & Cooper J.A. 1981. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell* 24: 741–752.
- Huh, D., Hamilton, G.A. & Ingber D.E. 2011. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* 21: 745–754.
- Ilmonen S., Vaheri A., Asko-Seljavaara S. & Carpen O. 2005. Ezrin in primary cutaneous melanoma. *Mod Pathol* 18: 503–10.
- Irby R.B. & Yeatman T.J. 2000. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19: 5636–5642.

- Jankovics F., Sinka R., Lukacsovich T. & Erdelyi M. 2002. MOESIN crosslinks actin and cell membrane in *Drosophila* oocytes and is required for OSKAR anchoring. *Curr Biol* 12: 2060–2065.
- Jin T., Jin J., Li X., Zhang S., Choi Y.H., Piao Y., Shen X. & Lin Z. 2014 Prognostic implications of ezrin and phosphorylated ezrin expression in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 15: 191–198.
- Kang, He Y.W., Tulley S., Gupta G.P., Serganova I., Chen C-R., Manova-Todorova K., Blasberg R.G., William L. & Massague J. 2005. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13909–13914.
- Khanna C., Wan X.L., Bose S., Cassaday R., Olomu O., Mendoza A., Yeung C., Gorlick R., Hewitt S.M. & Helman L.J. 2004. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med* 10: 182–186.
- Kishore R., Qin G., Luedemann C., Bord E., Hanley A., Silver M., Gavin M., Goukassain D. & Losordo D.W. 2005a. The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF- $\alpha$ -induced transcriptional repression of cyclin A. *J Clin Invest* 115: 1785–1796.
- Kishore R., Qin G., Luedemann C., Bord E., Hanley A., Silver M., Gavin M., Yoon Y.S., Goukassian D. & Losordo D.W. 2005b. The cytoskeletal protein ezrin regulates EC proliferation and angiogenesis via TNF- $\alpha$ -induced transcriptional repression of cyclin A. *J Clin Invest* 115: 1785–1796.
- Kitajiri S., Fukumoto K., Hata M., Sasaki H., Katsuno T., Nakagawa T., Ito J., Tsukita S. & Tsukita S. 2004. Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *J Cell Biol* 166: 559–570.
- Konstantinovskiy S., Smith Y., Zilber S., Tuft Stavnes H., Becker A.M., Nesland J.M., Reich R. & Davidson B. 2010. Breast carcinoma cells in primary tumors and effusions have different gene array profiles. *J Oncol* 2010: 969084.
- Konstantinovskiy S. 2012. Ezrin and BCAR1/p130Cas mediate breast cancer growth as 3-D spheroids. *Clin Exp Metastasis* 29: 527–540.
- Krieg J. & Hunter T. 1992. Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. *J Biol Chem* 267: 19258–19265.
- Krishnan K.K. 2006. Ezrin mediates growth and survival in Ewing's sarcoma through the AKT/mTOR, but not the MAPK, signaling pathway. *Clin Exp Metastasis* 23: 227–236.
- Kuo W.-C., Yang, K.-T., Hsieh, S.-L. & Lai, M. Ezrin is a negative regulator of death receptor-induced apoptosis. *Oncogene* 29: 1374–1383.
- Lamb R.F., Roy C., Diefenbach T.J., Vinters H.V., Johnson M.W., Jay D.G. & Hall A. 2000. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nature Cell Biol* 2: 281–287.
- Lan M.M. 2006. Phosphorylation of ezrin enhances microvillus length via a p38 MAP-kinase pathway in an immortalized mouse hepatic cell line. *Exp Cell Res* 312: 111–120.
- Legg J.W., Lewis C.A., Parsons M., Ng T. & Isacke C.M. 2002. A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol* 4: 399–407.

- Li Q., Nance M.R., Kulikauskas R., Nyberg K., Fehon R., Karplus P.A., Bretscher A. & Tesmer J.J. 2007. Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central alpha-helical domain. *J Mol Biol* 365: 1446–1459.
- Li Q. 2012. Expression of ezrin correlates with malignant phenotype of lung cancer, and in vitro knockdown of ezrin reverses the aggressive biological behavior of lung cancer cells. *Tumour Biol* 33: 1493–1504.
- Li Q. 2008. Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells. *Cancer Lett* 261: 55–63.
- Lidke, D.S. & Wilson B.S. 2009. Vaught in the act: quantifying protein behaviour in living cells. *Trends Cell Biol* 19:566–574.
- Lorentzen A. 2011. An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells. *J Cell Sci* 124: 1256–1267.
- Lowery A.J., Miller N., Dwyer R.M. & Kerin M.J. 2010. Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells. *BMC Cancer* 10 (2010): 502–515.
- Lun D.X., Hu Y.C., Xu Z.W., Xu L.N. & Wang B.W. 2014. The prognostic value of elevated ezrin in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol* 35: 1263–1266.
- Mackay D.J., Esch F., Furthmayr H. & Hall A. 1997. Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins. *J Cell Biol* 138: 927–938.
- Mak H. 2012. Ezrin phosphorylation on tyrosine 477 regulates invasion and metastasis of breast cancer cells. *BMC Cancer* 12: 82–96.
- Mao W., Irby R., Coppola D., Fu L., Wloch M., Turner J., Yu H., Garcia R., Jove R. & Yeatman T.J. 1997. Activation of c-Src by receptor tyrosine kinases in human colon cancer cells with high metastatic potential. *Oncogene* 15: 3083–3090.
- Matsui T., Yonemura S., Tsukita S. & Tsukita S. 1999. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9: 1259–1262.
- Matsui T., Maeda M., Doi Y., Yonemura S., Amano M., Kaibuchi K., Tsukita S. & Tsukita S. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140: 647–657.
- McClatchey A.I. 2003. Merlin and ERM proteins: Unappreciated roles in cancer development? *Nature Rev Cancer* 3: 877–883.
- McRobert, E.A., Young, A.N. & Bach, L.A. 2012. Advanced glycation end-products induce calpain-mediated degradation of ezrin. *FEBS J* 279: 3240–3250.
- Mendoza M.C. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 36: 320–328.
- Miller A.D., Miller D.G., Garcia J.V. & Lynch C.M. 1993. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 217: 581–599.
- Moilanen J., Lassus H., Leminen A., Vaheri A., Bützow R. & Carpén O. 2003. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol*. 90: 273–281.
- Morgenstern J.P. & Land H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucl Acid Res* 18: 3587–3596.

- Morrison H. 2007. Merlin/Neurofibromatosis Type 2 Suppresses Growth by Inhibiting the Activation of Ras and Rac. *Cancer Res* 67: 520–527.
- Mäkitie T., Carpén O., Vaheri A. & Kivelä T. 2001. Invest Ophthalmol Vis Sci 42: 2442–2449.
- Naba A., Reverdy C., Louvard D. & Arpin M. 2008a. Spatial recruitment and activation of the Fes kinase by ezrin promotes HGF-induced cell scattering. *EMBO J* 27: 38–50.
- Naba A., Reverdy C., Louvard D. & Arpin M. 2008b. Spatial recruitment and activation of the Fes kinase by ezrin promotes HGF-induced cell scattering. *EMBO J* 27: 38–50.
- Ng T., Parsons M., Hughes W.E., Monypenny J., Zicha D., Gautreau A., Arpin M., Gschmeissner S., Verveer P.J., Bastiaens P.I. & Parker P.J. 2001. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J* 20: 2723–2741.
- Orian-Rousseau V., Morrison, H., Matzke, A., Kastilan, T., Pace, G., Herrlich, P. & Ponta, H. 2007. Hepatocyte Growth Factor-induced Ras Activation Requires ERM Proteins Linked to Both CD44v6 and F-Actin. *Mol Biol Cell* 18: 76–83.
- Parlato S., Giammarioli A.M., Logozzi M., Lozupone F., Matarrese P., Luciani F., Falchi M., Malorni W. & Fais S. 2000. CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J* 19: 5123–5134.
- Patara M., Santos E.M., Coudry Rde A., Soares F.A., Ferreira F.O. & Rossi B.M. 2011. Ezrin expression as a prognostic marker in colorectal adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 17: 827–833.
- Pearson M.A., Reczek D., Bretscher A. & Karplus P.A. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101: 259–270.
- Pietromonaco S.F., Simons, P.C., Altman, A. & Elias, L. 1998. Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem* 273: 7594–7603.
- Polesello C., Delon I., Valenti P., Ferrer P. & Payre F. 2002. Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* 4: 782–789.
- Provenzano P.P., Eliceiri K.W. & Keely P.J. 2009. Shining new light on 3D cell motility and the metastatic process. *Trends Cell Biol* 19: 638–648.
- Pujuguet P., Del Maestro L., Gautreau A., Louvard D. & Arpin M. 2003. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* 14: 2181–2191.
- Reczek D., Berryman M. & Bretscher A. 1997. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol* 139: 169–179.
- Ren L., Hong S.H., Cassavaugh J., Osborne T., Chou A.J., Kim S.Y., Gorlick R., Hewitt S.M. & Khanna C. 2009. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC. *Oncogene* 28: 792–802.
- Ren, L., Hong S.-H., Chen Q.-R., Briggs J., Cassavaugh J., Srinivasan S., Lizardo M.M., Mendoza A., Xia A.Y., Avadhani N., Khan J. & Khanna C. 2012.



- Dysregulation of ezrin phosphorylation prevents metastasis and alters cellular metabolism in osteosarcoma. *Cancer Res* 72: 1001–1012.
- Ridky, T.W., Chow J.M., Wong D.A. & Khavari P.A. 2010. Invasive three-dimensional organotypic neoplasia from multiple normal human epithelia. *Nat Med* 16: 1450–1455.
- Rouleau G.A., Merel P., Lutchman M., Sanson M., Zucman J., Marineau C., Hoang-Xuan K., Demczuk S., Desmaze C., Plougastel B., Pulst S.M., Lenoir G., Bijlsma E., Fashold R., Dumanski J., de Jong P., Parry D., Eldrige R., Aurias A., Delattre O. & Thomas G. 1993. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 363: 515–521.
- Sahai, E. 2007. Illuminating the metastatic process. *Nature Rev Cancer* 7: 737–749.
- Sahai E. & Marshall C.J. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biol* 5: 711–719.
- Saotome I., Curto M. & McClatchey A.I. 2004. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Dev Cell* 6: 855–864.
- Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla S.M., Dotor A., Calero F., Hardisson D. & Palacios J. 2006. Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 98:71–79.
- Sarver A.L., Li H. & Subramanian S. 2010. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res* 70: 9570–9580.
- Schlecht, N.F., Brandwein-Gensler M., Smith R.V., Kawachi N., Broughel D., Lin J., Keller C.E., Reynolds P.A., Gunn-Moore F., Harris T., Childs G., T.J. Belbin T.J. & Prystowsky M.B. 2012. Cytoplasmic Ezrin and Moesin Correlate with Poor Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head and Neck Pathol* 6:232–243.
- Schmeichel K.L. & Bissel M. J. 2003. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 116: 2377–2388.
- Schwartz-Albiez R., Merling A., Spring H., Moller P. & Koretz K. 1995. Differential expression of the microspike-associated protein moesin in human tissues. *Eur J Cell Biol* 67: 189–198.
- Serrador J.M., Alonso-Lebrero J.L., del Pozo M.A., Furthmayr H., Schwartz-Albiez R., Calvo J., Lozano F. & Sanchez-Madrid F. 1997. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol* 138: 1409–1423.
- Serrador J.M., Nieto M., Alonso-Lebrero J.L., del Pozo M.A., Calvo J., Furthmayr H., Schwartz-Albiez R., Lozano F., Gonzalez-Amaro R., Sanchez-Mateos P. & Sanchez-Madrid F. 1998. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91: 4632–4644.
- Shaffer M.H., Huang Y., Corbo E., Wu G.F., Velez M., Choi J.K., Saotome I., Cannon J.L., McClatchey A.I., Sperling A.I., Maltzman J.S., Oliver P.M.,

- Bhandoola A., Laufer T.M. & Burkhardt J.K. 2010. Ezrin is highly expressed in early thymocytes, but dispensable for T cell development in mice. *PLoS One* 5: e12404.
- Shcherbina A., Bretscher A., Kenney D.M. & Remold-O'Donnell E. 1999. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett* 443: 31–36.
- Shibue, T. & Weinberg, R. 2011. Metastatic colonization: Settlement, adaptation and propagation of tumor cells in a foreign tissue environment. *Semin Cancer Biol* 21:99–106.
- Sizemore S., Cicek M., Sizemore N., Kwok P.N. & Casey G. 2007. Podocalyxin increases the aggressive phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro through its interaction with ezrin. *Cancer Res* 67: 6183.
- Smith W.J., Nassar N., Bretscher A., Cerione R.A. & Karplus P.A. 2003. Structure of the active n-terminal domain of ezrin - Conformational and mobility changes identify keystone interactions. *J Biol Chem* 278: 4949–4956.
- Söderström M. 2010. Expression of ezrin, Bcl-2, and Ki-67 in chondrosarcomas. *APMIS* 118: 769–776.
- Song J. 2005. Estradiol-induced ezrin overexpression in ovarian cancer: a new signaling domain for estrogen. *Cancer Lett* 220: 57–65.
- Soriano, P., Montgomery C., Geske R. & Bradley A. 1991. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64:693–702.
- Sperka T., Geißler K.J., Merkel U., Scholl I., Rubio I., Herrlich P. & Morrison H.L. 2011. Activation of ras requires the ERM-dependent link of actin to the plasma membrane. *PLoS ONE* 6: e27511.
- Srivastava J., Elliott B.E., Louvard D. & Arpin M. 2005. Src-dependent ezrin phosphorylation in adhesion-mediated signaling. *Mol Biol Cell* 16: 1481–1490.
- Suni J., Narvanen A., Wahlstrom T., Aho M., Pakkanen R., Vaheri A., Copeland T., Cohen M. & Oroszlan S. 1984. Human placental syncytiotrophoblastic Mr 75,000 polypeptide defined by antibodies to a synthetic peptide based on a cloned human endogenous retroviral DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6197–6201.
- Takahashi K., Sasaki T., Mammoto A., Takaishi K., Kameyama T., Tsukita S. & Takai Y. 1997. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* 272: 23371–23375.
- Takeuchi K., Kawashima A., Nagafuchi A. & Tsukita S. 1994. Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *J Cell Sci* 107 ( Pt 7): 1921–1928.
- Tan J, Zhang C & Qian J. 2011. Expression and significance of Six1 and Ezrin in cervical cancer tissue. *Tumour Biol.* 32:1241–1247.
- Tran Quang ,C.C. 2000. Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *EMBO J* 19: 4565–4576.
- Tremmel M., Matzke A., Albrecht I., Laib A.M., Olaku V., Ballmer-Hofer K., Christofori G., Héroult M., Augustin H.G., Ponta H. & Orian-Rousseau V. 2009. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood* 114: 5236–5244.

- Trofatter J.A., MacCollin M.M., Rutter J.L., Murrell J.R., Duyao M.P., Parry D.M., Eldridge R., Kley N., Menon A.G., Pulaski K., et al. 1993. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 75: 826-826.
- Tsai, C., Buyong M. & Nussinov R. 2009. Protein-protein interaction networks: how can a hub protein bind so many different partners? *TIBS* 34:594-600.
- Tsukita S., Oishi K., Sato N., Sagara J., Kawai A. & Tsukita S. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 126: 391-401.
- Turunen O., Wahlstrom T. & Vaheri A. 1994. Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* 126: 1445-1453.
- Turunen O., Sainio M., Jaaskelainen J., Carpen O. & Vaheri A. 1998. Structure-function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein. *Biochim Biophys Acta* 1387: 1-16.
- Tynninen O., Carpen O., Jääskeläinen J., Paavonen T. & Paetau A. 2004. Ezrin expression in tissue microarray of primary and recurrent gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:472-477.
- Valastyan, S. & Weinberg R. 2011. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147:275-292.
- Wald F.A. 2008. Atypical protein kinase C (iota) activates ezrin in the apical domain of intestinal epithelial cells. *J Cell Sci* 121: 644-654.
- Wan X., Mendoza A., Khanna C. & Helman L.J. 2005. Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res* 65: 2406-2411.
- Wang D.S., Pan C.C., Lai H.C. & Huang J.M. 2013. Expression of HMGA1 and ezrin in laryngeal squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 133: 626-632.
- Wang G., Mao W. & Zheng S. 2008. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Lett* 582: 3663-3668.
- Wei Y.C., Li C.F., Yu S.C., Chou F.F., Fang F.M., Eng H.L., Uen Y.H., Tian Y.F., Wu J.M., Li S.H., Huang W.W., Li W.M. & Huang H.Y. 2009. *Mod Pathol* 22: 1351-1360.
- Weng W.H., Ahlén J., Aström K., Lui W.O. & Larsson C. 2005. Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. *Clin. Cancer Res* 11: 6198-6204.
- Wick W., Grimm C., Wild-Bode C., Platten M., Arpin M. & Weller M. 2001. Ezrin-dependent promotion of glioma cell clonogenicity, motility, and invasion mediated by BCL-2 and transforming growth factor-beta2. *J Neurosci* 21: 3360-3368.
- Wu B., Li J., Huang D., Wang W., Chen Y., Liao Y., Tang X., Xie H. & Tang F. 2011. Baicalein mediates inhibition of migration and invasiveness of skin carcinoma through Ezrin in A431 cells. *BMC Cancer* 11 :527-535.
- Wyckoff, J.B., Jones J.G., Condeelis J. & Segall J.E. 2000. A critical step in metastasis: in vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res* 60: 2504-2511.

- Xie J.J., Zhang F.R., Tao L.H., Lu Z., Xu X.E., Jian-Shen, Xu L.Y. & Li E.M. 2011. Expression of ezrin in human embryonic, fetal, and normal adult tissues. *J Histochem Cytochem* 59: 1001–1008.
- Xue, C., Wyckoff J., Liang F., Sidani M., Violini S., Tsai K-L., Zhang Z.-Y., Sahai E., Condeelis J. & Segall J.E. 2006. Epidermal Growth Factor Receptor Overexpression Results in Increased Tumor Cell Motility In vivo Coordinately with Enhanced Intravasation and Metastasis. *Cancer Res* 66:192–197.
- Yang H.S. & Hinds P.W. 2006. Phosphorylation of ezrin by cyclin-dependent kinase 5 induces the release of Rho GDP dissociation inhibitor to inhibit Rac1 activity in senescent cells. *Cancer Res* 66: 2708–2715.
- Yao X., Thibodeau A. & Forte J.G. 1993. Ezrin-calpain I interactions in gastric parietal cells. *Am J Physiol* 265: C36–46.
- Yeh C.N., Pang S.T., Chen T.W., Wu R.C., Weng W.H. & Chen M.F. 2009. Expression of ezrin is associated with invasion and dedifferentiation of hepatitis B related hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 9: 233–242.
- Yonemura S., Matsui T., Tsukita S. & Tsukita S. 2002. Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci* 115: 2569–2580.
- Yonemura S., Hirao M., Doi Y., Takahashi N., Kondo T., Tsukita S. & Tsukita S. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140: 885–895.
- Youn J. 2009. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ Res* 104: 50.
- Yu, Y., Khan J., Khanna C., Helman L., Meltzer P.S. & Merlino G. 2004. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* 10: 175–181.
- Yu Y., Davicioni E., Triche T.J. & Merlino G. 2006. The homeoprotein six1 transcriptionally activates multiple protumorigenic genes but requires ezrin to promote metastasis. *Cancer Res* 66: 1982–1989.
- Yu Y., Zeng P., Xiong J., Liu Z., Berger S.L. & Merlino G. 2010. Epigenetic Drugs Can Stimulate Metastasis through Enhanced Expression of the Pro-Metastatic Ezrin Gene. *PLoS ONE* 5: e12710.
- Yu, H., Mouw J. & Weaver V.M. 2011. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *TIBS* 21: 47–56.
- Zaarour R.F., Chirivino D., Del Maestro L., Daviet L., Atfi A., Louvard D. & Arpin M. 2012. Ezrin ubiquitylation by the E3 ubiquitin ligase, WWP1, and consequent regulation of hepatocyte growth factor receptor activity. *PLoS ONE* 7: e37490.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R., ja Geiger B. 2007. Functional atlas of integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9: 858–867.
- Zhang, X., Wang Q., Gerald W., Hudis C.A., Norton L., Smid M., Foekens J.A. & Massague J. 2009. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent Survival Signals. *Cancer Cell* 16: 67–78.

- Zhang, X., Chen G., Wu T., Yan J. & Zhou J. 2012. Expression and clinical significance of ezrin in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 13: 196–204.
- Zhao J., Zhang X. & Xin Y. 2011. Up-regulated expression of Ezrin and c-Met proteins are related to the metastasis and prognosis of gastric carcinomas. *Histol Histopathol* 26: 1111–1120.
- Zheng S., Huang J., Zhou K., Zhang C., Xiang Q., Tan Z., Wang T. & Fu X. 2011. 17 $\beta$ -Estradiol enhances breast cancer cell motility and invasion via Extra-Nuclear activation of Actin-Binding protein ezrin. *PLoS ONE* 6: e22439.
- Zhu L., Hatakeyama J., Chen C., Shastri A., Poon K & Forte J.G. 2008. Comparative study of ezrin phosphorylation among different tissues: more is good; too much is bad. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C192 - C202.
- Zhu J. 2012. Down-regulation of miR-183 promotes migration and invasion of osteosarcoma by targeting Ezrin. *Am J Pathol* 180: 2440–2451.
- Zhu L., Liu Y. & Forte J.G. 2005. Ezrin oligomers are the membrane-bound dormant form in gastric parietal cells. *Am J Physiol - Cell Physiol* 288: C1242–C1254.