



**TURUN
YLIOPISTO**

Rab24:n vuorovaikutus HOPS-kompleksin VPS18:n ja Golgin laitteen GM130:n kanssa

Pro gradu -tutkielma
Fysiologia ja genetiikka
Biologian laitos
Turun yliopisto

Tekijä:
Roosa Kotiniitty

18.2.2024
Turku

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.*

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Fysiologia ja genetiikka

Tekijä: Roosa Kotiniitty

Otsikko: Rab24:n vuorovaikutus HOPS-kompleksin VPS18:n ja Golgin laitteen GM130:n kanssa

Ohjaajat: Prof. Eeva-Liisa Eskelinen, MSc Mauricio Ramm, FT Tiina Henttinen

Sivumäärä: 62 sivua + 9 liitesivua

Päivämäärä: 18.2.2024

Rab-proteiinit ovat eukaryoottien solunsisäistä kalvoliikennettä sääteleviä pieniä GTPaaseja. Rab24 osallistuu muun muassa autofagia- ja endosytoosireittien toiminnan sekä mitokondrioiden plastisuuden säätelyyn. Eniten Rab24:n toimintaa on tutkittu autofagiassa, eli prosessissa, jossa esimerkiksi tarpeettomia soluelimiä ja proteiineja hävitetään lysosomaalisesti. Rab24:n Q38P-mutaation on havaittu aiheuttavan koirien perinnöllisen neurodegeneratiivisen sairauden todennäköisesti autofagiaprosessin häiriöiden takia. Rab24 on erikoinen Rab-proteiini, sillä se hydrolysoi GTP:tä tavallista hitaammin. Tämä johtuu todennäköisesti epätavallisesta seriiniaminohappotähteestä (S67) hydrolyysin kannalta keskeisellä alueella. Rab24-S67L-mutantintiedetään sitovan GTP:tä villityyppiä heikommin.

Rab24:n molekyyli-tason toiminta tunnetaan huonosti. Toiminnan selvittämiseksi on oleellista tunnistaa proteiineja, joiden kanssa se vuorovaikuttaa soluissa. Alustavan kartoituksen perusteella Rab24:n lähiympäristössä sijaitsee muun muassa HOPS-kompleksin proteiineja, esimerkiksi VPS18. HOPS-kompleksi säätelee autofagosomien ja endosomien fuusioitumista lysosomien kanssa. Rab24:n lähiympäristössä sijaitsee myös GM130 eli *cis*-Golgin laitteen markkeriproteiini, joka muun muassa säätelee kalvofuusioita Golgin laitteen alueella. Tutkielman tavoitteena oli selvittää, onko Rab24 fyysisessä vuorovaikutuksessa VPS18:n tai GM130:n kanssa. Lisäksi tutkittiin, ovatko fyysiset vuorovaikutukset riippuvaisia GTP:n sitoutumisesta Rab24:ään ja vaikuttavatko Rab24:n Q38P- ja S67L-mutaatiot vuorovaikutuksiin. Tutkielmassa selvitettiin myös Q38P- ja S67L-mutaatioiden vaikutusta Rab24:n kolokalisaatioon VPS18:n ja GM130:n kanssa.

Kaikki kokeet tehtiin hiiren Neuro-2a-neuroblastoomasoluilla. Fyysisiä vuorovaikutuksia tutkittiin koimmunopresipitaatiolla ja kolokalisaatiota proteiinien immunofluoresenssivärjäyksellä. Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutusta tutkittiin myös proksimateettiligaatiomäärityksellä. Tutkielmassa Rab24:n ja VPS18:n välillä havaittiin fyysinen vuorovaikutus. Tulos viittaa siihen, että Rab24 vuorovaikuttaa HOPS-kompleksin kanssa, eli se saattaa osallistua tämän säätelemiin kalvofuusioihin. Rab24:n Q38P- ja S67L-mutaatiot heikensivät Rab24:n ja VPS18:n fyysistä vuorovaikutusta sekä kolokalisaatiota, mutta GTP:n sitoutumisen merkityksestä ei voitu tehdä johtopäätöksiä. Rab24:n ja GM130:n välillä ei havaittu fyysistä vuorovaikutusta, mutta Q38P-mutaatio paransi Rab24:n kolokalisaatiota GM130:n kanssa, eli se lisäsi Rab24:n paikantumista *cis*-Golgin laitteeseen.

Avainsanat: Rab24, Rab, VPS18, HOPS-kompleksi, GM130, autofagia

SISÄLLYS

1	Johdanto	1
1.1	Rab-proteiinit	1
1.2	Rab24	5
1.2.1	Rab24:n rakenne ja erikoispiirteet.....	5
1.2.2	Rab24 ja autofagia.....	8
1.2.3	Rab24:n muut tehtävät	12
1.3	Rab24:n mahdolliset vuorovaikutuskumppanit.....	14
1.3.1	VPS18 ja HOPS-kompleksi	16
1.3.2	GM130	18
1.4	Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit.....	19
2	Aineisto ja menetelmät	21
2.1	Solut ja niiden kasvatus.....	21
2.2	Koimmunopresipitaatiokokeet	22
2.2.1	Transientit transfektiot ja niiden validaatio.....	22
2.2.2	Koimmunopresipitaatio	24
2.2.3	SDS-PAGE-geelija jo ja immunoblottaus.....	26
2.3	Kolokalisaatiokokeet.....	28
2.3.1	Solujen immunofluoresenssivärjäys ja konfokaalimikroskopia.....	28
2.3.2	Kolokalisaatioanalyysi	29
2.4	Proksimiteettiligaatiomääritys (PLA)	30
2.5	Tilastolliset analyysit.....	31
3	Tulokset.....	32
3.1	Transfektoidut solut yli-ilmensivät VPS18- ja GM130-proteiineja.....	32
3.2	Rab24:n ja VPS18:n välillä havaittiin fyysinen vuorovaikutus	33
3.3	Rab24:n mutaatiot heikensivät Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutusta sekä kolokalisaatiota.....	34
3.4	GM130 kolokalisoitui eniten Rab24-Q38P-mutanttiproteiinin kanssa.....	38
4	Pohdinta	40
4.1	Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutus	40
4.2	Rab24:n ja GM130:n vuorovaikutus	44
4.3	Mahdollisia jatkotutkimuksia	46
4.4	Yhteenveto	49
	Kiitokset	50
	Lähteet.....	51

Liitteet	63
Liite 1: Liuokset.....	63
Liite 2: Plasmidit	66
Liite 3: Koimmunopresipitaatiokokeiden proteiinimäärät	68
Liite 4: Immunoblottaussignaalien käsittelyt	69
Liite 5: Duolink® PLA Fluorescence -määrityksen ohjeet	70

LYHENTEET

APEX	engineered ascorbate peroxidase
COPII	coat protein complex II
CORVET	class C core vacuole/endosome tethering
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
FIS1	mitochondrial fission 1 protein
GABARAP	gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GAP	GTPase activating protein
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GDF	GDI displacement factor
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	guanosine diphosphate, guanosiidifosfaatti
GEF	GDP-GTP exchange factor
GM130	Golgi matrix protein 130
GOSR1	Golgi SNAP receptor complex member 1
GTP	guanosine triphosphate, guanosinitrifosfaatti
HOPS	homotypic fusion and protein sorting
HVD	hypervariable domain
LC3	microtubule-associated protein light chain 3
LDL	low density lipoprotein
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
PLA	proximity ligation assay, proksimiteettiligaatiomääritys
RILP	Rab interacting lysosomal protein
SNAP29	synaptosomal-associated protein 29
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
VPS	vacuolar protein sorting-associated protein

1 JOHDANTO

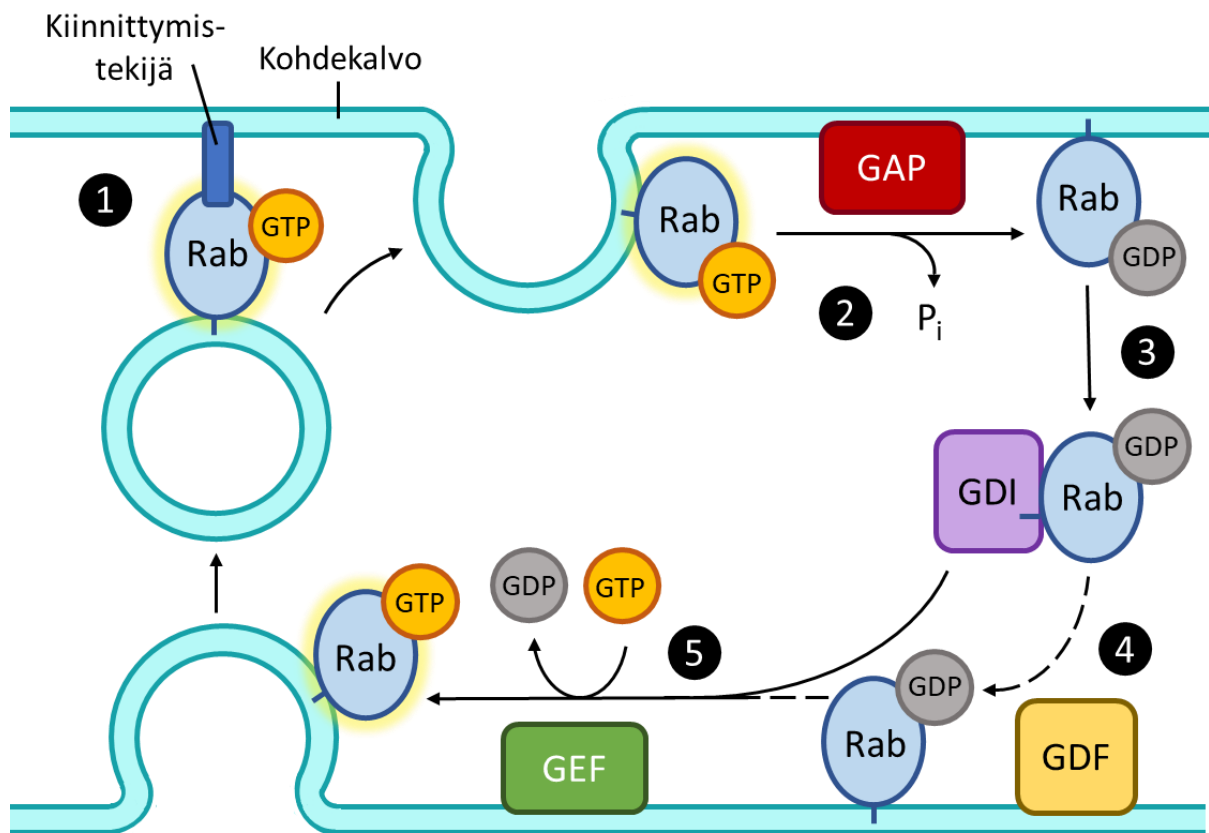
1.1 Rab-proteiinit

Rab-proteiinit ovat eukaryoottien solunsisäistä kalvoliikennettä sääteleviä pieniä GTPaaseja eli guanosiinitrifosfaateja (Pylypenko ym. 2018). Ne säätelevät esimerkiksi vesikkeleiden muodostusta, kuljetettavan lastin valintaa, vesikkeleiden kuljetusta mikrotubuluksia pitkin sekä vesikkeleiden kiinnittymistä ja fuusiota kohteidensa kanssa (Homma ym. 2021; Pylypenko ym. 2018). Ne osallistuvat myös kalvojen ympäröimien soluelinten biogeneesiin ja kuljetukseen (Homma ym. 2021). Rab-proteiinit ovat erittäin tärkeitä solujen homeostasian ylläpitämiselle (Guadagno ja Progida 2019). Rab-proteiinit kuuluvat pienten GTPaasien Ras-superperheeseen, ja nisäkkäillä tunnetaan noin 60 erilaista Rab-proteiinia (Homma ym. 2021).

Kuten muutkin pienet GTPaasit, Rab-proteiinit ovat molekulaarisia kytkimiä, jotka ovat aktiivisia, kun niihin on sitoutunut GTP (guanosiinitrifosfaatti) ja inaktiivisia, kun niihin on sitoutunut GDP (guanosinidifosfaatti) (Wilmes ja Kümmel 2023). Aktiiviset Rab-proteiinit ovat sitoutuneita solun kalvorakenteisiin ja inaktiiviset sijaitsevat solulimassa (Homma ym. 2021). Rab-proteiinit syntetisoidaan liukoisina proteiineina, mutta translaation jälkeen ne prenyloidaan eli niiden karboksiterminaalisen päään kysteinitähteisiin lisätään hydrofobiset geranyyli-geranyyli- eli prenyyliryhmät, joiden avulla ne voivat kiinnittyä kalvorakenteiden sytosoliselle puolelle (Wilmes ja Kümmel 2023). Aktiiviset Rab-proteiinit paikantuvat spesifisesti tietyille solun kalvorakenteille, kuten esimerkiksi solulimakalvostoon, Golgin laitteeseen, endosomeihin tai lysosomeihin (Homma ym. 2021). Tämän ansiosta Rab-proteiinien avulla voidaan identifoida erilaisia kalvojen rajaamia osastoja soluissa (Borchers ym. 2021).

Rab-proteiinien toiminta solunsisäisen kalvoliikenteen säätelijöinä perustuu siihen, että aktiiviset kalvoilla sijaitsevat Rab-proteiinit sitovat ja tuovat paikalle spesifisiä efektoriproteiineja, jotka säätelevät kalvoliikenteen eri vaiheita, kuten vesikkeleiden muodostusta, kuljetusta, kiinnittymistä tai fuusiota (Homma ym. 2021). Efektoriproteiineja ovat esimerkiksi kuljetettavan lastin valikoimiseen liittyvät proteiinit, moottoriproteiinit, kiinnittymistekijät ja entsyymit (Hutagalung ja Novick 2011; Pylypenko ym. 2018). Usein pelkästään se, että Rab-proteiiniin sitoutuminen tuo efektorin spesifiseen sijaintiin solussa, indusoi efektorin toimintaa, mutta joskus Rab-proteiinit myös aktivoivat efektoreitaan esimerkiksi saamalla aikaan muutoksen näiden

konformaatioissa (Hyvola ym. 2006; Ji ym. 2015; Murray ym. 2016; Pylypenko ym. 2018). Yhdellä Rab-proteiinilla voi olla useita eri efektoriproteiineja ja yksi proteiini voi olla monen eri Rab-proteiinin efektori (Fukuda ym. 2008; Pylypenko ym. 2018). Rab-proteiinien efekto-
reiden tunnistaminen on tärkeää, jotta kunkin Rab-proteiinin tehtävät voidaan selvittää tarkem-
min (Fukuda ym. 2008; Homma ym. 2021). Kuvassa 1 esitellään esimerkki Rab-proteiinin toi-
mintasyklistä, jossa Rab-proteiinin efektori on kalvojen fuusioitumiseen vaadittava kiinnitty-
mistekijä.



Kuva 1. Esimerkki Rab-proteiinin toimintasyklistä. 1) Aktiivinen GTP:tä sitova Rab-proteiini osal-
listuu kuvan esimerkissä vesikkelin fuusioon toisen kalvon kanssa sitoutumalla kohdekalvolla sijaitse-
vaan kiinnittymistekijään. Kiinnittymistekijä on kyseisen Rab-proteiinin efektori. 2) GAP eli GTPaasia
aktivoiva proteiini aktivoi GTP:n hydrolysointia GDP:ksi, minkä seurauksena Rab inaktivoituu.
3) Inaktiivinen Rab siirtyy solulimaan, kun GDI eli GDP:n irtoamisen estäjäproteiini sitoutuu Rab-
proteiiniin ja peittää tämän hydrofobisen prenyyliryhmän. 4) Joidenkin Rab-proteiinien tapauksessa GDF
eli GDI:n syrjäyttäjäproteiini irrottaa GDI:n, jolloin Rab sitoutuu alkuperäiselle kalvolle. 5) GEF eli
nukleotidin vaihtajaproteiini irrottaa GDP:n, minkä jälkeen Rab-proteiiniin sitoutuu GTP ja Rab akti-
voituu. Useimmilla Rab-proteiineilla nukleotidin vaihtuminen johtaa myös GDI:n irtoamiseen, minkä
seurauksena Rab sitoutuu kalvolle. Kuva on tehty Iton ja Uemuran (2022) ja Pylypenkon ym. (2018)
julkaisujen perusteella.

Rab-proteiinit inaktivoituvat ja irtoavat efektoreistaan, kun ne hydrolysoivat sitomansa GTP:n GDP:ksi (kuva 1) (Pylypenko ym. 2018). Hydrolyysi siis keskeyttää Rab-proteiinin säätelämän toiminnon kalvolla. Kuten muillakin GTPaaseilla, Rab-proteiineilla on alhainen luontainen GTPaasiaktiivisuus, mutta soluissa GTPaasia aktivoivat proteiinit (engl. GTPase activating protein, GAP) aktivoivat GTP:n hydrolysointia ja siten säätelevät, kuinka pitkän ajan Rab on aktiivisena (Pylypenko ym. 2018; Wittinghofer ja Vetter 2011). GAP-proteiinien konservoitunut toimintamekanismi perustuu siihen, että GAP tuo Rab-proteiinin aktiiviseen kohtaan tarpeelliset katalyyttiset aminohapot (Wilmes ja Kümmel 2023). Inaktiivinen Rab siirtyy kalvolta soluun kompleksina GDP:n irtoamisen estäjäproteiinin (engl. GDP dissociation inhibitor, GDI) kanssa, joka peittää Rab-proteiinin prenyyliryhmän ja tekee siten Rab-proteiinista vesiliukoisena (kuva 1) (Homma ym. 2021).

Rab voi aktivoitua uudelleen, kun kalvolla sijaitseva nukleotidin vaihtajaproteiini (engl. GDP-GTP exchange factor, GEF) stimuloi GDP:n irtoamista (kuva 1) (Pylypenko ym. 2018). Eri GEF-proteiinien toimintamekanismit ovat hyvin erilaisia (Wilmes ja Kümmel 2023). Rab-proteiinien affiniteetti sekä GTP:lle että GDP:lle on suuri, mutta koska GTP:n pitoisuus solussa on huomattavasti suurempi kuin GDP:n, GDP:n irtoaminen johtaa GTP:n sitoutumiseen (Pylypenko ym. 2018). Pelkästään nukleotidin vaihtuminen voi aiheuttaa samanaikaisesti GDI:n irtoamisen, minkä seurauksena Rab sitoutuu kalvolle, mutta joidenkin Rab-proteiinien tapauksessa erillinen GDI:n syrjäyttäjäproteiini (engl. GDI displacement factor, GDF) irrottaa GDI:n ennen kuin GEF stimuloi GDP:n irtoamista (kuva 1) (Dirac-Svejstrup ym. 1997; Pylypenko ym. 2018; Schoebel ym. 2009; Wilmes ja Kümmel 2023). GTP:n sitouduttua Rab-proteiini aktivoituu ja voi jälleen sitoa efektoreita (Wilmes ja Kümmel 2023).

Rab-proteiinien toimintasykliä säätelevistä proteiineista GDI:t ovat eri Rab-proteiineille yhteisiä, kun taas kullakin Rab-proteiinilla on omat spesifiset GEF- ja GAP-proteiininsa (Blümer ym. 2013; Pylypenko ym. 2018). Rab-proteiinin toiminnan selvittämiseksi on efektoreiden tunnistamisen lisäksi tärkeä tietää, missä ja milloin Rab aktivoidaan, minkä vuoksi myös Rab-proteiinille spesifisten GEF-proteiinien tunnistus on tärkeää (Homma ym. 2021). GEF-proteiinit määrittävät pitkälti monen Rab-proteiinin kalvopaikantumisen soluissa, mutta myös muilla tekijöillä voi olla merkitystä (Blümer ym. 2013; Gerondopoulos ym. 2012; Homma ym. 2021; Wiegandt ym. 2015).

Rab-proteiinit ovat perusrakenteeltaan keskenään hyvin samankaltaisia (Pylypenko ym. 2018). Rab-proteiinin aktiivisen tai inaktiivisen konformaation määrittävät pääasiassa kaksi aluetta, kytkinalueet 1 ja 2 (engl. switch) (Homma ym. 2021). Kytkinalue 1 on rakenteeltaan α -heliksin ja β -levyn välinen silmukka ja kytkinalueeseen 2 sisältyy α -heliksi (Pylypenko ym. 2018). Rab-proteiiniin sitoutuneen GTP:n γ -fosfaatti stabiloi kytkinalueita, mikä pitää proteiinin aktiivisessa konformaatioissa (Pylypenko ym. 2018). GTP:n hydrolysoituessa GDP:ksi kytkinalueet rentoutuvat, minkä seurauksena Rab-proteiinin konformaatio muuttuu inaktiiviseksi. Kytkinalueilla sekä muualla proteiinissa on muutamien aminohappojen pituisia nukleotidin sitomisen kannalta tärkeitä sekvenssimotiiveja, jotka ovat melko konservoituneita Rab-proteiineissa (Wittinghofer ja Vetter 2011). Niitä ovat fosfaatteja sitovat alueet PM1–3 (engl. phosphate and metal binding) ja guaniiniemästä sitovat alueet G1–3 (Wittinghofer ja Vetter 2011). Lisäksi Rab-proteiineilla on karboksiterminaalisisessä päässä prenyloitavat kysteiniin sisältävä hypervariaabelialue (engl. hypervariable domain, HVD), joka vaikuttaa ainakin joidenkin Rab-proteiinien kohdennukseen oikealle kalvolle (Chavrier ym. 1991).

Vaikka Rab-proteiinit ovat rakenteeltaan melko samankaltaisia, niillä on myös omanlaisiaan rakenteellisia piirteitä, jotka mahdollistavat spesifiset vuorovaikutukset tiettyjen efektoreiden sekä GEF- ja GAP-säätelijäproteiinien kanssa ja siten Rab-proteiinien spesifiset toiminnot tiettyillä kalvoilla (Pylypenko ym. 2018). Vuorovaikutuksiin osallistuu useita kohtia Rab-proteiinista, mutta etenkin kytkinalueet 1 ja 2 sekä niiden välinen alue (engl. interswitch) osallistuvat lähes kaikkien vuorovaikutuskumppaneiden sitomiseen (Pylypenko ym. 2018). Vaikka näidenkin rakenteiden muodostama alue on melko konservoitunut eri Rab-proteiineissa, sisältää se kuitenkin kullekin Rab-proteiinille spesifisiä aminohappotähteitä, jotka tekevät sen kolmiulotteisesta rakenteesta sopivan tiettyjen proteiinien sitoutumiselle (Merithew ym. 2001). Lisäksi ero Rab-proteiinin aktiivisen ja inaktiivisen konformaation välillä on suurin tällä alueella, ja Rab-proteiinin kanssa vuorovaikuttavat proteiinit sitoutuvatkin yleensä spesifisesti joko sen aktiiviseen tai inaktiiviseen konformaatioon (Pylypenko ym. 2018). Efektoriproteiinit sitoutuvat parhaiten Rab-proteiinin aktiiviseen konformaatioon, ja konformaation muutos inaktiiviseksi keskeyttää vuorovaikutuksen (Pylypenko ym. 2018; Spoerner ym. 2007).

1.2 Rab24

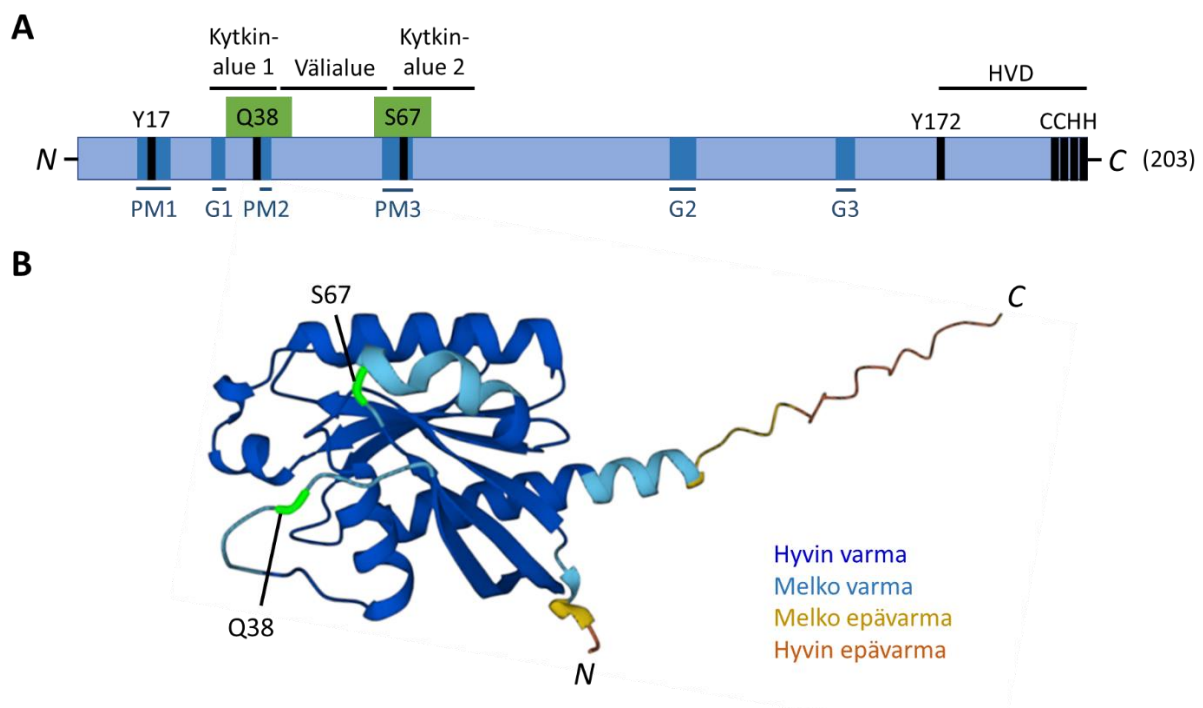
Rab24 on alkukantainen Rab-proteiini, sillä se ilmentyi jo eukaryoottien viimeisessä yhteisessä esivanhemmassa (Elias ym. 2012). Rab24 on konservoitunut monissa lajeissa, kuten nisäkäissä ja seeprakalassa (*Danio rerio*), mutta se ei ilmenny esimerkiksi banaanikärpäsessä (*Drosophila melanogaster*), sukkulamadossa (*Caenorhabditis elegans*) tai leiviniivassa (*Saccharomyces cerevisiae*) (Elias ym. 2012). Tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitytään ensisijaisesti nisäkässoluilla saatuihin tutkimustuloksiin.

Olkkonen ym. (1993) karakterisoivat Rab24:n ensimmäisen kerran. He osoittivat Rab24:n mRNA:n ilmentyvän kaikissa tutkituissa hiiren kudoksissa, eniten aivoissa. Samassa tutkimuksessa yli-ilmenneen Rab24:n todettiin useissa nisäkässolutyypeissä paikantuvan Golgin laitteen *cis*-puolen eli solulimakalvoston puoleisille kalvoille, solulimakalvostolle, näiden välialueelle (engl. ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC) sekä myöhäisille endosomaalisille vesikkeleille. Myöhemmin yli-ilmenneen Rab24:n osoitettiin paikantuvan myös autofagosomeihin (Munafó ja Colombo 2002; Ylä-Anttila ym. 2015). Endogeenisen Rab24:n sijaintia soluissa on haastava tutkia, koska sen määrä soluissa on vähäinen, eikä sitä tämänhetkellä vasta-aineilla kyetä spesifisesti havaitsemaan immunofluoresenssimikroskopialla (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon havainto). Myös Rab24:n molekyyli-tason toiminta tunnetaan toistaiseksi melko huonosti. Seuraavissa luvuissa käsitellään, mitä sen ominaisuuksista ja tehtävistä tällä hetkellä tiedetään.

1.2.1 Rab24:n rakenne ja erikoispiirteet

Rab24 rakentuu 203 aminohaposta ja se on molekyyli-painoltaan 23 kDa:n kokoinen (kuva 2A) (Uniprot, Rab24, *Mus musculus*). Rab24:n kolmiulotteista rakennetta ei toistaiseksi tunneta muuten kuin AlphaFold-ohjelmiston ennustamana (kuva 2B), mutta aminohapposekvenssiltään se muistuttaa pääosin muita Rab-proteiineja (Pylypenko ym. 2018). Rab24:llä on kuitenkin muutamia piirteitä, joilla se poikkeaa muista Rab-proteiineista. Se ensinnäkin hydrolysoi GTP:tä selvästi hitaammin kuin muut Rab-proteiinit (Erdman ym. 2000). Tästä syystä se esiintyy soluissa pääasiassa aktiivisessa, GTP:tä sitovassa muodossaan, toisin kuin useimmat Rab-proteiinit (Erdman ym. 2000). Hitaan hydrolyysin uskotaan johtuvan siitä, että

67. aminohappotähde on Rab24-proteiinissa seriini (S67), kun taas muilla Rab-proteiineilla vastaava aminohappo on glutamiini (Q) (Erdman ym. 2000). Aminohappotähde on osa PM3-sekvenssimotiivia ja se sijaitsee kytkinalueella 2 (kuva 2A), joka on tärkeä alue nukleotidin sitomiselle sekä proteiinin konformaatiolle (Pylypenko ym. 2018). Monissa muissa Rab-proteiineissa vastaavassa kohdassa sijaitseva glutamiini on hyvin keskeinen GTP:n hydrolyysille, sillä usein sen korvaus muilla aminohapoilla, esimerkiksi seriinillä, vähentää Rab-proteiinin GTPaasiaktiivisuutta huomattavasti (Munafó ja Colombo 2002; Stenmark ym. 1994; Wilson ym. 1996). Tällaiset mutaatiot siis aktivoivat usean Rab-proteiinin toimintaa, koska proteiini on normaalia suuremman osan ajasta aktiivisessa konformaatiossa. On kiinnostavaa, että kun Rab24:n seriini 67 puolestaan korvataan glutamiinilla (S67Q-substituutio), Rab24:n GTPaasiaktiivisuus kasvaa (Erdman ym. 2000).



Kuva 2. Rab24-proteiinin primäärirakenne (A) ja ennustettu tertiäärirakenne (B). A. Kytkinalueet 1 ja 2 määrittävät pääasiassa Rab-proteiinin konformaation. Nukleotidin sitomiseen osallistuvia sekvenssimotiiveja ovat fosfaatteja sitovat PM1–3 ja guaniiniemästä sitovat G1–3. HVD = hypervariaabelialue. Kursivoidut N ja C = proteiinin amino- ja karboksiterminaaliset päät. Aminohappojen Y17, S67 ja Y172 sekä karboksiterminaalisen pään kysteiniin (C) viereisten histidiinien (H) mahdollista merkitystä Rab24:n toiminnalle käsitellään varsinaisessa tekstissä. Vihreällä korostettujen Q38- ja S67-aminohappojen mutaatioita Q38P ja S67L käsitellään tutkielmassa. Rab24:ssä on yhteensä 203 aminohappoa. Kuva on tehty Pylypenkon ym. (2018) ja Wittinghoferin ja Vetterin (2011) julkaisujen perusteella. B. Rab24:n ennustettu kolmiulotteinen rakenne (AlphaFold, Rab24, *Mus musculus*). Glutamiini Q38 kytkinalueen 1 silmukassa ja seriini S67 kytkinalueen 2 α -kierteen vieressä on korostettu vihreällä. Muut värit tarkoittavat ennustettujen rakenteiden varmuusasteita kuvassa osoitetulla tavalla.

Muilla Rab-proteiineilla vastaavassa kohdassa sijaitsevan glutamiinin tärkeys GTP:n hydrolyysille liittyy proteiinista riippuen ensisijaisesti joko Rab-proteiinin omaan luontaiseen GTPaasiaktiivisuuteen tai Rab-proteiinin vuorovaikutukseen GAP-proteiinin kanssa (Lange-meyer ym. 2014). Rab24:n tapauksessa ei tiedetä, vastaako Rab24-WT (engl. wild type) esimerkiksi huonommin GAP-stimulaatioon kuin Rab24-S67Q-mutanttiproteiini. Rab24:n lisäksi myös toisella Ras-superperheeseen kuuluvalla proteiinilla, RhoE:lla, on vastaavassa kohdassa glutamiinin sijaan seriini (Foster ym. 1996). RhoE ei hydrolysoi GTP:tä lainkaan eikä vastaa GAP-stimulaatioon, ja siten se esiintyy soluissa ainoastaan GTP:tä sitovassa muodossaan (Foster ym. 1996).

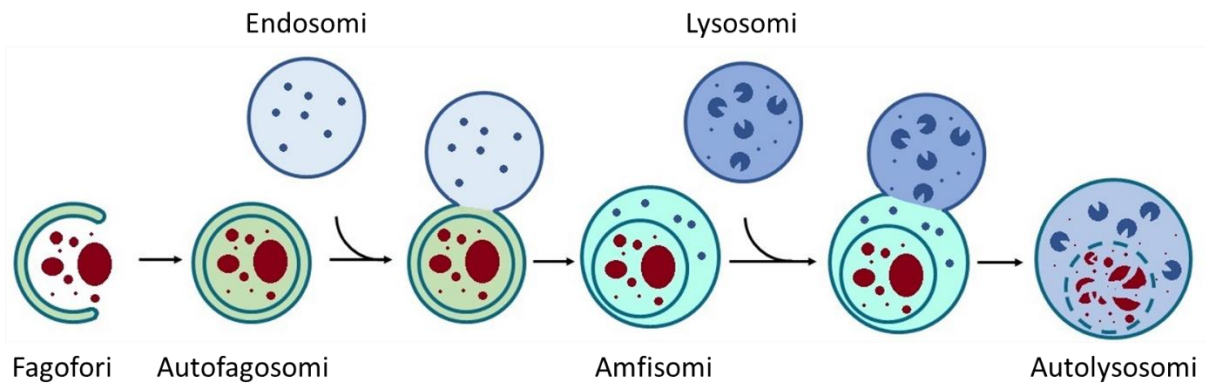
Seriini 67:n vaikutusta Rab24:n toimintaan on tutkittu myös korvaamalla se leusiinilla (L) (Munafó ja Colombo 2002; Ylä-Anttila ym. 2015). Useimmilla muilla Rab-proteiineilla vastaavan glutamiinin substituutio leusiinilla heikentää GTPaasiaktiivisuutta eli aktivoi proteiinia, kuten muutkin tämän glutamiinin substituutiot (Stenmark ym. 1994; Wilson ym. 1996; Ylä-Anttila ja Eskelinen 2018), mutta Rab24:n kyky sitoa GTP:tä heikentyy S67L-mutaation myötä (Munafó ja Colombo 2002; Ylä-Anttila ym. 2015). Rab24-S67L myös paikantuu solussa villityyppiä diffuusimmin, eikä se paikannu mihinkään kalvorakenteiseen soluelimeen (Munafó ja Colombo 2002; Ylä-Anttila ym. 2015). Se ei myöskään kolokalisoidu autofagosomimarkkeri LC3:n (engl. microtubule-associated protein light chain 3) kanssa, toisin kuin Rab24-WT (Ylä-Anttila ym. 2015). Rab24:n ominaisuuksia tutkittaessa on usein tarkasteltu niiden merkitystä Rab24:n paikantumiselle autofagosomeihin, koska Rab24:n toimintaa on eniten tutkittu autofagiassa. Autofagiaa ja Rab24:n osuutta sen säätelyyn käsitellään myöhemmin luvussa 1.2.2.

Rab24:llä on seriini S67:n lisäksi aminohapposekvenssissään muutama muukin mielenkiintoinen ero muihin Rab-proteiineihin nähden (Erdman ym. 2000). Sen karboksiterminaalisisä päässä prenyloitavien kysteiniinien vieressä on kaksi histidiiniä, joita ei tavata muilla prenyloituilla proteiineilla (kuva 2A) (Erdman ym. 2000). Rab24:n prenylaatiosta sekä GDI-proteiineihin sitoutumisesta onkin esitetty ristiriitaisia tuloksia. Erdmanin ym. (2000) mukaan Rab24 on heikommin prenyloitu kuin muut Rab-proteiinit ja sen sitoutuminen GDI-proteiineihin on vähäistä. Rab24:n poikkeavien piirteiden perusteella Erdman ym. (2000) ehdottivat, että Rab24 toimisi uudella mekanismilla, johon ei liittyisi GTP:n hydrolysointi tai GDI:hin sitoutuminen. Toisen tutkimuksen mukaan kuitenkin suuri osa Rab24:stä oli prenyloitunut, ja prenylaatio vaadittiin, jotta Rab24 paikantui autofagosomeihin (Ylä-Anttila ym. 2015). Lisäksi Behrends ym. (2010) ovat osoittaneet Rab24:n sitoutuvan GDI-proteiineihin.

Rab24:llä on myös Rab-proteiineille epätavallisia tyrosiiniaminohappotähteitä, joista kahden on osoitettu fosforyloituvan (Ding ym. 2003). Tyrosiini Y17:n fosforylaation on ehdotettu vaikuttavan Rab24:n alhaiseen GTPaasiaktiivisuuteen, sillä se sijaitsee PM1-alueella, joka sitoo nukleotidin fosfaatteja (kuva 2A) (Ding ym. 2003). Toinen fosforyloitava tyrosiini, Y172, sijaitsee HVD-alueella, joka liittyy joidenkin Rab-proteiinien paikantumiseen kalvorakenteisiin (kuva 2A) (Chavrier ym. 1991; Ding ym. 2003). On ehdotettu, että Y172:n fosforylaatio voisi vaikuttaa Rab24:n paikantumiseen solussa, mutta tätä ei tutkittu kokeellisesti (Ding ym. 2003). Ding ym. (2003) havaitsivat myös, että tyrosiinien fosforylaatiota esiintyi enemmän soluliikemassassa sijaitsevilla kuin kalvoihin sitoutuneilla Rab24-proteiineilla. Myöhemmin osoitettiin, että Rab24:n paikantuminen autofagosomeihin ei vaatinut Y17:n tai Y172:n fosforylaatiota tai defosforylaatiota (Ylä-Anttila ym. 2015).

1.2.2 Rab24 ja autofagia

Rab24:n toimintaa on eniten tutkittu autofagiaan liittyen. Autofagia on eukaryoottisolujen konservoitunut prosessi, jossa solun komponentteja hajotetaan lysosomaalisesti (Zhao ja Zhang 2019). Useat eri Rab-proteiinit säätelevät autofagian vaiheita (Szatmári ja Sass 2014). Rab24:n on osoitettu säätelevän autofagian tunnetuinta muotoa eli makroautofagiaa, jota tästä edespäin kutsutaan autofagiaksi (Ylä-Anttila ym. 2015). Prosessissa solun komponentteja hajotetaan ympäröimällä ne autofagosomeiksi kutsuttuihin vesikkeleihin, jotka myöhemmin fuusioituvat lysosomien kanssa (kuva 3) (Zhao ja Zhang 2019). Fuusion seurauksena syntyy autolysoosomeja, joissa autofagosomien sisältämä lasti hajotetaan (Zhao ja Zhang 2019). Hajotettavat komponentit voivat olla esimerkiksi proteiineja, kokonaisia soluelimiä tai solunsisäisiä patogeenejä (Eskelinen 2019; Wileman 2013). Hajotustuotteet palautetaan takaisin solulimaan, jossa ne voidaan käyttää esimerkiksi biosynteesiin tai energiantuotantoon (Eskelinen 2019).



Kuva 3. Makroautofagian vaiheet monisoluisilla eukaryooteilla. Fagofori-niminen kalvorakenne ympäröi hajotettavan kohteen ja sulkeutuessaan muodostaa kaksikalvoisen autofagosomin. Autofagosomit kypsyvät amfosomeiksi, kun ne fuusioituvat endosomien kanssa. Lopullinen kypsyminen tapahtuu amfisomin fuusioituessa lysosomin kanssa, jolloin muodostuu autolysosomi. Tällöin lysosomaaliset entsyymit hajottavat autofagosomaalisen sisemmän kalvon ja sen sisältämän lastin. Kuva on tehty Zhaon ja Zhangin (2019) ja Mizushiman (2007) julkaisujen perusteella.

Autofagiaprosessin alussa solulimakalvoston välittömässä läheisyydessä muodostuu kovera kalvorakenne eli fagofori, joka ympäröi hajotettavat komponentit ja lopulta sulkeutuu muodostaen kahden kalvon ympäröimän autofagosomin (kuva 3) (Zhao ja Zhang 2019). Esimerkiksi hiivalla autofagosomi fuusioituu heti vakuolin kanssa, mutta monisoluisilla eukaryooteilla autofagosomit kypsyvät asteittain hajotuskykyisiksi (Zhao ja Zhang 2019). Kypsymistä tapahtuu, kun autofagosomit fuusioituvat endosytoosireittiin kuuluvien kalvo-osastojen, kuten endosomien kanssa (kuva 3). Endosytoosireittiä esitellään lisää luvussa 1.2.3. Autofagosomien ja endosytoosireitin osastojen fuusioissa muodostuneita vesikkeleitä kutsutaan myös amfosomeiksi (Eskelinen 2019). Lopullinen kypsyminen tapahtuu autofagosomin tai amfisomin fuusioituessa lysosomin kanssa (kuva 3). Syntyneissä autolysosomeissa lysosomaaliset entsyymit hajottavat autofagosomin sisemmän kalvon ja sen sisältämän lastin (Tsuboyama ym. 2016). Jatkossa myös amfosomeihin viitataan autofagosomi-termillä, mikäli ei nimenomaisesti haluta viitata kypsymisasteeseen. Termeillä autofaginen vakuoli ja autofaginen osasto viitataan autofagosomeihin, amfosomeihin ja autolysosomeihin (Zhao ja Zhang 2019).

Autofagia ylläpitää solun homeostasiaa eri tavoin erilaisissa olosuhteissa (Gómez-Virgilio ym. 2022). Autofagiaa on kahden tyyppistä: basaaliautofagiaa ja indusoitua autofagiaa (Eskelinen 2019). Basaaliautofagiaa eli perustilan autofagiaa tapahtuu soluissa jatkuvasti, ja siinä keskeistä on hajottaa soluun kertyviä haitallisia ja tarpeettomia komponentteja, kuten vaurioituneita soluelimiä, väärin laskostuneita proteiineja ja proteiiniaggregaatteja (Eskelinen 2019).

Basaaliautofagiaa voidaan pitää solun laadunvalvontamekanismina. Basaaliautofagia on erityisen tärkeää soluille, jotka eivät enää jakaudu, kuten neuroneille (Damme ym. 2015). Sen häiriöillä onkin havaittu olevan yhteys neurodegeneratiivisiin sairauksiin (Hara ym. 2006; Klionsky ym. 2021; Komatsu ym. 2006). Autofagian tehostumista indusoivat solua kuormittavat olosuhteet, kuten ravinnon puute eli starvaatio tai hypoksia (Eskelinen 2019). Indusoitu autofagia on solujen selviytymismekanismi, jossa keskeistä on, että hajotuksessa vapautuneet aineet kierrätetään uusien komponenttien biosynteesiin tai käytetään energian tuotantoon (Eskelinen 2019). Basaaliautofagiaa ja indusoitua autofagiaa säädellään ainakin osittain eri mekanismein (Jäger ym. 2004; Lee ym. 2010; Yamamoto ym. 2006; Ylä-Anttila ym. 2015).

Rab24:n on havaittu kolokalisoituvan soluissa useiden autofagiaan liittyvien proteiinien kanssa (Tambe ym. 2009; Wu ym. 2006; Ylä-Anttila ym. 2015). Ylä-Anttilan ym. (2015) tutkimuksessa sen havaittiin kolokalisoituvan autofagosomimarkkeri LC3:n kanssa sekä perustilassa että aminohappojen puutteen aiheuttamassa starvaatiossa. Ylä-Anttila ym. (2015) myös osoittivat immunoelektronimikroskopiolla, että Rab24 paikantuu autofagosomien ulko- ja sisäkalvoille. Samassa tutkimuksessa Rab24:n toiminnan osoitettiin olevan erityisen tärkeää basaaliautofagian viimeisissä vaiheissa. Kun Rab24 hiljennettiin ei-näännytetyissä soluissa, soluihin kertyi runsaasti happamia ja yksikalvoisia hajotusvaiheessa olevia autolysosomeja (Ylä-Anttila ym. 2015). Vastaavaa ei havaittu, kun Rab24 hiljennettiin soluissa, joita näännytetään pitämällä niitä aminohapottomassa liuoksessa, mikä indusoi autofagiaa. Rab24 on siis ilmeisesti välttämätön autolysosomien hävitykselle basaaliautofagiassa (Ylä-Anttila ja Eskelinen 2018). Myös pitkäikäisten proteiinien ja Huntingtonin tautia aiheuttavan Huntingtin-mutanttiproteiinin muodostamien aggregaattien hävitys hidastui perustilassa, kun Rab24 hiljennettiin (Ylä-Anttila ym. 2015). Samassa tutkimuksessa osoitettiin, ettei Rab24 ollut välttämätön autofagiaprosessin aiemmille vaiheille, kuten esimerkiksi autofagosomien muodostukselle. Tämä ei poissulje sitä, että Rab24 voisi osallistua myös autofagian aiempiin vaiheisiin, mutta niissä sen ei kuitenkaan havaittu olevan korvaamaton.

Vaikka Rab24:n hiljennyksen ei havaittu vaikuttavan autofagiaprosessiin näännytetyissä soluissa (Ylä-Anttila ym. 2015), toinen tutkimusryhmä havaitsi kuitenkin Rab24:n sijainnin toisessa solutyypissä muuttuvan, kun autofagia indusoi aminohappostarvaatiolla (Munafó ja Colombo 2002). Rab24 paikantui tällöin fluoresenssimikroskopian perusteella suuriin koveriin ja rengasmaisiin kalvorakenteisiin (Munafó ja Colombo 2002). Lisäksi Rab24-proteiinin sekä sen mRNA:n ilmentymistason on havaittu kasvavan solua rasittavien olosuhteiden myötä, esimerkiksi neuroneissa vaurion jälkeen (Egami ym. 2005; Seki ym. 2009). Rab24:llä saattaa siis

olla joitain tehtäviä myös indusoidussa autofagiassa, mahdollisesti solutyypistä riippuen, vaikka se ei olekaan osoittautunut välttämättömäksi missään indusoidun autofagian vaiheessa.

On vielä epäselvää, millä mekanismeilla Rab24 edesauttaa autolysosomien hävittämistä basaaliautofagiassa. Autolysosomien hävitykseen tunnetaan tällä hetkellä kaksi mekanismia. Autolysosomeista voidaan muodostaa uudelleen lysosomeja prosessissa, jossa autolysosomeihin muodostuvien putkimaisten rakenteiden päistä irtoaa vesikkeleitä, jotka myöhemmin kypsyvät lysosomeiksi (Yu ym. 2010). Autolysosomit voivat myös fuusioitua solukalvolle, jolloin hajoitettu materiaali vapautetaan solun ulkopuolelle eksosytoottisesti (Spampanato ym. 2013). Hävitystä säädellään ainakin osittain eri mekanismein indusoidussa autofagiassa ja basaaliautofagiassa, ja edellä mainitut hävitystavat liittyvät säätelymekanismeihin, jotka ovat aktiivisia pääasiassa starvaation indusoimassa autofagiassa (Rodgers ym. 2022; Settembre ym. 2013; Spampanato ym. 2013; Ylä-Anttila ym. 2015; Yu ym. 2010). Autolysosomien hävitys basaaliautofagiassa sen sijaan tunnetaan huonommin (Rodgers ym. 2022). Voi esimerkiksi olla, että Rab24 liittyy joihinkin toistaiseksi tuntemattomiin autolysosomien hävityksen säätelymekanismeihin, jotka toimivat vain basaaliautofagiassa.

Aglerin ym. (2014) tutkimustulokset vahvistavat käsitystä Rab24:n tärkeydestä autofagisten osastojen hävittämisprosessille basaaliautofagiassa. He havaitsivat Rab24:n Q38P-mutaation (glutamiini 38 -> proliini) olevan vahvasti yhteydessä tiettyjen koirarotujen resessiivisesti periytyvään ataksiaan. Ataksia on neurodegeneratiivinen sairaus, joka heikentää motoristen liikkeiden koordinaatiota. Glutamiini 38 sijaitsee Rab24:n kytkinalueella 1 (kuva 2A), eli Q38P-substituutio saattaa vaikuttaa esimerkiksi Rab24:n nukleotidinsitomiskykyyn, mutta tätä ei ole toistaiseksi tutkittu (Aglér ym. 2014; Ylä-Anttila ja Eskelinen 2018). Glutamiini tässä sijainnissa on hyvin konservoitunut Rab24:ssä eri lajeissa, muttei ole konservoitunut muissa Rab-proteiineissa (Aglér ym. 2014; Pylypenko ym. 2018). Sairaiden koirien pikkuaivojen Purkinjen soluihin havaittiin kertyneen runsaasti autofagisia vakuoleja, pääasiassa amfosomeja ja autolysosomeja (Aglér ym. 2014). Purkinjen solujen lukumäärä oli myös vähentynyt huomattavasti, ja pikkuaivoissa havaittiin proteiiniaggregaatteja sekä merkkejä aksonien degeneraatiosta. Löydökset ovat hyvin samankaltaisia kuin hiiritutkimuksissa, joissa basaaliautofagian neuroniselektiivinen estäminen johti neurodegeneraatioon (Hara ym. 2006; Komatsu ym. 2006). Rab24-Q38P:n on kuitenkin todettu kolokalisoituvan autofagosomimarkkeri LC3:n kanssa yhtä paljon kuin Rab24-WT (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos).

1.2.3 Rab24:n muut tehtävät

Rab24 osallistuu myös endosomaalisen hajotuksen viimeisten vaiheiden säätelyyn (Amaya ym. 2016). Kun solun ulkopuolinen molekyyli otetaan endosytoottisesti soluun, se päätyy ensin varhaisiin endosomeihin (Huotari ja Helenius 2011). Niissä lasti lajitellaan kierrätettäviin ja hajotettaviin molekyyliin. Hajotettavaksi tarkoitettu lasti jää varhaisiin endosomeihin, jotka joko kypsyvät myöhäisiksi endosomeiksi tai erilliset vesikkelit vievät lastin niistä myöhäisiin endosomeihin (Gruenberg ja Stenmark 2004). Lasti hajotetaan, kun myöhäiset endosomit fuusioituvat lysosomien kanssa (Huotari ja Helenius 2011).

Endosytoosireitin säätelyyn osallistuvat useat Rab-proteiinit (Amaya ym. 2016). Rab7, joka on myöhäisten endosomien markkeri, osallistuu muun muassa myöhäisten endosomien ja lysosomien fuusioitumisen säätelyyn (Borchers ym. 2021). Ennen fuusiota Rab7:n efektori RILP (engl. Rab interacting lysosomal protein) kiinnittää dyneiinin ja dynaktiin muodostaman moottoriproteiini-kompleksin myöhäisiin endosomeihin, minkä seurauksena endosomeja kuljetetaan mikrotubuluksia pitkin kohti lysosomeja (Johansson ym. 2007; Schleinitz ym. 2023). Myös Rab24 paikantuu myöhäisiin endosomaalisiin vesikkeleihin (Olkkonen ym. 1993), ja sen havaittiin vuorovaikuttavan Rab7:n sekä RILP:n kanssa (Amaya ym. 2016). Rab24 myös vaadittiin, jotta Rab7 paikantui endosomeihin ja jotta endosytoottinen lasti hajotettiin lysosomaalisesti (Amaya ym. 2016). Amaya ym. (2016) ehdottavat, että Rab24 muodostaa Rab7:n ja RILP:n kanssa myöhäisten endosomaalisten vesikkeleiden kalvoille kompleksin, joka säätelee vesikkeleiden kuljetusta mikrotubuluksia pitkin.

Rab24:n onkin havaittu vuorovaikuttavan myös mikrotubulusten kanssa (Militello ym. 2013). Toisaalta vuorovaikutus voi liittyä myös Rab24:n toimintaan mitoosin ja meioosin säätelyssä (Militello ym. 2013; Qiu ym. 2019). Rab24:n havaittiin olevan tärkeä mitoottisessa solunjakautumisessa kromosomien segregaatille sekä sytokineesille (Militello ym. 2013). Metafaasissa Rab24 myös paikantui tumasukkulaan (Militello ym. 2013). Lisäksi naaraan meioosissa Rab24:n hiljentäminen johti epänormaaleiden tumasukkuloiden muodostukseen, kromosomien virheelliseen segregatioon ja aneuploidisten munasolujen syntymiseen (Qiu ym. 2019). Vaikutusten uskottiin johtuvan siitä, että Rab24:n hiljennys aiheutti virheitä mikrotubulusten kiinnittymisessä kromosomien kinetokoreihin (Qiu ym. 2019).

Seitz ym. (2019) havaitsivat, että Rab24 säätelee myös mitokondrioiden plastisuutta. Mitokondrioiden plastisuudella tarkoitetaan niiden kykyä muuttaa morfologiaansa ja toimintaansa

vasteena solun tarpeisiin (Bahat ja Gross 2019). Rab24:n havaittiin indusoivan maksasolujen mitokondrioiden fissiota eli jakautumista, sillä Rab24:n hiljentämisen seurauksena mitokondrioista tuli pidempiä ja niillä oli enemmän yhdysaaroja toisiinsa (Seitz ym. 2019). Samassa tutkimuksessa Rab24:n myös todettiin vuorovaikuttavan mitokondrioiden fissiota säätelevän FIS1-proteiinin (engl. mitochondrial fission 1 protein) kanssa. Lisäksi Rab24:n hiljentäminen aktivoi mitokondrioissa tapahtuvaa soluhengitystä ja vähensi mitofagiaa eli mitokondrioiden autofagista hajottamista perustilassa (Seitz ym. 2019).

Säätelemällä mitokondrioiden plastisuutta Rab24 osallistuu myös maksan lipidi- ja glukoosihomöostasian säätelyyn (Seitz ym. 2019). Rab24:n mRNA:n ilmentymisen havaittiin huomattavasti lisääntyneen ylipainoisten, ei-alkoholiperäistä rasvamaksatautiä sairastavien ihmisten maksakudoksessa (Seitz ym. 2019). Samassa tutkimuksessa ylipainoisilla hiirillä maksaselektiivinen Rab24:n hiljentäminen vähensi rasvan kertymistä maksaan ja pienensi veren glukoosi- ja kolesterolipitoisuutta. Hiljentäminen myös vähensi näiden hiirten maksasolujen mitokondrioiden fissioitumista. Rab24:n hiljentämisellä ehdotettiin olevan maksasolujen mitokondrioiden toimintaan samankaltaisia vaikutuksia kuin paastolla, sillä mitokondrioiden lisääntyntä fuusioitumista ja soluhengityksen tehostumista tavataan tyypillisesti paaston indusoimana (Gomes ym. 2011; Seitz ym. 2019). Rab24:n hiljennys maksasoluissa myös lisäsi LDL:n (engl. low density lipoprotein) endosytoosia ja vähensi kolesterolin erityystä soluista, mutta mekanismeja ei tutkittu enempää (Seitz ym. 2019). Seitz ym. (2019) ehdottavat, että esimerkiksi maksan rasvoittumisen tai veren liiallisen kolesterolipitoisuuden hoidossa voitaisiin mahdollisesti käyttää Rab24:ään kohdistuvia hoitomuotoja.

Rab24:n mRNA:n ilmentymisen on havaittu kasvaneen myös heptosellulaarisessa karsinoomassa (Chen ym. 2017). Samassa tutkimuksessa Rab24:n hiljentäminen vähensi näiden syöpäsolujen liikkuvuutta, epiteeli-mesenkymaalitransitiota ja adheesiokykyä, mutta mekanismeja ei tutkittu tarkemmin. Rab24:n mRNA:n ilmentymistason muutokset on liitetty useisiin muihinkin sairauksiin, mutta monet tutkimuksista eivät ole keskittyneet Rab24:ään, eikä sen merkitystä taudeille ole tutkittu enempää. Esimerkiksi eturauhassyövässä Rab24:n korkean ilmentymistason on havaittu olevan yhteydessä huonoon ennusteeseen (Hu ym. 2020), haimasyövässä sen sijaan hyvään ennusteeseen (Deng ym. 2022; Yu ym. 2021). Lisäksi Rab24:n mRNA:n ilmentymisen on havaittu lisääntyneen Alzheimerin tautia (Li ym. 2023; Qin ym. 2022), lasten tuberkuloosia (Jenum ym. 2016) ja nivelreumaa (Wu ym. 2021) sairastavien potilaiden veressä. Ilmentymisen on puolestaan havaittu vähentyneen multippeliskleroosia sairastavien potilaiden veressä (Igcı ym. 2016) sekä oireellista ateroskleroosia sairastavien potilaiden

kaulavaltimoiden plakeissa (Swaminathan ym. 2014). Koska tarkempia mekanismeja näissä tapauksissa ei ole tutkittu, on epäselvää, ovatko muutokset Rab24:n mRNA:n ilmentymistasossa mahdollisesti tautien taustalla vai niiden seurauksia. Ei myöskään tiedetä, onko näissä tapauksissa potilaiden soluissa häiriöitä joissain edellä esitellyissä prosesseissa, joiden säätelyyn Rab24 osallistuu.

1.3 Rab24:n mahdolliset vuorovaikutuskumppanit

Vaikka Rab24:n on osoitettu säätelevän useita solunsisäisiä prosesseja, sen toiminnan molekulaariset mekanismit tunnetaan toistaiseksi huonosti. Proteiinien toiminnasta voidaan saada keskeistä tietoa, kun selvitetään, minkä muiden proteiinien kanssa ne vuorovaikuttavat ja minkälaisia nämä vuorovaikutukset ovat luonteeltaan (Mohammed ja Carroll 2013). Rab-proteiinin toiminnan selvittämiseksi on muun muassa tärkeä tunnistaa sen efektoreja sekä sitä aktivoivia GEF-proteiineja (Fukuda ym. 2008; Homma ym. 2021). Tämä pro gradu -tutkielma keskittyy tutkimaan Rab24:n vuorovaikutuksia muiden proteiinien kanssa.

Rab24:lle on aiemmin ehdotettu muutamia potentiaalisia vuorovaikutuskumppaneita. Monet niistä toimivat kalvofuusiotapahtumissa, mikä viittaa siihen, että myös Rab24 saattaa osallistua joidenkin kalvofuusioiden säätelyyn (Ylä-Anttila ja Eskelinen 2018). Kuten edellä on mainittu, Rab24:n on esimerkiksi osoitettu vuorovaikuttavan Rab7:n ja RILP:n kanssa, jotka vaaditaan endosomin ja lysosomin fuusioitumiseen (Amaya ym. 2016). Lisäksi starvaation indusoimassa autofagiassa Rab7 on välttämätön myös autofagosomien fuusioitumiselle lysosomien kanssa (Gutierrez ym. 2004; Jäger ym. 2004). Rab7 ja RILP osallistuvat endosomien ja autofagosomien kuljettamiseen kohti lysosomeja ja mahdollisesti myös näiden kiinnittämiseen lysosomeihin ennen fuusiota (Borchers ym. 2021; Lin ym. 2014; Schleinitz ym. 2023; Wijdeven ym. 2016).

Rab24:n on myös havaittu vuorovaikuttavan joidenkin SNARE-proteiinien (engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) kanssa (Behrends ym. 2010; Schardt ym. 2009). Tietyillä kalvoilla spesifisesti sijaitsevien SNARE-proteiinien kiertyminen toistensa ympäri edesauttaa kalvojen fuusioitumista (Smeele ja Vaccari 2023). Schardt ym. (2009) havaitsivat tutkimuksessaan vuorovaikutuksen Rab24:n ja SNARE-proteiini SNAP29:n (engl. synaptosomal-associated protein 29) välillä, ja he ehdottivat SNAP29:n olevan Rab24:n efektori. SNAP29 osallistuu muun muassa autofagosomien ja lysosomien fuusion säätelyyn

(Itakura ym. 2012; Smeele ja Vaccari 2023). Rab24:n on todettu vuorovaikuttavan myös GOSR1-proteiiniin (engl. Golgi SNAP receptor complex member 1) ja NSF-proteiiniin (engl. N-ethylmaleimide sensitive fusion protein) kanssa (Behrends ym. 2010). GOSR1 on Golgin laitteessa sijaitseva SNARE-proteiini (Sun ym. 2012), ja NSF puolestaan osallistuu erilaisten SNARE-kompleksien hajottamiseen kalvojen fuusioituttua (White ym. 2018).

Edellä esitellyissä tapauksissa yhtenä menetelmänä vuorovaikutusten tutkimiseen on käytetty koimmunopresipitaatiota, jossa solulyysaateista eristetään vasta-aineella kohdeproteiini sekä tähän sitoutuneet proteiinit (Lin ja Lai 2017). Mikäli tutkittava potentiaalinen vuorovaikutuskumppani eristyy kohdeproteiinin mukana, proteiinien välillä on oletettavasti fyysinen vuorovaikutus. Koimmunopresipitaatio on tavallisin menetelmä fyysisten vuorovaikutusten tunnistamiseen (Mohammed ja Carroll 2013). Se ei kuitenkaan paljasta, ovatko proteiinien väliset vuorovaikutukset suoria vai epäsuoria, sillä kohdeproteiinin mukana voi eristyä esimerkiksi monen proteiinin muodostama kompleksi, jonka osia kohdeproteiini ja tutkittava vuorovaikutuskumppani ovat (Lin ja Lai 2017). Menetelmä ei myöskään sovi ennestään tuntemattomien vuorovaikutuskumppaneiden laajamittaiseen kartoittamiseen, vaan sillä tutkitaan tiettyjä, etukäteen valikoituja potentiaalisia vuorovaikutuskumppaneita (Mohammed ja Carroll 2013).

Koimmunopresipitaatiomenetelmää käytetään Rab24:n fyysisten vuorovaikutusten tutkimiseen myös tässä tutkielmassa. Tutkittavat potentiaaliset vuorovaikutuskumppanit ovat sen sijaan valikoituneet toisen menetelmän perusteella. Eskelisen tutkimusryhmä on äskettäin kartoittanut proteiineja, jotka sijaitsevat solussa Rab24:n läheisyydessä (julkaisematon tulos). Menetelminä käytettiin proksimiteettileimausta (engl. proximity labeling) ja massaspektrometriaa. Tutkimuksessa hiiren Neuro-2a-neuroblastoomasoluissa ilmenettiin Rab24-proteiiniin fuusioitua APEX2-entsyymiä (engl. engineered ascorbate peroxidase), jonka avulla fuusioproteiinista 30 nanometrillä sijainneet proteiinit leimattiin biotiinilla. Määrityksessä leimautui siis myös proteiineja, jotka sijaitsevat Rab24:n lähellä, vaikka ne eivät fyysisesti ole vuorovaikutuksessa sen kanssa (Del Olmo ym. 2019; Homma ym. 2021). Menetelmällä selvitettiin sekä Rab24-WT:n että Rab24-S67L- ja Rab24-Q38P-mutanttiproteiinien mahdollisia vuorovaikutuskumppaneita.

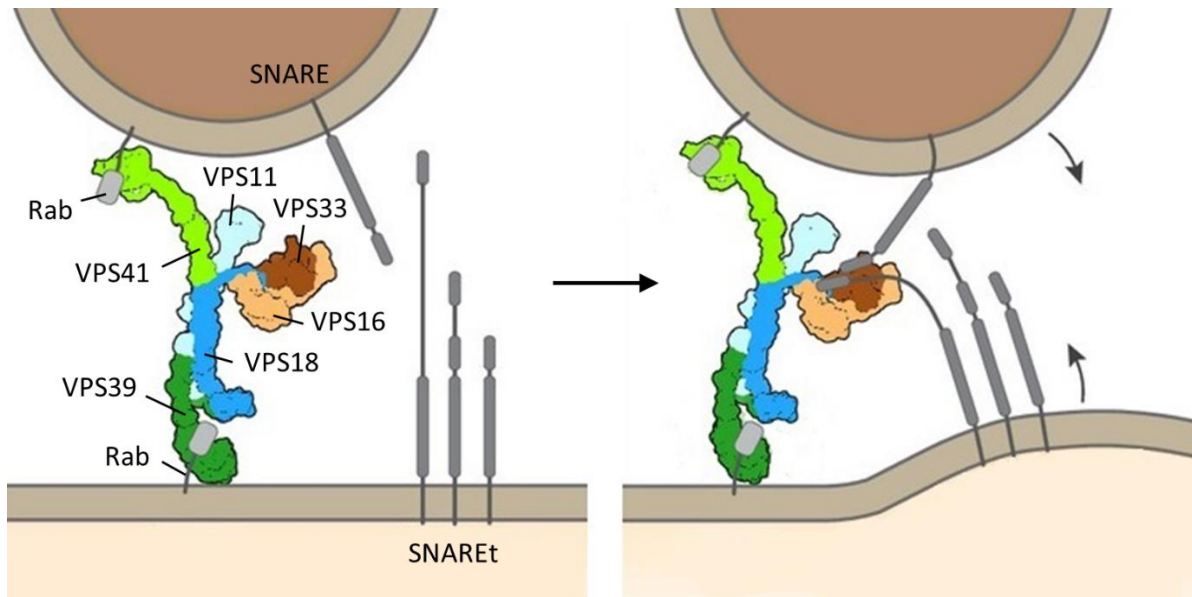
Julkaisemattomien tulosten mukaan Rab24-WT:n lähiympäristössä sijaitsevat muun muassa lukuisia Golgin laitteen ja solulimakalvoston välistä kalvoliikennettä sääteleviä proteiineja, esimerkiksi COPII-kompleksin (engl. coat protein complex II) proteiineja sekä tiettyjä Golgin laitteen proteiineja. COPII-kompleksi päällystää vesikkeleitä, jotka kuljettavat proteiineja

solulimakalvostolta Golgin laitteeseen (Gorur ym. 2017). Lisäksi Rab24-WT:n lähellä sijaitti retromeerikompleksin sekä HOPS-kompleksin (engl. homotypic fusion and protein sorting complex) proteiineja. Retromeerikompleksi osallistuu endosomien sisältämän lastin kuljetukseen Golgin laitteeseen ja solukalvolle (Burd ja Cullen 2014), ja HOPS-kompleksi säätelee muun muassa endosomien ja autofagosomien fuusioitumista lysosomien kanssa (Shvarev ym. 2022). Proksimateettileimausmäärittelyksen tulokset ovat yhdenmukaisia aiempien havaintojen kanssa, joiden mukaan Rab24 paikantuu muun muassa ERGIC-alueelle, Golgin laitteeseen, myöhäisiin endosomeihin sekä autofagosomeihin (Munafó ja Colombo 2002; Olkkonen ym. 1993). Ainakin osa Rab24:n lähiympäristössä sijaitsevista proteiineista todennäköisesti vuorovaikuttaa myös fyysisesti sen kanssa. Tutkimuskohteiksi tähän pro gradu -tutkielmaan valikoituivat HOPS-kompleksiin kuuluva VPS18 (engl. vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog) ja Golgin laitteessa sijaitseva GM130 (engl. Golgi matrix protein 130).

1.3.1 VPS18 ja HOPS-kompleksi

VPS18 on 110 kDa:n kokoinen proteiini (Uniprot, VPS18, *Mus musculus*), joka on muun muassa osa HOPS-kompleksia (Shvarev ym. 2022). HOPS-kompleksi on kiinnittymistekijä, joka säätelee myöhäisten endosomien, autofagosomien sekä Golgin laitteesta peräisin olevien vesikkeleiden fuusiota lysosomien kanssa (Jiang ym. 2014; Schoppe ym. 2020; Shvarev ym. 2022). Se kiinnittää fuusioituvat kalvo-osastot toisiinsa, sitoo eri kalvoilla sijaitsevia SNARE-proteiineja ja edesauttaa niiden sitoutumista toisiinsa, mikä lopulta johtaa kalvojen fuusioitumiseen (Jiang ym. 2014; Shvarev ym. 2022).

HOPS-kompleksi koostuu kuudesta VPS-proteiinista (kuva 4). VPS18 on osa kompleksin ydintä yhdessä VPS11:n, VPS16:n ja VPS33:n kanssa (Shvarev ym. 2022). VPS16 ja VPS33 muodostavat SNARE-proteiineja sitovan moduulin (Shvarev ym. 2022). VPS41 ja VPS39, joiden välityksellä HOPS-kompleksi kiinnittyy fuusioituviiin kalvorakenteisiin, sijaitsevat ytimen vastakkaisilla puolilla (Shvarev ym. 2022). Proksimateettileimaustulosten mukaan VPS18:n lisäksi myös VPS41, VPS39 ja VPS16 sijaittivat Rab24-WT:n lähiympäristössä (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos). VPS18 valittiin tähän tutkielmaan HOPS-kompleksin edustajaksi, koska proksimateettileimaustulosten mukaan HOPS-kompleksin proteiineista juuri se oli vahvin ehdokas Rab24:n vuorovaikutuskumppaniksi.



Kuva 4. Kuudesta VPS-proteiinista muodostuva HOPS-kompleksi kiinnittää fuusioituvat kalvot toisiinsa ja edesauttaa SNARE-proteiinien pariutumista. Kuvan esimerkissä Rab-proteiinit kiinnittävät HOPS-kompleksin fuusioituville kalvoille VPS41- ja VPS39-proteiinien välityksellä. VPS16 ja VPS33 sitovat SNARE-proteiineja. HOPS-kompleksi edesauttaa autofagosomien, endosomien sekä Golgin laitteesta peräisin olevien vesikkeleiden fuusiota lysosomien kanssa. Kuvassa ei nimetä fuusioituvia kalvorakenteita, sillä on epäselvää, kummin päin HOPS-kompleksi orientoituu osastojen välille. Kuva: Shvarev ym. 2022 (muokattu).

VPS18 on myös osa CORVET-kompleksia (engl. class C core vacuole/endosome tethering complex). CORVET-kompleksi on kiinnittymistekijä, joka säätelee vesikkeleiden kiinnittymistä varhaisiin endosomeihin (Spang 2016). CORVET-kompleksin ydin muodostuu samoista proteiineista kuin HOPS-kompleksin, mutta VPS41:n tilalla on VPS8 ja VPS39:n tilalla VPS3 (Spang 2016). Koska proksimiteettileimausmäärityksen tulosten mukaan myös VPS41 ja VPS39 sijaitsivat Rab24:n lähellä, mutta VPS8 ja VPS3 eivät, HOPS-kompleksi on CORVET-kompleksia todennäköisempi Rab24:n vuorovaikutuskumppani (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos).

Ei tiedetä tarkalleen, miten HOPS-kompleksi sitoutuu fuusioituville kalvoille. Sen kiinnittämiseen voi ilmeisesti osallistua useita tekijöitä (Borchers ym. 2021). Muun muassa kalvoilla sijaitsevat aktiiviset pienet GTPaasit kuten Rab-proteiinit voivat sitoa HOPS-kompleksia joko suoraan (kuva 4) tai muiden efektoriensa välityksellä. HOPS-kompleksin kiinnittäjiksi myöhäiseen endosomiin on ehdotettu muun muassa Rab7-proteiinia RILP:n välityksellä (Lin ym. 2014) sekä Rab2-proteiinia (Schleinitz ym. 2023). Lisäksi HOPS-kompleksin sitomiseen voivat

osallistua muun muassa SNARE-proteiinit (Jiang ym. 2014), muut kiinnittymistekijät (McEwan ym. 2015) ja fosfatidyli-inositolifosfaatit (Jeschke ja Haas 2018).

Rab24:n ja HOPS-kompleksin potentiaalista vuorovaikutusta on kiinnostavaa tutkia, koska muun muassa Rab24:n tunnistetut vuorovaikutuskumppanit viittaavat siihen, että myös Rab24 saattaa osallistua endosomaalisen ja autofagosomaalisen reitin kalvofuusioihin (Amaya ym. 2016; Ylä-Anttila ja Eskelinen 2018). Esimerkiksi autofagosomin ja lysosomin fuusiossa Rab24:n vuorovaikutuskumppani SNAP29 on osa SNARE-proteiinikompleksia, jonka toimintaa HOPS-kompleksi säätelee (Itakura ym. 2012; Smeele ja Vaccari 2023). On myös havaittu, että Rab24:n S67L- ja Q38P-mutaatiot todennäköisesti heikentävät Rab24:n potentiaalista vuorovaikutusta HOPS-kompleksin kanssa, sillä Eskelisen tutkimusryhmän julkaisemattomien proksimiteettileimaustulosten mukaan Rab24-S67L sekä Rab24-Q38P esiintyivät selvästi Rab24-WT:tä harvemmin HOPS-kompleksin proteiinien, kuten VPS18:n, lähellä.

1.3.2 GM130

GM130 on Golgin laitteen *cis*-puolen kalvoilla sijaitseva 130 kDa:n kokoinen perifeerinen kalvoproteiini (Nakamura ym. 1995). Se on sitoutunut karboksiterminaaliseen päästään Golgin laitteen kalvojen sytosoliselle puolelle (Huang ym. 2021; Nakamura ym. 1995). Koska GM130-proteiinia esiintyy runsaasti *cis*-Golgin laitteen kalvoissa, sitä voidaan käyttää tämän osaston markkerina (Taguchi ym. 2003). GM130:n on myös havaittu kiertävän *cis*-Golgin laitteen kalvojen sekä ERGIC-alueen vesikkeleiden välillä (Marra ym. 2007). GM130 on tutkituimpia Golgin laitteessa sijaitsevia proteiineja (Huang ym. 2021).

GM130:lla on useita tehtäviä. Sen tärkein tehtävä on säädellä ja ylläpitää Golgin laitteen rakennetta (Huang ym. 2021). Se muun muassa sitoo Golgin laitteen kalvo-osastoja toisiinsa (Nakamura 2010). Lisäksi se säätelee solulimakalvostolta tulevien vesikkeleiden fuusiota Golgin laitteeseen toimimalla kiinnittymistekijänä (Nakamura 2010). GM130:n on todettu olevan Rab1b- ja Rab33b-proteiinien efektori Golgin laitteen sisäisissä sekä solulimakalvoston ja Golgin laitteen välisissä kiinnittymis- ja fuusiotapahtumissa (Huang ym. 2021; Valsdottir ym. 2001; Weide ym. 2001). GM130 on myös autofagian negatiivinen säätelijä, sillä se häiritsee autofagosomien muodostumista sitomalla GABARAP-proteiinia (engl. gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein), joka osallistuu muun muassa fagoforin sulkeutumiseen (Joachim ym. 2015). Lisäksi GM130:lla on tehtäviä muun muassa proteiinien glykosylaatiassa

(Puthenveedu ym. 2006), solujen polaarisuuden ja migraation säätelyssä (Baschieri ym. 2015) sekä tumasukkulan muodostuksessa (Wei ym. 2015).

Eskelisen tutkimusryhmän julkaisemattomien proksimateettileimaustulosten mukaan Rab24:n lähellä sijaitsevat GM130:n lisäksi myös useita muita Golgin laitteen proteiineja. GM130 valittiin tutkittavaksi tähän projektiin, koska sen sijainti *cis*-Golgin laitteen kalvoilla sekä ERGIC-alueella vastaa osittain Rab24:n sijaintia (Olkkonen ym. 1993). Lisäksi GM130 säätelee kalvo-fuusioita Golgin laitteen alueella, kuten myös Rab24:n aiemmin tunnistettu vuorovaikutuskumppani SNARE-proteiini GOSR1 (Behrends ym. 2010; Sun ym. 2012). Myös Rab24:n mutaatioiden vaikutusta sen ja GM130:n potentiaaliseen vuorovaikutukseen on kiinnostava tutkia, sillä proksimateettileimaustulosten mukaan GM130 esiintyi Rab24-WT:n läheisyydessä useammin kuin Rab24-S67L:n läheisyydessä, mutta yhtä usein Rab24-WT:n ja Rab24-Q38P:n läheisyydessä. S67L- ja Q38P-mutaatioilla on siis todennäköisesti erilainen vaikutus Rab24:n assosiaatioon GM130:n tai *cis*-Golgin laitteen kanssa. Lisäksi alustavassa kokeessa GM130:n on todettu kolokalisoituvan enemmän yli-ilmennetyn Rab24-Q38P:n kuin Rab24-WT:n kanssa (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos).

1.4 Tutkimuksen tavoitteet ja hypoteesit

Rab24:n molekyyli-tason toiminta tunnetaan toistaiseksi huonosti. Toimintamekanismeista voidaan saada tarkempaa tietoa, kun tunnistetaan proteiineja, joiden kanssa Rab24 on vuorovaikutuksessa. Tämä pro gradu -tutkielma keskittyy tunnistamaan Rab24:n vuorovaikutuskumppaneita, sekä selvittämään, mistä Rab24:n ominaisuuksista havaitut vuorovaikutukset ovat riippuvaisia. Tutkielmalla on kolme spesifistä tavoitetta:

1. Selvittää, onko Rab24 fyysisessä vuorovaikutuksessa VPS18:n tai GM130:n kanssa.
2. Tutkia, ovatko mahdolliset fyysiset vuorovaikutukset riippuvaisia GTP:n sitoutumisesta Rab24:ään ja vaikuttavatko Rab24:n mutaatiot vuorovaikutuksiin. Käsiteltävät mutaatiot ovat GTP:n sitomiskykyä heikentävä S67L-mutaatio tai koirien ataksiaa aiheuttava Q38P-mutaatio.
3. Tutkia, vaikuttavatko Rab24:n S67L- ja Q38P-mutaatiot sen kolokalisaatioon VPS18:n tai GM130:n kanssa soluissa riippumatta siitä, havaitaanko fyysisiä vuorovaikutuksia.

Fyysisiä vuorovaikutuksia tutkitaan koimmunopresipitaatiolla ja kolokalisaatiota tutkitaan proteiinien immunofluoresenssivärjäyksellä. Mikäli koimmunopresipitaatiomenetelmällä havaitaan vuorovaikutus, sitä tutkitaan myös proksimiteettiligaatiomäärityksellä (engl. proximity ligation assay, PLA), joka paljastaa *in situ*, missä kohdissa solua proteiinit sijaitsevat lähekkäin. Kaikissa kokeissa käytetään hiiren Neuro-2a-neuroblastoomasoluja. Nämä hermostoperäiset solut valittiin tutkimukseen, koska edellä esitellyssä proksimiteetileimausmäärityksessä käytettiin samaa solulinjaa, Rab24:n on havaittu ilmentyvän enemmän hiiren aivoissa kuin muissa kudoksissa (Olkkonen ym. 1993) ja Rab24:n Q38P-mutaatio aiheuttaa koirien neurodegeneratiivisen sairauden (Aglar ym. 2014).

Mikäli fyysisiä vuorovaikutuksia havaitaan, hypoteesina on, että vuorovaikutus on riippuvainen GTP:n sitoutumisesta Rab24:ään, sillä HOPS-kompleksin sekä GM130:n tiedetään olevan muiden Rab-proteiinien efektoreita (Lin ym. 2014; Valsdottir ym. 2001; Weide ym. 2001; Zhang ym. 2023), ja efektorit sitoutuvat parhaiten Rab-proteiinin aktiiviseen konformaatioon (Pylypenko ym. 2018). Julkaisemattomien proksimiteetileimaustulosten mukaisesti toinen hypoteesi on, että Rab24:n S67L-mutaatio heikentää potentiaalista vuorovaikutusta sekä kolokalisaatiota molempien proteiinien kanssa. Myös Rab24:n Q38P-mutaation odotetaan heikentävän vuorovaikutusta ja kolokalisaatiota VPS18:n kanssa, mutta edellä esiteltyjen alustavien tulosten perusteella Rab24-Q38P:n odotetaan kolokalisoituvan GM130:n kanssa Rab24-WT:tä enemmän.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Solut ja niiden kasvatus

Kaikki tutkielman kokeet tehtiin hiiren Neuro-2a-neuroblastoomasoluilla (Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen soluviljely-yksikkö), joista Eskelisen tutkimusryhmän Mauricio Ramm oli valmistanut käytetyt solutyypit ennen pro gradu -projektin alkamista (taulukko 1). Kokeissa käytettiin neljää eri solutyyppiä, joista kaikista oli poistettu endogeenisen Rab24:n geeni. Solutyypeistä kolme ilmensi stabiilisti GFP-konjugoitua (engl. green fluorescent protein) hiiren Rab24-proteiinia, joka oli joko Rab24-WT, Rab24-Q38P-mutantti tai Rab24-S67L-mutantti. GFP-konjugaatti sijaitsi Rab24:n aminoterminaaliosassa. GFP-konjugaattia käytettiin Rab24:n eristämiseen koimmunopresipitaatiokokeissa sekä Rab24:n paikantamiseen soluissa mikroskopiolla. Näitä kolmea solutyyppiä nimitetään niiden ilmentämän GFP-Rab24-proteiinin nimellä (taulukko 1).

Taulukko 1. Tutkielmassa käytetyt hiiren Neuro-2a-neuroblastoomasolutyypit ja niille tehdyt geneettiset muokkaukset. Solutyypit oli valmistettu ennen projektin alkamista. Endogeenisen Rab24:n geeni oli poistettu CRISPR/Cas9-menetelmällä. Stabiilit transfektiot oli tehty lentiviruksilla.

Solutyyppi	Endogeenisen Rab24:n geeni poistettu	Stabiili transfektio
GFP-Rab24-WT	kyllä	GFP-Rab24-WT
GFP-Rab24-Q38P	kyllä	GFP-Rab24-Q38P; glutamiini 38 -> proliini
GFP-Rab24-S67L	kyllä	GFP-Rab24-S67L; seriini 67 -> leusiini
kontrolli	kyllä	GFP ja APEX2-NES

Negatiivisena kontrollina tutkimuksessa käytettiin kontrollisoluiksi nimitettäviä Rab24-poistogeenisiä soluja, jotka ilmensivät stabiilisti GFP:tä (taulukko 1). Ne ilmensivät stabiilisti myös APEX2-NES-proteiinia (engl. nuclear export signal), sillä niitä oli käytetty kontrollisoluina myös aiemmin esitellyssä proksimateittileimausmäärityksessä. APEX2-NES:n ilmentymisen ei oleteta häiritsevän tutkimusta. Kontrollisoluja käyttämällä varmistettiin, etteivät potentiaaliset vuorovaikutuskumppanit sitoudu koimmunopresipitaatiokokeissa epäspesifisesti esimerkiksi Rab24:n GFP-konjugaattiin. Kontrollisoluilla tutkittiin myös Rab24:n poissaolon vaikutusta VPS18:n ja GM130:n paikantumiseen soluissa.

Soluja kasvatettiin soluviljelypulloissa +37 °C:n lämpötilassa ja 5 %:n CO₂-pitoisuudessa. Solujen kasvatusmedium oli α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha, Biowest, L0476), jonka lisäaineet eli supplementit on ilmoitettu liitteessä 1. Neuro-2a-solut ovat adherentteja eli kasvualustaansa kiinnittyviä soluja. Harvennusta varten ne irrotettiin kasvualustasta inkubaamalla niitä trypsiiniliuoksessa (0,25 % trypsiini, 0,02 % kalium-EDTA) 1 minuutti +37 °C:ssa, minkä jälkeen solut suspensoitiin kasvatusmediumiin. Solususpensio sentrifugoitiin 400 g, 4 minuuttia, ja solut resuspensoitiin uuteen kasvatusmediumiin. Kun solut asetettiin kasvamaan kokeita varten, solutiheydet määritettiin Bürkerin laskukammiota apuna käyttäen.

2.2 Koimmunopresipitaatiokokeet

VPS18:n ja GM130:n mahdollista fyysistä vuorovaikutusta Rab24:n kanssa tutkittiin koimmunopresipitaatiolla. Kaikissa kokeissa käytettiin GFP-Rab24-WT- ja kontrollisoluja, ja mutaatioiden vaikutusta tutkittaessa käytettiin myös GFP-Rab24-Q38P- ja GFP-Rab24-S67L-soluja.

2.2.1 Transientit transfektiot ja niiden validaatio

VPS18- ja GM130-proteiineja yli-ilmennettiin transientisti kaikissa soluissa koimmunopresipitaatiokokeita varten, jotta mahdolliset vuorovaikutukset havaittaisiin todennäköisemmin. Solut transfektoitiin plasmidilla, jossa oli joko FLAG-konjugoitua ihmisen VPS18-proteiinia (FLAG-VPS18) tai FLAG- ja HA-konjugoitua rotan GM130-proteiinia (FLAG-HA-GM130) koodaava cDNA-jakso. FLAG ja HA ovat peptidikonjugaatteja, joiden tarkoitus on helpottaa proteiinien havainnointia vasta-aineilla, mutta tässä tutkimuksessa niitä ei kuitenkaan hyödynnetty. Konjugaatit olivat VPS18- ja GM130-proteiinien aminoterminaalisisessa päässä. Plasmidit oli valmistettu ennen projektin alkamista. GM130-cDNA oli kloonattu FLAG-HA-pcDNA3.1-plasmidiin (Addgene, 52535), ja FLAG-VPS18-plasmidi oli saatu Gabor Juhaszilta (Eötvös Loránd University, Budapest, Unkari). Plasmidit on esitelty liitteessä 2.

Koimmunopresipitaatiokokeissa tarkasteltiin siis ihmisen VPS18:n ja rotan GM130:n mahdollista vuorovaikutusta hiiren Rab24:n kanssa. Kun eri lajien VPS18:n ja GM130:n aminohapposekvenssien homologisuutta tarkasteltiin Protein BLAST -verkkotyökalulla (NCBI), havaittiin, että ihmisen ja hiiren VPS18:n aminohapposekvenssit ovat 95,8 % samanlaiset (Uniprot,

VPS18, *Homo sapiens*; Uniprot, VPS18, *Mus musculus*), ja rotan ja hiiren GM130:n aminohapposekvenssit ovat 94,4 % samanlaiset (Uniprot, GM130, *Mus musculus*; Uniprot, GM130, *Rattus norvegicus*). Molempia proteiineja pidettiin tarpeeksi konservoituneina potentiaalisten vuorovaikutusten tutkimista varten.

Ennen koimmunopresipitaatiokokeita transientit transfektiot validoitiin, eli varmistettiin, että plasmideilla transfektoidut GFP-Rab24-WT- ja kontrollisolut yli-ilmensivät VPS18- ja GM130-proteiineja. Validaatio tehtiin näillä kahdella solutyypillä, koska niitä käytettiin kaikissa koimmunopresipitaatiokokeissa. Mikäli yli-ilmennys onnistuisi näissä soluissa, sen oletettiin onnistuvan tarvittaessa myös GFP-Rab24-Q38P- ja GFP-Rab24-S67L-soluissa jotakuinkin samalla tehokkuudella, koska kaikki solutyypit olivat samaa alkuperää.

Transfektio tehtiin samalla tavalla validaatiota ja koimmunopresipitaatiota varten, mutta eri solumäärälle. 24 tuntia ennen transfektiota kasvatusmaljoille tai -pulloihin asetettiin kasvamaan taulukon 2 mukainen määrä soluja. Plasmidi laimennettiin lisääaineettomaan α -MEM-liuokseen, seokseen lisättiin PolyFect-transfektioagenssia (Qiagen, 301107), seos vorteksoitiin ja sitä inkuboitiin huoneenlämpötilassa 10 minuuttia. Transfektioseokseen sekoitettiin kasvatusmediumia (lisääaineellinen α -MEM) ja seos lisättiin soluille, joiden kasvatusmedium oli vaihdettu tuoreeseen juuri ennen transfektiota. Taulukossa 2 on esitetty transfektioseosten tarkat koostumukset. Soluja inkuboitiin transfektioseoksen kanssa 24 tuntia +37 °C:n lämpötilassa ja 5 %:n CO₂-pitoisuudessa, minkä jälkeen soluista eristettiin proteiinit joko validaatiota tai koimmunopresipitaatiota (luku 2.2.2) varten.

Taulukko 2. Neuro-2a-solujen transienteissa transfektioissa käytetyt solumäärät ja transfektioseosten koostumukset. Validaatio tarkoittaa transfektoidun proteiinin ilmentymisen varmistusta ja ko-IP koimmunopresipitaatiota. Ilmoitettu solumäärä asetettiin kasvamaan 24 tuntia ennen transfektiota. Kasvatusmedium tarkoittaa α -MEM-liuosta, johon on lisätty lisäaineet, kuten seerumi (liite 1).

Koe	Pinta-ala (cm ²)	Solumäärä / kasvatusmedium (ml)	Plasmidi (µg)	Plasmidi + α -MEM (µl)	PolyFect-reagenssi (µl)	Kasvatusmedium transfektioseoksessa (ml)
Validaatio	8,8	0,4 x 10 ⁶ / 2	1,5	100	12	0,6
Ko-IP	75	4,5 x 10 ⁶ / 7	6	300	50	1

Validaatiokokeissa transfektoiduista sekä transfektoimattomista GFP-Rab24-WT- ja kontrollisoluista eristettiin proteiinit immunoblottausnäytteiden valmistusta varten. Solujen kasvatusmedium poistettiin ja solut kaavittiin kylmään PBS:ään (Biowest, 10010-015). Solut sentrifugoitiin 400 g, 3 minuuttia +4 °C:ssa, minkä jälkeen solupelletti resuspensoitiin 60 µl:aan

kylmää hajotuspuskuria (liite 1). Näytteitä inkuboitiin 30 minuuttia putkenpyörittäjässä +4 °C:ssa, minkä jälkeen ne sentrifugoitiin 16 000 g, 15 minuuttia +4 °C:ssa. Supernatantit eli proteiinit sisältävät osuudet kerättiin talteen ja niiden proteiinipitoisuudet määritettiin BCA-määrityksellä (engl. bicinchoninic acid assay) (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, 23225) valmistajan ohjeen mukaisesti. Määritykseen kuuluva absorbanssimittaus (562 nm) tehtiin EnSight Multimode Microplate Reader -kuoppalevylukijalla (PerkinElmer). Näytteet laimennettiin MQ-vedellä samaan proteiinipitoisuuteen ja niihin lisättiin +95 °C 4x Laemmlin puskuria (liite 1) 1:4. Näytteet vorteksoitiin ja niitä inkuboitiin +95 °C:ssa 5 minuuttia. Immunoblottausta ja tulosten analysointi on kuvattu luvussa 2.2.3. Validaatiokokeita ei toistettu.

Transfektioiden validaatio onnistui PolyFect-reagenssin valmistajan suosittelemilla transfektioolosuhteilla, mutta olosuhteiden optimoinnissa koimmunopresipitaatiokokeita varten kului huomattavan paljon aikaa. Haasteena oli, että soluista eristetyissä proteiininäytteissä oli liian vähän tutkittavaa proteiinia koimmunopresipitaatiota varten. Aluksi pyrittiin muun muassa parantamaan transfektiotehokkuutta muuttamalla transfektioseosten koostumusta, mutta toimivimmaksi ratkaisuksi osoittautui lopulta transfektoitavan solumäärän huomattava kasvattaminen valmistajan suosittelemaan nähden. Taulukossa 2 on ilmoitettu lopulliset, optimaalisimmiksi todetut olosuhteet.

2.2.2 Koimmunopresipitaatio

24 tuntia transientin transfektion jälkeen solujen kasvatusmedium poistettiin ja solut kaavittiin kylmään PBS:ään. Solut sentrifugoitiin 400 g, 4 minuuttia +4 °C:ssa, ja solupelletit resuspensoitiin 200 µl:aan kylmää hajotuspuskuria (liite 1), johon lisättiin GTP- γ -S-liuosta (Sigma-Aldrich, G8634; MQ-vedessä) siten, että GTP- γ -S:n lopullinen konsentraatio oli 0,5 mM. GTP- γ -S on GTP-analogi, joka ei hydrolysoitu tai hydrolysoituu hitaasti GDP:ksi, eli sen sitoutuminen Rab-proteiiniin hidastaa tämän inaktivoitumista (Fukuda ym. 2008; Spoerner ym. 2007). GTP- γ -S-lisäyksen tavoitteena oli lisätä aktiivisessa konformaatioissa olevan Rab24:n osuutta koimmunopresipitaatioissa. Kokeessa, jossa tutkittiin vuorovaikutuksen riippuvuutta GTP:n sitoutumisesta Rab24:ään, osaan näytteistä lisättiin GTP- γ -S:n sijasta GDP:tä (Sigma-Aldrich, G7127; MQ-vedessä, loppukonsentraatio 1 mM). Vastaavat GTP- γ -S- ja GDP-käsittelyt Rab-proteiinien koimmunopresipitaatiokokeissa on aiemmin kuvattu Fukudan ym. (2008)

tutkimuksessa. Jotta GTP- γ -S- ja GDP-lisäyksiä vertailevassa kokeessa eri nukleotideilla käsiteltävät näytteet olisivat kokeen alussa mahdollisimman samanlaiset, kahdesta kasvatuspullostasta kerätyt solut yhdistettiin ja jaettiin kahdeksi näytteeksi ennen solujen hajotusta.

Soluja inkuboitiin GTP- γ -S:ää tai GDP:tä sisältävässä hajotuspuskurissa 40 minuuttia putkenpyörittäjässä +4 °C:ssa, minkä jälkeen näytteet sentrifugoitiin 17 000 g, 10 minuuttia +4 °C:ssa. Supernatantit eli proteiinit sisältävät osuudet kerättiin talteen ja niihin lisättiin 300 μ l kylmää laimennospuskuria (liite 1). 18 μ l kutakin näytettä kerättiin tässä vaiheessa erikseen talteen ja säilytettiin jäällä (lähtömateriaalinäyte, engl. input). Laimennospuskurin lisäyksen takia jäljellä oleviin näytteisiin lisättiin vielä GTP- γ -S- tai GDP-liuosta siten, että loppukonsentraatio pysyi 0,5 mM:na tai 1 mM:na. Tämän jälkeen näytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin BCA-määrityksellä kuten on kuvattu luvussa 2.2.1.

GFP-konjugoidut Rab24-proteiinit (WT, Q38P, S67L) ja GFP eristettiin näytteistä GFP-vastaaineella päällystetyillä magneettisilla helmillä (GFP-Trap Magnetic Agarose, ChromoTek, gtma). 25 μ l helmiliuosta käytettiin näytettä kohden. Helmet tasapainotettiin ensin pesemällä ne kolmesti 500 μ l:lla laimennospuskuria magneettia apuna käyttäen. Tasapainotuksen jälkeen helmille lisättiin mahdollisimman suuren proteiinimäärän (700–1800 μ g) sisältävä tilavuus näytettä. Kussakin kokeessa kaikista näytteistä lisättiin aina sama proteiinimäärä helmille. Koe-kohtaiset proteiinimäärät ovat liitteessä 3. Näytteitä inkuboitiin helmien kanssa 1 tunti putkenpyörittäjässä +4 °C:ssa, minkä jälkeen helmet kerättiin putken kylkeen kylmällä magneetilla ja supernatantista kerättiin talteen 18 μ l erilliseksi näytteeksi. Tämä näyte sisälsi helmiin sitoutumattomia proteiineja (engl. flow through).

Helmet pestiin kolmesti 500 μ l:lla laimennospuskuria, ja ne resuspensoitiin 70 μ l:aan +95 °C 2x Laemmlin puskuria (4x Laemmlin puskuria (liite 1) ja MQ-vettä 1:1). Näytteitä kuumennettiin +95 °C:ssa 5 minuutin ajan, jotta GFP-vasta-aineeseen sitoutuneet proteiinit irtosivat puskuriin. Helmet kerättiin putken kylkeen magneetilla ja puskuri kerättiin talteen. Koimmunopresipitaation tuloksia tarkasteltiin immunoblottauksella (luku 2.2.3). Sitä varten myös lähtömateriaalista sekä helmiin sitoutumattomasta osuudesta otetuista näytteistä valmistettiin immunoblottausnäytteet lisäämällä niihin +95 °C 4x Laemmlin puskuria 1:4, vorteksoimalla ne ja kuumentamalla niitä 5 minuuttia +95 °C:ssa. Kaikissa koimmunopresipitaatiokokeissa immunoblottauksella tarkasteltiin lähtömateriaalinäytteitä ja koimmunopresipitoituneita proteiineja. Osassa kokeista tarkasteltiin myös sitoutumatonta osuutta kuvaavia näytteitä. Tulosten yhteydessä on ilmoitettu, kuinka monta kertaa kukin koimmunopresipitaatiokoe toistettiin.

2.2.3 SDS-PAGE-geeliajo ja immunoblottaus

Kaikkia immunoblottausnäytteitä kuumennettiin +95 °C:ssa 3 minuuttia ennen niiden lisäämistä 1,5 mm 10 % SDS-PAGE-geelin kaivoihin. Transienttien transfektioiden validaationäytteitä lisättiin geelille 20 µg proteiinia/kaivo. Koimmunopresipitaatiokokeiden lähtömateriaalia ja sitoutumatonta osuutta kuvaavia näytteitä lisättiin 20 µl/kaivo, ja näytettä, joka sisälsi koimmunopresipitoituneet proteiinit, lisättiin 60 µl/kaivo. Lähtömateriaalinäytteiden geelille lisätyt proteiinimäärät on ilmoitettu liitteessä 3. Molekyylipainostandardia (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, ThermoFisher, 26619) lisättiin 5 µl/kaivo. Proteiineja ajettiin geelillä 20 minuuttia 60 V:n jännitteellä ja 1 tunti 130 V:n jännitteellä. Käytetyn ajopuskurin koostumus on liitteessä 1. Geeliajon jälkeen geeliä inkuboitiin 15 minuuttia siirtopuskurissa (liite 1) ravistelijassa. PVDF-kalvo (polyvinyylideenifluoridi) aktivoitiin 15 sekuntia metanolissa ja sitä inkuboitiin 10 minuuttia siirtopuskurissa ravistelijassa ennen siirtokompleksin kokoamista. Proteiinit siirrettiin geeliltä kalvolle 90 V:n jännitteellä 90 minuuttia +4 °C:ssa (märkäblottaus).

Siirtoajon jälkeen PVDF-kalvon epäspesifiset sitoutumiskohdat peitettiin 5 %:n maitojauheliuoksella (TBST:ssä, liite 1) 1 tunnin ajan putkenpyörittäjässä, minkä jälkeen kalvoa inkuboitiin 5 %:n maitojauheliuokseen tehdyssä primäärivasta-ainelaimennoksessa (taulukko 3) yön yli +4 °C:ssa putkenpyörittäjässä. Inkubaation jälkeen kalvo pestiin TBST:ssä 3 x 5 minuuttia. HRP-konjugoitu (engl. horse radish peroxidase) sekundäärivasta-aine (taulukko 3) laimennettiin 1:20 000 5 %:n maitojauheliuokseen ja kalvoa inkuboitiin laimennoksessa 1 tunti putkenpyörittäjässä huoneenlämpötilassa. Vasta-aineinkubaatioiden jälkeen kalvo pestiin TBST:ssä 3 x 5 minuuttia. Kalvolle lisättiin substraattiliuosta (Clarity Max Western ECL Substrate, BioRad, 1705062), ja kalvoa inkuboitiin 2 minuuttia valolta suojattuna. Kalvon kemiluminesensisisignaaleista otettiin kuvat Sapphire Biomolecular Imager -laitteella (Azure biosystems) useilla eri valotusajoilla analyysiä varten.

Taulukko 3. Proteiinien immunoblottauksessa käytetyt vasta-aineet ja niiden käyttöläimennokset. Valmistajien tietojen perusteella VPS18-, GM130- ja GAPDH-vasta-aineiden odotettiin tunnistavan myös hiiren proteiinit.

Primäärivasta-aine	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos
kanissa tuotettu anti-ihmis-VPS18	Abcam, ab178416	1:500
hiiressä tuotettu anti-rotta-GM130	BD Bioscience, 610822	1:1000
hiiressä tuotettu anti-GFP	Roche, 11 814 460 001	1:400
hiiressä tuotettu anti-ihmis-GAPDH	Abcam, ab8245	1:20 000
Sekundäärivasta-aine	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos
vuohessa tuotettu HRP-konjugoitu anti-kani-IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, 111-035-003	1:20 000
vuohessa tuotettu HRP-konjugoitu anti-hiiri-IgG	Jackson Immuno Research Laboratories, 115-035-003	1:20 000

Transfektioiden validoinnissa kalvolta detektoitiin vasta-aineilla VPS18 tai GM130 ja latauskontrolli GAPDH (glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi), ja koimmunopresipitaatiokokeissa näiden lisäksi myös GFP (taulukko 3). Kalvot käsiteltiin eri vasta-aineilla siten, että kalvon kuvaamisen jälkeen vasta-aineet poistettiin ennen seuraavan primäärivasta-aineen lisäämistä. Vasta-aineet poistettiin käsittelemällä kalvo irrotuspuskurilla (liite 1) 40 minuutin ajan +50 °C:ssa. Käsitelyn jälkeen kalvoa huuhdeltiin vesijohtovedellä ja se pestiin TBST:ssä 2 x 5 minuuttia. Tämän jälkeen epäspesifiset sitoutumiskohdat peitettiin ja kalvo käsiteltiin seuraavalla primäärivasta-aineella kuten kuvattu edellä. Ensin detektoitiin aina VPS18 tai GM130, seuraavaksi GFP ja viimeisenä GAPDH.

Proteiinien suhteelliset määrät kalvolla kvantitoitiin kuvien perusteella ImageJ-ohjelmalla. Proteiinien ilmentymisvoimakkuuksia analysoitaessa signaalit normalisoitiin saman näytteen GAPDH-latauskontrollin signaalilla. Tietyissä kokeissa koimmunopresipitoituneen tutkittavan proteiinin signaali normalisoitiin saman näytteen GFP-Rab24-signaalilla, jolloin tulos kuvasi sitä, kuinka paljon tutkittavaa proteiinia oli kussakin näytteessä koimmunopresipitoitunut GFP-Rab24:n kanssa. Eri näytteiden normalisoidut signaalit suhteutettiin valitun näytteen vastaavaan normalisoituun signaaliin. Signaalien käsittelyt on kuvattu tuloskohtaisesti lukujen 3.1–3.3 kuvateksteissä ja tarkemmin liitteessä 4.

2.3 Kolokalisaatiokokeet

Solujen immunofluoresenssivärjäyksellä selvitettiin, vaikuttavatko Rab24:n Q38P- ja S67L-mutaatiot sen kolokalisaatioon VPS18:n tai GM130:n kanssa. Kolokalisaatio kuvaa sitä, kuinka paljon tutkittavat proteiinit paikantuvat samoihin rakenteisiin tai osastoihin solussa (Aaron ym. 2018). Endogeeninen VPS18 tai GM130 värjättiin kaikissa neljässä solutyypissä. Yli-ilmenneetyt Rab24-proteiinit havaittiin GFP-konjugaatin perusteella.

2.3.1 Solujen immunofluoresenssivärjäys ja konfokaalimikroskopia

80 000 solua asetettiin kasvamaan kasvatusmaljoille (Ø 35 mm), joihin oli asetettu poly-D-lysiinillä päällystetyt 13 mm:n peitinlasit. 24 tuntia myöhemmin solut kiinnitettiin peitinlaseille käsittelemällä ne 4 % paraformaldehydillä (PBS:ssä, liite 1) 20 minuutin ajan, minkä jälkeen lasit pestiin kolmesti PBS:llä. Ennen värjäystä solukalvojen läpäisevyyttä lisättiin 10 minuutin 0,1 % Triton-X-100-käsittelyllä (PBS:ssä) ja epäspesifiset sitoutumiskohdat peitettiin 3 %:n BSA-liuoksella (engl. bovine serum albumin, PBS:ssä) 30 minuutin ajan. VPS18- tai GM130-primäärivasta-ainelaimennosta (taulukko 4; 3 %:n BSA-liuoksessa) lisättiin parafilmin päälle 30 µl:n pisarat, ja peitinlasit käännettiin solupuoli alaspäin pisaroiden päälle. Näytteitä inkuboitiin 1 tunti huoneenlämpötilassa, minkä jälkeen peitinlasit pestiin PBS:ssä 3 x 5 minuuttia. Alexa Fluor 568 -konjugoitu sekundäärivasta-aine (taulukko 4) laimennettiin 1:500 3 %:n BSA-liuokseen, ja solut käsiteltiin samoin kuin primäärivasta-ainekäsittelyn yhteydessä. Lisäksi tästä edespäin näytteitä suojattiin valolta.

Taulukko 4. VPS18:n ja GM130:n immunofluoresenssivärjäyksessä käytetyt vasta-aineet ja niiden käyttöläimennokset. Eskelisen tutkimusryhmä on aiemmin värjännyt samoilla VPS18- ja GM130-vasta-aineilla soluista onnistuneesti myös endogeeniset hiiren proteiinit.

Primäärivasta-aine	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos
kanissa tuotettu anti-ihmis-VPS18	Abcam, ab178416	1:200
hiiressä tuotettu anti-rotta-GM130	BD Bioscience, 610822	1:200
Sekundäärivasta-aine	Valmistaja ja tuotenumero	Laimennos
vuohessa tuotettu Alexa Fluor 568 -konjugoitu anti-kani-IgG	Invitrogen/ThermoFisher Scientific, A-11011	1:500
vuohessa tuotettu Alexa Fluor 568 -konjugoitu anti-hiiri-IgG	Invitrogen/ThermoFisher Scientific, A-11004	1:500

Vasta-ainekäsittelyiden jälkeen peitinlasit pestiin PBS:ssä 5 x 4 minuuttia valolta suojattuna. Peitinlasit päällystettiin DAPI-tumaväriä sisältävällä Mowiol-päällystysaineella (liite 1) ja ne asetettiin objektilaseille. Näytteitä säilytettiin valolta suojattuna yön yli huoneenlämpötilassa ja sen jälkeen +4 °C:ssa. Näytteet kuvattiin muutaman päivän kuluttua 3i spinning disk -konfokaalimikroskoopilla (Marianas CSU-W1), 63x Zeiss Plan Aplanachromat -objektiivilla (numeerinen aperttuuri 1,4), Photometrics Prime BSI sCMOS -kameralla ja SlideBook 6 -sovelluksella. Kuvattujen leiketasojen väli oli 0,27 µm. Alexa Fluor 568 -sekundäärivasta-aine kuvattiin 561 nm:n, GFP 488 nm:n ja DAPI 405 nm:n viritysaallonpituudella. Valotusaika kaikilla kanavilla oli 100 ms.

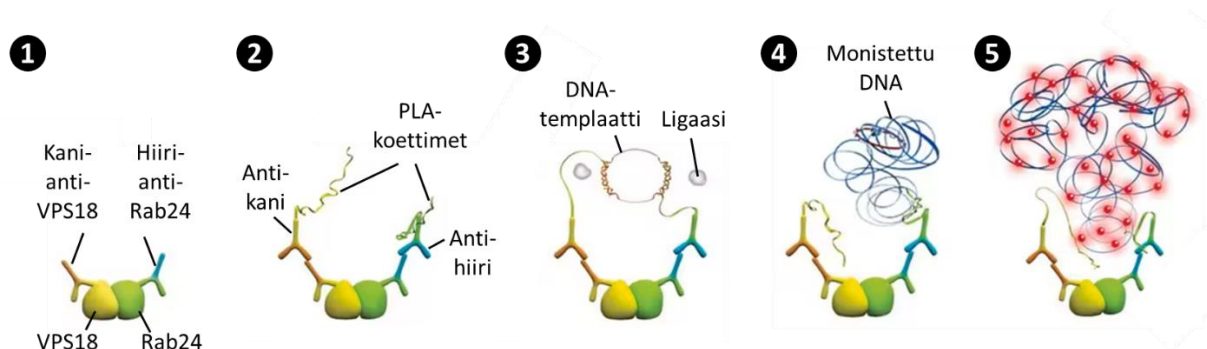
2.3.2 Kolokalisaatioanalyysi

Ennen kolokalisaatioanalyysiä kuvat esikäsiteltiin ImageJ-ohjelmalla. Koska GFP-signaali soluissa oli diffuusi, jokaisen solun GFP-kanavalta vähennettiin kaikkien pikseleiden signaalista kyseisen solun GFP-kanavan 1,2-kertainen keskiarvosignaali, jolloin jäljelle jäivät vain kirkkaimmat pikselit eli alueet, joilla GFP:tä sijaitsi eniten. GFP-konjugoitujen Rab24-proteiinien (WT, Q38P, S67L) tai GFP:n (kontrollisolut) ja VPS18:n tai GM130:n kolokalisaatio analysoitiin ImageJ-ohjelman Coloc2-liitännäistyökalulla. Työkalu määrittäi GFP:n ja Alexa Fluor 568 -sekundäärivasta-aineen (VPS18- tai GM130-signaali) kolokalisaatiolle kussakin solussa Pearsonin korrelaatiokertoimen r sekä Mandersin päällekkäisyyskertoimet M1 ja M2 (engl. Manders' overlap coefficient). Työkalu kävi läpi solun kaikki kuvatut leiketasot eli optiset leikkeet.

Pearsonin ja Mandersin kertoimet kuvaavat kolokalisaatiota eri tavoin. Pearsonin korrelaatiokerroin r ilmaisee eri kanavien signaalien intensiteettien korrelaatiota (-1–1) pikseleissä alueella, jolla signaalit menevät päällekkäin, eli se kuvaa tutkittavien proteiinien runsauden korrelaatiota (Aaron ym. 2018). Mandersin päällekkäisyyskertoimet puolestaan kuvaavat proteiinien esiintymisalueiden päällekkäisyyttä (Aaron ym. 2018). Tässä tutkimuksessa Mandersin päällekkäisyyskerroin M1 ilmaisee, kuinka suuri osa (0–1) VPS18- tai GM130-positiivisista pikseleistä on myös GFP-positiivisia ja M2 ilmaisee, kuinka suuri osa GFP-positiivisista pikseleistä on myös VPS18- tai GM130-positiivisia. Mandersin päällekkäisyyskerroimiin eivät vaikuta signaalien intensiteetit. Eri solutyyppeiden Pearsonin ja Mandersin kertoimien tilastollinen vertailu on kuvattu luvussa 2.5. Analysoitujen solujen lukumäärä on ilmoitettu tulosten yhteydessä. Kolokalisaatiokokeita ei toistettu.

2.4 Proksimiteettiligaatiomääritys (PLA)

Endogeenisen VPS18:n ja yli-ilmenneen Rab24:n vuorovaikutusta tutkittiin myös PLA-menetelmällä. Menetelmän avulla soluissa *in situ* havaittiin fluoresoivina pisteinä kohdat, joissa Rab24 ja VPS18 olivat alle 40 nanometrin etäisyydellä toisistaan (Alam 2018). Menetelmän periaate esitellään kuvassa 5. Kokeessa käytettiin kaikkia neljää solutyyppeä, sillä myös Rab24:n mutaatioiden vaikutusta proteiinien vuorovaikutukseen tutkittiin.



Kuva 5. PLA-menetelmä Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutuksen tutkimisessa. 1) Kanissa tuotettu anti-VPS18-primäärivasta-aine ja hiiressä tuotettu anti-Rab24-primäärivasta-aine sitoutuvat spesifisesti kohteisiinsa. 2) Anti-kani- ja anti-hiiri-sekundäärivasta-aineet, joihin on konjugoitu oligonukleotidit eli PLA-koettimet, sitoutuvat primäärivasta-aineisiin. 3) Jos PLA-koettimet sijaitsevat tarpeeksi lähellä toisiaan, yhdistäjäoligonukleotidit yhdistävät koettimet toisiinsa ja ligaasi muodostaa suljetun, rengasmaisen DNA-templaatin. 4) DNA-polymeraasi monistaa DNA:ta pitkäksi konkatemeeriseksi eli toistuvajaksoiseksi DNA:ksi. 5) Fluorokromileimatut koettimet sitoutuvat monistettuun DNA:han. Vuorovaikutuspisteet havaitaan fluoresenssimikroskopiolla soluista *in situ*. Kuva: Sigma-Aldrich, How Proximity Ligation Assays (PLA) Work (muokattu).

100 000 solua asetettiin kasvamaan kasvatusmaljoille (Ø 35 mm), joihin oli asetettu poly-D-lysiinillä päällystetyt 13 mm:n peitinlasit. 24 tuntia myöhemmin solut kiinnitettiin peitinlaseille käsittelemällä ne 4 % paraformaldehydillä (PBS:ssä, liite 1) 20 minuutin ajan, minkä jälkeen lasit pestiin kolmesti PBS:llä. Solukalvojen läpäisevyyttä lisättiin 10 minuutin 0,1 % Triton-X-100-käsittelyllä (PBS:ssä). PLA-määritys tehtiin kaupallisella Duolink-tuotesarjalla (Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS (DUO92004), Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS (DUO92002), Duolink In Situ Detection Reagents Orange (DUO92007), Sigma-Aldrich) valmistajan ohjeiden mukaisesti (liite 5). Kutakin liuosta lisättiin aina 30 µl:n pisara parafilmiin päälle ja peitinlasi asetettiin pisaran päälle solupuoli alaspäin inkubaation ajaksi. Kokeessa käytettiin kanissa tuotettua anti-ihmis-VPS18-vasta-ainetta (Abcam,

ab178416; laimennos 1:200) ja hiiressä tuotettua anti-hiiri-Rab24-vasta-ainetta (BD Bioscience, 612174; laimennos 1:100). Aiemmat onnistuneet immunofluoresenssikokeet (luku 2.3.1) osoittivat, että kyseinen VPS18-vasta-aine tunnistaa myös hiiren VPS18-proteiinin. Primäärivasta-aineita inkuboitii näytteillä 1 tunti huoneenlämpötilassa. Kontrollisolujen lisäksi kokeessa negatiivisena kontrollina käytettiin GFP-Rab24-WT-soluja, jotka käsiteltiin muuten samoin kuin muut näytteet, mutta niille ei tehty primäärivasta-aineinkubaatiota. Inkubaation ajan tämä peitinlasi oli pesupuskurissa A. Pesupuskurit A ja B valmistettiin itse (liite 1).

Lopuksi peitinlasit päällystettiin DAPI-tumaväriä sisältävällä päällystysaineella (Sigma-Aldrich, DUO82040) ja ne asetettiin objektilaseille. Näytteet kuvattiin tunnin kuluttua 3i spinning disk -konfokaalimikroskoopilla (Marianas CSU-W1) samoilla asetuksilla ja laitteistolla kuin kolokalisaatiokokeissa (luku 2.3.1). Vuorovaikutuspisteet kuvattiin 561 nm:n, GFP 488 nm:n ja DAPI 405 nm:n viritysaallonpituudella (valotusaika kaikilla kanavilla 100 ms). Kuvatuista optisista leikkeistä tehtiin ImageJ-ohjelman Maximum intensity projection -toiminnolla kuvat, joissa oli kunkin kanavan kirkkaimmat pikselit kultakin leiketasolta yhdistettynä yhteen kuvaan. Kuvien perusteella laskettiin manuaalisesti vuorovaikutuspisteiden lukumäärä kuvatuista soluista. Vuorovaikutuspisteiden solukohtaisen lukumäärän tilastollinen vertailu eri solutyypin kesken on kuvattu luvussa 2.5. Analysoitujen solujen lukumäärä on ilmoitettu tulosten yhteydessä. Koetta ei toistettu.

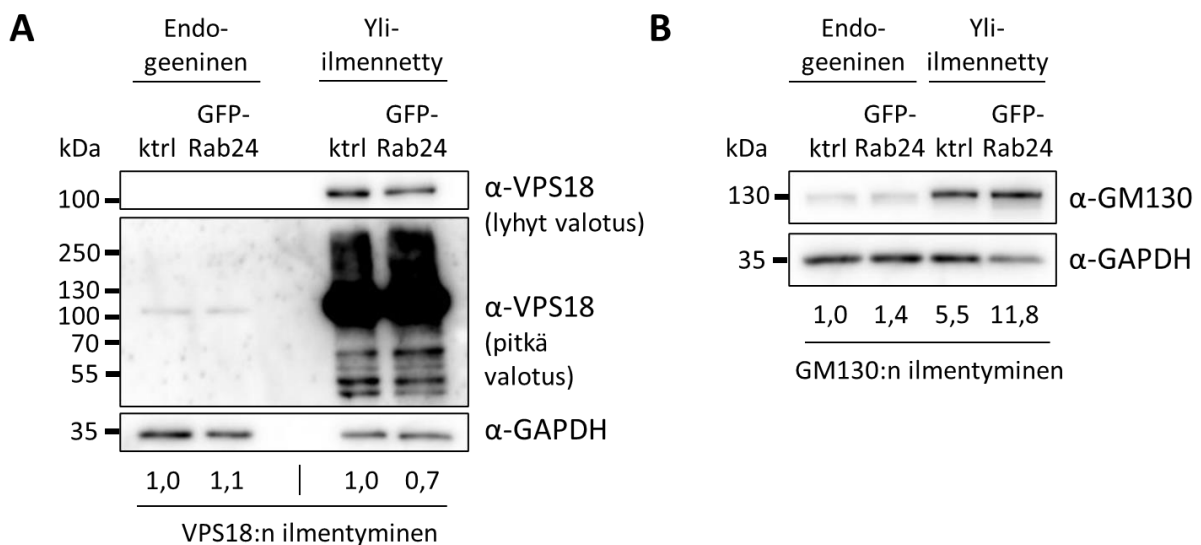
2.5 Tilastolliset analyysit

Pearsonin ja Mandersin kertoimien (kolokalisaatiokokeet, luku 2.3.2) sekä vuorovaikutuspisteiden lukumäärän (PLA-koe, luku 2.4) solutyypikohtainen normaalijakautuneisuus tarkistettiin Anderson-Darlingin, D'Agostino-Pearsonin sekä Shapiro-Wilkin testeillä. Mikäli muuttujat olivat normaalijakautuneet, niitä vertailtiin eri solutyypin kesken yhdensuuntaisella ANOVA-testillä ja *post hoc* Tukeyn testillä, kun muuttujan keskihajonta kussakin solutyypissä oli yhtä suurta (tarkistus Brown-Forsythen ja Bartlettin testeillä), tai Welch ANOVA -testillä ja *post hoc* Dunnettin T3-testillä, kun keskihajonnat poikkesivat toisistaan. Kun muuttujat eivät olleet normaalijakautuneet, niitä vertailtiin eri solutyypin kesken Kruskal Wallisin testillä ja *post hoc* Dunnin testillä. Tilastollisen merkittävyyden rajana pidettiin p-arvoa 0,05. Tilastolliset testit ja kuvaajat tehtiin GraphPad Prism -ohjelmalla (versio 9.0.0).

3 TULOKSET

3.1 Transfektoidut solut yli-ilmensivät VPS18- ja GM130-proteiineja

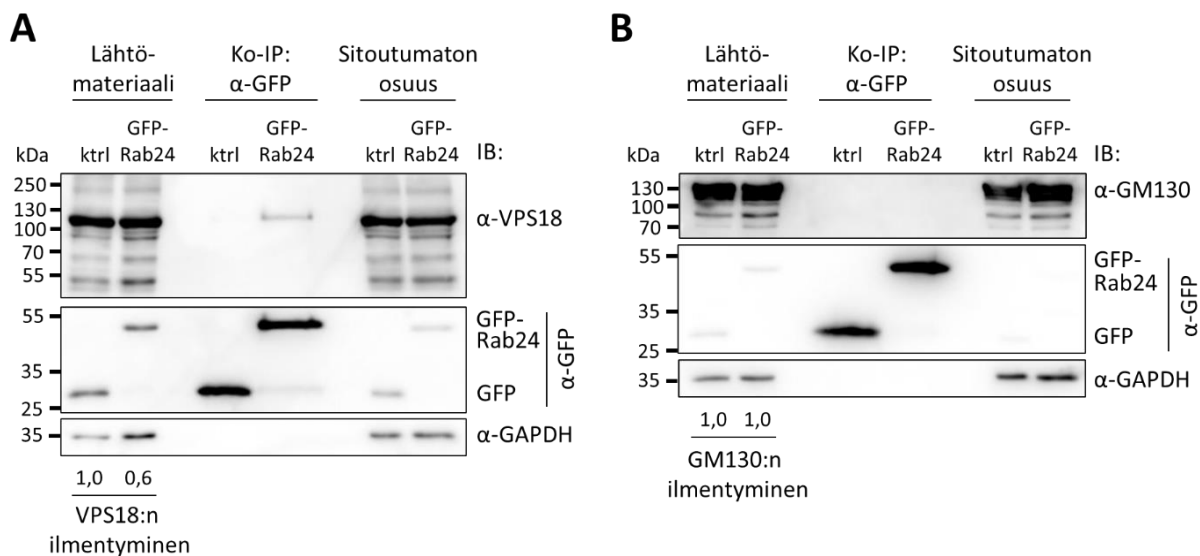
Ennen koimmunopresipitaatiokokeita varmistettiin, että FLAG-VPS18- tai FLAG-HA-GM130-plasmideilla transientisti transfektoidut GFP-Rab24-WT-solut ja kontrollisolut yli-ilmensivät VPS18- ja GM130-proteiineja. VPS18:n yli-ilmennys oli huomattavaa Neuro-2a-solujen endogeeniseen ilmennystasoon nähden (kuva 6A). Toisaalta ihmisen VPS18:aa vastaan tuotettu vasta-aine ei välttämättä sitoudu hiiren VPS18:aan yhtä tehokkaasti, mikä voi myös osaltaan selittää heikkoa endogeenista signaalia. Kun kalvoa valotettiin pitkään, havaittiin, että transfektoiduissa näytteissä VPS18-vasta-aine tunnisti odotetun kokoisen proteiinin (110 kDa) lisäksi myös muun kokoisia proteiineja tai proteiinifragmentteja pienempiä määriä (kuva 6A). Myös GM130 yli-ilmentyi soluissa (kuva 6B). GFP-Rab24-WT-solut yli-ilmensivät GM130:aa selvästi enemmän kuin kontrollisolut.



Kuva 6. Endogeenisen ja transientisti yli-ilmennetyn VPS18:n (A) ja GM130:n (B) ilmentyminen Neuro-2a-soluissa. Rab24-poistogeeniset solut ilmensivät stabiilisti joko GFP:tä (ktrl) tai GFP-Rab24-WT-proteiinia. Kuvassa on samoista VPS18-signaaleista kahdella eri valotusajalla otetut kuvat (A). Ilmentymisvoimakkuuksien kvantitoinnissa VPS18- tai GM130-signaalit normalisoitiin saman näytteen GAPDH-signaalilla ja suhteutettiin kontrollinäytteen vastaavalla tavalla normalisoituun signaaliin. VPS18:n kvantitointi tehtiin erikseen endogeeniselle ja yli-ilmennetylle proteiinille eri valotusajoilla otettujen kuvien perusteella (A), kun taas GM130:n tapauksessa signaalit suhteutettiin endogeeniseen kontrollinäytteeseen (B). Kokeita ei toistettu.

3.2 Rab24:n ja VPS18:n välillä havaittiin fyysinen vuorovaikutus

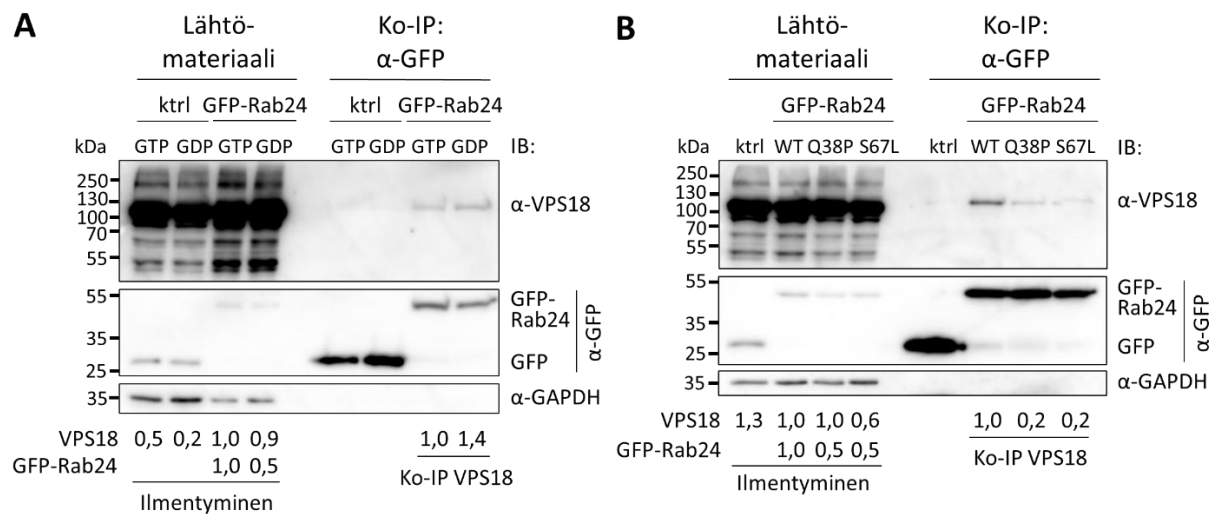
Rab24:n vuorovaikutusta transientisti yli-ilmennettyjen VPS18:n ja GM130:n kanssa tutkittiin koimmunopresipitaatiolla. Solujen stabiilisti ilmentämät GFP-Rab24-WT sekä GFP immuno-presipitoituivat anti-GFP-helmillä tehokkaasti (kuva 7A, B). GFP-Rab24-WT:n kanssa koimmunopresipitoitui VPS18:aa, mikä viittaa siihen, että VPS18:n ja Rab24-WT:n välillä on fyysinen vuorovaikutus (kuva 7A). Kontrollisolujen koimmunopresipitaationäytteessä havaittiin hieman VPS18:n epäspesifistä sitoutumista helmiin, kun kalvoa valotettiin pitkään (ei esitetty). Lähtömateriaalinäytteiden analyysin perusteella kontrollisolut ilmensivät VPS18:aa enemmän kuin GFP-Rab24-WT-solut (kuva 7A). GFP-konjugaatti oli irronnut pienestä osasta GFP-Rab24-WT-fuusioproteiineja (kuva 7A). GM130:n ja Rab24:n välillä ei havaittu fyysistä vuorovaikutusta kahden koimmunopresipitaatiokokeen perusteella (kuva 7B), eikä niiden vuorovaikutusta tästä syystä tutkittu koimmunopresipitaatiomenetelmällä enempää. GM130-vasta-aine tunnisti lähtömateriaalia ja helmiin sitoutumatonta osuutta kuvaavissa näytteissä myös odotettua (130 kDa) pienempiä proteiineja tai proteiinifragmenteja (kuva 7B).



Kuva 7. Transientisti yli-ilmennettyjen VPS18:n (A) ja GM130:n (B) mahdollista fyysistä vuorovaikutusta Rab24:n kanssa tutkittiin koimmunopresipitaatiolla (anti-GFP). Rab24-poistogeeniset Neuro-2a-solut ilmensivät stabiilisti joko GFP:tä (ktrl) tai GFP-Rab24-WT-proteiiniä. **A.** VPS18:n ja Rab24:n välillä havaittiin fyysinen vuorovaikutus. Koe toistettiin kolmesti, ja tämä on kaikkia kokeita edustava tulos. **B.** GM130:n ja Rab24:n välillä ei havaittu vuorovaikutusta. Koe toistettiin kerran, ja tämä on molempia kokeita edustava tulos. Ilmentymisvoimakkuuksien kvantitoinnissa lähtömateriaalinäytteiden VPS18- tai GM130-signaalit normalisoitiin saman näytteen GAPDH-signaalilla ja suhteutettiin kontrollinäytteen vastaavasti normalisoituun signaaliin. Kvantitoinnissa käytettiin VPS18- ja GM130-signaaleista vähemmän valotettuja kuvia, kuin tässä esitetty. Koekohtaiset proteiinimäärät ovat liitteessä 3. IB = immunoblottauksessa käytetyt vasta-aineet.

3.3 Rab24:n mutaatiot heikensivät Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutusta sekä kolokalisaatiota

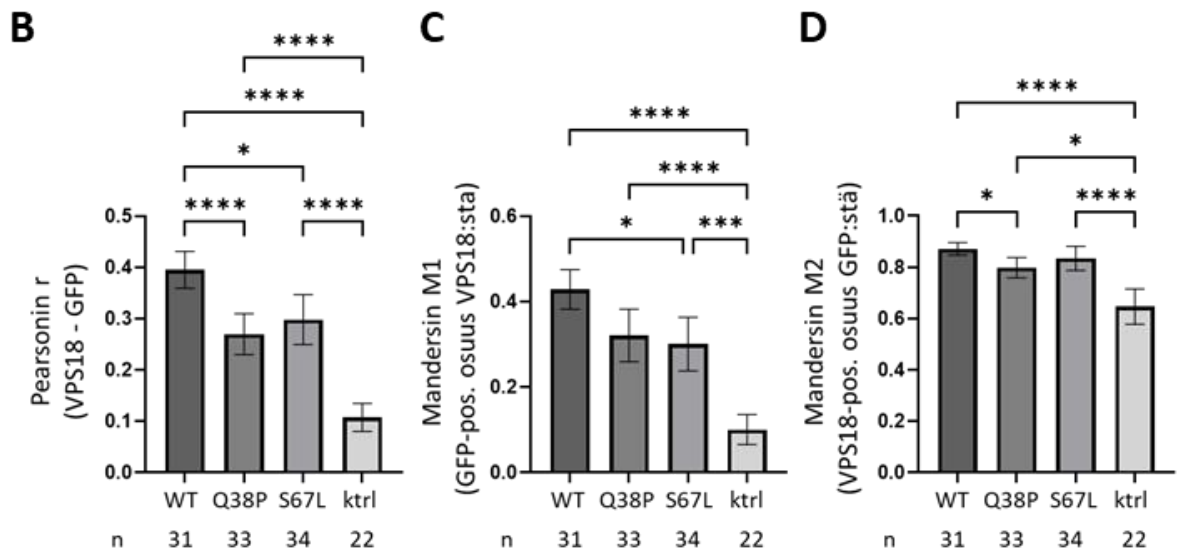
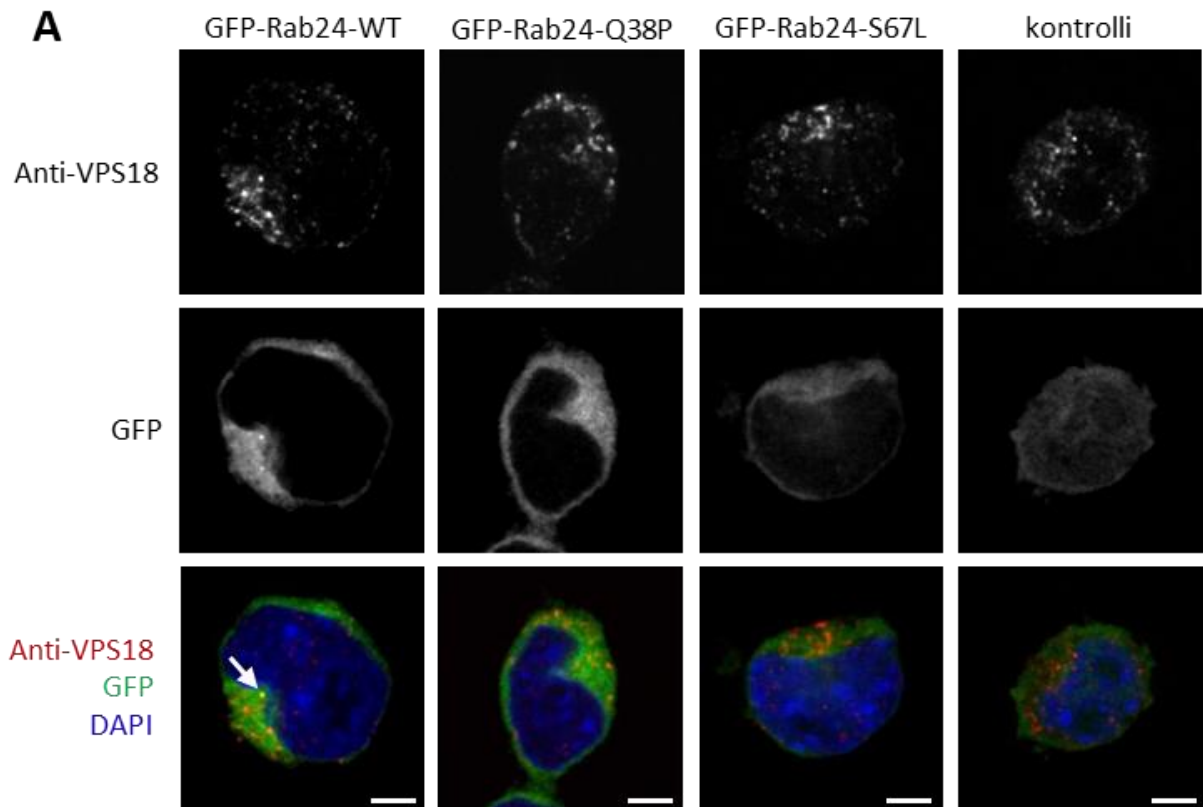
Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutuksen karakterisoimiseksi selvitettiin, mistä Rab24:n ominaisuuksista se on riippuvainen. Ensinnäkin tutkittiin, vaikuttiko näytteen GTP- γ -S-käsittelyn korvaaminen GDP-käsittelyllä VPS18:n koimmunopresipitoitumiseen GFP-Rab24-WT-proteiinin kanssa. Nukleotidilisäyksillä pyrittiin vaikuttamaan Rab24:n konformaatioon, sillä Rab-proteiinin kanssa vuorovaikuttavat proteiinit sitoutuvat yleensä parhaiten joko tämän aktiiviseen tai inaktiiviseen konformaatioon (Pylypenko ym. 2018). GFP-Rab24-WT:n kanssa koimmunopresipitoituneen VPS18:n määrässä ei kuitenkaan havaittu selvää eroa eri nukleotideilla käsiteltyjen näytteiden välillä (kuva 8A). Koetta ei toistettu. Lähtömateriaalinäytteiden analyysin perusteella GTP- γ -S-käsitellyt GFP-Rab24-WT-solut vaikuttivat ilmentävän GFP-Rab24-WT-proteiinia enemmän kuin GDP-käsitellyt (kuva 8A) siitä huolimatta, että solut jaettiin kahdeksi näytteeksi vasta juuri ennen solujen hajotusta.



Kuva 8. GTP- γ -S- ja GDP-käsittelyiden (A) sekä Rab24:n Q38P- ja S67L-mutaatioiden (B) vaikutusta Rab24:n ja transientisti yli-ilmennetyn VPS18:n väliseen vuorovaikutukseen tutkittiin koimmunopresipitaatiolla (anti-GFP). Rab24-poistogeeniset Neuro-2a-solut ilmensivät stabiilisti GFP:tä (ktrl) tai GFP-konjugoituja Rab24-proteiineja. A. GFP-Rab24-WT:n kanssa koimmunopresipitoituneen VPS18:n määrässä ei havaittu selvää eroa, kun lysaatti käsiteltiin GDP:llä GTP- γ -S:n sijaan. Koetta ei toistettu. B. VPS18 vuorovaikutti GFP-Rab24-Q38P:n ja GFP-Rab24-S67L:n kanssa heikommin kuin GFP-Rab24-WT:n kanssa. Koe toistettiin kerran, ja tämä on molempia kokeita edustava tulos. Proteiinien signaalit normalisoitiin joko saman näytteen GAPDH-signaalilla (VPS18:n ja GFP-Rab24:n ilmentyminen) tai immunopresipitoituneen GFP-Rab24:n signaalilla (ko-IP VPS18) ja suhteutettiin GFP-Rab24 GTP -näytteen (A) tai GFP-Rab24-WT-näytteen (B) vastaavasti normalisoituun signaaliin. Suurten proteiinimäärien kvantitoinnissa käytettiin vähemmän valotettuja kuvia, kuin tässä esitetyt. Koekohtaiset proteiinimäärät ovat liitteessä 3. IB = immunoblottauksessa käytetyt vasta-aineet.

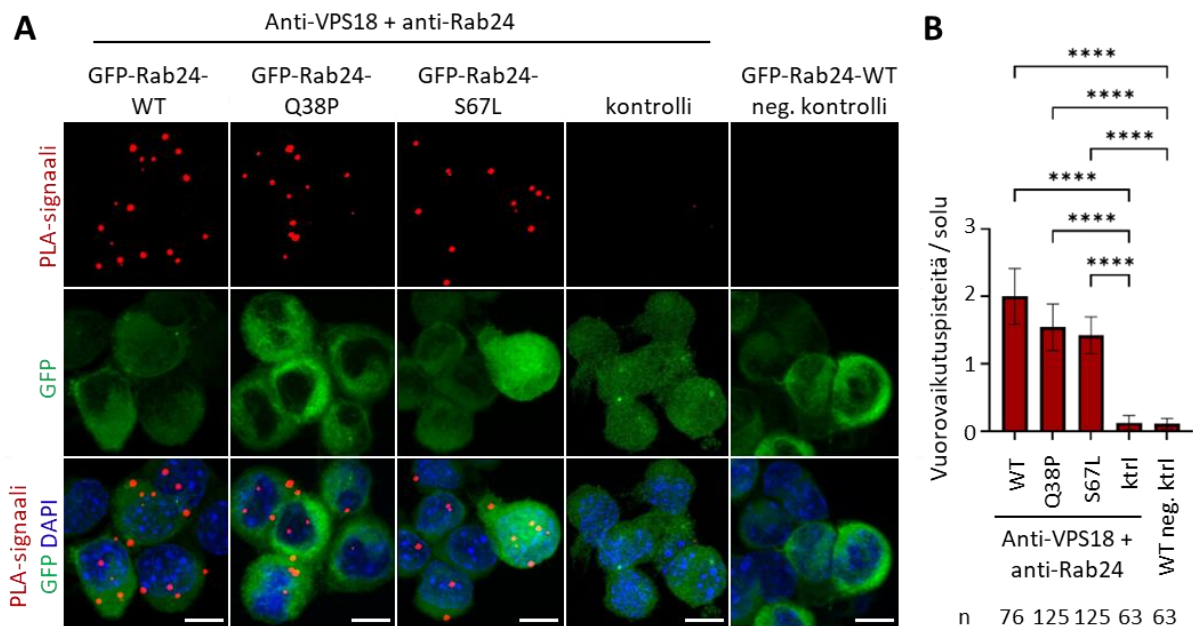
Tutkielmassa selvitettiin myös, vaikuttivatko Rab24:n Q38P- ja S67L-mutaatiot sen vuorovaikutukseen VPS18:n kanssa. Q38P-mutaatio aiheuttaa koirien periytyvän ataksian (Aglar ym. 2014), ja S67L-mutaatio heikentää Rab24:n GTP:n sitomiskykyä (Ylä-Anttila ym. 2015). Koimmunopresipitaatiomenetelmällä havaittiin, että molemmat mutaatiot heikensivät Rab24:n ja VPS18:n fyysistä vuorovaikutusta (kuva 8B). VPS18:aa koimmunopresipitoitui noin viisi kertaa enemmän GFP-Rab24-WT:n kuin GFP-Rab24-Q38P:n tai GFP-Rab24-S67L:n kanssa (kuva 8B). Koe toistettiin kerran, jolloin VPS18:aa koimmunopresipitoitui GFP-Rab24-WT:n kanssa 2–2,5 kertaa enemmän kuin GFP-Rab24-mutanttiproteiinien kanssa (ei esitetty). Kontrollinäytteessä helmiin sitoutui jälleen hieman VPS18:aa, mutta vähemmän kuin GFP-Rab24-mutanttiproteiinien kanssa koimmunopresipitoitui (ei esitetty). Lähtömateriaalinäytteiden analyysin perusteella VPS18:n yli-ilmennys onnistui myös GFP-Rab24-Q38P- ja GFP-Rab24-S67L-soluissa, vaikka GFP-Rab24-S67L-soluissa VPS18:n ilmentyminen olikin vähäisintä (kuva 8B). GFP-Rab24-WT-proteiini ilmentyi enemmän kuin GFP-Rab24-mutanttiproteiinit (kuva 8B).

Rab24:n Q38P- ja S67L-mutaatiot heikensivät myös Rab24:n kolokalisaatiota endogeenisen VPS18:n kanssa (kuva 9). Kuvapaneelissa 9A on esitetty tiettyä solutyyppeä mahdollisimman hyvin edustava, konfokaalimikroskoopilla kuvattu optinen leiketaso yhdestä solusta VPS18:n immunofluoresenssivärjäyksen jälkeen. VPS18-signaali paikantui kaikissa solutyypeissä piste-mäisiin rakenteisiin, kun taas GFP-signaali paikantui melko diffuusisti (kuva 9A). GFP-signaali oli erityisen diffuusi kontrollisoluissa ja GFP-Rab24-S67L-soluissa, ja niissä GFP-signaalia oli usein myös tumassa. GFP-signaali on esikäsittelemätön kaikissa kuvissa (kuva 9A). VPS18-signaalin ja esikäsitellyn GFP-signaalin (jäljellä alueet, joilla suurin GFP:n intensiteetti, ks. luku 2.3.2) kolokalisaatio analysoitiin määrittämällä signaaleille kussakin solussa Pearsonin korrelaatiokerroin r ja Mandersin päällekkäisyyskertoimet M1 ja M2. Eri kertoimien vertailun perusteella VPS18 kolokalisoi eniten GFP-Rab24-WT:n kanssa (kuva 9B–D). VPS18- ja GFP-signaalien intensiteetit korreloivat positiivisesti kaikissa solutyypeissä (kuva 9B). Eniten VPS18:n intensiteetti korreloi GFP-Rab24-WT:n kanssa ja vähiten liukoisen GFP:n kanssa (kuva 9B). Myös VPS18:n ja eri GFP-Rab24-proteiinien esiintymisalueiden päällekkäisyys oli suurempaa kuin VPS18:n ja liukoisen GFP:n (kuva 9C, D). Lisäksi suurempi osuus VPS18:sta paikantui GFP-Rab24-WT-positiiviselle alueelle kuin GFP-Rab24-S67L-positiiviselle alueelle (kuva 9C) ja suurempi osuus GFP-Rab24-WT:stä kuin GFP-Rab24-Q38P:stä paikantui VPS18-positiiviselle alueelle (kuva 9D). Signaalien intensiteettien korrelaatioissa tai päällekkäisyyskertoimissa ei ollut eroa GFP-Rab24-Q38P- ja GFP-Rab24-S67L-solujen välillä (kuva 9B–D).



Kuva 9. Endogeeninen VPS18 kolokaloitui eniten GFP-Rab24-WT-proteiinin kanssa. Rab24-poistogeeniset Neuro-2a-solut ilmensivät stabiilisti GFP-konjugoitua Rab24-WT-, Rab24-Q38P- tai Rab24-S67L-proteiinia tai GFP:tä (kontrolli). **A.** Kuvat havainnollistavat immunofluoresenssivärjätyn VPS18:n (punainen), GFP-signaalin (vihreä) ja tumien (DAPI, sininen) sijaintia. Kuvissa on konfokaalimikroskoopilla kuvattu yksi optinen leike. Nuoli osoittaa keltaisen pisteen, jossa havaitaan selvä VPS18:n ja GFP-Rab24-WT:n kolokalisaatio. Mittajanan pituus on 5 μ m. Pearsonin korrelaatiokertoimen r (**B**) ja Mandersin päällekkäisyyskertoimien M1 (**C**) ja M2 (**D**) keskiarvot kuvaavat VPS18:n ja erilaisten GFP-Rab24-proteiinien (WT, Q38P, S67L) sekä GFP:n (ktrl) kolokalisaatiota soluissa. Virhepalkit kuvaavat 95 %:n luottamusvälejä ja otoskoko n ilmaisee analysoidujen solujen lukumäärän. Kustakin solusta analysoitiin kaikki leiketaset ja GFP-signaali esikäsiteltiin ennen analyysiä (ks. luku 2.3.2). * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$; Dunnettin T3-testi (B) ja Dunnin testi (C, D). Koetta ei toistettu.

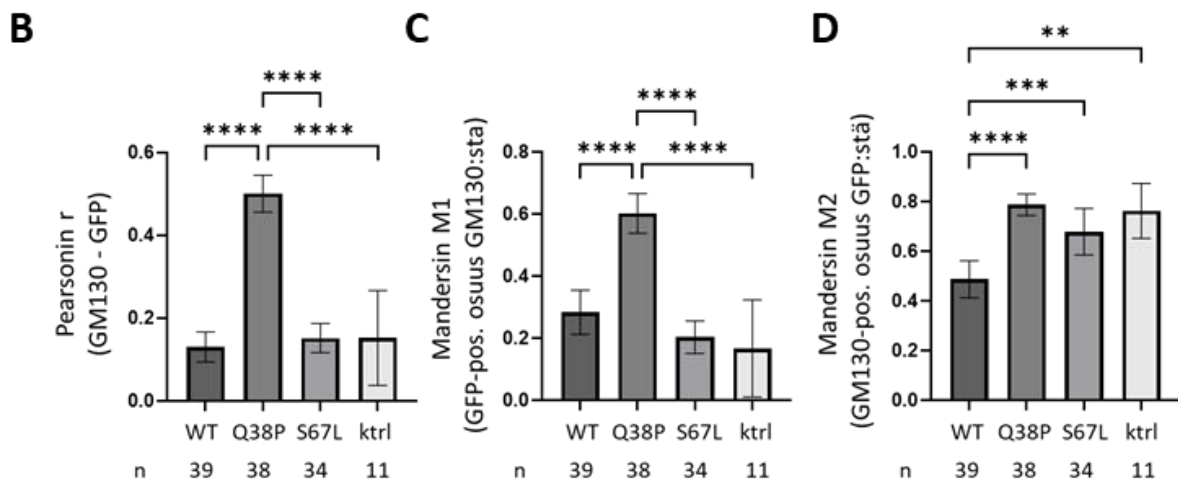
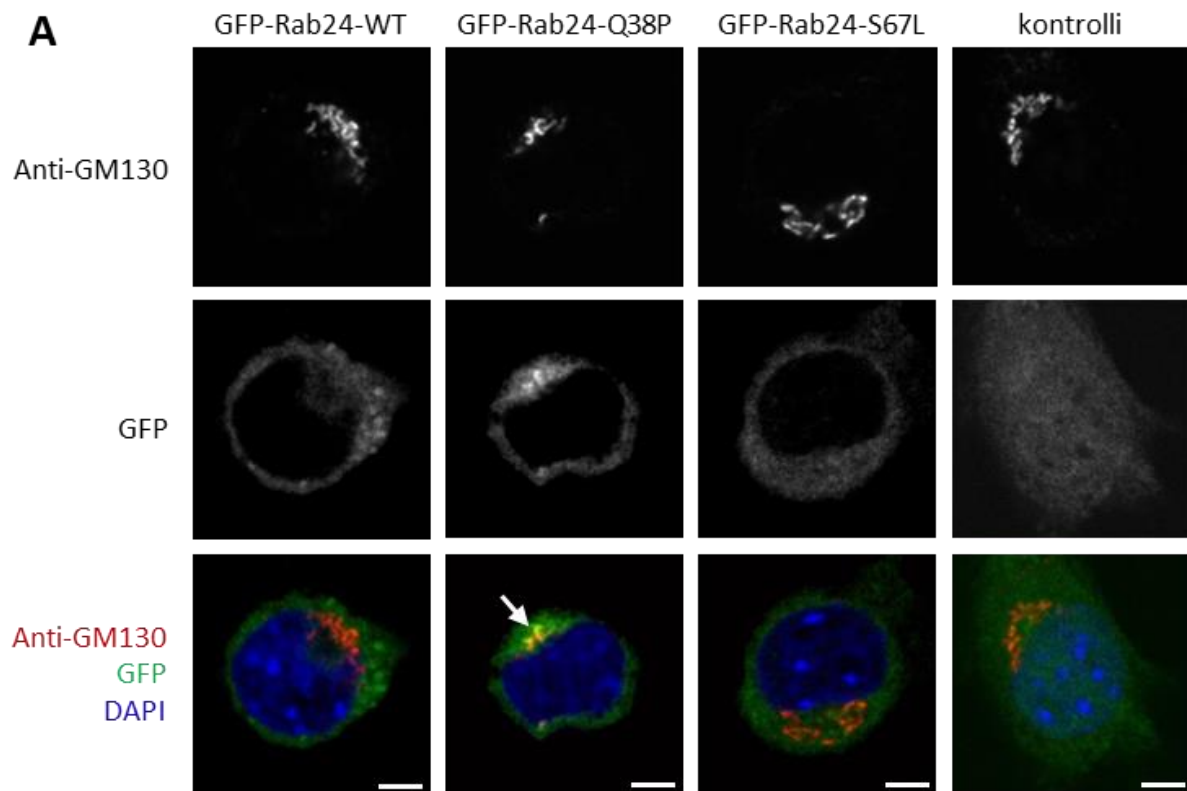
Yli-ilmennetyn Rab24:n ja endogeenisen VPS18:n vuorovaikutusta tutkittiin myös PLA-menetelmällä. Menetelmän avulla soluissa havaittiin fluoresoivina vuorovaikutuspisteinä kohdat, joissa Rab24 ja VPS18 olivat alle 40 nanometrillä toisistaan (Alam 2018). Vuorovaikutuspisteitä oli huomattavasti enemmän muissa soluissa kuin kahden negatiivisen kontrollinäytteen soluissa (kontrollisolut sekä GFP-Rab24-WT-solut ilman primäärivasta-ainekäsittelyä) (kuva 10A, B). Lisäksi GFP-Rab24-WT-soluissa havaittiin enemmän vuorovaikutuspisteitä kuin GFP-Rab24-Q38P- tai GFP-Rab24-S67L-soluissa, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä (kuva 10B). GFP-Rab24-WT-soluissa vuorovaikutuspisteitä oli keskimäärin 2,0 (95 %:n luottamusväli [1,59; 2,41]) per solu (kuva 10B). Yksittäisiä optisia leikkeitä tarkasteltaessa havaittiin, että kaikissa solutyypeissä vuorovaikutuspisteitä oli eniten solulimassa, mutta niitä oli myös tumassa. Myös epäspesifisiä PLA-signaalipisteitä kahdessa erilaisessa kontrollinäytteessä oli sekä solulimassa että tumassa (ei esitetty).



Kuva 10. Rab24:n ja endogeenisen VPS18:n vuorovaikutus havaittiin myös PLA-menetelmällä. Rab24-poistogeeniset Neuro-2a-solut ilmensivät stabiilisti GFP-konjugoitua Rab24-WT-, Rab24-Q38P- tai Rab24-S67L-proteiinia tai GFP:tä (kontrolli). GFP-Rab24-WT -negatiivista kontrollinäytettä ei käsitelty primäärivasta-aineilla. **A.** Kuvat havainnollistavat vuorovaikutuspisteiden (PLA-signaali, punainen), GFP-signaalin (vihreä) ja tumien (DAPI, sininen) sijaintia soluissa. Vuorovaikutuspisteissä Rab24 ja VPS18 sijaitsevat lähellä toisiaan. Konfokaalimikroskoopilla kuvattujen optisten leikkeiden jokaisen kanavan kirkkaimmat pikselit kultakin leiketasonalta on yhdistetty yhteen kuvaan. Mittajanan pituus on 10 μm . **B.** Solukohtaisen vuorovaikutuspisteiden lukumäärän keskiarvot eri näytteissä (näytteen järjestys kuten kuvassa A). Virhepalkit kuvaavat 95 %:n luottamusvälejä ja otoskoko n ilmaisee analysoidujen solujen lukumäärän. **** = $p < 0,0001$; Dunnin testi. Koetta ei toistettu.

3.4 GM130 kolokalisoitui eniten Rab24-Q38P-mutanttiproteiinin kanssa

Vaikka GM130:n ja Rab24:n välillä ei havaittu fyysistä vuorovaikutusta, Rab24:n Q38P- ja S67L-mutaatioiden vaikutusta proteiinien kolokalisaatioon tutkittiin, sillä proteiinien välillä voi olla heikko vuorovaikutus, jota on haastava havaita koimmunopresipitaatiomenetelmällä (Singer-Krüger ym. 2020). Toisaalta kolokalisaatiotulokset kuvaavat myös mutaatioiden vaikutusta Rab24:n paikantumiseen *cis*-Golgin laitteen alueelle. Endogeeninen GM130 paikantui immunofluoresenssivärjäyksen perusteella kaikissa solutyypeissä rakenteeseen, joka morfologialtaan vastaa Golgin laitetta (kuva 11A). GFP-signaali on esikäsittelemätön kuvissa (kuva 11A). GM130-signaalin ja esikäsitellyn GFP-signaalin (jäljellä alueet, joilla suurin GFP:n intensiteetti, ks. luku 2.3.2) kolokalisaatiota kuvaavien Pearsonin korrelaatiokertoimien ja Mandersin päällekkäisyyskertoimien vertailun perusteella GM130 kolokalisoitui parhaiten GFP-Rab24-Q38P:n kanssa (kuva 11B–D). GM130:n ja GFP:n intensiteetit korreloivat positiivisesti kaikissa solutyypeissä (kuva 11B). Intensiteetit korreloivat eniten GFP-Rab24-Q38P-soluissa, mutta muiden solutyyppeiden välillä ei ollut eroja (kuva 11B). Lisäksi suurempi osuus GM130-positiivisesta alueesta sisälsi GFP-Rab24-Q38P:tä kuin muita GFP-Rab24-proteiineja tai liukoista GFP:tä (kuva 11C). Tämän lisäksi suurempi osuus GFP-Rab24-Q38P:stä kuin GFP-Rab24-WT:stä paikantui GM130-positiiviselle alueelle, mutta myös GFP-Rab24-S67L ja liukoinen GFP paikantuivat alueelle enemmän kuin GFP-Rab24-WT (kuva 11D).



Kuva 11. Endogeeninen GM130 kolokaloitui eniten GFP-Rab24-Q38P-proteiinin kanssa. Rab24-poistogeeniset Neuro-2a-solut ilmensivät stabiilisti GFP-konjugoitua Rab24-WT-, Rab24-Q38P- tai Rab24-S67L-proteiinia tai GFP:tä (kontrolli). **A.** Kuvat havainnollistavat immunofluoresenssivärjätyn GM130:n (punainen), GFP-signaalin (vihreä) sekä tumien (DAPI, sininen) sijaintia. Kuvissa on konfokaalimikroskoopilla kuvattu yksi optinen leike. Nuoli osoittaa keltaisen alueen, jossa havaitaan selvä GM130:n ja GFP-Rab24-Q38P:n kolokalisaatio. Mittajanan pituus on 5 μ m. Pearsonin korrelaatiokerroimen r (**B**) ja Mandersin päällekkäisyyskertoimien M1 (**C**) ja M2 (**D**) keskiarvot kuvaavat GM130:n ja erilaisten GFP-Rab24-proteiinien (WT, Q38P, S67L) sekä GFP:n (ktrl) kolokalisaatiota soluissa. Virhepalkit kuvaavat 95 %:n luottamusvälejä ja otoskoko n ilmaisee analysoidujen solujen lukumäärän. Kustakin solusta analysoitiin kaikki leiketaset ja GFP-signaali esikäsiteltiin ennen analyysiä (ks. luku 2.3.2). ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$; Tukeyn testi (B) ja Dunnin testi (C, D). Koetta ei toistettu.

4 POHDINTA

4.1 *Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutus*

Tämän pro gradu -tutkielman yhtenä tavoitteena oli varmistaa aiemmin tehdyn alustavan kartoituksen ennustamia Rab24:n vuorovaikutuskumppaneita Neuro-2a-soluissa. Tutkielmassa yli-ilmennettyjen Rab24:n ja VPS18:n todettiin olevan fyysisessä vuorovaikutuksessa. Koimmunopresipitaatiotulosten perusteella ei kuitenkaan voida päätellä, onko proteiinien välinen vuorovaikutus suora vai epäsuora (Lin ja Lai 2017). PLA-kokeen tulosten mukaan yli-ilmennetty Rab24-WT sijaitsee alle 40 nanometrin etäisyydellä endogeenisestä VPS18:sta keskimäärin vain kahdessa pisteessä per solu. Tämä voi tarkoittaa, että Rab24 ja VPS18 eivät fyysisestä vuorovaikutuksesta huolimatta sijaitse usein hyvin lähellä toisiaan, mikä voisi esimerkiksi viitata vuorovaikutuksen epäsuoruuteen. Tästä ei kuitenkaan toistaiseksi ole varmuutta. PLA-kokeessa VPS18:n ja Rab24:n vuorovaikutuspisteitä havaittiin lähinnä solulimassa, ja molemmat myös paikantuivat immunofluoresenssimikroskopian perusteella pääasiassa solulimaan.

Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutus viittaa siihen, että Rab24 on fyysisessä vuorovaikutuksessa HOPS- ja/tai CORVET-kompleksin kanssa, sillä VPS18 on osa kummankin kompleksin ydintä (Shvarev ym. 2022; Spang 2016). HOPS- ja CORVET-kompleksit ovat kalvofuusioita sääteleviä kiinnittymistekijöitä, eli havaittu vuorovaikutus sopii ehdotukseen, jonka mukaan Rab24 saattaa toimia muun muassa kalvofuusioissa (Ylä-Anttila ja Eskelinen 2018). Aiempien proksimiteettileimaustulosten mukaan HOPS-kompleksi on kuitenkin todennäköisempi Rab24:n vuorovaikutuskumppani kuin CORVET-kompleksi (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos). Rab24 siis mahdollisesti osallistuu HOPS-kompleksin säätelemiin fuusiotapahtumiin, eli autofagosomien, myöhäisten endosomien tai Golgin laitteesta peräisin olevien vesikkeleiden fuusioitumiseen lysosomien kanssa (Shvarev ym. 2022). Amaya ym. (2016) ovatkin havainneet, että Rab24 vaaditaan endosomin ja lysosomin fuusioitumiselle. Autofagosomin ja lysosomin fuusiolle Rab24:ää ei ole havaittu välttämättömäksi (Ylä-Anttila ym. 2015), mutta Rab24:n on todettu vuorovaikuttavan tätä fuusiota säätelevän SNAP29:n kanssa (Schardt ym. 2009). Lisäksi Rab24:n Q38P-mutaation aiheuttamaa ataksiaa sairastavien koirien pikkuaivoihin kertyi myös kaksikalvoisia amfosomeja eli autofagisia osastoja, jotka eivät oletettavasti ole vielä fuusioituneet lysosomin kanssa (Aglar ym. 2014).

Koska pienet GTPaasit, kuten Rab-proteiinit, osallistuvat HOPS-kompleksin sitomiseen kalvoille (Schleinitz ym. 2023), on mahdollista, että myös Rab24 osallistuu tähän. Tällöin Rab24:n vuorovaikutus VPS18:n kanssa olisi todennäköisimmin epäsuora, sillä HOPS-kompleksi sitoutuu kalvoihin VPS39- ja VPS41-proteiinien välityksellä (Shvarev ym. 2022). HOPS-kompleksin kiinnittämiseen endosomiin sekä autofagosomiin osallistuu luultavasti useita eri proteiineja (Borchers ym. 2021; Schleiniz ym. 2023). Kiinnittäjäksi sekä endosomiin että autofagosomiin on ehdotettu esimerkiksi Rab2-proteiinia (Ding ym. 2019; Schleinitz ym. 2023; Zhang ym. 2023), jonka kanssa Rab24 kolokalisoituu merkittävästi (Olkkonen ym. 1993). Myös Rab7:n ja RILP:n, jotka molemmat ovat Rab24:n fyysisiä vuorovaikutuskumppaneita (Amaya ym. 2016), on ehdotettu kiinnittävän HOPS-kompleksi endosomiin (Lin ym. 2014). Kaikki HOPS-kompleksin kiinnittäjistä eivät ilmeisesti ole tehtävässä yhtä keskeisiä (Schleinitz ym. 2023). Myöskään Rab24 ei todennäköisesti olisi välttämätön kiinnittäjä, koska tämän tutkielman mikroskopiatulosten perusteella VPS18 paikantuu soluissa silmämääräisesti arvioituna samalla tavalla riippumatta siitä, ilmentävätkö solut Rab24:ää vai eivät.

Rab24:n todennäköinen vuorovaikutus HOPS-kompleksin kanssa ei toisaalta välttämättä tarkoita sitä, että Rab24:llä olisi HOPS-kompleksin toimintaan liittyviä tehtäviä. Vaikka Rab24 ja HOPS-kompleksi ilmeisesti sijaitsevat samassa proteiinikompleksissa, voi olla, että ne säätelevät eri toimintoja. Rab24 voisi esimerkiksi osallistua autofagosomin tai endosomin kuljetukseen mikrotubuluksia pitkin kohti lysosomia. Amaya ym. (2016) ovatkin ehdottaneet, että Rab24 osallistuu endosomin kuljetukseen Rab7:n ja RILP:n kanssa. Rab7:n ja RILP:n on todettu säätelevän myös autofagosomien kuljetusta (Wijdeven ym. 2016). Lisäksi Rab24:n on havaittu vuorovaikuttavan mikrotubulusten kanssa (Militello ym. 2013). Behrendsin ym. (2010) tutkimustulokset toisaalta viittaavat siihen, että Rab24 voisi osallistua jollakin tavalla kalvofuusion jälkeisiin tapahtumiin. He selvittivät autofagiaan liittyvien proteiinien keskinäisiä vuorovaikutuksia ja havaitsivat, että Rab24 mahdollisesti vuorovaikuttaa SNAP29:n ja useiden muiden SNARE-proteiinien kanssa SNARE-kompleksin hajottamiseen osallistuvan NSF-proteiinin välityksellä. Behrendsin ym. (2010) tulosten mukaan Rab24:llä voisi olla myös VPS18:n kanssa epäsuora vuorovaikutus usean proteiinin, muun muassa NSF:n kautta.

Yleensä Rab-proteiinien vuorovaikutuskumppanit sitoutuvat parhaiten joko Rab-proteiinin aktiiviseen tai inaktiiviseen konformaatioon (Pylypenko ym. 2018). Tästä syystä Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutusta pyrittiin karakterisoimaan vertailemalla GTP- γ -S- ja GDP-lisäysten vaikutusta VPS18:n koimmunopresipitoitumiseen Rab24-WT:n kanssa. Vuorovaikutuksen odotettiin olevan voimakkaampi GTP- γ -S:n läsnä ollessa, sillä kiinnittymistekijät kuten HOPS-

kompleksi ovat monen Rab-proteiinin efektoreja, ja Rab-proteiinit sitovat efektoreitaan ollessaan aktiivisessa konformaatioissa (Pylypenko ym. 2018). Vastoin hypoteesia selvää eroa koimmunopresipitoituneen VPS18:n määrässä eri nukleotideilla käsiteltyjen näytteiden välillä ei havaittu. Tulos saattaa viitata siihen, että VPS18 kykenee vuorovaikuttamaan Rab24:n kanssa yhtä hyvin riippumatta siitä, onko Rab24 aktiivisessa vai inaktiivisessa konformaatioissa. Tällainen Rab-proteiinin ja vuorovaikutuskumppanin suhde on epätyypillinen. Hiivalla HOPS-kompleksin on kuitenkin havaittu sitoutuvan yhtä hyvin Ypt7-proteiiniin (hiivan vastine Rab7:lle) riippumatta siitä, onko Ypt7:ään sitoutunut GTP vai GDP, vaikka HOPS-kompleksia pidetään Ypt7:n efektorina (Nordmann ym. 2010; Zick ja Wickner 2012). Kun HOPS-kompleksin VPS41-alayksikkö fosforyloidaan, HOPS-kompleksi sen sijaan sitoutuu selvästi paremmin GTP:tä sitovaan Ypt7:ään (Zick ja Wickner 2012). Vastaavaa ei kuitenkaan ole havaittu nisäkässoluissa. Tulos joka tapauksessa osoittaa, että tutkimuksissa on hyvä huomioida myös proteiinien posttranslacionaalisten muokkausten mahdollinen merkitys vuorovaikutuksille.

On kuitenkin huomioitava, että tämän tutkielman nukleotidilisäyksiä vertaileva koe tehtiin ainoastaan kerran. Yhden kokeen perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä vuorovaikutuksen luonteesta, vaan koetta tulisi toistaa luotettavampien tulosten saamiseksi. On myös mahdollista, että kokeessa hajotuspuskuriin lisätyt nukleotidit eivät sitoutuneet Rab24:ään tehokkaasti. Ylipäätään erilaisissa nukleotidilisäyksiä hyödyntävissä tutkimuksissa on hyvä huomioida se, että Rab24 on soluissa muita Rab-proteiineja useammin GTP:hen sitoutuneena, koska se hydrolysoi GTP:tä hitaasti (Erdman ym. 2000). Esimerkiksi Schardt ym. (2009) epäilivät Rab24:n hitaan GTP:n hydrolyysin selittävän heidän kiinnostavan koimmunopresipitaatiotuloksensa. Sen mukaan Rab24:n ja SNAP29:n vuorovaikutuksen havaitseminen ei vaatinut GTP- γ -S-lisäystä, toisin kuin SNAP29:n vuorovaikutus toisen Rab-proteiinin, Rab3a:n kanssa.

Vaikka nukleotidilisäyksiä hyödyntävän kokeen perusteella Rab24:n konformaation merkitys sen ja VPS18:n vuorovaikutukselle jäi toistaiseksi epäselväksi, Rab24:n mutaatioiden osoitettiin heikentävän sen ja VPS18:n fyysistä vuorovaikutusta sekä kolokalisaatiota hypoteesin mukaisesti. VPS18 koimmunopresipitoitui 2–5 kertaa huonommin Rab24-Q38P- ja Rab24-S67L-proteiinien kuin Rab24-WT-proteiinin kanssa. Tulos on selvästi suuntaa antava, mutta koe pitäisi toistaa useamman kerran, jotta voitaisiin arvioida tarkemmin, kuinka paljon fyysinen vuorovaikutus heikkenee mutaatioiden myötä. Koetta olisi myös hyvä toistaa, jotta varmistutaan, etteivät havaitut VPS18:n ja GFP-Rab24-proteiinien ilmennyserot eri solutyypeissä ole vaikuttaneet tulokseen. Päätelmää vuorovaikutuksen heikentymisestä tukevat kuitenkin myös kolokalisaatiokokeen tulokset. Molemmat mutaatiot heikensivät etenkin Rab24:n ja VPS18:n

signaalien intensiteettien korrelaatiota soluissa. Juuri intensiteettien korrelaation tarkastelu on kolokalisaatiotutkimuksessa keskeisintä, kun tutkittavien proteiinien välille ehdotetaan toiminnallista vuorovaikutusta (Aaron ym. 2018). VPS18 paikantui silmämääräisesti arvioituna samalla tavalla joka solutyypissä, kun taas Rab24-S67L ja liukoinen GFP olivat selvästi diffuusimpia kuin Rab24-WT ja Rab24-Q38P. Kolokalisaatiotuloksissa oli siis eroja todennäköisimmin sen takia, että Rab24-WT, Rab24-mutantit ja GFP paikantuivat eri tavalla suhteessa VPS18:aan.

Se, että mutaatiot heikensivät Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutusta, ei kuitenkaan paljasta tarkkaa tietoa vuorovaikutuksen luonteesta, koska ei ole varmaa tietoa siitä, mistä heikentynyt vuorovaikutus johtuu. Rab24-S67L:n tiedetään sitovan GTP:tä heikommin kuin Rab24-WT (Ylä-Anttila ym. 2015), ja myös Q38P-mutaation on ehdotettu vaikuttavan Rab24:n nukleotidinsitomiskykyyn (Aglar ym. 2014). Mikäli mutaatiot heikentäisivät vuorovaikutusta VPS18:n kanssa juuri Rab24:n heikentyneen GTP:n sitomiskyvyn vuoksi, tulos tukee ehdotusta, jonka mukaan HOPS-kompleksi voisi olla Rab24:n efektori. Tämä olisi toisaalta ristiriidassa nukleotidilisäyksiä hyödyntäneen koimmunopresipitaatiokokeen tuloksen kanssa, mutta kuten edellä on mainittu, kyseistä tulosta ei voidakaan pitää luotettavana.

Jos taas myöhemmissä kokeissa osoittautuu, että Rab24:n aktiivisella tai inaktiivisella konformaatiolla ei todella ole merkitystä sen vuorovaikutukselle VPS18:n kanssa, mutaatioiden vuorovaikutusta heikentävä vaikutus perustuu johonkin muuhun kuin Rab24:n nukleotidinsitointilaan. Mutaatiot voisivat esimerkiksi vaikuttaa muulla tavalla Rab24:n rakenteeseen siten, että VPS18 tai HOPS-kompleksi kykenee sitoutumaan siihen normaalia huonommin. Tämä on hyvin mahdollista, koska aminohapot S67 ja Q38 sijaitsevat kytkinalueilla, jotka osallistuvat Rab-proteiinien vuorovaikutuskumppaneiden sitomiseen (Pylypenko ym. 2018). Syynä heikentyneeseen vuorovaikutukseen voi toisaalta olla myös se, että kummankin mutaation myötä Rab24:n sijainti soluissa muuttui ja paikantuminen VPS18:n lähiympäristöön väheni. Paikantumisen muutos on tyypillistä Rab-mutanteille, joiden GTP:n sitomiskyky on heikentynyt (Homma ym. 2021). On erityisesti yleistä, etteivät tällaiset Rab-mutantit paikannu solun kalvorakenteille, kuten ei myöskään Rab24-S67L (Chen ym. 2002; Lamers ym. 2017; Liu ym. 2013; Maltese ym. 2002; Ylä-Anttila ym. 2015). Huomionarvoista on, että Rab24:n mutaatiot eivät kuitenkaan kokonaan estäneet Rab24:n fyysistä vuorovaikutusta tai kolokalisaatiota VPS18:n kanssa. PLA-kokeessa vuorovaikutuspisteiden lukumäärässä ei myöskään ollut tilastollisesti merkittävää eroa Rab24-WT- ja Rab24-mutanttiproteiineja ilmentäneiden solujen välillä.

4.2 Rab24:n ja GM130:n vuorovaikutus

Rab24:n ja GM130:n välillä ei tässä tutkimuksessa havaittu fyysistä vuorovaikutusta. Fyysinen vuorovaikutus voi silti olla mahdollinen, sillä toisin kuin proksimateettileimauksella, koimmunopresipitaatiomenetelmällä ei välttämättä havaita transienteja tai heikkoja vuorovaikutuskumppaneita, mikäli ne eivät pysy sitoutuneena kohdeproteiiniin solujen hajotuksen tai pesujen ajan (Singer-Krüger ym. 2020). Toisaalta voi myös olla, etteivät proteiinit vuorovaikuta fyysisesti, vaan *cis*-Golgin laitteen markkeri GM130 on proksimateettileimausmäärityksessä leimautunut sen vuoksi, että myös Rab24 sijaitsee kyseisellä alueella (Del Olmo ym. 2019; Olkkonen ym. 1993; Taguchi ym. 2003).

Hypoteesin mukaisesti Rab24-Q38P kuitenkin kolokalisoitui GM130:n kanssa Rab24-WT:tä enemmän kaikkien kolokalisaatiokertoimien vertailun perusteella. Myöskään Rab24-Q38P ei kuitenkaan välttämättä vuorovaikuta fyysisesti GM130:n kanssa, sillä kolokalisaatioanalyysi ei paljasta fyysisiä vuorovaikutuksia, koska tutkimuksessa käytetyn mikroskoopin erotuskyky ei riitä havainnoimaan tyypillisiä biomolekyylien vuorovaikutusetäisyyksiä (Aaron ym. 2018). Olisi kuitenkin hyvä selvittää koimmunopresipitaatiokokeilla, onko proteiinien välillä fyysinen vuorovaikutus. Tulos joka tapauksessa tarkoittaa, että Rab24-Q38P paikantuu *cis*-Golgin laitteeseen enemmän kuin Rab24-WT. Tämä ei ole tyypillistä GTP:tä heikosti sitoville Rab-mutanteille, jollainen myös Rab24-Q38P:n on ehdotettu olevan (Aglar ym. 2014). Kuten edellä on mainittu, monet muut tällaiset Rab-mutantit, mukaan lukien Rab24-S67L, ovat soluissa liukoisia (Chen ym. 2002; Lamers ym. 2017; Liu ym. 2013; Maltese ym. 2002; Ylä-Anttila ym. 2015).

Rab24-Q38P:n paikantumista *cis*-Golgin laitteeseen voidaan mahdollisesti selittää tarkastelemalla eräillä Rab11b-mutanteilla tehtyjä tutkimuksia. Tiettyjen Rab11b-mutanttien, joiden on ennustettu tai osoitettu sitovan GTP:tä heikommin kuin Rab11b-WT, on villityypistä poiketen havaittu paikantuvan Golgin laitteeseen (Lamers ym. 2017; Schlierf ym. 2000). On kiinnostavaa, että näillä mutanteilla havaittiin myös muutoksia vuorovaikutuksissa Rab11b:n GEF-proteiinien kanssa (Lamers ym. 2017). GEF-proteiinit määräävät pitkälti Rab-proteiinien paikantumisen soluissa (Wiegandt ym. 2015), ja esimerkiksi Rab5A-mutantit, joiden kanssa Rab5A:n GEF ei kykene normaalisti vuorovaikuttamaan, paikantuvat solussa poikkeavalla tavalla (Blümer ym. 2013). Voidaan pohtia, johtuisiko Rab24-Q38P:n kasvanut paikantuminen *cis*-Golgin laitteeseen muutoksista vuorovaikutuksissa Rab24:n GEF-proteiinien kanssa. Tätä ehdotusta tukee se, että Rab24:n glutamiini Q38 sijaitsee kytkinalueella 1 (Aglar ym. 2014). Useiden Rab-

proteiinien kytkinalueen 1 konformaatio muuttuu huomattavasti GEF:n sitoutumisen myötä, ja alueen mutaatioilla on vaikutusta vuorovaikutukseen GEF-proteiinien kanssa (Itzen ym. 2006; Jenkins ym. 2018; Schoebel ym. 2009).

Hypoteesin vastaisesti S67L-mutaatio ei heikentänyt Rab24:n kolokalisaatiota GM130:n kanssa. Mandersin M2-päällekkäisyyskertoimien vertailun perusteella jopa suurempi osa Rab24-S67L:stä kuin Rab24-WT:stä paikantui GM130-positiiviselle alueelle. Toisaalta myös kontrollisolujen liukoinen GFP kolokalisoiutui GM130:n kanssa yhtä paljon kuin Rab24-S67L kaikkien kertoimien vertailun perusteella. Tämä antaa aiheutta epäillä kolokalisaatiotulosten luotettavuutta, koska liukoinen GFP ei tiedettävästi paikannu soluissa erityisesti Golgin laitteeseen. Tulokset eivät siis todennäköisesti viittaa siihen, että myöskään Rab24-S67L spesifisesti paikantuisi *cis*-Golgin laitteeseen enemmän tai välttämättä edes saman verran kuin Rab24-WT. Myös silmämääräisesti arvioituna Rab24-S67L sekä GFP paikantuivat soluissa hyvin diffuusiivisesti, eivätkä ne vaikuttaneet konsentroituvan esimerkiksi Golgin laitteen alueelle. Kolokalisaatiotulokset eivät myöskään ole samansuuntaisia aiempien proksimateettileimaustulosten kanssa, joiden mukaan GM130 sijaitsi Rab24-S67L:n lähellä harvemmin kuin Rab24-WT:n lähellä (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos).

Koska nämä kolokalisaatiotulokset ovat ristiriidassa muiden havaintojen kanssa, biologisten syiden sijaan tässä tapauksessa voi olla oleellisempaa tarkastella mahdollisia menetelmään liittyviä syitä sille, miksi Rab24-S67L ja GFP eivät tulosten mukaan kolokalisoituneet Rab24-WT:tä heikommin GM130:n kanssa. Mandersin päällekkäisyyskertoimien suhteen olisi kiinnostava tutkia, voisivatko erot analyysissä käytettyjen signaalien esiintymisalueiden pinta-alojen koossa selittää tuloksia. Toistaiseksi ei ole selvitetty, vaikuttaako kuvien esikäsittelyssä tehtävä GFP-signaalin vähennys jäljellejäävän signaalin pinta-alaan eri tavalla eri solutyypeissä sen mukaan, kuinka diffuusi signaali lähtötilanteessa on. Analyysimenetelmän toimivuutta olisi hyvä varmistaa ja kolokalisaatiokokeita toistaa, jotta voitaisiin päätellä varmemmin, miten Rab24-S67L-mutantti käyttäytyy suhteessa Golgin laitteeseen. Kokeissa käytettävät solut on jatkossa myös syytä käsitellä sykklisellä AMP:llä, joka saa solut erilaistumaan neuronaaliseen suuntaan (Tremblay ym. 2010). Samalla solujen muoto muuttuu litteämmäksi, mikä helpottaa immunofluoresenssikuvien analysointia huomattavasti.

4.3 Mahdollisia jatkotutkimuksia

Jotta voitaisiin tehdä varmempia johtopäätöksiä esimerkiksi tutkielmassa havaitun Rab24:n ja VPS18:n vuorovaikutusten luonteesta, olisi tulevaisuudessa ensinnäkin tärkeä toistaa tässä projektissa tehtyjä kokeita useamman kerran. Nyt useaa koetta ei toistettu ajanpuutteen vuoksi. Suurin osa tutkielman käytännön osuuteen lopulta käytetystä ajasta kului koimmunopresipitaatiokokeita edeltäneiden transfektioiden optimointiin ja siten myös epäonnistuneisiin koimmunopresipitaatioyrityksiin ja immunoblottaukseen. Myöskään GM130:n ja Rab24:n vuorovaikutusta ei ehditty tutkimaan enempää. Vaikka niiden välillä ei havaittu fyysistä vuorovaikutusta, olisi etenkin Rab24:n Q38P-mutaation vaikutusta vuorovaikutukseen kiinnostava tutkia jatkossa esimerkiksi koimmunopresipitaatiolla sekä PLA-menetelmällä.

Tulevissa vuorovaikutuskokeissa mahdollisimman monen proteiinin olisi hyvä olla endogeeninen, koska proteiinien yli-ilmennys voi johtaa esimerkiksi niiden vääränlaiseen paikantumiseen soluissa tai niiden epäspesifiseen sitoutumiseen toisiin proteiineihin (Burckhardt ym. 2021). Tässä tutkimuksessa yli-ilmennetyt proteiinit olivat myös eri eläinlajeilta, mikä voisi periaatteessa häiritä vuorovaikutusta, joskin lajienväliset erot aminohapposekvensseissä olivat hyvin pieniä. Lisäksi on huomioitava, että kaikissa yli-ilmennetyissä proteiineissa oli epitooppikonjugaatit. VPS18- ja GM130-proteiineihin liitetyt FLAG ja HA ovat pieniä peptidejä, eivätkä ne todennäköisesti vaikuta proteiinien ominaisuuksiin (Zhao ym. 2013). Sen sijaan Rab24:ään liitetty 27 kDa:n kokoinen GFP (Uniprot, GFP, *Aequorea victoria*) yli kaksinkertaistaa Rab24:n koon, mikä voisi mahdollisesti vaikuttaa proteiinin toimintaan tai paikantumiseen (Schneider ja Hackenberger 2017). On esimerkiksi mahdollista, että koimmunopresipitaatiokokeessa GFP-konjugaatti esti GM130:n sitoutumisen Rab24:ään.

Vaikka vuorovaikutukset olisi tärkeä osoittaa myös endogeenisillä proteiineilla, tämä ei aina ole mahdollista. Kokeet endogeenisellä Rab24:llä olisivat erityisen haastavia, koska sen määrä soluissa on vähäinen (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon havainto). Tämän tutkielman tulos, jonka mukaan Rab24:n mutaatiot heikensivät VPS18:n ja Rab24:n vuorovaikutusta, viittaa kuitenkin siihen, että VPS18:n ja Rab24:n välillä on toiminnallinen vuorovaikutus, eikä koimmunopresipitaatiotuloksissa ollut kyse yli-ilmennyksen aiheuttamasta epäspesifisestä sitoutumisesta. On myös havaittu, että kun GFP-konjugaatti on Rab-proteiinin aminoterminaaliossa päässä, kuten tässä tutkimuksessa, useat GFP-Rab-proteiinit toimivat ja paikantuvat soluissa normaalisti (Buvelot Frei ym. 2006). Toisin kuin Rab24:ää, VPS18- ja GM130-

proteiineja on hyvin mahdollista tutkia myös endogeenisina, eikä niitä myöskään tässä tutkielmassa yli-ilmennetty kolokalisaatio- ja PLA-kokeissa. Lisäksi pro gradu -projektin jälkeen koimmunopresipitaatiomenetelmällä havaittiin Rab24:n vuorovaikuttavan myös endogeenisen VPS18:n ja VPS41:n kanssa (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos). Rab24:n vuorovaikutus HOPS-kompleksin kanssa vaikuttaa siis hyvin todennäköiseltä.

Jatkossa koimmunopresipitaatiomenetelmällä voitaisiin tutkia myös muita potentiaalisia Rab24:n vuorovaikutuskumppaneita. Tällaisia olisivat esimerkiksi tietyt COPII- ja retromeerikompleksien proteiinit, jotka proksimiteettileimaustulosten mukaan sijaitsevat Rab24:n lähiympäristössä (Eskelisen tutkimusryhmä, julkaisematon tulos). Alun perin tutkielmassa olikin tarkoitus tutkia myös näitä proteiineja VPS18:n ja GM130:n lisäksi, mutta ajanpuutteen vuoksi näin ei tehty. Lisäksi olisi kiinnostava selvittää, onko Rab24 fyysisessä vuorovaikutuksessa Rab2:n kanssa. Rab2 kolokalisoituu huomattavan paljon Rab24:n kanssa (Olkkonen ym. 1993) ja Rab2:n on ehdotettu kiinnittävän HOPS-kompleksia endosomeihin sekä autofagosomeihin (Ding ym. 2019; Schleinitz ym. 2023), eli se voisi hyvin kuulua samaan proteiinikompleksiin Rab24:n kanssa.

Jotta havaittujen vuorovaikutusten perusteella voidaan selvittää Rab24:n tarkempia toimintamekanismeja, vuorovaikutusten luonnetta on tutkittava. Tässä tutkielmassa vuorovaikutuksia karakterisointiin hyödyntämällä Rab24-Q38P- ja Rab24-S67L-mutanttiproteiineja sekä nukleotidilisäyksiä. Q38P- ja S67L-mutaatioiden vaikutuksia Rab24:n rakenteeseen ja toimintaan ei toistaiseksi ole tutkittu paljon, eikä tiedetä, miksi mutaatiot heikensivät vuorovaikutusta VPS18:n kanssa. Rab-mutanttiproteiinien ominaisuudet on tärkeä tuntea hyvin, sillä on havaittu, että yleisesti tutkimuksissa käytetyillä Rab-mutanteilla voi olla odottamattomia vaikutuksia Rab-proteiinien toimintaan, kuten GTPaasiaktiivisuuteen tai vuorovaikutuksiin muiden proteiinien kanssa (Langemeyer ym. 2014). Tällaiset vaikutukset voivat johtaa tulosten väärintulkintaan. Etenkin Rab24-Q38P- ja Rab24-S67L-mutanttien nukleotidinsitomiskykyä olisi hyvä tutkia jatkossa tarkemmin. Toistaiseksi ei tiedetä, heikentääkö myös Q38P-mutaatio GTP:n sitomiskykyä. Lisäksi muilla Rab-proteiineilla GTP:n sitomista heikentävistä mutaatioista osa heikentää myös GDP:n sitomista, osa ei (Maltese ym. 2002). Mutaatioiden mahdollisten odottamattomien vaikutusten vuoksi vuorovaikutusten karakterisointiin voisi toisaalta olla hyvä hyödyntää Rab-proteiinin luonnollista aktiivista ja inaktiivista konformaatiota. Wiegandt ym. (2015) ovat kehittäneet menetelmän, jossa Rab-proteiiniin kiinnitetään nukleotidi kovalenttisesti. Tällainen menetelmä olisi myös luotettavampi kuin vapaiden nukleotidien

lisääminen hajotuspuskuriin siltä osin, että halutut nukleotidit olisivat varmasti sitoutuneet tutkittaviin Rab-proteiineihin (Wiegandt ym. 2015).

Olisi lisäksi tärkeää tutkia, ovatko tunnistetut vuorovaikutukset suoria vai epäsuoria. Tätä voitaisiin tutkia esimerkiksi koimmunopresipitaation kaltaisella pull down -menetelmällä. Menetelmässä vasta-aineen sijasta helmien pintaan on kiinnitetty toinen tutkittavista proteiineista ja helmien kanssa inkuboidaan näytettä, joka sisältää vain tutkittavaa potentiaalista vuorovaikutuskumppania (Louche ym. 2017). Näin voisi esimerkiksi selvittää, onko Rab24:n ja VPS18:n välinen vuorovaikutus suora. Jatkossa voitaisiin myös tutkia, miten olosuhteiden muutos, kuten autofagian indusointi, vaikuttaa havaittuihin vuorovaikutuksiin soluissa. Rab24:n tunnistetut vuorovaikutuskumppanit voivat viitata siihen, että Rab24 saattaa liittyä autofagosomin ja lysosomin fuusioon myös indusoidussa autofagiassa, sillä HOPS-kompleksi ja SNAP29 osallistuvat fuusioon sekä basaaliautofagiassa että starvaation indusoimassa autofagiassa (Jiang ym. 2014; Takáts ym. 2013). Lisäksi Rab7 on lysosomin ja autofagosomin fuusiolle välttämätön nimenomaan starvaation indusoimassa autofagiassa (Gutierrez ym. 2004; Jäger ym. 2004). Jatkossa voisi esimerkiksi tutkia, vaikuttaako autofagian indusointi Rab24:n kolokalisaatioon näiden fuusioon liittyvien proteiinien kanssa.

Ylipäättään Rab24:n molekyyli-tason toiminnan tutkimusta on tärkeä jatkaa. Tulokset avaisivat sen tehtäviä solunsisäisissä prosesseissa ja voisivat selittää sen yhteyksiä eri sairauksiin. Rab24:n on esimerkiksi havaittu olevan basaaliautofagiassa välttämätön autolysosomien hävittämiseksi, mutta mekanismia ei vielä tunneta (Ylä-Anttila ym. 2015). Mekanismin selvittämiseksi on jatkossa myös tutkittava lisää, miten basaaliautofagian viimeiset vaiheet tapahtuvat. Olisi myös kiinnostava selvittää, miten Rab24:n Q38P-mutaatio aiheuttaa ataksian ja siihen liittyvät kliiniset löydökset koirilla (Agler ym. 2014). Voitaisiin esimerkiksi tutkia, liittyykö taudin syntymekanismiin oleellisesti tässä tutkielmassa havaittu Rab24-Q38P:n lisääntynyt paikantuminen *cis*-Golgin laitteeseen. Lisäksi Rab24:n toimintaa on tärkeä tutkia erilaisissa solulinjoissa, sillä jotkin sen tehtävistä voivat olla solutyypispesifisiä. Jatkossa kokeita voisi tehdä esimerkiksi maksasoluissa, joiden mitokondrioiden plastisuutta sekä lipidi- ja glukoosihomöostaasia Rab24:n havaittu säätelevän (Seitz ym. 2019).

4.4 Yhteenveto

Tässä pro gradu -tutkielmassa havaittiin fyysinen vuorovaikutus Rab24:n ja VPS18:n välillä, jota Rab24:n mutaatiot heikensivät. Tulos viittaa todennäköisimmin siihen, että Rab24 vuorovaikuttaa HOPS-kompleksin kanssa, eli Rab24:llä saattaa olla tehtäviä esimerkiksi autofagosomien tai endosomien fuusioitumisessa lysosomien kanssa. Tulos vahvistaa aiempaa käsitystä, jonka mukaan Rab24 mahdollisesti toimii muun muassa kalvofuusioissa (Ylä-Anttila ja Eskelinen 2018). Rab24:n ja GM130:n välillä puolestaan ei havaittu fyysistä vuorovaikutusta, mutta Rab24:n Q38P-mutaatio paransi kolokalisaatiota GM130:n kanssa, eli se lisäsi Rab24:n paikantumista *cis*-Golgin laitteeseen. Tämän tutkielman havaintojen pohjalta tehtävät jatkotutkimukset voivat avata tarkemmin Rab24:n toiminnan molekulaarisia mekanismeja.

KIITOKSET

Kiitos Eeva-Liisa Eskeliselle siitä, että sain tehdä tämän mielenkiintoisen pro gradu -projektin hänen tutkimusryhmässään. Kiitos myös neuvoista kirjoitusprosessissa. Suuri kiitos Mauricio Rammille tutkielman käytännön osan ohjaamisesta ja avusta ongelmanratkaisussa. Kiitokset Tiina Henttiselle sekä Minna Vainiolle avusta kirjoitusprosessin aikana. Kiitokset myös tuesta ja mukavasta työilmapiiristä muille tutkimusryhmäläisille: Martin, Lav, Hira, Yunus, Farhad, Sylvana ja Johannes.

LÄHTEET

- Aaron, J. S., Taylor, A. B., & Chew, T. L. (2018). Image co-localization - Co-occurrence versus correlation. *Journal of Cell Science*, 131(3). <https://doi.org/10.1242/JCS.211847>
- Aglar, C., Nielsen, D. M., Urkasemsin, G., Singleton, A., Tonomura, N., Sigurdsson, S., Tang, R., Linder, K., Arepalli, S., Hernandez, D., Lindblad-Toh, K., van de Leemput, J., Motsinger-Reif, A., O'Brien, D. P., Bell, J., Harris, T., Steinberg, S., & Olby, N. J. (2014). Canine Hereditary Ataxia in Old English Sheepdogs and Gordon Setters Is Associated with a Defect in the Autophagy Gene Encoding RAB24. *PLoS Genetics*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003991>
- Alam, M. S. (2018). Proximity Ligation Assay (PLA). *Current Protocols in Immunology*, 123(1). <https://doi.org/10.1002/cpim.58>
- AlphaFold Protein Structure Database. EMBL. Rab24, *Mus musculus*. [alphafold.ebi.ac.uk/entry/P35290]. Viitattu 3.11.2023.
- Amaya, C., Militello, R. D., Calligaris, S. D., & Colombo, M. I. (2016). Rab24 interacts with the Rab7/Rab interacting lysosomal protein complex to regulate endosomal degradation. *Traffic*, 17(11), 1181–1196. <https://doi.org/10.1111/tra.12431>
- Bahat, A., & Gross, A. (2019). Mitochondrial plasticity in cell fate regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(38), 13852–13863. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.000828>
- Baschieri, F., Allmen, E. U. Von, Legler, D. F., & Farhan, H. (2015). Loss of gm130 in breast cancer cells and its effects on cell migration, invasion and polarity. *Cell Cycle*, 14(8), 1139–1147. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1007771>
- Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P., & Harper, J. W. (2010). Network organization of the human autophagy system. *Nature*, 466(7302), 68–76. <https://doi.org/10.1038/nature09204>
- Blümer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Maze, T., Wu, Y. W., Bastiaens, P., Goody, R. S., & Itzen, A. (2013). RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *Journal of Cell Biology*, 200(3), 287–300. <https://doi.org/10.1083/jcb.201209113>
- Borchers, A. C., Langemeyer, L., & Ungermann, C. (2021). Who's in control? Principles of rab gtpase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. *Journal of Cell Biology*, 220(9). <https://doi.org/10.1083/jcb.202105120>
- Burckhardt, C. J., Minna, J. D., & Danuser, G. (2021). Co-immunoprecipitation and semi-quantitative immunoblotting for the analysis of protein-protein interactions. *STAR Protocols*, 2(3). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100644>
- Burd, C., & Cullen, P. J. (2014). Retromer: A master conductor of endosome sorting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016774>

- Buvelot Frei, S., Rahl, P. B., Nussbaum, M., Briggs, B. J., Calero, M., Janeczko, S., Regan, A. D., Chen, C. Z., Barral, Y., Whittaker, G. R., & Collins, R. N. (2006). Bioinformatic and Comparative Localization of Rab Proteins Reveals Functional Insights into the Uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Molecular and Cellular Biology*, 26(19), 7299–7317. <https://doi.org/10.1128/mcb.02405-05>
- Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., & Zerial, M. (1991). Hyper-variable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature*, 353(6346). <https://doi.org/10.1038/353769a0>
- Chen, X., Edwards, J. A. S., Logsdon, C. D., Ernst, S. A., & Williams, J. A. (2002). Dominant negative Rab3D inhibits amylase release from mouse pancreatic acini. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 18002–18009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201248200>
- Chen, Z., Wang, X., Liu, R., Chen, L., Yi, J., Qi, B., Shuang, Z., Liu, M., Li, X., Li, S., & Tang, H. (2017). KDM4B-mediated epigenetic silencing of miRNA-615-5p augments RAB24 to facilitate malignancy of hepatoma cells. *Oncotarget*, 8(11), 17712–17725. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10832>
- Damme, M., Suntio, T., Saftig, P., & Eskelinen, E. L. (2015). Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions. *Acta Neuropathologica*, 129(3), 337–362. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1361-4>
- Del Olmo, T., Lauzier, A., Normandin, C., Larcher, R., Lecours, M., Jean, D., Lessard, L., Steinberg, F., Boisvert, F., & Jean, S. (2019). APEX2-mediated RAB proximity labeling identifies a role for RAB21 in clathrin-independent cargo sorting. *EMBO reports*, 20(2). <https://doi.org/10.15252/embr.201847192>
- Deng, J., Zhang, Q., Lv, L., Ma, P., Zhang, Y., Zhao, N., & Zhang, Y. (2022). Identification of an autophagy-related gene signature for predicting prognosis and immune activity in pancreatic adenocarcinoma. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11050-w>
- Ding, J., Soule, G., Overmeyer, J. H., & Maltese, W. A. (2003). Tyrosine phosphorylation of the Rab24 GTPase in cultured mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(3), 670–675. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.171>
- Ding, X., Jiang, X., Tian, R., Zhao, P., Li, L., Wang, X., Chen, S., Zhu, Y., Mei, M., Bao, S., Liu, W., Tang, Z., & Sun, Q. (2019). RAB2 regulates the formation of autophagosome and autolysosome in mammalian cells. *Autophagy*, 15(10), 1774–1786. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596478>
- Dirac-Svejstrup, A. B., Sumizawa, T., & Pfeffer, S. R. (1997). Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO Journal*, 16(3), 465–472. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.3.465>
- Egami, Y., Kiryu-Seo, S., Yoshimori, T., & Kiyama, H. (2005). Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(4), 1206–1213. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.171>

- Elias, M., Brighthouse, A., Gabernet-Castello, C., Field, M. C., & Dacks, J. B. (2012). Sculpting the endomembrane system in deep time: High resolution phylogenetics of Rab GTPases. *Journal of Cell Science*, 125(10), 2500–2508. <https://doi.org/10.1242/jcs.101378>
- Erdman, R. A., Shellenberger, K. E., Overmeyer, J. H., & Maltese, W. A. (2000). Rab24 Is an Atypical Member of the Rab GTPase Family. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6). <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.3848>
- Eskelinen, E. L. (2019). Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 111, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.010>
- Foster, R., Nolan, K. M., Thissen, J., & Settleman, J. (1996). Identification of a Novel Human Rho Protein with Unusual Properties: GTPase Deficiency and In Vivo Farnesylation. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2689–2699. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2689>
- Fukuda, M., Kanno, E., Ishibashi, K., & Itoh, T. (2008). Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad rab binding specificity. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(6), 1031–1042. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700569-MCP200>
- Gerondopoulos, A., Langemeyer, L., Liang, J. R., Linford, A., & Barr, F. A. (2012). BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Current Biology*, 22(22), 2135–2139. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.020>
- Gomes, L. C., Benedetto, G. Di, & Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology*, 13(5), 589–598. <https://doi.org/10.1038/ncb2220>
- Gómez-Virgilio, L., Silva-Lucero, M. D. C., Flores-Morelos, D. S., Gallardo-Nieto, J., Lopez-Toledo, G., Abarca-Fernandez, A. M., Zacapala-Gómez, A. E., Luna-Muñoz, J., Montiel-Sosa, F., Soto-Rojas, L. O., Pacheco-Herrero, M., & Cardenas-Aguayo, M. D. C. (2022). Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/cells11152262>
- Gorur, A., Yuan, L., Kenny, S. J., Baba, S., Xu, K., & Schekman, R. (2017). COPII-coated membranes function as transport carriers of intracellular procollagen I. *Journal of Cell Biology*, 216(6), 1745–1759. <https://doi.org/10.1083/jcb.201702135>
- Gruenberg, J., & Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), 317–323. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2689>
- Guadagno, N. A., & Progida, C. (2019). Rab GTPases: Switching to human diseases. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080909>
- Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W., & Colombo, M. I. (2004). Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 117(13). <https://doi.org/10.1242/jcs.01114>

- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., & Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885–889. <https://doi.org/10.1038/nature04724>
- Homma, Y., Hiragi, S., & Fukuda, M. (2021). Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS Journal*, 288(1), 36–55. <https://doi.org/10.1111/febs.15453>
- Hu, D., Jiang, L., Luo, S., Zhao, X., Hu, H., Zhao, G., & Tang, W. (2020). Development of an autophagy-related gene expression signature for prognosis prediction in prostate cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02323-x>
- Huang, B., Li, X., & Zhu, X. (2021). The Role of GM130 in Nervous System Diseases. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.743787>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO Journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, 91(1), 119–149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Hyvola, N., Diao, A., McKenzie, E., Skippen, A., Cockcroft, S., & Lowe, M. (2006). Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by rab GTPases. *EMBO Journal*, 25(16), 3750–3761. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601274>
- Igci, M., Baysan, M., Yigiter, R., Ulasli, M., Geyik, S., Bayraktar, R., Bozgeyik, İ., Bozgeyik, E., Bayram, A., & Cakmak, E. A. (2016). Gene expression profiles of autophagy-related genes in multiple sclerosis. *Gene*, 588(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.04.042>
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151(6), 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>
- Ito, E., & Uemura, T. (2022). RAB GTPases and SNAREs at the trans-Golgi network in plants. *Journal of Plant Research*, 135(3), 389–403. <https://doi.org/10.1007/s10265-022-01392-x>
- Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R. S., Alexandrov, K., & Rak, A. (2006). Nucleotide exchange via local protein unfolding - Structure of Rab8 in complex with MSS4. *EMBO Journal*, 25(7), 1445–1455. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601044>
- Jenkins, M. L., Margaria, J. P., Stariha, J. T. B., Hoffmann, R. M., McPhail, J. A., Hamelin, D. J., Boulanger, M. J., Hirsch, E., & Burke, J. E. (2018). Structural determinants of Rab11 activation by the guanine nucleotide exchange factor SH3BP5. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06196-z>

- Jenum, S., Dhanasekaran, S., Lodha, R., Mukherjee, A., Kumar Saini, D., Singh, S., Singh, V., Medigeshi, G., Haks, M. C., Ottenhoff, T. H. M., Doherty, T. M., Kabra, S. K., Ritz, C., & Grewal, H. M. S. (2016). Approaching a diagnostic point-of-care test for pediatric tuberculosis through evaluation of immune biomarkers across the clinical disease spectrum. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep18520>
- Jeschke, A., & Haas, A. (2018). Sequential actions of phosphatidylinositol phosphates regulate phagosome-lysosome fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 29(4), 452–465. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-07-0464>
- Ji, H. H., Zhang, H. M., Shen, M., Yao, L. L., & Li, X. D. (2015). The motor function of *Drosophila melanogaster* myosin-5 is activated by calcium and cargo-binding protein dRab11. *Biochemical Journal*, 469(1), 135–144. <https://doi.org/10.1042/BJ20141330>
- Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., & Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular Biology of the Cell*, 25(8). <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-08-0447>
- Joachim, J., Jefferies, H. B. J., Razi, M., Frith, D., Snijders, A. P., Chakravarty, P., Judith, D., & Tooze, S. A. (2015). Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130. *Molecular Cell*, 60(6), 899–913. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.018>
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V. M., & Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor β III spectrin. *Journal of Cell Biology*, 176(4), 459–471. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606077>
- Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., & Eskelinen, E. L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, 117(20). <https://doi.org/10.1242/jcs.01370>
- Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A. M. K., Choi, M. E., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z., Eskelinen, E., ... Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal*, 40(19). <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108863>
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J. I., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., & Tanaka, K. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441(7095), 880–884. <https://doi.org/10.1038/nature04723>

- Lamers, I. J. C., Reijnders, M. R. F., Venselaar, H., Kraus, A., Jansen, S., de Vries, B. B. A., Houge, G., Gradek, G. A., Seo, J., Choi, M., Chae, J. H., van der Burgt, I., Pfundt, R., Letteboer, S. J. F., van Beersum, S. E. C., Dusseljee, S., Brunner, H. G., Doherty, D., Kleefstra, T., & Roepman, R. (2017). Recurrent De Novo Mutations Disturbing the GTP/GDP Binding Pocket of RAB11B Cause Intellectual Disability and a Distinctive Brain Phenotype. *American Journal of Human Genetics*, 101(5), 824–832. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.09.015>
- Langemeyer, L., Nunes Bastos, R., Cai, Y., Itzen, A., Reinisch, K. M., & Barr, F. A. (2014). Diversity and plasticity in Rab GTPase nucleotide release mechanism has consequences for Rab activation and inactivation. *eLife*, 3. <https://doi.org/10.7554/elife.01623>
- Lee, J. Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y. S., Pandey, U. B., Kaushik, S., Tresse, E., Lu, J., Taylor, J. P., Cuervo, A. M., & Yao, T. P. (2010). HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO Journal*, 29(5), 969–980. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.405>
- Li, J., Liu, W., Sun, W., Rao, X., Chen, X., & Yu, L. (2023). A Study on Autophagy Related Biomarkers in Alzheimer’s Disease Based on Bioinformatics. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(7), 3693–3703. <https://doi.org/10.1007/s10571-023-01379-9>
- Lin, J. S., & Lai, E. M. (2017). Protein–protein interactions: Co-immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology*, 1615, 211–219. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_17
- Lin, X., Yang, T., Wang, S., Wang, Z., Yun, Y., Sun, L., Zhou, Y., Xu, X., Akazawa, C., Hong, W., & Wang, T. (2014). RILP interacts with HOPS complex via VPS41 subunit to regulate endocytic trafficking. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep07282>
- Liu, S., Hunt, L., & Storrie, B. (2013). Rab41 Is a Novel Regulator of Golgi Apparatus Organization That Is Needed for ER-To-Golgi Trafficking and Cell Growth. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071886>
- Louche, A., Salcedo, S. P., & Bigot, S. (2017). Protein–protein interactions: Pull-down assays. *Methods in Molecular Biology*, 1615, 247–255. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_20
- Maltese, W. A., Soule, G., Gunning, W., Calomeni, E., & Alexander, B. (2002). Mutant Rab24 GTPase is targeted to nuclear inclusions. *BMC Cell Biology*, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-3-25>
- Marra, P., Salvatore, L., Mironov, A., Campli, A. Di, Tullio, G. Di, Trucco, A., Beznoussenko, G., & De Matteis, M. A. (2007). The Biogenesis of the Golgi Ribbon: The Roles of Membrane Input from the ER and of GM130. *Molecular Biology of the Cell*, 18(5), 1595–1608. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- McEwan, D. G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F. P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M. H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., & Dikic, I. (2015). PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Molecular Cell*, 57(1), 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.006>

- Merithew, E., Hatherly, S., Dumas, J. J., Lawe, D. C., Heller-Harrison, R., & Lambright, D. G. (2001). Structural Plasticity of an Invariant Hydrophobic Triad in the Switch Regions of Rab GTPases Is a Determinant of Effector Recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), 13982–13988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009771200>
- Militello, R. D., Munafó, D. B., Berón, W., López, L. A., Monier, S., Goud, B., & Colombo, M. I. (2013). Rab24 is Required for Normal Cell Division. *Traffic*, 14(5), 502–518. <https://doi.org/10.1111/tra.12057>
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: Process and function. *Genes and Development*, 21(22), 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Mohammed, H., & Carroll, J. S. (2013). Approaches for assessing and discovering protein interactions in cancer. *Molecular Cancer Research*, 11(11), 1295–1302. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0454>
- Munafó, D. B., & Colombo, M. I. (2002). Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24. *Traffic*, 3(7). <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30704.x>
- Murray, D. H., Jahnel, M., Lauer, J., Avellaneda, M. J., Brouilly, N., Cezanne, A., Morales-Navarrete, H., Perini, E. D., Ferguson, C., Lupas, A. N., Kalaidzidis, Y., Parton, R. G., Grill, S. W., & Zerial, M. (2016). An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together. *Nature*, 537(7618), 107–111. <https://doi.org/10.1038/nature19326>
- Nakamura, N. (2010). Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *Journal of Pharmacological Sciences*, 112(3), 255–264. <https://doi.org/10.1254/jphs.09R03CR>
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T. E., & Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Gol Matrix Protein, GM130. *The Journal of Cell Biology*, 131(6), 1715–1726. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1715>
- Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Bröcker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandré, S., & Ungermann, C. (2010). The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Current Biology*, 20(18), 1654–1659. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.002>
- Olkkonen, V. M., Dupree, P., Killisch, I., Lutcke, A., Zerial, M., & Simons, K. (1993). Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily. *Journal of Cell Science*, 106(4). <https://doi.org/10.1242/jcs.106.4.1249>
- Protein BLAST. NCBI. [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins] Viitattu 23.10.2023.
- Puthenveedu, M. A., Bachert, C., Puri, S., Lanni, F., & Linstedt, A. D. (2006). GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nature Cell Biology*, 8(3), 238–248. <https://doi.org/10.1038/ncb1366>

- Pylypenko, O., Hammich, H., Yu, I. M., & Houdusse, A. (2018). Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. *Small GTPases*, 9(1–2), 22–48. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1336191>
- Qin, Q., Gu, Z., Li, F., Pan, Y., Zhang, T. X., Fang, Y., & Zhang, L. (2022). A Diagnostic Model for Alzheimer's Disease Based on Blood Levels of Autophagy-Related Genes. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.881890>
- Qiu, D., Li, S., Guo, L., Yuan, R., & Ou, X. (2019). Rab24 functions in meiotic apparatus assembly and maturational progression in mouse oocyte. *Cell Cycle*, 18(21), 2893–2901. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1660115>
- Rodgers, S. J., Jones, E. I., Arumugam, S., Hamila, S. A., Danne, J., Gurung, R., Eramo, M. J., Nanayakkara, R., Ramm, G., McGrath, M. J., & Mitchell, C. A. (2022). Endosome maturation links PI3K α signaling to lysosome repopulation during basal autophagy. *The EMBO Journal*, 41(19). <https://doi.org/10.15252/embj.2021110398>
- Schardt, A., Brinkmann, B. G., Mitkovski, M., Sereda, M. W., Werner, H. B., & Nave, K. A. (2009). The SNARE protein SNAP-29 interacts with the GTPase Rab3A: Implications for membrane trafficking in myelinating glia. *Journal of Neuroscience Research*, 87(15). <https://doi.org/10.1002/jnr.22005>
- Schleinitz, A., Pöttgen, L. A., Keren-Kaplan, T., Pu, J., Saftig, P., Bonifacino, J. S., Haas, A., & Jeschke, A. (2023). Consecutive functions of small GTPases guide HOPS-mediated tethering of late endosomes and lysosomes. *Cell Reports*, 42(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111969>
- Schlierf, B., Fey, G. H., Hauber, J., Hocke, G. M., & Rosorius, O. (2000). Rab11b is essential for recycling of transferrin to the plasma membrane. *Experimental Cell Research*, 259(1), 257–265. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4947>
- Schneider, A. F. L., & Hackenberger, C. P. R. (2017). Fluorescent labelling in living cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.012>
- Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S., & Itzen, A. (2009). RabGDI Displacement by DrrA from Legionella Is a Consequence of Its Guanine Nucleotide Exchange Activity. *Molecular Cell*, 36(6), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.014>
- Schoppe, J., Mari, M., Yavavli, E., Auffarth, K., Cabrera, M., Walter, S., Fröhlich, F., & Ungermann, C. (2020). AP-3 vesicle uncoating occurs after HOPS-dependent vacuole tethering. *The EMBO Journal*, 39(20). <https://doi.org/10.15252/embj.2020105117>
- Seitz, S., Kwon, Y., Hartleben, G., Jülg, J., Sekar, R., Krahmer, N., Najafi, B., Loft, A., Gancheva, S., Stemmer, K., Feuchtinger, A., Hrabe de Angelis, M., Müller, T. D., Mann, M., Blüher, M., Roden, M., Berriel Diaz, M., Behrends, C., Gilleron, J., Herzig, S., & Zeigerer, A. (2019). Hepatic Rab24 controls blood glucose homeostasis via improving mitochondrial plasticity. *Nature Metabolism*, 1(10), 1009–1026. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0124-x>

- Seki, Y., Suzuki, S. O., Nakamura, S., & Iwaki, T. (2009). Degenerative and protective reactions of the rat trigeminal motor nucleus after removal of the masseter and temporal muscles. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 38(10), 777–784. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00772.x>
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L., & Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(5), 283–296. <https://doi.org/10.1038/nrm3565>
- Shvarev, D., Schoppe, J., König, C., Perz, A., Füllbrunn, N., Kiontke, S., Langemeyer, L., Janulienė, D., Schnelle, K., Kümmel, D., Fröhlich, F., Moeller, A., & Ungermann, C. (2022). Structure of the HOPS tethering complex, a lysosomal membrane fusion machinery. *eLife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.80901>
- Sigma-Aldrich. Duolink® PLA Fluorescence Protocol. Merck KGaA. [www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-and-nucleic-acid-interactions/duolink-fluorescence-user-manual#DuolinkPLAFluorescenceProtocol]. Viitattu 15.11.2023.
- Sigma-Aldrich. How Proximity Ligation Assays (PLA) Work. Merck KGaA. [www.sigmaaldrich.com/FI/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/protein-and-nucleic-acid-interactions/how-pla-works]. Viitattu 15.11.2023.
- Singer-Krüger, B., Fröhlich, T., Franz-Wachtel, M., Nalpas, N., Macek, B., & Jansen, R. P. (2020). APEX2-mediated proximity labeling resolves protein networks in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEBS Journal*, 287(2), 325–344. <https://doi.org/10.1111/febs.15007>
- Smeele, P. H., & Vaccari, T. (2023). Snapshots from within the cell: Novel trafficking and non trafficking functions of Snap29 during tissue morphogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 133, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.024>
- Spampanato, C., Feeney, E., Li, L., Cardone, M., Lim, J. A., Annunziata, F., Zare, H., Polishchuk, R., Puertollano, R., Parenti, G., Ballabio, A., & Raben, N. (2013). Transcription factor EB (TFEB) is a new therapeutic target for Pompe disease. *EMBO Molecular Medicine*, 5(5), 691–706. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202176>
- Spang, A. (2016). Membrane tethering complexes in the endosomal system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00035>
- Spoerner, M., Nuehs, A., Herrmann, C., Steiner, G., & Kalbitzer, H. R. (2007). Slow conformational dynamics of the guanine nucleotide-binding protein Ras complexed with the GTP analogue GTP γ S. *FEBS Journal*, 274(6), 1419–1433. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05681.x>
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., & Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *The EMBO Journal*, 13(6), 1–287. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06381.x>

Sun, N. K., Huang, S. L., Chien, K. Y., & Chao, C. C. K. (2012). Golgi-SNARE GS28 potentiates cisplatin-induced apoptosis by forming GS28-MDM2-p53 complexes and by preventing the ubiquitination and degradation of p53. *Biochemical Journal*, 444(2), 303–314. <https://doi.org/10.1042/BJ20112223>

Swaminathan, B., Goikuria, H., Vega, R., Rodríguez-Antigüedad, A., López Medina, A., Del Mar Freijo, M., Vandenbroeck, K., & Alloza, I. (2014). Autophagic marker MAP1LC3B expression levels are associated with carotid atherosclerosis symptomatology. *PLoS ONE*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115176>

Szatmári, Z., & Sass, M. (2014). The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators: A review. *Autophagy*, 10(7). <https://doi.org/10.4161/auto.29395>

Taguchi, T., Pypaert, M., & Warren, G. (2003). Biochemical sub-fractionation of the mammalian Golgi apparatus. *Traffic*, 4(5), 344–352. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00091.x>

Takáts, S., Nagy, P., Varga, Á., Piracs, K., Kárpáti, M., Varga, K., Kovács, A. L., Hegedus, K., & Juhász, G. (2013). Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology*, 201(4), 531–539. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211160>

Tambe, Y., Yamamoto, A., Isono, T., Chano, T., Fukuda, M., & Inoue, H. (2009). The drs tumor suppressor is involved in the maturation process of autophagy induced by low serum. *Cancer Letters*, 283(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.028>

Tremblay, R. G., Sikorska, M., Sandhu, J. K., Lanthier, P., Ribocco-Lutkiewicz, M., & Bani-Yaghoub, M. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 186(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.11.004>

Tsuboyama, K., Koyama-Honda, I., Sakamaki, Y., Koike, M., Morishita, H., & Mizushima, N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science*, 354(6315). <https://doi.org/10.1126/science.aaf6136>

Uniprot. GFP, *Aequorea victoria*. [www.uniprot.org/uniprotkb/P42212/entry] Viitattu 20.11.2023.

Uniprot. GM130, *Mus musculus*. [www.uniprot.org/uniprotkb/Q921M4/entry] Viitattu 23.10.2023.

Uniprot. GM130, *Rattus norvegicus*. [www.uniprot.org/uniprotkb/Q62839/entry] Viitattu 23.10.2023.

Uniprot. Rab24, *Mus musculus*. [www.uniprot.org/uniprotkb/P35290/entry] Viitattu 4.8.2023.

Uniprot. VPS18, *Homo sapiens*. [www.uniprot.org/uniprotkb/Q9P253/entry] Viitattu 23.10.2023.

Uniprot. VPS18, *Mus musculus*. [www.uniprot.org/uniprotkb/Q8R307/entry] Viitattu 23.10.2023.

- Valsdottir, R., Hashimoto, H., Ashman, K., Koda, T., Storrie, B., & Nilsson, T. (2001). Identification of rabaptin-5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER. *FEBS Letters*, 508(2), 201–209. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02993-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02993-3)
- Wei, J. H., Zhang, Z. C., Wynn, R. M., & Seemann, J. (2015). GM130 Regulates Golgi-Derived Spindle Assembly by Activating TPX2 and Capturing Microtubules. *Cell*, 162(2), 287–299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.014>
- Weide, T., Bayer, M., Köster, M., Siebrasse, J.-P., Peters, R., & Barnekow, A. (2001). The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b. *EMBO reports*, 2(4), 336–341. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve065>
- White, I., Zhao, M., Choi, U. B., Pfuetzner, R. A., & Brunger, A. T. (2018). Structural principles of SNARE complex recognition by the AAA+ protein NSF. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.38888.001>
- Wiegandt, D., Vieweg, S., Hofmann, F., Koch, D., Li, F., Wu, Y. W., Itzen, A., Müller, M. P., & Goody, R. S. (2015). Locking GTPases covalently in their functional states. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8773>
- Wijdeven, R. H., Janssen, H., Nahidiazar, L., Janssen, L., Jalink, K., Berlin, I., & Neefjes, J. (2016). Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11808>
- Wileman, T. (2013). Autophagy as a defence against intracellular pathogens. *Essays in Biochemistry*, 55(1), 153–163. <https://doi.org/10.1042/BSE0550153>
- Wilmes, S., & Kümmel, D. (2023). Insights into the role of the membranes in Rab GTPase regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102177>
- Wilson, A. L., Sheridan, K. M., Erdman, R. A., & Maltese, W. A. (1996). Prenylation of a Rab1B mutant with altered GTPase activity is impaired in cell-free systems but not in intact mammalian cells. *Biochemical Journal*, 318(3), 1007–1014. <https://doi.org/10.1042/bj3181007>
- Wittinghofer, A., & Vetter, I. R. (2011). Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 943–971. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062708-134043>
- Wu, C., Tan, S., Liu, L., Cheng, S., Li, P., Li, W., Liu, H., Zhang, F., Wang, S., Ning, Y., Wen, Y., & Zhang, F. (2021). Transcriptome-wide association study identifies susceptibility genes for rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02419-9>

- Wu, M., Yin, G., Zhao, X., Ji, C., Gu, S., Tang, R., Dong, H., Xie, Y., & Mao, Y. (2006). Human RAB24, interestingly and predominantly distributed in the nuclei of COS-7 cells, is colocalized with cyclophilin A and GABARAP. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(5), 749–754. <https://doi.org/10.3892/ijmm.17.5.749>
- Yamamoto, A., Cremona, M. L., & Rothman, J. E. (2006). Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *Journal of Cell Biology*, 172(5), 719–731. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510065>
- Ylä-Anttila, P., & Eskelinen, E.-L. (2018). Roles for RAB24 in autophagy and disease. *Small GTPases*, 9(1–2), 57–65. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1317699>
- Ylä-Anttila, P., Mikkonen, E., Happonen, K. E., Holland, P., Ueno, T., Simonsen, A., & Eskelinen, E. L. (2015). RAB24 facilitates clearance of autophagic compartments during basal conditions. *Autophagy*, 11(10), 1833–1848. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1086522>
- Yu, J., Lang, Q., Zhong, C., Wang, S., & Tian, Y. (2021). Genome-Wide Identification of Autophagy Prognostic Signature in Pancreatic Cancer. *Dose-Response*, 19(2). <https://doi.org/10.1177/15593258211023260>
- Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D. W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E. H., & Lenardo, M. J. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465(7300), 942–946. <https://doi.org/10.1038/nature09076>
- Zhang, S., Tong, M., Zheng, D., Huang, H., Li, L., Ungermann, C., Pan, Y., Luo, H., Lei, M., Tang, Z., Fu, W., Chen, S., Liu, X., & Zhong, Q. (2023). C9orf72-catalyzed GTP loading of Rab39A enables HOPS-mediated membrane tethering and fusion in mammalian autophagy. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42003-0>
- Zhao, X., Li, G., & Liang, S. (2013). Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/581093>
- Zhao, Y. G., & Zhang, H. (2019). Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *Journal of Cell Biology*, 218(3), 757–770. <https://doi.org/10.1083/jcb.201810099>
- Zick, M., & Wickner, W. (2012). Phosphorylation of the effector complex HOPS by the vacuolar kinase Yck3p confers Rab nucleotide specificity for vacuole docking and fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 23(17), 3429–3437. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-04-0279>

LIITTEET

Liite 1: Liuokset

Solujen kasvatusmedium

α -MEM (Biowest, L0476)

10 % FBS (Gibco, 10270-206)

100 μ M glysiini, L-alaniini, L-asparagiini, L-asparagiinihappo, L-glutamiinihappo, L-proliini ja L-seriini (MEM Non-Essential Amino Acids Solution 100X, Gibco, 11140050)

2 mM glutamiini (GlutaMAX, Gibco, 35050061)

penisilliini/streptomysiini (Biowest, L0022)

Hajotuspuskuri

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % Triton X-100

proteaaasi- ja fosfataasi-inhibiittoritabletti (ThermoScientific, A32959) 10 ml:ssä puskuria

4x Laemmlin puskuri

0,2 M Tris-HCl (pH 6,8)

48 % glyseroli

8 % SDS

2 % merkaptoetanoli

0,02 % bromofenoli

Laimennospuskuri (koimmunopresipitaatio)

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

150 mM NaCl

0,5 mM EDTA

proteaaasi- ja fosfataasi-inhibiittoritabletti (ThermoScientific, A32959) 10 ml:ssä puskuria

Ajopuskuri

25 mM Tris
192 mM glysiini
0,1 % SDS

Siirtopuskuri

25 mM Tris
192 mM glysiini
20 % metanoli

TBST (pH 7,6)

150 mM NaCl
20 mM Tris-HCl
0,1 % Tween-20

Irrotuspuskuri

63 mM Tris-HCl (pH 6,8)
2 % SDS
0,8 % β -merkaptoetanoli

PBS (pH 7,4)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10,1 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄

Mowiol-päällystysaine

2,4 g MOWIOL 4-88 (Sigma-Aldrich, 81381)
6 g glyseroli
6 ml MQ-vesi
12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5)
2,5 % DAPCO (1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane; Sigma-Aldrich, D2522)
1 μ g/ml DAPI (4',6-diamidino-2-fenyyli-indoli; ThermoFisher Scientific, 62247)

Pesupuskuri A (PLA)

10 mM Tris (pH 7,4)

150 mM NaCl

0.05 % Tween-20

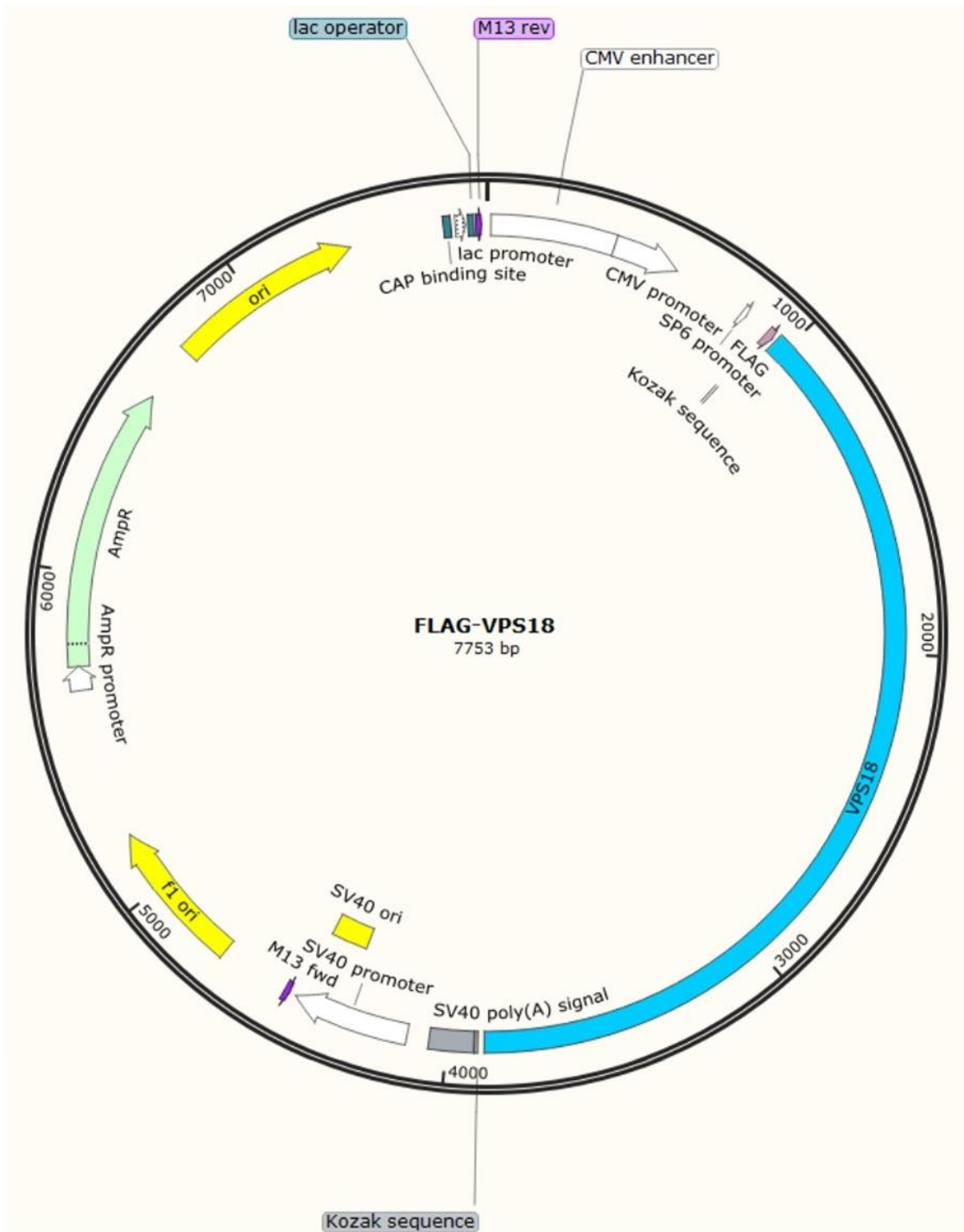
Pesupuskuri B (PLA)

200 mM Tris (pH 7,5)

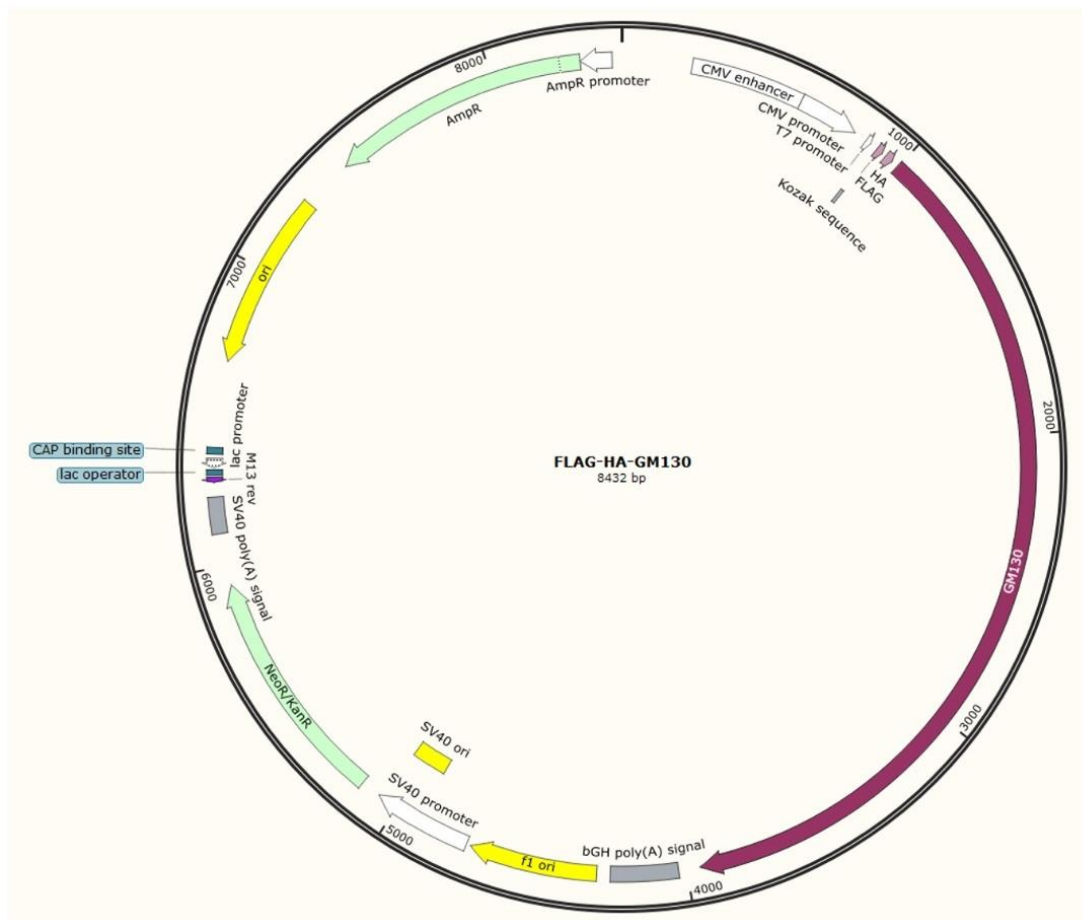
100 mM NaCl

Liite 2: Plasmidit

FLAG-VPS18-plasmidi



FLAG-HA-GM130-plasmidi



FLAG-konjugaatin aminohapposekvensi: DYKDDDDK

HA-konjugaatin aminohapposekvensi YPYDVPDYA

D = asparagiinihappo, Y = tyrosiini, K = lysiini, P = proliini, V = valiini, A = alaniini

Liite 3: Koimmunopresipitaatiokokeiden proteiinimäärät

Esitetyt lähtömateriaalinäytteiden proteiinimäärät lisättiin SDS-PAGE-geelille.

VPS18 – Kontrolli- ja GFP-Rab24-WT-solut (kuva 7A)

Proteiinia helmille (µg)	Proteiinia lähtömateriaalinäytteessä (µg)	
kaikki näytteet	kontrolli	GFP-Rab24-WT
1147	38	53

GM130 – Kontrolli- ja GFP-Rab24-WT-solut (kuva 7B)

Proteiinia helmille (µg)	Proteiinia lähtömateriaalinäytteessä (µg)	
kaikki näytteet	kontrolli	GFP-Rab24-WT
1757	60	60

VPS18 – Kontrolli- ja GFP-Rab24-WT-solut, GTP-γ-S- ja GDP-käsittelyt (kuva 8A)

Proteiinia helmille (µg)	Proteiinia lähtömateriaalinäytteessä (µg)			
kaikki näytteet	kontrolli	kontrolli	GFP-Rab24-WT	GFP-Rab24-WT
	GTP	GDP	GTP	GDP
996	53	48	34	33

VPS18 – Kontrolli-, GFP-Rab24-WT-, GFP-Rab24-Q38P- ja GFP-Rab24-S67L-solut (kuva 8B)

Proteiinia helmille (µg)	Proteiinia lähtömateriaalinäytteessä (µg)			
kaikki näytteet	kontrolli	GFP-Rab24-WT	GFP-Rab24-Q38P	GFP-Rab24-S67L
792	28	34	26	33

Liite 4: Immunoblottaussignaalien käsittelyt

Validaatio: VPS18 (kuva 6A)

VPS18:n ilmentyminen = (VPS18-signaali / GAPDH-signaali) / (VPS18-signaali_{kontrolli} / GAPDH-signaali_{kontrolli})

Tehty erikseen endogeeniselle sekä yli-ilmennetylle proteiinille.

Validaatio: GM130 (kuva 6B)

GM130:n ilmentyminen = (GM130-signaali / GAPDH-signaali) / (GM130-signaali_{kontrolli, endogeeninen} / GAPDH-signaali_{kontrolli, endogeeninen})

Koimmunopresipitaatio: VPS18 – Kontrolli- ja GFP-Rab24-WT-solut (kuva 7A)

VPS18:n ilmentyminen = (VPS18-signaali / GAPDH-signaali) / (VPS18-signaali_{kontrolli} / GAPDH-signaali_{kontrolli})

Koimmunopresipitaatio: GM130 – Kontrolli- ja GFP-Rab24-WT-solut (kuva 7B)

GM130:n ilmentyminen = (GM130-signaali / GAPDH-signaali) / (GM130-signaali_{kontrolli} / GAPDH-signaali_{kontrolli})

Koimmunopresipitaatio: VPS18 – Kontrolli- ja GFP-Rab24-WT-solut, GTP- γ -S- ja GDP-käsittelyt (kuva 8A)

VPS18:n tai GFP-Rab24:n ilmentyminen = (VPS18- tai GFP-Rab24-signaali / GAPDH-signaali) / (VPS18- tai GFP-Rab24-signaali_{GFP-Rab24 GTP} / GAPDH-signaali_{GFP-Rab24 GTP})

Ko-IP VPS18 = (VPS18-signaali / GFP-Rab24-signaali) / (VPS18-signaali_{GFP-Rab24 GTP} / GFP-Rab24-signaali_{GFP-Rab24 GTP})

Koimmunopresipitaatio: VPS18 – Kontrolli-, GFP-Rab24-WT-, GFP-Rab24-Q38P- ja GFP-Rab24-S67L-solut (kuva 8B)

VPS18:n tai GFP-Rab24:n ilmentyminen = (VPS18- tai GFP-Rab24-signaali / GAPDH-signaali) / (VPS18- tai GFP-Rab24-signaali_{GFP-Rab24-WT} / GAPDH-signaali_{GFP-Rab24-WT})

Ko-IP VPS18 = (VPS18-signaali / GFP-Rab24-signaali) / (VPS18-signaali_{GFP-Rab24-WT} / GFP-Rab24-signaali_{GFP-Rab24-WT})

Liite 5: Duolink® PLA Fluorescence -määrityksen ohjeet

Valmistajan alkuperäiset englanninkieliset ohjeet (Sigma-Aldrich, Duolink® PLA Fluorescence Protocol):

1. Blocking

- a. Vortex the Duolink® Blocking Solution.
- b. Add 1 drop (~40 µL) of Duolink® Blocking Solution to each 1cm² sample. Be sure to cover the entire sample with Blocking Solution.
- c. Incubate the slides in a heated humidity chamber for 60 minutes at 37 °C.

2. Primary Antibody Incubation

NOTE: Do not allow the slide to dry before adding antibody as this can cause background.

- a. Vortex the Duolink® Antibody Diluent.
- b. Dilute your primary antibody or antibodies to suitable concentration in the Duolink® Antibody Diluent.
- c. Tap off the Duolink® Blocking Solution from the slides
- d. Add the primary antibody solution to each sample.
- e. Incubate the slides in a humidity chamber. Use the optimal incubation temperature and time for your primary antibodies.

3. Duolink® PLA Probe Incubation

- a. Vortex PLUS and MINUS PLA probes
- b. Dilute the PLUS and MINUS PLA probes 1:5 in the Duolink® Antibody Diluent.
 - *For a 40 µL reaction, take 8 µL of PLA probe MINUS stock, 8 µL of PLA probe PLUS stock and 24 µL of Antibody Diluent. Make sufficient solution for all samples.*
- c. Tap off the primary antibody solution from the slides
- d. Wash the slides 2x 5 minutes in 1x Wash Buffer A at room temperature.
- e. Tap off excess wash buffer and apply the PLA probe solution.
- f. Incubate the slides in a pre-heated humidity chamber for 1 hour at 37 °C.

4. Ligation

NOTE: Wait to add the ligase until immediately prior to addition to the sample. Make sure ligation buffer is completely thawed and mixed well prior to usage.

- a. Dilute the 5x Duolink® Ligation buffer 1:5 in high purity water and mix.
 - *For a 40 µL reaction, add 8 µL of the 5x Ligation buffer to 32 µL of high purity water. Make sufficient solution for all samples.*
- b. Tap off the PLA probe solution from the slides.
- c. Wash the slides 2x 5 minutes in 1x Wash Buffer A at room temperature.

- d. During the wash, retrieve the Ligase from the freezer using a freezer block (-20 °C).
- e. Add Ligase to the 1x Ligation buffer from step (a) at a 1:40 dilution and mix.
 - For 40 μL ligation solution, add 1 μL of Ligase to 39 μL of the 1x ligation buffer.
- f. Tap off excess wash buffer and apply the ligation solution.
- g. Incubate the slides in a pre-heated humidity chamber for 30 minutes at 37 °C.

5. Amplification

NOTE: Wait to add the polymerase until immediately prior to addition to the sample. The Amplification buffer is light-sensitive. Protect all solutions containing buffer from light.

- a. Dilute the 5x Amplification buffer 1:5 in high purity water and mix.
 - For 40 μL reaction, add 8 μL of the 5x Amplification buffer to 32 μL of high purity water. Make sufficient solution for all samples.
- b. Tap off the ligation solution from the slides.
- c. Wash the slides 2x 5 minutes in 1x Wash Buffer A at room temperature
- d. During the wash, retrieve the Polymerase from the freezer using a freezer block (-20 °C).
- e. Add Polymerase to the 1x Amplification buffer from step (a) at a 1:80 dilution and mix.
- f. Tap off excess wash buffer and apply the amplification solution.
- g. Incubate the slides in a pre-heated humidity chamber for 100 minutes at 37 °C.

6. Final Washes

NOTE: Light-sensitive reagents. Keep the slides protected from light at all times.

- a. Tap off the amplification solution from the slides.
- b. Wash the slides 2x 10 minutes in 1x Wash Buffer B at room temperature.
- c. Wash the slides in 0.01x Wash Buffer B for 1 minute.

7. Preparation for Imaging

NOTE: Duolink® In Situ Mounting Media with DAPI is aqueous and does not solidify. Clear nail polish can be used to seal the edges of the coverslip to the slide. Avoid getting air bubbles caught under the coverslip.

- a. Tap off excess wash buffer from the slides.
- b. Mount the slides with a coverslip using a minimal volume of Duolink® In Situ Mounting Medium with DAPI.
- c. Wait for 15 minutes before analyzing in a fluorescence or confocal microscope, using at least a 20x objective.
- d. After imaging, store the slides in the dark at 4 °C for up to 4 days or at -20 °C for up to 6 months