

# Embigiini - uusi fibronektiinireseptori

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Biokemia

maaliskuu 2018

Salli Keinänen

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

KEINÄNEN, SALLI: Embigiini - uusi fibronektiinireseptori

Pro gradu -tutkielma, 83 s.

Biokemia

maaliskuu 2018

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

---

Embigiini (GP-70, lyhenne EMB) on immunoglobuliinisuperperheeseen kuuluva solukalvon runsaasti glykosyloitu proteiini. Se löydettiin jo 1988, mutta sen toiminta on edelleen huonosti tunnettu. Se on luultavasti tärkeä proteiini alkionkehityksessä, koska se ilmenee voimakkaasti alkionkehityksen alkuvaiheessa. Se toimii avustajaproteiinina monokarboksylaattitransportteri-2-proteiinille (MCT2) ja saattaa voimistaa integriinivälitteistä soluadheesiota. Se saattaa liittyä solun kasvuun ja kehitykseen ja välittää solun ja solun ulkopuolisen matriksin välisiä vuorovaikutuksia, joten sillä voi olla merkittävä tehtävä soluadheesiossa.

Aiemmin ryhmässämme ihmisen embigiinin solun ulkopuolisen osan on havaittu sitoutuvan soluväliaineproteiineista erityisesti fibronektiiniin. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää embigiinin toimintaa fibronektiinireseptorina tutkimalla proteiinitasolla sen sitoutumismekanismeja fibronektiiniin ja solutasolla sen tehtävää soluadheesiossa luomalla ihmisen embigiinihiljennetty (EMB KO) solulinja. Embigiinin solun ulkopuolista osaa tuotettiin *Escherichia coli* -soluissa villityyppinä ja viitenä erilaisena mutaatioasettinä ja näiden sitoutumista fibronektiiniin tutkittiin EuLISA-kokeissa. Lisäksi embigiinin homofiilistä sitoutumista yritettiin tutkia Biacore-laitteella. Solutasolla embigiini yritettiin hiljennää ihmisen MG-63-osteosarkoomasoluista CRISPR/Cas9-menetelmällä. EMB KO -solujen embigiinitasoja tarkasteltiin kvantitatiivisella polymeerasiketjureaktiolla, western blot -menetelmällä (WB) sekä immunofluoresenssimikroskopiassa. Lisäksi niiden sitoutumista ja leviämistä fibronektiinille mitattiin xCELLigence-laitteella. Hiljennystä yritettiin myös DU145-eturauhassyöpäsoluista lentiviruksiin perustuvalla hiljennysmenetelmällä. Lisäksi useita eri embigiinivasta-aineita vertailtiin keskenään WB:ssa.

Embigiinin tarttuminen fibronektiiniin toistettiin onnistuneesti, mutta minkään fibronektiinisitoutumisessa tärkeäksi ajatellun kohdan mutatoiminen ei estänyt sitoutumista. Sitoutumismekanismi jäi vielä epäselväksi, mutta saadut tulokset auttavat sitoutumisen mallitusta tulevaisuudessa. Embigiini-embigiini-homofiilistä sitoutumista ei havaittu, mutta tämän tutkimus jäi vielä kesken. Solutasolla osa CRISPR/Cas9-hiljennetyistä soluista oli EMB KO heterotsygootteja (EMB<sup>+/-</sup>), mutta ei homotsygootteja (EMB<sup>-/-</sup>). EMB<sup>+/-</sup>-solut eivät eronneet villityyppin soluista, joten osittainen hiljennys ei ollut riittävä. Lentivirushiljennys ei onnistunut DU145-soluissa luultavasti teknisen ongelman vuoksi. Eri embigiinivasta-aineet erosivat toisistaan paljon ja suuri osa niistä saattaa olla epäspesifisiä. Hiiren embigiinivasta-aine vaikutti lupaavalta, ja siksi embigiinin tutkimuksessa ollaan siirtymässä hiirimalliin.

Asiasanat: embigiini, fibronektiini, soluväliaine, soluadheesio

*Kiitos prof. Jyrki Heinolle ja FT Kalle Sipilälle mielenkiintoisen projektin tarjoamisesta.  
Kiitos myös FT Maria Salmelalle, FT Jarmo Käpylälle, FT Johanna Jokiselle sekä muille  
integriini-tutkimusryhmän jäsenille ohjaamisesta ja tuesta projektin aikana.*

# Sisällys

<b>LYHENTEET</b> .....	<b>3</b>
<b>OSA I: KIRJALLISUUSKATSAUS</b> .....	<b>5</b>
<i>BASIGIINIPERHEEN PROTEIINIT SOLUADHEESIOSSA</i> .....	5
<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>6</b>
<b>2 SOLUADHEESIOMOLEKYYLIT</b> .....	<b>7</b>
2.1 SOLUADHEESIOMOLEKYYLIT OSALLISTUVAT SOLU-SOLU- JA SOLU-ECM-VUOROVAIKUTUKSIIN .....	7
2.2 SOLUADHEESIOMOLEKYYLIT VOIDAAN JAKAA NELJÄÄN RYHMÄÄN .....	7
2.2.1 <i>Immunoglobuliinisuperperhe</i> .....	8
2.2.2 <i>Integriinit</i> .....	8
2.2.3 <i>Kadheriinit</i> .....	9
2.2.4 <i>Selektiinit</i> .....	10
<b>3 SOLUVÄLIAINE</b> .....	<b>11</b>
3.1 SOLUVÄLIAINE ON DYNAAMINEN KOKONAISUUS .....	11
3.2 SOLUVÄLIAINE KOOSTUU MONISTA ERI MOLEKYYLEISTÄ .....	12
3.2.1 <i>Kollageenit</i> .....	12
3.2.2 <i>Proteoglykaanit ja glykosaminoglykaanit</i> .....	12
3.2.3 <i>Ei-kollageenimäiset glykoproteiinit</i> .....	13
3.2.4 <i>Elastiinit</i> .....	13
3.3 FIBRONEKTIINI.....	14
3.3.1 <i>Fibronektiini esiintyy monessa eri muodossa</i> .....	14
3.3.2 <i>Integriinit sitoutuvat fibronektiiniin</i> .....	15
3.3.3 <i>Fibronektiini tarttuu useisiin eri molekyyleihin soluväliaineessa</i> .....	16
3.3.4 <i>Fibronektiinisäikeiden muodostuminen on integriinien avustamaa</i> .....	16
<b>4 BASIGIINIPERHEEN PROTEIINIT</b> .....	<b>18</b>
4.1 BASIGIINI.....	19
4.1.1 <i>Basigiinin koko vaihtelee ja se esiintyy neljässä eri isomuodossa</i> .....	19
4.1.2 <i>Basigiini avustaa monokarboxylaattitransporttereita</i> .....	20
4.1.3 <i>Basigiini saattaa avustaa integriinien toimintaa</i> .....	21
4.1.4 <i>Basigiini indusoi matriksin metalloproteiinaasien tuottoa</i> .....	21
4.1.5 <i>Homo-oligomerisaatio ja glykosylaatio ovat tärkeitä basigiinin toiminnalle</i> .....	22
4.1.6 <i>Basigiinihiljennetyissä hiirissä on monia häiriöitä</i> .....	22
4.2 NEUROPLASTIINI.....	23
4.2.1 <i>Neuroplastiini esiintyy neljässä eri isomuodossa ja sen glykosylaatiotaso vaihtelee</i> .....	24
4.2.2 <i>Neuroplastiinit säätelevät synapsien rakennetta ja toimintaa</i> .....	24
4.2.3 <i>Neuroplastiinit toimivat avustavana proteiinina MCT2:lle</i> .....	25
4.2.4 <i>Neuroplastiinit saattavat liittyä kuulemiseen ja neurologisiin häiriöihin</i> .....	26
4.3 EMBIGIINI.....	27
4.3.1 <i>Embigiini on voimakkaasti glykosyloitu proteiini</i> .....	27
4.3.2 <i>Embigiini on luultavasti tärkeä proteiini alkionkehityksessä</i> .....	28
4.3.3 <i>Embigiini saattaa toimia avustavana proteiinina integriineille ja MCT2:lle</i> .....	29
4.3.4 <i>Embigiini saattaa liittyä solujen kasvuun ja erilaistumiseen</i> .....	30
4.3.5 <i>Embigiini voi liittyä hematopoiesin säätelyyn</i> .....	31
4.4 BASIGIINIPERHEEN PROTEIINEILLA ON YHTÄLÄISYYKSIÄ JA EROJA .....	32
4.4.1 <i>Kaikki basigiiniperheen jäsenet avustavat MCT-proteiineja</i> .....	32
4.4.2 <i>Basigiini ja embigiini voivat osallistua spermatogeneesin säätelyyn</i> .....	34
4.4.3 <i>Basigiiniperheen jäsenet saattavat liittyä syövän etenemisen säätelyyn</i> .....	34

4.4.4 Basigiiniperheen jäsenillä voi olla merkittävä tehtävä soluadheesiossa .....	36
<b>OSA II: KOKEELLINEN OSA.....</b>	<b>37</b>
<i>EMBIGIINI - UUSI FIBRONEKTIINI RESEPTORI.....</i>	37
<b>5 TYÖN TAVOITTEET .....</b>	<b>38</b>
<b>6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....</b>	<b>39</b>
6.1 PROTEIINITASON TUTKIMUKSET .....	39
6.1.1 Villityypin ja mutatoitujen embigiinien tuotto ja puhdistus.....	39
6.1.2 EMB-GST-proteiinien fibronektiiniin sitoutumisen tutkiminen EuLISA-kokeella .....	42
6.1.3 Embigiinin homofiilisen interaktion tutkiminen Biacorella .....	43
6.2 SOLUTASON TUTKIMUKSET .....	43
6.2.1 Käytetyt solulinjat.....	43
6.2.2 Embigiinin hiljennys CRISPR/Cas9-menetelmällä MG-63-soluista .....	44
6.2.3 Embigiinitasojen tarkistus hiljennetyistä MG-63-soluista.....	45
6.2.4 Solujen fibronektiinille sitoutumisen mittaaminen xCELLigence-laitteella .....	47
6.2.5 Embigiinihiljennyksen tarkistus PCR:llä ja sekvensoimalla .....	48
6.2.6 HDR-plasmidin pysymisen tarkistus CRISPR/Cas9-käsitellyistä MG-63-soluissa.....	49
6.2.7 Embigiinitasojen vertailu eri soluissa ja hiljennys lentivirusmenetelmällä .....	49
6.2.8 Embigiinivasta-aineiden testaus.....	50
<b>7 TULOKSET .....</b>	<b>52</b>
7.1 PROTEIINITASON TUTKIMUKSET .....	52
7.1.1 Tuotettujen EMB-GST-erien saanto ja toimivuus vaihtelevat .....	52
7.1.2 EMB-GST sitoutuu fibronektiiniin, mutta mutaatiot eivät estäneet sitoutumista ....	53
7.1.3 Embigiini-embigiini-sitoutumista ei havaittu Biacore-laitteella .....	53
7.2 SOLUTASON TUTKIMUKSET .....	55
7.2.1 Embigiini hiljennettiin MG-63-soluista CRISPR/Cas9-tekniikalla .....	55
7.2.2 MG-63 EMB KO -solut eivät eronneet villityypistä.....	58
7.2.3 Osa hiljennetyistä MG-63-soluista oli EMB KO heterotsygootteja .....	60
7.2.4 CRISPR/Cas9-hiljennyksessä EMB-geenistä poistuu 98 emäsparin pituinen pätkä ..	61
7.2.5 Embigiinihiljennetyissä soluissa ei ollut enää merkkejä HDR-plasmidista.....	62
7.2.6 Toisella CRISPR/Cas9-hiljennysyrityksellä ei saatu EMB KO -homotsygoottisoluja ..	62
7.2.7 Lentivirushiljennys ei toiminut .....	64
7.2.8 Embigiinivasta-aineet eroavat paljon toisistaan .....	68
<b>8 TULOSTEN TARKASTELU.....</b>	<b>71</b>
8.1 PROTEIINITASON TUTKIMUKSET .....	71
8.1.1 EMB-GST-proteiinin tuotto on haastavaa.....	71
8.1.2 Embigiini sitoutuu fibronektiiniin mutta sitoutumismekanismi on vielä epäselvä....	72
8.1.3 Embigiinin homofiilisestä interaktiosta ei ole varmuutta .....	74
8.2 SOLUTASON TUTKIMUKSET .....	75
8.2.1 Embigiini hiljennettiin MG-63-soluista osittain .....	75
8.2.2 Lentivirushiljennyksessä oli teknisiä ongelmia.....	78
8.2.3 Ihmisen embigiinivasta-aineiden toimivuudesta ei ole varmuutta.....	80
8.2.4 Seuraavaksi embigiinin tutkimuksessa siirrytään hiirimalliin .....	82
<b>9 YHTEENVETO .....</b>	<b>83</b>
<b>LÄHTEET .....</b>	<b>84</b>

## Lyhenteet

<u>Lyhenne</u>	<u>Suomeksi</u>	<u>Englanniksi</u>
bp	emäspari	base pair
BSA	naudan seerumin albumiini	bovine serum albumin
BSG	basigiini	basigin
CAM	soluuhdeesiomolekyyli	cell adhesion molecule
cDNA	komplementaarinen DNA	complementary DNA
cFN	solun fibronectiini	cellular FN
DMSO	dimetyylisulfoksidi	dimethyl sulfoxide
DTT	ditiotreitoli	dithiothreitol
ECM	soluväliaine	extracellular matrix
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo	ethylenediaminetetraacetic acid
EMB	embigiini (ihminen)	embigin (human)
Emb	embigiini (hiiri)	embigin (mouse)
EMB <sup>+/-</sup>	EMB KO heterotsygootti	EMB KO heterozygote
EMB <sup>-/-</sup>	EMB KO homotsygootti	EMB KO homozygote
EuLISA	europium-välitteinen immunosorbenttimääritys	europium-linked immunosorbent assay
FACS	fluoresenssi-aktivoitu solulajittelu	fluorescence-activated cell sorting
FCS	naudan sikiön seerumi	fetal calf serum
FGF	fibroblastikasvutekijä	fibroblast growth factor
FN	fibronectiini	fibronectin
GAG	glykosaminoglykaani	glycosaminoglycan
GAPDH	glyseraldehydi-3-fosfaatti- dehydrogenaasi	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	vihreä fluoresoiva proteiini	green fluorescent protein
GST	glutationi S-transferaasi	glutathione S-transferase
HBS	hepes-puskuroitu suolaliuos	hepes buffered saline
HDR	homologiaan perustuva korjaus	homology directed repair

HSPC	hematopoieettinen kanta/ esisolu	hematopoietic stem/ progenitor cell
IF	immunofluoresenssi	immunofluorescence
Ig-I	Ig-kaltainen	Ig-like
IgSF	immunoglobuliinisuperperhe	immunoglobulin superfamily
IHC	sisempi karvasolu	inner hair cell
IPTG	isopropyli- $\beta$ -D-tiogalaktosidi	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
KO	hiljennetty	knockout
MCT	monokarboksylaattitransportteri	monocarboxylate transporter
MMP	matriksin metalloproteinaasi	matrix metalloproteinase
mRNA	lähetti-RNA	messenger RNA
NCAM	hermosoluadheesiomolekyyl	neural cell adhesion molecule
OHC	ulompi karvasolu	outer hair cell
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos	phosphate buffered saline
PCR	polymeraasiketjureaktio	polymerase chain reaction
pFN	plasmafibronektiini	plasma FN
qPCR	kvantitatiivinen PCR	quantitative PCR
RFP	punainen fluoresoiva proteiini	red fluorescent protein
RPE	verkkokalvon pigmenttiepiteeli	retinal pigment epithelium
RT	huoneenlämpö	room temperature
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti- polyakryyliamidigeeli- elektroforeesi	sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA	pieni hiuspinni-RNA	short hairpin RNA
TBS	tris-puskuroitu suolaliuos	tris-buffered saline
TBST	TBS + tween 20	TBS + tween 20
WB	western blot	western blot
WT	vilityyppi	wild type

# **Osa I: Kirjallisuuskatsaus**

*Basigiiniperheen proteiinit soluadheesiossa*



## 1 JOHDANTO

Soluadheesio tarkoittaa solujen kykyä tarttua toiseen soluun tai soluväliaineeseen (*engl.* extracellular matrix, ECM), mikä tapahtuu solukalvon soluadheesiomolekyylin (*engl.* cell adhesion molecule, CAM) välityksellä ja on välttämätöntä monisolujen rakenteiden ylläpidossa. Se mahdollistaa solujen liittämisen toisiinsa eri tavoin ja liittyy solujen väliseen signaalinvälitykseen. (katsausartikkelissa Albelda ja Buck 1990.)

Soluadheesio on tärkeää solun kasvun, erilaistumisen, liikkumisen ja selviytymisen kannalta. Se on siis tärkeää solujen välisessä kommunikoinnissa ja säätelyssä, erityisesti kudosten kehittämisessä ja ylläpidossa. Solujen ja soluväliaineen väliset mekaaniset vuorovaikutukset voivat vaikuttaa solujen käyttäytymiseen ja toimintaan. Muutokset soluadheesiossa voivat olla ratkaisevia tekijöitä monissa sairauksissa, kuten syövässä, nivelreumassa, osteoporoosissa ja ateroskleroosissa. (katsausartikkelissa Khalili ja Ahmad 2015.) Esimerkiksi syöpien edetessä pahanlaatuisiksi solujen välinen adheesio yleensä vähenee. (katsausartikkelissa Hirohashi ja Kanai 2003.)

Basigiiniperheen proteiinit kuuluvat immunoglobuliinisuperperheen (*engl.* immunoglobulin superfamily, IgSF) soluadheesiomolekyyleihin. Koska monilla IgSF-perheen proteiineilla on tärkeä tehtävä solun eri toiminnoissa, kuten solujen adheesiossa, erilaistumisessa ja signaalien välityksessä, myös basigiiniperheen jäsenillä saattaa olla merkittävä tehtävä näissä. (Miyachi ja muut 1991; Huang ja muut 1993.)

## 2 SOLUADHEESIOMOLEKYYLIT

Soluadheesiomolekyylit ovat solukalvon proteiineja, jotka sitoutuvat toisiin soluihin tai soluväliaineeseen. Ne siis välittävät solu-solu- tai solu-ECM-vuorovaikutuksia, ja tätä kautta ne voivat laukaista suuren määrän erilaisia solunsisäisiä vasteita, jotka vaikuttavat solunsisäiseen signaalointiin, soluntukirangan järjestäytymiseen ja/tai geenien ilmentymiseen. Ne ovat siis tärkeä linkki solun ulkopuolisen ympäristön ja solunsisäisten signaalireittien välillä. Ne liittyvät moniin solun prosesseihin, kuten alkionkehitykseen, solun kasvuun, apoptoosiin ja erilaistumiseen. (katsausartikkeleissa Albelda ja Buck 1990.)

### 2.1 Soluadheesiomolekyylit osallistuvat solu-solu- ja solu-ECM-vuorovaikutuksiin

Soluadheesiomolekyylit ovat tyypillisesti solukalvon läpäiseviä reseptoreita ja ne koostuvat kolmesta domeenista: solun sisäisestä domeenista, joka voi olla vuorovaikutuksessa solun tukirangan kanssa, solukalvon läpäisevästä domeenista ja solun ulkopuolisesta domeenista, joka voi olla vuorovaikutuksessa samanlaisten soluadheesiomolekyylien kanssa homofiilisesti tai toisten soluadheesiomolekyylien tai soluväliaineen kanssa heterofiilisesti. Solut käyttävät yleensä useita eri Soluadheesiomolekyyliä kiinnittyäkseen muihin soluihin ja soluväliaineeseen. Soluadheesiomolekyylit voivat puolestaan kiinnittyä solun sisäiseen tukirankaan erilaisten välittäjäproteiinien avulla. Solujen välisen sitoutumisen voimakkuus riippuu siis monesta eri tekijästä. (katsausartikkeleissa Albelda ja Buck 1990; Gumbiner 1996.)

### 2.2 Soluadheesiomolekyylit voidaan jakaa neljään ryhmään

Suurin osa soluadheesiomolekyyleistä kuuluu johonkin seuraavista neljästä ryhmästä: immunoglobuliinisuperperheeseen, integriineihin, kadheriineihin tai selektiineihin. Integriinit osallistuvat lähinnä solun ja soluväliaineen välisiin vuorovaikutuksiin, kun taas muiden perheiden molekyylit osallistuvat pääasiassa solu-solu-vuorovaikutuksiin. (katsausartikkelissa Albelda ja Buck 1990.)

### 2.2.1 Immunoglobuliinisuperperhe

Immunoglobuliinisuperperhe koostuu suuresta määrästä solukalvon proteiineja, joilla on monia biologisia tehtäviä. Ne välittävät solu-solu-vuorovaikutuksia erityisesti alkionkehityksessä, haavan paranemisessa ja immuunipuolustuksessa. Monet niistä osallistuvat sekä homofiilisiin että heterofiilisiin solu-solu-vuorovaikutuksiin, ja niiden toiminta on kalsiumista riippumatonta. (katsausartikkelissa Huang ja muut 1997.)

IgSF-perheen proteiineja yhdistää Ig-kaltaisten (*engl.* Ig-like, Ig-I) domeenien esiintyminen niiden solun ulkopuolisessa rakenteessa (katsausartikkelissa Huang ja muut 1997). Ig-I-domeenit voidaan luokitella seuraaviin tyyppeihin: IgV (variable), IgC1 (constant 1), IgC2 (constant 2) tai IgI (intermediate). Suurin osa Ig-domeeneista on IgV- tai IgC-tyyppisiä. (katsausartikkelissa Chothia ja Jones 1997.)

### 2.2.2 Integriinit

Integriinit ovat ryhmä rakenteeltaan ja toiminnaltaan samankaltaisia solukalvon reseptoreita, jotka toimivat soluväliaineen ja solun sisäisen tukirangan välisenä linkkinä ja osallistuvat tiettyihin solu-solu-vuorovaikutuksiin. Ne ovat rakenteeltaan heterodimeerejä ja ne koostuvat erityyppisistä  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alayksikoista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa ei-kovalenttisin sidoksien.  $\alpha$ -alayksikköjä on löydetty 18 ja  $\beta$ -alayksikköjä 8 erilaista, ja nämä alayksiköt voivat muodostaa yhteensä 24 eri integriiniyhdistelmää. Eri  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alayksikköjen yhdistelmät määrittävät integriinin spesifisyyden solun ulkopuolisille ligandeille ja myös solun sisäisille signaalitapahtumille. (katsausartikkeleissa Johansson ja muut 1997; Barczyk ja muut 2010.)

Integriinit voivat esiintyä aktiivisessa tai inaktiivisessa muodossa, joita säätelevät solunsisäiset ja solunulkoiset signaalit, jotka puolestaan säätelevät integriinien vuorovaikutusta solun ulkopuolisten ligandien tai solun sisäisen tukirangan kanssa (katsausartikkelissa Barczyk ja muut 2010). Integriinien toiminta on divalenteista kationeista riippuvaista. Magnesiumilla ja mangaanilla on toimintaa aktivoiva vaikutus, kun taas kalsiumioneilla on aktivoitumista estävä vaikutus. (Tiwari ja muut 2011.)

Suurin osa integriineistä osallistuu solu-ECM-vuorovaikutuksiin, osa solu-solu-vuorovaikutuksiin ja muutama niistä osallistuu molempiin (katsausartikkelissa Johansson ja muut 1997). Ne sitoutuvat soluväliaineessa esimerkiksi kollageeniin, fibronektiiniin, fibrinogeeniin, laminiiniin ja vitronektiiniin. Osa integriineistä tunnistaa kolmen aminohapon muodostaman RGD-jakson (Arg-Gly-Asp), joka on tärkeä tunnistuskohta monien proteiinien rakenteessa, esimerkiksi fibronektiinissa. Kollageeniin sitoutuvat integriinit puolestaan tunnistavat GFOGER-sekvenssin kollageenin kolmoisjuosterakenteessa. Monet integriineistä pystyvät sitoutumaan useisiin eri ligandeihin. (katsausartikkelissa Barczyk ja muut 2010.)

### *2.2.3 Kadheriinit*

Kadheriinit ovat kalsiumista riippuvaisia glykoproteiineja. Ne osallistuvat solujen välisten kiinteiden liitosten muodostamiseen. Solu-solu-adheesiossa kadheriinit dimerisoituvat ja sitoutuvat homofiilisesti toisen solukalvon kadheriineihin. Dimerisaatio ja adheesio ovat kalsiumista riippuvaisia. Kun kalsiumia ei ole saatavilla, kadheriini esiintyy monomeerinä ja se ei pysty muodostamaan adheesiokomplekseja. (katsausartikkelissa Chothia ja Jones 1997.)

Korkeammassa eliössä on useita kadheriinityyppejä, kuten epiteliaalisia E-kadheriineja ja neuraalisia N-kadheriineja. Eri kadheriinityypit antavat soluille tiettyjä soluadheesio-ominaisuuksia ja monet solutyypit ilmentävät näiden erilaisia yhdistelmiä. Lähes kaikissa kadheriinityypeissä on viisi homologista solun ulkopuolista domeenia, yksinkertainen solukalvon läpäisevä osio sekä sytoplasmisen alue, joka voi olla ankkuroituneena solun tukirangan säikeisiin proteiineihin. (katsausartikkelissa Chothia ja Jones 1997.)

#### 2.2.4 Selektiinit

Selektiinit ovat perhe heterofiilisesti sitoutuvia soluadheesiomolekyylejä, jotka tunnistavat ja sitoutuvat toisten solujen pinnalla esiintyviin oligosakkarideihin. Ne ovat yksijuosteisia solukalvon läpäiseviä glykoproteiineja, joilla on lektiini-glykoproteiinien kaltaisia ominaisuuksia. Ne muodostavat kolme ryhmää: L-, P- ja E-selektiinit. L-selektiinit ilmentyvät veren leukosyyteissä, P-selektiinit verihiutaleissa ja E- ja P-selektiinit endoteelisoluissa. Ne välittävät solu-solu-vuorovaikutuksia muun muassa veren leukosyyttien ja verisuonten seinämien välillä kudosten vaurioissa ja tulehduksessa. (katsausartikkelissa Tedder ja muut 1995.)

Selektiinit koostuvat suuresta solun ulkopuolisesta domeenista, yksinkertaisesta solukalvon läpäisevästä osasta ja niillä on lyhyt sytoplasminen häntä. Niiden solun ulkopuolisessa domeenissa on N-terminaalinen lektiinidomeeni, jonka avulla ne voivat sitoutua tiettyihin sokerirakenteisiin toisissa molekyyleissä. Sitoutuminen on kalsiumista riippuvaista. (katsausartikkelissa Tedder ja muut 1995.)

### 3 SOLUVÄLIAINE

Soluväliaine koostuu solun ulkopuolisista molekyyleistä, jotka antavat mekaanista tukea soluille ja kudoksille ja täyttävät niiden välisen tilan. Soluväliaine tarjoaa myös biokemiallisia ja biomekaanisia tarttumispintoja solujen erilaistumiselle, kudosten muokkaukselle ja homeostaasille. (katsausartikkelissa Frantz ja muut 2010.) Soluväliaine on monimutkainen ja dynaaminen kokonaisuus, joka on tärkeä normaalille kudosten kehitykselle ja fysiologialle. Soluväliaine välittää solujen välisiä viestejä, ja se voi vaikuttaa solujen signaalireittien säätelyyn ja siten se voi säädellä geenien ilmentymistä. Soluväliaineen komponenteilla onkin keskeinen tehtävä solujen kasvun, erilaistumisen, selviytymisen ja apoptoosin säätelyssä. Sillä on myös erityisen tärkeä tehtävä alkionkehityksessä. (katsausartikkelissa Goody ja Henry 2010.)

#### 3.1 Soluväliaine on dynaaminen kokonaisuus

Soluväliaine toimii solujen tarttumispintana ja tukena. Sen molekyylien ominaisuudet määrittävät myös kudosten fysikaalisia ominaisuuksia, kuten elastisuutta ja vetolujuutta. Soluväliaine ei ainoastaan tarjoa kolmiulotteista rakennetta soluadheesiolle ja solujen liikkumiselle vaan se myös toimii varastona signaalintimolekyyleille. Se on hyvin dynaaminen kokonaisuus, jota muokataan jatkuvasti entsyymaattisesti tai ei-entsyymaattisesti, ja sen komponentit ovat alttiita lukuisille translaation jälkeisille muokkauksille. Kudosten soluväliaineen koostumus voi muuttua paljon alkionkehityksen lisäksi ikääntymisessä ja eri sairauksissa. (katsausartikkelissa Goody ja Henry 2010.)

Proteinaasit vastaavat soluväliaineen dynaamisesta muokkauksesta (katsausartikkelissa Goody ja Henry 2010). Esimerkiksi matriksin metalloproteinaasit (engl. matrix metalloproteinase, MMP) ovat ryhmä  $Zn^{2+}$ -riippuvaisia endopeptidaaseja, joilla on kyky hajottaa adheesiomolekyylejä solukalvolla ja soluväliaineessa. Niillä on merkittävä tehtävä monissa sairauksissa, kuten syövän metastaasissa. Soluväliaineen synteesin ja kokoamisen ja MMP-välitteisen hajoamisen välisellä tasapainolla on tärkeä tehtävä alkionkehityksessä ja kudosten homeostaasissa. (katsausartikkelissa Matrisian 1990.)

### 3.2 Soluväliaine koostuu monista eri molekyyleistä

Soluväliaine koostuu solujen ympärilleen tuottamista molekyyleistä. Sen molekyylijä tuottavat sitä ympäröivät solut, kuten fibroblastit. Se koostuu pääasiassa vedestä, proteiineista ja polysakkarideista. Kuitenkin jokaisella kudoksella on koostumukseltaan ja fysikaalisiltaan ja biokemiallisilta ominaisuuksiltaan uniikki soluväliaine. (katsausartikkelissa Frantz ja muut 2010.) Soluväliaineen yleisimmät proteiinit voidaan jakaa kollageeneihin, proteoglykaaneihin, ei-kollageenimäisiin glykoproteiineihin ja elastiineihin (katsausartikkelissa Goody ja Henry 2010).

#### 3.2.1 Kollageenit

Kollageenit ovat yleisin proteiini soluväliaineessa. Ne muodostavat säikeisiä ja pallomaisia glykoproteiinirakenteita ja vastaavat kudoksen vetolujuudesta. Kollageeneja esiintyy selkärankaisissa eliöissä ainakin 28 erilaista (I-XXVIII). Kollageenit voidaan jakaa useisiin eri ryhmiin niiden muodostaman rakenteen mukaan: säikeisiin (tyypit I, II, III, V ja XI), FACIT- (tyypit IX, XII, XIV, XVI, XIX ja XXI), verkostoja muodostaviin (tyypit IV, VIII ja X), solukalvon läpäiseviin (tyypit XIII, XVII ja XXV), endostatiineja tuottaviin (tyypit XV ja XVIII), ankkuroivia säikeitä muodostaviin (tyyppi VII) ja helminauhamaisia säikeitä muodostaviin (tyyppi VI) kollageeneihin. Esimerkiksi tyyppin I kollageeni on näistä muodoista yleisin, se koostuu kolmesta  $\alpha$  -juosteesta ja muodostaa kollageenisäikeitä. Tyyppin IV kollageeni puolestaan esiintyy tyvikalvossa ja se muodostaa verkkomaisia rakenteita. (katsausartikkelissa Kadler ja muut 2007.)

#### 3.2.2 Proteoglykaanit ja glykosaminoglykaanit

Proteoglykaanit ovat korkeasti glykosyloituja proteiineja, ja ne muodostuvat ydinproteiinista, johon on liittynyt kovalenttisesti yksi tai useampi glykosaminoglykaaniketju (*engl.* glycosaminoglycan, GAG). GAG-molekyylit ovat pitkäketjuisia haarautumattomia polysakkarideja. Proteoglykaanit ovat negatiivisesti varautuneita, mikä houkuttelee positiivisesti varautuneita kationeja, jotka puolestaan vetävät puoleensa vesimolekyylijä. Proteoglykaanit huolehtivat soluväliaineen ja sen läheisten solujen kosteudesta ja siten vastustavat puristuksesta aiheutuvia voimia. (katsausartikkelissa Goody ja Henry 2010.)

Soluväliaineessa esiintyy useita erilaisia proteoglykaaneja, joiden tehtävät poikkeavat toisistaan. Niiden erilaisuus johtuu niiden erilaisista ydinproteiineista ja erilaisista GAG-ketjuista sekä näiden lukumäärästä ja pituudesta. Joissakin näissä proteoglykaaneissa on vain yksi GAG-ketju, kuten dekoriinissa, kun taas joissakin on yli 100 GAG-ketjua, esimerkiksi aggregaanissa. (katsausartikkelissa Iozzo ja Schaefer 2015.)

Soluväliaineen suurimolekyylinen GAG-molekyyli, hyaluronaani, huolehtii myös kudosten kosteudesta ja vastustaa puristuksesta aiheutuvia voimia. Se ei poikkeuksellisesti muodosta proteoglykaaneja, toisin kuin monet muut GAG-molekyylit, vaan se muodostaa ei-kovalenttisesti sitoutuneita komplekseja soluväliaineen proteoglykaanien kanssa. (katsausartikkelissa Vigetti ja muut 2014.)

### *3.2.3 Ei-kollageenimäiset glykoproteiinit*

Soluväliaineen ei-kollageenimäisiin glykoproteiineihin kuuluvat laminiini ja fibronectiini (katsausartikkelissa Goody ja Henry 2010). Laminiinit ovat verkkomaisia rakenteita muodostavia proteiineja. Ne ovat tärkeä osa tyvikalvoa tyypin IV kollageenin lisäksi ja ne vaikuttavat solujen erilaistumiseen, migraatioon ja adheesioon. Ne koostuvat  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -heterotrimeerisistä ketjuista, jotka muodostavat ristimäisen rakenteen, joka voi sitoutua solukalvon tai soluväliaineen molekyyliin. Soluväliaineen komponenteista laminiinit sitoutuvat toisiin laminiineihin tai esimerkiksi kollageeniin. (katsausartikkelissa Miner 2008.) Fibronectiinista kerrotaan kappaleessa 3.3.

### *3.2.4 Elastiinit*

Elastiini on erittäin kestävä ja liukenematon proteiini soluväliaineessa, ja se muodostuu sen esiastemuotojen, tropoelastiinien, yhdistyessä toisiinsa verkkomaisiksi kuiduiksi (katsausartikkelissa Mithieux ja Weiss 2005). Elastini on hyvin joustava proteiini, joka lisää kudosten kimmoisuutta. Se siis mahdollistaa monien kudosten palaamisen niiden alkuperäiseen muotoon näiden venymisen tai kokoon puristumisen jälkeen. (katsausartikkelissa Goody ja Henry 2010.) Elastini yhdistyy kollageeneihin, jotka rajoittavat sen venymistä. Lisäksi elastiinikuituja peittää mikrofibrilli-glykoproteiinit, pääasiassa fibrilliinit, jotka ovat tärkeitä sen eheydelle. (katsausartikkelissa Frantz ja muut 2010.)



### 3.3 Fibronektiini

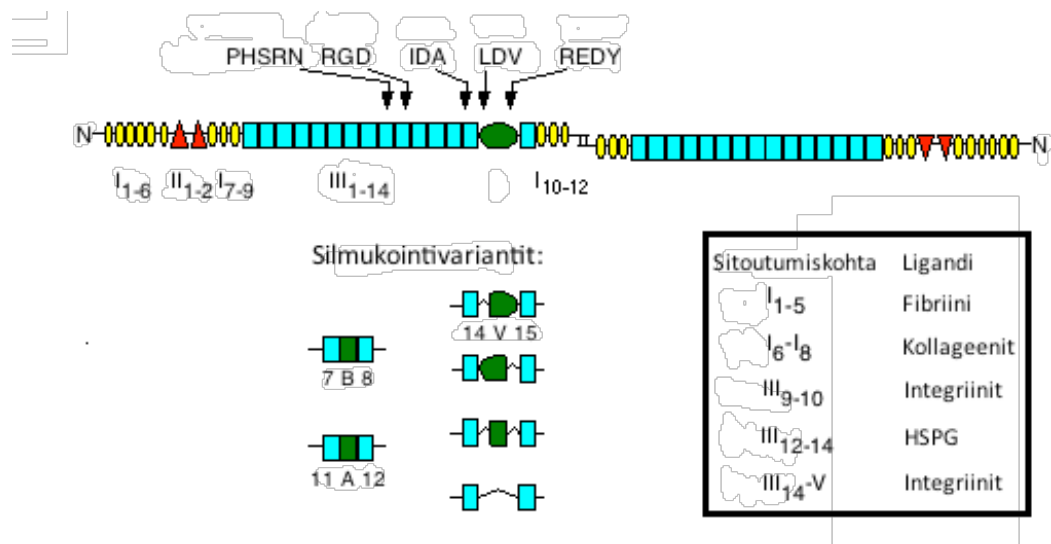
Fibronektiini (*engl.* fibronectin, FN) on suuri soluväliaineen glykoproteiini, jonka avulla solut voivat tarttua soluväliaineeseen. Se välittää monia solun ja soluväliaineen välisiä vuorovaikutuksia ja sillä on tärkeä tehtävä soluadheesiossa, migraatiossa, kasvussa ja erilaistumisessa ja myös esimerkiksi haavan paranemisessa. (katsausartikkelissa Pankov ja Yamada 2002.) Erytisen tärkeä tehtävä fibronektiinilla on selkärankaisten eliöiden alkionkehityksessä (George ja muut 1993). Lisäksi sen muuttunut toiminta on yhdistetty moniin eri sairauksiin, kuten syöpään (katsausartikkelissa Ruoslahti 1984).

#### 3.3.1 Fibronektiini esiintyy monessa eri muodossa

Fibronektiini esiintyy yleensä dimeerinä, joka tyypillisesti koostuu kahdesta lähes identtisestä 230-270 kDa kokoisesta monomeeristä, jotka ovat liittyneet toisiinsa disulfidididoksin C-terminaaliseen päästään. Kumpikin monomeeri koostuu kolmesta erityyppisestä fibronektiinimoduulista (tyyppi I, II ja III), jotka vuorottelevat fibronektiinin rakenteessa. Fibronektiinimonomeeri voi sisältää 12 tyyppin I moduulia, kaksi tyyppin II moduulia ja 15-17 tyyppin III moduulia, ja nämä toistot muodostavat yhdessä 90 % fibronektiinin sekvenssistä. (katsausartikkelissa Pankov ja Yamada 2002.) Kuvassa 1 on esitetty fibronektiinin rakenne ja sen merkittävimmät sitoutumiskohtat sekä osa sen silmukointivarianteista.

Fibronektiinilla on monia vaihtoehtoisesta silmukoinnista johtuvia isomuotoja, ja ihmisessä niitä on jopa 20 erilaista. Fibronektiini esiintyy liukoisena plasmafibronektiinina (*engl.* plasma FN, pFN) ja vähemmän liukoisena solun fibronektiinina (*engl.* cellular FN, cFN). pFN on veren plasman merkittävä komponentti, ja cFN on soluväliaineen tärkeä komponentti. pFN:llä on vain vähän eri isomuotoja, kun taas cFN-isomuotoja on enemmän ja ne ovat solutyypin- ja lajispesifiä. Fibronektiini-isomuodoilla on erilaisia ominaisuuksia, esimerkiksi ne voivat erota sitoutumisominaisuuksiltaan eri ligandeihin. Eri fibronektiinimuotojen avulla solut voivat muuttaa soluväliaineen koostumusta kudospohtaisesti. (katsausartikkelissa Pankov ja Yamada 2002.)

Fibronectiinin rakenteesta on solutyypistä riippuen 4-9 % sokerirakenteita. Glykosylaatiokohdat sijaitsevat pääasiassa tyyppin III toistoissa ja kollageenia sitovissa domeeneissa. Hiilihydraatit ovat sitoutuneet sekä *N*- että *O*-tyypin sidoksin. Ne luultavasti stabiloivat sen rakennetta hydrolyysiä vastaan ja säätelevät sen affiniteettia joihinkin sitoutumiskohteisiin. (katsausartikkelissa Pankov ja Yamada 2002).



**Kuva 1. Plasmafibronektiinin rakenne.** Fibronectiini esiintyy yleensä dimeerinä, joka koostuu kahdesta lähes identtisestä monomeeristä, jotka ovat liittyneet toisiinsa disulfididoksin C-terminaaliseen päästään. Rakenteessa vuorottelevat kolmentyyppiset fibronectiinimoduulit (I, II ja III). Toiseen monomeereistä on merkitty nuolilla tärkeimpiä integriinien sitoutumiskohtia. Kuvassa on esitettyä osa vaihtoehtoisista silmukointieksoneista (IIIA, IIIB ja IIIV), jotka voivat esiintyä joko vain toisessa tai molemmissa monomeereissä. Lisäksi laatikossa on esitetty merkittävimmät integriinien ja soluväliaineen molekyylien sitoutumisalueet fibronectiinin rakenteessa. (muokattu katsausartikkelin Johansson ja muut 1997 kuvasta)

### 3.3.2 Integriinit sitoutuvat fibronectiiniin

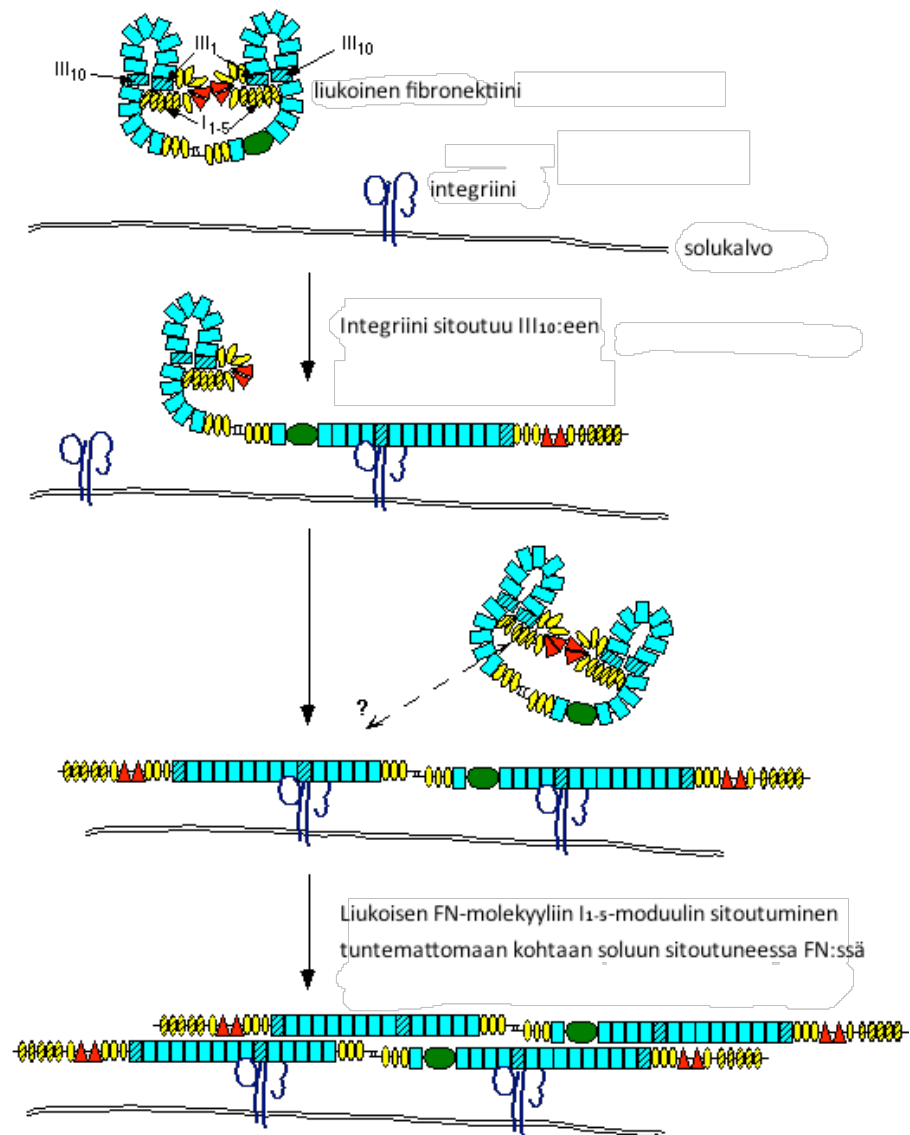
Solukalvon reseptorit voivat tarttua useisiin kohtiin fibronectiinin rakenteessa, joista tärkein on RGD-jakso, joka sijaitsee III<sub>10</sub>-domeenissa (kuva 1). Fibronectiini toimii useiden eri integriinien ligandina. Esimerkiksi  $\alpha 5 \beta 1$ -integriini sitoutuu pääasiassa fibronectiinin RGD-sekvenssiin, ja sillä on myös muita sitoutumiskohteita tämän rakenteessa. Fibronectiinin rakenteessa on myös muita eri integriinityyppien sitoutumiskohtia, jotka voivat aiheuttaa erilaisia vasteita soluissa tai niiden adheesiossa. (katsausartikkeleissa Johansson ja muut 1997; Pankov ja Yamada 2002.)

### *3.3.3 Fibronektiini tarttuu useisiin eri molekyylihin soluväliaineessa*

Fibronektiini sitoutuu useisiin soluväliaineen komponentteihin, ja se välittää näiden sitoutumista solukalvon integriineihin. Fibronektiinin rakenteessa on kaksi tärkeää hepariinia sitovaa domeenia, joihin heparaanisulfaatti-proteoglykaanit voivat sitoutua. Domeeneista voimakkaampi sijaitsee C-terminaalisessa päässä ja heikompi sijaitsee N-terminaalisessa päässä, ja nämä domeenit sitovat myös muita proteoglykaaneja. Kollageenia sitovia alueita on fibronektiinin domeeneissa I<sub>6-9</sub> ja II<sub>1-2</sub>, ja ne sitovat voimakkaammin yksijuosteista denaturoitua kollageenia kuin natiivia kollageenia. Fibronektiini saattaa siis sitoutua pääasiassa kollageenin triplajuosteen avautuneisiin kohtiin. Rakenteessa on myös fibriiniä sitovat kohdat sekä C-terminaalisessa että N-terminaalisessa päässä. Fibronektiinin sitoutuminen fibriiniin on tärkeää esimerkiksi solujen migraatiossa fibriinihyttymiksi haavan paranemisen yhteydessä. (katsausartikkelissa Pankov ja Yamada 2002.)

### *3.3.4 Fibronektiinisäikeiden muodostuminen on integriinien avustamaa*

Monet solut tuottavat fibronektiinia liukoisessa muodossa, josta voi muodostua liukenemattomia fibronektiinisäikeitä, jotka pääasiassa vastaavat fibronektiinin aktiivisuudesta (katsausartikkelissa Pankov ja Yamada 2002). Liukoisen fibronektiinin rakenne on kompaktissa kiertyneessä muodossa, ja fibronektiinisäikeiden muodostuessa tämä rakenne oikenee. (katsausartikkelissa Johansson ja muut 1997.) Useat eri alueet fibronektiinin rakenteessa osallistuvat säikeiden muodostukseen (kuva 2). Liukoinen fibronektiini voi sitoutua solun pinnalle integriinien, esimerkiksi  $\alpha 5\beta 1$ :n, välityksellä. Integriinit sitoutuvat fibronektiinin III<sub>10</sub>-domeenin RGD-sekvenssiin ja tätä voimistaviin alueisiin, jolloin fibronektiinimolekyylissä tapahtuu konformaatiomuutos, ja sen rakenne suoristuu. Samalla fibronektiinin rakenteessa paljastuu sitoutumiskohtia, joihin toisen fibronektiinimolekyylin I<sub>1-5</sub>-domeeni voi sitoutua. Tämä puolestaan mahdollistaa toisten fibronektiinimolekyylien suoristumisen ja sitoutumisen muodostuvaan fibronektiini-säikeeseen. Fibronektiinin suoristumisessa on luultavasti mukana myös muita avustavia proteiineja. (katsausartikkeleissa Johansson ja muut 1997; Mao ja Schwarzbauer 2005.)

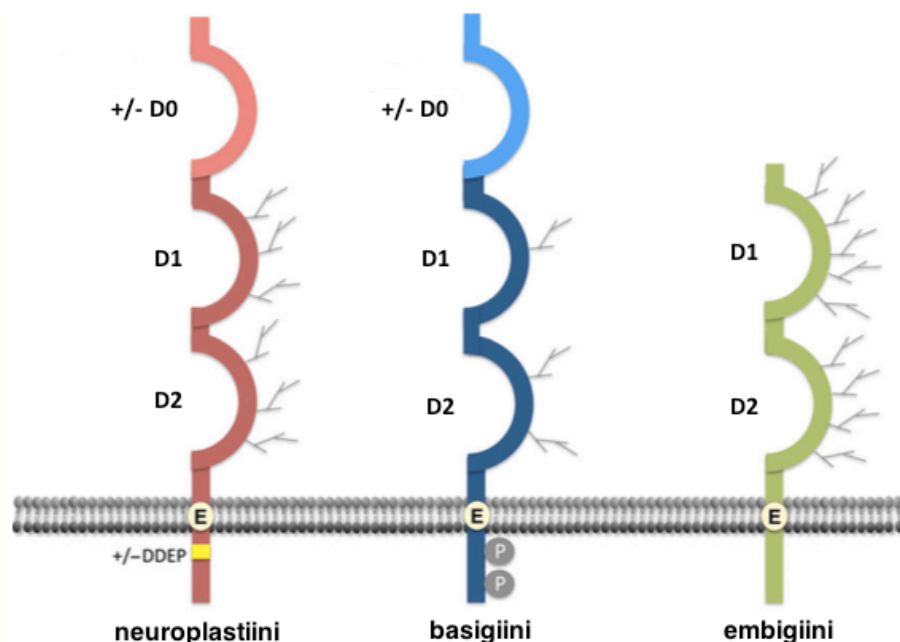


**Kuva 2. Fibronektiinisäikeiden muodostuminen.** Malli fibronektiinisäikeiden muodostumisen alusta, joka on integriiniä avustavaa. Lisäksi jotkin tuntemattomat proteiinit voi avustaa säikeiden muodostumista. Liukoinen fibronektiinimolekyylit voi sitoutua solun pinnalle III<sub>10</sub>-domeeniin RDG-jaksoon sitoutuvien integriiniä välityksellä. Sitoutumisen aiheuttaman konformaatiomuutoksen myötä sen rakenne suoristuu ja samalla rakenteessa paljastuu sitoutumiskohtia, joihin toisen fibronektiinimolekyylin I<sub>1-5</sub>-domeeni voi sitoutua. Tämä puolestaan mahdollistaa seuraavien fibronektiinimolekyylin suoristumisen ja sitoutumisen. Fibronektiini-fibronektiini-sitoutumiseen mahdollisesti osallistuvat domeenit on merkitty kuvassa mustilla raidoilla. (muokattu katsausartikkelin Johansson ja muut 1997 kuvasta)

## 4 BASIGIINIPERHEEN PROTEIINIT

IgSF-perheeseen kuuluvat basigiini (*engl.* basigin, BSG) (Biswas 1982), neuroplastiini (*engl.* neuroplastin) (Hill ja muut 1988) ja embigiini (*engl.* embigin, EMB) (Ozawa ja muut 1998) muodostavat basigiiniperheen. Basigiini on näistä proteiineista tutkituin, joten siksi perhe on nimetty sen mukaan (katsausartikkelissa Muramatsu 2015).

Basigiiniperheen jäsenet ovat solukalvon läpäiseviä glykoproteiineja (kuva 3) ja niillä on kaksi Ig-I-domeenia solun ulkopuolisessa N-terminaaliosassa. Lisäksi basigiini ja neuroplastiini esiintyvät isomuotoina, jossa niiden N-terminaaliosassa on kolmas Ig-I-domeeni (D0). (Langnaese ja muut 1997; Kanekura ja muut 1991.) Kaikilla on myös muita vaihtoehtoisesta silmukoinnista johtuvia muotoja, ja niillä solukalvon läpäisevässä domeenissaan epätyypillinen glutamaatti (E). Basigiinilla on myös havaittu kaksi fosforylointikohtaa sytoplasmisessa domeenissa. *N*-glykosylaation määrä ja paikat vaihtelevat perheen jäsenten välillä ja myös eri eliölajien välillä. Embigiini on näistä voimakkaimmin glykosyloitu. (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014.)



**Kuva 3. Basigiiniperheen proteiinien rakenteet.** Basigiiniperheen glykoproteiinit, basigiini, neuroplastiini ja embigiini, kuuluvat immunoglobuliinisuperperheeseen. Kaikilla on kaksi glykosyloitua immunoglobuliinin kaltaista (Ig-I) domeenia solun ulkopuolisessa osassa. Basigiini ja neuroplastiini esiintyvät myös kolmen Ig-I-domeenin isomuotona. Embigiini on perheen jäsenistä voimakkaimmin glykosyloitu. (muokattu katsausartikkelin Beesley ja muut 2014 kuvasta)

## 4.1 Basigiini

Basigiini (lyhenne BSG (ihminen) tai Bsg (hiiri), tunnetaan myös nimillä CD147 ja EMMPRIN, käytetty myös muita nimiä, kuten gp42, HT7, neurothelin, OX-47, M6 ja 5A11) on solukalvon glykoproteiini, ja se osallistuu monenlaisiin solun tapahtumiin (katsausartikkelissa Muramatsu 2016). Basigiini löydettiin 1982 (Biswas 1982), mutta sen säätelystä ja tehtävästä tiedetään vielä melko vähän.

Basigiinilla on monia eri vaikutuskohteita: sitä ilmentyy monissa syövässä ja se on tärkeä alkionkehityksessä, haavan paranemisessa, verkkokalvon toiminnassa, T-solujen kehityksessä, monissa neurologisissa prosesseissa (katsausartikkelissa Iacono ja muut 2007). Basigiini toimii avustavana proteiinina monokarboxylaattitransportteri 1:lle, 3:lle ja 4:lle (*engl.* monocarboxylate transporter, MCT) (Kirk ja muut 2000; Philp ja muut 2003). Se voi olla vuorovaikutuksessa myös esimerkiksi integriinien (Berditchevski ja muut 1997; Curtin ja muut 2005) ja kaveoliini-1:n kanssa (Tang ja Hemler, 2004) sekä indusoida MMP-molekyylien tuottoa (Kataoka ja muut 1993).

### 4.1.1 Basigiinin koko vaihtelee ja se esiintyy neljässä eri isomuodossa

BSG-geeni ilmentää 29 kDa kokoista proteiinia ja basigiinin koko vaihtelee 35-65 kDa välillä sen glykosylaatiotasosta riippuen (Kasinrerk ja muut 1992 ja 1999; Kirsch ja muut 1997). Basigiinissa on kolme potentiaalista *N*-glykosylaatiokohtaa, ja molekyylipainosta jopa puolet johtuu *N*-linkatuista hiilihydraateista. *N*-glykosylaatiossa sokeriketjut on liitetty tyyppeen, tyypillisesti asparagiinin amidisivuketjuun. (Miyachi ja muut 1991; Kasinrerk ja muut 1992.) Basigiinin sytoplasminen ja solukalvon läpäisevä domeeni ovat konservoituneita (Miyachi ja muut 1991) ja ne ovat tärkeitä sen toiminnalle proteiini-proteiini-vuorovaikutuksissa solukalvolla (Kirk ja muut 2000).

Basigiini esiintyy neljässä eri isomuodossa: basigiini-1, -2, -3 ja -4 (Liao ja muut 2011). Basigiini-2 (basigiini/CD147/EMMPRIN) on näistä isomudoista yleisin ja sen tehtävä on parhaiten tunnettu (Belton ja muut 2008). Sen solun ulkopuolinen osa koostuu kahdesta Ig-I-domeenista, joista lähimpänä N-terminaalia oleva D1-domeeni on Ig-I-C2-domeeni ja toinen D2-domeeni on puolestaan Ig-I-V-domeeni (Wilson ja muut 2005). Basigiini-1-isomuodon (ennen basigiini-2) solun ulkopuolisessa osassa on kolme Ig-I-domeenia ja sen N-terminaalisin D0-domeeni on Ig-I-V-domeeni. Tällä isomuodolla esiintyy homofiilistä interaktiota. (Hanna ja muut 2003.) Se on retinaspesifinen eli sitä ilmentyy ainoastaan silmän verkkokalvossa (Ochrietor ja muut 2003). Basigiini-2:n, -3:n ja -4:n ilmentyminen on korkeampaa syöpäsolulinjoissa kuin normaaleissa solulinjoissa, ja basigiini-2:n lisäksi myös basigiini-3:lla ja -4:llä esiintyy glykosylaatiota (Liao ja muut 2011). Basigiini-3:n solun ulkopuolinen osa koostuu vain yhdestä Ig-I-domeenista (Schlegel ja muut 2009). Se saattaa toimia basigiini-2:n säätelijänä (Liao ja muut 2011).

#### *4.1.2 Basigiini avustaa monokarboksylaattitransporttereita*

Monokarboksylaattitransportterit kuljettavat solukalvon yli monokarboksylaatteja, kuten laktaattia, pyruvaattia ja ketoaineita, ylläpitäen monien solujen homeostaasia. MCT-perheessä on 14 jäsentä, joista MCT1-MCT4, MCT8 ja MCT10 ovat parhaiten tutkittuja. MCT1-4 ovat protoniriippuvaisia transporttereita ja ne tarvitsevat toimiakseen avustavia proteiineja. (katsausartikkelissa Halestrap ja Price 1999.) Niiden ilmentyminen on tärkeää esimerkiksi monissa syövässä ja ilmentymisen lisääntyminen saattaa olla merkki syövän kehittymisestä pahanlaatuiseksi (katsausartikkelissa Iacono ja muut 2007).

Basigiini toimii avustavana proteiinina MCT1:lle ja 4:lle (Kirk ja muut 2000). Kaperoniaktiivisuuden lisäksi basigiini on välttämätön myös näiden proteiinien toiminnalle (Wilson ja muut 2005). MCT1 ilmentyy laajasti eri kudoksissa ja se on tärkeä laktaatin kuljettamiselle sydän- ja punaisissa luustolihasoluissa (Garcia ja muut 1994; McCullagh ja muut 1996). MCT4 (ennen MCT3) puolestaan ilmentyy melko laajasti eri kudoksissa ja erityisen voimakkaasti glykolyttisissä kudoksissa, kuten valkoisissa luustolihasoluissa (Price ja muut 1998; Wilson ja muut 1998).

Basigiini-1 on retinaspesifinen eli sitä esiintyy ainoastaan silmän verkkokalvossa (Ochrietor ja muut 2003). Sen homofiilinen interaktio voi olla tärkeää laktaattitransportterien asemoimiselle verkkokalvolle, jossa laktaatti on tärkeä metaboliitti (Hanna ja muut 2003). MCT3 ilmentyy silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelissä (*engl.* retinal pigment epithelium, RPE) basaalisella puolella. MCT1 puolestaan ilmentyy RPE:ssä apikaalisella puolella. (Yoon ja muut 1997; Philp ja muut 2001.) Myös basigiini ilmentyy RPE-soluissa ja kolokalisoituu siellä MCT1:n ja MCT3:n kanssa. Basigiinihiljennetyissä (*engl.* knockout, KO) hiirissä MCT1:n ja MCT3:n ilmentyminen oli alentunut huomattavasti, joten basigiini luultavasti osallistuu myös näiden MCT-proteiinien kuljettamiseen verkkokalvolle. (Philp ja muut 2003.)

#### *4.1.3 Basigiini saattaa avustaa integriinien toimintaa*

Integriinien  $\alpha3\beta1$  ja  $\alpha6\beta1$  on havaittu olevan vuorovaikutuksessa basigiinin kanssa (Berditchevski ja muut 1997). Nämä integriinit sitoutuvat pääasiassa laminiineihin ja ovat tyvikalvon tärkeitä komponentteja (Delwel ja muut 1994). Laminiinit on yhdistetty moniin metastaasille tärkeisiin prosesseihin, kuten soluadheesion lisäämiseen ja angiogeneesiin (katsausartikkelissa Malinda ja Kleinman 1996). Basigiini saattaa säädellä integriini-laminiini-vuorovaikutusta ja siten esimerkiksi tyvikalvon muodostumista, alkionkehitystä ja metastaasiin liittyviä prosesseja (katsausartikkelissa Iacono ja muut 2007).

#### *4.1.4 Basigiini indusoi matriksin metalloproteiinaasien tuottoa*

MMP-molekyyleillä on kyky hajottaa adheesiomolekyylejä solukalvolla ja soluväliaineessa sekä muita soluväliaineen proteiineja. Niillä on tärkeä tehtävä esimerkiksi haavan paranemisessa ja syövän metastaasissa. (katsausartikkelissa Matrisian 1990.) Basigiini stimuloi useiden MMP-proteiinien tuottoa soluissa, mistä basigiinin yksi nimi EMMPRIN (extra-cellular matrix metalloproteinase inducer) tulee (Kataoka ja muut 1993). Ollessaan galektiini-3:n kanssa vuorovaikutuksessa basigiini voi laukaista erityisesti MMP-9:n erityksen soluista (Mauris ja muut 2014), ja sillä on myös tärkeä tehtävä MMP-2:n tuotossa (Sun ja Hemler 2001).



#### *4.1.5 Homo-oligomerisaatio ja glykosylaatio ovat tärkeitä basigiinin toiminnalle*

Homo-oligomerisaatio on edellytys monen proteiinin kunnolliselle toiminnalle. Basigiini-1:n lisäksi basigiini-2:lla esiintyy homofiilistä interaktiota ja se stimuloi MMP-ilmentymistä homo-oligomerisoitumalla muiden basigiini-2-proteiinien kanssa. (Sun ja Hemler 2001.) Basigiini-3 voi puolestaan inhiboida MMP-induktiota muodostamalla hetero-oligomeerejä sitoutumalla basigiini-2:een ja näin estää MMP-induktioon vaadittujen basigiini-2-homo-oligomeerien syntyä. Basigiini-3 saattaa siis säädellä basigiini-2:n toimintaa. (Liao ja muut 2011.)

Basigiinin glykosylaatiotasoa vaihtelee paljon ja tämänkaltainen iso koon vaihtelu on yleensä epätyypillistä solukalvon glykoproteiineille ja erityisesti IgSF:n proteiineille (Tang ja muut 2004). Glykosylaatio on tärkeää basigiinin toiminnalle, koska juuri glykosyloitu muoto basigiinista on esimerkiksi alttiimpi klusteroitumiselle ja MMP-tuoton induktiolle (Guo ja muut 1997). Kaveoliini-1 säätelee basigiinin glykosylaatiota estämällä tämän korkeasti glykosyloidun muodon tuottoa ja siten se myös vähentää basigiinivälitteistä MMP-tuottoa. Kaveoliini-1 toimiikin syöpää estävänä proteiinina, kun taas basigiinia pidetään syöpää edistävänä proteiinina. Basigiinin glykosylaatio saattaa olla tärkeää myös muissa vuorovaikutuksissa. (Tang ja muut 2004.)

#### *4.1.6 Basigiinihiljennetyissä hiirissä on monia häiriöitä*

Basigiini on luultavasti tärkeä proteiini lisääntymisessä ja alkiokehityksessä (Igakura ja muut 1998). Sitä ilmentyy hiiren alkioissa laajasti alkionkehityksen alkuvaiheessa ja organogeneesissä useissa epiteelikudoksissa, aivokammioissa, selkäytimessä ja spinaaligangliossa (Fan ja muut 1998). Basigiini KO -hiiriä syntyy vain noin neljäsosa normaalista. Alkiot kehittyivät normaalisti preimplantaatiovaiheiden aikana, mutta suurin osa niistä kuoli implantaation eli kohtuun kiinnittymisen aikana. Basigiini luultavasti siis osallistuu solujen väliseen tunnistukseen implantaatiossa. Puolet syntyneistä KO -hiiristä kuoli ennen 1 kuukauden ikää interstitiaalisen keuhkosairauden takia. Selviytyneet aikuiset hiiret olivat pieniä ja steriilejä. Spermatogeneesi oli pysähtynyt KO -hiirissä. (Igakura ja muut 1998.) Naaraissa häiriön ajateltiin johtuvan luultavasti preimplantaatiovaiheen ongelmista (Igakura ja muut 1998), mutta ongelma vaikuttaisi olevan myös oosyyttien kypsymisessä (Kuno ja muut 1998).

Basigiini saattaa liittyä myös hermoston kehitykseen (Fadool ja muut 1993). Basigiini KO -hiirillä havaittiin lyhytaikaisen muistin ja oppimisen huonontuneen, mutta hiirillä ei kuitenkaan havaittu motorisia toimintahäiriöitä. Lisäksi basigiini ilmentyy voimakkaasti hiiren aivoissa limbisen järjestelmän alueella, aivokuoressa, pikkuaivoissa ja aivorungossa. Basigiinilla saattaa siis olla tärkeä tehtävä oppimisessa ja muistamisessa ja myös sensorisissa toiminnoissa. (Naruhashi ja muut 1997; Fan ja muut 1998.)

Basigiini KO -hiirien on havaittu sokeutuvan. Hiirien näkökyky oli heikentynyt kahden viikon ikäisinä, jolloin silmät avautuvat, vaikka verkkokalvon rakenne vaikutti normaalilta (Ochrietor ja muut 2002). Kolmen viikon ikäisissä hiirissä fotoreseptorien ulommat segmentit näyttivät normaalia väljemmiltä ja lyhyemmiltä, ja 8 viikon ikäisissä hiirissä fotoreseptorien rappeutuminen oli alkanut. Fotoreseptorien hajoaminen jatkui asteittain kahdeksan kuukauden ikään asti, jolloin koko fotoreseptorikerros puuttui. (Hori ja muut 2000, Ochrietor ja muut 2001.) Basigiinilla on tärkeä tehtävä MCT-proteiinien kuljetuksessa solukalvolle, joten siksi ne luultavasti ovat välttämättömiä verkkokalvon normaalille toiminnalle (Philp ja muut 2003).

#### 4.2 Neuroplastiini

Neuroplastiinit (Np55, aiemmin gp55 ja Np65, aiemmin gp65, käytetty myös nimiä SDR1 ja ZOV3) ovat synaptisella solukalvolla olevia IgSF:n glykoproteiineja, joilla on tärkeä tehtävä monissa neuronaaalisissa ja synaptisissa toiminnoissa (Langnaese ja muut 1997.) Ne esimerkiksi edistävät neuriittien kasvua ja säätelevät synapsien rakennetta ja toimintaa. Ne saattavat osallistua myös neuronien energiansaantiin. Lisäksi ne avustavat useiden proteiinien, kuten MCT2:n, glutamaattireseptori 1:n ja GABA<sub>A</sub>-reseptorin lokalisaatiota ja toimintaa. (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014.)

#### *4.2.1 Neuroplastiini esiintyy neljässä eri isomuodossa ja sen glykosylaatiotasoa vaihtelee*

Neuroplastiini-isomuodoista Np55 koostuu kahdesta (D1 ja D2) ja Np65 kolmesta (D0, D1 ja D2) Ig-I-domeenista. D0- ja D2-domeenit ovat tyyppin C2 domeeneja, mutta D1-domeenia ei voida luokitella miksikään tietyksi Ig-domeenityypiksi. (Langnaese ja muut 1997.) Neuroplastiineja ilmentää *NPTN*-geeni, ja kahden isomuodon (Np55 ja Np65) lisäksi neuroplastiinien sytoplasmisesta domeenista voi puuttua neljän aminohapon pätkä (340-Asp-Asp-Glu-Pro-(DDEP)-343), joten neuroplastiini esiintyy neljässä isomuodossa (Np65 ja Np55 ± DDEP) (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014).

Kuten basigiinilla, myös neuroplastiinin koko vaihtelee glykosylaation myötä. Ilman glykosylaatiota Np55:n koko on 28 kDa ja Np65:n 40 kDa, kun taas glykosyloituna Np55:n koko voi olla jopa 55 kDa ja Np65:n 65 kDa. Neuroplastiineilla on kuusi potentiaalista *N*-glykosylaatiokohtaa D1- ja D2-domeeneissa. (Willmott ja muut 1992.) Np65 ilmentyy pelkästään aivoissa ja neuroneissa, kun taas Np55 ilmentyy aivojen lisäksi monissa muissa kudoksissa, kuten munuaisissa, pernassa, kateenkorvassa, luustolihaksissa, mahassa, kiveksissä, keuhkoissa, sydämessä ja maksassa. Np55:n glykosylaatiomuodot vaihtelevat eri kudosten välillä, joten glykosylaatio luultavasti vaikuttaa neuroplastiinin toimintaan. (Langnaese ja muut 1997.) Lisäksi Np65:lla on havaittu trans-homofiilistä sitoutumista, mutta Np55:llä puolestaan tätä ei havaittu (Smalla ja muut 2000).

#### *4.2.2 Neuroplastiinit säätelevät synapsien rakennetta ja toimintaa*

Soluadheesio luo toiminnallisen pohjan aivojen monimutkaisen neuroniverkon synnylle ja ylläpitämiselle. Monet soluadheesiomolekyylit, kuten neuroplastiinit, säätelevät hermosolujen erilaistumista alkionkehityksen aikana ja tukevat synapsien kypsymistä ja ylläpitoa aikuisen aivoissa. (Owczarek ja muut 2011.) Varhaisessa alkionkehityksessä neuroplastiineja ilmentyy hiiren ja ihmisen aivojen kuorialueella vain vähän, mutta kehityksen myöhemmissä vaiheissa ilmentyminen kasvaa lapsuuteen asti. Korkeimmillaan neuroplastiinien ilmentyminen on murrosiässä, jonka jälkeen ilmentyminen laskee. Solutasolla neuroplastiinit saattavat liittyä aivokuoren arkkitehtuurin säätelyyn. (Desrivières ja muut 2015.)

Monilla muilla soluadheesiomolekyyleillä on tärkeä tehtävä hermosolujen kasvun edistämässä ja siten niiden erilaistumisessa. Yksi tärkeimmistä solu-ECM-vuorovaikutuksen vaikutuksesta aktivoituvista signaalireiteistä liittyy fibroblastikasvutekijöihin (*engl.* fibroblast growth factor, FGF) ja niiden reseptoreihin (FGFR). Esimerkiksi FGF-reseptorin kanssa vuorovaikutuksessa olevat IgSF-perheeseen kuuluva hermosoluadheesiomolekyylä (*engl.* neural cell-adhesion molecule, NCAM) ja kadheriineihin kuuluva N-kadheriini aktivoivat neuriittien kasvun aiheuttavia signalointireittejä. (Hansen ja muut 2008.) Neuroplastiinit voivat olla vuorovaikutuksessa FGF-reseptorien kanssa. Np55 sitoutuu FGFR1:een ja aktivoimalla tämän Np55:n D1-domeeni indusoi neuriittien kasvua. Lisäksi Np55 lisää synaptista kalsium-konsentraatiota FGFR1:n kautta. (Owczarek ja muut 2010.) Myös Np65 edistää neuriittien kasvua trans-homofiilisen adheesion kautta ja lisää synaptista kalsium-konsentraatiota. Neuroplastiinit luultavasti siis säätelevät synaptista muovautuvuutta muiden soluadheesiomolekyyläin tavoin. (Owczarek ja muut 2011.)

#### *4.2.3 Neuroplastiinit toimivat avustavana proteiinina MCT2:lle*

MCT2 ilmentyy harvemmissa kudoksissa kuin MCT1. Sitä kuitenkin ilmentyy useissa samoissa kudoksissa, kuin MCT1:tä, kuten maksassa, munuaisissa, kiveksissä ja aivoissa, mutta sen lokalisatio on eri kuin MCT1:llä. MCT1:llä ja MCT2:lla on luultavasti siis eri tehtävät kudoksissa (Garcia ja muut 1995.) Neuroplastiinit toimivat avustavana proteiinina MCT2:lle ainakin joissakin neuronipopulaatioissa (Wilson ja muut 2013). MCT1, MCT2 ja MCT4 ilmentyvät aivoissa, ja MCT2 on jyrksijöissä luultavasti merkittävin MCT-isomuoto laktaatin kuljetuksessa neuroneihin hermostimulaation jälkeen (katsausartikkelissa Pierre ja Pellerin 2005). Laktaatti on merkittävin monokarboksylaatti aikuisen aivoissa ja se on tärkeä energianlähde neuroneille (Bergersen 2007). Neuroplastiineilla saattaa siis olla tärkeä tehtävä aivojen ja neuronien energiansaannissa (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014).

MCT2 on merkittävin hermosoluihin liittyvä MCT jyrsijöissä, mutta kuitenkin ihmisen aivoissa se ei ole kovin yleinen proteiini. Jokin muu MCT-molekyyleistä saattaisi olla merkittävin ihmisellä, esimerkiksi MCT1. Neuroplastiini voisi mahdollisesti toimia avustavana proteiinina myös MCT1:lle aivoissa. (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014.) Lisäksi neuroplastiinien jakauma ihmisen aivoissa poikkeaa jyrsijöiden aivoista. Neuroplastiinit eivät siis välttämättä toimi samalla tavalla ihmisissä ja jyrsijöissä. (Bernstein ja muut 2007.)

#### *4.2.4 Neuroplastiinit saattavat liittyä kuulemiseen ja neurologisiin häiriöihin*

Np65 KO -hiirissä on ilmennyt vakavaa kuuroutta (Carrott ja muut 2016) ja myös Np55 KO -hiirien kuulo on selkeästi huonontunut (Zeng ja muut 2016). Np65 ilmentyy korvan simpukkarakenteen kuuloaistimusta välittävien sisempien karvasolujen (*engl.* inner hair cell, IHC) presynaptisella alueella. Np65 KO -hiirissä Np65:n puuttuminen aiheuttaa kuuroutta ja estää hermosolun välittäjäaineiden vapautumisen IHC-soluista. Np65 on tärkeä IHC-solujen synapsien muodostumiselle ja toiminnalle, mikä on edellytys äänen vastaanottamiselle nisäkkäissä. (Carrott ja muut 2016.) Np55 ilmentyy puolestaan simpukan ulommissa karvasoluissa (*engl.* outer hair cell, OHC), mutta ei IHC-soluissa. Np55 on tärkeä OHC-solujen toiminnalle, koska se ylläpitää OHC-solujen ja katekalvon välistä mekaanista sidosta. Myös Np55 KO -hiirien kuulo on huonontunut ja Np55 vaikuttaa olevan tärkeä äänen vahvistamiselle. (Zeng ja muut 2016.)

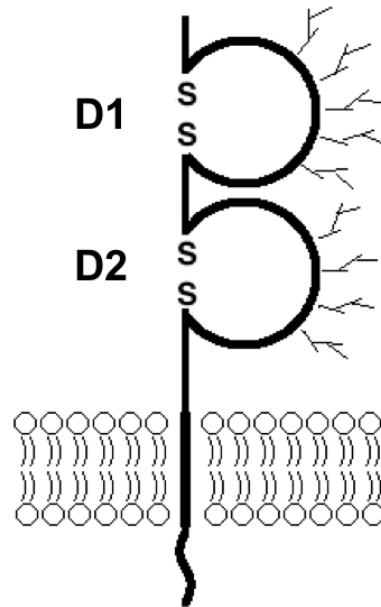
Neuroplastiinien tehtävää ihmisen sairauksissa tai neurologisissa häiriöissä ei ole vielä täysin selvitetty, mutta se on yhdistetty joihinkin sairauksiin ja häiriöihin (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014). Neuroplastiinin on esimerkiksi havaittu olevan riskitekijä skitsofreniassa (Saito ja muut 2007). Sillä saattaa olla myös merkittävä tehtävä masennuksessa (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014). Lisäksi Np65 KO -hiirissä neuronien selviytyminen aivoissa on heikentynyt. Aivoinfarktissa Np65 KO -hiirissä oli vakavampia neurologisia häiriöitä, laajempia kuduskuolioalueita ja enemmän apoptoottisia soluja kuin villityypin hiirissä. Np65 KO -hiiret vaikuttavat olevan herkempiä iskeemisille muutoksille ja Np65 luultavasti vaikuttaa neuronien selviytymiseen aivoissa. (Hu ja muut 2017.)

### 4.3 Embigiini

Embigiini (lyhenne EMB (ihminen) tai Emb (hiiri), aiemmin GP-70 tai GP70) on IgSF-perheeseen kuuluva solukalvon glykoproteiini. Embigiini löydettiin jo 30 vuotta sitten hiiren teratokarsinomasoluista (Ozawa ja muut 1988), mutta sen tehtävä on vielä huonosti tunnettu. Sen ajatellaan osallistuvan varhaiseen alkionkehitykseen, koska sitä ilmenee voimakkaasti alkionkehityksen alkuvaiheessa ja tämän jälkeen sen ilmentyminen vähentyy (Huang ja muut 1990; Fan ja muut 1998). Se toimii avustajaproteiininä MCT2:lle (Wilson ja muut 2005) ja se saattaa voimistaa integriinivälitteistä soluadheesiota (Huang ja muut 1993). Embigiini saattaa siis liittyä solujen kasvuun ja kehitykseen sekä välittää solun ja soluväliaineen välisiä vuorovaikutuksia (Huang ja muut 1993).

#### *4.3.1 Embigiini on voimakkaasti glykosyloitu proteiini*

Embigiinistä esiintyy homologeja eri lajeissa ihmisestä banaanikärpäseen, joten se on hyvin konservoitunut evoluution aikana (Guenette ja muut 1997). Kuvassa 4 on esitetty ihmisen embigiinin rakenne. Embigiinin solun ulkopuolinen N-terminaalinen osa koostuu kahdesta runsaasti glykosyloidusta V-tyyppin Ig-l-domeenista, siinä on yksinkertainen solukalvon läpäisevä domeeni ja siinä on lyhyt sytosolinen häntä (Guenette ja muut 1997). Ihmisen ja hiiren embigiinin aminohapposekvenssit ovat 65 % samankaltaisia. Ihmisen embigiinillä on yhdeksän potentiaalista N-glykosylaatiokohtaa (UniProt: Q6PCB8) ja hiiren embigiinillä niitä on kaksitoista (UniProt: P21995). Kuten basigiinilla ja neuroplastiinilla, embigiinin glykosylaatiotasoa vaihtelee ja tämän myötä myös sen koko vaihtelee paljon (Ozawa ja muut 1988). Ilman glykosylaatiota sekä ihmisen että hiiren embigiinin ydinproteiini on kooltaan 37 kDa. Glykosyloidun muodon koon on havaittu vaihtelevan välillä 62-90 kDa (Ozawa ja muut 1988). Lisäksi embigiinillä on toinen silmukointivariantti, josta embigiinin N-terminaaliosasta puuttuu 50 aminohapon pituinen pätkä ja tämän isomuodon ydinproteiinin koko on 32 kDa (UniProt: Q6PCB8-2). Tätä embigiinin isomuotoa ei ole vielä tutkittu.



**Kuva 4. Ihmisen embigiinin rakenne.** Embigiinin N-terminaalinen solun ulkopuolinen osa (aa33-260) koostuu kahdesta voimakkaasti glykosyloidusta V-tyyppin Ig-I-domeenista (D1 ja D2), siinä on yksinkertainen solukalvon läpäisevä osa (aa261-281) ja lyhyt sytosolinen häntä (aa282-237). Embigiinin ydinproteiinin koko on 37 kDa ja glykosylaation takia sen todellinen koko vaihtelee paljon. Lyhyemmän isomuodon ydinproteiinin koko on 32 kDa. Rakenteessa on yhdeksän potentiaalista N-glykosylaatiokohtaa.

#### 4.3.2 Embigiini on luultavasti tärkeä proteiini alkionkehityksessä

Embigiinin havaittiin aluksi ilmentyvän voimakkaasti lähetti-RNA-tasolla (*engl.* messenger RNA, mRNA) embryonaalisissa karsinoomasoluissa, ja sen ajateltiin liittyvän alkionkehitykseen (Ozawa ja muut 1988). Hiirissä ja rotissa embigiinin on havaittu ilmentyvän mRNA-tasolla alkionkehityksen aikana useissa eri kudoksissa, ja iän myötä sen määrä vähenee (Huang ja muut 1990).

Embigiinin on havaittu ilmentyvän mRNA-tasolla hiiren alkioissa päivinä E5-6 kohtuullisesti ja voimakkaasti päivinä E7-9. Se ilmentyi voimakkaasti endodermisissä aikaisessa postimplantaatiovaiheessa ja somiittien muodostumisvaiheessa suolistossa, aivoissa ja viskeraalisessa endodermisissä, kun taas ektodermisissä ja mesodermisissä sitä ilmentyi vain heikosti tai kohtalaisesti. Päivinä E10-15 embigiiniä ei havaittu, ja se ilmentyi vain heikosti aikuisen hiiren elimissä. Embigiiniä ilmentyy siis voimakkaasti vain alkionkehityksen alkuvaiheessa, jonka jälkeen sen ilmentyminen laskee organogeneesin aikana. (Huang ja muut 1990; Fan ja muut 1998.)

Aikuisten rottien ja hiirien kudoksissa embigiini ilmentyi heikosti mRNA-tasolla. Aivoissa, munasarjoissa, kiveksissä ja raskaana olevan hiiren kohdussa sitä ilmentyi hieman enemmän kuin muissa tutkituissa kudoksissa. On siis mahdollista, että embigiini osallistuu alkion implantaatioon. (Huang ja muut 1990.) Lisäksi embigiinin on havaittu ilmentyvän aikuisessa rotassa myös munuaisissa, heikommin sydämessä, maksassa ja keuhkoissa sekä hyvin heikosti rakkularauhasissa (Guenette ja muut 1997).

Embigiinin ilmentyminen on liitetty hiiren alkiokehityksen aikana glykoproteiini *Dolichos biflorus* -agglutiniiniin, jota ilmentyy alkionkehityksen aikana endodermissä (Muramatsu ja muut 1981; Noguchi ja muut 1982; Fan ja muut 1998). Embigiini ilmentyy munuaisten kehityksen alkuvaiheessa. Se saattaa säädellä solu-ECM-vuorovaikutuksia munuaisten kehityksen aikana ja saattaa olla *Dolichos biflorus* -sitoutuva proteiini munuaisissa. (Stuart ja muut 2003.) Eturauhasen kehityksessä embigiinin kasvanut ilmentyminen on puolestaan liitetty eturauhasen hyvin järjestäytyneiden rakenteiden ilmenemiseen (Guenette ja muut 1997). Embigiini ilmentyy myös hermo-lihasliitoksissa kehittyvissä lihaksissa. Se saattaa edistää NCAM-riippuvaista hermo-lihasadheesiota ja liittyä hermo-lihasliitoksen muodostumiseen ja muovautuvuuteen. (Lain ja muut 2009.) Embigiinin ilmentyminen saattaa siis liittyä kudosten uudelleenorganisointiin sekä aikuisissa että kehittyvissä kudoksissa (Guenette ja muut 1997).

#### *4.3.3 Embigiini saattaa toimia avustavana proteiinina integriineille ja MCT2:lle*

Embigiinin solun ulkopuolinen domeeni sitoutuu luultavasti joihinkin soluväliaineen proteiineihin ja muihin soluadheesiomolekyyleihin (Guenette ja muut 1997). Embigiinin yli-ilmentäminen L-soluissa lisäsi integriinivälitteistä soluadheesiota. Embigiinin välittämä soluadheesio saattaa siis liittyä integriineihin ja se saattaa avustaa niiden toimintaa. (Huang ja muut 1993.)



MCT2:n on havaittu sitoutuvan paremmin embigiiniin kuin basigiiniin, joten embigiini luultavasti avustaa MCT2:n kuljettamista solukalvolle (Wilson ja muut 2005). Embigiini voi olla vuorovaikutuksessa myös MCT1:n kanssa joissakin tietyissä kudoksissa, kuten rotan punasoluissa (Poole ja Halestrap 1997). CAIV-proteiinin on havaittu lisäävän merkittävästi MCT2:n kuljetusaktiivisuutta, kun MCT2 ilmentyi sitä avustavan embigiinin kanssa (Klier ja muut 2011). CAIV kuuluu nisäkkäiden hiilihappoanhydraaseihin, jotka katalysoivat hiilidioksidin hydraatiota hiilihapon kautta vety- ja bikarbonaatti-ioneiksi (katsausartikkelissa Supuran ja Scozzafava 2007). CAIV:tä ilmentyy neuronien ja astrosyyttien pinnalla, jossa se katalysoi aivojen solujen ulkopuolisen nesteen puskurointia ja edistää laktaatin kuljettamista (Svichar ja Chesler 2003; Svichar ja muut 2006). CAIV ja MCT2 eivät välttämättä ole vuorovaikutuksessa suoraan toistensa kanssa vaan embigiini saattaa toimia näiden proteiinien välisenä avustavana proteiinina (Klier ja muut 2011).

#### *4.3.4 Embigiini saattaa liittyä solujen kasvuun ja erilaistumiseen*

Embigiini saattaa olla solun kasvuun ja kehitykseen liittyvä glykoproteiini, joka välittää solun ja soluväliaineen välisiä vuorovaikutuksia (Huang ja muut 1993). Se siis luultavasti on vuorovaikutuksessa joidenkin solun adheesiomolekyylien ja soluväliaineen molekyylien kanssa (Guenette ja muut 1997). Embigiinin ilmentyminen saattaa liittyä myös solujen erilaistumistasoon. Kun voimakkaasti embigiiniä ilmentäviä LNCaP- ja MDA-MB-231-soluja kasvatettiin Matrigel-matriksilla, niiden embigiini-ilmentyminen aleni. Samalla solujen jakaantuminen väheni ja ne olivat selkeämmin erilaistuneita. Kun embigiiniä on paljon soluissa, ne saattavat siis olla vähemmän erilaistuneita ja jakaantua enemmän ja kun embigiiniä on vähemmän soluissa, ne saattavat olla erilaistuneempia ja jakaantua vähemmän. Embigiini saattaa siis säädellä solujen aktiivisuutta erilaistumisen ja kudosten muokkauksen aikana välittämällä solujen välistä tunnistusta. (Guenette ja muut 1997.)

#### 4.3.5 *Embigiini voi liittyä hematopoieesin säätelyyn*

Embigiinin on havaittu ilmentyvän luuytimen solujen esiasteissa. Sitä ilmentyi paljon myeloidisissa soluissa ja tymosyyteissä, ja sen ilmentyminen oli keskitasolla T-soluissa ja NK-soluissa. B-soluissa sitä ilmentyi vain vähän tai ei ollenkaan. Embigiini ilmentyy siis laajasti hematopoieesissa. (Pridans ja muut 2008.)

Transkriptiofaktori Pax5 on tärkeä tekijä B-solujen muodostumiselle hiirissä, joissa se estää linjalle sopimattomien geenien ilmentymistä ja aktivoi B-solujen geenien ilmentymistä. Embigiiniä ei ilmentynyt tavallisissa pro-B-soluissa, mutta Pax5-hiljennetyissä pro-B-soluissa puolestaan sitä ilmentyi voimakkaasti. *Emb* on siis potentiaalinen Pax5:n estämä geeni myöhäisen B-solujen erilaistumisen aikana. (Pridans ja muut 2008.) Embigiinin ilmentyminen kuitenkin lisääntyy tavallisten B-solujen lopullisen erilaistumisen aikana niiden aktivoituessa ja sen ilmentyminen säilyy plasm soluissa. Samalla Pax5:n toiminta estyy. (Kallies ja muut 2007.) Embigiinin ilmentyminen B-soluissa on siis mahdollinen markkeri heikentyneelle Pax5:n toiminnalle (Pridans ja muut 2008).

Embigiini ilmentyy laajasti hematopoieettisissa soluissa, mukaan lukien alkukantaisissa muodoissa, mutta sen tehtävä näissä soluissa on vielä epäselvä (Pridans ja muut 2008). Kantasolujen toimintaa säätelee kantasoluja hoitavien ”niche”-solujen erittämät liukoiset tekijät. Nämä solut muodostavat kantasolujen heterogeenisen mikroympäristön. (Xie ja Spradling 2000.) Etsittäessä uusia hematopoieettisten kanta/esisolujen (*engl.* hematopoietic stem/progenitor cell, HSPC) säätelijöitä luuytimessä embigiinin havaittiin ilmentyvän HSPC-soluja lähellä olevissa luulinjan soluissa. Sen havaittiin säätelevän HSPC-solujen lokalisaatiota ja lisäävän niiden ”uinuvuutta” (*engl.* quiescence) eli solujen pysyvyyttä jakaantumattomassa G0-vaiheessa. Embigiini saattaa siis toimia hematopoieettisena säätelijänä ja sillä saattaa olla tehtävä HSPC-solujen regeneraatiossa. (Silberstein ja muut 2016.)

#### 4.4 Basigiiniperheen proteiineilla on yhtäläisyyksiä ja eroja

Basigiiniperheen jäsenet eroavat paljon toisistaan, mutta niillä on myös yhtäläisyyksiä. Basigiini, neuroplastiini ja embigiini ovat keskenään hyvin konservoituneita, koska niiden aminohapposekvenssit ovat 37-46 % samankaltaisia (Hanna ja muut 2003). Niiden rakenteissa on kuitenkin merkittäviä rakenteellisia eroja. Niiden Ig-I-domeenit ovat erityyppisiä, mikä voi vaikuttaa niiden toimintaan oleellisesti. Lisäksi basigiini ja neuroplastiini esiintyvät kolmen Ig-I-domeenin isomeerinä ja embigiini puolestaan ei (Langnaese ja muut 1997; Ochrietor ja muut 2003). Basigiinilla ja neuroplastiinilla esiintyy homofiilistä interaktiota, mutta embigiinillä homofiilistä sitoutumista ei ole tutkittu (Hanna ja muut 2003; Smalla ja muut 2000). Ei myöskään tiedetä, muodostavatko perheen jäsenet heterodimeerejä keskenään (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014).

Basigiiniperheen jäsenten rakenteellisen erilaisuuden takia proteiineilla on tiettyjä toisistaan eroavia tehtäviä, mutta niillä on myös joitakin toiminnallisia päällekkäisyyksiä, joista tiedetään vielä vähän. Ne saattavat myös kompensoida toistensa toimintaa ensisijaisen proteiinin puuttuessa. Esimerkiksi embigiiniä ilmenee voimakkaasti alkionkehityksessä ja heikosti aikuisessa, joten basigiini ja neuroplastiini saattavat olla sitä vastaavia proteiineja aikuisissa yksilöissä. (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014.)

##### *4.4.1 Kaikki basigiiniperheen jäsenet avustavat MCT-proteiineja*

Kaikki basigiiniperheen jäsenet toimivat avustavina proteiineina MCT-proteiineille. Basigiini toimii avustavana proteiinina MCT1:lle, -3:lle ja -4:lle (Kirk ja muut 2000). Neuroplastiini puolestaan avustaa MCT2:ta ainakin joissakin neuronipopulaatioissa (Wilson ja muut 2013). Embigiini toimii avustavana proteiinina MCT2:lle (Wilson ja muut 2005).

Basigiini voi MCT1:n, -3:n ja -4:n avustamisen lisäksi avustaa myös MCT2:ta poikkeustilanteissa, kun embigiiniä ei ole soluissa (Ovens ja muut 2010). Lisäksi basigiinin ilmentymisen on myös havaittu kasvavan neuroplastiinihiljennettyjen hiirien etuaivoissa, jolloin se saattaa heikommasta sitoutumisesta huolimatta toimia avustavana proteiinina MCT2:lle ja korvata joitakin neuroplastiinin tehtäviä. (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014; Montag, D., Kaehne, T. ja Smalla, K.-H., julkaisematon tulos.) Lisäksi basigiini saattaa avustaa MCT2:ta myös spermatogeneesissä (Mannowetz ja muut 2012).

Embigiini voi olla vuorovaikutuksessa myös MCT1:n kanssa joissakin tietyissä kudoksissa, kuten rotan punasoluissa (Poole ja Halestrap 1997). MCT1 sitoutuu kuitenkin basigiiniin voimakkaammin, joten basigiini avustaa sitä pääasiassa. Lisäksi aikuisissa jyrsijöissä embigiiniä ilmentyy vähemmän kuin basigiinia, mikä tukee tätä väitettä. (Ovens ja muut 2010.)

Embigiiniä ilmentyy voimakkaasti vain alkionkehityksen alkuvaiheessa ja sen vuorovaikutusta MCT2:n kanssa alkionkehityksessä ei ole tutkittu. Embigiiniä ilmentyy jonkin verran aikuisen aivoissa ja joissakin neuroneissa, mutta sen tarkkaa lokalisaatiota aivoissa ei ole tutkittu. Aikuisen hiiren aivoissa ilmentyvät Np55 ja Np65 puolestaan vaikuttavat olevan pääasialliset MCT2:ta avustavat proteiinit ainakin osassa neuronityypeistä. Embigiini ja neuroplastiini saattavat siis molemmat olla MCT2:ta avustavia proteiineja eri neuronityypeissä. (Wilson ja muut 2013.)

Jokaisella basigiiniperheen jäsenellä on samassa kohtaa solukalvon läpäisevässä osassa negatiivisesti varautunut glutamaatti (Glu<sub>218</sub>, E218), mikä epätyypillistä yhden kerran solukalvon läpäiseville proteiineille. Glu<sub>218</sub> saattaa siis olla tärkeä aminohappo basigiiniperheen jäsenten toiminnalle. Kuitenkaan basigiinin Glu<sub>218</sub> ei ollut välttämätön MCT1:n avustamiselle, joten sen vaikutusta perheen jäsenten toimintaan pitäisi tutkia vielä lisää. (Manoharan ja muut 2006.)

#### *4.4.2 Basigiini ja embigiini voivat osallistua spermatogeneesin säätelyyn*

Basigiini on tärkeä sekä naaras- että uroshiirien hedelmällisyydelle. Uroksissa se liittyy sukusolujen erilaistumiseen kiveksissä, koska basigiini KO -hiirissä spermatogeneesi estyy ensimmäisen meioosin aikana (Igakura ja muut 1998.) Aiemmin embigiinistä ei ole ollut saatavilla KO -hiiriä, joten siksi sen toiminnasta aikuisissa hiirissä ei tiedetä vielä paljoa, kuten tehtävästä lisääntymiselimissä (Mannowetz ja muut 2012).

Basigiinin on havaittu ilmentyvän spermatideissa ja siittiöiden hännissä ja embigiinin siittiöiden hännissä ja lisäkiveksen runko- ja häntäosassa. Myös MCT1 ja MCT2 ilmentyivät siittiöiden häntäosissa, joten kaikki nämä proteiinit saattavat olla tärkeitä lisäkiveksessä sperman kypsymisen ja elinkelpoisuuden kannalta, ja ne voivat osallistua spermatogeneesin säätelyyn. (Mannowetz ja muut 2012.) Kypsissä siittiöissä MCT1 ja MCT2 kolokalisoitui vain basigiinin kanssa mutta ei embigiinin kanssa. Basigiini on siis luultavasti myös tärkeä MCT1:n ja MCT2:n lokalisoinnissa ja siten laktaatin talteenotossa ja energiansaannissa valmiissa siittiöissä. (Mannowetz ja muut 2012.)

#### *4.4.3 Basigiiniperheen jäsenet saattavat liittyä syövän etenemisen säätelyyn*

Basigiini on usein yli-ilmentyneenä tuumorisoluisissa (katsausartikkelissa Muramatsu 2016). Sitä ilmentyy erityisesti pahanlaatuisissa syövässä, kuten rinta-, munasarja-, virtsarakko- ja keuhkosyövässä, glioomissa, melanoomissa sekä lymfoomissa (katsausartikkelissa Yan ja muut 2005). Basigiinia ilmentyy myös monissa syövän mikrometastaaseissa (Klein ja muut 2002; Reimers ja muut 2004). Sen ilmentyminen saattaa olla merkki syövän pahanlaatuisuudesta. Esimerkiksi embigiiniä ei juuri havaittu eturauhassyövässä, kun taas basigiinin havaittiin olevan markkeri eturauhassyövän pahanlaatuisuudelle (Pértega-Gomes ja muut 2011). Basigiini luultavasti indusoi soluissa monia pahanlaatuisiin syöpiin liittyviä ominaisuuksia, kuten invasiivisuutta, angiogeneesiä ja ankkuroitumisesta riippumatonta kasvua. Siihen kohdentuvat terapeutit hoidot voisivat olla uusia ja mahdollisesti tehokkaita vaihtoehtoja nykyisille syöpähoidoille. (katsausartikkelissa Yan ja muut 2005.)

Basigiinilla ja embigiinillä voi olla rakenteessaan  $\beta$ 1,6-haaroittuneita *N*-glykaaneja, joihin galektiini-3-proteiini voi sitoutua (Krishnan ja muut 2005). Galektiini-3:lla on tärkeä tehtävä esimerkiksi haavan paranemisprosessissa sekä syövän invaasioissa ja metastaasissa (Cao ja muut 2002; katsausartikkelissa Takenaka ja muut 2002). Basigiini ja embigiini voivat siis olla vuorovaikutuksessa galektiini-3-proteiinin kanssa, joten niillä saattaa olla tärkeä tehtävä syövän etenemisessä (Dange ja muut 2017). Lisäksi basigiini voi aiheuttaa MMP-proteiinien stimulaation galektiini-3:n välityksellä (Mauris ja muut 2014).

Embigiinin vaikutusta eri sairauksiin ei ole juuri tutkittu, mutta se saattaa liittyä tuumorigeneesiin (Guenette ja muut 1997). Embigiini ilmentyy eri kehitysasteisissa embryonaalisissa karsinomasoluissa, joten se saattaa liittyä syövän kehittymiseen (Huang ja muut 1990). Lisäksi embigiinin ilmentyminen on muuttunut eturauhas- ja rintasyöpäsoluissa verrattuna normaaleihin eturauhas- ja rintaepiteelikudoksiin, joten se saattaa liittyä solujen pahanlaatuisuuteen (Guenette ja muut 1997).

Transkriptiotekijä HOXC8 säätelee embigiinin ilmentymistä hiiren embryonaalisissa fibroblasteissa (Lei ja muut 2006), ja se kuuluu homeoboksi (HOX) -perheeseen ja osallistuu useisiin fysiologisiin ja patologistiin prosesseihin, kuten hiiren alkiokehitykseen ja ihmisen tuumorigeneesiin (Lei ja muut 2005). HOXC8:lla on tärkeä tehtävä monien syöpien etenemisessä, esimerkiksi rintasyövässä (Li ja muut 2010). HOXC8 säätelee embigiinin ilmentymistä rintasyöpäsoluissa estämällä sen transkriptiota. Embigiinin hiljentäminen rintasyöpäsoluista ja normaaleista rintasoluista lisäsi solujen jakaantumista, ankkuroitumisesta riippumatonta kasvua ja migraatiota. Lisäksi embigiinillä saattaa olla rintasyövän etenemistä estävä vaikutus, ja sen alhainen ilmentyminen tai puuttuminen basaalityyppisistä rintasyövästä on luultavasti merkki potilaiden huonosta selviytymisestä ja syövän pahanlaatuisuudesta. (Chao ja muut 2015.)

Embigiini ilmentyy myös haimasyöpäsoluissa ja sen hiljentämisen havaittiin vähentävän solujen jakaantumista, migraatiota, invaasiota, haavan paranemista sekä MMP2:n ja MMP9:n ilmentymistä. Hiljennys myös lisäsi solujen sisäisen L-laktaatin konsentraatiota ja vähensi MCT2:n määrää solukalvolla. Embigiini saattaa olla osana transformoiva kasvutekijä  $\beta$  -signaalikaskadia haimasyöpäsoluissa ja se saattaa myös liittyä haimasyövän kehityksessä epiteeli-mesenkyymi-transitioon, jota on pidetty tärkeänä vaiheena metastaasin alun tapahtumissa. (Jung ja muut 2016.)

Neuroplastiini saattaa edistää rintasyöpäkasvainten kasvua ja metastaasia, ja Np55 on potentiaalinen biomarkkeri rintasyövälle. Osassa rintasyöpiä on havaittu FGFR1:n määrän on lisääntyneen. (katsausartikkelissa Fearon ja muut 2013.) On siis mahdollista, että FGFR:n aktivoitumisella Np55:n kautta on tehtävä joissakin rintasyöpätyypeissä (katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014). Muissa syövässä neuroplastiinin tehtävää ei ole vielä tutkittu.

#### *4.4.4 Basigiiniperheen jäsenillä voi olla merkittävä tehtävä soluadheesiossa*

Monilla IgSF-perheen proteiineilla on tärkeä tehtävä solun eri toiminnoissa, kuten soluadheesiossa, solujen liikkumisessa ja signaalien välityksessä. Basigiiniperheen jäsenillä saattaa myös siis olla merkittävä tehtävä joissakin näistä tapahtumista. (Miyachi ja muut 1991; Huang ja muut 1993.)

Basigiinin on havaittu sitoutuvan integriineihin (Berditchevski ja muut 1997). Se saattaa siis säädellä integriini-laminiini-vuorovaikutusta ja siten sillä voi olla tärkeä tehtävä solu-ECM-vuorovaikutuksissa (katsausartikkelissa Iacono ja muut 2007). Neuroplastiinit puolestaan saattavat olla merkittäviä solu-ECM-vuorovaikutusta edistäviä soluadheesiomolekyylejä neuroneissa (Owczarek ja muut 2011). Embigiinin välittämä soluadheesio saattaa liittyä integriineihin, ja se mahdollisesti avustaa näiden toimintaa solu-ECM-vuorovaikutuksissa (Huang ja muut 1993). Lisäksi monet IgSF-proteiineista osallistuvat solu-solu-vuorovaikutuksiin homofiilisten kontaktien avulla (katsausartikkelissa Huang ja muut 1997). Basigiinilla ja neuroplastiinilla ollaan havaittu homofiilistä interaktiota, kun taas embigiinillä homofiilistä sitoutumista ei ole tutkittu (Hanna ja muut 2003, Smalla ja muut 2000).

## **Osa II: Kokeellinen osa**

*Embigiini - uusi fibronectiinireseptori*



## 5 TYÖN TAVOITTEET

Embigiini saattaa olla solun kasvuun ja kehitykseen liittyvä glykoproteiini, joka välittää solun ja soluväliaineen välisiä vuorovaikutuksia (Huang ja muut 1993), joten se on luultavasti vuorovaikutuksessa joidenkin solun adheesiomolekyylien ja soluväliaineen molekyylien kanssa (Guenette ja muut 1997). Aiemmin tutkimusryhmässämme ihmisen embigiinin N-terminaalisen solun ulkopuolisen osan on havaittu sitoutuvan soluväliaineeproteiineista erityisesti fibronektiiniin. Embigiini voisi mahdollisesti avustaa fibronektiini-molekyylien oikenemistä ja siten edistää fibronektiinisäkeiden muodostumista.

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää embigiinin toimintaa proteiinitasolla fibronektiinireseptorina tutkimalla sen sitoutumismekanismia fibronektiiniin tekemällä rekombinantisti tuotetun embigiinin rakenteeseen mahdollisesti sitoutumisen estäviä mutaatioita. Solutasolla tavoitteena oli tutkia embigiinin tehtävää soluadheesiossa luomalla ihmisen embigiinihiljennetty solulinja. Lisäksi yritettiin löytää toimiva kaupallinen ihmisen embigiinivasta-aine.

## 6 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 6.1 Proteiinitason tutkimukset

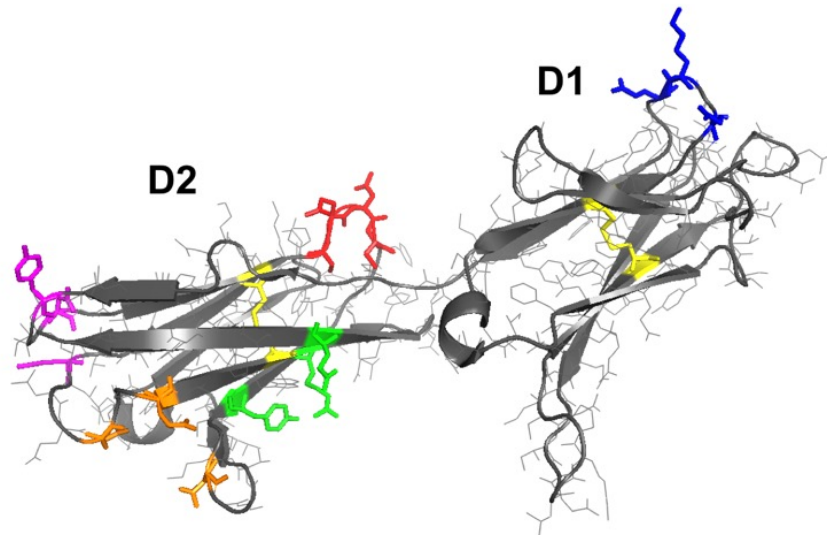
#### 6.1.1 Villityypin ja mutatoitujen embigiinien tuotto ja puhdistus

Ihmisen embigiinin solun ulkopuolisesta osasta oli tehty malli (kuva 5, rakenteen laatinut yhteistyöprojektissa Tiina Salminen, Åbo Akademi) ja tilattu Eurofins Genomicsilta *Escherichia coli*n optimoitujen villityypin (*engl.* wild type, WT) ja viiden erilaisen mutantin plasmidikonstruktit. Mutanteissa (Mut1-5) tietyt aminohapot oli muutettu alaniiniksi embigiinin rakenteessa (taulukko 1). Plasmidikonstruktioiden *EMB*-geenit oli siirretty pGex-2T-tuottovektoriin, joka lisäsi *EMB*-geenin perään Glutathioni-S-transferaasi-proteiinin (*engl.* glutathione S-transferase, GST) geenin, BamHI- ja EcoRI-restriktiokohtien avulla. Siirron onnistuminen tarkistettiin sekvensoimalla (Eurofins Genomics).

*EMB*-GST:tä tuotettiin BL21 *E. coli*-soluissa (Novagen, Millipore), joihin oli transformoitu *EMB*-geenit sisältävät plasmidit. Tuottoa kokeiltiin myös Shuffle T7 (New England Biolabs) ja Origami 2(DE3) (Novagen, Millipore) *E. coli* -soluilla. Tehtiin 50 ml:n esikasvatus LB-mediumissa, johon oli lisätty 100 µg/ml ampisilliini-antibioottia, yön yli +37 °C:ssa 225 rpm ravistelussa. Varsinainen tuottokasvatus tehtiin yhteensä viidessä litran LB-medium-kasvatuksissa, joihin oli lisätty 100 µg/ml ampisilliinia ja joihin siirrettiin 10 ml esikasvatusta. Tätä kasvatettiin +37 °C:ssa 200 rpm ravistelussa, kunnes OD<sub>600</sub> oli noin 0,6-0,8. Proteiinin tuotto indusoidiin lisäämällä kasvatukseen 0,1 mM isopropyli-β-D-tiogalaktosidia (*engl.* isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG, Sigma-Aldrich) ja kasvatusta jatkettiin huoneenlämmössä (*engl.* room temperature, RT) noin kuusi tuntia. Solut kerättiin sentrifugoimalla 6 200 x g 10 min +4 °C:ssa ja solupelletit säilytettiin -20 °C:ssa.

Taulukko 1. *Escherichia coli*in optimoitujen EMB WT:n ja EMB-mutanttien aminohapposekvenssit

EMB	Aminohapposekvenssi (alaniiniksi muutetut aminohapot merkitty eri värein)
WT	DGSAPDSPFTSPPLREEIMANNFSLESHNLSLTHESSMPVEKNITLERPSNVNLTQCFITSG DLNAVNVTWKKDGEQLENNYLVSATGSTLYTQYRFTIINSKQMGSYSCFFR <b>EEKE</b> QRGTF NFKVPELHGKNKPLIS <b>YVG</b> DSTVLTK <b>CQNC</b> FPLNWTW <b>YSS</b> NGSVKVPVGVQMNKYVI NGTYANETKLKIT <b>QLLE</b> EDGESYWC <b>R</b> ALFQLGESE <b>EE</b> HIELVVLSYLVP
Mut1	DGSAPDSPFTSPPLREEIMANNFSLESHNLSLTHESSMPVEKNITLERPSNVNLTQCFITSG DLNAVNVTWKKDGEQLENNYLVSATGSTLYTQYRFTIINSKQMGSYSCFFR <b>AEAA</b> QRGT FNFKVPPELHGKNKPLISYVGDSTVLTKCQNC <b>F</b> PLNWTWYSSNGSVKVPVGVQMNKYVI NGTYANETKLKITQLLEEDGESYWC <b>R</b> ALFQLGESE <b>EE</b> HIELVVLSYLVP
Mut2	DGSAPDSPFTSPPLREEIMANNFSLESHNLSLTHESSMPVEKNITLERPSNVNLTQCFITSG DLNAVNVTWKKDGEQLENNYLVSATGSTLYTQYRFTIINSKQMGSYSCFFR <b>EEKE</b> QRGTF NFKVPELHGKNKPLIS <b>AVG</b> ASTVLTKCQNC <b>F</b> PLNWTWYSSNGSVKVPVGVQMNKYVI NGTYANETKLKIT <b>ALLE</b> EDGESYWC <b>R</b> ALFQLGESE <b>EE</b> HIELVVLSYLVP
Mut3	DGSAPDSPFTSPPLREEIMANNFSLESHNLSLTHESSMPVEKNITLERPSNVNLTQCFITSG DLNAVNVTWKKDGEQLENNYLVSATGSTLYTQYRFTIINSKQMGSYSCFFR <b>EEKE</b> QRGTF NFKVPELHGKNKPLISYVGDSTVLTKCQNC <b>F</b> PLNWTW <b>ASS</b> NGSVKVPVGVQMNKYVI NGTYANETKLKITQLLEEDGESYWC <b>A</b> ALFQLGES <b>A</b> E <b>H</b> IELVVLSYLVP
Mut4	DGSAPDSPFTSPPLREEIMANNFSLESHNLSLTHESSMPVEKNITLERPSNVNLTQCFITSG DLNAVNVTWKKDGEQLENNYLVSATGSTLYTQYRFTIINSKQMGSYSCFFR <b>EEKE</b> QRGTF NFKVPELHGKNKPLISYVGDSTVLTKCQNC <b>F</b> PLNWTWYSS <b>A</b> GSVKVPVGVQMNKYVIN GTYANETKLKITQLLE <b>ADG</b> ASYWC <b>R</b> ALFQLGESE <b>EE</b> HIELVVLSYLVP
Mut5	DGSAPDSPFTSPPLREEIMANNFSLESHNLSLTHESSMPVEKNITLERPSNVNLTQCFITSGD LNAVNVTWKKDGEQLENNYLVSATGSTLYTQYRFTIINSKQMGSYSCFFR <b>EEKE</b> QRGTFN FKVPELHGKNKPLISYVGDSTVLTK <b>AAAA</b> FPLNWTWYSSNGSVKVPVGVQMNKYVING TYANETKLKITQLLEEDGESYWC <b>R</b> ALFQLGESE <b>EE</b> HIELVVLSYLVP



**Kuva 5. Mutaatiot embigiinin rakenteessa.** Malli embigiinin solun ulkopuolisen osan rakenteesta, joka muodostuu kahdesta immunoglobuliinidomeenista. Seuraavat aminohapot mutatoitiin alaniiniksi embigiinin rakenteessa: **Mut1**: Glu146, Lys148 ja Glu149 (D1), **Mut2**: Tyr171, Asp174 ja Gln226 (D2), **Mut3**: Tyr193, Arg238 ja Glu247 (D2), **Mut4**: Asn196, Glu230 ja Glu233 (D2) ja **Mut5**: Cys182, Gln183, Asn184 ja Cys185 (D2). Ig-domeenien sisäiset rikkisillat on merkitty keltaisella.

Solut suspensoitiin vorteksoimalla kylmään fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (*engl.* phosphate buffered saline, PBS) kokonaistilavuuteen 25 ml ja hajotettiin sonikoimalla kuusi kertaa 15 s jaksoissa jäähauteessa 30 s tauoilla pienemmällä tai isommalla sonikointikärjellä. Tämän jälkeen liuokseen lisättiin 2 % (V/V) Triton X-100 (MP Biomedicals) ja sitä inkuboitiin 30 min pyörytyksessä +4 °C:ssa. Solujätteistä päästiin eroon sentrifugoimalla 35 000 x g 10 min +4 °C ja supernatantin joukkoon lisättiin 2 ml 50 % (V/V) glutationisefaroodia PBS:ssä (Macherey-Nagel). Näytettä inkuboitiin 30 min pyörytyksessä +4 °C:ssa. Matriksi sentrifugoitiin 500 x g 10 min +4 °C, suurin osa nesteestä kaadettiin pois ja matriksi siirrettiin 10 ml pylvääseen, jossa sitä pestiin yhteensä 30 ml PBS:llä. Proteiini eluutiin matriksista 4 ml:lla 30 mM pelkistyneellä glutationilla (Acros Organics), jonka ensin annettiin vaikuttaa pylväässä 10 min RT. Eluutiosta kerättiin 0,5 ml:n fraktioita ja näiden näytteiden proteiinipitoisuudet arvioitiin lisäämällä niitä 1:1000 Bradford-reagenssiin (Bio-Rad Protein Assay), joka oli laimennettu 1:5 PBS:llä valmistajan ohjeen mukaan. Eniten proteiinia sisältävät fraktiot yhdistettiin ja dialysoitiin dialyysikasetin (Slide-A-lyzer Dialysis Casette, 10 000 MWCO, Thermo Scientific) avulla yön yli PBS:ssä +4 °C:ssa. Dialysoitujen näytteiden proteiinipitoisuudet määritettiin Bradford-reagenssin avulla (Bio-Rad Protein Assay) valmistajan ohjeen mukaan. Standardina käytettiin naudan seerumin albumiinia (*engl.* bovine serum albumin, BSA).

Proteiinien puhtaus ja laatu tarkistettiin ajamalla osasta puhdistetuista EMB-GST-proteiineista näytteet PhastSystem-laitteella natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesigeelille (*engl.* sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) (GE Healthcare). Geeli ajettiin laitteen SDS-PAGE-ohjelmalla ja se värjättiin Coomassie-värillä laitteen värjäysohjelmalla ja kuvattiin.

### 6.1.2 EMB-GST-proteiinien fibronektiiniin sitoutumisen tutkiminen EuLISA-kokeella

WT:n ja mutantti-EMB-GST-proteiinien sitoutumista fibronektiiniin ja BSA:han tutkittiin europium-välitteisellä immunosorbenttimäärityksellä (*engl.* europium-linked immunosorbent assay, EuLISA). Kutakin EMB-GST-proteiinia tuotettiin ja testattiin useita eriä ja parhaiten toimivista eristä tehtiin sitoutumiskäyrät. GST-proteiinia käytettiin sitoutumisen kontrollina. Delfia Microtitration (high binding) -levyn (PerkinElmer) kuopat päällystettiin  $5,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  fibronektiinilla (Fibronectin from human plasma, F1056, Sigma-Aldrich) ja kontrollikuopat BSA:lla (Diluent II BSA 3,75 % (m/V), PerkinElmer), jotka oli laimennettu PBS:ään. Levyjä inkuboitii yön yli  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ :ssa. Seuraavana päivänä kuoppien sitoutumattomat kohdat päällystettiin Diluent II:lla 1 h RT, jonka jälkeen kuopat pestiin PBS:llä. Kuoppiin lisättiin 39, 78, 156, 313, 625, 1 250, 2 500 tai 5 000 ng WT EMB-GST:tä tai mutatoituja EMB-GST:itä koepuskurissa (Delfia Assay Buffer, PerkinElmer) 100  $\mu\text{l}$ :n tilavuudessa. GST-proteiinia käytettiin puolet EMB-GST-määristä, koska GST:n koko (26 kDa) on puolet EMB-GST:n koosta (noin 52 kDa). Jokaisesta näytteestä valmistettiin kolme rinnakkaista näytettä. Näytteitä inkuboitii 1 h RT, jonka jälkeen kaivot pestiin kolmesti PBS:llä. Kuoppiin lisättiin 1:1000 europium-leimattua GST-vasta-ainetta (Delfia Eu-N1-anti-GST, PerkinElmer) koepuskurissa. Vasta-ainetta inkuboitii 1 h RT ja kaivot pestiin kolmesti PBS:llä. Sitoutumisen fluoresenssi aktivoitiin lisäämällä 100  $\mu\text{l}$  Delfia Enhancement -liuosta (PerkinElmer) ja europium-leiman aikaerotteisia fluoresenssiarvoja mitattiin minuutin päästä Victor 2 -laitteella (PerkinElmer). Sitoutumisen fluoresenssiarvoista piirrettiin kuvaajat ja niistä laskettiin sitoutumisten voimakkuudet Origin8-ohjelmalla.

### 6.1.3 Embigiinin homofiilisen interaktion tutkiminen Biacorella

Embigiini-embigiini-sitoutumista tutkittiin Biacore X -laitteella (GE Healthcare Life Sciences). Biacoren levyn (Sensor Chip CM5, GE Healthcare Life Sciences) yksi kanava päällystettiin EMB-GST-proteiinilla (0,1 mg/ml 10 mM natriumasetaattipuskurissa, pH 5) ja toinen GST:llä (0,05 mg/ml natriumasetaattipuskurissa, pH 5) valmistajan ohjeen mukaan. EMB-GST:n sitoutumista näihin kanaviin testattiin 0,3 mg/ml pitoisuudessa ja fibronektiinin sitoutumista 0,05 mg/ml pitoisuudessa HEPES-puskuroidussa suolaliuoksessa (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM etyleenidiamiinitetraetikkahappo (*engl.* ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 0.005% (V/V) surfaktantti P20).

## 6.2 Solutason tutkimukset

### 6.2.1 Käytetyt solulinjat

Tutkimuksissa käytettiin neljää eri ihmisen solulinjaa: MG-63- (tilattu American Type Culture Collectionilta, ATCC), LNCaP- (saatu Daniel Abankwan ryhmältä), DU145- (ATCC) ja HeLa-soluja. MG-63- ja HeLa-soluja kasvatettiin DMEM-mediumissa (Lonza) ja LNCaP- ja DU145-soluja RPMI-mediumissa (Lonza), joihin oli lisätty 10 % (V/V) naudan sikiön seerumi (*engl.* fetal calf serum, FCS, PromoCell), 2  $\mu$ M L-glutamiini (Lonza), 100 U/ml penisilliini ja 0,1 mg/ml streptomysiini (Sigma-Aldrich), 37 °C:ssa ja 5 % CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa. Solujen pesemiseen käytettiin PBS:ää (Lonza) ja irrotukseen trypsiini-EDTA:ta (Lonza). Selektiivisenä antibioottina käytettiin puromysiiniä (Gibco) CRISPR/Cas9-hiljennyksessä 2  $\mu$ g/ml pitoisuudessa ja lentivirushiljennyksessä 0,5  $\mu$ g/ml pitoisuudessa.

### 6.2.2 Embigiinin hiljennys CRISPR/Cas9-menetelmällä MG-63-soluista

Embigiini yritettiin hiljentää MG-63-soluista CRISPR/Cas9-tekniikalla. Kolme erilaista embigiini CRISPR/Cas9 KO -plasmidia (sc-408321, Santa Cruz Biotechnology) sekä embigiini HDR -plasmidi (sc-408321-HDR, Santa Cruz Biotechnology) transfektoitiin edellisenä päivänä 6-kuoppalevyille jaettuihin soluihin HilyMax-transfektioagenssilla (Dojindo Molecular Technologies) valmistajien ohjeiden mukaan. Testattiin seuraavia DNA ( $\mu\text{g}$ ): HilyMax ( $\mu\text{l}$ ) -suhteita: 1:3, 1:5 ja 1:7. Plasmidi-DNA:ta käytettiin 1  $\mu\text{g}$ /kuoppa ja kontrollisoluille laitettiin pelkkä HilyMax-reagenssi. Medium vaihdettiin seerumilliseen (10 % FCS) DMEMiin 4 h inkuboinnin jälkeen. Inkubointia jatkettiin 72 h ja transfektion onnistuminen tarkistettiin soluista embigiini CRISPR/Cas9 KO -plasmidien sisältämän vihreän fluoresoivan proteiinin (*engl.* green fluorescent protein, GFP) ja embigiini HDR -plasmidin sisältämän punaisen fluoresoivan proteiinin (*engl.* red fluorescent protein, RFP) avulla Evos-konfokaalimikroskoopilla (ThermoFisher Scientific). MG-63 WT -soluille optimaalista puromysiinipitoisuutta testattiin välillä 1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ja hiljennetyille soluille aloitettiin 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  puromysiini-antibioottiselektio. Selektio lopetettiin viiden päivän jälkeen ja parhaiten kasvaneista 1:5 (DNA ( $\mu\text{g}$ ): HilyMax ( $\mu\text{l}$ ) -suhteella käsitellyistä soluista kasvatettiin yksisolukloonit.

Hiljennystä kokeiltiin uudelleen MG-63 EMB KO 32 -heterotsygoottisoluista (*engl.* EMB KO heterozygote,  $\text{EMB}^{+/-}$ ). Hiljennys tehtiin kuten aiemmin, paitsi tällä kertaa hiljennettävät solut olivat 10 cm:n maljalla, DNA ( $\mu\text{g}$ ): HilyMax ( $\mu\text{l}$ ) -suhteena käytettiin edellisellä yrityksellä tehokkaimmaksi havaittua 1:7-suhdetta ja plasmidi-DNA:ta käytettiin 6  $\mu\text{g}$ . Solut lajiteltiin virtaussytometrillä fluoresenssi-aktivoidulla solulajittelulla (*engl.* fluorescence-activated cell sorting, FACS) GFP- ja RFP-leimojen perusteella FACSAria IIu -laitteella (BD Biosciences) 72 h inkuboinnin jälkeen. Näistä soluista kasvatettiin yksisolukloonit.

### 6.2.3 Embigiinitasojen tarkistus hiljennetyistä MG-63-soluista

Embigiinitasoja tarkasteltiin hiljennetyissä MG-63-soluissa kvantitatiivisella PCR:llä (*engl.* quantitative PCR, TaqMan qPCR), western blot -menetelmällä (WB) ja immunofluoresenssimikroskopiassa (*engl.* immunofluorescence, IF).

**TaqMan**-analyysia varten RNA eristettiin 6-kuoppalevyille jaetuista MG-63 WT- ja EMB KO -soluista TRIsure-reagenssilla (Bioline) valmistajan ohjeen mukaan. TRIsurea käytettiin 0,5 ml/kuoppa. RNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä (ThermoFisher Scientific). RNA:lle ei tehty DNAasi-käsittelyä. RNA:sta valmistettiin komplementaarista DNA:ta (*engl.* complementary DNA, cDNA) SensiFAST cDNA Synthesis -kitillä (Bioline) valmistajan ohjeen mukaan ja RNA:ta käytettiin 1 µg. TaqMan-reaktiosekset tehtiin ABI TaqMan Universal Master Mix II -liuokseen (ThermoFisher Scientific). Ihmisen embigiinialukkeista ja -koettimesta käytettiin valmista liuosta (TAQMAN GENE EX ASSAYS MTO, Hs00904660\_m1 FAM-MGB, ThermoFisher Scientific). Ihmisen β-aktiini- ja glyseraldehydi-3-fosfaatti-dehydrogenaasi (*engl.* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) -alukkeita käytettiin 3 µM ja -koetinta 2 µM pitoisuuksissa (Biotekniikan keskus, Turun yliopisto, sekvenssit esitetty taulukossa 2). TaqMan-reaktioseoksia (EMB, β-aktiini tai GAPDH) lisättiin 8 µl/kuoppa ja cDNA:ta käytettiin laimentamattomana 2 µl/reaktio. Näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaista näytettä, ne ajettiin TaqMan-ajopalvelussa (Biotekniikan keskus, Turun yliopisto) ja tulokset analysoitiin QuantStudio-ohjelmalla (Applied Biosystems). Solujen embigiinitasot suhteutettiin β-aktiiniin ja GAPDH:hon Microsoft Excel -ohjelmalla, ja embigiinihiljentyneet solut valikoitiin näiden tulosten perusteella.

**Taulukko 2. TaqMan qPCR:ssä käytetyt β-aktiini- ja GAPDH-alukkeet ja -koettimet**

Sekvenssi (5'→3')		
<b>β-aktiini</b>	Forward-aluke	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG C
	Reverse-aluke	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G
	Koetin	FAM-ATG CCC TCC CCCA TGC CAT CCT GCG T-BHQ
<b>GAPDH</b>	Forward-aluke	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA
	Reverse-aluke	TTG CTG TAG CCA AAT TCG TTG T
	Koetin	FAM-ACG ACC ACT TTG TCA AGC TCA TTT CCT GGT- BHQ



**WB**-analyysia varten 6-kuoppalevyillä kasvatetut MG-63 WT- ja EMB KO -solut hajotettiin 100 µl:aan lyysispuskuriin (1% (V/V) Triton X-100, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 10 µg/ml aprotiniini, 10 µg/ml leupeptiini, 2 mM fenyyylimetyylisulfonyyli fluoridi (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) ja näytteen proteiinipitoisuudet mitattiin Bradfordin menetelmällä (Bio-Rad Protein Assay) valmistajan ohjeen mukaan. Geelinäytteet valmistettiin SDS-näytekuriin (1,7 % (m/V) SDS, 5 % (V/V) glyseroli, 0,05 M Tris-HCl pH 6,8, 1,6 % (m/V) ditiotreitol (*engl.* dithiothreitol, DTT), 0,002 % bromofenolinen sininen) ja niitä kuumennettiin 98 °C:ssa 5 min. Proteiinit eroteltiin toisistaan ajamalla 30 µg näytteitä 10 % SDS-PAGE-geelille (alageelin akryyliamidipitoisuus 10 % (V/V) ja ylägeelin 4 % (V/V)) ja siirrostettiin PVDF-membraanille (EMD Millipore) o/n 40 V 4 °C. Kokomarkkerina käytettiin BlueStar Prestained Protein Markeria (Nippon Genetics). Membraanin sitoutumattomat kohdat päällystettiin blokkauksliuoksessa (5 % (m/V) maitojauhe ja 1 % (m/V) BSA Tween-20:tä sisältävässä tris-puskuroidussa suolaliuoksessa (*engl.* tris-buffered saline + Tween 20, TBST: 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05 % (V/V) Tween 20)) 30 min RT ja siitä määritettiin ihmisen embigiini (1:1000 anti-embigin homolog rabbit mAb, ab179801, Abcam) ja β-aktiini (1:1000 Actin antibody I-19 sc-1616, goat pAb, Santa Cruz Biotechnology) TBST:ssä 1 h RT pyöryksessä. Membraani pestiin 4 kertaa 5 min TBST:ssä ja inkuboitettiin sekundääriivasta-aineissa (1:15 000 IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) ja 680RD Donkey anti-Goat IgG (H + L), LI-COR Biosciences) TBST:ssä 1 h RT valolta suojattuna. Membraani pestiin 4 kertaa 5 min TBST:ssä ja skannattiin lähi-infrapunafluoresenssiin perustuvalla Odyssey CLx -laitteella (LI-COR Biosciences).

**IF**-mikroskopiaa varten MG-63 WT- ja EMB KO (EMB<sup>+/-</sup> 32) -solut jaettiin peitinlaseille. Seuraavana päivänä medium pestiin pois PBS:llä, solut kiinnitettiin lasille metanolilla 5 min RT ja lasit huuhdeltiin PBS:llä. Soluista värjättiin ihmisen embigiini (1:100 Anti-Embigin homolog antibody ab127692, Abcam) ja fibronektiini (1:100 Anti-Fibronectin antibody IST-9 ab6328, Abcam) 3 % (m/V) BSA-PBS:ssä 1 h RT. Näytteet pestiin kolme kertaa, lisättiin sekundäärivasta-aineet (1:200 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit ja 555 goat anti-mouse, Invitrogen) sekä DAPI (1:1000, Sigma-Aldrich) 3 % (m/V) BSA-PBS:ssä ja inkuboitiin 45 min RT valolta suojattuna. Näytteet pestiin kolmesti PBS:llä, siirrettiin Mowiol-DABCO-pisaran (Calbiochem, Sigma-Aldrich) päälle mikroskooppilasille ja annettiin kuivua seuraavaan päivään +4 °C:ssa. Solut kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (Zeiss LSM510) ja kuvat käsiteltiin BioImage XD -ohjelmalla.

#### *6.2.4 Solujen fibronektiinille sitoutumisen mittaaminen xCELLigence-laitteella*

MG-63 WT- ja EMB KO -solujen (EMB<sup>+/-</sup> 1 ja EMB<sup>+/-</sup> 32) kykyä sitoutua ja levitä fibronektiinille verrattiin. Lisäksi kokeessa oli mukana hiljentymättömät solut (EMB<sup>+/+</sup> 20). Sitoutumisen kontrolleina käytettiin BSA:ta ja pelkkää muovia. Kultapäälystetyn 96-kuoppalevyn (E-Plate 96, ACEA Biosciences) kuopista osa päälystettiin 3 µg/cm<sup>2</sup> fibronektiinilla (Fibronectin from bovine plasma, Sigma-Aldrich) yli yön 4 °C:ssa. Tämän jälkeen kuoppien sitoutumattomat kohdat päälystettiin 1 % (m/V) BSA-PBS-liuoksella 1 h RT (pelkkää muovia ei päälystetty). Ennen mittauksen aloittamista xCELLigence RTCA -laite (ACEA Biosciences) kalibroitiin lisäämällä kuoppiin 50 µl seerumillista DMEM-mediumia. Solut irrotettiin 10 mM EDTA:lla, ne laskettiin ja niitä laitettiin 5 000 solua/kuoppa 100 µl:ssa seerumillista DMEM-mediumia, jolloin lopputilavuus oli 150 µl. Jokaisesta tehtiin 4 rinnakkaista. Solujen sitoutumista ja leviämistä seurattiin 5 h ja tuloksista piirrettiin käyrät.

### 6.2.5 Embigiinihiljennyksen tarkistus PCR:llä ja sekvensoimalla

Polymeraasiketjureaktion (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) avulla tarkistettiin, onko MG-63 EMB KO -soluista onnistuttu hiljentämään *EMB*-geeni. Soluista eristettiin genominen DNA (gDNA) NucleoSpin Tissue -kitillä (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeen mukaan. DNA-konsentraatiot mitattiin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä. PCR-alkukeet (taulukko 3) suunniteltiin siten, että ne sitoutuivat *EMB*-geenissä CRISPR/Cas9-hiljennyksessä leikkaantuneen alueen ympärille ja että ne tunnistivat embigiinin molemmat silmukointivariantit. PCR:ssä käytettiin Phusion-polymeraasia (Thermo Scientific), 50 µl reaktiilavuutusta ja 250 ng gDNA:ta. Ensin PCR:ssä testattiin kolmea eri alukkeiden anniilauksen eli sitoutumislämpötilaa (55, 60 ja 65 °C, PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 4) MG-63 WT-, EMB KO 1- ja EMB KO 28 -soluilla. Loppujen EMB KO -solujen PCR:ssä käytettiin optimaalisinta 60 °C sitoutumislämpötilaa. PCR-tuotteet ajettiin 1 % (m/V) agarosigeelille. Kokomarkkerina käytettiin O'GeneRuler 1 kb DNA ladder -markkeria.

**Taulukko 3. PCR:ssä käytetyt EMB-alkukeet**

EMB-alue	Sekvenssi (5'→3')	T <sub>m</sub>
Forward	AGG GCA TGC CTC TTG GTA AC	59,7
Reverse	CAG GCC AGG AAC AGG GAT TA	59,7

**Taulukko 4. PCR-ohjelma**

Lämpötila	Aika	
98 °C	30 s	
98 °C	10 s	X 28
55/60/65 °C	30 s	
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Sekvensointia varten MG-63 WT- ja EMB<sup>+/-</sup> (EMB KO 32) -solujen PCR-tuotteet ajettiin 2 % (m/V) agarosigeelille ja juovat eristettiin geeliltä NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-kitillä (Macherey-Nagel) valmistajan ohjeen mukaan. DNA:t lähetettiin sekvensoitaviksi Eurofins Genomicsille, ja EMB<sup>+/-</sup> ylemmän ja alemman juovan sekvenssejä vertailtiin embigiini WT:n sekvenssiin BLASTn-ohjelmalla (NIH).

### 6.2.6 HDR-plasmidin pysymisen tarkistus CRISPR/Cas9-käsitellyistä MG-63-soluissa

Tarkistettiin, onko CRISPR/Cas9-käsitellyissä MG-63-soluissa enää HDR-plasmidia tai sen sisältämää RFP:tä, koska HDR-plasmidia ei havaittu PCR-geelillä hiljennyksen onnistumisen tarkistuksessa. Viiden eri EMB<sup>+/-</sup>-solujen (1, 4, 5, 32 ja 36) RFP-tasoja tarkasteltiin virtausytometrillä, ja WT-soluja käytettiin kontrollina. 6-kuoppalevylle jaetut solut irrotettiin ja pestiin PBS:ssä (fuugaus 250 x g 4 min RT). Solut blokattiin 1 % (V/V) FCS-PBS:ssä 30 min jäällä, pestiin kahdesti kylmässä PBS:ssä (fuugaukset 250 x g 4 min + 4 °C) ja suspensoitiin PBS:ään. Solut ajettiin FACSCalibur-laitteella (BD Biosciences), RFP-signaaleista tehtiin kuvaaja Flowing Software-ohjelmalla ja käyrien geometriset keskiarvot määritettiin. Lisäksi Evos-konfokaalimikroskoopilla (ThermoFisher Scientific) tarkistettiin solujen RFP-tasot ja solujen puromysiiniresistenttyyttä testattiin kasvattamalla soluja 2 µg/ml puromysiiniä sisältävässä mediumissa.

### 6.2.7 Embigiinitasojen vertailu eri soluissa ja hiljennys lentivirusmenetelmällä

Ihmisen eri solulinjojen embigiinitasoja verrattiin keskenään Genevestigator-ohjelmalla mRNA-tasojen perusteella (Affymetrix-sirudata), ja uuteen hiljennykseen valittiin MG-63-soluja enemmän embigiiniä ilmentävä solulinja. Embigiini yritettiin hiljentää mRNA-tasolla DU145-eturauhassyöpäsoluista pGIPZ-plasmideihin pakattujen lentiviruspartikkeleiden avulla (VGH5526-EG133418 GIPZ Lentiviral shRNA Viral Particle Starter Kit, GE Dharmacon), jotka sisälsivät jonkin seuraavista kolmesta embigiinin molempiin silmukointimuotoihin kohdentuvasta lyhyestä hiuspinni-RNA:sta (*engl.* short hairpin RNA, shRNA): V2LHS\_27304, V2LHS\_27305 tai V3LHS\_401557. Lisäksi kontrolleina käytettiin ei-kohdentuvaa kontrolli-shRNA:ta (*engl.* non-targeting control shRNA) (RHS4348) ja GAPDH:hon kohdentuvaa kontrolli-shRNA:ta (*engl.* GAPDH targeting control shRNA) (RHS4372). DU145-solut jaettiin edellisenä päivänä T25-pulloihin siten, että niiden konfluenssit olivat noin 50 % hiljennyksen alkaessa. Hiljennys tehtiin valmistajan ohjeen mukaan. Viruspartikkeleista käytettiin 1:25-laimennosta ja soluille lisättiin seerumillista RPMI-mediumia 4 tunnin inkuboinnin jälkeen.

Transfektion onnistuminen tarkistettiin 48 tunnin jälkeen soluista pGIPZ-plasmidin sisältämän GFP-signaalin avulla konfokaalimikroskoopilla. Aloitettiin soluille 0,5 µg/ml puromysiini-antibioottiselektio (pitoisuus tappoi 100% DU145 WT -soluista viidessä päivässä). Embigiinitasot tarkistettiin soluista TaqManissä, kuten aiemmin, ja WB:ssa ab127692-vasta-aineella, kuten vasta-aineiden testauksessa (solut hajotettiin suoraan 2X SDS-näytepuskurilla, vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä ja latauskontrollina käytettiin β-aktiinia).

Toisella lentivirushiljennysyrityksellä DU145-solut jaettiin edellisenä päivänä 6-kuoppalevyille ja kaikki kolme embigiini-shRNA:ta laitettiin samaan aikaan soluille. Viruspartikkeleista käytettiin yhteensä väkevämpää 1:5-laimennosta (lopullinen konsentraatio viruspartikkeleista oli yhteensä sama kuin yksinään). Selektoiduista soluista tarkistettiin embigiinitasot TaqManissä ja WB:ssa kuten aiemmin.

#### *6.2.8 Embigiinivasta-aineiden testaus*

Useita eri embigiinivasta-aineita (taulukko 5) testattiin HeLa-soluilla ja muutamaa lupaavaa vasta-ainetta testattiin MG-63-, LNCaP-, DU145- ja HeLa-solulinjoilla WB:ssa. 6-kuoppalevyillä kasvatetut solut hajotettiin suoraan 100 µl:lla 2x SDS-näytepuskuria (3,4 % (m/V) SDS, 10 % (V/V) glyseroli, 0,1 M Tris-HCl pH 6.8, 3,2 % (m/V) DTT, 0,004 % bromifenoli-sininen). Näytteitä kuumennettiin 98 °C:ssa 5 min ja ladattiin 10 % SDS-PAGE-geelille 35 µl/kaivo laimentamattomana ja ajon jälkeen proteiinit siirrostettiin PVDF-membraanille o/n 40 V 4 °C. Membraanin sitoutumattomat kohdat päällystettiin 5 % (m/V) maito-TBST:ssä 30 min RT ja siitä määritettiin embigiini ja β-aktiini (Anti-β-Actin antibody A1978, Sigma-Aldrich) maito-TBST:ssä 2 h RT pyöryksessä. Membraani pestiin 4 kertaa 5 min TBST:ssä ja inkuboitiin primäärivasta-aineita vastaavissa sekundäärivasta-aineissa (LI-COR Biosciences) maito-TBST:ssä 1 h RT valolta suojattuna. Membraani pestiin 4 kertaa 5 min TBST:ssä ja skannattiin Odyssey CLx -laitteella (LI-COR Biosciences).

**Taulukko 5. Testatut embigiinivasta-aineet**

Vasta-aine	Tunnistaa	Laimennos (WB)
Abcam ab127692 anti-embigin homolog rabbit pAb	Ihmisen EMB	1:1000
Abcam ab179801 anti-embigin homolog rabbit mAb	Ihmisen EMB	1:1000
Abcam ab72195 anti-embigin homolog rabbit pAb	Ihmisen EMB	1:1000
LS Bioscience LS-C148454 anti-embigin rabbit pAb	Ihmisen EMB	1:1000
Proteintech 13946-1-AP embigin rabbit pAb	Ihmisen EMB	1:1000
Sigma-Aldrich HPA017740 anti-embigin rabbit pAb	Ihmisen EMB	1:1000
Santa Cruz Biotechnology SC-323810 embigin C-16 goat pAb	Ihmisen EMB	1:200
eBioscience G7.43.1 embigin rat mAb	Hiiren Emb	1:1000

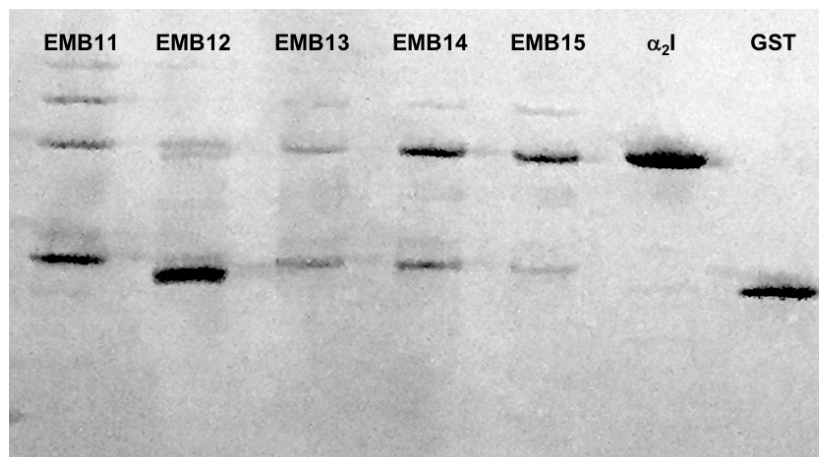
Vasta-aineiden WB-juovien lukumäärää yritettiin vähentää käsittelemällä HeLa-soluja proteiinien *N*-glykosylaatiota estävällä tunikamysiinillä (Sigma-Aldrich). Tunikamysiiniä, joka oli liuotettu dimetyylisulfoksidiin (*engl.* dimethyl sulfoxide, DMSO), testattiin pitoisuuksissa 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 ja 1 µg/ml seerumillisessa DMEM-mediumissa ja pelkkää DMSO:ta käytettiin käsittelyn kontrollina. Käsittely aloitettiin samalla, kun solut jaettiin 6-kuoppalevyille ja solut hajotettiin suoraan 2X SDS-näytepuskurilla 72 h inkuboinnin jälkeen. WB tehtiin ab127692-vasta-aineella (Abcam), kuten aiemmin. Vasta-aineet olivat maito-TBST-liuoksessa ja latauskontrollina käytettiin β-aktiinia. Embigiinijuovien (32 & 37 kDa, 50 kDa sekä 90 kDa) intensiteetit mitattiin Image Studio-ohjelmalla (LI-COR Biosciences), ne suhteutettiin aktiinitasoihin, ja tuloksista tehtiin pylväskuvaaja Microsoft Excel -ohjelmalla.

## 7 TULOKSET

### 7.1 Proteiinitason tutkimukset

#### 7.1.1 Tuotettujen EMB-GST-erien saanto ja toimivuus vaihtelevat

Embigiinin solun ulkopuolista osaa tuotettiin GST-fuusioproteiineina *Escherichia coli* -soluissa WT:nä ja viitenä erilaisena pistemutaatioisettinä. Mutaatioissa tietyt aminohapot oli muutettu alaniiniksi embigiinin solun ulkopuolisessa rakenteessa (taulukko 1 ja kuva 5). EMB-GST:tä tuotettiin *E. coli* BL21 -soluissa ja se puhdistettiin solulysaatista GST-affiniteettikromatografialla. Tuotettujen EMB-GST-erien saanto ja toimivuudet EuLISA-kokeissa vaihtelivat paljon ja näitä yritettiin parantaa käyttämällä proteiinituoton indusoivaa IPTG:tä normaalia vähemmän ja kokeilemalla proteaasi-inhibiittoreita. Tuotossa kokeiltiin myös SHuffle ja Origami *E. coli* -soluja. Millään näistä muutoksista ei kuitenkaan ollut vaikutusta erien määrään tai laatuun. Tuotossa saatiin enemmän embigiiniä, kun bakteerisolut hajotettiin tehokkaammin isommalla sonikointikärjellä, mutta silti EMB-GST:t eivät aina olleet toimivassa muodossa. SDS-PAGE-geelin (kuva 6) perusteella huonommin toimivissa EMB-GST-erissä (EMB11-13) oli suhteessa vähemmän EMB-GST:tä (koko noin 52 kDa) ja enemmän GST:tä (koko 26 kDa) tai hajonnutta EMB-GST:tä verrattuna toimiviin EMB-GST-eriin (EMB14 ja 15).



**Kuva 6. Huonommin toimivat EMB-GST-erät saattavat olla hajonneet.** Osa tuotetuista villityypin EMB-GST-proteiineista (EMB11-15) ajettiin SDS-PAGE-geelille. Kokokontrolleina käytettiin GST:tä (26 kDa) ja α<sub>2</sub>I-GST:tä (50 kDa). EMB solun ulkopuolisen osan koko on noin 26 kDa, joten EMB-GST koko on noin 52 kDa. EuLISA-kokeissa huonommin toimivissa EMB-GST-erissä (EMB11-13) oli suhteessa vähemmän EMB-GST:tä ja enemmän GST:tä tai hajonnutta EMB-GST:tä verrattuna toimiviin EMB-GST-eriin (EMB14 ja 15).

### *7.1.2 EMB-GST sitoutuu fibronektiiniin, mutta mutaatiot eivät estäneet sitoutumista*

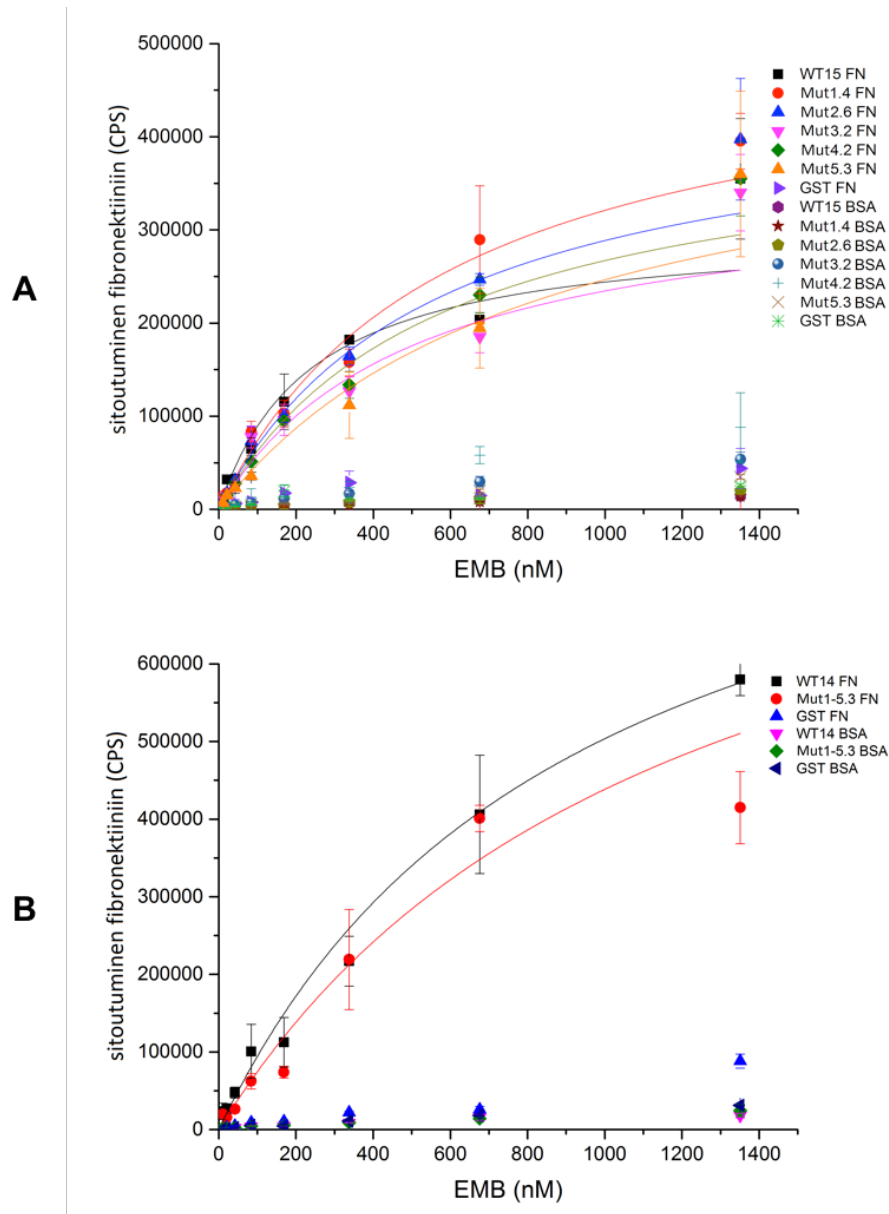
WT:n ja mutatoitujen EMB-GST-proteiinien sitoutumista fibronektiiniin tutkittiin EuLISA-kokeissa. Kontrolleina käytettiin GST:tä ja BSA:ta. EMB-GST-eristä valittiin sitoutumiskokeisiin parhaiten toimivat kustakin mutantista ja villityypistä. Näistä eristä tehtiin sitoutumiskäyrät ja sitoutumisen maksiminopeus ( $V_{max}$ ) sekä voimakkuuden dissosiaatiovakio ( $K_d$ ) määritettiin sovittamalla sitoutumiskäyrät Hillin yhtälöön Origin-ohjelmalla (kuva 7A ja taulukko 6).

EMB-GST:n tarttuminen fibronektiiniin toistettiin ja sitoutumisvoimakkuus on parhaimmillaan noin 240 nM luokkaa (kuvan 7 EMB-GST WT15:llä  $K_d = 239$ ). Mutaatioseleillä ( $K_d$ :t välillä 505-844) fibronektiinisitoutuminen vaikutti hieman alentuneen, mutta mikään niistä ei estänyt sitoutumista kokonaan. GST- ja BSA-kontrollitasot olivat alhaisia. Kokeiltiin myös kaikkia mutaatioita samassa proteiinissa (kuva 7B ja taulukko 6), mutta tämän EMB-GST Mut1-5:n sitoutuminen ( $K_d = 1189$ ) ei eronnut merkittävästi villityypistä ( $K_d = 931$ ).

### *7.1.3 Embigiini-embigiini-sitoutumista ei havaittu Biacore-laitteella*

Embigiinin homofiilistä sitoutumista tutkittiin Biacore-laitteella. Biacore-lastun yksi kanava päällystettiin toimivalla EMB-GST:llä ja toinen kanava kontrolliksi GST:llä. Embigiini-embigiini-sitoutumista ei kuitenkaan havaittu. Myöskään fibronektiini ei sitoutunut EMB-GST:hen, ja siksi tuloksia ei näytetty, koska luultavasti embigiini ei ollut sitoutunut aktiiviseen muotoon Biacore-lastulle.





**Kuva 7. Embigiini sitoutuu fibronectiiniin, mutta mutaatiot embigiinin rakenteessa eivät estäneet sitoutumista. A.** Villityypin (WT) ja mutatoitujen (Mut1, 2, 3, 4 ja 5) EMB-GST-proteiinien sitoutumista fibronectiiniin (FN) ja tutkittiin EuLISA-kokeissa. Kontrollina käytettiin GST:tä ja BSA:ta. EMB-GST:n tarttuminen fibronectiiniin toistettiin. Mutaatioseiteillä fibronectiini-sitoutuminen oli hieman alentunut, mutta mikään niistä ei estänyt sitoutumista kokonaan. GST- ja BSA-kontrollitasot olivat alhaisia. **B.** Testattiin kaikkien embigiinimutaatioiden yhteisvaikutusta (EMB-GST Mut1-5) fibronectiinisitoutumiseen. EMB-GST Mut1-5:n sitoutuminen fibronectiiniin ei juuri eronnut villityypistä tai estänyt sitoutumista. (CPS = tapahtumia sekunnissa)

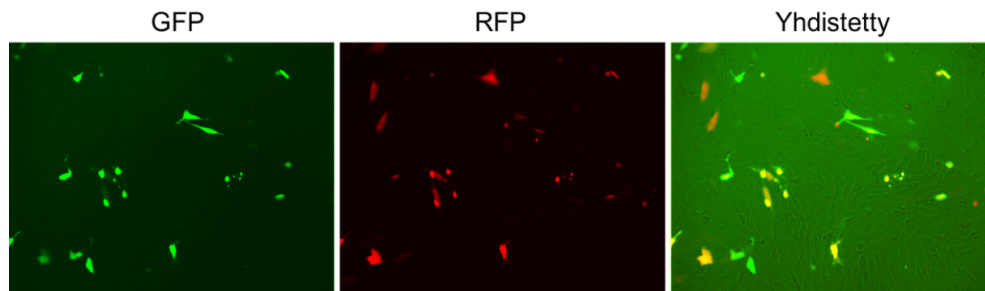
Taulukko 6. EMB WT:n ja eri mutanttien FN-sitoutumisen maksiminopeudet ja dissosiaatiovakiot

Malli:	Hillin yhtälö:	Arvo	Keskihajonta
Hill n=1	$y=V_{max} * x^n / (K_d^n + x^n)$		+/-
WT15	$V_{max}$	302331	32642
	$K_d$	239	60
Mut1.4	$V_{max}$	511589	172898
	$K_d$	594	253
Mut2.6	$V_{max}$	448491	17719
	$K_d$	554	24
Mut3.2	$V_{max}$	352870	71300
	$K_d$	505	128
Mut4.2	$V_{max}$	419565	51276
	$K_d$	571	75
Mut5.3	$V_{max}$	454579	181888
	$K_d$	844	393
WT14	$V_{max}$	972622	103793
	$K_d$	931	197
Mut1-5.3	$V_{max}$	959712	651733
	$K_d$	1189	103

## 7.2 Solutason tutkimukset

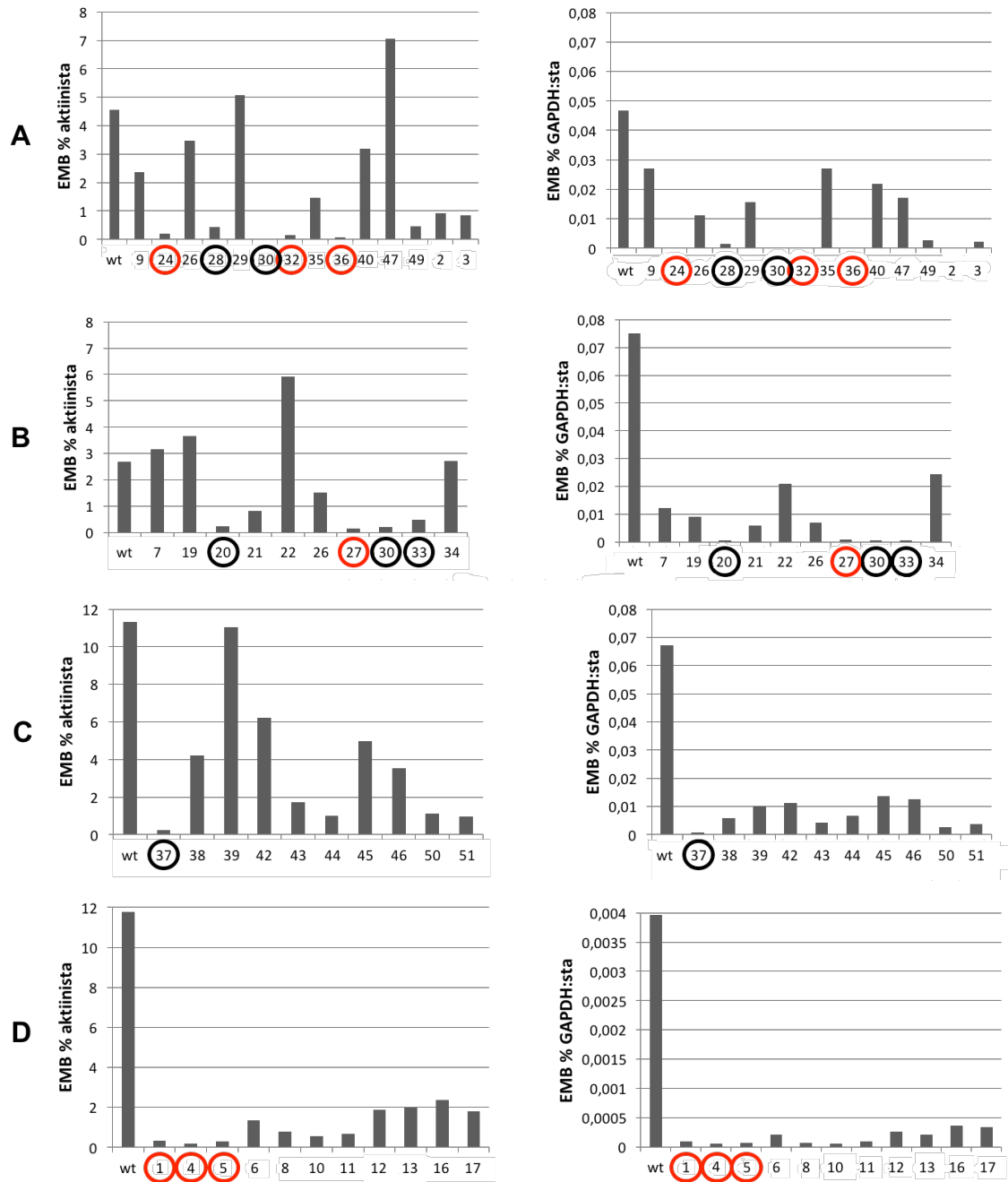
### 7.2.1 Embigiini hiljennettiin MG-63-soluista CRISPR/Cas9-tekniikalla

Embigiini hiljennettiin CRISPR/Cas9-tekniikalla ihmisen MG-63-soluista. Embigiini CRISPR KO- ja embigiini HDR -plasmidit transfektoitiin soluihin, ja transfektion onnistuminen tarkistettiin embigiini CRISPR KO -plasmidien sisältämän GFP:n ja embigiini HDR -plasmidin sisältämän RFP:n avulla konfokaalimikroskoopilla (kuva 8). Soluissa näkyi hieman enemmän RFP:tä kuin GFP:tä, ja noin 5 % soluista oli transfektoitunut sekä 1:5 että 1:7 DNA ( $\mu\text{g}$ ): HilyMax ( $\mu\text{l}$ ) -suhteilla käsitellyissä soluissa (1:7-suhteella tehokkuus oli hieman parempi). MG-63 WT -soluilla testattiin optimaalista puromysiinipitoisuutta välillä 1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ja pitoisuudeksi valittiin 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , koska se tappoi kaikki solut viidessä päivässä. Soluille tehtiin puromysiini-antibioottiselektio, joka lopetettiin viiden päivän jälkeen, jolloin kontrollisolut olivat kuolleet ja embigiinihiljennettyjä soluja oli hyvin vähän elossa. 1:5 DNA ( $\mu\text{g}$ ): HilyMax ( $\mu\text{l}$ ) -suhteella käsitellyt solut kasvoivat muita soluja huomattavasti nopeammin, joten näistä soluista kasvatettiin yksisolukloonit.



**Kuva 8. Noin 5 % CRISPR/Cas9-käsitellyistä MG-63-soluista oli transfektoitunut.** Transfektion onnistuminen tarkistettiin embigiini CRISPR KO -plasmidin sisältämän GFP:n ja embigiini HDR -plasmidin sisältämän RFP:n avulla 72 h transfektion jälkeen konfokaalimikroskoopilla 10X objektiivilla. Soluissa näkyi hieman enemmän RFP:tä kuin GFP:tä, ja noin 5 % soluista oli transfektoitunut.

Embigiinihiljentyneet solut valikoitiin TaqMan-tulosten perusteella, jossa solujen embigiini-mRNA-tasoja verrattiin  $\beta$ -aktiiniin ja GAPDH:hon (kuva 9). Testattiin 44 yksisolukloonaa kasvunopeusjärjestyksessä, ja 11 solut (ympyröity kuvassa 9) valittiin jatkoon EMB KO -soluina. Näissä soluissa embigiinitasot olivat lähellä nollaa sekä  $\beta$ -aktiiniin (alle 0,5 %) että GAPDH:hon (alle 0,001 %) verrattuna. Aktiini- ja GAPDH-tasoihin vertaaminen antoivat samansuuntaisia tuloksia solujen embigiinitasoista, tosin joissakin soluissa niiden välillä oli jonkin verran eroa. Kuvan 9D GAPDH-tasot poikkesivat muiden kokeiden GAPDH-tasoista, joten niitä ei voida pitää kovin luotettavina. Myöhemmin havaittiin, että todellisuudessa näistä soluista vain seitsemän oli osittain hiljentyneitä EMB<sup>+/-</sup>-soluja (merkitty kuvassa 10 punaisella).



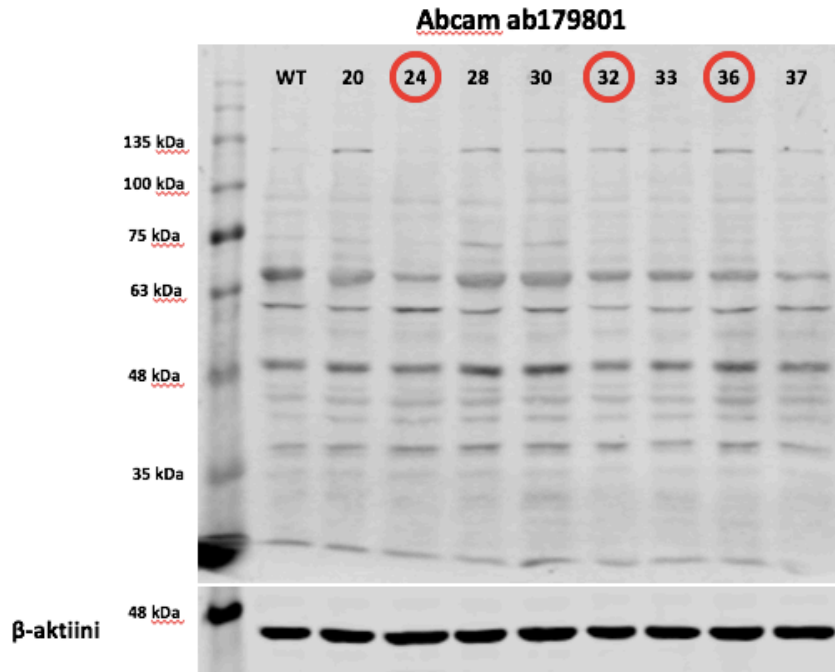
**Kuva 9. Embigiinihiljentyneet solut valikoitiin TaqMan-tulosten perusteella.** WT ja EMB KO CRISPR/Cas9-käsiteltyjen MG-63-solujen embigiini-mRNA-tasoja verrattiin TaqManissä. Solujen embigiinitasot suhteutettiin  $\beta$ -aktiiniin ja GAPDH:hon. Renkaalla merkityt solut valittiin jatkoon embigiinihiljentyneinä soluina. Oikeasti osittain hiljentyneet EMB<sup>+/-</sup>-solut on merkitty kuvaan punaisella.

### 7.2.2 MG-63 EMB KO -solut eivät eronneet villityypistä

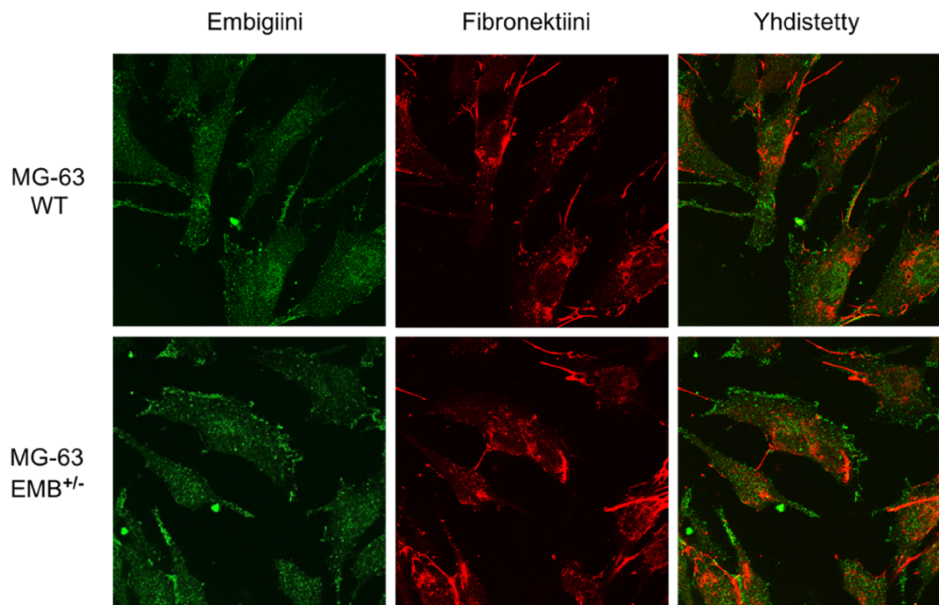
MG-63 WT ja EMB KO -solujen embigiini-ilmentymistä verrattiin proteiinitasolla WB:ssa Abcamin ab179801-vasta-aineella. WB:ssa näkyi monta juovaa, jotka saattavat johtua embigiinin eri glykosylaatiomuodoista (kuva 10). WT- ja EMB KO -solujen välillä ei näkynyt selkeää eroa juovien intensiteeteissä voimakkaimmissa noin 50 ja 65 kDa kokoisissa juovissa.

IF-mikroskopiassa verrattiin MG-63 WT- ja EMB KO -soluja (EMB<sup>+/-</sup> 32) värjäämällä niistä embigiini ja fibronectiini (kuva 11). Embigiini näytti kertyvän erityisesti solujen pinnoille ja solukalvon ulokkeisiin. EMB KO -soluissa embigiini näkyi yhtä voimakkaana kuin WT-soluissa. Lisäksi molemmissa solulinjoissa fibronectiinisiäikeet olivat näkyvissä.

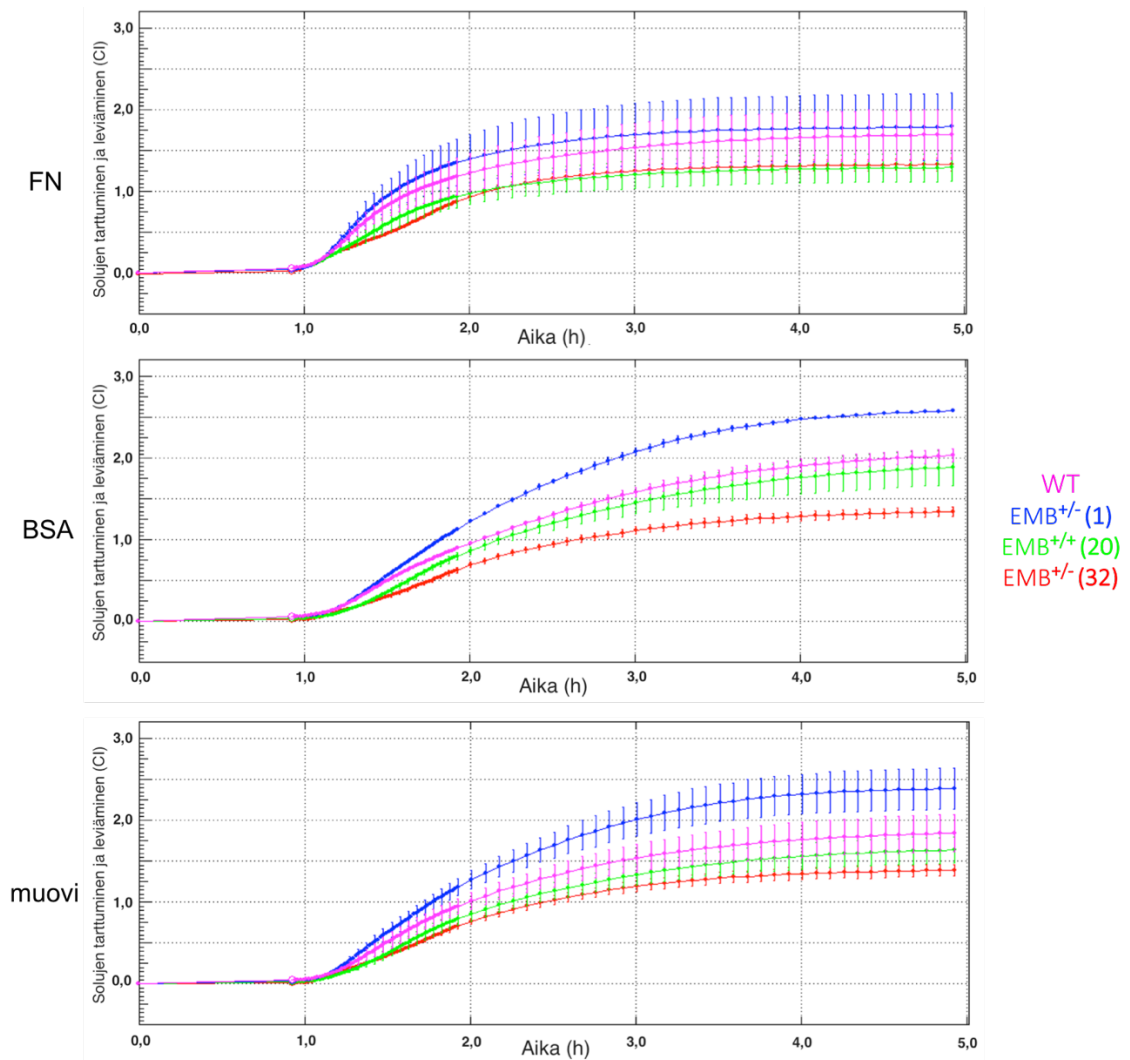
MG-63 WT- ja EMB KO (EMB<sup>+/-</sup> 1 ja EMB<sup>+/-</sup> 32) -solujen tarttumista ja leviämistä fibronectiinille mitattiin xCELLigence-laitteella seerumillisessa mediumissa (kuva 12). Lisäksi kokeessa oli mukana hiljentymättömät EMB<sup>+/+</sup> 20 -solut ja sitoutumisen kontrollina käytettiin BSA:ta ja muovia. Solujen kyvyissä sitoutua fibronectiiniin ei juuri näkynyt eroa, sillä sitoutumista ja leviämistä kuvaavat CI-arvo (cell index) oli WT- ja EMB<sup>+/-</sup> 1 -soluille noin 1,7 ja EMB<sup>+/-</sup> 32- ja EMB<sup>+/+</sup> 20 -soluille noin 1,3. Lisäksi sitoutumisen hajonta oli melko suurta. BSA- ja muovi-kontrollisitoutumisten signaalitasot olivat yllättävän korkeita, sillä CI-arvot BSA:lla olivat välillä 1,3-2,5 ja muovilla välillä 1,4-2,4. Näillä alustoilla parhaiten sitoutuivat EMB<sup>+/-</sup> 1 -solut (CI-arvo BSA:lla 2,5 ja muovilla 2,4) ja huonoiten EMB<sup>+/-</sup> 32 -solut (CI-arvo BSA:lla 1,3 ja muovilla 1,4).



**Kuva 10.** Embigiinihiljennettyjen solujen embigiinitasot eivät eronneet villityypistä WB:ssa. Solujen embigiinitasoja vertailtiin WB:ssa ab179801-vasta-aineella (Abcam). Solujen hajottamiseen käytettiin lysispuskuria, vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä ja latauskontrollina käytettiin  $\beta$ -aktiinia. EMB<sup>+/-</sup>-solut on merkitty kuvaan punaisella. WT- ja EMB KO -solujen välillä ei näkynyt selkeää eroa noin 50 ja 65 kDa kokoisten juovien intensiteeteissä.



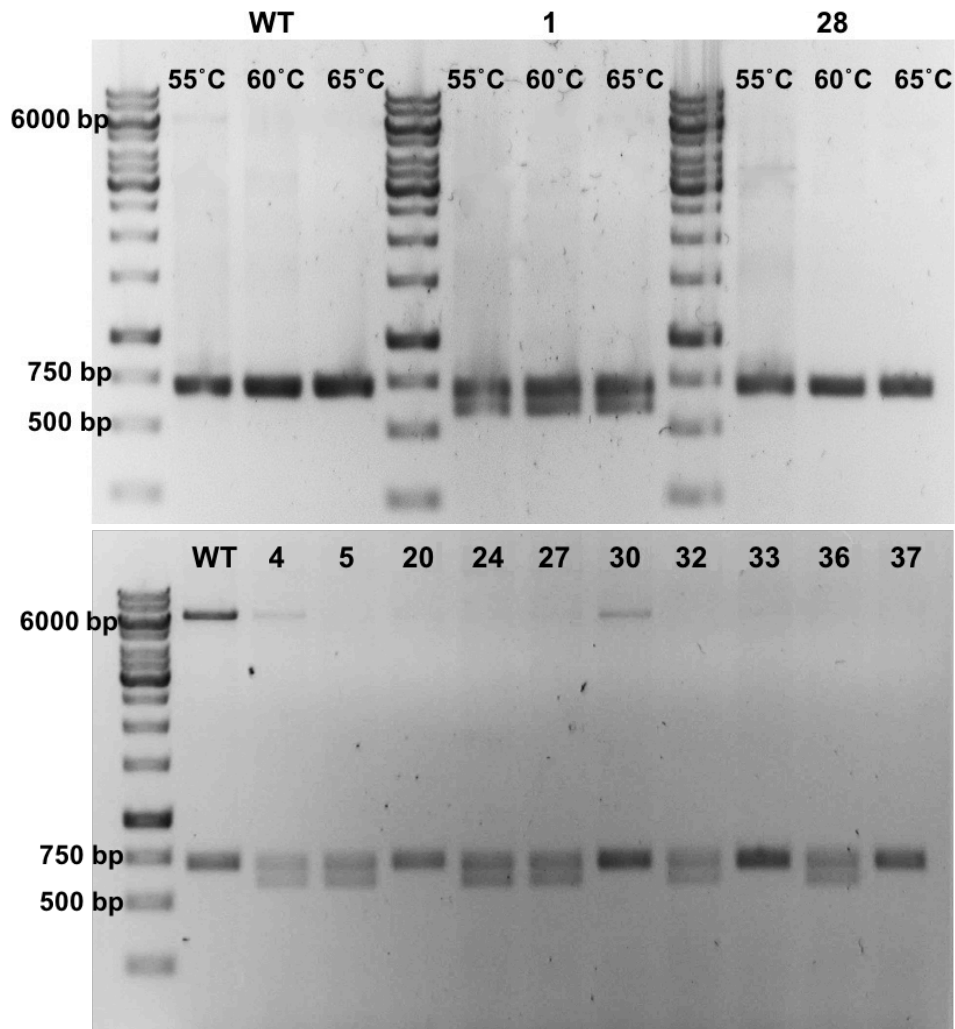
**Kuva 11.** Embigiinihiljennettyjen solujen embigiinitasot eivät eronneet villityypistä IF-mikroskopiassa. MG-63 WT- ja EMB KO-solujen embigiinitasoja verrattiin IF-mikroskopiassa värjäämällä soluista (EMB<sup>+/-</sup> 32) embigiini ab127692-vasta-aineella (Abcam). Lisäksi soluista värjättiin fibronectiini. EMB KO -soluissa embigiini näkyi yhtä voimakkaana kuin WT-soluissa. Lisäksi molemmissa solulinjoissa fibronectiinisäikeet olivat näkyvissä.



**Kuva 12. Embigiinihiljennettyjen solujen sitoutuminen fibronectiiniin ei poikennut villityypistä xCELLigence-kokeessa.** xCELLigence-mittauksissa verrattiin MG-63 WT- ja EMB KO -solujen ( $EMB^{+/-}$  1 ja 32) tarttumista ja leviämistä fibronectiinille. Kokeessa oli mukana myös hiljentymättömät  $EMB^{+/+}$  20 -solut. Sitoutumisen kontrolleina käytettiin BSA:ta ja muovia. Solujen fibronectiini-sitoutumisessa ei havaittu eroa. (CI = cell index, kuvaa solujen tarttumista ja leviämistä alustalle)

### 7.2.3 Osa hiljennetyistä MG-63-soluista oli EMB KO heterotsygootteja

CRISPR/Cas9-hiljennyksen onnistuminen tarkistettiin PCR:llä hiljennetyistä soluista (kuva 13). Testattiin embigiinialukkeiden optimaalisinta sitoutumislämpötilaa, joka oli 60 °C. WT-soluissa näkyi 706 emäsparin (*engl.* base pair, bp) kokoinen juova ja  $EMB^{+/-}$ -soluissa näkyi myös hieman pienempi juova, jonka kokoa ei tiedetty. EMB KO homotsygoottisoluissa (*engl.* EMB KO homozygote,  $EMB^{-/-}$ ) olisi pitänyt näkyä vain pienempi juova. Hiljennetyistä MG-63-soluista seitsemän (1, 4, 5, 24, 27, 32 ja 36) oli osittain hiljentyneitä  $EMB^{+/-}$ -soluja ja solut loput solut eivät olleet hiljentyneet. HDR-plasmidia (koko noin 6 kbp) ei näkynyt geelillä hiljennetyissä soluissa.

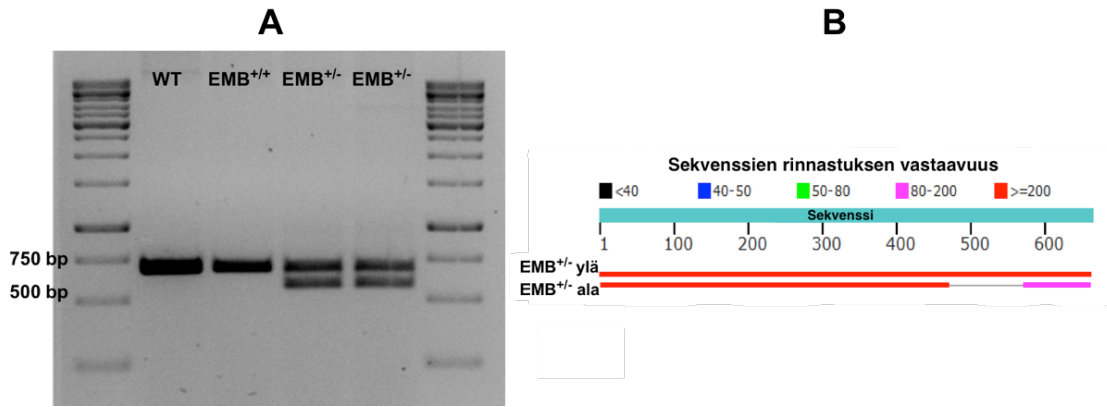


**Kuva 13. Osa embigiinihiljennetyistä soluista oli EMB KO heterotsygotteja.** MG-63-solujen embigiini-hiljentymisen onnistuminen tarkistettiin PCR:llä ja PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelille. Samalla testattiin myös embigiinialukkeiden optimaalisinta sitoutumislämpötilaa, joka oli 60 °C. WT-soluissa näkyi 706 bp kokoinen juova ja EMB<sup>+/-</sup>-soluissa näkyi lisäksi hieman pienempi juova. EMB<sup>-/-</sup>-soluissa olisi näkynyt vain pienempi juova.

#### 7.2.4 CRISPR/Cas9-hiljennyksessä EMB-geenistä poistuu 98 emäsparin pituinen pätkä

PCR-geelillä näkyvien juovien sekvenssit varmistettiin oikeiksi ja samalla selvitettiin, millainen pala CRISPR/Cas9-hiljennyksessä lähtee EMB-geenistä. WT- ja EMB<sup>+/-</sup>-solujen PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelille (kuva 14A), ja geeliltä eristettiin WT- ja EMB<sup>+/-</sup>-solujen ala ja -yläjuovien DNA:t, jotka lähetettiin sekvensoitaviksi. EMB<sup>+/-</sup>-alajuovan ja -yläjuovan sekvenssit rinnastettiin WT:n sekvenssiin, jolloin EMB<sup>+/-</sup>-alajuovan sekvenssistä nähtiin, että CRISPR/Cas9-hiljennyksessä EMB-geenistä on poistunut 98 emäsparin pituinen pätkä (kuva 14B).





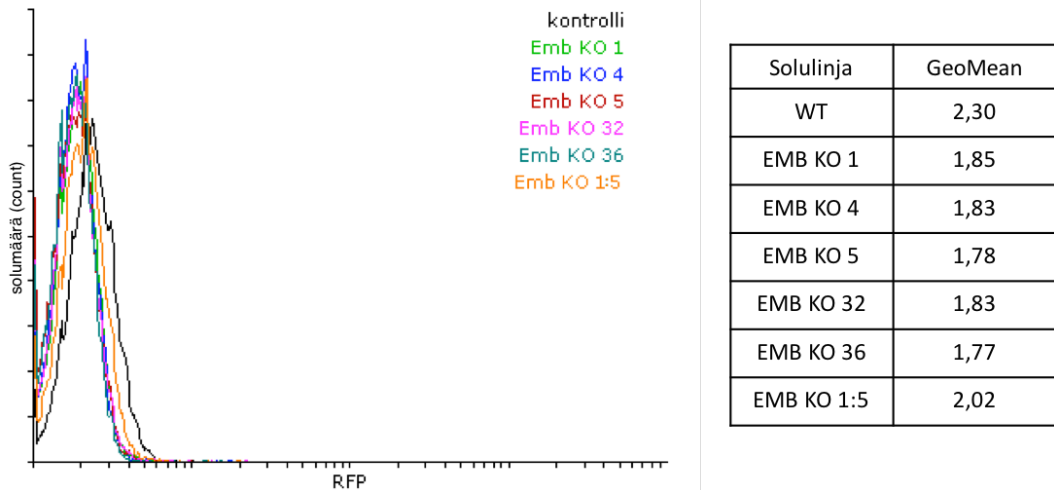
**Kuva 14. CRISPR/Cas9-hiljennyksessä *EMB*-geenistä poistuu 98 emäsparin pituinen pätkä. A.** WT- ja *EMB*<sup>+/-</sup>-solujen PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelille, ja geeliltä eristettiin solujen ala ja -yläjuovan DNA:t, jotka lähetettiin sekvensoitaviksi. **B.** *EMB*<sup>+/-</sup>-alajuovan ja -yläjuovan sekvenssit rinnastettiin WT:n sekvenssiin. *EMB*<sup>+/-</sup>-alajuovan sekvenssistä puuttui 98 bp:n pituinen pätkä.

### 7.2.5 Embigiinihiljennetyissä soluissa ei ollut enää merkkejä HDR-plasmidista

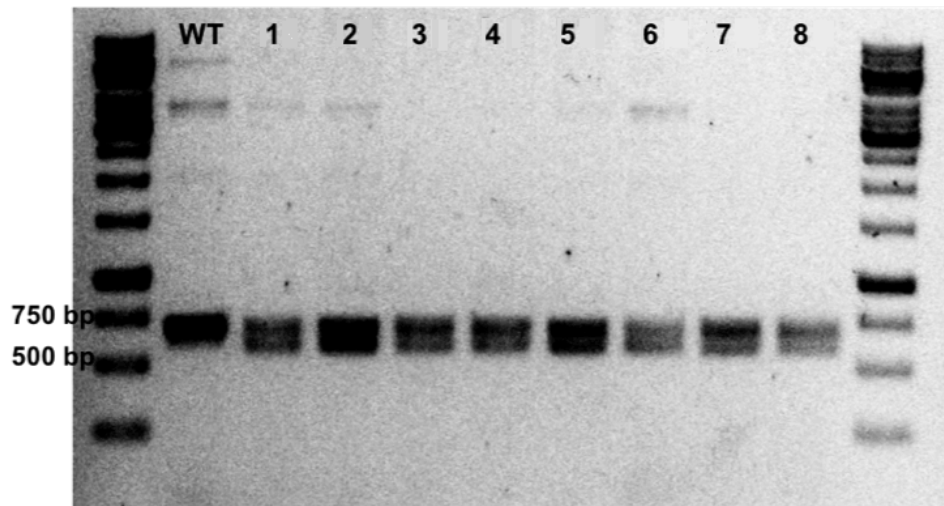
PCR-tuloksista huomattiin, että noin 6 kbp:n kokoista HDR-plasmidia ei näkynyt embigiinihiljennetyissä soluissa. Osan MG-63 *EMB*<sup>+/-</sup>-solujen (*EMB* KO 1, 4, 5, 32 ja 36) ja hiljennettyjen sekapopulaatiosolujen (*EMB* KO 1:5) RFP-signaali tarkistettiin virtaussytometrillä (kuva 15). Kontrollina käytettiin MG-63 WT -soluja, joihin ei ole transfektoitu HDR-plasmidia. Missään näissä soluissa ei ollut RFP:tä fluoresenssi-intensiteettien geometrinen keskiarvojen (GeoMean) perusteella ja myöskään konfokaalimikroskoopilla katsottaessa RFP:tä ei näkynyt soluissa. Lisäksi solut kuolivat puromysiinikäsittelyssä.

### 7.2.6 Toisella CRISPR/Cas9-hiljennysyrityksellä ei saatu *EMB* KO -homotsygoottisoluja

CRISPR/Cas9-hiljennystä yritettiin uudelleen MG-63 *EMB*<sup>+/-</sup> 32 -soluihin. Tällä kertaa solut yritettiin lajitella FACS:lla GFP:n ja RFP:n perusteella. Leimat näkyivät kuitenkin heikosti. Soluista kasvatettiin yksisolukloonit ja näistä soluista (1-8) tarkistettiin hiljentymisen onnistuminen PCR:llä, Tulosten perusteella mikään uudelleen hiljennetyistä soluista ei ollut *EMB*<sup>-/-</sup> (kuva 16). WT-soluissa näkyi 706 bp kokoinen juova ja *EMB*<sup>+/-</sup>-soluissa näkyi lisäksi pienempi 608 bp kokoinen juova. Täysin hiljentyneissä *EMB*<sup>-/-</sup>-soluissa olisi pitänyt näkyä ainoastaan pienempi juova.



**Kuva 15. MG-63 EMB<sup>+/-</sup>-soluissa ei ollut RFP:tä.** Virtausytometrillä selvitettiin, näykö MG-63 EMB<sup>+/-</sup>-soluissa (EMB KO 1, 4, 5, 32 ja 36) tai hiljennetyissä sekapopulaatiosoluissa (EMB KO 1:5) HDR-plasmidin sisältämää RFP:tä. Kontrollina käytettiin MG-63 WT -soluja, joissa ei ole HDR-plasmidia. Käyristä määritettiin fluoresenssi-intensiteettien geometriset keskiarvot (GeoMean), joiden perusteella EMB<sup>+/-</sup>-soluissa ei näkynyt RFP:tä.

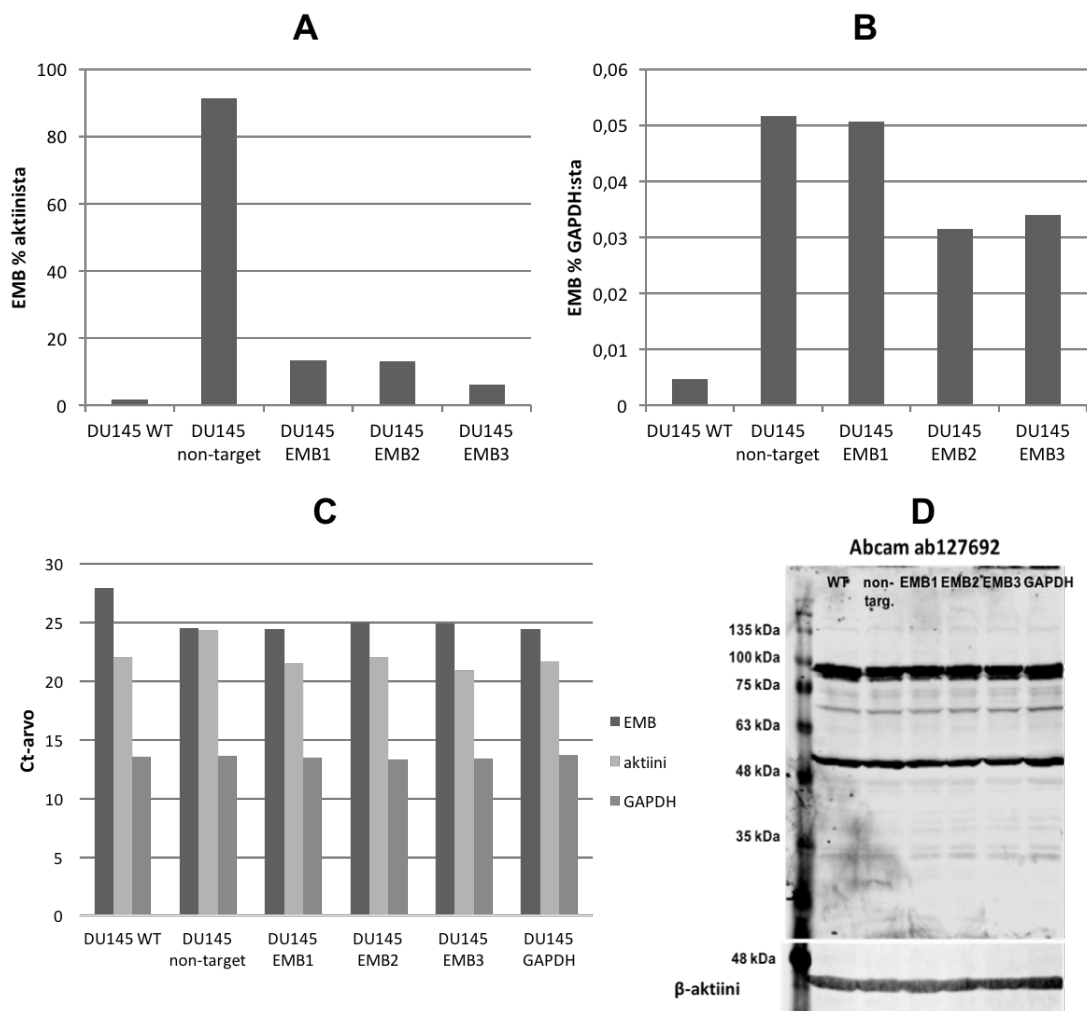


**Kuva 16. Mikään uudelleen CRISPR/Cas9-hiljennetyistä soluista ei ollut homotsygootti EMB KO.** Uudelleen CRISPR/Cas9-hiljennettyjen solujen (1-8) hiljentymisen onnistuminen tarkistettiin PCR:llä ja PCR-tuotteet ajettiin agarosigeelille. WT-soluissa näkyi 706 bp kokoinen juova ja EMB<sup>+/-</sup>-soluissa näkyi lisäksi pienempi 608 bp kokoinen juova. Täysin hiljentyneissä EMB<sup>-/-</sup>-soluissa olisi näkynyt vain pienempi juova.

### 7.2.7 Lentivirushiljennys ei toiminut

Embigiini yritettiin hiljentää mRNA-tasolla lentivirustekniikalla. Eri solulinjojen embigiini-mRNA-tasoja verrattiin keskenään ja tämän perusteella hiljennykseen valittiin keskitasolla embigiiniä ilmentävä DU145-eturauhassyöpäsolulinja. Kontrolleina käytettiin ei-kohdentuvaa kontrolli-shRNA:ta ja GAPDH:hon kohdentuvaa kontrolli-shRNA:ta. Transfektion onnistuminen tarkistettiin 48 tunnin jälkeen infektiosta soluista pGIPZ-plasmidin sisältämän GFP-signaalin avulla konfokaalimikroskoopilla ja transfektio tehokkuus oli alle 5 %. Solujen antibioottiselektiossa käytettiin 0,5 µg/ml puromysiinipitoisuutta.

Lentivirushiljennettyjen DU145-solujen embigiini-mRNA-tasot suhteutettiin β-aktiini- ja GAPDH-mRNA-tasoihin TaqManissä (kuva 17A ja B). Embigiinihiljennettyjen solujen (EMB1, -2 ja -3) ja ei-kohdentuvien kontrollisolujen (non-target) embigiinitasoissa ei havaittu merkittäviä eroja solujen GAPDH-tasoihin verrattaessa (kuva 17B), kun taas β-aktiinitasoihin verrattaessa embigiinihiljennetyissä soluissa embigiiniä vaikutti ilmentyvän vähemmän (17A). β-aktiini- ja GAPDH-tulokset poikkesivat toisistaan ja kuvan 17C kynnysyklarvoista (Ct) havaittiin β-aktiinitasojen (Ct-arvot 20,9-24,4) vaihtelevan GAPDH-tasoja (Ct-arvot 13,3-13,7) enemmän. Erityisesti ei-kohdentuvissa kontrollisoluissa β-aktiinia oli muita soluja vähemmän (Ct-arvo 24,4). Ct-arvojen perusteella embigiini ei ollut hiljentynyt EMB1, -2 tai -3-soluista (Ct-arvot 24,4-25,0) verrattuna ei-kohdentuviin kontrollisoluihin (Ct-arvo 24,5). Lisäksi huomattiin, että villityypin soluissa on muihin soluihin verrattuna hyvin vähän embigiiniä (Ct-arvo 27,9). Ct-arvojen perusteella GAPDH-kontrollihiljennetyissä soluissa ei näkynyt GAPDH-hiljentymistä (Ct-arvo 13,6, muissa soluissa 13,3-13,7). WB:ssa embigiinijuovien (noin 50 ja 90 kDa) intensiteeteissä ei havaittu eroa ab127692-vasta-aineella (Abcam) (kuva 17D).

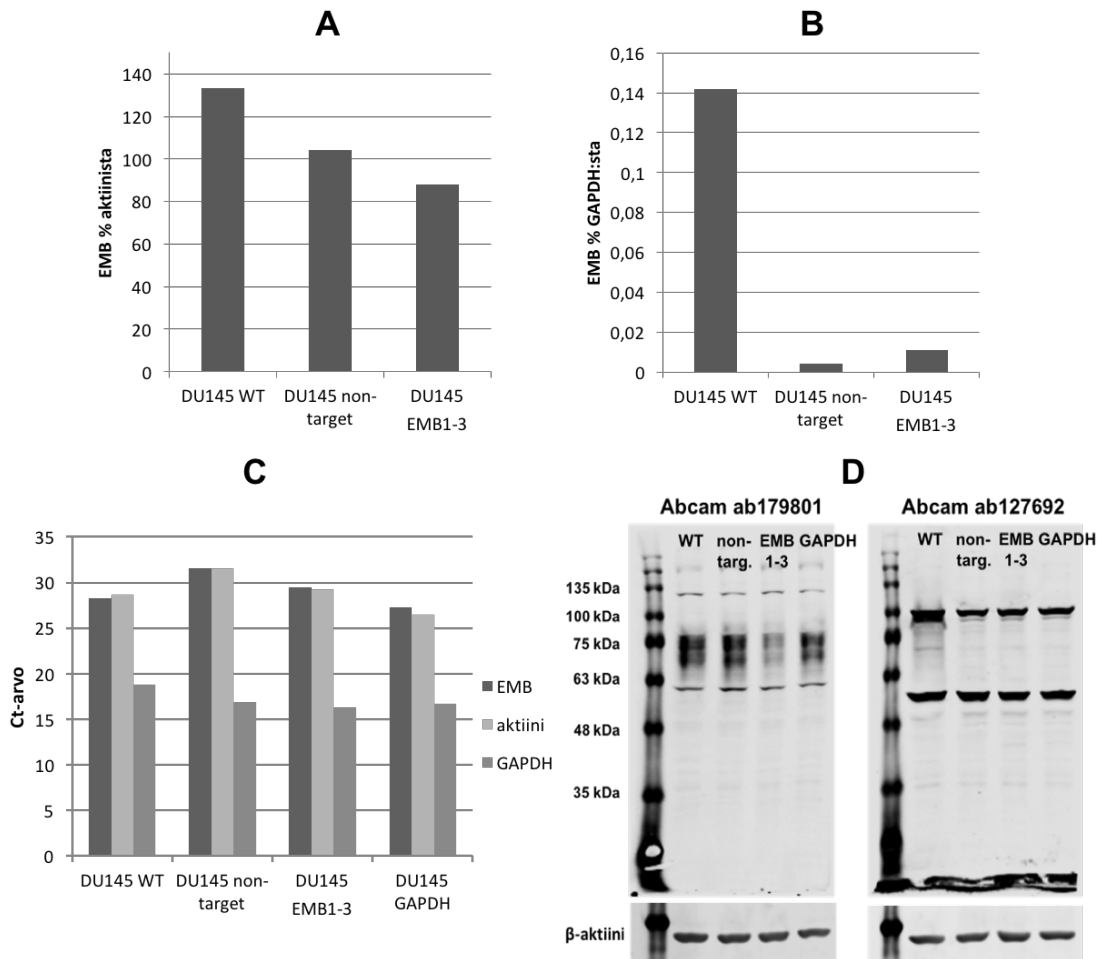


**Kuva 17. TaqMan- ja WB-tulosten perusteella DU145-solut eivät olleet embigiinihiljentyneet lentivirushiljennyksessä. A. & B.** Lentivirushiljennettyjen DU145-solujen embigiini-mRNA-ilmennyksitasot tarkistettiin TaqManissa ja ne suhteutettiin solujen  $\beta$ -aktiini- ja GAPDH-mRNA-tasoihin. Embigiinihiljennettyjen solujen (EMB1, -2 ja -3) ja ei-kohdentuvien kontrollisolujen (non-target) embigiinitasoissa ei havaittu merkittäviä eroja solujen GAPDH-tasoihin.  $\beta$ -aktiinitasoihin verrattaessa embigiinihiljennetyissä soluissa embigiiniä vaikutti ilmentyvän vähemmän. **C.** Kynnyssyklarivojen (Ct) perusteella solujen  $\beta$ -aktiinitasot vaihtelivat GAPDH-tasoa enemmän. Eikohdentuvissa kontrollisoluissa  $\beta$ -aktiinia oli muita soluja vähemmän. Lisäksi embigiini ei ollut hiljentynyt EMB1, -2 tai -3-soluista verrattuna ei-kohdentuviin kontrollisoluihin. Villityypin soluissa on muihin soluihin verrattuna hyvin vähän embigiiniä. GAPDH-kontrollihiljennetyissä soluissa ei näkynyt GAPDH-hiljentyneistä. **D.** Solujen embigiinitasot tarkistettiin myös WB:ssä ab127692-vasta-aineella (Abcam). Solut hajotettiin suoraan SDS-näytepuskurilla, vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä ja latauskontrollina käytettiin  $\beta$ -aktiinia. Solujen embigiinijuovien (noin 50 ja 90 kDa) intensiteeteissä ei havaittu eroa.

Toisella lentivirushiljennysryityksellä viruspartikkeleita käytettiin enemmän ja kaikki kolme embigiini-shRNA:ta laitettiin samaan aikaan soluille. Tästä huolimatta transfektiotehokkuus oli edelleen alle 10 %. Solut kasvoivat huonosti, joten antibioottiselektiota ylläpitävää puromysiinipitoisuutta laskettiin 0,25 µg/ml pitoisuuteen, mutta tällä ei ollut solujen kasvua parantavaa vaikutusta.

Hiljennettyjen solujen embigiini-ilmentymistasot tarkistettiin TaqManissä ja ne suhteutettiin solujen β-aktiini- ja GAPDH-tasoihin (kuva 18A ja B). β-aktiinitasoihin verrattaessa (kuva 18A) embigiinihiljennetyissä soluissa (EMB1-3) embigiiniä vaikutti ilmentyvän vähemmän kuin ei-kohdentuvissa kontrollisoluissa (non-target), kun taas GAPDH-tasoihin verrattaessa (kuva 18B) vastaavaa eroa ei näkynyt. Kynnyssykli- eli Ct-arvojen perusteella (kuva 18C) tässä kokeessa solujen β-aktiinitasot (Ct-arvot 26,4-31,6) vaihtelivat jälleen GAPDH-tasojen (Ct-arvot 16,3-16,9) enemmän (poikkeuksena olivat villityypin solut, joissa GAPDH:ta oli muita soluja vähemmän (Ct-arvo 18,8)). Ct-arvojen perusteella embigiinihiljennettyjen solujen (EMB1-3) embigiini-ilmentyminen (Ct-arvo 29,4) ei juuri ollut vähentynyt verrattuna ei-kohdentuviin kontrollisoluihin (Ct-arvo 31,5) tai villityypin soluihin (Ct-arvo 28,2). Ct-arvoista havaittiin myös, ettei GAPDH ei ollut hiljentynyt tälläkään kertaa GAPDH-hiljennetyistä soluista (Ct-arvo 16,7, muissa soluissa Ct-arvo 16,3-18,8).

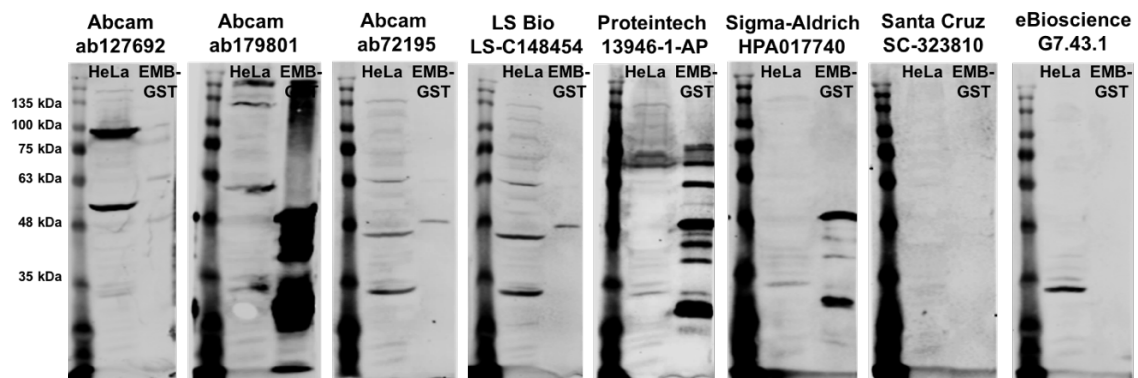
Solujen embigiinitasot tarkistettiin myös WB:ssa (kuva 18D) ab179801- ja ab127692-vasta-aineilla (Abcam). ab179801-vasta-aineen noin 70-80 kDa kokoisen juovan intensiteetin perusteella embigiini vaikutti hiljentyneen osittain EMB1-3-soluista, mutta WB-toistossa vastaavaa eroa ei näkynyt. ab127692-vasta-aineen noin 50 ja 90 kDa kokoisten juovien intensiteettien perusteella embigiini ei ollut hiljentynyt EMB1-3-soluista.



**Kuva 18. TaqMan- ja WB-tuloksen perusteella DU145-solut eivät olleet embigiinihiljentyneet toisella lentivirushiljennysyrityksellä. A. & B.** Lentivirushiljennettyjen DU145-solujen embigiini-mRNA-ilmentymistasot tarkistettiin TaqManissa ja ne suhteutettiin solujen  $\beta$ -aktiini- ja GAPDH-mRNA-tasoihin.  $\beta$ -aktiinitasoihin verrattaessa embigiinihiljennetyissä soluissa (EMB1-3) embigiiniä vaikutti ilmentyvän vähemmän kuin ei-kohdentuvissa kontrollisoluissa (non-target) ja GAPDH-tasoihin verrattaessa vastaavaa eroa ei näkynyt. **C.** Kynnysyklarvojen (Ct) perusteella solujen  $\beta$ -aktiinitasot vaihtelivat GAPDH-tasoja enemmän, paitsi villityypin soluissa GAPDH:ta oli muita soluja vähemmän. EMB1-3-solujen embigiini-ilmentymistaso ei ollut ei-kohdentuvia kontrollisoluja tai villityypin soluja merkittävästi pienempi. GAPDH ei ollut hiljentynyt GAPDH-hiljennetyistä soluista. **D.** Solujen embigiinitasot tarkistettiin WB:ssa ab179801- ja ab127692-vasta-aineilla (Abcam). Solut hajotettiin suoraan SDS-näytepuskurilla, vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä ja latauskontrollina käytettiin  $\beta$ -aktiinia. ab179801-vasta-aineen noin 70-80 kDa kokoisen juovan perusteella embigiini vaikutti hiljentyneen osittain EMB1-3-soluista, mutta ab127692-vasta-aineen noin 50 ja 90 kDa kokoisten juovien perusteella embigiini ei ollut hiljentynyt EMB1-3-soluista.

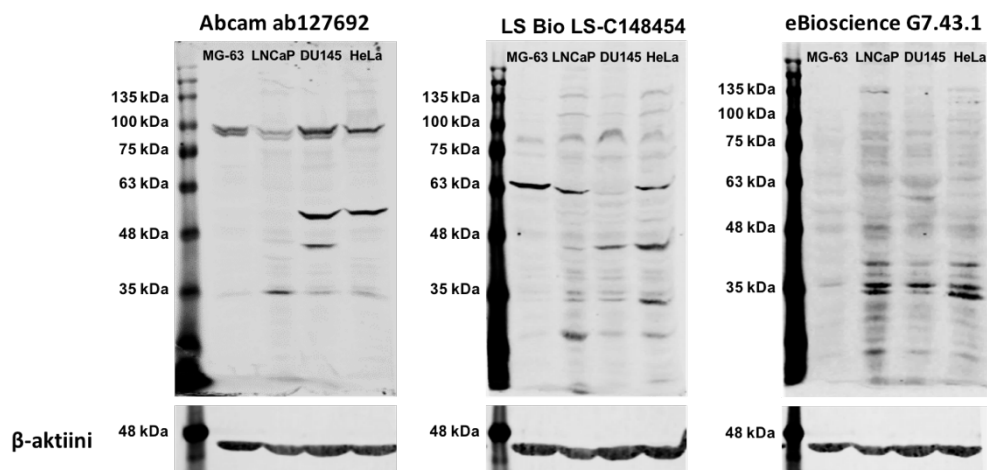
### 7.2.8 Embigiinivasta-aineet eroavat paljon toisistaan

Kahdeksan eri embigiinivasta-ainetta (taulukko 5) testattiin WB:ssa ihmisen HeLa-soluilla, joiden pitäisi sisältää embigiiniä. Solut hajotettiin suoraan SDS-näytepuskurilla, jotta lyaatissa oli solukalvon proteiinit mukana. Vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä maito-BSA:n sijaan, jolloin vasta-aineiden blotit olivat selkeästi aiempaa siistimmän näköisiä ja niissä oli vähemmän epäspesifisiä juovia. Havaittiin, että juovien koko vaihtelee eri vasta-aineiden välillä paljon (kuva 19). Testatuista ihmisen vasta-aineista ab179801 (Abcam), 13946-1-AP (Proteintech), ja HPA017740 (Sigma-Aldrich) tunnistivat voimakkaasti EMB-GST:n (koko noin 52 kDa), ja ab127692 (Abcam), ab72195 (Abcam) ja LS-C148454 (LS Bioscience) tunnistivat EMB-GST:n heikosti. SC-323810-vasta-aine (Santa Cruz) ei näyttänyt tunnistavan mitään. Hiiren G7.43.1-vasta-aine (eBioscience) ei tunnistanut ihmisen EMB-GST:tä.



**Kuva 19. Embigiinivasta-aineet eroavat paljon toisistaan.** Kahdeksan eri embigiinivasta-ainetta (eBioscience G7.43.1 hiiren ja muut ihmisen) testattiin WB:ssa HeLa-soluilla. Positiivisena kontrollina käytettiin EMB-GST:tä. Solut hajotettiin suoraan SDS-näytepuskurilla ja vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä. Juovien koko vaihtelee eri vasta-aineiden välillä paljon ja osa vasta-aineista tunnistaa EMB-GST:n ja osa niistä puolestaan ei.

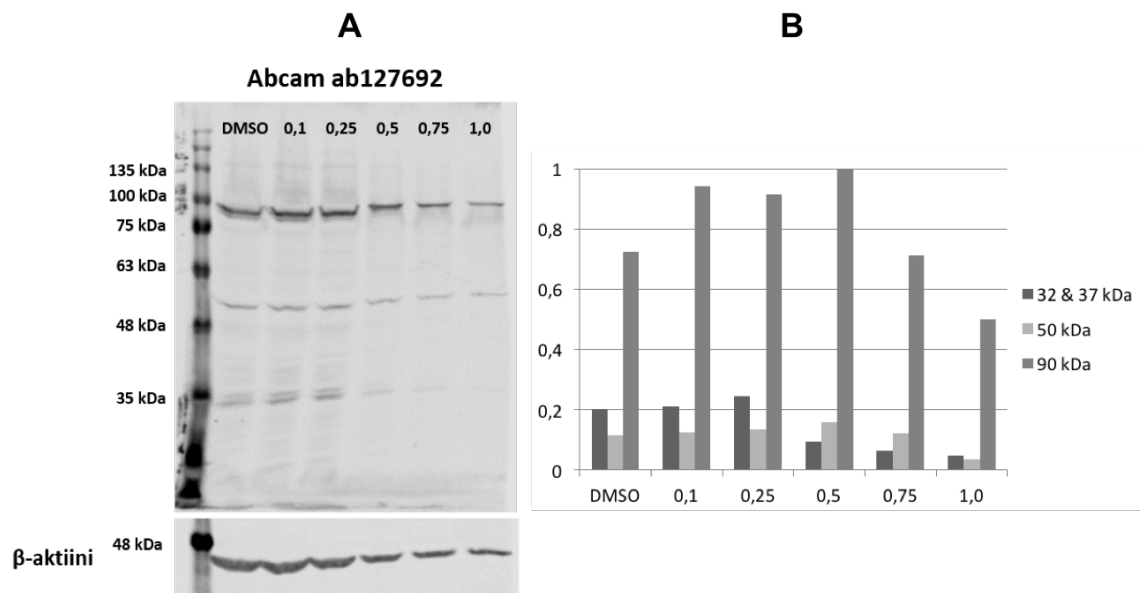
Kolmea embigiinivasta-ainetta (Abcam ab127692, LS Bioscience LS-C148454 ja eBioscience G7.43.1) testattiin MG-63-, LNCaP-, DU145- ja HeLa-solulinjoilla maito-TBST:ssä (kuva 20). Juovien koon ja määrän havaittiin vaihtelevan eri solulinjojen välillä ihmisen embigiinivasta-aineilla. Lisäksi huomattiin eri solulinjojen ilmentävän eri määriä embigiiniä. Hiiren G7.43.1 vasta-aineella huomattiin, että MG-63-solut ilmentävät selkeästi muita solulinjoja vähemmän embigiiniä embigiinin ydinproteiinin kokoisten juovien perusteella (32 ja 37 kDa). Kahden muun vasta-aineen juovien perusteella vastaavaa eroa ei näkynyt.



**Kuva 20. Embigiinijuovien koko ja embigiinin määrä vaihtelevat eri solulinjoissa.** Kolmea eri embigiinivasta-ainetta (Abcam ab127692, LS Bioscience LS-C148454 ja eBioscience G7.43.1) testattiin WB:ssa MG-63-, LNCaP-, DU145- ja HeLa-solulinjoilla. Solut hajotettiin suoraan SDS-näytepuskurilla, vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä ja latauskontrollina käytettiin  $\beta$ -aktiinia. Embigiinijuovien koko vaihtelee eri solulinjojen välillä ihmisen embigiinivasta-aineilla ja eri solulinjat ilmentävät eri määriä embigiiniä.

Embigiinin *N*-glykosylaatiota yritettiin estää tunikamysiinillä HeLa-soluissa, ja solujen embigiinijuovia tarkasteltiin WB:ssa ab127692-vasta-aineella (kuva 21A). Korkeimmilla pitoisuuksilla tunikamysiini tappoi suurimman osan soluista ja siksi WB-geelillä ei ollut tasaista latausta. Tunikamysiinikäsittelyllä ei kuitenkaan ollut selkeää vaikutusta suurempien embigiinijuovien (noin 50 ja 90 kDa) intensiteettien heikentymiseen tai pienempien embigiinin ydinproteiinien kokoisten juovien (32 ja 37 kDa) intensiteettien voimistumiseen verrattuna DMSO-kontrollikäsiteltyihin soluihin (kuva 21B).





**Kuva 21. Tunikamysiinikäsittelyllä ei ollut vaikutusta embigiinijuovien kokoon. A.** Embigiinin glykosylaatiota yritettiin estää tunikamysiinillä HeLa-soluissa pitoisuuksissa 0,1, 0,25, 0,5, 0,75 ja 1  $\mu\text{g/ml}$  (pelkkä DMSO kontrollina). Käsiteltyjen solujen embigiinijuovien kokoja tarkasteltiin ab127692 vasta-aineella. Solut hajotettiin suoraan SDS-näytepuskurilla, vasta-aineet olivat maito-TBST:ssä ja latauskontrollina käytettiin  $\beta$ -aktiinia. Korkeimmilla pitoisuuksilla tunikamysiini tappoi suuren osan soluista ja siksi lataus ei ole geelillä tasainen. **B.** Embigiinijuovien (32 & 37 kDa, 50 kDa sekä 90 kDa) intensiteetit mitattiin ja ne suhteutettiin solujen aktiinitasoihin. Juovien intensiteeteissä ei havaittu merkittäviä muutoksia DMSO-kontrolliin verrattuna.

## 8 TULOSTEN TARKASTELU

Embigiini saattaa olla solun kasvuun ja kehitykseen liittyvä glykoproteiini, joka välittää solun ja solun ulkopuolisen matriksin välisiä vuorovaikutuksia (Huang ja muut 1993). Aiemmin tutkimusryhmässämme ihmisen embigiinin N-terminaalisen solun ulkopuolisen osan on havaittu sitoutuvan soluväliaine proteiineista erityisesti fibronectiiniin, mutta muuta sen toiminnasta ei juuri tiedetty, joten lähtötilanteessa embigiinin tutkimus oli vielä hyvin alkuvaiheessa. Proteiinitasolla tutkittiin embigiinin toimintaa fibronectiini-reseptorina tavoitteena selvittää sen sitoutumismekanismi fibronectiiniin. Solutasolla yritettiin tutkia embigiinin tehtävää soluadheesiossa luomalla ihmisen embigiinihiljennetty solulinja. Lisäksi yritettiin löytää toimiva ihmisen embigiinivasta-aine.

### 8.1 Proteiinitason tutkimukset

#### *8.1.1 EMB-GST-proteiinin tuotto on haastavaa*

Embigiinin solun ulkopuolista osaa tuotettiin GST-fuusioproteiineina *Escherichia coli* -soluissa villityyppinä ja viitenä erilaisena pistemutaatioasettinä. Embigiinistä tutkittiin solun ulkopuolista osaa liukoisena, koska membraaniproteiineja on hankalampaa tuottaa ja tutkia kokonaisina. Mutaatioissa tietyt aminohapot oli muutettu alaniiniksi embigiinin solun ulkopuolisessa rakenteessa, ja näiden mutatoitujen aminohappojen ajateltiin olevan tärkeitä embigiinille fibronectiinisitoutumisessa. Suurin osa mutaatioista sijaitti embigiinin solukalvoa lähempänä olevassa domeenissa (D2), koska aiemmin tutkimusryhmässämme ollaan havaittu, että D2 sitoutuu D1:tä voimakkaammin fibronectiiniin.

EMB-GST:tä tuotettiin *E. coli* BL21 -soluissa ja se puhdistettiin solulysoatista GST-leimaan perustuvalla affiniteettikromatografialla. EMB-GST:n tuotossa oli ongelmia, koska tuotettujen EMB-erien saanto ja toimivuudet EuLISA-kokeissa vaihtelivat paljon. Näitä yritettiin parantaa käyttämällä proteiinin tuoton indusoinnissa vähemmän IPTG:tä ja kokeilemalla proteaasi-inhibiittoreita, jotka estävät proteiineja hajottavien entsyymien toimintaa. Näillä ei kuitenkaan ollut vaikutusta erien saantoihin tai toimivuuteen. EMB-GST:n toimimattomuus saattaa johtua Ig-domeeneja koossa pitävien rikkisiltojen laskostumisongelmasta. Tuotossa kokeiltiin SHuffle ja Origami *E. coli* -solukantoja, joilla on kyky edistää proteiinien rikkisiltojen muodostumista, mutta tämäkään ei parantanut EMB-GST-erien toimivuutta. Tuotossa saatiin enemmän embigiiniä, kun bakteerisolut hajotettiin tehokkaammin isommalla sonikointikärjellä, mutta tästä huolimatta EMB-GST:t eivät aina olleet toimivassa muodossa. SDS-PAGE-geelin perusteella toimimattomat EMB-GST:t ovat saattaneet hajota embigiiniksi ja GST:ksi, jolloin GST-vasta-aine ei tunnista embigiinin sitoutumista ligandiinsa, vaikka proteiinia olisi käytetty oikea määrä EuLISA-kokeissa.

#### *8.1.2 Embigiini sitoutuu fibronektiiniin mutta sitoutumismekanismi on vielä epäselvä*

WT:n ja mutatoitujen EMB-GST-proteiinien sitoutumista fibronektiiniin tutkittiin EuLISA-kokeissa. Kokeissa fibronektiini laitettiin kuopan pohjalle ja EMB-GST:n sitoutuminen siihen havaittiin europium-leimatulla GST-vasta-aineella mittaamalla europium-leiman aikaerotteisia fluoresenssiarvoja. Kokeessa sitoutumisen kontrolleina käytettiin GST:tä ja BSA:ta, joiden tasot pysyivät alhaisina. Suurten erävaihteluiden takia varsinaisiin sitoutumiskokeisiin EMB-GST-eristä valittiin parhaiten toimivat erät kustakin mutantista ja villityypistä aiempien EuLISA-testisitoutumiskokeiden perusteella. Näistä EMB-GST-eristä tehtiin sitoutumiskäyrät ja sitoutumisten voimakkuudet määritettiin.

Sitoutumisen voimakkuutta kuvataan usein dissosiaatiovakion ( $K_d$ ) arvolla. Mitä pienempi arvo on, sitä suurempi on ligandin sitoutumisen voimakkuus sitoutumisen kohteeseen. Sitoutumiskäyrät sovitettiin Hillin yhtälöön ja Hillin vakio oletettiin yhdeksi, jolloin yhtälö noudattaa Michaelis-Mentenin kinetiikkaa, jolloin voidaan olettaa, että dissosiaatiovakio  $K_d$  vastaa Michaelis-vakiota  $K_m$ .

Ihmisen embigiinin tarttuminen fibronektiiniin pystyttiin luotettavasti toistamaan, ja sitoutumisvoimakkuus oli heikkoa ( $K_d$  parhaimmillaan 240 nM luokkaa), mikä on tyypillistä monille membraaniproteiinien välisille vuorovaikutuksille (Hanna ja muut 2003). Kuitenkaan minkään fibronektiinisitoutumisessa tärkeäksi ajatellun kohdan mutatoiminen embigiinin rakenteessa ei estänyt sitoutumista, mutta fibronektiinisitoutuminen oli kuitenkin hieman alentunut. Tuloksille ei kuitenkaan tehty tilastollista analysointia, koska erot sitoutumisissa olivat melko pieniä.

Mikään yksittäinen mutaatio ei estänyt fibronektiiniin sitoutumista, joten kokeiltiin myös kaikkia mutaatioita samassa proteiinissa. Haluttiin siis testata, osallistuuko useampi kohta embigiinin rakenteessa fibronektiinisitoutumiseen. Tämäkään muutos ei estänyt sitoutumista fibronektiiniin. Mutatoidut aminohapot eivät siis luultavasti ole fibronektiinisitoutumiselle tärkeitä embigiinin rakenteessa, ja sitoutumismekanismi on oltava erilainen kuin ollaan ajateltu. Tulokset auttavat kuitenkin sitoutumisen mallintamista tulevaisuudessa. On myös muistettava, että mallitettu embigiinin rakenne on vasta malli, joten rakenne ja sen toiminta voivat poiketa jonkin verran siitä, mitä tähän mennessä on ajateltu.

Embigiini saattaa avustaa myös integriinejä (Huang ja muut 1993) ja se voisi olla integriinejä avustava proteiini fibronektiinisäiemuodostuksessa. Toisaalta aiemmin tutkimusryhmässämme embigiinin on havaittu sitoutuvan fibronektiinin lisäksi jossain määrin myös muihin soluväliaine proteiineihin, mitä voisi tutkia vielä lisää. Embigiinillä saattaa siis olla muitakin merkittäviä vaikutuskohteita fibronektiinin lisäksi.

Ihmisen embigiinillä on yhdeksän potentiaalista *N*-glykosylaatiokohtaa (UniProt: Q6PCB8). Embigiinin glykosylaatiotaso vaihtelee paljon ja tämän myötä myös sen vaihtelee (Ozawa ja muut 1988). Ilman glykosylaatiota embigiinin ydinproteiini on kooltaan 37 kDa (UniProt: Q6PCB8) ja lyhyemmän silmukointivariantin ydinproteiini on 32 kDa (UniProt: Q6PCB8-2). *E. colissa* tuotetussa embigiinissä ei ole glykosylaatiota. Glykosylaation vaikutusta tai eri glykosylaatiomuotojen merkitystä embigiinin toimintaan ei tiedetä proteiini- tai solutasolla. Solukalvon hiilihydraateilla voi olla merkittävä tehtävä solun tunnistustapahtumissa, ja ne säätelevät selviytymistä, migraatiota, adheesiota, kasvua ja erilaistumista useissa eri soluissa (katsausartikkelissa Muramatsu 2000). Glykosylaatiolla voi olla aktiivisuutta joko stimuloiva tai inhiboiva vaikutus (Goettig 2016). Glykosylaatio on basigiinin ja neuroplastiinin toiminnalle välttämätöntä (Guo ja muut 1997; Langaese ja muut 1997), joten luultavasti se on myös embigiinin toimintaa säätelevä tekijä, koska embigiini on myös perheen jäsenistä voimakkaimmin glykosyloitu.

### *8.1.3 Embigiinin homofiilisestä interaktiosta ei ole varmuutta*

Basigiini ja neuroplastiini esiintyvät sekä kahden että kolmen Ig-domeenin isomuotona ja embigiini puolestaan vain kahden Ig-domeenin muotoisena (kuva 3). Basigiinilla ja neuroplastiinilla on havaittu homofiilistä interaktiota etenkin, kun rakenne koostuu kolmesta Ig-domeenista (Hanna ja muut 2003; Smalla ja muut 2000). Haluttiin tutkia, esiintyykö myös embigiinillä tämän kaltaista vuorovaikutusta, vaikka se ei esiinnykään kolmen Ig-domeenin muotoisena. Biacore-menetelmä perustuu pintaplasmoni-resonanssiin, ja sen avulla pystytään seuraamaan proteiini-proteiini-vuorovaikutuksen sitoutumisvoimakkuutta ja -nopeutta (Myszka ja muut 1998). Biacore-lastun yksi kanava päällystettiin EuLISA-kokeissa toimivaksi todetulla EMB-GST:llä ja toinen kanava kontrolliksi GST:llä. Embigiini-embigiini-sitoutumista ei havaittu, joten embigiinillä ei välttämättä esiinny homofiilistä interaktiota. Toisaalta myöskään fibronektiini-embigiini-sitoutumista ei havaittu, joten on mahdollista, ettei embigiini ollut oikeassa muodossa lastuun sitoutuneena. Embigiinin homofiilisen interaktion tutkiminen jäi kesken, koska embigiini olisi pitänyt saada sitoutumaan lastulle varmasti toimivaan muotoon.

## 8.2 Solutason tutkimukset

### 8.2.1 Embigiini hiljennettiin MG-63-soluista osittain

Embigiini yritettiin hiljentää ihmisen MG-63-osteosarkoomasoluista CRISPR/Cas9-tekniikalla. Kolme erilaista embigiini CRISPR KO-plasmidia sekä embigiini HDR -plasmidi transfektoitiin soluihin, jolloin embigiini CRISPR KO -plasmidit leikkasivat *EMB*-geenistä tietystä kohdasta palan pois ja embigiini HDR -plasmidi korjasi syntyneen DNA:n kaksoisjuosteen katkeamisen homologiaan perustuvalla korjauksella (*engl.* *homology directed repair*, HDR). CRISPR KO -plasmidien sisältämien GFP:n ja HDR-plasmidin sisältämän RFP:n avulla transfektion onnistuminen pystyttiin tarkistamaan konfokaalimikroskoopilla. Soluissa näkyi hieman enemmän RFP:tä kuin GFP:tä, joten HDR-plasmidin transfektio oli tehokkaampaa kuin CRISPR KO -plasmidin.

Soluihin transfektoitu HDR-plasmidi sisälsi puromysiiniresistenttisyysgeenin, jonka avulla hiljennetyt solut pystyttiin rikastamaan. Optimaaliseksi puromysiinipitoisuudeksi valittiin 2 µg/ml, koska se tappoi kaikki MG-63 WT -solut viidessä päivässä. Soluille tehtiin puromysiini-antibioottiselektio ja se lopetettiin viiden päivän jälkeen, jolloin kontrollisolut olivat kuolleet ja embigiinihiljennettyjä soluja oli hyvin vähän elossa. Parhaiten kasvavista soluista kasvatettiin yksisolukloonit.

Hiljennetyistä soluista valikoitiin embigiinihiljentyneet solut TaqMan-tulosten perusteella, jossa solujen embigiini-mRNA-tasoja verrattiin β-aktiiniin ja GAPDH:hon. Aktiini- ja GAPDH-tasoihin vertaaminen antoivat samansuuntaisia tuloksia solujen embigiinitasoista, tosin joissakin soluissa niiden välillä oli jonkin verran eroa. Ei kuitenkaan tiedetty, kumpaan vertailu olisi ollut luotettavampaa, joten siksi embigiinihiljentyneiden solujen valinnassa embigiinitasot olivat lähellä nollaa sekä aktiini- että GAPDH-tasoihin verrattuna. Myöhemmin havaittiin, että todellisuudessa vain osa näistä soluista oli osittain hiljentyneitä *EMB*<sup>+/-</sup>-soluja ja muista soluista embigiini ei ollut hiljentynyt edes osittain. Tämän takia TaqMan-tuloksia ei pidetty kovin luotettavina ja niille ei tehty tilastollista analyysia. Tulosten luotettavuuden parantamiseksi koe olisi kannattanut toistaa ja näytteistä olisi pitänyt tehdä kolme rinnakkaista kahden sijaan.

MG-63 WT ja hiljennettyjen solujen embigiini-ilmentymistä verrattiin proteiinitasolla WB:ssa Abcamin ab179801-vasta-aineella. WB:ssa näkyi monta juovaa, joiden ajateltiin johtuvan embigiinin eri glykosylaatiomuodoista. WT- ja EMB KO -solujen välillä ei näkynyt selkeää eroa juovien intensiteeteissä ja siksi tuloksille ei tehty tilastollista analysointia. Myöhempien tulosten perusteella todellisuudessa vain osa soluista oli EMB<sup>+/-</sup> ja näiden solujen embigiinitasot eivät näyttäneet olevan myöskään villityypin soluja alhaisemmat eli osittainen hiljennys ei juuri näkynyt soluissa proteiinitasolla. Toisaalta myöskään ab179801-vasta-aineen toimivuudesta ei ollut varmuutta.

IF-mikroskopiassa MG-63 WT ja hiljennettyjä soluja (EMB<sup>+/-</sup> 32) verrattiin toisiinsa värjäämällä niistä embigiini ja fibronktiini. Embigiini näytti kertyvän erityisesti solujen pinnoille ja solukalvon ulokkeisiin. EMB<sup>+/-</sup>-soluissa embigiinivärjäys näkyi yhtä voimakkaana kuin WT-soluissa, joten osittainen hiljennys ei näkynyt soluissa proteiinitasolla. On myös mahdollista, ettei vasta-aine tunnista spesifisesti ainoastaan embigiiniä, sillä myöhempien tulosten perusteella MG-63-soluissa ilmentyy vain vähän embigiiniä ja tällä vasta-aineella soluissa näyttäisi olevan melko paljon embigiiniä. EMB<sup>+/-</sup>-soluissa fibronktiinisäikeet olivat näkyvissä, kun taas täysin embigiinihiljentyneissä soluissa fibronktiini ei välttämättä ole säiemäisenä, jos embigiini osallistuu fibronktiinisäiemuodostukseen.

MG-63 WT- ja embigiinihiljennettyjen (EMB<sup>+/-</sup>) -solujen tarttumista fibronktiiniin mitattiin xCELLigence-laitteella, joka mittaa sähkövirran muuttumista solujen tarttuessa ja levitessä kultapäälystetyn kuoppalevyn kuopan pohjaan. Solujen kyvyissä sitoutua ja levitä fibronktiinille ei juuri havaittu eroa. BSA- ja muovi-kontrollisitoutumisten signaalitasot olivat yllättävän korkeita, koska ne olivat samalla tasolla tai jopa korkeampia solujen fibronktiinisitoutumiseen verrattuna, mikä saattoi johtua seerumillisen mediumin käytöstä kokeessa. Parhaiten sitoutuivat EMB<sup>+/-</sup> 1 -solut ja huonoiten EMB<sup>+/-</sup> 32 -solut, joten embigiinihiljennyksellä ei ollut vaikutusta solujen sitoutumis- ja leviämisominaisuuksiin näille alustoille. Havaitut pienet erot saattoivat johtua xCELLigence-levyn reunakaivovaiikutuksesta, ja solut olisi pitänyt asemoida järkevämpään järjestykseen kuoppalevylle. Tämän takia tuloksia ei vertailtu tilastollisesti.

TaqMan-tulosten perusteella valitut MG-63 EMB KO -solut eivät siis eronneet villityypin soluista WB:ssa, IF:ssä tai xCELLigence-mittauksissa, joten solujen embigiinihiljentymisen onnistuminen päätettiin tarkistaa PCR:llä. Geelillä WT-soluissa näkyi 706 emäsparin kokoinen juova ja EMB<sup>+/-</sup>-soluissa näkyi lisäksi pienempi juova, jossa EMB-geenistä oli lähtenyt pala pois CRISPR/Cas9-hiljennyksessä. EMB<sup>-/-</sup>-soluissa olisi pitänyt näkyä vain pienempi juova. CRISPR/Cas9-menetelmällä onnistuttiin saamaan EMB<sup>+/-</sup>-soluja mutta ei EMB<sup>-/-</sup>-soluja. Osa soluista ei ollut hiljentynyt lainkaan. Toisaalta WT- ja EMB<sup>+/-</sup>-solujenkaan välillä ei näkynyt eroa, joten osittainen hiljennys ei juuri näkynyt soluissa.

PCR-geelillä näkyvien juovien sekvenssit haluttiin varmistaa oikeiksi ja samalla selvitettiin, millainen pätkä EMB-geenistä lähtee pois CRISPR/Cas9-hiljennyksessä, koska valmistaja ei kertonut tätä. Geeliltä eristettyjen WT- ja EMB<sup>+/-</sup>-solujen ala ja -yläjuovien DNA:t lähetettiin sekvensoitaviksi. EMB<sup>+/-</sup>-alajuovan ja -yläjuovan sekvenssit rinnastettiin WT:n sekvenssiin, jolloin havaittiin, että CRISPR/Cas9-hiljennyksessä EMB-geenistä on poistunut 98 emäsparin pätkä. PCR-geelillä näkynyt pienempi juova oli siis 608 emäsparin kokoinen.

PCR-tuloksista huomattiin myös, että noin 6 kbp kokoista HDR-plasmidia ei näkynyt agarosigeeleillä. Soluissa ei näkynyt HDR-plasmidin sisältämää RFP:tä virtausytometrillä tai konfokaalimikroskoopilla katsottaessa. Lisäksi solut kuolivat puromysiinikäsittelyssä, joten voitiin olettaa, ettei soluissa enää ollut HDR-plasmidia. On mahdollista, että HDR-plasmidi ei ole kunnolla insertoitunut hiljennettyjen solujen genomiin tai se on spontaanisti poistunut sieltä.



CRISPR/Cas9-hiljennystä yritettiin uudelleen ja solut yritettiin sortteerata FACS:lla soluihin transfektoitujen plasmidien sisältämien GFP:n ja RFP:n perusteella. Leimat näkyivät kuitenkin heikosti ja soluja oli hankalaa erotella niiden avulla, joten tämä keino transfektoituneiden solujen selektioon ei ollut antibioottiselektiota parempi. PCR-tulosten perusteella saatiin jälleen vain  $EMB^{+/-}$ -soluja. MG-63-solut voivat olla osittain triploidisia, mikä voi vaikeuttaa hiljennystä, koska niissä saattaa olla 3 hiljennettävää  $EMB$ -alleelia. Selvisi myös, että MG-63-soluissa on embigiiniä hyvin vähän, joten WT- ja  $EMB^{-/-}$ -solut tuskin eroavaisivat paljoakaan toisistaan. Päätettiin etsiä solulinja, jossa olisi enemmän embigiiniä, ja näistä soluista yritettiin hiljennystä eri tekniikalla.

### *8.2.2 Lentivirushiljennyksessä oli teknisiä ongelmia*

Embigiini yritettiin hiljentää seuraavaksi mRNA-tasolla lentivirustekniikalla. Eri solulinjojen embigiini-mRNA-ilmentymistasoja verrattiin keskenään, ja tämän perusteella hiljennykseen valittiin DU145-eturauhassyöpösolulinja, jossa pitäisi ilmentyä enemmän embigiiniä, kuin aiemmin käytetyissä MG-63-soluissa.

Lentivirustekniikka perustuu pGIPZ-plasmideihin pakattuihin lentivirus-shRNA:ihin, jotka aiheuttavat RNA-interferenssiä eli hajottavat sekvenssispesifisesti mRNA:ta. Transfektion kontrollina käytetty ei-kohdentuva shRNA sisältää pelkän pGIPZ-plasmidin, ja hiljennyksen toimivuuden kontrollina käytetty GAPDH:hon kohdentuva shRNA hiljentää solujen GAPDH:ta. Transfektion onnistuminen tarkistettiin soluista pGIPZ-plasmidin sisältämän GFP-signaalin perusteella. Solujen transfektiotehokkuus näytti huonolta, koska niistä alle 5 % oli transfektoitunut.

TaqManissä hiljennettyjen ja kontrollisolujen embigiinitasoissa ei havaittu merkittäviä eroja GAPDH-tasoihin verrattaessa, kun taas  $\beta$ -aktiinitasoihin verrattaessa embigiinihiljennetyissä soluissa embigiiniä vaikutti ilmentyvän vähemmän.  $\beta$ -aktiini- ja GAPDH-tulokset poikkesivat toisistaan, ja kynnyssykliarvoista (Ct) havaittiin  $\beta$ -aktiinitasojen vaihtelevan GAPDH-tasoja enemmän. Kynnyssykli (Ct) kuvaa sykliä, jossa PCR-tuotetta alkaa muodostua. Mitä pienempi Ct-arvo on, sitä enemmän kyseisen proteiinin mRNA:ta on soluissa. Erityisesti ei-kohdentuvissa kontrollisoluissa  $\beta$ -aktiinia oli muita soluja vähemmän, mikä vääristää embigiini-ilmentymistulosta. Ct-arvojen perusteella embigiini ei siis ollut hiljentynyt hiljennetyistä soluista ja GAPDH-kontrollihiljennetyissä soluissakaan ei näkynyt GAPDH-hiljentymistä, joten kokeessa oli jotain vialla. DU145 WT-soluissa oli muihin soluihin verrattuna hyvin vähän embigiiniä. Näiden solujen olisi pitänyt ilmentää embigiiniä kontrollisolujen tasolla. On siis mahdollista, että embigiinin ilmentyminen vaihtelee soluissa kasvuolosuhteiden mukaan. Proteiinitasolla WB:ssa embigiinijuovien intensiteeteissä ei havaittu eroa ab127692-vasta-aineella (Abcam), joten embigiini ei ollut hiljentynyt soluista ja hiljennystä yritettiin uudelleen. Tästä syystä myöskään tilastollista tarkastelua ei tehty.

Transfektio tehokkuus oli ensimmäisellä lentivirushiljennysyrityksellä huono, joten toisella yrityksellä käytettiin enemmän viruspartikkeleita ja kaikki kolme eri embigiini-shRNA:n sisältävää pGIPZ-plasmidia transfektoitiin samaan aikaan soluihin hiljennyksen tehostamiseksi. Tälläkin kertaa transfektio tehokkuus kuitenkin jäi alhaiseksi.

TaqManissä embigiinihiljennetyissä soluissa embigiiniä vaikutti ilmentyvän vähemmän kuin ei-kohdentuvissa kontrollisoluissa  $\beta$ -aktiinitasoihin verrattaessa, kun taas GAPDH-tasoihin verrattaessa vastaavaa eroa ei näkynyt. Ct-arvojen perusteella solujen  $\beta$ -aktiinitasot vaihtelivat jälleen GAPDH-tasoja enemmän, joten GAPDH:ta voidaan pitää luotettavampana proteiinien ilmentymisen kontrollina TaqManissä. Ct-arvoista huomattiin, ettei embigiinihiljennettyjen solujen embigiini-ilmentyminen ollut juuri vähentynyt ja ettei GAPDH ollut hiljentynyt tälläkään kertaa GAPDH-hiljennetyistä soluista, joten hiljennyksessä oli edelleen jokin tekninen vika.

Hiljennettyjen solujen embigiinitasot tarkistettiin myös proteiinitasolla WB:ssa ab179801- ja ab127692-vasta-aineilla (Abcam). ab179801-vasta-aineen noin 70-80 kDa kokoisen juovan intensiteetin perusteella embigiini vaikutti hiljentyneen osittain EMB1-3-soluista, mutta WB-toistossa vastaavaa eroa ei näkynyt. ab127692-vasta-aineen noin 50 ja 90 kDa kokoisten juovien intensiteettien perusteella embigiini ei ollut hiljentynyt EMB1-3-soluista. Näiden ja TaqMan-tuloksien perusteella embigiini ei siis ollut hiljentynyt soluista toisellakaan hiljennysyrityksellä.

Tarkoituksena olisi verrata embigiinihiljennettyjä soluja villityypin soluihin esimerkiksi niiden kyvyssä sitoutua fibronektiiniin ja tuottaa fibronektiinisäikeitä ja yhdistää siten solutason kokeet proteiinitason kokeiden tuloksiin. Tämä olisi tärkeää, jotta saataisiin selville, onko embigiinin ja fibronektiinin välisellä vuorovaikutuksella merkitystä solujen toiminnassa. Vielä tätä ei kuitenkaan pystytty tekemään, koska embigiiniä ei saatu hiljennettyä riittävällä tasoilla soluista kummallakaan hiljennystekniikalla ja koska osittain hiljennetyt solut eivät eronneet villityypistä.

### *8.2.3 Ihmisen embigiinivasta-aineiden toimivuudesta ei ole varmuutta*

Aiemmin embigiinin tutkimuksessa ei ollut saatavilla varmasti toimivia kaupallisia ihmisen vasta-aineita. Embigiinitutkimuksissa on käytetty itsetehtyjä embigiinivasta-aineita rotan (Guenette ja muut 1997; Wilson ja muut 2005) ja hiiren embigiinille (Pridans ja muut 2008). Lisäksi jotakin kaupallisia ihmisen embigiinivasta-aineita on testattu (Pértega-Gomes ja muut 2011; Chao ja muut 2015; Jung ja muut 2016), mutta tarkkoja tietoja näistä vasta-aineista tai niiden toimivuudesta ei ole mainittu. Tämän takia testattiin useita eri embigiinivasta-aineita WB:ssa HeLa-soluilla, joissa pitäisi ilmentyä embigiiniä.

Ihmisen embigiinillä on yhdeksän potentiaalista *N*-glykosylaatiokohtaa ja glykosyloidun muodon koon on havaittu vaihtelevan välillä 62-90 kDa (Ozawa ja muut 1988). Eri vasta-aineiden välillä embigiinijuovien koko vaihteli paljon ja tämän ajateltiin mahdollisesti johtuvan embigiinin eri glykosylaatiomuodoista tai vasta-aineiden epäspesifisyydestä. Osa testatuista vasta-aineista tunnisti voimakkaasti positiivisena kontrollina käytetyn rekombinantin EMB-GST:n, joten nämä vasta-aineet tunnistavat solun ulkopuolisen osan embigiinistä. Osa puolestaan ei tunnistanut tai tunnisti EMB-GST:n heikosti, joten vasta-aineet saattavat tunnistaa pääasiassa solun sisäisen osan embigiinistä tai eivät välttämättä tunnista embigiiniä lainkaan. Hiiren G7.43.1-vasta-aine (eBioscience) ei tunnistanut EMB-GST:tä. Se ei välttämättä tunnista kunnolla ihmisen embigiiniä, koska ihmisen ja hiiren embigiinit ovat sekvensseiltään 65 % samankaltaisia, tai se saattaa tunnistaa solun sisäisen osan embigiinistä.

Kolmea lupaavalta vaikuttavaa ihmisen embigiinivasta-ainetta vertailtiin eri solulinjoilla WB:ssa. Huomattiin, että embigiinijuovien koko ja määrä vaihtelevat solulinjojen välillä ja että eri solulinjat ilmentävät eri määriä embigiiniä. G7.43.1-vasta-aineella huomattiin, että MG-63-soluissa oli selkeästi vain vähän embigiiniä verrattuna muihin testattuihin solulinjoihin. Tämä vastasi embigiini-mRNA-haun tulosta, joka perustui Affymetrix-sirudataan eri solulinjojen embigiini-mRNA-tasoista. Tämän perusteella hiiren vasta-aine vaikuttaa näistä kolmesta vasta-aineesta luotettavimmalta, koska kahdella muulla vasta-aineella (Abcam ab127692 ja LS Bioscience LS-C148454) vastaavaa eroa ei näkynyt.

Ihmisen embigiinivasta-aineiden monien eri tunnistuskohtien ajateltiin johtuvan embigiinin eri glykosylaatiomuodoista. Embigiinin glykosylaatiota yritettiin estää HeLa-soluissa proteiinien *N*-glykosylaatiota estävällä tunikamysiinillä. WB:ssa ab127692-vasta-aineella (Abcam) tunikamysiini-käsittelyllä ei kuitenkaan ollut selkeää vaikutusta suurempien embigiinijuovien intensiteettien heikentymiseen tai pienempien embigiinin ydinproteiinien kokoisten juovien intensiteettien voimistumiseen, joten juovien suuri määrä saattaa johtua kyseisen vasta-aineen epäspesifisyydestä. On myös mahdollista, ettei tunikamysiini toiminut pienimmillä käytetyillä pitoisuuksilla, kun taas suuremmilla pitoisuuksilla solut puolestaan kuolivat.

Ihmisen eri embigiinivasta-aineet toimivat siis hyvin eri tavoin, joten luultavasti osa niistä on epäspesifisiä eli ne eivät välttämättä tunnista ainoastaan embigiiniä. Embigiinin tutkimus on osoittautunut haastavaksi toimivien ihmisen embigiinivasta-aineiden puuttuessa ja vasta-aineiden toimivuus on edelleen epävarmaa. Hiiren G7.43.1-vasta-aine vaikuttaa kuitenkin lupaavalta, koska se on toiminut aiemmin virtaussytometriassa ja kudოსleikevärjäyksissä (Pridans ja muut 2008) ja se vaikuttaisi toimivan myös WB:ssa paremmin kuin ihmisen vasta-aineet.

#### *8.2.4 Seuraavaksi embigiinin tutkimuksessa siirrytään hiirimalliin*

Saatujen tulosten perusteella tällä hetkellä ei ole saatavilla varmasti toimivia ihmisen vasta-aineita, joten seuraavaksi tutkimuksessa olisi tarkoituksena siirtyä hiirimalliin, koska hiiren embigiinivasta-aine vaikuttaa testatuista vasta-aineista luotettavimmalta. Tavoitteena olisi esimerkiksi hiljentää embigiini mRNA-tasolla hiiren soluista ja yhdistää näillä soluilla tehdyt kokeet proteiinitason kokeisiin. Proteiinitasolla pitäisi myös siis selvittää, sitoutuuko rekombinantisti tuotettu hiiren Emb-GST-proteiini fibronektiiniin vastaavasti kuin ihmisen EMB-GST.

Embigiini on luultavasti tärkeä proteiini alkionkehityksessä, koska sen on havaittu ilmentyvän voimakkaasti hiiren alkionkehityksen alkuvaiheessa (Huang ja muut 1990). Lisäksi tutkimusryhmässämme on aiemmin havaittu, että TUKO53 Embigiini KO -homotsygoottihierien syntyvyys on selkeästi alentunut, mutta syytä tälle ei vielä tiedetä. Mousefenotype.org-sivuston tietojen perusteella Emb KO heterotsygooteilla hiirillä on havaittu epänormaaliutta sydämen ja maksan morfologiassa sekä sydämen suurentumista. Emb KO homotsygooteilla hiirillä on puolestaan havaittu alkiokuolleisuutta ja epänormaaliutta rakkularauhasen morfologiassa. Tulevaisuudessa halutaan tutkia, missä ja milloin embigiini ilmentyy proteiinitasolla hiiren alkioidissa ja miksi ja milloin EMB KO -homotsygoottialkiot kuolevat. Toisaalta tavoitteena on myös selvittää, miksi osa näistä alkioidista selviää ja eroavatko aikuiset Emb KO -hiiret villityypin hiiristä.

## 9 YHTEENVETO

Embigiini saattaa olla solun kasvuun ja kehitykseen liittyvä glykoproteiini, joka välittää solun ja soluväliaineen välisiä vuorovaikutuksia. Aiemmin tutkimusryhmässämme ihmisen embigiinin N-terminaalisen solun ulkopuolisen osan on havaittu sitoutuvan soluväliaine proteiineista erityisesti fibronektiiniin. Embigiini saattaa avustaa integriinien toimintaa, ja se voisi avustaa niitä esimerkiksi fibronektiinin säiemuodostuksessa.

Embigiinin toimintaa fibronektiinireseptorina yritettiin selvittää proteiinitasolla tutkimalla sen sitoutumismekanismia fibronektiiniin tekemällä ihmisen embigiinin solun ulkopuoliseen rakenteeseen mahdollisesti sitoutumisen estäviä mutaatioita. Embigiinin tarttuminen fibronektiiniin pystyttiin toistamaan luotettavasti, mutta minkään fibronektiiniin sitoutumisessa tärkeäksi ajatellun kohdan mutatoiminen ei estänyt sitoutumista, joten merkittävin sitoutumiskohta on luultavasti jokin muu. Saadut tulokset auttavat kuitenkin sitoutumisen mallitusta tulevaisuudessa. Embigiinillä ei havaittu homofiilista sitoutumista, mutta tätä pitäisi vielä tutkia lisää, koska embigiini ei välttämättä ollut toimivassa muodossa Biacore-lastulla.

Solutasolla tavoitteena oli luoda ihmisen embigiinihiljennetty solulinja. CRISPR/Cas9-hiljennysmenetelmällä onnistuttiin saamaan MG-63 EMB KO -heterotsygoottisoluja, mutta ei kuitenkaan homotsygoottisoluja. Heterotsygoottisolut eivät eronneet villityypistä, ja huomattiin, että MG-63-soluissa ilmentyi vain vähän embigiiniä. Hiljennystä yritettiin mRNA-tasolla lentivirustekniikalla enemmän embigiiniä ilmentävistä DU145-soluista. Hiljennys ei kuitenkaan toiminut jonkin teknisen ongelman vuoksi. Tarkoituksena olisi verrata embigiinihiljennettyjä soluja villityyppiin esimerkiksi niiden kyvyssä sitoutua fibronektiiniin ja fibronektiini-säiemuodostuksessa.

Ihmisen eri embigiinivasta-aineiden havaittiin toimivan hyvin eri tavoin ja suuri osa niistä vaikuttaa epäspesifisiltä. Embigiinin tutkimus on osoittautunut haastavaksi toimivien ihmisen vasta-aineiden puuttuessa. Hiiren embigiinivasta-aine vaikuttaa kuitenkin lupaavalta ja se näyttäisi toimivan testattuja ihmisen embigiinivasta-aineita paremmin. Seuraavaksi tutkimuksessa olisikin tarkoituksena siirtyä hiirimalliin.

## LÄHTEET

Albelda, S. M. & Buck, C. A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **4**:2868-2880.

Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* **339**:269-280.

Beesley, P. W., Herrera-Molina, R., Smalla, K. H. & Seidenbecher, C. (2014) The Neuroplastin adhesion molecules: key regulators of neuronal plasticity and synaptic function. *J Neurochem* **131**:268-283.

Belton, R. J., Jr., L. Chen, Mesquita, F. S. & Nowak R. A. (2008) Basigin-2 is a cell surface receptor for soluble basigin ligand. *J. Biol. Chem.* **283**:17805-17814.

Berditchevski, F., Chang, S., Bodorova, J. & Hemler, M. E. (1997) Generation of monoclonal antibodies to integrin-associated proteins. Evidence that alpha3beta1 complexes with EMMPRIN/basigin/OX47/M6. *J Biol Chem* **272**:29174-29180.

Bergersen, L. H. (2007) Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* **145**:11-19.

Bernstein, H. G., Smalla, K. H., Bogerts, B., Gordon-Weeks, P.R., Beesley, P. W., Gundelfinger, E. D. & Kreutz, M. R. (2007) The immunolocalization of the synaptic glycoprotein neuroplastin differs substantially between the human and the rodent brain. *Brain Res* **1134**:107-112.

Biswas, C. (1982) Tumor cell stimulation of collagenase production by fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **109**:1026-1034.

Biswas, C., Zhang, Y., DeCastro, R., Guo, H., Nakamura, T., Kataoka, H. & Nabeshima, K. (1995) The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res.* **55**:434-439.

Cao, Z., Said, N., Amin, S., Wu, H. K., Bruce, A., Garate, M., Hsu, D. K., Kuwabara, I., Liu, F. T. & Panjwani, N. (2002) Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. *J Biol Chem* **277**:42299-42305.

Carrott, L., Bowl, M. R., Aguilar, C., Johnson, S. L., Chessum, L., West, M., Morse, S., Dorning, J., Smart, E., Hardisty-Hughes, R., Ball, G., Parker, A., Barnard, A. R., Maclaren, R. E., Wells, S., Marcotti W. & Brown, S. D (2016) Absence of neuroplastin-65 affects synaptogenesis in mouse inner hair cells and causes profound hearing loss. *J Neurosci* **36**:222-234.

Chao, F., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, H., Yang, C., Wang, J., Guo, Y., Wen, X., Zhang, K., Huang, B., Liu, D. & Li, Y. (2015) Embigin, regulated by HOXC8, plays a suppressive role in breast tumorigenesis. *Oncotarget* **6**:23496-23509.

Chothia, C. & Jones, E. Y. (1997) The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* **66**:823-862.

Curtin, K. D., Meinertzhagen, I. A. & Wyman, R. J. (2005) Basigin (EMMPRIN/ CD147) interacts with integrin to affect cellular architecture. *J Cell Sci* **118**:2649-2660.

Dange, M. C., Bhonsle, H. S., Godbole, R. K., More, S. K., Bane, S. M., Kulkarni, M. J. & Kalraiya, R. D. (2017) Mass spectrometry based identification of galectin-3 interacting proteins potentially involved in lung melanoma metastasis. *Mol BioSyst* **13**:2303-2309.

Delwel, G. O., de Melker, A. A., Hogervorst, F., Jaspars, L. H., Fles, D. L., Kuikman, I., Lindblom, A., Paulsson, M., Timpl, R. & Sonnenberg, A. (1994) Distinct and overlapping ligand specificities of the alpha 3A beta 1 and alpha 6A beta 1 integrins: recognition of laminin isoforms. *Mol Biol Cell* **5**:203-215.

Deryugina, E. I. & Quigley, J. P. (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **25**:9-34.

Desrivières, S., Lourdasamy, A., Tao, C., Toro, R., Jia, T., Loth, E., Medina, L. M., Kepa, A., Fernandes, A., Ruggeri, B., Carvalho, F. M., Cocks, G., Banaschewski, T., Barker, G. J., Bokde, A. L., Büchel, C., Conrod, P. J., Flor, H., Heinz, A., Gallinat, J., Garavan, H., Gowland, P., Brühl, R., Lawrence, C., Mann, K., Martinot, M. L., Nees, F., Lathrop, M., Poline, J. B., Rietschel, M., Thompson, P., Fauth-Bühler, M., Smolka, M. N., Pausova, Z., Paus, T., Feng, J., Schumann, G. & IMAGEN Consortium. (2015) Single nucleotide polymorphism in the neuroplastin locus associates with cortical thickness and intellectual ability in adolescents. *Mol Psychiatry* **20**:263-274.

Fadool, J. M. & Linser, P. J. (1993) 5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glial interactions in avian neural retina. *Dev Dyn* **196**:252-262.

Fan, Q. W., Kadomatsu, K., Uchimura, K. & Muramatsu, T. (1998) Embigin/basigin subgroup of the immunoglobulin superfamily: different modes of expression during mouse embryogenesis and correlated expression with carbohydrate antigenic markers. *Dev Growth Differ* **40**:277-86.

Fearon, A. E., Gould, C. R. & Grose, R. P. (2013) FGFR signalling in women's cancers. *Int J Biochem Cell Biol* **45**:2832-2842.

Frantz C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**:4195-4200.

Garcia, C. K., Goldstein, J. L., Pathak, R. K., Anderson, R. G. W. & Brown, M. S. (1994) Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* **76**:865-873.



- Garcia, C. K., Brown, M. S., Pathak, R. K. & Goldstein, J. L. (1995) cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J Biol Chem* **270**:1843-1849.
- George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H. & Hynes, R. O. (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **119**:1079-1091.
- Goettig, P. (2016) Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *Int J Mol Sci* **17**:1969.
- Goody, M. F. & Henry, C. A. (2010) Dynamic interactions between cells and their extracellular matrix mediate embryonic development. *Mol Reprod Dev* **77**:475-488.
- Guenette, R. S., Sridhar, S., Herley, M., Mooibroek, M., Wong, P. & Tenniswood, M. (1997) Embigin, a developmentally expressed member of the immunoglobulin super family, is also expressed during regression of prostate and mammary gland. *Dev Genet* **21**:268-278.
- Gumbiner, B. M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**:345-357.
- Gundry, R. L., Raginski, K., Tarasova, Y., Tchernyshyov, I., Bausch-Fluck, D., Elliott, S. T., Boheler, K. R., Van Eyk, J. E. & Wollscheid, B. (2009) The mouse C2C12 myoblast cell surface *N*-linked glycoproteome: identification, glycosite occupancy, and membrane orientation. *Mol Cell Proteomics* **8**:2555-2569.
- Guo, H., Zucker, S., Gordon, M.K., Toole, B.P. & Biswas, C. (1997) Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **272**:24-27.
- Halestrap, A. P. & Price, N. T. (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* **343**:281-299.
- Hanna, S. M., Kirk, P., Holt, O. J., Puklavec, M. J., Brown, M. H. & Barclay, A. N. (2003) A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically. *BMC Biochem.* **4**:17.
- Hansen, S. M., Berezin, V. & Bock, E. (2008) Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cell Mol Life Sci* **65**:3809-3821.
- Hill I. E., Selkirk C. P., Hawkes R. B. & Beesley, P. W. (1988) Characterization of novel glycoprotein components of synaptic membranes and postsynaptic densities, gp65 and gp55, with a monoclonal antibody. *Brain Res* **461**:27-43.

- Hirohashi, S. & Kanai, Y. (2003) Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci* **94**:575-581.
- Hori, K., Katayama, N., Kachi, S., Kondo, M., Kadomatsu, K., Usukura, J., Muramatsu, T., Mori, S. & Miyake, Y. (2000) Retinal dysfunction in basigin deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**:3128-3133.
- Howard, J., Finch, N. A. & Ochrietor, J. D. (2010) Characterization of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) binding affinity for basigin gene products and L1cam. *Cell Mol Neurobiol* **30**:671-674.
- Hu, Y., Zhan, Q., Zhang, H., Liu, X., Huang, L., Li, H. & Yuan, Q. (2017) Increased susceptibility to ischemic brain injury in neuroplastin 65-deficient mice likely via glutamate excitotoxicity. *Front Cell Neurosci* **11**:110.
- Huang, R.-P., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1990) Developmentally regulated expression of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily found in embryonal carcinoma cells. *Differentiation* **45**:76-83.
- Huang, R. P., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1993) Embigin, a member of the immunoglobulin superfamily expressed in embryonic cells, enhances cell- substratum adhesion. *Dev Biol* **155**:307-314.
- Huang, Z., Li, S. & Korngold, R. (1997) Immunoglobulin superfamily proteins: structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymers* **43**:367-382.
- Husmann, M., Gorgen, I., Weisgerber, C. & Bitter-Suermann, D. (1989) Up-regulation of embryonic NCAM in an EC cell line by retinoic acid. *Dev Biol* **136**:194-200.
- Iacono, K. T., Brown, A. L., Greene, M. I. & Saouaf, S. J. (2007) CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* **83**:283-295.
- Igakura, T., Kadomatsu, K., Taguchi, O., Muramatsu, H., Kaname, T., Miyauchi, T., Yamamura, K., Arimura, K. & Muramatsu, T. (1996) Roles of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in behavior as to an irritating odor, lymphocyte response, and blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **224**:33-36.
- Igakura, T., Kadomatsu, K., Kaname, T., Muramatsu, H., Fan, Q.-W., Miyauchi, T., Toyama, Y., Kuno, N., Yuasa, S., Takahashi, M., Senda, T., Taguchi, O., Yamamura, K., Arimura, K. & Muramatsu T. (1998) A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol* **194**:152-165.

- Inoue, M., Kratz, G., Haegerstrand, A. & Ståhle-Bäckdahl, M. (1995) Collagenase expression is rapidly induced in wound-edge keratinocytes after acute injury in human skin, persists during healing, and stops at re-epithelialization. *J Invest Dermatol* **104**:479-483.
- Iozzo, R. V. & Schaefer, L. (2015) Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* **42**:11-55.
- Itoh, T., Tanioka, M., Matsuda, H., Nishimoto, H., Yoshioka, T., Suzuki, R. & Uehira, M. (1999) Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* **17**:177-181.
- Johansson, S., Svineng, G., Wennerberg, K., Armulik, A. & Lohikangas L. (1997) Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* **2**:d126-146.
- Jung, D. E., Kim, J. M., Kim, C. & Song, S. Y. (2016) Embigin Is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF- $\beta$  pathway. *Mol Carcinog* **55**:633-645.
- Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J. & Boot-Handford, R. P. (2007) Collagens at a glance. *J Cell Sci* **120**:1955-1958.
- Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B. S., Lew, A. M., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Nutt, S. L. (2007) Initiation of plasma cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity* **26**:555-566.
- Kanekura, T., Miyauchi, T., Tashiro, M. & Muramatsu, T. (1991) Basigin, a new member of the immunoglobulin superfamily: genes in different mammalian species, glycosylation changes in the molecule from adult organs and possible variation in the N-terminal sequences. *Cell Struct Funct* **16**:23-30.
- Kasinrerk, W., Fiebiger, E., Stefanova, I., Baumruker, T., Knapp, W. & Stockinger, H. (1992) Human leukocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J Immunol* **149**:847-854.
- Kasinrerk, W., Tokrasinwit, N. & Phunpae, P. (1999) CD147 monoclonal antibodies induce homotypic cell aggregation of monocytic cell line U937 via LFA-1/ICAM-1 pathway. *Immunology* **96**:184-192.
- Kataoka, H., DeCastro, R., Zucker, S. & Biswas, C. (1993) Tumor cell-derived collagenase-stimulatory factor increases expression of interstitial collagenase, stromelysin, and 72-kDa gelatinase. *Cancer Res* **53**:3154-3158.
- Khalili, A. A. & Ahmad, M. R. (2015) A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int J Mol Sci* **16**:18149-18184.

Kirk, P., Wilson, M. C., Heddle, C., Brown, M. H., Barclay, A.N. & Halestrap, A. P. (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J* **19**:3896-3904.

Kirsch, A. H., Diaz Jr., L. A., Bonish, B., Antony, P. A. & Fox, D. A. (1997) The pattern of expression of CD147/neurothelin during human T-cell ontogeny as defined by the monoclonal antibody 8D6. *Tissue Antigens* **50**:147-152.

Klein, C. A., Seidl, S., Petat-Dutter, K., Offner, S., Geigl, J. B., Schmidt-Kittler, O., Wendler, N., Passlick, B., Huber, R. M., Schlimok, G., Baeuerle, P. A. & Riethmüller, G. (2002) Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* **20**:387-392.

Klier, M., Schüler, C., Halestrap, A. P., Sly, W. S., Deitmer, J. W. & Becker, H. M. (2011) Transport activity of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 is enhanced by extracellular carbonic anhydrase IV but not by intracellular carbonic anhydrase II. *J Biol Chem* **286**:27781-27791.

Krishnan, V., Bane, S. M., Kawle, P. D., Naresh, K. N. & Kalraiya, R. D. (2005) Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium. *Clin Exp Metastasis* **22**:11-24.

Kuno, N., Kadomatsu, K., Fan, Q. W., Hagihara, M., Senda, T., Mizutani, S. & Muramatsu, T. (1998) Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. *FEBS Lett* **425**:191-194.

Lain, E., Carnejac, S., Escher, P., Wilson, M. C., Lømo, T., Gajendran, N. & Brenner, H. R. (2009) A novel role for embigin to promote sprouting of motor nerve terminals at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* **284**:8930-8939.

Langnaese, K., Beesley, P. W. & Gundelfinger, E. D. (1997) Synaptic membrane glycoproteins gp65 and gp55 are new members of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* **272**:821-827.

Lei, H., Wang, H., Juan, A. H. & Ruddle, F. H. (2005) The identification of Hoxc8 target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2420-2424.

Lei, H., Juan, A. H., Kim, M. S. & Ruddle, F. H. (2006) Identification of a Hoxc8-regulated transcriptional network in mouse embryo fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:10305-10309.

Li, Y., Zhang, M., Chen, H., Dong, Z., Ganapathy, V., Thangaraju, M. & Huang, S. (2010) Ratio of miR-196s to HOXC8 messenger RNA correlates with breast cancer cell migration and metastasis. *Cancer Res* **70**:7894-7904.

Liao, C.-G., Kong, L.-M., Song, F., Xing, J.-L., Wang, L.-X., Sun, Z.-J., Tang, H. Yao, H., Zhang, Y., Wang, L., Wang, Y., Yang, X.-M., Li, Y. & Chen, Z.-N. (2011) Characterization of basigin isoforms and the inhibitory function of basigin-3 in human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion. *Mol Cell Biol* **31**:2591-604.

Malinda, K. M. & Kleinman, H. K. (1996) The laminins. *Int J Biochem Cell Biol* **28**:957-959.

Mannowetz, N., Wandernoth, P. & Wennemuth, G. (2012) Basigin interacts with both MCT1 and MCT2 in murine spermatozoa. *J Cell Physiol* **227**:2154-2162.

Manoharan, C., Wilson, M. C., Sessions, R. B. & Halestrap, A. P. (2006) The role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporter 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity. *Mol Membr Biol* **23**:486-498.

Mao, Y. & Schwarzbauer, J. E. (2005) Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* **24**:389-399.

Matrisian, L. M. (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* **6**:121-125.

Mauris, J., Woodward, A. M., Cao, Z., Panjwani, N. & Argueso, P. (2014) Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *J Cell Sci* **127**:3141-3148.

McCullagh, K. J. A., Poole, R. C., Halestrap, A. P., O'Brien, M. & Bonen, A. (1996) Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *Am J Physiol* **34**:E143-E150.

Miner, J. H. (2008) Laminins and their roles in mammals. *Microsc Res Tech* **71**:349-356.

Mithieux, S. M. & Weiss, A. S. (2005) Elastin. *Adv Protein Chem* **70**:437-461.

Miyauchi, T., Kanekura, T., Yamaoka, A., Ozawa, M., Miyazawa, S. & Muramatsu, T. (1990) Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the b-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem* **107**:316-323.

Miyauchi, T., Masuzawa, Y. & Muramatsu, T. (1991) The basigin group of the immunoglobulin superfamily: complete conservation of a segment in and around transmembrane domains of human and mouse basigin and chicken HT7 antigen. *J Biochem* **110**:770-774.

Muramatsu, T., Muramatsu, H. & Ozawa, M. (1981) Receptors for *Dolichos biflorus* agglutinin on embryonal carcinoma cells. *J Biochem* **89**:473-481.

Muramatsu, T. (2000) Protein-bound carbohydrates on cell-surface as targets of recognition: An Odyssey in understanding them. *Glycoconj J* **17**:577-595.

Muramatsu, T. (2016) Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem* **159**:481-490.

Myszka, D., He, X., Dembo, M., Morton, T. & Goldstein, B. (1998) Extending the range of rate constants available from BIACORE: interpreting mass transport-influenced binding data. *Biophys J* **75**:583-594.

Naruhashi, K., Kadomatsu, K., Igakura, T., Fan, Q.-W., Kuno, N., Muramatsu, T. & Nabeshima, T. (1997) Abnormalities of sensory and memory functions in mice lacking Bsg gene. *Biochem Biophys Res Comm* **236**:733-737.

Noguchi, M., Noguchi, T., Watanabe, M. & Muramatsu, T. (1982) Localization of receptors for *Dolichos biflorus* agglutinin in early post implantation embryos in mice. *J Embryol Exp Morphol* **72**:39-52.

Ochrietor, J. D., Moroz, T. M., Kadamatsu, K., Muramatsu, T. & Linser, P. J. (2001) Retinal degeneration following failed photoreceptor maturation in 5A11/basigin-null mice. *Exp Eye Res* **72**:467-477.

Ochrietor, J. D., Moroz, T. P., Clamp, M. F., Timmers, A. M., Muramatsu, T. & Linser P. J. (2002) Inactivation of the Basigin gene impairs normal retinal development and maturation. *Vision Res* **42**:447-453.

Ochrietor, J. D., Moroz, T. P., van Ekeris, L., Clamp, M. F., Jefferson, S. C., de Carvalho, A. C., Fadool, J. M., Wistow, G., Muramatsu, T. & Linser, P. J. (2003) Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:4086-4096.

Ovens, M. J., Manoharan, C., Wilson, M. C., Murray, C. M. & Halestrap, A. P. (2010) The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochem J* **431**:217-225.

Owczarek, S., Kiryushko, D., Larsen, M. H., Gajhede, M., Sandi, C., Berezin, V., Bock, E. & Soroka V. (2010) Neuroplastin-55 binds to and signals through the fibroblast growth factor receptor. *FASEB J* **24**:1139-1150.

Owczarek, S., Soroka, V., Kiryushko, D., Yuan, Q., Sandi, C., Berezin, V. & Bock, E. (2011) Neuroplastin-65 and a mimetic peptide derived from its homophilic binding site modulate neuritegenesis and neuronal plasticity. *J Neurochem* **117**:984-994.

Owczarek, S. & Berezin, V. (2012) Neuroplastin: Cell adhesion molecule and signaling receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **44**:1-5.

Ozawa, M., Huang, R.-P., Furukawa, T. ja Muramatsu, T. (1988) A teratocarcinoma glycoprotein carrying a developmentally regulated carbohydrate marker is a member of the immunoglobulin gene superfamily. *J Biol Chem* **263**:3059-3062.

Pankov, R. & Yamada, K. M. (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**:3861-3863.

Pértéga-Gomes, N., Vizcaíno, J. R., Miranda-Gonçalves, V., Pinheiro, C., Silva, J., Pereira, H., Monteiro, P., Henrique, R. M., Reis, R. M., Lopes, C. & Baltazar, F. (2011) Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer* **11**:312.

Philp, N. J., Yoon, H. & Lombardi, L. (2001) Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. *Am J Physiol* **280**:C1319-C1326.

Philp, N. J., Ochrietor, J. D., Rudoy, C., Muramatsu, T. & Linser, P. J. (2003) Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:1305-1311.

Pierre, K. & Pellerin, L. (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* **94**:1-14.

Poole, R. C. & Halestrap, A. P. (1997) Interaction of the erythrocyte lactate transporter (monocarboxylate transporter 1) with an integral 70-kDa membrane glycoprotein of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* **272**:14624-14628.

Price, N. T., Jackson, V. N. & Halestrap, A. P. (1998) Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J* **329**:321-328.

Pridans, C., Holmes, M. L., Polli, M., Wettenhall, J. M., Dakic, A., Corcoran, L. M., Smyth, G. K. & Nutt, S. L. (2008) Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *J Immunol* **180**:1719-1728.

Reimers, N., Zafrakas, K., Assmann, V., Egen, C., Riethdorf, L., Riethdorf, S., Berger, J., Ebel, S., Jänicke, F., Sauter, G. & Pantel, K. (2004) Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **10**:3422-3428.

Ruoslahti, E. (1984) Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **3**:43-51.

Saito, A., Fujikura-Ouchi, Y., Kuramasu, A., Shimoda, K., Akiyama, K., Matsuoka, H. & Ito, C. (2007) Association study of putative promoter polymorphisms in the neuroplastin gene and schizophrenia. *Neurosci Lett* **411**:168-173.

- Schlegel, J., Redzic, J. S., Porter, C. C., Yurchenko, V., Bukrinsky, M., Labeikovskiy, W., Armstrong, G. S., Zhang, F., Isern, N. G., DeGregori, J., Hodges, R. & Eisenmesser, E. Z. (2009) Solution characterization of the extracellular region of CD147 and its interaction with its enzyme ligand cyclophilin A. *J Mol Biol* **391**:518-535.
- Silberstein, L., Goncalves, K. A., Kharchenko, P. V., Turcotte, R., Kfoury, Y., Mercier, F., Baryawno, N., Severe, N., Bachand, J., Spencer, J. A., Papazian, A., Lee, D., Chitteti, B. R., Srour, E. F., Hoggatt, J., Tate, T., Lo Celso, C., Ono, N., Nutt, S., Heino, J., Sipilä, K., Shioda, T., Osawa, M., Lin, C. P., Hu, G. F. & Scadden D. T. (2016) Proximity-based differential single-cell analysis of the niche to identify stem/progenitor cell regulators. *Cell Stem Cell* **19**:530-543.
- Sivak, J. M., West-Mays, J. A., Yee, A., Williams, T. & Fini, M. E. (2004) Transcription factors Pax6 and AP-2alpha interact to coordinate corneal epithelial repair by controlling expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. *Mol Cell Biol* **24**:245-257.
- Smalla, K. H., Matthies, H., Langnäse, K., Shabir, S., Böckers, T. M., Wyneken, U., Staak, S., Krug, M., Beesley, P. W. & Gundelfinger, E. D. (2000) The synaptic glycoprotein neuroplastin is involved in long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. *Proc Natl Acad Sci* **97**:4327-4332.
- Stuart, R. O., Bush, K. T. & Nigam, S. K. (2003) Changes in gene expression patterns in the ureteric bud and metanephric mesenchyme in models of kidney development. *Kidney Int* **64**:1997-2008.
- Sun, J. & Hemler, M. E. (2001) Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* **61**:2276–2281.
- Supuran, C. T. & Scozzafava, A. (2007) Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem* **15**:4336-4350.
- Svichar, N. & Chesler, M. (2003) Surface carbonic anhydrase activity on astrocytes and neurons facilitates lactate transport. *Glia* **41**:415-419.
- Svichar, N., Esquenazi, S., Waheed, A., Sly, W. S. & Chesler, M. (2006) Functional demonstration of surface carbonic anhydrase IV activity on rat astrocytes. *Glia* **53**:241-247.
- Takenaka, Y., Fukumori, T. & Raz, A. (2002) Galectin-3 and metastasis. *Glycoconj J* **19**:543-549.
- Tang, W. & Hemler, M. E. (2004) Caveolin-1 regulates matrix metalloproteinases-1 induction and CD147/EMMPRIN cell surface clustering. *J Biol Chem* **279**:11112-11118
- Tang, W., Chang, S. B. & Hemler, M. E. (2004) Links between CD147 function, glycosylation, and caveolin-1. *Mol Biol Cell* **15**:4043-4050.



- Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A. & Engel, P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* **9**:866-873.
- Tiwari, S., Askari, J. A., Humphries, M. J. & Bulleid, N. J. (2011) Divalent cations regulate the folding and activation status of integrins during their intracellular trafficking. *J Cell Sci* **124**:1672-1680.
- Vigetti, D., Karousou, E., Viola, M., Deleonibus, S., De Luca, G. & Passi, A. (2014) Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta* **1840**:2452-2459.
- Weissman, I. L. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* **287**:1442-1446.
- Willmott T., Skitsa I., Hill I., Mummery R. & Beesley P. W. (1992) Molecular characterisation and structural relationship of the synapse-enriched glycoproteins gp65 and gp55. *J Neurochem* **58**:2037-2043.
- Wilson, M. C., Jackson, V. N., Heddle, C., Price, N. T., Pilegaard, H., Juel, C., Bonen, A., Montgomery, I., Hutter, O. F. & Halestrap, A. P. (1998) Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J Biol Chem* **273**:15920-15926.
- Wilson, M. C., Meredith, D., Fox, J. E., Manoharan, C., Davies, A. J. & Halestrap, A. P. (2005) Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem* **280**:27213-27221.
- Wilson, M. C., Kraus, M., Marzban, H., Sarna, J. R., Wang, Y., Hawkes, R., Halestrap, A. P. & Beesley, P. W. (2013) The neuropilin adhesion molecules are accessory proteins that chaperone the mono-carboxylate transporter MCT2 to the neuronal cell surface. *PLoS ONE* **8**:e78654.
- Xie, T. & Spradling, A. C. (2000) A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary. *Science* **290**:328-330.
- Yan, L., Zucker, S. & Toole, B. P. (2005) Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. *Thromb Haemost* **93**:199-204.
- Yoon, H. Y., Fanelli, A., Grollman, E. F. & Philp, N. J. (1997) Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* **234**:90-94.
- Zeng, W. Z., Grillet, N., Dewey, J. B., Trouillet, A., Krey, J. F., Barr-Gillespie, P. G., Oghalai, J. S. & Müller, U. (2016) Neuropilin isoform Np55 is expressed in the stereocilia of outer hair cells and required for normal outer hair cell function. *J Neurosci* **36**:9201-9216.