

**Sumolaatio ja Notch2 lihassolujen erilaistumisessa ja  
mekaanisessa stressissä**

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Molekulaarisen solubiologian tutkinto-ohjelma

Kesäkuu 2021

Vilma Trapp

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

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

TRAPP, VILMA: Sumolaatio ja Notch2 lihassolujen erilaistumisessa ja mekaanisessa stressissä

Pro gradu -tutkielma, 59 s., 3 liites.

Biokemia

Kesäkuu 2021

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

-----

Sumolaatio, Notch-signaali ja mekaaninen stressi liittyvät lihassolujen erilaistumiseen. Erikoistyössä tutkittiin sumolaation ja Notch2:n tasojen muutoksia hiiren lihassolujen myoblastien erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana. Myoblastit indusoitiin erilaistumaan alentamalla kasvatusliuoksen seerumitasoa ja soluista tutkittiin sumolaation, Notch2:n, desmiinin, myogeenin ja Troponiini T:n tasot. Erilaistumattomat solut altistettiin mekaaniselle stressille ja näytteistä tutkittiin sumolaation ja Notch2:n tasot. Näiden kokeiden pohjalta solut indusoitiin erilaistumaan ja erilaistumisen eri aikapisteissä ne altistettiin mekaaniselle stressille. Kokeiden näytteet analysoitiin Western blot -menetelmällä.

Erilaistumisessa sumolaation taso nousi 24 tunnin kohdalla, jonka jälkeen se alkoi laskea, jolloin Notch2:n taso taas nousi. Kun sumolaatio alkoi jälleen nousta erilaistumisen loppuvaiheessa, Notch2:n taso laski. Desmiinin tasot kasvoivat tasaisesti erilaistumisen aikana, kun taas myogeeni ja Troponiini T alkoivat ilmetä Notch2:n nousun jälkeen, kun Notch2 oli laskussa. Erilaistumattomissa soluissa mekaaninen stressi ei juuri vaikuttanut Notch2:n tasoihin, mutta sumolaation taso nousi noin 30 min kohdalla.

Sumolaation ja Notch2:n tasojen muutokset mekaanisessa stressissä erosivat solujen erilaistumisasteen mukaan. Erilaistumattomissa soluissa sumolaatiotaso nousi vasteena mekaaniseen stressiin, erilaistumisen käynnistyttyä stressi alensi sumolaatiota. Notch2:n, jonka tasoihin mekaaninen stressi ei juuri vaikuttanut erilaistumattomissa soluissa, tasot laskivat huomattavasti 72 tuntia erilaistuneiden solujen stressissä. Desmiinin tasot taas saattoivat laskea hieman erilaistumattomien ja erilaistumisen alkuvaiheessa olevien solujen mekaanisessa stressissä, mutta loppuvaiheessa mekaaninen stressi nosti desmiinin tasoja selvästi.

Sumolaation ja Notch2:n tasot näyttävät muuttuvan päinvastaisesti, mutta erilaistumisen käynnistäneissä soluissa molempien tasot laskivat vasteena mekaaniseen stressiin, kun taas desmiinin taso nousi jyrkästi. Notch2:n sumolaatiota tulisi tutkia vielä immunosaostuksella, jonka optimointi aloitettiin, jotta voitaisiin päätellä sumolaation säätelevän Notch2:ta. Tiedosta näiden välisestä yhteydestä voisi olla hyötyä esimerkiksi regeneratiivisessa lääketieteessä.

Asiasanat: Sumolaatio, Notch2, erilaistuminen, mekaaninen stressi, C2C12-solut

Kiitokset koko Cell Fate -ryhmälle ja erityisesti ohjaajilleni Johanna Ahlskogille ja  
Cecilia Sahlgrenille!

## Sisällys

Lyhenteet .....	5
1. Kirjallisuuskatsaus .....	7
1.1 Notch-signalointi .....	7
1.1.1 Notch-reseptorit ja ligandit.....	9
1.1.2 Notch-signaalin kulkeutuminen solussa .....	11
1.1.3 NICD:n post-translacionaaliset muokkaukset .....	11
1.1.4 NICD tumassa .....	12
1.1.5 Erot Notch-signaloinnissa .....	12
1.1.6 Notch ja muut signalointi- ja säätelyreitit.....	13
1.1.7 Notch kehityksessä ja lihasten ylläpidossa .....	14
1.1.8 Notch sairauksissa ja syövässä .....	16
1.1.9 Notch sairauksien hoidossa .....	16
1.2 Sumolaatio .....	17
1.2.1 SUMO-proteiinit.....	18
1.2.2 Sumolaation mekanismi.....	19
1.2.3 SUMO:n eri E3-ligaasientsyymit ja SENP-isopeptidaasit.....	20
1.2.4 SUMO:n liitäntäkohdat .....	21
1.2.5 SUMO:n ei-kovalenttiset vuorovaikutukset.....	21
1.2.6 Sumolaation vaikutukset.....	21
1.2.7 Sumolaatio tumassa .....	22
1.2.8 Sumolaation säätely .....	23
1.3 Notchin sumolaatio .....	24
1.4 Notch ja sumolaatio erilaistumisessa ja mekaanisessa stressissä .....	25
1.5 Erikoistyön tavoitteet.....	27

2. Materiaalit ja menetelmät .....	27
2.1 C2C12-solujen kasvatusta .....	27
2.2 C2C12-solujen erilaistuminen .....	28
2.3 C2C12-solujen transfektio GenJet-reagenssilla .....	28
2.4 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi .....	29
2.4.1 Transfektio .....	29
2.4.2 Mekaaninen stressi .....	29
2.5 Erilaistumattomien ja erilaistuneiden C2C12-solujen mekaaninen stressi .....	29
2.5.1 Transfektio .....	29
2.5.2 Mekaaninen stressi ja erilaistuminen .....	29
2.6 Western blot .....	30
2.6.1 SDS-PAGE .....	30
2.6.2 Siirrostus ja membraanin käsittely.....	31
2.6.3 Primäärivasta-aineet .....	31
2.6.4 Sekundäärivasta-aineet.....	31
2.6.5 Tulosten visualisointi ja filmikehitys .....	31
2.6.6 Membraanin uudelleenanalysointi .....	32
2.6.7 Tulosten kvantitointi ja kuvien käsittely .....	32
3. Tulokset.....	32
3.1 C2C12-solujen erilaistuminen .....	34
3.1.1 Sumolaatiotaso nousee solujen erilaistumisen alussa, laskee 48 tunnin kohdalla ja nousee uudelleen .....	35
3.1.2 Notch2: tasot muuttuvat päivittäin sumolaation tasoon verrattuna solujen erilaistumisessa .....	37
3.1.3 Desmiinin tasot nousevat erilaistumisen yhteydessä melko tasaisesti.....	38
3.1.4 Myogeeniini ilmenee soluissa sumolaatiopiikin ja Notch2:n tasojen nousun jälkeen solujen erilaistumisen aikana .....	40

3.1.5 Troponiini T:n tasot nousevat myogeeniinin ilmenemisen jälkeen solujen erilaistumisen aikana .....	41
3.2 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi .....	43
3.2.1 Sumolaatio nousee erilaistumattomissa soluissa mekaanisen stressin alussa ja sitten laskee.....	43
3.2.2 Notch2:n tasot pysyvät melko tasaisina erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä .....	45
3.3 Erilaistuneiden ja erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi .....	47
3.3.1 Sumolaatiovaste mekaaniseen stressiin eroaa erilaistuneiden ja erilaistumattomien solujen välillä.....	47
3.3.2 Notch2:n tasot laskevat mekaanisessa stressissä huomattavasti vasta erilaistumisen loppuvaiheilla .....	49
3.3.3 Erilaistumisen alkuvaiheessa olevissa soluissa mekaaninen stressi voi alentaa desmiinin tasoja, loppuvaiheessa stressi taas nostaa tasoja.....	51
4. Tulosten tarkastelu .....	52
4.1 C2C12-solujen erilaistuminen .....	52
4.2 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi .....	54
4.3 Erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaaninen stressi.....	55
5. Päätelmät .....	57
6. Lähteet .....	60
7. Liitteet .....	72
7.1 Solujen erilaistuminen .....	72
7.1.1 Sumolaatio erilaistumisessa.....	72
7.1.2 Notch2 erilaistumisessa .....	72
7.1.3 Desmiini erilaistumisessa .....	72
7.1.4 Myogeeniini erilaistumisessa .....	72
7.1.5 Troponiini T erilaistumisessa.....	73
7.2 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi.....	73

7.2.1 Sumolaatio erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä .....	73
7.2.2 Notch2 erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä.....	73
7.3 Erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaaninen stressi.....	73
7.3.1 Sumolaatio erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaanisessa stressissä .....	73
7.3.2 Notch2 erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaanisessa stressissä .....	74
7.3.3 Desmiini erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaanisessa stressissä .....	74

## Lyhenteet

ADAM, disintegrointi ja metalloproteaasi (*engl.* disintegrin and metalloprotease)

AMP, adenosini-monofosfaatti

ANK, ankyriinisto

APS, ammoniumpersulfaatti

ATP, adenosini-trifosfaatti

BSA, naudan seerumin albumiini (*engl.* bovine serum albumin)

CSL, CBF-1/RBPJ- $\kappa$ , Suppressor of Hairless ja Lag-1

Dll, Deltan kaltainen (*engl.* Delta-like)

DMEM, Dulbeccon muokattu Eaglen mediumi (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DNA, deoksiribonukleiinihappo

ECL, kemiluminesenssiluosto (*engl.* enhanced luminol-based chemiluminescent substrate)

EDTA, etyleenidiamiinitetraetikkahappo

EGF, epidermin kasvutekijä (*engl.* epidermal growth factor)

FBS, vasikan sikiön seerumi (*engl.* fetal bovine serum)

HBSS, Hankin tasapainotettu suolaliuos (*engl.* Hanks' Balanced Salt Solution)

HSC70, lämpöshokkiproteiini 70 (*engl.* Heat shock protein 70)

MAML, Mastermindin kaltainen (*engl.* Mastermind-like)

miRNA, mikroRNA

MQ, Milli-Q-vesi

N1ICD, Notch1:n solun sisäinen osa

N2ICD, Notch2:n solun sisäinen osa

NECD, Notchin solun ulkoinen osa (*engl.* Notch extracellular domain)

NICD, Notchin solun sisäinen osa (*engl.* Notch intracellular domain)

NRR, negatiivisen säätelyn alue (*engl.* negative regulatory region)

O-GlcNAc, N-asetyyli-glukosamiini (*engl.* N-acetylglucosamine)

PBS, fosfaattipuskuroitu suolaliuos (*engl.* phosphate buffered saline)

RAM, RBP-J $\kappa$ -sitoutumisproteiinialue (*engl.* recombination binding protein-J $\kappa$ -associated molecule)

RNA, ribonukleiinihappo

RT, huoneenlämpö

S1-leikkaus, ensimmäisen alueen leikkaus (*engl.* site 1 cleavage)

S2-leikkaus, toisen alueen leikkaus (*engl.* site 2 cleavage)

S3-leikkaus, kolmannen alueen leikkaus (*engl.* site 3 cleavage)

SDS-PBS, Natriumdodekyylisulfaatti-PBS

SDS-PAGE, natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi

SENP, sentriini-spesifinen proteaasi

SIM/SBM, SUMO:n kanssa vuorovaikuttava alue tai SUMO:a sitova alue (*engl.* a SUMO interacting/binding motif)

SUMO, pieni ubikitiinin kaltainen muokkaajaproteiini (*engl.* small ubiquitin related modifier)

TAD, transkription aktivaation alue

TEMED, tetrametyyli-etyleenidiamiini

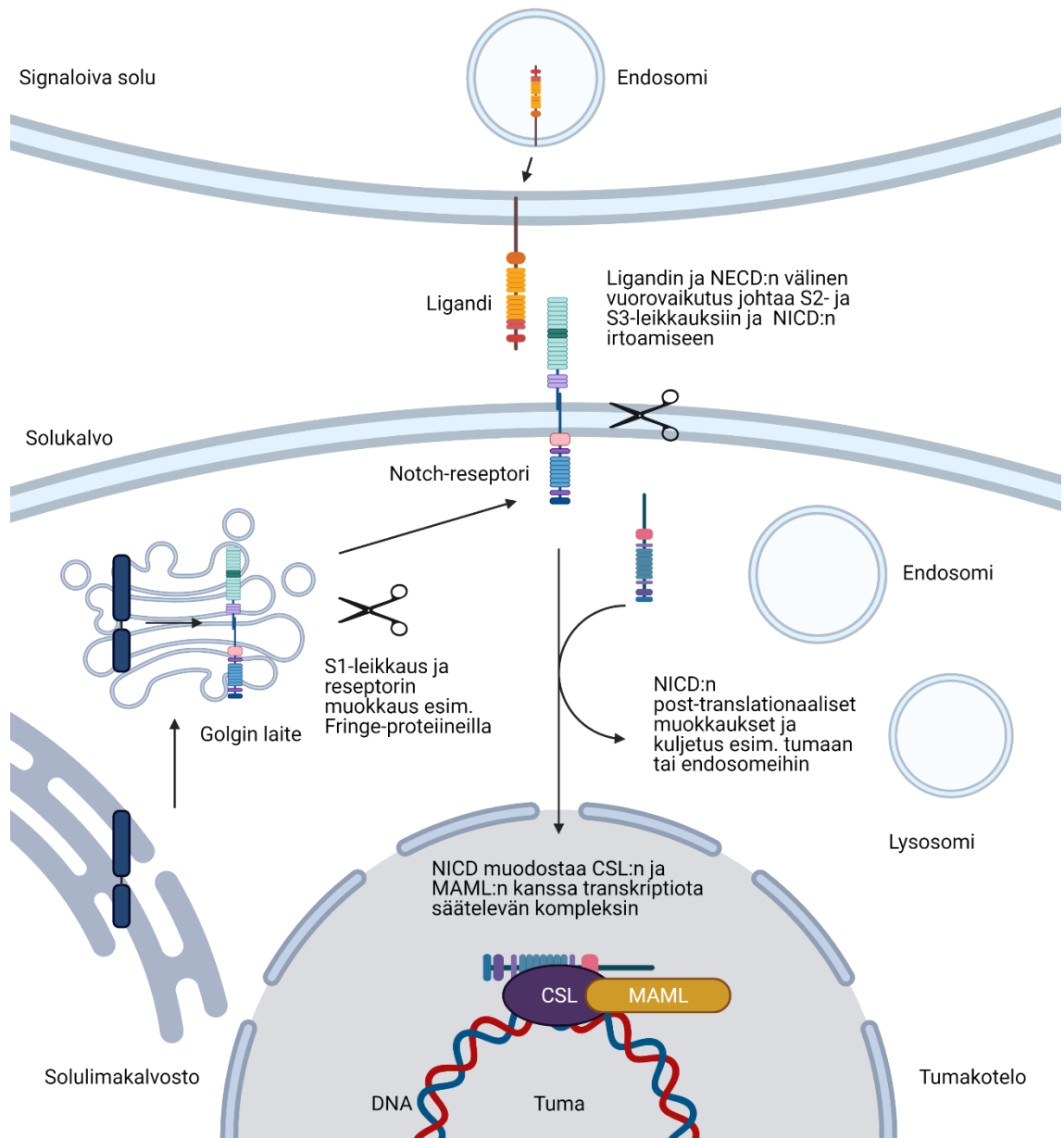
Wnt, Wingless ja Int-1 -signalointireitti

# 1. Kirjallisuuskatsaus

Notch-signaaloinnin tiedetään liittyvän erilaistumiseen ja lihasten regeneraatioon (Siebel ja Lendahl 2017). Notchin on havaittu sumoloituvan (*engl.* sumoylation) solustressissä (Antila ja muut 2018) ja myös sumolaation on havaittu olevan tärkeä lihassolujen erilaistumiselle (Riquelme ja muut 2006). Lihaskudoksessa solut altistuvat lisäksi mekaaniselle stressille, joka myös vaikuttaa solujen erilaistumiseen (Esteves de Lima ja muut 2016). Erikoistyössä tutkittiin Notch2:ta ja sumolaatiota sekä mekaanisessa stressissä että erilaistumisessa ja etsittiin näiden välistä yhteyttä.

## 1.1 Notch-signaali

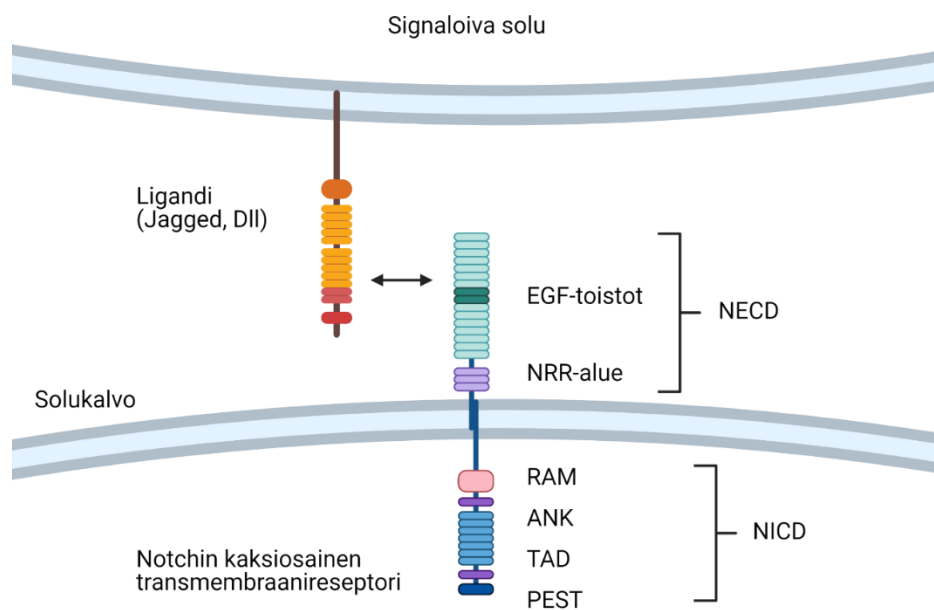
Notch-signaalintireitti (kuva 1.) säätelee muun muassa homeostasiaa, solujen erilaistumista, kudosten kehittymistä ja lihaskudoksen regeneraatiota. Viallinen Notch-signaali voi johtaa useisiin sairauksiin, kuten tiettyihin syöpiin. Nisäkkäillä ilmenee neljää eri Notch-reseptorityyppiä, Notch1-4. Notch-reseptorit ovat transmembraanireseptoreita, jotka leikkautuvat Golgin laitteessa kaksiosaiseksi ennen solukalvolle siirtymistä. Notchin solun ulkoinen osa (*engl.* Notch extracellular domain, NECD) vuorovaikuttaa ligandien kanssa, jotka yleensä sijaitsevat viereisen solun pinnalla. Notchin ligandeja ovat Jagged (1 ja 2) ja Deltan kaltainen (1, 3 ja 4) (*engl.* Delta-like, Dll1, 3 ja 4). Kun NECD sitoutuu ligandiin se aiheuttaa Notchin solun sisäisen osan (*engl.* Notch intracellular domain, NICD) irtoamisen, joka voi tumaan kulkeuduttuaan sitoutua transkriptiotekijän kanssa. Tätä transkriptiotekijää kutsutaan monilla eri nimillä organismin mukaan: CBF-1/RBPJ- $\kappa$  ihmisessä, Suppressor of Hairless *Drosophila*:ssa ja Lag-1 *Caenorhabditis elegans*:ssa (CSL). NICD:n sitoutuminen muuttaa CSL:n repressorista aktivaattoriksi. NICD:n ja CSL:n muodostamaan kompleksiin sitoutuu vielä Mastermindin kaltainen (*engl.* Mastermind-like, MAML). Nämä muodostavat transkriptiokompleksin, joka voi vaikuttaa geeniekspressioon. Notchin säätelemiin geeneihin kuuluvat muun muassa Hairy/Enhancer of Split ja Herp/Hesr/Hrt/CHF/gridlock -perhe, jotka kuuluvat transkriptionaalisiin repressoreihin. Notchin vaikutukset vaihtelevat muun muassa Notchin tyyppin, kohdesolun ja NICD:n post-translacionaalisten muokkausten mukaan. (Meier-Stiegen ja muut 2010; Siebel ja Lendahl 2017).



**Kuva 1.** Yleiskatsaus Notch-signaalintireitistä. Kypsyvä Notch-reseptori käy Golgin laitteessa läpi S1-leikkauksen, jolloin muodostuu kaksiosainen transmembraanireseptori. Tämän NECD:tä voivat muokata glykaaneilla esimerkiksi Fringe-proteiinit. Valmis reseptori kulkeutuu solun solukalvolle, jossa solun NECD voi sitoutua ligandiin, joka yleensä sijaitsee viereisen solun solukalvolla. Ligandiin sitoutuminen johtaa S2- ja S3-leikkauksiin, jolloin NICD irtoaa solukalvolta. NICD voi sitten kulkeutua esimerkiksi tumaan tai endosomeihin ja/tai käydä läpi post-translacionaalisia muokkauksia, kuten sumolaatiota (Antfolk ja muut 2019). Tumassa NICD muodostaa kompleksin CSL:n ja MAML:n kanssa ja vaikuttaa geenien ekspressioon. (Siebel ja Lendahl 2017). Luotu Biorender-sivustolla (Biorender.com).

### 1.1.1 Notch-reseptorit ja ligandit

Notch-reseptorit (kuva 2.) ovat kaksiosaisia transmembraaniproteiineja, jotka läpäisevät solukalvon kerran. NECD muodostuu epidermin kasvutekijöiden (*engl.* epidermal growth factor, EGF) toistoista ja negatiivisen säätelyn alueesta (*engl.* negative regulatory region, NRR). NICD taas sisältää RBP-J $\kappa$ -sitoutumisproteiinialueen (*engl.* recombination binding protein-J $\kappa$ -associated molecule, RAM), ankyriinitoistoja (ANK), muita variaabelialueita, kuten Notch1:ssä ja Notch2:ssa ilmenevä transkription aktivaation alueen (TAD) ja lopuksi C-terminaalinen negatiivisen säätelyn PEST-alueen (Chillakuri ja muut 2012). (Siebel ja Lendahl 2017).



**Kuva 2.** Notch-reseptorin yleisrakenne, eri reseptorityypeillä rakenne voi vaihdella. Kypsä Notch-reseptori on kaksiosainen transmembraanireseptori solukalvolla. NECD koostuu EGF-toistoista ja NRR-alueesta, NICD sisältää RAM-, ANK-, TAD- ja PEST-alueet. NECD sitoutuu ligandiin ja aloittaa signaalin kulun. Kun NECD sitoutuu ligandiin, NICD irtoaa solukalvolta ja kulkeutuu vaikuttamaan geenien ekspressioon. NICD voidaan myös hajottaa ja/tai sitä voidaan muokata monin eri post-translationalisin tavoin. (Antfolk ja muut 2019; Siebel ja Lendahl 2017). Luotu Biorender-sivustolla (Biorender.com).

Kypsyvä Notch-reseptori leikkautuu Golgin laitteessa proteolyttisesti furiinin kaltaisella konvertaasilla (*engl.* furin-like convertase). Tätä ensimmäistä leikkausta kutsutaan ensimmäisen alueen leikkaukseksi (S1-leikkaus) (*engl.* site 1 cleavage), jolloin muodostuu kaksiosainen reseptori. (Siebel ja Lendahl 2017).

NECD:tä muokataan monin eri tavoin ja nämä muokkaukset voivat vaikuttaa reseptorin vuorovaikutukseen ligandin kanssa, joko lisäten tai vähentäen tiettyyn ligandiin sitoutumista. Muokkauksiin kuuluvat muun muassa O-glykaani (*engl.* O-glycans) -muokkaukset. Ne voidaan jakaa O-fukoosi (*engl.* O-fucose), O-glukoosi (*engl.* O-glucose), O-xyloosi (*engl.* O-xylose) ja N-asetyyli-glukosamiini (*engl.* N-acetylglucosamine, O-GlcNAc) -jatkeisiin. (Matsuura ja muut 2008; Moloney ja muut 2000; Siebel ja Lendahl 2017). Eri entsyymit liittävät O-glykaanit reseptoriin. Esimerkiksi Rumi-entsyymit liittävät O-glukoosin EGF-toistojen seriinitähteisiin, lisäten Notch-reseptorien leikkausta (Acar ja muut 2008), kun taas proteiini O-fukosyyli-transferaasi (*engl.* protein O-fucosyltransferase) -entsyymi lisää O-fukoosin EGF-toistojen seriini- ja treoniinitähteisiin (Shi ja Stanley 2003; Okajima ja Irvine 2002). Fringe-proteiinit voivat muokata O-fukoosijatkeita edelleen lisäämällä GlcNAc-jatkeen, joka vaikuttaa Notch-reseptorin vuorovaikutukseen ligandin kanssa (Brückner ja muut 2000; Moloney ja muut 2000). (Siebel ja Lendahl 2017).

Golgin laitteessa muokattu ja kypsä Notch-reseptori kulkeutuu solukalvolle kaksiosaiseksi transmembraanireseptoriksi, jossa NECD voi sitoutua ligandiin, johon edellä mainitut O-glykaanimuokkaukset voivat osallistua (Luca ja muut 2015). Notchin ligandeihin kuuluvat Dll:t ja Jaggedit. Ligandit endosytoidaan ja kierrätetään takaisin solun pinnalle ennen kypsymistä, jonka jälkeen ne voivat osallistua signalointiin. Ligandien kierrätykseen liittyvät muun muassa ubiquitinaatio, Neuralized ja Mindbomb. (Deblandre ja muut 2001; Itoh ja muut 2003). Neuralized ja Mindbomb ovat ubiquitiiniligaaseja, jotka toimivat Notch-signaaloinnin säätelyssä ligandin endosytoosin kautta (Lai ja muut 2001; Taal ja muut 2019; Itoh ja muut 2003; Daskalaki ja muut 2011). Notch-signaalointireitti aktivoituu useimmiten lähellä olevien solujen pinnalla olevien ligandien kautta, mutta tämä on myös mahdollista kaukana olevien solujen kanssa. Esimerkiksi rintasyövässä Notch3:n havaittiin aktivoituvan stroomasolujen eksosomien kautta (Boelens ja muut 2014) ja Dll4-ligandien on havaittu myös kulkeutuvan eksosomeissa (Sheldon ja muut 2010). NECD:n on havaittu myös vaikuttavan endosomeissa ligandien kanssa, joten kaikki signalointi ei välttämättä tapahdu vain solukalvolla (Hansson ja muut 2010). Signalointi voi tapahtua myös saman solun ligandien ja reseptorien kesken. Tätä kutsutaan *cis*-signaaloinniksi ja se johtaa Notch-signaaloinnin inhibitioon. (Sprinzak ja muut 2010). Siebel ja Lendahl 2017).

### 1.1.2 Notch-signaalin kulkeutuminen solussa

Ligandin sitoutumisesta seuraa reseptorin proteolyttinen leikkautuminen. Toisen alueen leikkauksen (S2-leikkaus) (*engl. site 2 cleavage*) suorittavat disintegriini ja metalloproteaasit (ADAM:it) (*engl. disintegrin and metalloproteases*). Kolmannen alueen leikkauksen (S3-leikkaus) (*engl. site 3 cleavage*) suorittaa  $\gamma$ -sekretaasikompleksi (*engl.  $\gamma$ -secretase complex*). Nykyisen tiedon mukaan ligandin sitoutuminen aiheuttaa NECD:hen vetävän voiman, joka muuttaa NRR-alueen konformaatiota solukalvon lähellä, jotta ADAM:it voivat vuorovaikuttaa sen kanssa. NRR muodostaa saranan kaltaisen rakenteen ligandin sitoutuessa, jolloin S2-leikkauskohta paljastuu ja ADAM:it voivat suorittaa leikkauksen. (Siebel ja Lendahl 2017).

S2-leikkauksen jälkeen  $\gamma$ -sekretaasikompleksi suorittaa S3-leikkauksen, joka johtaa NICD:n irtoamiseen ja esimerkiksi tumaan kulkeutumisen. S3-leikkauksen paikka on vielä huonosti tunnettu, joidenkin tutkimusten mukaan tämä tapahtuisi solukalvossa (Kaether ja muut 2006; Sorensen ja Conner 2010), mutta toisten tutkimusten mukaan NICD voi olla mono-ubikitinoitu ja kiinni  $\gamma$ -sekretaasikompleksissa kulkeutuessaan solun sisäosiin, jossa S3-leikkaus lopulta tapahtuu (Gupta-Rossi ja muut 2004). S3-leikkauksen paikka voi olla myös Notch-signaaloinnin säätelymekanismi, sillä eri alueilla leikattujen NICD:n on havaittu eroavan toisistaan stabiiliudessa (Tagami ja muut 2008). (Siebel ja Lendahl 2017).

Jossain tilanteissa NICD voi S3-leikkauksen jälkeen kulkeutua suoraan tumaan, mutta usein signaalia säädellään tässä vaiheessa NICD:n post-translationalisten muokkausten kautta ja/tai NICD:n erilaisten reititysten kautta esimerkiksi endosomeihin tai hajotettavaksi (Childress ja muut 2006; Gallagher ja Knoblich 2006). Notchin reititykseen liittyy monia eri säätelijöitä, esimerkiksi Numb vaikuttaa Notchin endosomireititykseen (Couturier ja muut 2013). (Siebel ja Lendahl 2017).

### 1.1.3 NICD:n post-translationaliset muokkaukset

Notch-signaalointireitti on suoraviivainen eikä sisällä monille signaalointireiteille ominaista kinaasien suorittamaa vahvistusaskelta. Notch-signaaloinnin säätely tapahtuu eri tavalla kinaaseja käyttäviin signaalointireitteihin verrattuna, esimerkiksi NICD:n post-translationalisten muokkausten kautta. Post-translationaliset muokkaukset ovat reversiibeilitä proteiinimuokkauksia, jotka voivat vaikuttaa proteiinin aktiivisuuteen, lokalisaatioon ja stabiiliuteen. NICD:n post-translationalisia muokkauksia on havaittu useita. Näitä ovat esimerkiksi fosforylaatio, joka vaikuttaa proteiinien väliseen

vuorovaikutukseen, ubikitinaatio, joka usein johtaa hajotukseen, asetylaatio, joka vaikuttaa stabiiliuteen ja toimintaan, metylaatio, joka vaikuttaa stabiiliuteen ja geeniekspressioon, hydroksylaatio, joka välittää hypoksian vastetta ja sumolaatio, joka usein johtaa geenien repression. Muokkaukset myös vaikuttavat toisiinsa lisäten edelleen Notchin jo itsessään monipuolisia signaloinnin vaikutusmahdollisuuksia. (Antfolk ja muut 2019). Muokkausten lisäksi CSL saattaa vaikuttaa NICD:n hajotukseen. Notch1:n solun sisäisestä osasta (N1ICD) löydettiin hajotusdomeeni (*engl.* degradation domain), jonka CSL sitoutuessaan peittää, jolloin N1ICD:n ja CSL:n vuorovaikutus saattaa lisätä N1ICD:n stabiiliutta. (Broadus ja muut 2016). (Borggreffe ja muut 2016; Siebel ja Lendahl 2017).

#### 1.1.4 NICD tumassa

NICD:n tumaan kulkeutumiseen vaikuttavat tumaan kulkeutumisen sekvenssit (*engl.* nuclear localization sequences) ja kulkeutumista kontrolloivat importiini- $\alpha$ -proteiinit (*engl.* importin- $\alpha$  proteins). Tumassa NICD vuorovaikuttaa deoksiribonukleiinihappoa (DNA) sitovan proteiinin CSL:n kanssa. Ilman NICD:tä CSL on repressorimuodossa ja kykenee sitomaan ko-repressoreita, kuten SMRT, KyoT2 ja SPEN. Useilla CSL:n ko-repressoreilla on kyky värvätä histoni-deasetylaaseja, joka voi johtaa transkriptionaaliseen repression. Kun Notch sitoutuu CSL:ään ko-repressorit vaihtuvat ko-aktivaattoreiksi. Osa ko-aktivaattoreista sitoutuu CSL:ään, osa vuorovaikuttaa NICD:n kanssa. Ei ole varmaa vaihtuvatko ko-repressorit aktivaattoreiksi suoraan samassa CSL:ssä vai voisiko NICD esimerkiksi vaihtaa aktivaattorimuodossa olevan CSL:n repressorimuodossa olevan tilalle. NICD ja CSL luovat pinnan johon MAML voi sitoutua. Yhdessä NICD, CSL ja MAML muodostavat aktiivisen transkriptiokompleksin, joka voi vaikuttaa geenien ekspressioon. (Siebel ja Lendahl 2017).

#### 1.1.5 Erot Notch-signaloinnissa

Notch-signaloinnin vaikutukset ovat monipuolisia ja se tuottaa monissa eri soluissa eri transkriptomeja sen yksikertaisesta ja suoraviivaisesta arkkitehtuurista huolimatta. Tämä voi tapahtua Notchin vaikuttamalla solulle spesifisiin transkriptiotekijöihin ja niiden repressiotekijöihin (Meier-Stiegen ja muut 2010). Mahdollinen syy erilaisiin vasteisiin eri soluissa voi olla myös eri solujen epigeneettisissä tiloissa, joissa soluilla on erilaiset varastot transkriptionaalisia aktivaattoreita, joiden kanssa NICD voi vaikuttaa geeneihin. (Siebel ja Lendahl 2017).

Myös eri Notch-reseptorityypeillä ilmenee eri vaikutuksia soluihin. Esimerkiksi medulloblastooman kehityksessä N1ICD ja Notch2:n solun sisäinen osa (N2ICD) johtavat vastakkaisiin vaikutuksiin, esimerkiksi N2ICD:n lisätessä solujen jakautumista N1ICD:n inhiboidessa (Fan ja muut 2004). Virtsarakon syövässä N2ICD:lla havaittiin olevan kasvainta edistävä vaikutus, kun taas N1ICD:lla vähentävä (Hayashi ja muut 2016). Notch3:lla näyttäisi olevan omanlaisensa signalointi muihin reseptoreihin verrattuna ja sen on havaittu liittyvän ainakin haiman solujen erilaistumiseen (Apelqvist ja muut 1999). Lisäksi sen vaikutus saattaa toimia ainakin osittain kilpailulla N1ICD:n kanssa (Beatus ja muut 1999). Notch4:n rooli ei ole yhtä selkeä muihin verrattuna. Se ei aktivoidu ligandien toimesta, vaan oman solun signaloimalla *cis*-signaloinnilla ja Notch4:n aktivaatio johtaa Notch1:n inhibitioon (James ja muut 2014). Myös ligandien paralogeissa on havaittu eroja, esimerkiksi Dll1:llä ja Dll4:llä (Preuße ja muut 2015). (Siebel ja Lendahl 2017).

#### 1.1.6 Notch ja muut signalointi- ja säätelyreitit

Solun monet signalointireitit ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa keskenään ja myös Notchilla esiintyy yhteisvaikutusta muiden kanssa, joka voi muuttaa Notch-signaloinnin vastetta. Notch liittyy erityisesti Wingless ja Int-1 -signalointireittiin (Wnt) monilla tasoilla, esimerkiksi *Drosophila*:n siiven kehityksessä NICD vuorovaikuttaa Wnt:n kanssa (Giraldez ja Cohen 2003), NICD:n voi fosforyloida Wnt:n eri komponentit (Foltz ja muut 2002) ja Wnt voi säädellä Dll:n ekspressiota. Notch vuorovaikuttaa myös useilla eri tavoilla  $\beta$ -kateniinin kanssa, esimerkiksi Notchin inaktivointi hiiren ihossa johti  $\beta$ -kateniinin repression kumoutumiseen ja kasvainten kehitykseen (Nicolas ja muut 2003). Notchin vaikutus on havaittu lisäksi myös hypoksiassa ja Sonic Hedgehog -signaloinnissa. (Borggreffe ja muut 2016; Siebel ja Lendahl 2017).

Useiden ei-koodaavien ribonukleiinihappojen (RNA) on havaittu toimivan säätelijöinä monessa eri solun toiminnassa. MikroRNA:t (miRNA) ovat ei-koodaavien RNA:iden luokka, joka osallistuu solun geeniekspression säätelyyn post-transkriptionaalisella tasolla ja ne vaikuttavat myös Notch-signalointiin säätelemällä signalointireitin komponenttien ekspressiota. Notch taas voi säädellä miRNA:iden ekspressiota. (Siebel ja Lendahl 2017).

Koska Notchin transkriptiokompleksi sitoutuu DNA:han, myös epigeneettinen ympäristö vaikuttaa signalointiin. Notchin transkriptiokompleksilla näyttää myös olevan kromatiinin muokkauskykyä muun muassa histonien metyloinnin kautta. Esimerkiksi

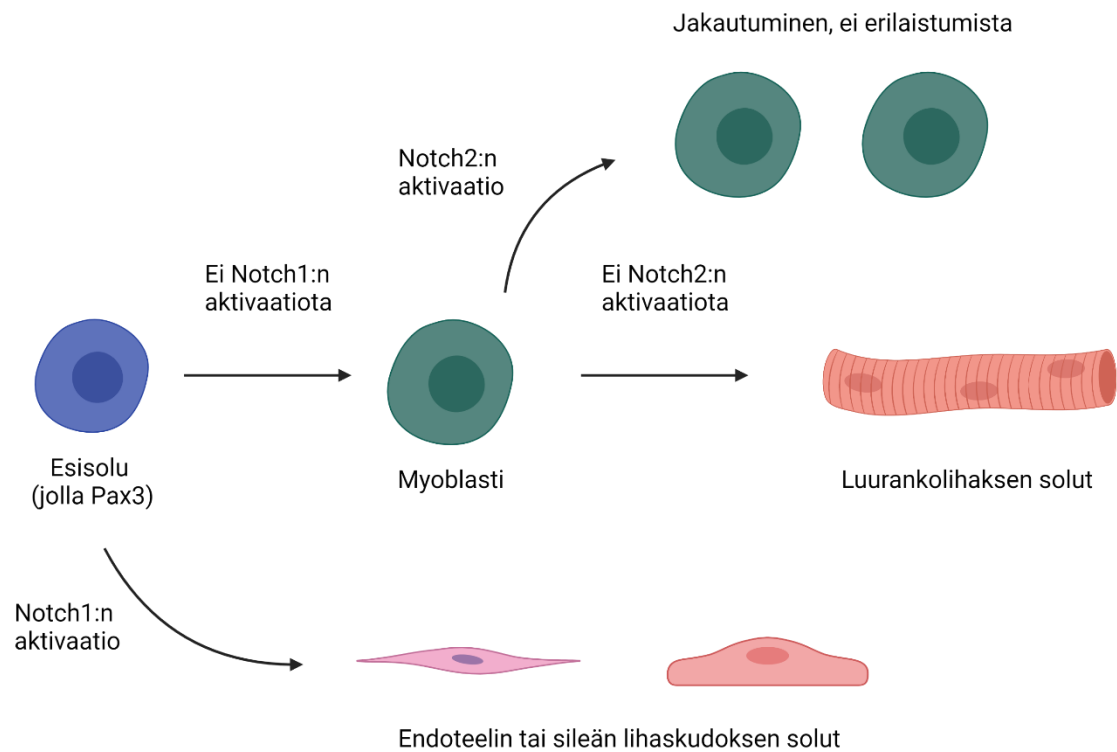
CSL vuorovaikuttaa histoni demetylaasin kanssa (Liefke ja muut 2010) ja Notchin on havaittu indusoivan histoni 3:n trimetylaation menetystä (Ntziachristos ja muut 2012). Sen lisäksi että Notch muuttaa kromatiinia NICD/CSL:n sitoutumiskohtien läheltä, kromatiinin tilan on myös havaittu säätelevän missä NICD ja CSL sitoutuminen tapahtuu. (Siebel ja Lendahl 2017).

#### 1.1.7 Notch kehityksessä ja lihasten ylläpidossa

Notch-signaalintireitti osallistuu useiden elinten ja kudosten kehitykseen ja usein aktivoituu toistuvasti solujen edetessä kehitysvaiheesta toiseen. Joissain tilanteissa Notch-signaali estää erilaistumisen ja varmistaa että osa soluista pysyy esimerkiksi kantasoluina. Notch voi myös edistää solujen erilaistumista, joissain tapauksissa inhibition kautta, jolloin alkuperäisestä homogeenisestä soluryhmästä erottuvat eri solulinjat. Notch liittyy monien organismin osien kehitykseen, esimerkiksi verisuonten, hermoston, haiman ja lihasten. (Siebel ja Lendahl 2017).

Notch-signaali säätelee luurankolihasmyogeneesiä (kuva 3.), jossa solut voivat erilaistua myoblasteista, eli erilaistumattomista lihassoluista, monitumaisiksi myoputkiksi (*engl.* myotube), yleensä inhiboimalla myoblastien erilaistumista. Myogeneesissä on lisäksi havaittu Notchia inhiboivan Numbin jakautuvan epätasaisesti lihaksessa, mahdollisesti säädellessä Notchia ja siten lihasten kasvua. (Buas ja Kadesch 2010). Myogeneesin alussa esisolu (*engl.* progenitor), joka ekspressoii transkriptiotekijä Pax3:a, voi erilaistua joko lihassoluksi, verisuonen endoteelin tai sileän lihaskudoksen soluksi ja tätä valintaa ohjaa Notch. Notch1:n aktivaatio johtaa näissä soluissa endoteeliseksi ja sileäksi lihaskudokseksi erilaistumiseen, jolloin soluista ei siis kehity luurankolihas-soluja (Mayeuf-Louchart ja muut 2014). Hiiren myoblasteja tutkittaessa havaittiin, että aktiivinen Notch-signaali estää myoblastien erilaistumisen pitäen ne erilaistumattomassa tilassa (Nofziger ja muut 1999). Kuinka Notch repressoii myogeneesiä ei ole vielä täysin tunnettu ja inhibio näyttää tapahtuvan useiden mekanismien kautta, esimerkiksi Notchin kohteiksi havaittujen repressorien MyoR:n ja Hey1:n poisto ei lopettanut myogeneesin repressiota Notch-signaloinnin ollessa aktiivinen (Buas ja muut 2009). Ono ja muut taas tutkivat liittyvätkö Notch2 ja Muuttuva kasvutekijä- $\beta$ 1 (*engl.* Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) yhteen myogeneesissä soluissa. He havaitsivat TGF- $\beta$ 1:n lisäyksen C2C12-soluihin johtavan myofibroplastisten markkerien ekspressioon ja samalla Notch2:n tason laskuun. Notch2:n yliekspressio taas vähensi markkerien TGF- $\beta$ 1 indusoimaa nousua. Myös Notch2:n hetkellinen poisto nosti

markkerien tasoa ja edisti erilaistumista ilman TGF- $\beta$ 1 lisäystä. He päättelivät Notch2:n inhiboivan erilaistumista myoblasteissa. (Ono ja muut 2007). (Siebel ja Lendahl 2017).



**Kuva 3.** *Notch myogeneesin säätelyssä. Notch1:n aktivaatio johtaa Pax3:a ekspressoivissa esisoluihin endoteelin tai sileän lihaskudoksen soluiksi erilaistumiseen, ilman Notch1:n aktivaatiota näistä voi tulla myoblasteja. Syntymän jälkeen myoblasteja voi kehittyä lihaksen satelliittisoluihin. Myoblasteissa Notch2:n aktivaatio inhiboi erilaistumista luurankolihasen soluiksi. (Mayeuf-Louchart ja muut 2014; Ono ja muut 2007; Siebel ja Lendahl 2017). Luotu Biorender-sivustolla (Biorender.com).*

Kehityksen lisäksi Notch vaikuttaa useiden kudosten homeostasiassa ja muuan muassa lihaksen ylläpidossa. Aikuisen lihaksissa on joukko kantasoluja, joita kutsutaan satelliittisoluihin, jotka tarvitsevat Notchia. On havaittu käänteinen korrelaatio Notch-signaloinnin ja ikääntymisen välillä, mikä ainakin osittain selittää kudosten regeneraation vähentymisen iän myötä. Esimerkiksi Dll1:n tasot laskevat vanhemmissa eläimissä ja kun Dll1:n tasoja nostettiin, havaittiin myös Notch-signaloinnin lisäys ja samalla myös kudosten regeneraation parantuminen (Conboy ja muut 2005). MAML:n toimimattoman negatiivisen version lisäyksen soluihin, joka häiritsi Notch-signalointia, havaittiin taas johtavan viialliseen regeneraatioon (Lin ja muut 2013). Lihaksen vahingoittuminen johtaa nousuun Notch-signaloinnissa, joka jälleen korreloi lisääntyneellä lihaskudoksen regeneraatiolla. Vaurion lisäksi Notch-signalointi näyttää aktivoituvan lihaksessa myös

lihaksen supistumisen aikana. Liikkumattomuus taas vähentää Notch-signaalointia, joka haittaa lihaksen esisolukantaa ja täten myogeneesiä. (Esteves de Lima ja muut 2016). (Siebel ja Lendahl 2017).

#### 1.1.8 Notch sairauksissa ja syövässä

Koska Notch-signaalointi liittyy moniin solujen toimintoihin, viallinen Notch-signaalointi myös liittyy moniin sairauksiin ja syöpiin. Joskus sairauden voi aiheuttaa mutaatio Notch-signaalointireitissä ja muutoin Notchin vaikutus voi olla epäsuora, jolloin viallinen Notchin kontrollointi edistää sairautta ilman poikkeavia signaalointireitin komponentteja. (Siebel ja Lendahl 2017).

Sairauksia joissa Notchin reseptorit tai ligandit ovat mutatoituneet kutsutaan monogeenisiksi. Esimerkkinä tällaisesta on Alagille-syndrooma, joka vaikuttaa useisiin elimiin, kuten maksaan, munuaisiin ja verisuoniin, joissa Notch-signaalointi on tärkeä toiminnalle ja kehitykselle. Tälle syndroomalle tyypillistä ovat mutaatiot Jagged1:ssä, joka johtaa vialliseen vuorovaikutukseen reseptorin kanssa (Li ja muut 1997). Toinen esimerkki Notchin monogeenisestä sairaudesta on Hajdu-Cheney-syndrooma, joka johtaa muun muassa neurologisiin, sydän- ja verisuoniongelmiin sekä luuston menetykseen. Siinä Notch2:n viallinen leikkaus johtaa lisääntyneeseen Notch-signaalointiin ja täten kudosten kehityksen häiriöihin (Simpson ja muut 2011; Isidor ja muut 2011). (Siebel ja Lendahl 2017).

Notch signaalointireitti voi toimia viallisesti myös ilman että sen osissa esiintyy mutaatioita, jolloin reitin säätely on viallinen aiheuttaen sairauksia. Tällaisia sairauksia ovat esimerkiksi Duchenne-lihassairaus (*engl.* Duchenne Muscular Disease) (Vieira ja muut 2015) ja erilaiset fibroosit. (Siebel ja Lendahl 2017).

Notchin signaloinnin häiriöitä on havaittu myös useissa syövässä, esimerkiksi T-solujen leukemiassa, rintasyövässä, maksasyövässä ja aivosyövässä. Monet Notch-reseptorit voivat olla viallisia samassa syövässä. Syövät, joissa Notch-signaalointi on vaikuttava tekijä, voidaan jakaa kolmeen tyyppiin: kasvainta estävät mutaatiot, joissa Notch on hypoaktivoitu, onkogeeniset mutaatiot, joissa Notch on hyperaktivoitu ja ei-mutatoituneet, joissa Notchin säätely on viallinen. (Siebel ja Lendahl 2017).

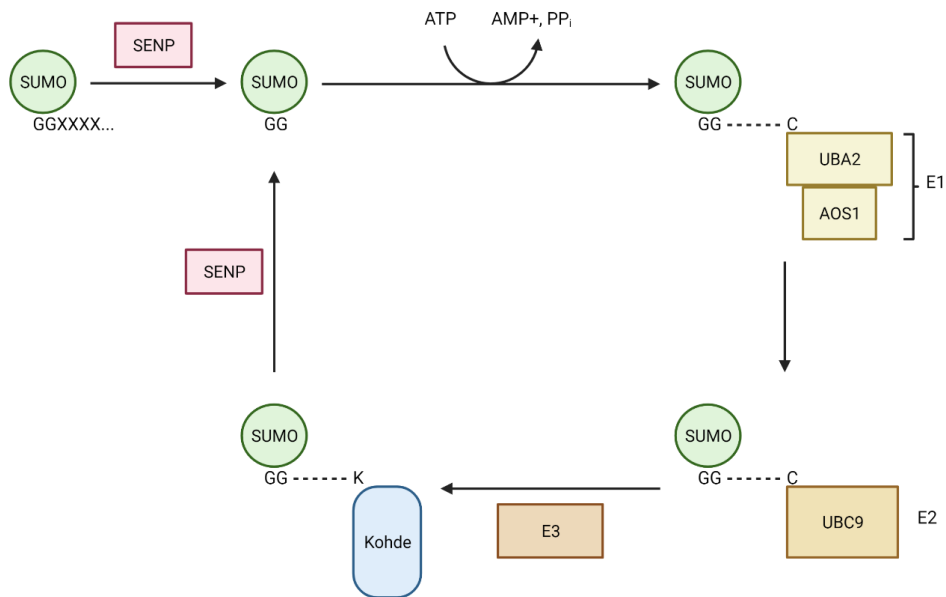
#### 1.1.9 Notch sairauksien hoidossa

Koska Notch liittyy moniin solujen toimintoihin ja sen viallinen signaalointireitti on osallinen useissa sairauksissa, on Notchia pohdittu lääkintäkohteena syövässä, tulehdussairauksissa ja regeneratiivisessa lääketieteessä. Koska Notchilla on jo

erilaistuneissakin soluissa useita rooleja esimerkiksi homeostasian ylläpidossa, ei ole kuitenkaan varmaa kestäisivätkö solut Notch-signaalintireitin lääkitsemistä. Potentiaalisia lääkintäkohteita Notch-signaalintireitille ovat esimerkiksi signaaloinnin estäminen joko reseptori/liganditasolla esimerkiksi ligandien vasta-aineilla, toimimattomilla ligandi- ja reseptoriklooneilla, jotka johtavat ligandi/reseptorivuorovaikutuksen estoon, reseptorin vasta-aineilla, jotka estäisivät reseptorin S2-leikkaukseen tarvittavat konformaatiomuutokset,  $\gamma$ -sekretaasikompleksin inhibiittorit, jotka estäisivät S3-leikkauksen tai tumassa NICD:n transkriptiokompleksin estolla, esimerkiksi muokatulla MAML-peptidillä. (Takebe ja muut 2014; Siebel ja Lendahl 2017).

## 1.2 Sumolaatio

Sumolaatio (kuva 4.) on tärkeä ja yleinen reversiibeli proteiinien muokkausmekanismi pienellä ubikitiinin kaltaisella muokkaajaproteiinilla (*engl.* small ubiquitin related modifier, SUMO). Sumolaation mekanismi on samankaltainen kuin ubikitinaation. Sumolaation entsyymikaskadi liittää SUMO-proteiinit kohdeproteiineihin reversiibelisti isopeptididoksella, jonka jälkeen liitetty SUMO vaikuttaa kohdeproteiinin toimintaan joko luomalla tai peittämällä aktiivisen kohdan. SUMO:n kohdeproteiineja ilmenee useilla solun alueilla, kuten tumassa, sytoplasmassa, solukalvolla ja mitokondriossa. Eniten sumolaatiota tapahtuu tumassa. Sumolaatiolla voi olla useita seurauksia, jotka vaihtelevat kohteen, ympäristön ja muiden proteiinien muokkausten mukaan. Sumolaatio voi johtaa muutoksiin esimerkiksi lokalisaatiossa, aktiivisuudessa ja proteiinin stabiiliudessa. Sumolaatio on useimmille organismeille elintärkeä ja se osallistuu moniin solujen toimintoihin, kuten kromatiinin rakenteen säätelyyn, DNA:n korjaukseen, transkriptioon ja solusyklissä etenemiseen. Sumolaatio osallistuu lisäksi ainakin joidenkin organismien rakenteiden, kuten neuronien kehitykseen (Henley ja muut 2014). Lisäksi SUMO1:n viallisen geenin on havaittu liittyvän huulihalkioon (Alkuraya ja muut 2006). (Gareau ja Lima 2010; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).



**Kuva 4.** Sumolaation yleismekanismi. Kypsyvän SUMO:n leikkaa ensin SENP, jonka jälkeen SUMO on valmis sumolaatioon. Ensin E1-aktivaattorientyymi aktivoi SUMO:n ATP:ta kuluttavassa reaktiossa, jolloin SUMO liittyy C-terminaalista karboksyyli ryhmästään E1-aktivaattorientyymien kysteinitähteeseen. Tämän jälkeen SUMO:n ottaa E2-konjugaatioentsyymi, joka vie SUMO:n kohdeproteiinille, jossa E3-ligaasientsyymi katalysoi peptidisidoksen muodostumisen SUMO:n glysiinitähteestä kohdeproteiinin lysiinitähteeseen. SUMO:n poistaa kohdeproteiinista SENP, jonka jälkeen SUMO:a voidaan käyttää uudelleen sumolaatiossa. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007). Luotu Biorender-sivustolla (Biorender.com).

### 1.2.1 SUMO-proteiinit

SUMO:t ovat noin 10 kD:n kokoisia polypeptidejä, joiden rakenne muistuttaa ubikitiniä. Ne kuitenkin omaavat alle 20 % samanlaista aminohappoketjua ja pintojen varausten jako on erilainen. (Bayer ja muut 1998). SUMO-proteiineilla on N-terminaaliossa päässä 10–25:n aminohapon häntä, jolla ei ole pysyvää kolmiulotteista rakennetta. Näiden häntien tehtävänä on ilmeisesti muodostaa ketju muiden SUMO-proteiinien kanssa. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

Kaikki SUMO-proteiinit ekspressoituvat ensin epäkypsässä muodossa, jossa niiden C-terminaaliossa on vaihtelevan pituinen 2–11:n variaatioalue. Tämän jälkeen on vakiona kaksi vierekkäistä glysiiniä, joka on kypsän SUMO:n C-terminaalien loppupää. Sentiini-spesifinen proteaasi (SENP) leikkaa vaihtelevan pituisen pään irti ennen SUMO:n osallistumista sumolaatioon ja proteiinien toiminnan säätelyyn. (Gareau ja Lima 2010; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

SUMO-proteiinia ilmenee kaikissa eukaryooteissa. Joissain organismeissa ilmenee vain yhtä SUMO-proteiinin tyyppiä, toisilla voi ilmetä useita ja näillä eri SUMO:illa voi olla soluissa eri tehtäviä. Ihmisessä ilmenee neljää SUMO:n tyyppiä, SUMO1-4, joista SUMO1-3 esiintyy kaikkialla kehossa, mutta SUMO4 ilmenee pääasiassa vain munuaisissa, imusolmukkeissa ja pernassa. SUMO2 ja SUMO3 ovat rakenteeltaan erittäin samankaltaisia ja niiden on havaittu osallistuvan samoihin solun vasteisiin, esimerkiksi solustressin aikana sekä SUMO2 että SUMO3 konjugoituivat suuren molekyyli­massan omaaviin proteiineihin, SUMO1:n erotessa näistä kahdesta enemmän (Saitoh ja Hinchey 2000; Vertegaal ja muut 2006). SUMO4:n on havaittu eroavan muista, sen variaatioalueen leikkausta inhiboidaan ja rooli on toistaiseksi vähemmän tunnettu (Owerbach ja muut 2005). (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

### 1.2.2 Sumolaation mekanismi

Sumolaatiossa SUMO:n ja kohdeproteiinin välille muodostuu isopeptidisisidos SUMO:n C-terminaalisen glysiinitähteen ja kohteen lysiinitähteen  $\epsilon$ -aminoryhmän välille. Kohdeproteiiniin voi liittyä useampi kuin yksi SUMO-proteiini, joko eri lysiinitähteisiin tai edelliseen SUMO-proteiiniin, jolloin muodostuu SUMO-ketju. Sumolaatio tapahtuu entsyymikaskadin avulla, jonka entsyymit voidaan jakaa kolmeen luokkaan: E1-entsyymit, jotka toimivat SUMO:n aktivaatioentsyymeinä, E2-entsyymi, joka toimii konjugaatioentsyyminä ja E3-entsyymit, jotka ovat ligaasientsyymejä. (Gareau ja Lima 2010; Hickey ja muut 2012; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

Sumolaation ensimmäisessä vaiheessa leikatun ja kypsän SUMO:n aktivoi sen sumolaatioon osallistuvasta C-terminaalisesta päästä SUMO:lle spesifinen E1-aktivaatioentsyymi, joka on AOS1:n ja UBA2:n heterodimeeri. Tämä vaihe kuluttaa adenosiiini-trifosfaattia (ATP), jolloin muodostuu SUMO-adenylaattikonjugaatti, joka toimii välivaiheena tulevalle tioesterisidokselle. Tämä tioesterisidos muodostuu seuraavaksi SUMO:n C-terminaalisen karboksyyli­ryhmän ja E1-entsyymien UBA2:n katalyyttisen kysteiinin välille. Tämän jälkeen SUMO siirtyy E2-konjugaatioentsyymille, joka on aina Ubc9. Tässä vaiheessa tioesterisidos muodostuu Ubc9:n katalyyttisen kysteiinin ja SUMO:n C-terminaalisen karboksyyli­ryhmän välille (Desterro ja muut 1997). Tämän jälkeen Ubc9 siirtää SUMO:n substraatille, jossa SUMO:n E3-ligaasientsyymi katalysoi isopeptidisisidoksen muodostumisen SUMO:n C-terminaalisen glysiinin ja substraatin lysiinisivuketjun välille. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

Vain harvat proteiinit sumoloidaan kvantitatiivisesti joko alussa tai tarvittun signaalin saatua. Sen sijaan useimmat kohteet näyttävät sumoloituvan pieninä lukumäärinä. Tämä riittää silti aiheuttamaan monia muutoksia soluissa. Sumolaatio on kuitenkin reversiibeli ja proteiineihin sekä lisätään että irrotetaan SUMO:a jatkuvasti. Vaikka tasapaino suosiikin SUMO:lla muokkaamatonta proteiinia, koko proteiinijoukko voi olla sumolaation vaikutuksen alaisena. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

### 1.2.3 SUMO:n eri E3-ligaasientsyymit ja SENP-isopeptidaasit

Toisin kuin sumolaation E1- ja E2- entsyymejä, E3-entsyymejä on monia ja ne voidaan jakaa kolmeen luokkaan. Suurimmalla osalla niistä esiintyy SP-RING-alue (*engl.* SP-RING motif), joka on niiden toiminnalle tärkeä. SP-RING-ligaasit sitoutuvat kohdeproteiineihin ja Ubc9:ään suoraan ja sitovat SUMO:n ei-kovalenttisesti SUMO:n kanssa vuorovaikuttavan alueen tai SUMO:a sitovan alueen (*engl.* a SUMO interacting motif/binding, SIM/SBM) kautta. Ne luultavasti toimivat alustana, joka asettaa kohdeproteiinin ja Ubc9:n ihanteelliseen asemaan SUMO:n siirtoa varten. SP-RING-ligaasit voidaan edelleen luokitella useisiin alaryhmiin. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007). Toisenlainen E3-ligaasientsyymi on selkärankaisten tumahuokosproteiinien RanBP2 (*engl.* The vertebrate-specific nuclear pore protein) (Pichler ja muut 2002). Kolmas SUMO:n E3-entsyymiligaasityyppi on ihmisen yhdistelmäryhmäperheen jäsen 2 (*engl.* human polycomb group member). Ei ole kuitenkaan varmaa toimiiko tämä oikeana katalyyttinä SUMO:n siirrossa E2:lta kohdeproteiinille, vai stimuloiko se proteiinin muokkausta esimerkiksi stoikiometrisesti. Näiden lisäksi myös SUMO:n omana kohteena oleva histoni deasetylaasi 4 stimuloi sumolaatiota (Grégoire ja Yang 2005). (Gareau ja Lima 2010; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

Yksi geeniperhe koodaa SUMO-spesifistä kysteiniiproteaasia. Hiivassa sen proteiinit ovat nimeltään Ulp1 ja 2, ihmisessä Ulp:n kuusi homologia ovat SENP1-3 ja SENP5-7. Ihmisestä on löydetty lisäksi desumoloivat isopeptidaasit 1 ja 2, sekä ubikitiinispesifinen proteaasin kaltainen 1 (*engl.* ubiquitin-specific protease-like 1). Niiden isopeptidaasitoiminnon lisäksi ne voivat toimia SUMO:n C-terminaalien hydrolyysissä, jossa ne voivat leikata edellä mainitun variaabelihännän kypsävistä SUMO-proteiinista ennen sumolaatiota. SENP-perheen proteiinit eroavat toisistaan niiden aktiivisuudesta kypsymisessä, isopeptidin leikkauksessa, vuorovaikutuksesta eri SUMO:n paralogeja kohtaan sekä lokalisaatiossa. (Hickey ja muut 2012; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

#### 1.2.4 SUMO:n liitöntäkohdat

Yleisen SUMO:n liitöntäkohdan (*engl.* acceptor site) konsensuskohta, joita voi olla samassa proteiinissa useita, havaittiin olevan  $\Psi KxE/D$ , jossa  $\Psi$  on alifaattinen haaraunut aminohappo ja  $x$  mikä tahansa aminohappo. Liitöntäkohta voi olla myös käänteinen. (Zhao 2018). Kohteen vastaanottava lysiinitähde kurottaa Ubc9:n katalyyttiseen taskuun, samalla alifaattinen aminohappo vuorovaikuttaa Ubc9:n pinnan kanssa. Konsensuskohdan kanssa vuorovaikutus on mahdollista vain jos se on ulkonevassa tai rakenteettomassa osassa proteiinia. SUMO:n liitöntäkohdan peruskonsensuskohdan lisäksi sitä on voitu jatkaa esimerkiksi fosforylaation tarvitsevalla jatkeella (Hietakangas ja muut 2006). On kuitenkin myös havaittu joitain harvoja sumolaation kohteita, joissa konsensuskohtaa ei löydy. (Gareau ja Lima 2010; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

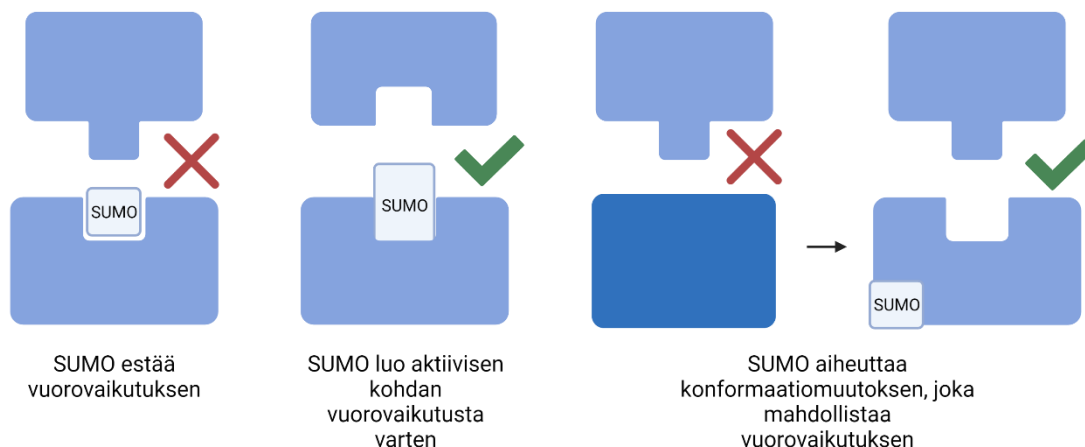
#### 1.2.5 SUMO:n ei-kovalenttiset vuorovaikutukset

Edellä kuvatun sumolaation lisäksi proteiinit voivat vuorovaikuttaa SUMO:n kanssa myös ei-kovalenttisesti. Tällöin proteiinit, jotka eivät muutoin vuorovaikuttaisi keskenään, voivat vuorovaikuttaa toiseen liitetyn SUMO:n välityksellä SUMO:SIM:n kautta. Joissain tapauksissa saman signaalointireitin useat proteiinit voidaan sumoloida, joka vakauttaa vuorovaikutusta muokattujen proteiinien välillä, esimerkiksi DNA:n korjauksessa (Psakhye ja Jentsch 2012). Tämä vuorovaikutus ei ole vahva, mutta sitä voi vahvistaa usean SIM:n sitoutuminen SUMO-ketjuihin. (Zhao 2018; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

#### 1.2.6 Sumolaation vaikutukset

Ei ole yksinkertaista tapaa ennustaa miten sumolaatio vaikuttaa kohdeproteiiniin. Tutkittaessa *in vivo* sumolaatio saattaa vaikuttaa proteiinien ominaisuuksiin esimerkiksi stabiiliudessa, lokalisaatiossa ja aktiivisuudessa. Molekulaarisella tasolla sumolaatio muuttaa proteiinin pintaa ja siten vaikuttaa sen vuorovaikutukseen muiden makromolekyylien kanssa (kuva 5.). Se voi edistää proteiini-proteiini vuorovaikutusta jolloin sumolaatio johtaa jonkin solun prosessin tapahtumiseen, esimerkiksi histoni-asetyyli transferaasi p300:n transkriptionaalisen vaikutuksen aktivoinnissa (Girdwood ja muut 2003). Sumolaatio voi myös estää tai vähentää proteiinien välistä vuorovaikutusta esimerkiksi peittämällä aktiivisen kohdan, jolloin tietty prosessi estyy, esimerkiksi transkription ko-repressorin CtBP:n lokalisaatiota muuttamalla (Lin ja muut 2003). Sumolaatio voi siis yksinkertaistetusti joko luoda tai peittää aktiivisen kohdan, joko SUMO:n itsensä peittämällä tai osallistumalla aktiiviseen kohtaan tai SUMO:n

sitoutumisen aiheuttamalla konformaatiomuutoksella. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).



**Kuva 5.** Sumolaation vaikutus kohdeproteiinin vuorovaikutukseen. SUMO voi peittää aktiivisen kohdan ja estää proteiini-proteiini vuorovaikutuksen, olla osa aktiivista kohtaa, joka mahdollistaa vuorovaikutuksen tai aiheuttaa kohdeproteiinin konformaatiomuutoksen, joka voi mahdollistaa vuorovaikutuksen. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007). Luotu Biorender-sivustolla (Biorender.com).

### 1.2.7 Sumolaatio tumassa

Sumolaatiota tapahtuu useilla solun alueilla, mutta eniten tumassa, josta on löydetty eniten sumolaation entsyymejä ja sumoloituvia proteiineja. Sumolaatiokoneiston mutatoinnin on havaittu johtavan moniin tumen rakennehäiriöihin, esimerkiksi heterokromatiinin rikkoutumiseen. Nämä viittaavat sumolaation tärkeyteen tumarakenteissa, joita säätelemällä sumolaatio voi mahdollisesti vaikuttaa biologisiin prosesseihin. (Zhao 2018).

Sumolaatio usein repressoi transkriptiota. Repressio näyttää perustuvan transkription säätelijöiden vuorovaikutukseen SUMO:n kanssa niiden SIM/SBM:n kautta. Ainakin kaksi repressiivistä säätelymekanismia on havaittu olevan yhteistä SUMO-välitteisessä säätelyssä. Toisessa transkriptiotekijän sumolaatio johtaa vuorovaikutukseen repressiivisen säätelijän kanssa, jolla on kromatiinia muokkaavia ominaisuuksia. Näissä tapauksissa kromatiinin repressiivinen muokkaus pysyy, vaikka sumolaatio poistuisi. Toisissa tapauksissa transkriptiotekijän sumolaatio voi johtaa repressiivisen kompleksin muodostumiseen. Tällöin transkriptiotekijän SUMO:n kanssa vuorovaikuttavat proteiinit, joilla on SIM/SBM toimivat alustana, johon voi muodostua repressiokompleksi. Tämä kompleksi pysyy, vaikka SUMO poistettaisiin transkriptiotekijästä. Molemmassa

malleissa sumolaatiota tarvitaan vain hetkeksi ja geenin repressio pysyy, vaikka SUMO poistetaan kohdeproteiinista. (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

Proteiinit, jotka kykenevät multivalentteihin vuorovaikutuksiin, voivat muodostaa suuria oligomeerejä, jotka erottuvat ympäristöstään. Nämä proteiinit voivat käyttää niiden vuorovaikutusalueitaan tai rakenteettomia osiaan värvätäkseen muita makromolekyylejä, jolloin rakenne laajenee. Nämä rakenteet voivat vuorovaikuttaa ympäristön kanssa monin eri tavoin ja lisäksi korkeat konsentraatiot tiettyjä makromolekyylejä samassa rakenteessa lisää niiden välisiä biologisia prosesseja. Tutkimukset tällaisista membraanittomista rakenteista viittaavat siihen, että SUMO:n ominaisuus lisätä proteiini-proteiini vuorovaikutuksia voisi johtaa näiden rakenteiden muodostumiseen. Tällaisia rakenteita ovat esimerkiksi promyelosyyttisen leukemian proteiinirakenteet (*engl.* promyelocytic leukemia protein bodies, PML), joiden rakenteissa voi esiintyä yli 150 proteiinia ja joiden toimintoihin kuuluvat esimerkiksi DNA:n korjaus, vaste solustressiin ja kasvainten repressointi. Mutaatiot sumolaatiossa tai proteiinien SIM:ssä haittasi rakenteiden muodostumista ja toimintaa. Sumolaatiasapainon tärkeys on havaittu myös tumajyväsien toiminnassa. Lisäksi sumolaatio vaikuttaa myös kromosomirakenteeseen ja toimintaan, kuten sentromeereihin ja telomeereihin. (Zhao 2018).

#### 1.2.8 Sumolaation säätely

Solu sumoloi useat proteiinit vain joko solun ulkoisen tai sisäisen signaloinnin jälkeen, kuten vasteena solusykliin, ravinnetilanteeseen tai solustressiin. Soluilla on useita säätelymekanismeja, jotka voivat joko lisätä tai vähentää sumolaatiota. Useissa tapauksissa kohdeproteiinin sumolaation säätely tapahtuu kohdeproteiinin muiden post-translationalaalisten muokkausten kautta, kuten fosforylaation, joka voi muuttaa esimerkiksi proteiinin lokalisaatiota. (Gareau ja Lima 2010; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

Sumolaation ja muiden post-translationalaalisten muokkausten välillä esiintyy monia yhteisvaikutuksia. Tällaista on esimerkiksi kilpaileva inhibitio sumolaation ja ubikitinaation välillä tietyistä lysiinitähteistä. Nämä lysiinitähteet voivat olla myös asetylaation ja metylaation kohteina. Useiden peptidien on myös havaittu olevan sekä sumoloituvia että fosforyloituvia (Antfolk ja muut 2019), esimerkiksi DNA-vaurioiden korjauksessa sumolaation ja fosforylaation substraatit ovat usein samoja. Lisäksi sumolaation useiden E3-entsyymien kohdeproteiineista osan on havaittu olevan proteiinikinaaseja, jotka ovat usein sumoloituja, viitaten sumolaation tärkeyteen

fosforylaation säätelyssä. Eri muokkaukset voivat toimia joko kilpailemalla tai ne yhdessä muuttavat proteiinin vastetta sumolaatioon. (Zhao 2018; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

Kohdeproteiinin säätelyn lisäksi sumolaatiota voidaan säädellä sumolaatioon osallistuvien entsyymien aktiivisuuden, lokalisaation ja määrän kautta. Tämä voi vaikuttaa sekä yksittäisiin sumolaation kohteisiin, että solun yleisen sumolaation tasoon. Sumoloidut kohteet ja SUMO:n entsyymit voivat olla esimerkiksi ubikitinoinnin kohteita, jolloin kohdistetut ubikitiniligaasit sitoutuvat SUMO:on ja sitä kautta sumoloituihin proteiineihin, joka johtaa ubikitinaation kautta proteiinin hajotukseen proteasomeissa. SUMO:n säätelyä kohdistettujen ubikitiniligaasien kautta taas säädellään niiden antagonisteilla ja tämän tasapainon ylläpito on tärkeää esimerkiksi DNA:n korjauksen ja kopioitumisen aikana. Toisaalta taas ubikitinaation komponentit voivat olla sumolaation kohteita. Toinen tapa säädellä yleistä sumolaatiota on SUMO:n koneiston lokalisointi tarpeen mukaan, esimerkiksi DNA:n vaurion aikana SUMO:n E2- ja tilanteelle spesifiset E3-entsyymit lokalisoidaan vaurioalueelle assosioimalla entsyymit vaurion tunnistavien kompleksien kanssa. Entsyymit voidaan lokalisoida myös esimerkiksi solusyklin mukaan. Sumolaation entsyymejä säädellään myös muiden post-translationalisten säätelymekanismien toimesta, esimerkiksi SUMO:n E2-entsyymin asetylaatio hypoksian aikana vähentää sen kykyä vuorovaikuttaa useiden proteiinien kanssa, mutta sen fosforylaatio mitoosin aikana lisää sen aktiivisuutta muodostaa tioesterisidos SUMO:n kanssa. (Zhao 2018; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

### 1.3 Notchin sumolaatio

Notch-signaalintireitillä on useita tehtäviä ja sen toiminnan vaikutukset vaihtelevat muun muassa Notch-reseptorin post-translationalisten muokkausten mukaan. Kuten edellä mainittiin, NECD:tä muokataan useilla eri glykaaneilla, joka vaikuttaa ligandien sitoutumiseen ja NICD:tä taas voidaan muokata monilla eri muokkauksilla, kuten sumolaatiolla. Sumolaation liitântäkohta vaihtelee Notchin tyyppin mukaan, esimerkiksi Notch2:n sumolaatiossa SUMO konjugoidaan 1353 kohdan lysiiniin, kun taas Notch3:ssa kohta on 2061 lysiini (Hendriks ja muut 2017). Sumolaatiosta Notchin säätelyssä ei ole vielä paljon tietoa, mutta siitä on jo löydetty esimerkkejä, joissa sumolaatio usein johtaa Notchin kohdegeenien repressioon. (Antfolk ja muut 2019).

Antila ja muut havaitsivat tutkimuksessaan N1ICD:n sumoloituvan tumassa solujen altistuessa lämpöshokille. Stressi ja sumolaatio lisäsivät N1ICD:n lokalisaatiota tumaan,

mutta samalla sen transkriptionaalinen aktiivisuus väheni. SUMO tai sumolaation E2-entsyymi eivät haitanneet N1ICD:n sitoutumista CSL:ään tai transkriptiokompleksiin, vaan sumolaatio aiheutti histonien deasetylaasi 4:n värväyksen Notchin transkriptiokompleksiin, josta seurasi Notchin kohdegeenien repressio. (Antila ja muut 2018). N1ICD:n sumolaatiota havaittiin myös mesenkymaalisissa kantasoluissa (*engl. mesenchymal stem cells*) ja se näytti liittyvän hypoksian vasteeseen ja sumolaation inhibitio johti muutoksiin solujen jakautumisessa ja migraatiossa (Ciria ja muut 2017). Zhu ja muut tutkivat Notch1:n ja sumolaation suhdetta angiogeneesissä, jossa Notchin tiedetään vaikuttavan. Heidän mukaansa sumolaatio liittyi N1ICD:n vapauttamiseen solukalvolta, jolloin se stabiloi N1ICD:n, johtaen kauemmin kestävään signaalointiin, joka taas johti angiogeneesin repressioon. (Zhu ja muut 2017).

Licciardello ja muut havaitsivat vuorovaikutuksen Notch1:n ja sumolaation välillä rintasyövän epiteelin soluissa. Tutkimuksessaan he inhiboivat sumolaation E1-entsyymiä ja poistivat E2-entsyymien, haitaten sumolaatiota. Tämä johti Notch1-aktiivisten rintasyöpäsolujen kasvun häiriöön, jolloin ne etenivät solusyklistä hitaammin ja ajautuivat lopulta apoptoosiin. Heidän mukaansa sumolaation inhibiittorit voisivat olla yksi mahdollisuus Notchin ajaman syövän lääkintäkohteena. (Licciardello ja muut 2015).

Sumolaation on myös havaittu inhiboivan yhtä tai useampaa komponenttia LIN-12/Notch-signaalointireitissä *Caenorhabditis elegans*issa yhdessä muuan muassa metylaation ja asetylaation kanssa (Poulin ja muut 2005). Lisäksi sumolaatio vaikuttaa Notchin signaalointiin KyoT2-proteiinin kautta, joka toimii Notchin negatiivisena säätelijänä (Wang ja muut 2007). Myös MAML:n on havaittu olevan sumolaation kohde, ja sen sumolointi johtaa MAML:n transkriptionaalisen aktiivisuuden vähenemiseen (Lindberg ja muut 2010).

#### 1.4 Notch ja sumolaatio erilaistumisessa ja mekaanisessa stressissä

Myogeneesin aikana lihassolujen prekursorisolut, eli myoblastit, poistuvat peruuttamattomasti solusyklistä ja lisäävät lihasspesifisten proteiinien ekspressiota, jolloin ne fuusioituvat toistensa kanssa muodostaakseen erilaistuneita ja usean tuman omaavia lihassoluja (Riquelme ja muut 2006). Kuten edellä on mainittu, Notch liittyy lihasten erilaistumiseen, usein repressio kautta (Siebel ja Lendahl 2017; Ono ja muut 2007), mutta myös sumolaation (Riquelme ja muut 2006) ja mekaanisen stressin (Le ja muut 2016; Esteves de Lima ja muut 2016) on havaittu liittyvän lihassolujen erilaistumiseen.

Tutkimuksessaan Riquelme ja muut tutkivat sumolaation roolia lihassolujen erilaistumisessa hiiren myoblasteissa, eli C2C12-soluissa. He havaitsivat sumolaation E2-entsyymin osittaisen poiston johtavan C2C12-solujen erilaistumisen häiriöön. Tällöin kuitenkin lihasspesifisten transkriptiotekijöiden MyoD:n ja myogeniinin, jotka ovat tärkeitä erilaistumiselle, ekspressio, lokalisaatio tai aktivaatio eivät muuttuneet. Heidän mukaansa tulokset viittaavat siihen, että sumolaatio on tärkeää C2C12-solujen erilaistumisessa ja mahdollisesti säätelee avainasemassa olevia MyoD:tä ja myogeniiniä. Tutkimuksessa Riquelmen ryhmä havaitsi myös kokonaissumolaation vähenevän erilaistumisen aikana. (Riquelme ja muut 2006).

Kuten edellä mainittiin, fosforylaation tiedetään myös liittyvän sekä sumolaatioon että Notchiin (Antfolk ja muut 2019; Zhao 2018; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007) ja sen taso näyttää nousevan mekaanisessa stressissä (Nakai ja muut 2010; Da ja muut 2020). Nakai ja muut tutkivat C2C12-solujen myoblasteissa mekaanisen venyttävän stressin vaikutusta proteiinien translaation aloitukselle ja solujen pidentymiselle ja havaitsivat translaation ja pidentymisten markkereiden aktivoitumisen sekä staattisessa että syklisessä mekaanisessa stressissä. Syklisessä stressissä havaittiin myös MAP-kinaasien lisääntynyt fosforylaatio. Ryhmä tutki eri inhibiittoreilla fosforylaatiota ja aktivaattoreita stressissä ja totesivat lopulta stressin indusoivan proteiinien translaation aktivaation ja pidentymisen tyrosiinikinaasien kautta, pois lukien Src-kinaasin ja JAK:n. (Nakai ja muut 2010). Da ja muut taas tutkivat mekaanisen stressin vaikutusta C2C12-solujen jakaantumiseen ja siihen liittyviä mekanismeja PI3K/AKT-signaalintireitissä, joka säätelee solujen jakautumista ja erilaistumista useissa eri soluissa. He havaitsivat syklisen mekaanisen stressin aktivoivan PI3K signaalintireitin, sekä lisäävän AKT:n fosforylaatiota ja mTOR:n ekspressiota solujen jakaantuessa enemmän ja päätyen myös vähemmän apoptoosiin. (Da ja muut 2020).

Kumar ja muut tutkivat syklisen mekaanisen stressin vaikutusta luurankolihasen myogeneesiin. Tutkimuksessaan he havaitsivat mekaanisen stressin lisäävän C2C12-solujen jakautumista ja samalla inhiboivan niiden erilaistumista myotubeiksi. Syklinen stressi inhiboi myosiinin raskaan ketjun ekspressiota sekä myoputkien muodostumista C2C12-soluissa. (Kumar ja muut 2004). Notch-signaalointi kontrolloi myös luurangon muodostumista sekä aikuisen luun uudelleenmuokkausta. Tutkimuksessaan Ziouti ja muut selvittivät aktivoituuko Notch-signaalintireitti luusolujen aistimassa mekaanisessa stressissä. He havaitsivat spesifisten Notchin kohdegeenien ekspresion indusoituvan sykliselle mekaaniselle stressille altistetuissa ihmisen luuytimistä otetuissa

mesenkymaalisisissa stroomasoluissa. Kun näiden stroomasolujen Notch-signalointireitti estettiin  $\gamma$ -sekretaasin inhibiittorilla, mekanotransduktio estyi ja aktiinitukirangan organisaatio muuttui. (Ziouti ja muut 2019).

### 1.5 Erikoistymisen tavoitteet

Vaikka lihassolujen myoblastien erilaistumisen tuntemisesta voisi olla suurta hyötyä regeneratiiviselle lääketieteelle esimerkiksi lihasrappeumataudin hoidossa, tarkkaa mekanismia ja säätelyä ei vielä tunneta. Koska Notch2:n ja sumolaation tiedetään liittyvän C2C12-solujen erilaistumiseen (Ono ja muut 2007; Riquelme ja muut 2006), erikoistymisen tavoitteena oli tutkia näiden tasojen muutoksia sekä erilaistumisessa ja mekaanisessa stressissä, joka toisaalta indusoi soluja jakaantumaan (Kumar ja muut 2004), mutta myös on tärkeä myogeneesille (Nakai ja muut 2010) ja mahdollisesti löytää yhteys näiden välillä. Solut sekä indusoi erilaistumaan alentamalla kasvatusliuoksen seerumitasoa, että altistettiin sykliselle mekaaniselle stressille, joka jäljitteli lihasten luontaista venymistä. Näiden kokeiden tulosten pohjalta päätettiin viimeisen kokeen erilaistumis- ja stressiajat. Tässä kokeessa alhaisen seerumipitoisuuden erilaistumiseen indusoimat ja erilaistumisen eri vaiheissa olevat solut altistettiin mekaaniselle stressille, jotta nähtiin eroaako vaste mekaaniseen stressiin soluissa, joissa erilaistuminen oli jo käynnistynyt. Näytteet tutkittiin käyttämällä Western blot -menetelmää. Lisäksi Notch2:n sumolaation immunosaostus-menetelmällä tutkimisen optimointi aloitettiin jatkotutkimuksia varten.

## 2. Materiaalit ja menetelmät

### 2.1 C2C12-solujen kasvatus

Erikoistymässä käytettiin hiiren lihassolujen myoblasteja (C2C12-soluja), joita kasvatettiin kasvatuslioksessa (Dulbecon muokattu Eaglen mediumi, ((*engl.* Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)), korkea glukoosi, Sigma, D6171-500 ML), 10 % v/v vasikan sikiön seerumi ((*engl.* fetal bovine serum, (FBS)), Biowest, S16337S1810), 2 mM L-glutamiini (Biowest, X0550-100), 100 U/ml penisilliini ja 100  $\mu$ g/ml streptomysiini (Sigma, PO781-100ml)) 10 cm:n kasvatusmaljoilla (Greinerbio-one) +37 °C 5 % CO<sub>2</sub>. Soluja jakaessa käytettiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta ((*engl.* phosphate buffered saline, PBS), Biowest, Dulbecon fosfaattipuskuroitu suolaliuos (*engl.* Dulbecco's

phosphate buffered saline), L0615-500) ja trypsiiniliuosta (Biowest, trypsiini 0,25 %-etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA), Hankin tasapainotettu suolaliuos (*engl.* Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS), L0931-100). Solut laskettiin Biorad TC20 automated cell counter -solulaskijalla. Jatkokasvatusta ei päästetty yli noin 60 %:n konfluenssin.

## 2.2 C2C12-solujen erilaistuminen

C2C12-solut kasvatettiin 10 cm:n maljoilla (Greinerbio-one) noin 60 %:n konfluenssiin. Kontrollinäytteen kasvatusliuos imettiin pois ja malja pestiin kerran PBS:llä, jonka jälkeen solut lyysattiin 1 ml/malja kolminkertaisella laemmlilla (30 % v/v glyseroli, 3 % w/v natriumlauryylisulfaatti (SDS) 0,1875 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,015 % w/v bromifenolisininen, 3 % v/v  $\beta$ -merkaptotetanoli) ja kammion pohjan laemmlisoluoseos kaavittiin yhteen kulmaan, josta näyte siirrettiin pipetoimalla mikrosentrifugiputkeen ja keitettiin 95 °C 10 min, jonka jälkeen näyte varastoitiin -20 °C. Muiden kasvatusliuos vaihdettiin erilaistumisliuokseen ((DMEM, korkea glukoosi, Sigma, D6171-500 ML), 1 % v/v FBS (Biowest, S16337S1810), 2 mM L-glutamiini (Biowest, X0550-100), 100 U/ml penisilliini ja 100  $\mu$ g/ml streptomysiini (Sigma, PO781-100ml)) ja näitä inkuboitiin +37 °C 5 % CO<sub>2</sub> keräysaikapisteeseen asti (24 tuntia, 48 tuntia, 72 tuntia, 96 tuntia ja 120 tuntia), jonka jälkeen näytteet kerättiin kuten kontrolli edellä. Erilaistumisliuos vaihdettiin joka toinen päivä imemällä vanha liuos pois, pesemällä PBS:llä ja lisäämällä tuore liuos.

## 2.3 C2C12-solujen transfektio GenJet-reagenssilla

C2C12-solut kasvatettiin transfektiota varten noin 30–40 %:n konfluenssiin eri kokoisilla maljoilla kokeesta riippuen: 6 cm:n maljalla (Falcon) erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä tai 10 cm:n maljoilla (Greinerbio-one) erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaanisessa stressissä, sekä Notch2:n sumolaation tutkimisessa immunosaostuksella. Solut transfektoitiin käyttäen GenJet In Vitro DNA Transfection reagent (Ver. II) -reagenssia (SignaGen Laboratories, #SL100489) valmistajan ohjeiden mukaan: 6 cm:n maljalle DNA-plasmidia yhteensä 2,5  $\mu$ g, 10 cm:n maljalle DNA-plasmidia yhteensä 5  $\mu$ g. Transfektio tehtiin joko Mock- (tyhjä kontrolliplasmidi) tai SUMO1His-plasmidilla molemmissa mekaanisen stressin kokeissa. Transfektoidut solut otettiin kokeiden käyttöön seuraavana päivänä.

## 2.4 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi

### 2.4.1 Transfektio

Solut transfektoitiin GenJet-reagensilla joko tyhjällä Mock-plasmidilla transfektiokontrolliksi tai SUMO1His-plasmideilla 6 cm:n maljoilla (Falcon) käyttäen 2,5 µg DNA-plasmidia.

### 2.4.2 Mekaaninen stressi

Mekaaniseen stressiin käytettiin Strex Inc. STB-140 -laitetta ja siihen sopivia steriloituja kammioita. 10 cm:n maljoille (Greinerbio-one) pipetoitiin 500 µl puhdasta 70 % etanolia, jonka päälle kammiot laskettiin. Kammioihin lisättiin 3 ml 5 µg/ml fibronektiiniliuosta (EMD Millipore Corp. FC010, Hu Plasma Fibronectin) ja inkuboitiin +37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 4 tuntia. Liuos imettiin pois ja kammiot pestiin PBS:llä kahdesti. Solut jaettiin kammioihin 100 000 solua/kammio, Mock-transfektioituja soluja vain yhteen kammioon, loppuihin SUMO1His-transfektioituja soluja. Kammiot inkuboitiin +37 °C 5 % CO<sub>2</sub> yön yli. Solujen kunto tarkistettiin aamulla ennen mekaanista stressiä. Mocksolujen-kammio ja SUMO1His-transfektioitujen kontrollisolujen -kammio jätettiin inkubaattoriin, muut asetettiin mekaanisen stressin laitteeseen ja solut altistettiin 10 %:n syklisteen venytykseen 1 Hz:n taajuudella. Näytekeräyksen aikapisteet olivat 15 min, 30 min, 1 tunti ja 2 tuntia. Mock- ja kontrollinäyte, joita ei altistettu stressille, lyysattiin ennen ensimmäistä aikapistettä. Jokaisen aikapisteen kohdalla laite pysäytettiin ja kammio irrotettiin ja laite laitettiin heti takaisin päälle, joten aikaa kului noin 2 min, kun jäljellä olevat kammiot olivat paikoillaan. Kammion kasvatusliuos imettiin pois ja kammio pestiin kerran PBS:llä jonka jälkeen solut lyysattiin 350 µl/kammio kolminkertaisella laemmlilla ja kammion pohjan laemmlis/soluseos kaavittiin kulmaan, josta näyte siirrettiin pipetoimalla mikrosentrifugiputkeen ja keitettiin 95 °C 10 min, jonka jälkeen näyte varastoitiin -20 °C.

## 2.5 Erilaistumattomien ja erilaistuneiden C2C12-solujen mekaaninen stressi

### 2.5.1 Transfektio

Solut transfektoitiin GenJet-reagensilla joko tyhjällä Mock-plasmidilla transfektiokontrolliksi tai SUMO1His-plasmideilla 10 cm:n maljoilla käyttäen 5 µg DNA-plasmidia.

### 2.5.2 Mekaaninen stressi ja erilaistuminen

Kuten edellä, mekaaniseen stressiin käytettiin Strex Inc. STB-140 -laitetta ja siihen sopivia steriilejä kammioita, jotka valmistettiin fibronektiiniliuoksella ja joihin transfektoidut solut jaettiin ja annettiin inkuboida yön yli. Tässä kokeessa kaikkia

stressinäytteitä altistettiin sykliselle mekaaniselle stressille 30 min ajan, käyttäen edelleen 10 %:n venytystä 1 Hz. Ensimmäisenä päivänä 0 tunnin stressinäyte altistettiin stressille. Mock ja 0 tunnin kontrolli odottivat inkubaattorissa stressinäytteen stressauksen ajan. Stressin jälkeen 0 tunnin stressinäytteen, 0 tunnin kontrollin ja Mockin kammioiden kasvatusliuos imettiin pois ja pestiin kerran PBS:llä jonka jälkeen solut lyysattiin 350 µl/kammio (viimeisessä toistossa käytettiin 300 µl) kolminkertaisella laemmlilla ja kammion pohjan laemmlisä/soluseos kaavittiin yhteen kulmaan, josta näyte siirrettiin pipetoimalla mikrosentrifugiputkeen ja keitettiin 95 °C 10 min, jonka jälkeen näyte varastoitiin -20 °C. Muiden kammioiden kasvatusliuos vaihdettiin erilaistumisliuokseen ja inkuboitiin +37 °C 5 % CO<sub>2</sub> erilaistumisaikapisteeseensä saakka (24 tuntia, 48 tuntia ja 72 tuntia), jonka jälkeen aikapisteen kontrolli odotti inkubaattorissa stressinäytteen stressauksen ajan, jonka jälkeen molemmat kerättiin kuten edellä. Erilaistumisliuos vaihdettiin joka toinen päivä kuten edellä.

## 2.6 Western blot

### 2.6.1 SDS-PAGE

Denaturoivaa natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesiajoo (SDS-PAGE) varten valmistettiin akryyliamidigeelit (ylägeeli 4,4 % v/v akryyliamidi (30 % Akryyliamidi/Bis liuos 37,5:1, Biorad 1610158), 0,12 M Tris-Base (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,04 % w/v ammoniumpersulfaatti (APS), 0,2 % v/v tetrametyyli-etyleenidiamiini (TEMED), alägeeli 8 tai 15 % v/v akryyliamidi (30 % Akryyliamidi/Bis liuos 37,5:1, Biorad 1610158), 0,4 M Tris-Base (pH 8,8), 0,1 % SDS, 0,1 % w/v APS, 0,1 % v/v TEMED) tutkittavan proteiinin mukaan: 8 % sumolaation, Notch2:n ja joidenkin desmiinien ajoihin, 15 % myogeeniin, Troponiini T:n ja joidenkin desmiinien ajoihin. Erilaistumisen näytteet keitettiin ennen ajoa uudestaan 95 °C 10 min ja kaikki näytteet sentrifugoitiin kevyesti. Proteiinistandardia (Precidion Plus Protein Dual Color standard, Biorad, 161-0374) ladattiin geelille 8 µl, näytettä ladattiin 35 µl, erilaistumisen mekaanisessa stressissä määrää nostettiin noin 47 µl:aan. Geelit ajettiin 80–120 V PowerPac HC-ajolaitteella (BioRad) geelijaopuskurissa (0,025 M Tris-Base, 0,19 M glysiini, 0,1 % SDS), kunnes joko latausrintama oli ajautunut geelin alareunaan tai tutkittava proteiini oli molekyylipainon mukaan erottunut mahdollisimman lähelle geelin keskikohtaa.

### 2.6.2 Siirrostus ja membraanin käsittely

Geeli siirrettiin nitroselluloosamembraanille (Nitrocellulose blotting membrane, GE Healthcare, 10600016) märkäsiirrostuksella 100 V 1 tunti 30 min siirrostuspuskurissa (0,06 M Tris-Base, 0,05 M glysiini, 20 % v/v metanoli). Membraani siirrettiin Pounceau-liuokseen (Pounceau S solution, Sigma, P7170-1L), membraanin tyhjät osat leikattiin irti ja membraani merkittiin, jonka jälkeen Pounceau huuhdeltiin MQ:lla pois ja membraanin sitoutumattomat kohdat peitettiin blokkiliuoksella (3 % m/v Valio rasvaton maitojauhe, 0,3 % tai 0,1 % Tween, PBS) inkuboiden noin 30 min.

### 2.6.3 Primäärivasta-aineet

Blokkiliuos pestiin pois pesuliuoksella (0,3 % tai 0,1 % Tween, PBS) ja membraani siirrettiin primäärivasta-aine putkeen inkuboimaan yön yli, +4 °C pyörittelyssä 50 ml putkessa (Falcon). Käytetyt primäärivasta-aineet olivat: SUMO1 (Invitrogen, 33-2400, hiiri, 1:1000 laimennos), Notch2 (Cell Signaling Technology, 57325, jänis, 1:1000 laimennos), Desmiini (Cell Signaling Technology, 5332S, jänis, 1:1000 laimennos), myogeeniini (Santa Cruz Biotechnology, SC-12732, hiiri, 1:500 laimennos, erilaistuneiden mekaaniseen stressiin yritettiin myös 1:200), Troponiini T (Santa Cruz Biotechnology, SC-20643, jänis, 1:500 laimennos) ja lämpöshokkiproteiini 70 (*engl.* Heat shock protein 70, HSC70) (Enzo, ADI-SPA-815-D, rotta, 1:10 000 laimennos). Primäärivasta-aineet laimennettiin yleensä 5 tai 10 milliin primäärivasta-ainepuskuria (0,5 % BSA, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, PBS).

### 2.6.4 Sekundäärivasta-aineet

Membraani pestiin kolme kertaa 7–10 min pesuliuoksella ja siirrettiin primääriä vastaavaan sekundäärivasta-aineeseen ja inkuboitin hitaassa liikkeessä ainakin 1 tunti RT. Käytetyt sekundäärivasta-aineet olivat: hiiri (Vector laboratories, PI-2000, 1:10 000 laimennos), jänis (Vector laboratories, PI-1000, 1:10 000 laimennos) ja rotta (Vector laboratories, PI-9400, 1:10 000 laimennos). Sekundäärivasta-aineet laimennettiin 20 milliin blokkiliuosta.

### 2.6.5 Tulosten visualisointi ja filmikehitys

Membraanit pestiin 3 kertaa 7–10 min pesuliuoksella ja inkuboitin 5 min kemiluminesenssiliuoksella (*engl.* enhanced luminol-based chemiluminescent substrate, ECL) valmistajan ohjeen mukaan (Amersham ECL western blotting detection reagents, GE Healthcare, RPN2106) liikutellen. Membraanit käärrittiin kelmuun ja teipattiin filmauskansioon ja kehitettiin filmille (Ultra Cruz autoradiography film, Santa Cruz, SC-

201697) käyttäen Agfa Gurix 60 -konetta vaihtelevin valotusajoin. Saadut filmit skannattiin tiff-muotoon filmikuviksi.

#### 2.6.6 Membraanin uudelleenanalysointi

Membraaneista selvitettiin yleensä kaksi eri proteiinia ja lopuksi HSC70-latauskontrolli. Ensin pestiin ECL pois pesuliuksella ja membraani siirrettiin blokkauksliuokseen 30 min ajaksi, jonka jälkeen taas pestiin pesuliuksella ja membraani siirrettiin inkuboimaan uudessa primäärivasta-aineputkessa yön yli ja jatkettiin kuten edellä.

#### 2.6.7 Tulosten kvantitointi ja kuvien käsittely

Western blot -filmikuvat analysoitiin ImageJ- (Fiji) ja Microsoft Excel -ohjelmia käyttäen. Kuvat käsiteltiin Gimp-ohjelmalla.

### 3. Tulokset

Erikoistyössä selvitettiin hiiren lihassolujen myoblastien, eli C2C12-solujen, sumolaation ja Notch2:n tasojen muuttumista erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana ja etsittiin näiden välistä yhteyttä. Soluja kasvatettiin kokeiden ulkopuolella pitämällä ne alle 60 %:n konfluenssissa, jotta ne eivät kasvaneet lähekkäin, jolloin erilaistuminen voisi indusoitua ennen kokeita ja vääristää tuloksia. Ensin soluja tutkittiin altistamalla ne pelkästään erilaistumista indusoivaan alhaisen seerumin erilaistumisliuokseen, jotta nähtiin kuinka solut erilaistuvat ja miten tutkittujen proteiinien tasot muuttuvat. Erilaistumattomista soluista tutkittiin myös sumolaation tasot lyhyessä mekaanisessa stressissä, jotta voitiin määrittää milloin sumolaatio on korkeimmillaan, johon olisi myöhemmin hyvä verrata. Näiden kokeiden pohjalta solut altistettiin erilaistumisen eri vaiheissa mekaaniselle stressille ja selvitettiin miten tarkasteltavien proteiinien vaste mekaaniseen stressiin eroaa erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen välillä. Lisäksi Notch2:n sumolaation tutkiminen immunosaostuksella aloitettiin, mutta menetelmää tulee vielä optimoida varmojen tulosten saamiseksi.

Erikoistyössä tutkittiin sumolaation tasoja eri tilanteissa, sillä sumolaation tiedetään olevan tärkeä C2C12-solujen erilaistumiselle (Riquelme ja muut 2006). Sumolaatiota tutkittiin SUMO1:n tasojen avulla, jonka on havaittu liittyvän useisiin tärkeisiin solun toimintoihin, kuten tumakuljetukseen, tulehdusvasteeseen ja solusyklin säätelyyn (Saitoh ja Hinchey 2000). Sumolaatiota tarkastellaan Western blot -filmien 75 kD:n yläpuolella

olevasta hunnusta. Notch-reseptoreista tutkittavaksi valittiin Notch2, jonka tiedetään liittyvän C2C12-solujen myogeneesiin negatiiviseen säätelyyn (Ono ja muut 2007). Notch2:ta tutkittiin vasta-aineella, joka tunnisti membraanilla olevan N2ICD:n, joka on kooltaan noin 110 kD, kun taas täyspitkä Notch2 on kooltaan noin 300 kD. Näiden lisäksi solujen erilaistumista tarkasteltiin eri erilaistumismarkkerien kautta. Nämä olivat desmiini, joka on aikaisin kehityksessä ilmenevä verkostoa muodostava noin 53 kD:n filamentti, myogeniini, joka on lihaksen muodostumiselle tärkeä noin 34 kD:n säätelijä ja Troponiini T, joka on noin 31 kD:n kokoinen osa Troponiinia, joka osallistuu aktiinin ja myosiinin väliseen vuorovaikutukseen. Soluista tutkittiin myös Western blotin latauskontrollina noin 73 kD:n kokoinen HSC70. Sen taso pysyy soluissa vakiona erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana ja siis heijastaa solun kokonaisproteiinimäärää, jolloin muutokset muiden proteiinien tasojen kesken voidaan suhteuttaa toisiinsa.

Kaikkien kokeiden näytteet analysoitiin Western blot -menetelmällä. Kokeiden solunäytteet lyysattiin kolminkertaisella laemmlilla, joka toimi myös ajopuskurina. Western blot -menetelmässä proteiinit ensin erotellaan SDS-PAGE:ssa, joka oli tässä erikoistyössä aina denaturoiva, jossa proteiinit siis eritellään vain koon eikä laskostumisen ja muodon mukaan. Sitten ne siirrettiin membraanille, jossa ne inkuboitiin tarkasteltavaan proteiiniin sitoutuvalla vasta-aineella. Tämä primäärivasta-aine sitten tunnistettiin toisella sekundaarivasta-aineella, johon oli liitetty piparjuuriperoksidaasi (*engl.* horseradish peroxidase), joka katalysoi lisätyn ECL-reagenssin kemiluminesenssin, joka voitiin havaita filmillä. Saadusta filmistä nähtiin proteiinien tasot suhteessa toisiinsa ja ImageJ-ohjelman geeliansalyysitoiminnolla (*engl.* gel analysis tool) nämä voi kvantitoitiin havainnoinnin helpottamiseksi, vaikka Western blot ei periaatteessa ole kvantitatiivinen menetelmä. ImageJ:llä saadut proteiinien raa'at intensiteetti-arvot normalisoitiin ja Microsoft Excel -laskentataulukko-ohjelman avulla, jolla kuvaajat myös tehtiin. Skannattujen filmien tiff-kuvat muokattiin PNG-kuviksi GIMP-ohjelmistolla.

Excelillä etsittiin toiston sisällä alin latauskontrolli (joka ei ollut 0), jolla sitten kaikki latauskontrollien arvot jaettiin, jolloin saatiin korjauskerroin. Saadulla korjauskertoimella jaettiin itse tutkittavien proteiinien intensiteettien arvot, jolloin saatiin korjatut, näytemäärään suhteutetut intensiteetit, joita pystyttiin vertaamaan keskenään saman toiston sisällä.

Toiston sisäisten normalisointien jälkeen tehtiin SUM-normalisointi, jotta toistoja voitiin vertailla keskenään. Edelleen Exceliä käyttäen, laskettiin ensin saman toiston kaikki korjatun intensiteetin arvopisteet yhteen summaksi. Tämän jälkeen suoritettiin summaan suhteutus, eli jokainen toiston arvopiste jaettiin saman toiston arvopisteiden summalla, jolloin saatiin arvopisteiden suhteellinen arvo.

Sitten päätettiin mihin kaikkien toistojen arvopisteitä tullaan vertaamaan, yleensä valittiin kokeen kontrollinäytettä edustava arvopiste. Tämän näytteen summaan suhteutetuista, 3:n eri toiston arvopisteistä otettiin keskiarvo. Sitten kaikki summaan suhteutetut arvot, jokaisesta toistosta, verrattiin valittuun kontrollikeskiarvoon. Tällöin kaikki pisteet ovat siis suhteellinen muutos kontrollin keskiarvoon.

Jokaiselle kontrolliin suhteutetulle aikapisteelle otettiin keskiarvo (kontrollin keskiarvo tällöin pysyen 1:nä) ja keskihajonta. Toistojen määrän paremmin huomioon ottamiseksi keskihajonnasta otettiin vielä keskiarvon keskivirhe (*engl.* standard error of mean, SEM).

Excelissä tehtiin kaikille tutkituille proteiineille pylväskaaviot, joissa arvopisteinä ovat normalisoitujen toistojen keskiarvot ja virhepalkkeina arvopisteiden SEM. Lopuksi tulosten tarkastelussa eri proteiinien arvot laitettiin samaan kuvaajaan, jotta näiden tasojen muutoksia voidaan paremmin verrata keskenään. Näiden arvot alkavat 1:stä, mutta tämä johtuu vain siitä, että esimerkiksi 0 t on asetettu kontrolliksi, jolloin ensimmäistä aikapistettä ei siis voida vertailla, vaan tasojen muuttumista kontrollista. Osassa joidenkin proteiinien tasojen muutos oli moninkertainen toisiin verrattuina ja nämä jaettiin pienemmiksi, jotta käyrien muodot säilyisivät.

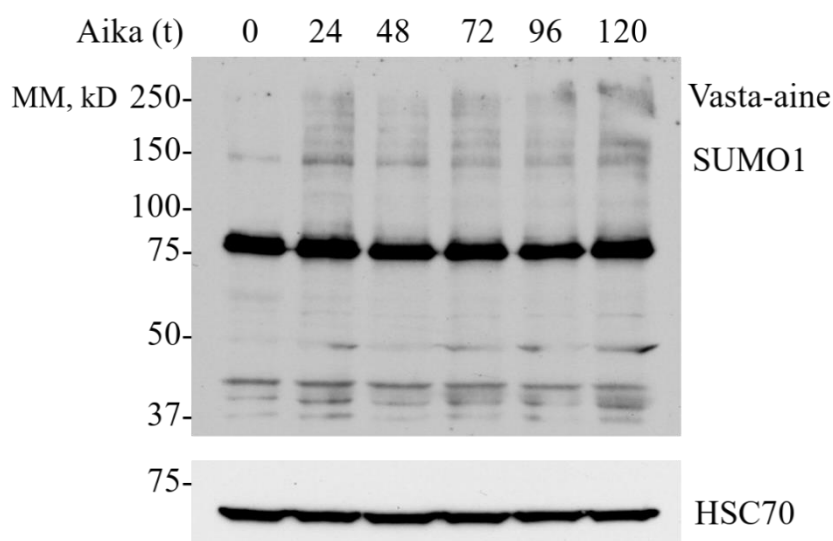
### 3.1 C2C12-solujen erilaistuminen

C2C12-solut kasvatettiin 10 cm:n maljoilla kasvatusliuoksessa ensin noin 50–60 %:n konfluenssiin, jotta ne olisivat tarpeeksi tiheässä erilaistumista varten, mutta eivät olleet kasvaneet vielä niin tiheästi että erilaistuminen olisi jo alkanut. Kasvatusliuos vaihdettiin sitten erilaistumisliuokseen, jonka alhainen seerumipitoisuus indusoi solujen erilaistumista. Näytteet kerättiin 0 t (ennen kasvatusliuoksen vaihtoa) ja sitten 24 tunnin välein solujen erilaistuessa, jotta saatiin näytteitä erilaistumisen eri vaiheissa. Näytteet lyysattiin kolminkertaisella laemmilla ja proteiinien ilmentymistä tarkasteltiin Western blot -menetelmällä, kuten edellä kerrottiin. Erilaistumisen näytteistä tutkittiin solun yleisen sumolaation, Notch2:n, desmiinin, myogeniinin ja Troponiini T:n tasot.

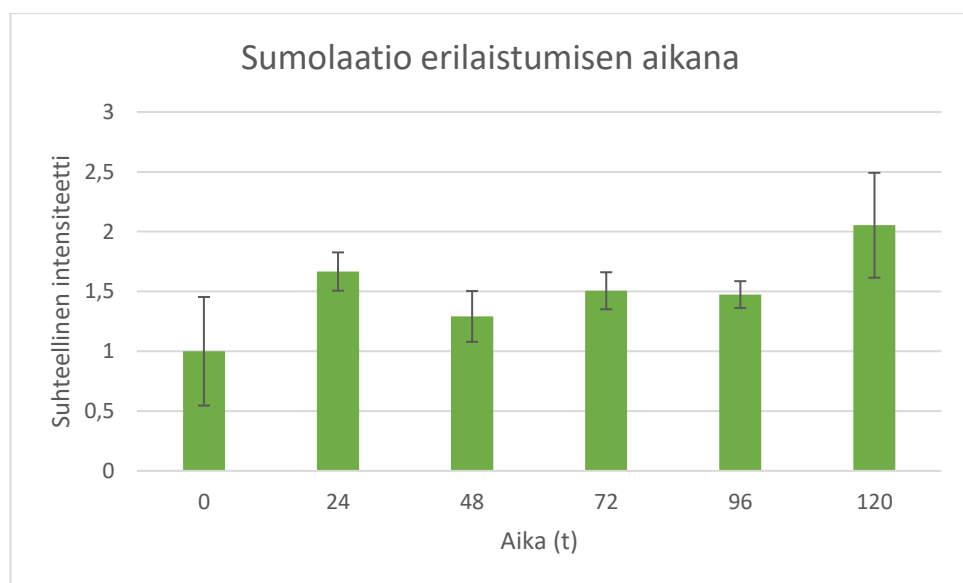
3.1.1 Sumolaatiotaso nousee solujen erilaistumisen alussa, laskee 48 tunnin kohdalla ja nousee uudelleen

Erilaistuvista C2C12-soluista tutkittiin solun yleisen sumolaation tasoja, jotta nähtäisiin kuinka solun yleinen sumolaatio, jonka tiedetään olevan tärkeä lihassolujen erilaistumiselle (Riquelme ja muut 2006), muuttuu soluissa erilaistumisen aikana. Sumolaatio määritettiin näytteistä Western blot -menetelmällä SUMO1:n tunnistavalla vasta-aineella. Sumolaation tarkasteluun käytetään noin 75 kD:n kohdalla olevan tumman juovan yläpuolella olevaa huntua, jonka intensiteetin kasvaessa sumolaatio kasvaa (kuva 6.). Tätä aluetta käytettiin kvantitointiin ImageJ-ohjelmalla (kuvaaja 1.). Filmikuvat kvantitoitiin ja normalisoitiin toistojen kesken SUM-menetelmällä ja näytteiden kontrolliksi, johon muiden tasojen muutosta siis verrataan, valittiin 0 tunnin näyte, eli siis kontrollisolut, joita ei indusoitu erilaistumaan. Kuvaajan vihrepalkit ovat SEM.

Solujen kokonaissumolaation nähdään nousevan heti ensimmäisten 24 tunnin kohdalla, jonka jälkeen se laskee 48 tunnin kohdalla, mutta näyttäisi pysyvän edelleen 0 tuntia korkeammalla. Sitten sumolaatiotaso nousee hieman 72 ja 96 tuntien kohdalla, mutta ei kuitenkaan 24 tunnin tasolle, jonka jälkeen 120 tunnin kohdalla sumolaatiotaso nousee enemmän. Toistojen välillä eniten vaihtelua esiintyi ensimmäisessä ja viimeisessä aikapisteessä, vähiten vaihtelua oli 96 tunnin aikapisteessä. Muutokset sumolaatioissa eivät ole suuria, mutta ne noudattavat kaikissa toistoissa samaa kaavaa. Lisäksi myöhemmissä kokeissa, joissa solut transfektoitiin SUMO1His-plasmidilla, havaittiin sama kaava, mutta suuremmilla eroilla. Sumolaation tutkiminen ilman transfektiota ei siis välttämättä anna selkeitä huomattavan muutoksen tuloksia.



**Kuva 6.** Solun kokonaissumolaation tasojen muutokset C2C12-solujen erilaistumisen aikana. Ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja pidettiin erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa tunteina, 0 t on kontrolli, eli sen soluja ei indusoitu erilaistumaan. Vasemmassa laidassa näkyy proteiinikokostandardissa molekyyli­massa ilmoitettuna kD:nä. Sumolaation tarkasteluun käytetään noin 75 kD:n paksun juovan yläpuolella olevaa huntua. Alempana näkyy käytetty latauskontrolli HSC70 hieman 75 kD:n alapuolella. Sumolaation nähdään nousevan heti 24 tunnin aikana, jonka jälkeen tasot hieman laskevat, viimeisessä aikapisteessä 120 tunnin kohdalla sumolaatio lähtee taas selvästi nousuun.

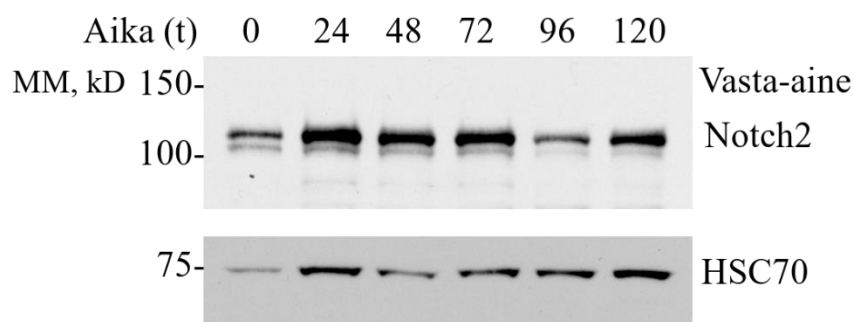


**Kuvaaja 1.** Solun kokonaissumolaation tasojen muutokset C2C12-solujen erilaistumisen aikana. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit SEM. 0 tunnin keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu näytteiden välillä on ensimmäisessä ja viimeisessä aikapisteessä. Sumolaation nähdään nousevan 24 tunnin aikana, sitten vähän laskevan ja jälleen selkeästi nousevan 120 tunnin kohdalla.

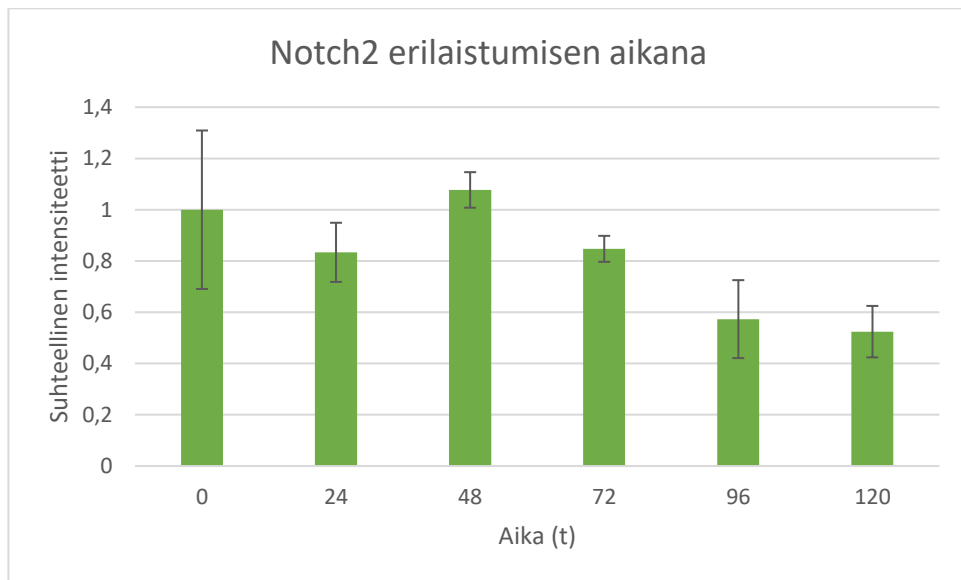
### 3.1.2 Notch2: tasot muuttuvat päinvastaisesti sumolaation tasoon verrattuna solujen erilaistumisessa

Erilaistuvista C2C12-soluista tutkittiin myös Notch2:n tasot, sillä sen tiedetään liittyvän lihassolujen erilaistumiseen (Ono ja muut 2007) ja haluttiin nähdä muuttuvatko tasot suhteessa solujen SUMO1-sumolaatioon. Kuten sumolaatioissa, Notch2:n tasoja tutkittiin Western blot -menetelmällä, tässä käyttäen Notch2:n membraanilla olevan NICD:n tunnistavaa vasta-ainetta.

Kuvassa 7. näkyy Notch2:n filmikuva, jossa Notch2 on nimensä kohdalla, hieman 100 kD:n yläpuolella, joka vastaa Notch2:n molekyyliainetta 110 kD. Pylväskuvaaja (kuvaaja 2.) on tehty kuten edellä, myös tässä kontrollina käytettiin 0 tunnin keskiarvoa, joka on siis asetettu 1 arvoksi ja muut on suhteutettu siihen, jolloin nähdään tasojen muutos alkutilanteesta ennen erilaistumista. Notch2:n tasot voivat laskea 24 tunnin kohdalla, jolloin sumolaatio oli nousussa ja Notch2:n tasot nousevat 48 tunnin kohdalla, jolloin sumolaatio taas oli laskussa. Tämän jälkeen Notch2:n tasot laskevat lisää, kun taas sumolaatio lähti nousuun. Toistojen välillä oli eniten eroa 0 tunnin kohdalla ja vähiten 72 tunnin kohdalla.



**Kuva 7.** Notch2:n tasojen muutokset C2C12-solujen erilaistumisen aikana. Ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja pidettiin erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa tunteina, 0 t on kontrolli, eli sen soluja ei indusoitu erilaistumaan. Vasemmassa laidassa näkyy proteiinikokostandardilla molekyyliainetta ilmoitettuna kD:nä. Notch2:n juovat ovat nimensä kohdalla hieman 100 kD:tä ylempänä ja latauskontrolli HSC70 alemmassa filmikuvassa hieman 75 kD:n alapuolella. Tasot nousevat 48 tunnin kohdalla ja sitten laskevat.

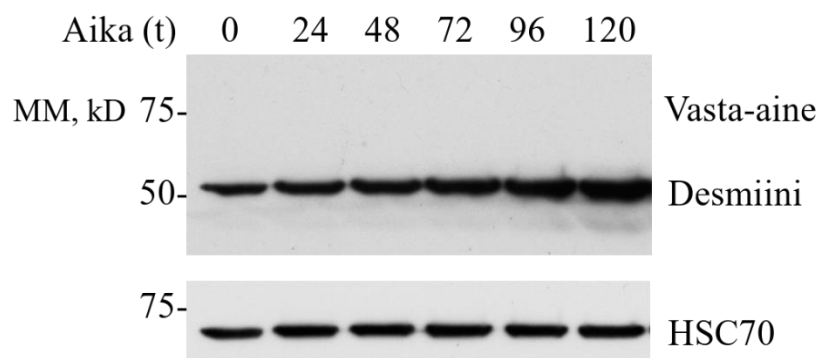


**Kuvaaja 2.** Notch2:n tasot erilaistumisen aikana. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit SEM. 0 tunnin keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Toistojen välillä oli eniten eroja ensimmäisessä aikapisteessä ja vähiten 72 tunnin kohdalla. Notch2:n taso nousee 48 tunnin kohdalla, jonka jälkeen se laskee.

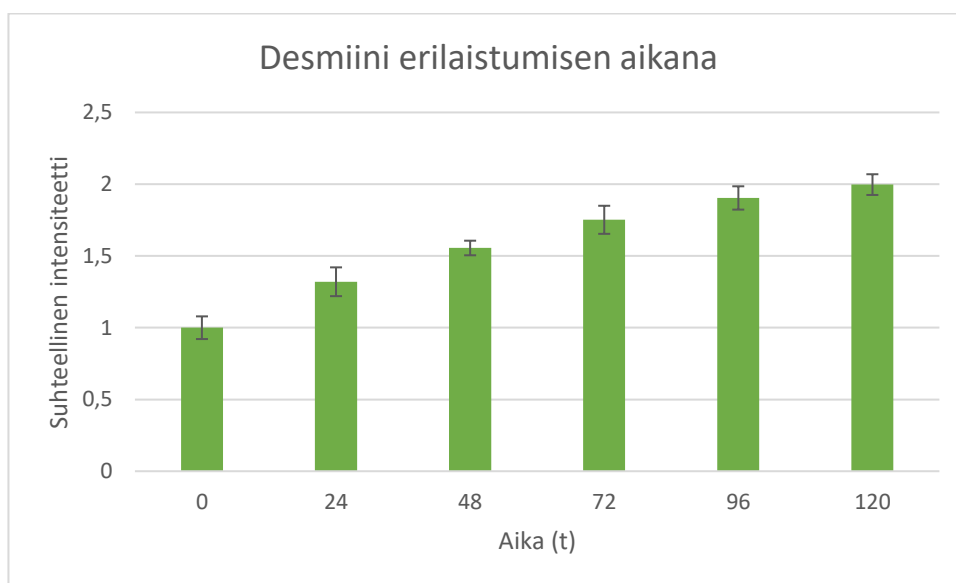
### 3.1.3 Desmiinin tasot nousevat erilaistumisen yhteydessä melko tasaisesti

Jotta C2C12-solujen erilaistumisen etenemistä voitaisiin seurata proteiinitasolla, tutkittiin näytteistä myös desmiinin tasoa. Desmiini on lihassoluissa esiintyvä proteiini, joka liittyy muun muassa sarkomeerien järjestelyyn ja jota siten käytetään yleisesti lihassolujen erilaistumismarkkerina. Kuten edellä desmiinin tasoa tutkittiin Western blot -menetelmällä, filmikuvat käsiteltiin GIMP-ohjelmistolla ja kvantitointi tehtiin ImageJ:llä.

Kuvassa 8. desmiini näkyy nimensä kohdalla hieman 50 kD:ta ylempänä, mikä täsmää desmiinin molekyylipainoon 53 kD ja latauskontrolli HSC70 hieman 75 kD:n alla alemmassa kuvassa. Kvantitointi ja normalisointi tehtiin kuten edellä siten, että 0 tunnin keskiarvoon verrattiin muita (kuvaaja 3.). Soluissa havaittiin desmiiniä jo ennen erilaistumista ja taso nousi melko tasaisesti erilaistumisen aikana. Eniten vaihtelua oli 24 tunnin kohdalla ja vähiten 48 tunnin kohdalla.



**Kuva 8.** Desmiinin tasojen muutos C2C12-solujen erilaistumisessa. Ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja pidettiin erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa tunteina, 0 t on kontrolli, eli sen soluja ei indusoitu erilaistumaan. Vasemmassa laidassa näkyy proteiinikokostandardilla molekyyli­massa ilmoitettuna kD:nä. Desmiini näkyy hieman 50 kD:tä ylempänä ja latauskontrolli HSC70 alemmassa kuvassa hieman 75 kD:n alapuolella. Desmiinin tasot nousevat erilaistumisen aikana melko tasaisesti.

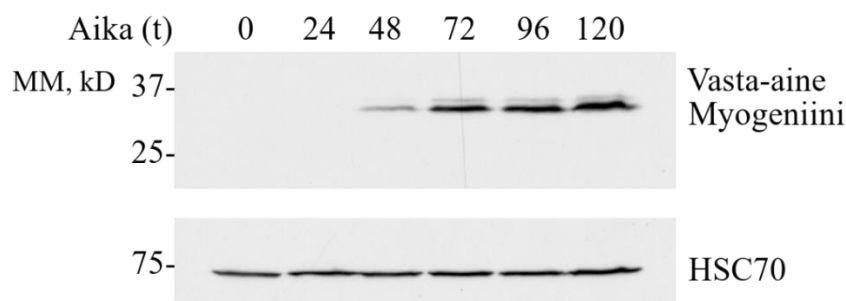


**Kuvaaja 3.** Desmiinin tasot erilaistumisen aikana. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit SEM. 0 tunnin keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Eniten vaihtelua toistojen välillä oli 24 tunnin kohdalla ja vähiten 48 tunnin kohdalla. Desmiinin tasot nousevat melko tasaisesti erilaistumisen aikana.

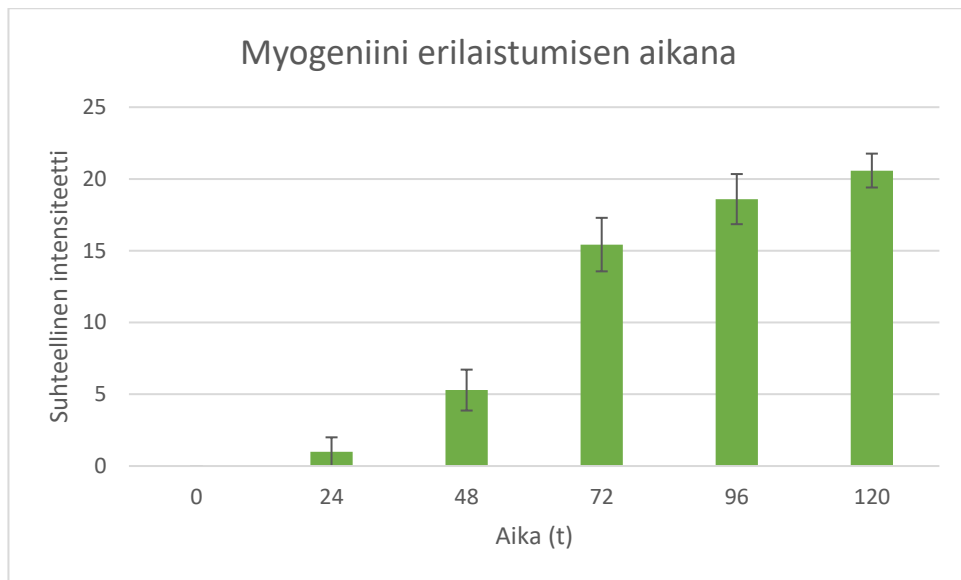
### 3.1.4 Myogeeniini ilmentyy soluissa sumolaatiopiikin ja Notch2:n tasojen nousun jälkeen solujen erilaistumisen aikana

C2C12-solujen erilaistumista seurattiin proteiinitasolla myös tutkimalla myogeeniinin tasoja. Myogeeniini on lihasspesifinen transkriptiofaktori, jota myös käytetään usein lihassolujen erilaistumismarkkerina. Kuten edellä myogeeniini analysoitiin näytteistä Western blot -menetelmällä, jonka filmikuvat analysoitiin ImageJ:llä ja käsiteltiin GIMP-ohjelmistolla.

Kuvassa 9. myogeeniini näkyy nimensä kohdalla hieman 37 kD:n alapuolella, mikä täsmää myogeeniinin molekyylipainoon 34 kD. Kvantitointi (kuvaaja 4.) tehtiin kuten edellä, mutta koska myogeeniiniä ei esiintynyt missään toistossa 0 tunnin aikapisteessä, kontrolliksi valittiin 24 tunnin normalisoitujen aikapisteiden keskiarvo. Myogeeniini alkoi ilmetä kahdessa toistossa 48 tunnin kohdalla, mutta kolmannessa toistossa, joka vaikutti olevan hieman edellä muita, se ilmeni heikosti jo 24 tunnin kohdalla. Ilmenemisensä jälkeen myogeeniinin tasot kasvoivat nopeasti monikymmenkertaiseksi. Myogeeniinin ilmentyminen seuraa erilaistumisen alun sumolaatiopiikkiä ja sitä seuraavaa Notch2:n nousua. Suurin vaihtelu toistojen välillä esiintyi 72 tunnin kohdalla ja pienin 24 tunnin kohdalla.



**Kuva 9.** Myogeeniinin tasot C2C12-solujen erilaistumisen aikana. Ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja pidettiin erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa tunteina, 0 t on kontrolli, eli sen soluja ei indusoidu erilaistumaan. Vasemmassa laidassa näkyy proteiiniokostandardilla molekyyli­massa ilmoitettuna kD:nä. Myogeeniini näkyy hieman 37 kD:n alapuolella ja latauskontrolli HSC70 alemmassa kuvassa hieman 75 kD:n alapuolella. Myogeeniini alkaa ilmetä sumolaatiopiikin jälkeen noin 48 tunnin kohdalla, jonka jälkeen sen taso nousee huomattavasti.



**Kuvaaja 4.** Myogeeniinin tasojen nousu C2C12-solujen erilaistumisen aikana. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden erilaistumislouksessa viettämä aika tunteina. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit SEM. 24 tunnin keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli 72 tunnin kohdalla ja pienin 24 tunnin kohdalla. Myogeeniini alkaa ilmetä noin 48 tunnin kohdalla, jonka jälkeen sen taso nousee huomattavasti.

### 3.1.5 Troponiini T:n tasot nousevat myogeeniinin ilmenemisen jälkeen solujen erilaistumisen aikana

Desmiinin ja myogeeniinin lisäksi C2C12-solujen erilaistumista seurattiin tutkimalla Troponiini T:n tasoa Western blot -menetelmällä ja ImageJ:llä kvantitoiden kuten edellä. Troponiini T on lihassoluissa esiintyvä rakenneproteiini, jota käytetään yleisesti lihassolujen erilaistumismarkkerina.

Kuvassa 10. Troponiini T näkyy nimensä kohdalla hieman 37 kD:n alla kahtena juovalla, joista alempi vastaa 31 kD:n Troponiini T:n kirjallisuuden molekyylipainoa. Kvantitointi (kuvaaja 5.) tehtiin myös kuten edellä, mutta tässä kontrolliksi otettiin 24 tunnin normalisoitujen arvojen keskiarvo, johon muita verrattiin. Filmikuvia katsoessa 24 tunnin kohdalla ei näy mitään, mutta kvantitoidessa havaittiin erittäin vähäisiä määriä Troponiini T:tä viimeisessä toistossa. Troponiini T ilmentyy noin päivä myogeeniinin ilmentymisen jälkeen kaikissa toistoissa paitsi kolmannessa, jossa nähdään erittäin heikko juova jo 24 tunnin kohdalla. Tämä on kuitenkin erittäin vähäinen määrä ja huomattava muutos alkaa



*normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit SEM. 24 tunnin keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli 120 tunnin kohdalla, pienin 24 tunnin kohdalla. Troponiini T:n määrä alkaa kasvaa huomattavasti ja nopeasti 48 tunnin jälkeen.*

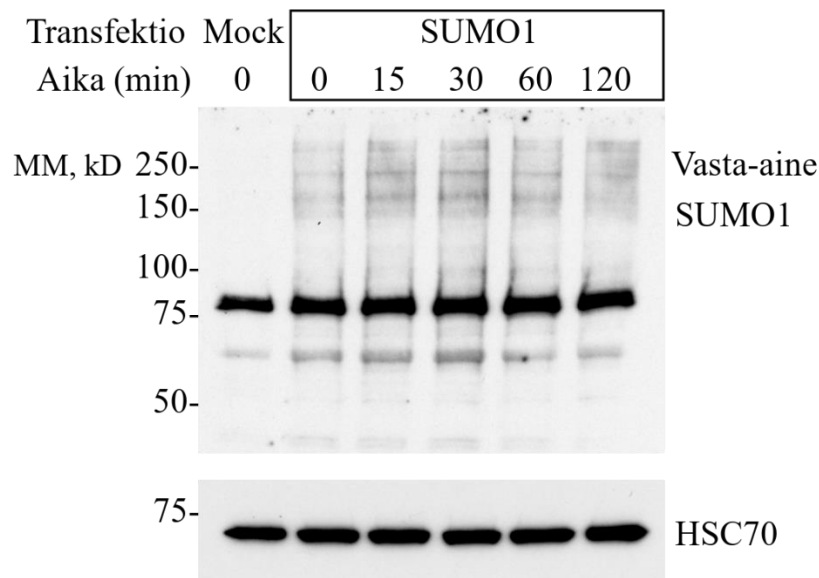
### 3.2 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi

C2C12-solut transfektoitiin ensin SUMO1His-plasmidilla tai tyhjällä Mock-transfektiokontrolliplasmidilla, sillä koetta testatessa havaittiin, että sumolaatio näkyi liian heikosti tarkastelua varten ilman solujen transfektiota. Transfektio suoritettiin GenJet-reagenssilla, jossa haluttu plasmidi inkuboidaan ensin lipidireagenssin kanssa, joka voi siirtää plasmidin soluihin ekspressoitavaksi. Solut jaettiin mekaanisen stressin laitteen kammioihin ja annettiin inkuboida yön yli, jotta ne kiinnittyisivät. Kammiot oli käsitelty fibronektiinilioksella, joka johti kammioiden seinämien päällystykseen fibronektiinillä, johon solut voisivat kiinnittyä. Sitten solut altistettiin lihassolujen luonnollista liikettä jäljittelevälle sykliselle mekaaniselle stressille 10 %:n venytyksellä 1 Hz:llä. Mock-soluja ja 0 min näytettä ei altistettu stressille. Näytteet lyysattiin laemmlilla, joka toimi myös denaturoivan SDS-PAGE:n näytekurina ja sumolaatiota tutkittiin Western blot- menetelmällä, kuten edellä. Näytteistä tutkittiin solun yleisen sumolaation ja Notch2:n tasot, jotta nähtäisiin muuttuvatko niiden tasot mekaanisen stressin aikana, mikä voisi viitata näiden tärkeyteen stressivasteessa. Soluista tutkittiin myös erilaistumiseen liittyvien myogeniinin ja Troponiini T:n tasot, mutta näitä ei havaittu.

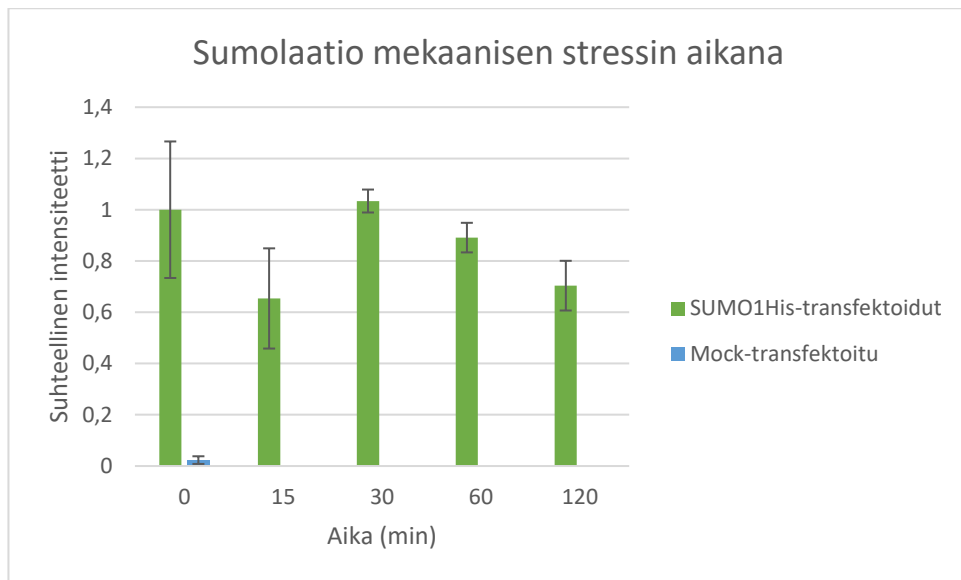
#### 3.2.1 Sumolaatio nousee erilaistumattomissa soluissa mekaanisen stressin alussa ja sitten laskee

C2C12-solut altistettiin mekaaniselle stressille, joka simuloi lihassolujen luontaista venymistä, jotta nähtäisiin reagoivatko erilaistumattomat solut mekaaniseen stressiin sumoloimalla, kuten ne tekevät lämpöshokissa (Antila ja muut 2018) ja milloin sumolaatio on korkeimmillaan. Mekaanisessa stressissä lisäksi fosforylaation tason on havaittu nousevan (Nakai ja muut 2010; Da ja muut 2020) ja fosforylaation taas tiedetään liittyvän sekä sumolaatioon että Notchiin (Antfolk ja muut 2019; Zhao 2018; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007). Solut transfektoitiin, altistettiin mekaaniselle stressille ja analysoitiin kuten edellä. Kvantitoinnin kontrolliksi asetettiin SUMO1-transfektioitujen 0 min, johon muita verrataan. Sumolaatiota tarkastellaan noin 75 kD:n kohdalla olevan tumman juovan yläpuolella olevasta hunnusta. Sumolaatio laskee kahdessa toistossa 15

min aikapisteessä, mutta nousten hieman yhdessä toistossa. Sitten sumolaatio nousee 30 min kohdalla ja laskee uudelleen tunnin jälkeen (kuva 11., kuvaaja 6.). Suurin vaihtelu toistojen välillä oli SUMO1-transfektoitujen solujen 0 min ja pienin Mock-transfektoitu 0 min.



**Kuva 11.** Sumolaation tasot erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä. Ylimpänä kuvassa näkyy millä solut on transfektoitu, laatikossa olevat on transfektoitu SUMO1His-plasmidilla ja ensimmäinen näyte tyhjällä Mock-plasmidilla. Alempana ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja altistettiin mekaaniselle stressille minuutteina. Vasemmassa laidassa näkyy proteiinikostandardilla molekyylimassa ilmoitettuna kD:nä. Sumolaatiota tarkastellaan noin 75 kD: kohdalla olevan tumman juovan yläpuolella olevasta hunnusta ja alemmassa kuvassa on latauskontrolli HSC70 hieman 75 kD:n alla. Sumolaatio laskee 15 min aikapisteessä kahdessa toistossa, tässä toistossa se nousee. Kaikissa toistoissa sumolaatio nousee 30 min kohdalla ja laskee taas tunnin kohdalla.

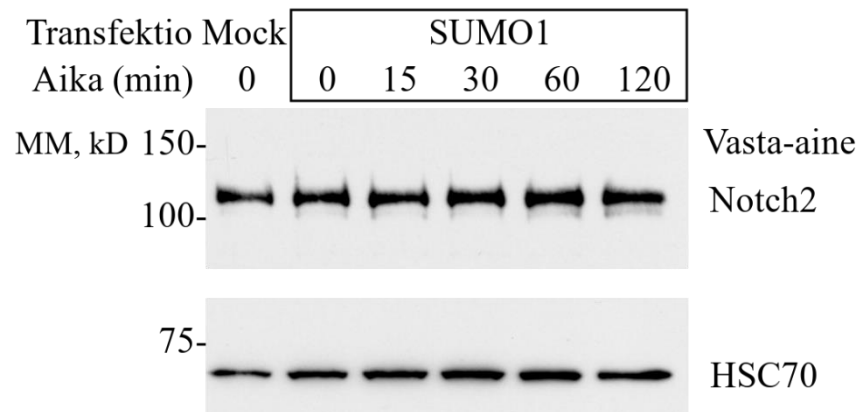


**Kuvaaja 6.** Sumolaatio mekaanisen stressin aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden stressin aika minuutteina. SUMO1:llä transfektoidut ovat vihreällä, Mock-transfektoitu näyte sinisellä. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit SEM. SUMO1His-transfektoidujen solujen 0 min näytteiden keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli SUMO1His-transfektoidujen solujen 0 min ja pienin Mock-transfektoidu 0 min. Sumolaatio nousee 30 min kohdalla ja laskee taas tunnin kohdalla.

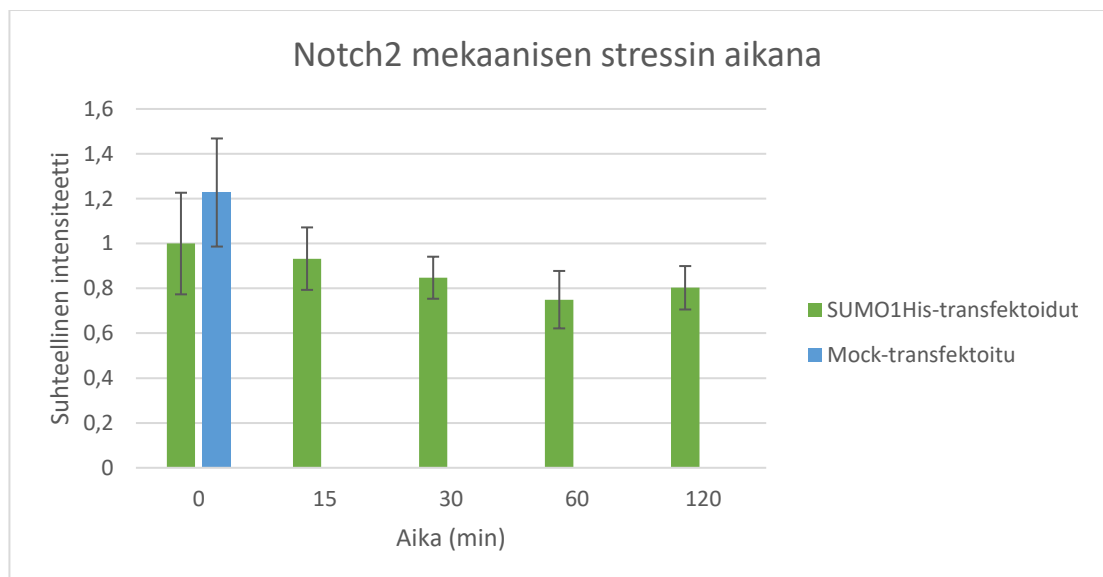
### 3.2.2 Notch2:n tasot pysyvät melko tasaisina erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä

Notchin tiedetään aktivoituvan ihmisen luuytimeistä otetuissa mesenkymaalisissa stroomasoluissa mekaanisessa stressissä (Ziouti ja muut 2019) ja haluttiin selvittää onko sen tasoissa muutoksia myös lihassolujen mekaanisessa stressissä, joiden erilaistumiseen Notch2:n tiedetään liittyvän (Ono ja muut 2007). Haluttiin myös tietää korreloiko sumolaation tason muutokset Notch2:n tason muutoksia. Solut transfektoitiin, altistettiin mekaaniselle stressille ja analysoitiin Western blot -menetelmällä, kuten edellä. Kvantitoinnin kontrolliksi asetettiin SUMO1-transfektoidujen 0 min, johon muita verrataan. Kuvassa 12. näkyy Notch2:n membraaniin kiinnittynyt NICD nimensä kohdalla hieman 100 kD:n yläpuolella, joka vastaa sen molekyyliainoa 110 kD. Notch2:n tasot eivät muutu paljon erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä. Kuvaajassa 7. kvantitointi näyttää hieman tasojen laskua 30–60 min aikana, jolloin solun

kokonaissumolaatio oli nousussa. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli SUMO1-transfektoitujen 0 min ja pienin SUMO1-transfektoitujen 30 min.



**Kuva 12.** Notch2:n tasot erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä. Ylimpänä kuvassa näkyy millä solut on transfektoitu, laatikossa olevat on transfektoitu SUMO1His-plasmidilla ja ensimmäinen näyte tyhjällä Mock-plasmidilla. Alempana ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja altistettiin mekaaniselle stressille minuutteina. Vasemmassa laidassa näkyy proteiinikostandardilla molekyyli­massa ilmoitettuna kD:nä. Notch2:n juovat näkyvät hieman 100 kD:tä ylempänä ja latauskontrolli HSC70 alemmassa kuvassa hieman 75 kD:n alla. Notch2:n tasot ovat melko tasaiset stressin aikana.



**Kuvaaja 7.** Notch2:n tasot mekaanisen stressin aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden stressin aika minuutteina. SUMO1:llä transfektoidut ovat vihreällä, Mock-transfektio näyte sinisellä. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft

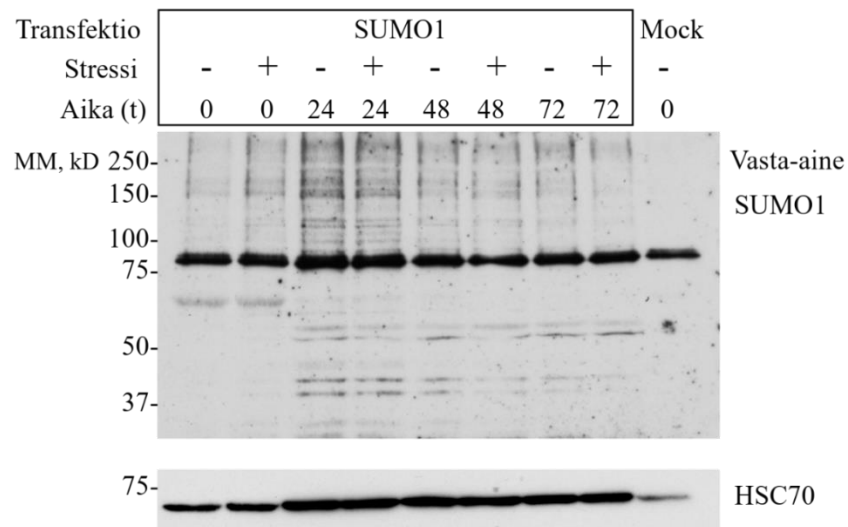
*Exceliä käyttäen. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit SEM. SUMO1His-transfektoitujen solujen 0 min näytteiden keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli SUMO1-transfektoitujen 0 min ja pienin SUMO1-transfektoitujen 30 min. Notch2:n tasot ovat melko tasaiset stressin aikana.*

### 3.3 Erilaistuneiden ja erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi

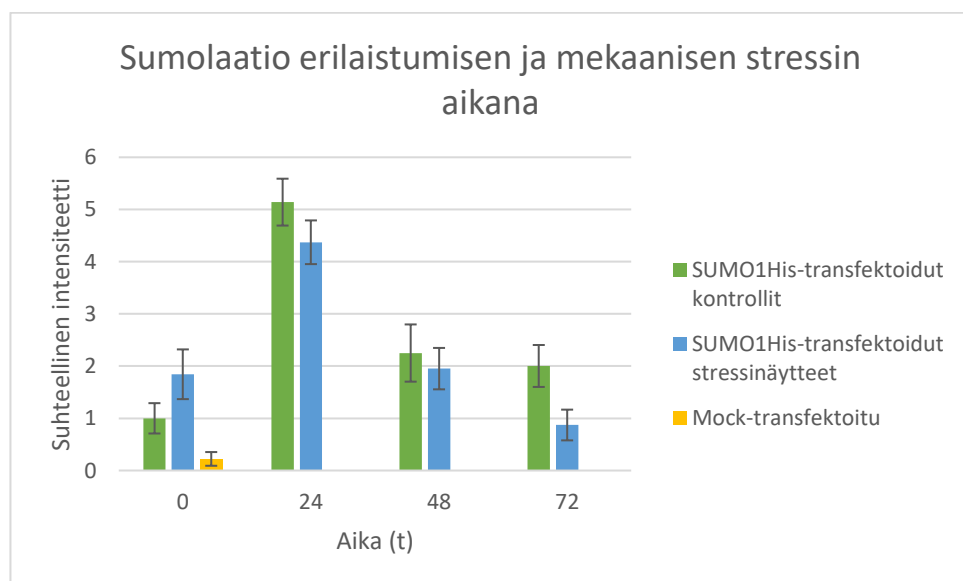
Erilaistumattomien ja erilaistuneiden C2C12-solujen vasteita vertailtiin mekaanisessa stressissä, jotta saatiin selville onko vasteissa eroja solujen erilaistumisasteen mukaan, joka voisi viitata tärkeyteen erilaistumisessa, eikä vain stressivasteena. Solut transfektoitiin SUMO1His-plasmidilla GenJet-reagenssia käyttäen kuten edellä erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä, jotta sumolaatiota voitiin tarkastella paremmin. Solut altistettiin lihasten luonnollista liikettä simuloivalle sykliselle mekaaniselle stressille kuten edellä ja stressin ajaksi valittiin erilaistumattomien solujen tulosten pohjalta 30 min, jolloin sumolaatio oli nousussa. Kuten edellä, solujen erilaistuminen indusoitiin erilaistumisliuksella ja aikapisteet olivat 24 tunnin välein. Jokaiselle aikapisteelle oli sekä mekaaniselle stressille altistettu näyte että kontrollinäyte, jotta stressin vaikutus nähtiin jokaisen erilaistumisen aikapisteen kohdalla. Transfektiokontrollia ei altistettu stressille. Kuten edellä, näytteet analysoitiin Western blot -menetelmällä ja Excelissä tehtiin kuvaajat havainnoinnin helpottamiseksi.

#### 3.3.1 Sumolaatiovaste mekaaniseen stressiin eroaa erilaistuneiden ja erilaistumattomien solujen välillä

Sumolaation tasoja tutkittiin, jotta nähtäisiin onko erilaistumattomien ja erilaistuneiden C2C12-solujen vaste erilainen mekaaniseen stressiin. Kuten erilaistumattomien mekaanisessa stressissä myös tässä nähdään sumolaation nousu erilaistumattomissa soluissa (kuva 13. ja kuvaaja 8., 0 t:n aikapisteet). Solujen erilaistuminen indusoitiin erilaistumisliuksella, jonka jälkeen sumolaatiotasot nousevat selvästi, kuten erilaistumisen aikana aiemmassakin kokeessa nähtiin. Sumolaatiovaste mekaaniseen stressiin taas eroaa erilaistumisen eri vaiheissa. 24 tunnin näytteissä sekä varsinkin 72 tunnin näytteissä sumolaatio muuttuu päinvastaisesti stressin aikana erilaistumattomiin soluihin verrattuna, jolloin erilaistumisen aloittaneissa soluissa sumolaation taso laskee mekaanisessa stressissä. 48 tunnin näytteissä sumolaatiossa ei joko näy juuri eroja tai sumolaatio mahdollisesti nousee stressin aikana kuten erilaistumattomissa soluissa. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli 48 tunnin kontrollinäytteessä ja pienin Mock-transfektoidussa.



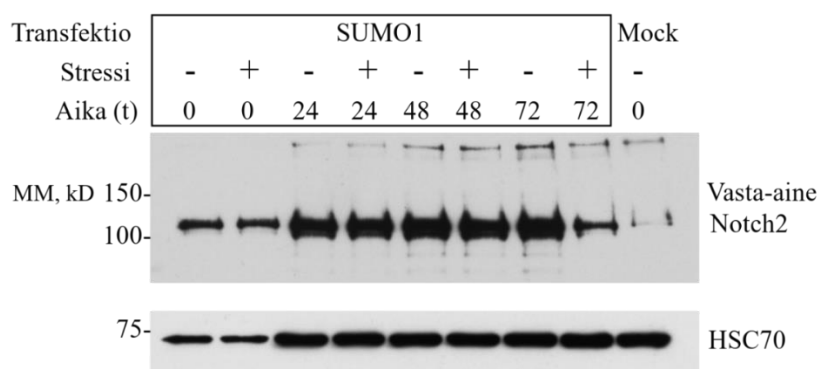
**Kuva 13.** Sumolaation tasot erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen 30 min mekaanisessa stressissä. Ylimpänä kuvassa näkyy millä solut on transfektoitu, laatikossa olevat on transfektoitu SUMO1His-plasmidilla ja viimeinen näyte tyhjällä Mock-plasmidilla. Keskimmäisenä näkyy onko soluja altistettu mekaaniselle stressille 30 min (+) vai ei (-). Alimpana ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja pidettiin erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa tunteina. Vasemmassa laidassa näkyy proteiiniokostandardilla molekyyylimassa ilmoitettuna kD:nä. Sumolaation tasojen muutoksia tarkastellaan noin 75 kD:n kohdalla olevan tumman juovan yläpuolella olevasta hunnusta ja latauskontrolli HSC70 on alemmassa kuvassa hieman 75 kD:n alla. Erilaistumattomissa soluissa mekaanisen stressin nähdään nostavan sumolaatiotasoa, erilaistuneissa soluissa taso taas laskee stressin aikana. 48 tunnin kohdalla tasot pysyvät melko tasaisina.



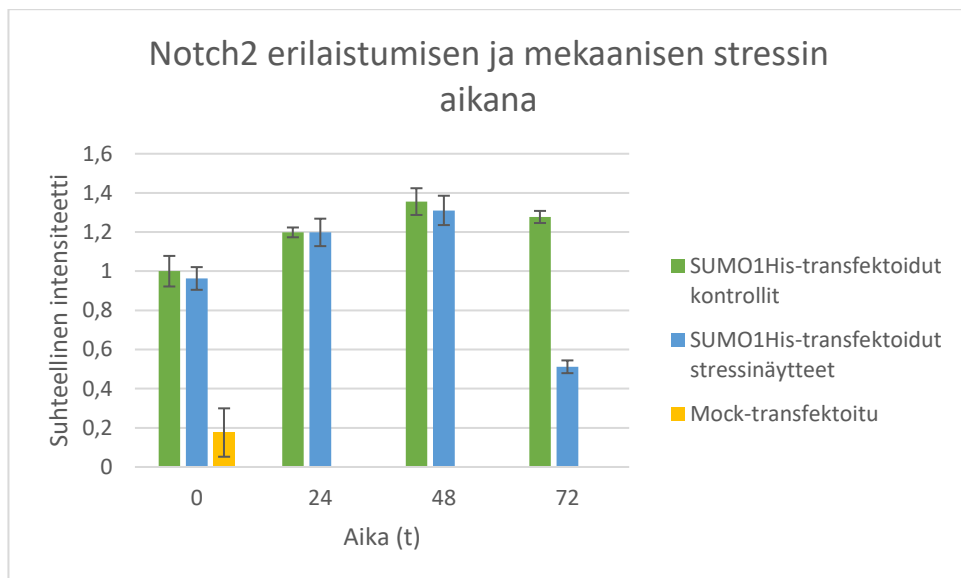
**Kuvaaja 8.** Sumolaatio erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla solujen erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. SUMO1His-transfektoidut kontrollit ovat vihreällä, stressinäytteet sinisellä ja Mock-transfektio näyte keltaisella. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUMO1-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit ovat SEM. SUMO1-transfektioitujen solujen 0 tunnin kontrollinäytteiden keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli 48 tunnin kontrollissa ja pienin Mock-transfektoidussa. Erilaistumattomissa soluissa mekaanisen stressin nähdään nostavan sumolaatiotasoa, erilaistuneissa soluissa taso taas laskee stressin aikana. 48 tunnin kohdalla tasot pysyvät melko tasaisina.

3.3.2 Notch2:n tasot laskevat mekaanisessa stressissä huomattavasti vasta erilaistumisen loppuvaiheilla

Myös Notch2:n tasoa tutkittiin jotta nähtäisiin eroaako niiden säätely erilaistuneiden ja erilaistumattomien solujen välillä (kuva 14., kuvaaja 9.). Tasot korreloivat erilaistumisessa nähtyä kaavaa erilaistumisen alkuvaiheilla, eli ne nousevat 48 tunnin kohdalla ja sitten laskevat. Alkuvaiheissa myös vaste mekaaniseen stressiin korreloi mitä nähtiin erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä, eli tasot laskevat vain hieman, eikä suurta muutosta tapahdu. Mutta 48 tunnin kohdalla saavutetun huipun jälkeen taso laskee erilaistumisen vuoksi, mutta mekaanisessa stressissä tapahtuu huomattava tason lasku. Mekaaninen stressi näyttää siis vaikuttavan erilaistumisen käynnistäneissä soluissa Notch2:n tasoa laskevasti. Viimeisessä kaivossa oleva Mock-transfektio näyte ei näkynyt missään toistossa hyvin. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli Mock-transfektoidussa ja pienin 24 tunnin kontrollissa.



**Kuva 14.** Notch2:n tasot erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen 30 min mekaanisessa stressissä. Ylimpänä kuvassa näkyy millä solut on transfektoitu, laatikossa olevat on transfektoitu SUMO1His-plasmidilla ja ensimmäinen näyte tyhjällä Mock-plasmidilla. Keskimmäisenä näkyy onko soluja altistettu mekaaniselle stressille 30 min (+) vai ei (-). Alimpana ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja pidettiin erilaistumista indusoivassa erilaistumiskasvatusliuoksessa tunteina. Vasemmassa laidassa näkyy proteiinikokostandardilla molekyyli­massa ilmoitettuna kD:nä. Notch2:n juovat näkyvät hieman 100 kD:tä ylempänä erittäin lähellä toisiaan ja latauskontrolli HSC70 on alemmassa kuvassa hieman 75 kD:n alla. Mock-näyte näkyi kaikissa toistoissa huonosti. Tasot näyttävät muuttuvan vain erilaistumisen mukaan 48 tuntiin asti, 72 tunnin kohdalla mekaaninen stressi alentaa Notch2:n tasoja huomattavasti.

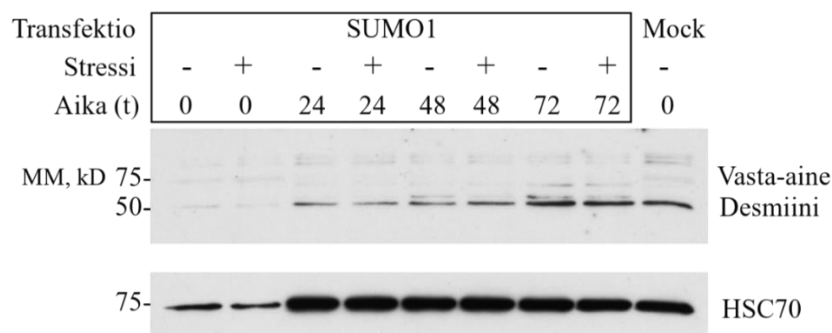


**Kuvaaja 9.** Notch2:n tasot erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla solujen erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. SUMO1His:llä transfektoidut kontrollit ovat vihreällä, stressinäytteet sinisellä ja Mock-transfektoidu näyte keltaisella. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä. Arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit ovat SEM. SUMO1-transfektoidujen solujen 0 tunnin kontrollinäytteiden keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli Mock-transfektoidussa ja pienin 24 tunnin kontrollissa. Notch2:n tasot näyttävät muuttuvan

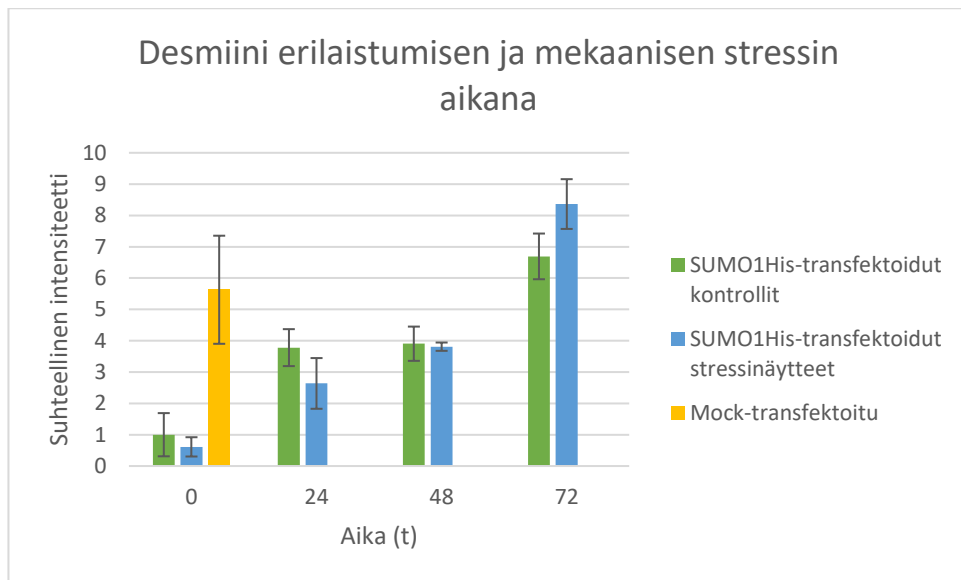
vain erilaistumisen mukaan 48 tuntiin asti, 72 tunnin kohdalla mekaaninen stressi alentaa *Notch2:n* tasoja huomattavasti.

3.3.3 Erilaistumisen alkuvaiheessa olevissa soluissa mekaaninen stressi voi alentaa desmiinin tasoja, loppuvaiheessa stressi taas nostaa tasoja

Erilaistumisen seurantaan näytteistä tutkittiin myös erilaistumismarkkeri desmiinin tasoja (kuva 15., kuvaaja 10.). Desmiinin tasot nousevat erilaistumisen aikana, kuten erilaistumista tutkittaessa. 48 tunnin kohdalla nousu ei välttämättä jatkunut vaan saattoi jopa laskea, mutta 72 tunnin kohdalla tasot ovat selvässä nousussa. Desmiinin tasojen muutos näyttää eroavan solujen erilaistumisasteen mukaan, 48 t aikapisteeseen asti mekaaninen stressi voi hieman laskea desmiinin tasoja, mutta 72 tunnin kohdalla stressi nosti desmiinin tasoja. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli Mock-transfektoidussa ja pienin 48 tunnin stressinäytteessä.



**Kuva 15.** Desmiinin tasot erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen 30 min mekaanisessa stressissä. Ylimpänä kuvassa näkyy millä solut on transfektoitu, laatikossa olevat on transfektoitu SUMO1His-plasmidilla ja ensimmäinen näyte tyhjällä Mock-plasmidilla. Keskimmäisenä näkyy onko soluja altistettu mekaaniselle stressille 30 min (+) vai ei (-). Alimpana ylhäällä näkyvät aikapisteet kertovat kuinka kauan soluja pidettiin erilaistumista indusoivassa erilaistumiskasvatusliuoksessa tunteina. Vasemmassa laidassa näkyy proteiinikokostandardilla molekyyli massa ilmoitettuna kD:nä. Desmiini näkyy hieman 50 kD:tä ylempänä ja latauskontrolli HSC70 alemmassa kuvassa hieman 75 kD:n alapuolella. Desmiinin tasot nousevat erilaistumisen aikana, voivat hieman laskea stressin aikana 48 tunnin aikapisteeseen asti, mutta 72 tunnin kohdalla stressi nosti desmiinin tasoja.



**Kuvaaja 10.** Desmiini erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla solujen erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. SUMO1His:llä transfektoidut kontrollit ovat vihreällä, stressinäytteet sinisellä ja Mock-transfektoitu näyte keltaisella. Kvantitointi tehtiin kaikkien kolmen toistojen pohjalta ImageJ:tä ja Microsoft Exceliä käyttäen. Toistot normalisoitiin toistensa suhteen SUM-menetelmällä, arvopisteet ovat toistojen arvopisteiden keskiarvot ja virhepalkit ovat SEM. SUMO1-transfektoidujen solujen 0 tunnin kontrollinäytteiden keskiarvo asetettiin 1:ksi ja muut suhteutettiin siihen. Suurin vaihtelu toistojen välillä oli Mock-transfektoidussa ja pienin 48 tunnin stressinäytteessä. Desmiinin tasot nousevat erilaistumisen aikana, voivat hieman laskea stressin aikana 48 tunnin aikapisteeseen asti, mutta 72 tunnin kohdalla stressi nosti desmiinin tasoa.

## 4. Tulosten tarkastelu

### 4.1 C2C12-solujen erilaistuminen

Kuvaajaan 11. on koottu edellä olevien erilaistumattomien C2C12-solujen erilaistumisessa tutkittujen proteiinien ilmentymistä kuvaavien pylväskaavioiden arvot käyrinä, jotta eri proteiinien tasojen muutosta on helpompi verrata keskenään. Sumolaation, Notch2:n ja desmiinin arvoja ei ole muutettu, joten siksi niiden 0 tunnin arvopiste on sama. Koska myogeniinin tasojen muutos oli monikymmenkertainen ja Troponiini T:n monisatakertainen, niiden arvot jaettiin pienemmiksi, myogeniini jaettiin

10:llä ja Troponiini T 200:lla, jotta kuvaajassa voitaisiin tarkastella kaikkien käyrien totuudenmukaista muotoa ja siten tasojen nousua ja laskua suhteessa toisiin proteiineihin.

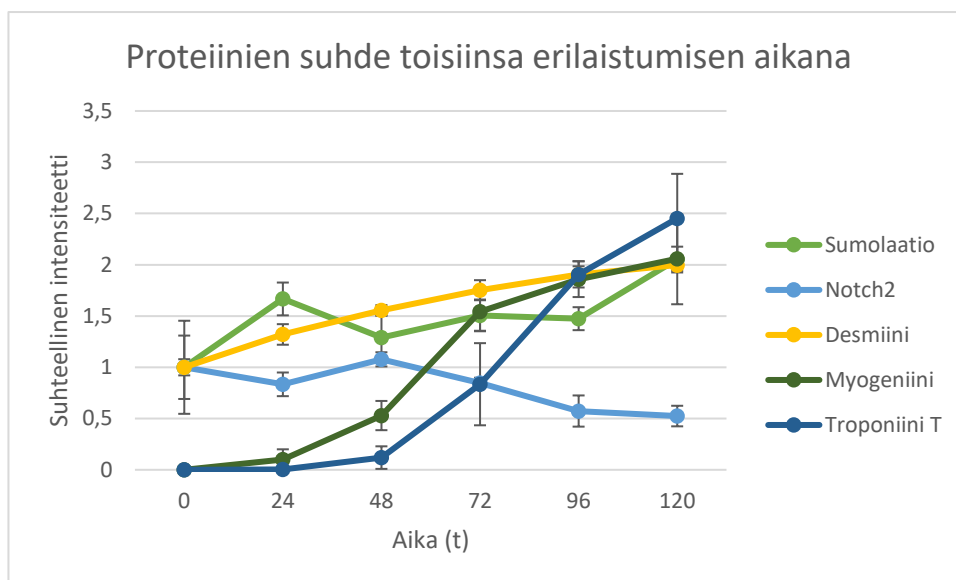
Sumolaation muutos eroaa Riquelmen ja muiden tutkimuksesta (Riquelme ja muut 2006), jossa sumolaatio oli korkealla ennen erilaistumisen indusointia ja ainoastaan väheni erilaistumisen aikana, kun taas erikoistytön kahdessa ensimmäisessä toistossa sumolaatio nousi heti 24 tunnin kohdalla erilaistumisen indusointia, jonka jälkeen se laski, nousten uudelleen lopussa. Kolmas toisto oli näitä edellä korreloi Riquelmen ja muiden tuloksia paremmin. Kolmanteen toistoon soluja oli jaettu jo monta kertaa, ehkä tämä voisi vaikuttaa erilaistumisen aikajanaan? Myös solujen tiheys voi vaikuttaa tuloksiin, erikoistytössä solut pidettiin noin 60 %:n konfluenssissa ennen erilaistumisliuoksen lisäystä, jotta solut eivät aloittaisi erilaistumista tiheästi kasvaessaan, jolloin ne jakaantuivat vielä ainakin kerran täyttäneen maljan, jonka jälkeen erilaistuminen luultavasti lähti kunnolla käyntiin.

Sumolaation taso on soluissa yleisesti melko alhainen ja muutokset eivät ole suuria, jolloin voidaan kyseenalaistaa niiden merkitsevyys, sillä ensimmäisen ja viimeisen aikapisteen virhepalkit ovat samalla alueella. Sumolaation alhaisten muutosten tiedetään olevan osa sen toimintaa (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007) ja toistoissa kuitenkin nähdään aina sama kaava. Lisäksi myöhemmässä kokeessa, jossa solut sekä indusointiin erilaistumaan että altistettiin mekaaniselle stressille, tämä sama muutos nähdään korostetusti transfektoiduilla soluilla.

Notch2:n tasot taas laskevat erilaistumisen edetessä ja tämä tukee tutkimuksia, joiden mukaan Notch2 repressoii C2C12-solujen erilaistumista (Ono ja muut 2007). Notch2:n nousu 48 tunnin kohdalla ei ole niin selkeä, ehkä solut eivät olleet vielä valmiita aloittamaan erilaistumista ja Notch2 repressoii erilaistumista, jotta solut ehtivät kasvaa tai järjestyä sopivaan tiheyteen? Sumolaation ja Notch2:n tasot näyttävät muuttuvan päinvastaisesti, kun toinen nousee, toinen laskee, mahdollisesti viitaten Notch2:n säätelyyn sumolaatiolla.

Sumolaatiopiikin ja Notch2:n nousun jälkeen erilaistumismarkkeri myogeniini alkaa ilmetä ja sen jälkeen Troponiini T, jotka osoittavat erilaistumisen käynnistyneen. Myogeniinin taso näyttää alkavan vakiintua loppua kohden, Troponiini T näyttäisi jatkavan vielä nousua. Troponiini T:n ilmeneminen myös korreloi aikapistettä, jolloin solut alkoivat fuusioitua putkimaisiksi lihassoluiksi. Desmiinin taso nousee jyrkemmän

alun jälkeen melko tasaisesti. 48 tunnin aikapiste näyttää olevan kynnys, jonka jälkeen tasot muuttuvat tasaisesti tiettyyn suuntaan.



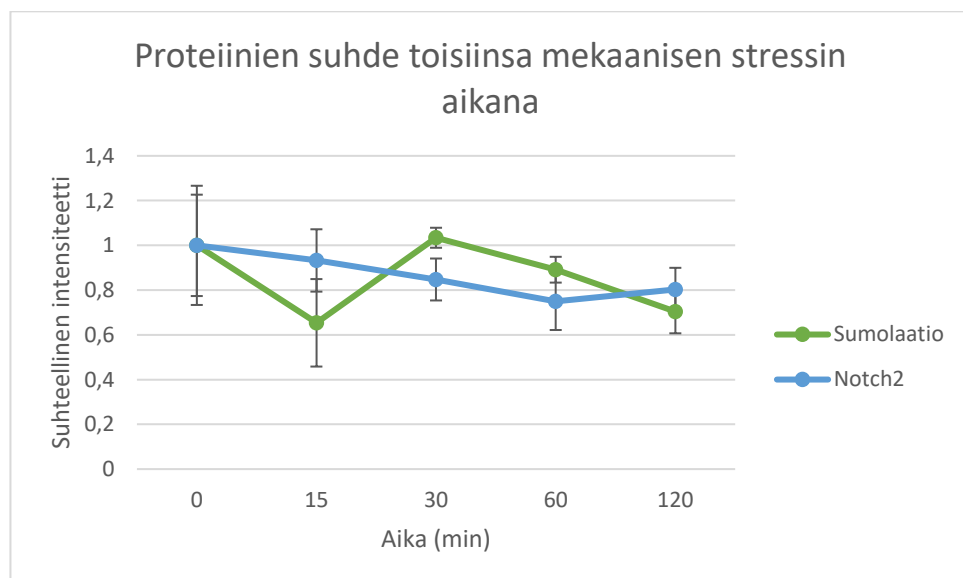
**Kuvaaja 11.** Sumolaation, Notch2:n, desmiinin, myogeeniinin ja Troponiini T:n tasojen muutokset C2C12-solujen erilaistumisen aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina. Eri proteiineja ei ole normalisoitu keskenään, vaan pylväskaavioiden arvot laitettiin vain samaan kuvaajaan ja siksi sumolaatio, Notch2 ja desmiini alkavat kaikki 1:stä. Myogeeniinin ja Troponiini T:n arvot on jaettu käyrien muotojen säilyttämiseksi. Sumolaation ja Notch2:n tasot muuttuvat päinvastaisesti toistensa suhteen, erilaistumismarkkerit myogeeniini ja Troponiini T ilmenevät sumolaatiopiikin jälkeen, desmiinin taso taas nousee melko tasaisesti.

#### 4.2 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi

Kuvaajaan 12. on koottu eri aikapisteiden sykliselle mekaaniselle stressille altistettujen erilaistumattomien C2C12-solujen sumolaation ja Notch2:n tasojen muutokset, jotta niitä on helpompi verrata keskenään. Tasojen muutokset olivat samaa luokkaa, eikä arvoja tarvinnut siis jakaa pienemmäksi. Sumolaation tiedetään jo ennestään nousevan stressivasteena lämpöshokissa (Antila ja muut 2018) ja myös mekaanisessa stressissä sen nähdään nousevan. Muutos on mekaanisessa stressissä kuitenkin samantapainen kuin erilaistumisen alussa nähtiin, jolloin nähdään ensin nousu, jonka jälkeen tasot laskevat. Mekaanisessa stressissä lisäksi fosforylaation tason on havaittu nousevan (Nakai ja muut 2010; Da ja muut 2020) ja fosforylaatio taas liittyy monin tavoin sekä sumolaatioon että Notchiin (Antfolk ja muut 2019; Zhao 2018; Geiss-Friedlander ja Melchior 2007). Ehkä nämä kaksi post-translacionaalista muokkausta liittyvät myös yhteen?

Sumolaatio nousi 30–60 min kohdalla, jolloin kvantitoinnissa nähdään hieman laskua Notch2:n tasoissa, mutta muutos on niin vähäinen että varmasti ei voida vetää johtopäätöksiä, kuitenkin tämä on jälleen samankaltainen kaava kuin erilaistumisessa nähtiin. Lisäksi Mock-näytteeseen verrattuna SUMO1His-plasmidilla transfektoitujen näytteiden Notch2:n taso oli alhaisempi, ehkä myös keinotekoinen sumolaation tason nousu alensi Notch2:n tasoja. Stressi ei ainakaan aiheuttanut huomattavaa Notch2:n hajotusta, mutta lyhyt stressi ei luultavasti riitä aikaa vieviin proteiinitason muutoksiin.

Mekaanisen stressin näytteistä analysoitiin myös myogeniini ja Troponiini T, mutta näitä ei havaittu, luultavasti jälleen koska proteiinitason muutokset vievät aikaa. Näytteistä olisi voinut tutkia desmiinin tasoja, kuten myöhemmässä eri erilaistumisasteisten solujen mekaanisessa stressissä.



**Kuvaaja 12.** *Proteiinien suhde toisiinsa erilaistumattomien solujen mekaanisen stressin aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoa ja X-akselilla näytteiden stressin aika minuutteina. Eri proteiineja ei ole normalisoitu keskenään, vaan pylväskaavioiden arvot laitettiin vain samaan kuvaajaan ja siksi sumolaatio ja Notch2 alkavat molemmat 1:stä. Notch2 on laskussa sumolaatiopiikin aikana ja nousee sumolaation laskettua.*

#### 4.3 Erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaaninen stressi

Kuvaajaan 13. on koottu erilaistumisen eri aikapisteissä olevien solujen mekaanisen stressin sumolaation, Notch2:n ja desmiinin tasojen muutokset, jotta niitä on helpompi verrata keskenään. Notch2:n arvot kerrottiin 2.5, jotta käyrä säilyttäisi muotonsa. SUMO1His-transfektion ansiosta erilaistumisen sumolaatiotasojen muutos näkyy

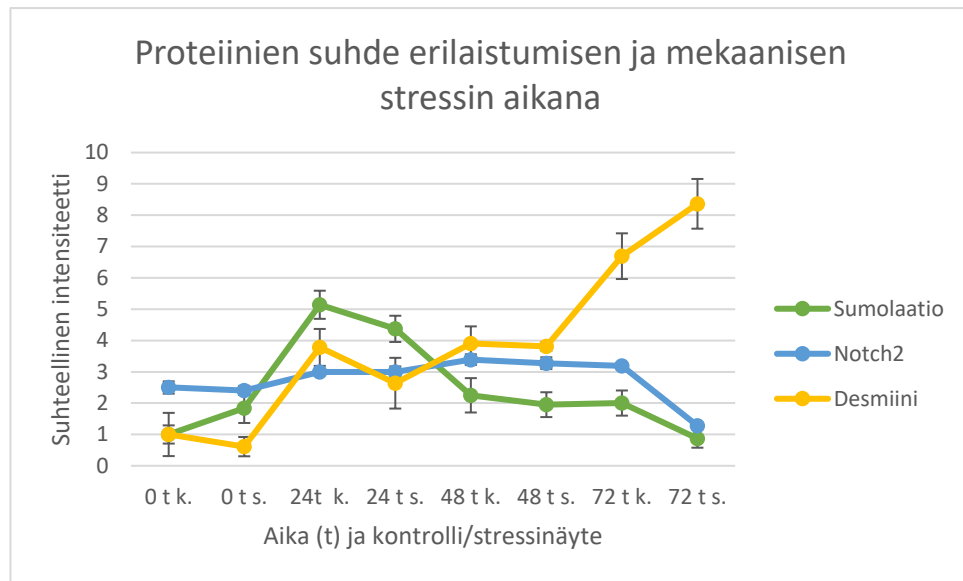
korostettuna ja se seuraa samaa kaavaa nousten selkeästi 24 tunnin kohdalla, jonka jälkeen se taas laskee. Tässä kokeessa havaittiin solujen näyttävän erilaistuvan ja kasvavan huonommin mekaanisen stressin laitteen kammioissa maljoihin verrattuna. Tätä voisi olla hyvä optimoida lisää testaamalla eri solumääriä kammioissa tai erilaisia fibronektiinipitoisuuksia kammioiden valmistelussa. Lisäksi lyysaukseen käytettävän kolminkertaisen laemmlin määrää voisi mahdollisesti vähentää, jotta näytteet olisivat konsentroituneempia ja Western blot -filmikuvissa voitaisiin nähdä tasojen muutokset paremmin.

Kokonaan erilaistumattomissa 0 tunnin aikapisteissä sumolaatio nousee mekaanisessa stressissä, kuten aiemmin nähtiin. Erilaistuvissa taas vaste eroaa ja sumolaatio laskee stressissä. Notch2:n tasot korreloivat erilaistumisen kaavaa nousten 48 tunnin kohdalla ja sitten laskien. Mekaanisessa stressissä sen tasot laskevat hieman erilaistumisen alkuvaiheessa, mutta 72 tunnin stressissä taso laskee huomattavasti. Desmiinin tasot taas saattoivat hieman laskea erilaistumattomissa soluissa, jotka altistettiin stressille, mutta 48 tunnin jälkeen, kun Notch2:n tasojen nousu oli ohi ja Notch2:n tasot myös laskivat stressissä sumolaation kanssa, desmiinin tasot nousivat huomattavasti stressissä. Jälleen 48 tuntia näyttää olevan aikapiste, jonka jälkeen tasojen muutokset vakiintuvat tiettyyn suuntaan, mahdollisesti sitoutuen lopullisesti erilaistuneeseen solulinjaan, jonka vaste mekaaniseen stressiin eroaa.

Muissa kokeissa ja erilaistumisen alussa sumolaation ja Notch2:n tasot ovat muuttuneet vastakkain, mutta 72 tuntia erilaistuneissa soluissa molempien tasot alenivat mekaanisessa stressissä, kun taas desmiinin tasot nousivat jyrkästi. Koska viimeisen kaivon Mock-näytteen Notch2 näkyi kaikissa filmeissä huonosti, pohdittiin onko toisiksi viimeisen kaivon Notch2, joka on siis 72 tunnin stressinäyte, myös huonosti näkyvä teknisestä syystä, mutta samoilta membraaneilta ei ollut ongelmaa latauskontrollin ja sumolaation tutkimisessa, joten tulos on luultavasti oikea.

Kumar ja muut havaitsivat tutkimuksessaan mekaanisen stressin inhiboivan myogeneesiä ja edistävän solujen jakautumista, mutta he myös käyttivät hieman erilaista mekaanista stressiä (Kumar ja muut 2004). Erikoistyössä nähty sumolaation lasku, Notch2:n lasku ja jyrkkä desmiinin nousu viimeisen aikapisteen stressinäytteissä voisivat viitata erilaistumisen tehostettuun etenemiseen, kun jo erilaistumisen aloittaneet solut altistettiin mekaaniselle stressille. Tutkimusta voisi jatkaa lisäämällä stressin jälkeen soluille

toipumisajan, jolloin proteiinitason muutoksia voitaisiin tarkkailla pidemmällä aikavälillä.



**Kuvaaja 13.** *Proteiinien suhde erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana. Y-akselilla on normalisoitu suhteellinen intensiteetti, joka kuvastaa proteiinitasoja ja X-akselilla solujen erilaistumista indusoivassa erilaistumisliuoksessa viettämä aika tunteina ja sen jälkeen joko k. (kontrolli, ei mekaanista stressiä) tai s. (solut altistettu 30 min mekaaniselle stressille). Eri proteiineja ei ole normalisoitu keskenään, vaan pylväskaavioiden arvot laitettiin vain samaan kuvaajaan ja siksi sumolaatio ja desmiini alkavat kaikki 1:stä Notch2:n arvot kerrottiin 2,5, jotta käyrä säilyttäisi muotonsa ja siksi se alkaa 2,5:stä. Pidempään erilaistuneiden solujen vaste mekaaniseen stressiin näyttää eroavan erilaistumattomista ja vähemmän erilaistuneista soluista.*

## 5. Päätelmät

Sumolaation, Notch-signaaloinnin ja mekaanisen stressin tiedetään liittyvän lihassolujen erilaistumiseen (Esteves de Lima ja muut 2016; Ono ja muut 2007; Riquelme ja muut 2006; Kumar ja muut 2004; Nakai ja muut 2010). Notchin on myös havaittu sumoloituvan solustressissä ennenkin (Antila ja muut 2018) ja erikoistyössä haluttiin tietää voisiko sumolaatiolla olla rooli Notch2:n säätelyssä erilaistumisessa ja/tai solujen mekaanisessa stressissä. Työssä tutkittiin sumolaation ja Notch2:n tasojen muutoksia hiiren lihassolujen myoblastien erilaistumisen ja mekaanisen stressin aikana ja etsittiin näiden välistä

yhteyttä, josta voisi olla hyötyä esimerkiksi regeneratiivisessa lääketieteessä lihasrappeumataudin hoidossa.

Lihassolujen erilaistumista tutkittaessa hiiren lihassolujen myoblastit indusoitiin erilaistumaan alentamalla kasvatusliuoksen seerumitasoa, jonka jälkeen soluista tutkittiin sumolaation ja Notch2:n tasot, sekä desmiini, myogeniini ja Troponiini T, jotka ovat yleisesti käytettyjä lihassolujen erilaistumisen proteiineja. Erilaistumattomat solut myös altistettiin mekaaniselle stressille eri ajoiksi, jotta nähtiin solujen sumolaation ja Notch2:n vasteet ja määritettiin aikapiste, jolloin sumolaatio oli korkeimmillaan. Näiden kokeiden pohjalta tehtiin kolmas koe, jossa solut indusoitiin erilaistumaan alhaisen seerumitason kasvatusliuoksella ja erilaistumisen eri aikapisteissä ne altistettiin mekaaniselle stressille. Kokeiden näytteet analysoitiin Western blot -menetelmällä.

Erilaistumisessa sumolaation taso nousi 24 tunnin kohdalla, jonka jälkeen se alkoi laskea, jolloin Notch2:n taso taas nousi. Kun sumolaatio alkoi jälleen nousta erilaistumisen loppuvaiheessa, Notch2:n taso laski. Erilaistumismarkkerit myogeniini ja Troponiini T alkoivat ilmetä Notch2:n nousun jälkeen, kun Notch2 oli laskussa. Desmiinin tasot taas kasvoivat erilaistumisen aikana melko tasaisesti. Erilaistumattomissa soluissa mekaaninen stressi ei juuri vaikuttanut Notch2:n tasoihin, mutta sumolaation taso nousi noin 30 min kohdalla, jonka jälkeen tasot laskivat.

Sumolaation ja Notch2:n tasojen muutokset mekaanisessa stressissä erosivat solujen erilaistumisasteen mukaan. Erilaistumattomissa soluissa sumolaatiotaso nousi vasteena mekaaniseen stressiin, erilaistumisen käynnistyttyä stressi alensi sumolaatiota. Notch2:n, jonka tasoihin mekaaninen stressi ei juuri vaikuttanut erilaistumattomissa soluissa, tasot laskivat huomattavasti erilaistumisen käynnistäneissä soluissa vasteena stressiin. Desmiinin tasot taas saattoivat laskea hieman erilaistumattomien ja erilaistumisen alkuvaiheessa olevien solujen mekaanisessa stressissä, mutta kun Notch2:n tasot laskivat erilaistumisen käynnistäneissä soluissa, myös desmiinin tasot kasvoivat stressissä huomattavasti.

Sumolaatio ja Notch2:n tasot näyttävät muuttuvan päinvastaisesti ja lihassolun vaste mekaaniseen stressiin eroaa sen erilaistumisasteen mukaan. Vasteiden muutos näytti tapahtuvan noin 48 tunnin kohdalla, jonka jälkeen tasot näyttivät nousevan tai laskevan tasaisesti, mutta tätä olisi hyvä tarkastella vielä pidemmällä aikapisteillä. Jotta voitaisiin vetää perustettuja johtopäätöksiä Notch2:n säätelystä sumolaatiolla, Notch2:n sumolaatiota olisi hyvä tutkia seuraavaksi immunosaostuksella ja tämän optimointi

aloitettiin. Voisi olla myös mielenkiintoista selvittää esimerkiksi Notch2:n kohdegeenien ekspression muutosta solustressiin, erilaistumiseen ja sumolaatioon ja lisäksi voisi olla järkevä tutkia eri SUMO:jen sumolaatiota, esimerkiksi SUMO2/3, jotka liittyvät solustressiin (Geiss-Friedlander ja Melchior 2007).

## 6. Lähteet

Acar, M., Jafar-Nejad, H., Takeuchi, H., Rajan, A., Ibrani, D., Rana, N.A., Pan, H., Haltiwanger, R.S. & Bellen, H.J. (2008) Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell* **132**:247-258.

Alkuraya, F.S., Saadi, I., Lund, J.J., Turbe-Doan, A., Morton, C.C. & Maas, R.L. (2006) SUMO1 haploinsufficiency leads to cleft lip and palate. *Science* **313**:1751.

Antfolk, D., Antila, C., Kemppainen, K., Landor, S.K. & Sahlgren, C. (2019) Decoding the PTM-switchboard of Notch. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1866**:118507.

Antila, C.J.M., Rraklli, V., Blomster, H.A., Dahlström, K.M., Salminen, T.A., Holmberg, J., Sistonen, L. & Sahlgren, C. (2018) Sumoylation of Notch1 represses its target gene expression during cell stress. *Cell Death Differ* **25**:600.

Apelqvist, Å, Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Angelis, M.H.D., Lendahl, U. & Edlund, H. (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**:877-881.

Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. & Becker, J. (1998) Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* **280**:275-286.

Beatus, P., Lundkvist, J., Oberg, C. & Lendahl, U. (1999) The Notch 3 intracellular domain represses Notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters. *Development* **126**:3925-3935.

Boelens, M.C., Wu, T.J., Nabet, B.Y., Xu, B., Qiu, Y., Yoon, T., Azzam, D.J., Twyman-Saint Victor, C., Wiemann, B.Z., Ishwaran, H., ter Brugge, P.J., Jonkers, J., Slingerland, J. & Minn, A.J. (2014) Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell* **159**:499-513.

Borggrefe, T., Lauth, M., Zwijsen, A., Huylebroeck, D., Oswald, F. & Giaimo, B.D. (2016) The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGF $\beta$ /BMP and hypoxia pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**:303-313.

Broadus, M.R., Chen, T.W., Neitzel, L.R., Ng, V.H., Jodoin, J.N., Lee, L.A., Salic, A., Robbins, D.J., Capobianco, A.J., Patton, J.G., Huppert, S.S. & Lee, E. (2016) Identification of a paralog-specific Notch1 intracellular domain degron. *Cell Reports* **15**:1920-1929.

Brückner, K., Perez, L., Clausen, H. & Cohen, S. (2000) Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch–Delta interactions. *Nature* **406**:411-415.

Buas, M.F., Kabak, S. & Kadesch, T. (2009) Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J Cell Physiol* **218**:84-93.

Buas, M.F. & Kadesch, T. (2010) Regulation of skeletal myogenesis by Notch. *Exp Cell Res* **316**:3028-3033.

Childress, J.L., Acar, M., Tao, C. & Halder, G. (2006) Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts Notch activation during endocytosis. *Current Biology* **16**:2228-2233.

Chillakuri, C.R., Sheppard, D., Lea, S.M. & Handford, P.A. (2012) Notch receptor-ligand binding and activation: insights from molecular studies. *Semin Cell Dev Biol* **23**:421-428.

Ciria, M., García, N.A., Ontoria-Oviedo, I., González-King, H., Carrero, R., De La Pompa, J.L., Montero, J.A. & Sepúlveda, P. (2017) Mesenchymal stem cell migration and proliferation are mediated by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  upstream of Notch and SUMO pathways. *Stem Cells and Development* **26**:973-985.

Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L. & Rando, T.A. (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**:760-764.

Couturier, L., Mazouni, K. & Schweisguth, F. (2013) Numb localizes at endosomes and controls the endosomal sorting of Notch after asymmetric division in *Drosophila*. *Current Biology* **23**:588-593.

Da, Y., Mou, Y., Wang, M., Yuan, X., Yan, F., Lan, W. & Zhang, F. (2020) Mechanical stress promotes biological functions of C2C12 myoblasts by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* **21**:470.

Daskalaki, A., Shalaby, N.A., Kux, K., Tsoumpekou, G., Tsimbidis, G.D., Muskavitch, M.A.T. & Delidakis, C. (2011) Distinct intracellular motifs of Delta mediate its ubiquitylation and activation by Mindbomb1 and Neuralized. *Journal of Cell Biology* **195**:1017-1031.

Deblandre, G.A., Lai, E.C. & Kintner, C. (2001) *Xenopus* Neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling. *Developmental Cell* **1**:795-806.

Desterro, J.M.P., Thomson, J. & Hay, R.T. (1997) Ubch9 conjugates SUMO but not ubiquitin. *FEBS Letters* **417**:297-300.

Esteves de Lima, J., Bonnin, M., Birchmeier, C. & Duprez, D. (2016) Muscle contraction is required to maintain the pool of muscle progenitors via YAP and NOTCH during fetal myogenesis. *eLife* **5**:e15593.

Fan, X., Mikolaenko, I., Elhassan, I., Ni, X., Wang, Y., Ball, D., Brat, D.J., Perry, A. & Eberhart, C.G. (2004) Notch1 and Notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* **64**:7787-7793.

Foltz, D.R., Santiago, M.C., Berechid, B.E. & Nye, J.S. (2002) Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  modulates Notch signaling and stability. *Current Biology* **12**:1006-1011.

Gallagher, C.M. & Knoblich, J.A. (2006) The conserved C2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in Drosophila. *Developmental Cell* **11**:641-653.

Gareau, J.R. & Lima, C.D. (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**:861-871.

Geiss-Friedlander, R. & Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology* **8**:947-56.

Giraldez, A.J. & Cohen, S.M. (2003) Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development* **130**:6533-6543.

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D. & Hay, R.T. (2003) p300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* **11**:1043-1054.

Grégoire, S. & Yang, X. (2005) Association with class IIa histone deacetylases upregulates the sumoylation of MEF2 transcription factors. *Molecular and Cellular Biology* **25**:2273.

Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israël, A. & Brou, C. (2004) Monoubiquitination and endocytosis direct  $\gamma$ -secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol* **166**:73-83.

Hansson, E.M., Lanner, F., Das, D., Mutvei, A., Marklund, U., Ericson, J., Farnebo, F., Stumm, G., Stenmark, H., Andersson, E.R. & Lendahl, U. (2010) Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction. *Journal of Cell Science* **123**:2931-2942.

Hayashi, T., Gust, K.M., Wyatt, A.W., Goriki, A., Jäger, W., Awrey, S., Li, N., Oo, H.Z., Altamirano-Dimas, M., Buttyan, R., Fazli, L., Matsubara, A. & Black, P.C. (2016) Not all NOTCH is created equal: the oncogenic role of NOTCH2 in bladder cancer and its implications for targeted therapy. *Clin Cancer Res* **22**:2981-2992.

Hendriks, I.A., Lyon, D., Young, C., Jensen, L.J., Vertegaal, A.C.O. & Nielsen, M.L. (2017) Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation. *Nature Structural & Molecular Biology* **24**:325-336.

Henley, J.M., Craig, T.J. & Wilkinson, K.A. (2014) Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. *Physiological Reviews* **94**:1249-1285.

Hickey, C.M., Wilson, N.R. & Hochstrasser, M. (2012) Function and regulation of SUMO proteases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**:755-766.

Hietakangas, V., Ankar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A. & Sistonen, L. (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:45.

Isidor, B., Lindenbaum, P., Pichon, O., Bézieau, S., Dina, C., Jacquemont, S., Martin-Coignard, D., Thauvin-Robinet, C., Merrer, M.L., Mandel, J., David, A., Faivre, L., Cormier-Daire, V., Redon, R. & Caignec, C.L. (2011) Truncating mutations in the last exon of NOTCH2 cause a rare skeletal disorder with osteoporosis. *Nature Genetics* **43**:306-308.

Itoh, M., Kim, C., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y., Maust, D., Yeo, S., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., Weissman, A.M., Lewis, J., Chandrasekharappa, S.C. & Chitnis, A.B. (2003) Mind Bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Developmental Cell* **4**:67-82.

James, A.C., Szot, J.O., Iyer, K., Major, J.A., Pursglove, S.E., Chapman, G. & Dunwoodie, S.L. (2014) Notch4 reveals a novel mechanism regulating Notch signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1843**:1272-1284.

Kaether, C., Schmitt, S., Willem, M. & Haass, C. (2006) Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. *Traffic* **7**:408-415.

Kumar, A., Murphy, R., Robinson, P., Wei, L. & Borie, A.M. (2004) Cyclic mechanical strain inhibits skeletal myogenesis through activation of focal adhesion kinase, Rac-1 GTPase, and NF- $\kappa$ B transcription factor. *The FASEB Journal* **18**:1524-1535.

Lai, E.C., Deblandre, G.A., Kintner, C. & Rubin, G.M. (2001) *Drosophila* Neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of Delta. *Developmental Cell* **1**:783-794.

Li, L., Krantz, I.D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A.B., Collins, C.C., Qi, M., Trask, B.J., Kuo, W.L., Cochran, J., Costa, T., Pierpont, M.E.M., Rand, E.B., Piccoli, D.A., Hood, L. & Spinner, N.B. (1997) Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nature Genetics* **16**:243-251.

Licciardello, M.P., Müllner, M.K., Dürnberger, G., Kerzendorfer, C., Boidol, B., Trefzer, C., Sdelci, S., Berg, T., Penz, T., Schuster, M., Bock, C., Kralovics, R., Superti-furga, G., Colinge, J., Nijman, S.M. & Kubicek, S. (2015) NOTCH1 activation in breast cancer confers sensitivity to inhibition of SUMOylation. *Oncogene* **34**:3780-3790.

Liefke, R., Oswald, F., Alvarado, C., Ferres-Marco, D., Mittler, G., Rodriguez, P., Dominguez, M. & Borggrefe, T. (2010) Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core Notch–RBP-J repressor complex. *Genes Dev* **24**:590-601.

Lin, S., Shen, H., Jin, B., Gu, Y., Chen, Z., Cao, C., Hu, C., Keller, C., Pear, W.S. & Wu, L. (2013) Brief Report: Blockade of Notch signaling in muscle stem cells causes muscular dystrophic phenotype and impaired muscle regeneration. *STEM CELLS* **31**:823-828.

Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F.C., Melchior, F. & Feng, X. (2003) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* **11**:1389-1396.

Lindberg, M.J., Popko-Scibor, A.E., Hansson, M.L. & Wallberg, A.E. (2010) SUMO modification regulates the transcriptional activity of MAML1. *The FASEB Journal* **24**:2396-2404.

Luca, V.C., Jude, K.M., Pierce, N.W., Nachury, M.V., Fischer, S. & Garcia, K.C. (2015) Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4. *Science* **347**:847-853.

Matsuura, A., Ito, M., Sakaidani, Y., Kondo, T., Murakami, K., Furukawa, K., Nadano, D., Matsuda, T. & Okajima, T. (2008) O-linked N-Acetylglucosamine is present on the extracellular domain of Notch receptors. *Journal of Biological Chemistry* **283**:35486-35495.

Mayeuf-Louchart, A., Lagha, M., Danckaert, A., Rocancourt, D., Relaix, F., Vincent, S.D. & Buckingham, M. (2014) Notch regulation of myogenic versus endothelial fates of cells that migrate from the somite to the limb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:8844-8849.

Meier-Stiegen, F., Schwanbeck, R., Bernoth, K., Martini, S., Hieronymus, T., Ruau, D., Zenke, M. & Just, U. (2010) Activated Notch1 target genes during embryonic cell differentiation depend on the cellular context and include lineage determinants and inhibitors. *PloS one* **5**:e11481.

Moloney, D.J., Panin, V.M., Johnston, S.H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K.D., Haltiwanger, R.S. & Vogt, T.F. (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**:369-375.

Moloney, D.J., Shair, L.H., Lu, F.M., Xia, J., Locke, R., Matta, K.L. & Haltiwanger, R.S. (2000) Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *Journal of Biological Chemistry* **275**:9604-9611.

Nakai, N., Kawano, F., Oke, Y., Nomura, S., Ohira, T., Fujita, R. & Ohira, Y. (2010) Mechanical stretch activates signaling events for protein translation initiation and elongation in C2C12 myoblasts. *Mol Cells* **30**:513-8.

Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J.A., Mill, P., Noort, M.V., Hui, C., Clevers, H., Dotto, G.P. & Radtke, F. (2003) Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nature Genetics* **33**:416-421.

Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K.M. & Weinmaster, G. (1999) Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* **126**:1689-1702.

Ntziachristos, P., Tsigos, A., Van Vlierberghe, P., Nedjic, J., Trimarchi, T., Flaherty, M.S., Ferres-Marco, D., da Ros, V., Tang, Z., Siegle, J., Asp, P., Hadler, M., Rigo, I., De Keersmaecker, K., Patel, J., Huynh, T., Utro, F., Poglio, S., Samon, J.B., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J.M., Rabadan, R., Levine, R.L., Brown, S., Pflumio, F., Dominguez, M., Ferrando, A. & Aifantis, I. (2012) Genetic Inactivation of the PRC2 complex in T-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* **18**:298-301.

Okajima, T. & Irvine, K.D. (2002) Regulation of Notch signaling by O-linked fucose. *Cell* **111**:893-904.

Ono, Y., Sensui, H., Okutsu, S. & Nagatomi, R. (2007) Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts. *Journal of Cellular Physiology* **210**:358-369.

Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T.H., Gabbay, K.H. & Bohren, K.M. (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* **337**:517-520.

Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A. & Melchior, F. (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**:109-120.

Poulin, G., Dong, Y., Fraser, A.G., Hopper, N.A. & Ahringer, J. (2005) Chromatin regulation and sumoylation in the inhibition of Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal* **24**:2613-2623.

Preuße, K., Tveriakhina, L., Schuster-Gossler, K., Gaspar, C., Rosa, A.I., Henrique, D., Gossler, A. & Stauber, M. (2015) Context-dependent functional divergence of the Notch ligands DLL1 and DLL4 in vivo. *PLoS genetics* **11**:e1005328.

Psakhye, I. & Jentsch, S. (2012) Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* **151**:807-820.

Riquelme, C., Barthel, K.K.B., Qin, X. & Liu, X. (2006) Ubc9 expression is essential for myotube formation in C2C12. *Exp Cell Res* **312**:2132-2141.

Saitoh, H. & Hinchey, J. (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* **275**:6252-6258.

Sheldon, H., Heikamp, E., Turley, H., Dragovic, R., Thomas, P., Oon, C.E., Leek, R., Edelmann, M., Kessler, B., Sainson, R.C.A., Sargent, I., Li, J. & Harris, A.L. (2010) New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* **116**:2385-2394.

Shi, S. & Stanley, P. (2003) Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5234-5239.

Siebel, C. & Lendahl, U. (2017) Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiological Reviews* **97**:1235-1294.

Simpson, M.A., Irving, M.D., Asilmaz, E., Gray, M.J., Dafou, D., Elmslie, F.V., Mansour, S., Holder, S.E., Brain, C.E., Burton, B.K., Kim, K.H., Pauli, R.M., Aftimos, S., Stewart, H., Kim, C.A., Holder-Espinasse, M., Robertson, S.P., Drake, W.M. & Trembath, R.C. (2011) Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nature Genetics* **43**:303-305.

Sorensen, E.B. & Conner, S.D. (2010)  $\gamma$  secretase-dependent cleavage initiates Notch signaling from the plasma membrane. *Traffic* **11**:1234-1245.

Sprinzak, D., Lakhanpal, A., LeBon, L., Santat, L.A., Fontes, M.E., Anderson, G.A., Garcia-Ojalvo, J. & Elowitz, M.B. (2010) Cis interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signaling states. *Nature* **465**:86-90.

Taal, K., Tuvikene, J., Rullinkov, G., Piirsoo, M., Sepp, M., Neuman, T., Tamme, R. & Timmusk, T. (2019) Neuralized family member NEURL1 is a ubiquitin ligase for the cGMP-specific phosphodiesterase 9A. *Scientific Reports* **9**:7104.

Tagami, S., Okochi, M., Yanagida, K., Ikuta, A., Fukumori, A., Matsumoto, N., Ishizuka-Katsura, Y., Nakayama, T., Itoh, N., Jiang, J., Nishitomi, K., Kamino, K., Morihara, T., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Chiba, S. & Takeda, M. (2008) Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Mol Cell Biol* **28**:165-176.

Takebe, N., Nguyen, D. & Yang, S.X. (2014) Targeting Notch signaling pathway in cancer: Clinical development advances and challenges. *Pharmacol Ther* **141**:140-149.

Vertegaal, A.C.O., Andersen, J.S., Ogg, S.C., Hay, R.T., Mann, M. & Lamond, A.I. (2006) Distinct and overlapping sets of SUMO-1 and SUMO-2 target proteins revealed by quantitative proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **5**:2298-2310.

Vieira, N.M., Elvers, I., Alexander, M.S., Moreira, Y.B., Eran, A., Gomes, J.P., Marshall, J.L., Karlsson, E.K., Verjovski-Almeida, S., Lindblad-Toh, K., Kunkel, L.M. & Zatz, M. (2015) Jagged 1 rescues the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *Cell* **163**:1204-1213.

Wang, J., Qin, H., Liang, J., Zhu, Y., Liang, L., Zheng, M. & Han, H. (2007) The transcriptional repression activity of KyoT2 on the Notch/RBP-J pathway is regulated by PIAS1-catalyzed SUMOylation. *J Mol Biol* **370**:27-38.

Zhao, X. (2018) SUMO-mediated regulation of nuclear functions and signaling processes. *Mol Cell* **71**:409-418.

Zhu, X., Ding, S., Qiu, C., Shi, Y., Song, L., Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Wang, Y., Sun, Y., Qin, L., Chen, J., Simons, M., Min, W. & Yu, L. (2017) SUMOylation negatively regulates angiogenesis by targeting endothelial NOTCH signaling. *Circulation research* **121**:636.

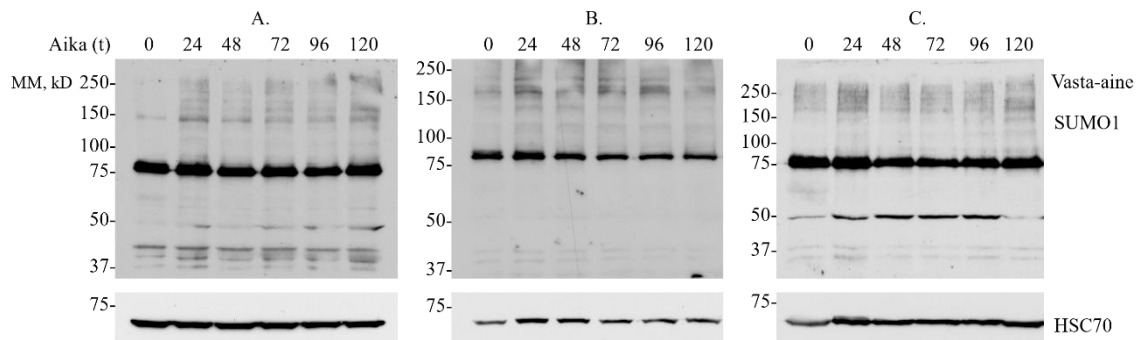
Ziouti, F., Ebert, R., Rummler, M., Krug, M., Müller-Deubert, S., Lüdemann, M., Franz, J., Willie, B.M. & Jundt, F. (2019) NOTCH signaling is activated through mechanical strain in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Stem Cells International* **2019**.

## 7. Liitteet

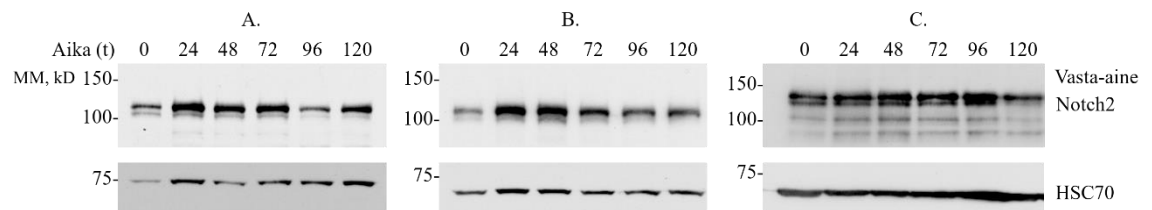
Kaikkien tuloksissa käytettyjen toistojen Western blot -filmikuvat.

### 7.1 Solujen erilaistuminen

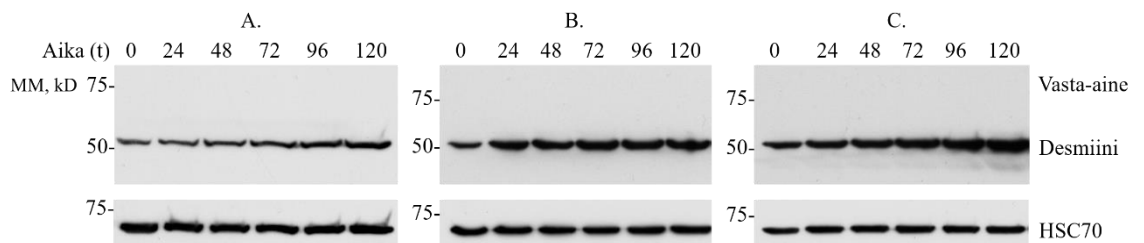
#### 7.1.1 Sumolaatio erilaistumisessa



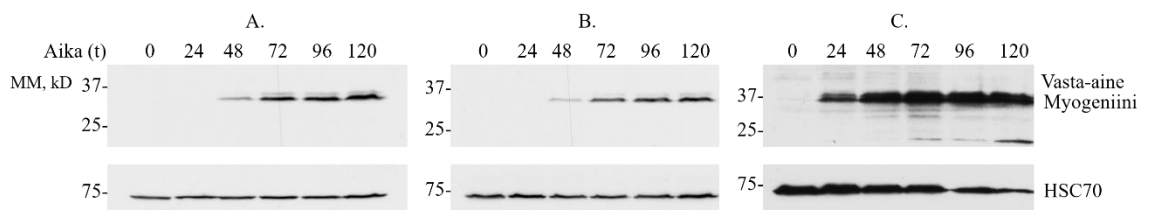
#### 7.1.2 Notch2 erilaistumisessa



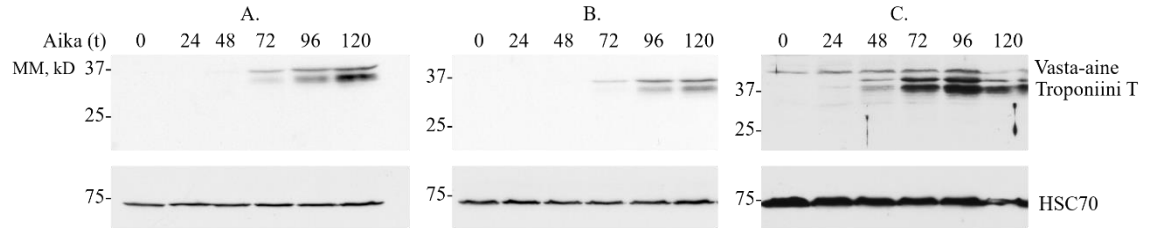
#### 7.1.3 Desmiini erilaistumisessa



#### 7.1.4 Myogeniini erilaistumisessa

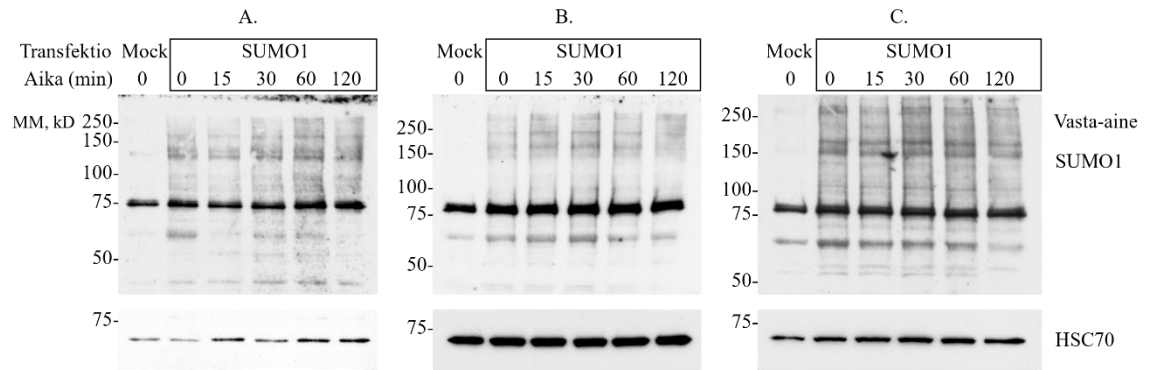


## 7.1.5 Troponiini T erilaistumisessa

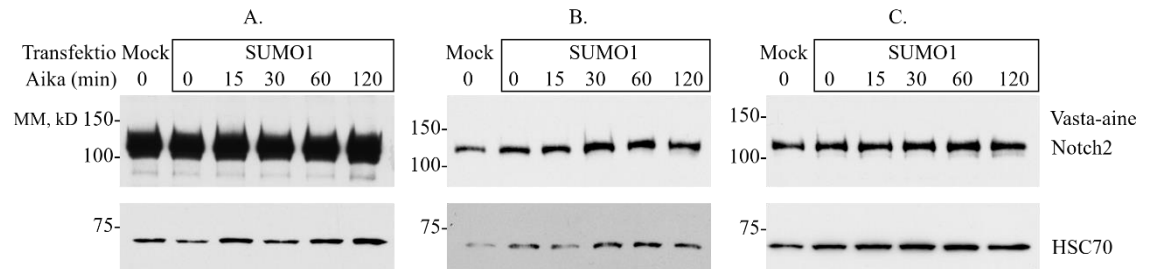


## 7.2 Erilaistumattomien solujen mekaaninen stressi

### 7.2.1 Sumolaatio erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä

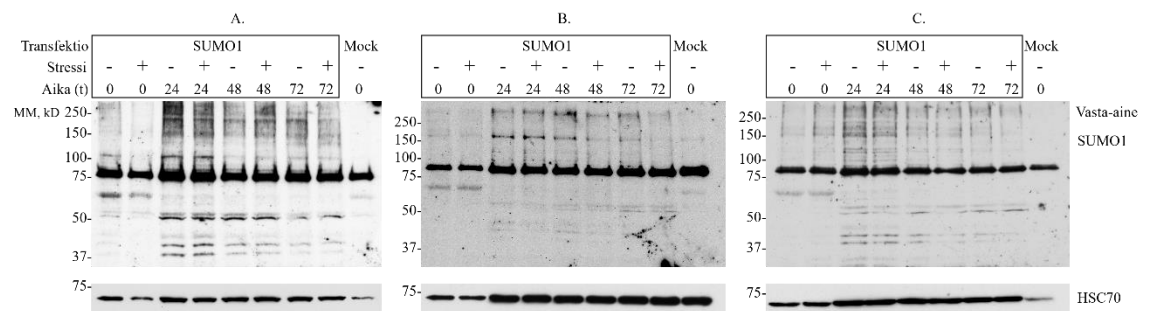


### 7.2.2 Notch2 erilaistumattomien solujen mekaanisessa stressissä

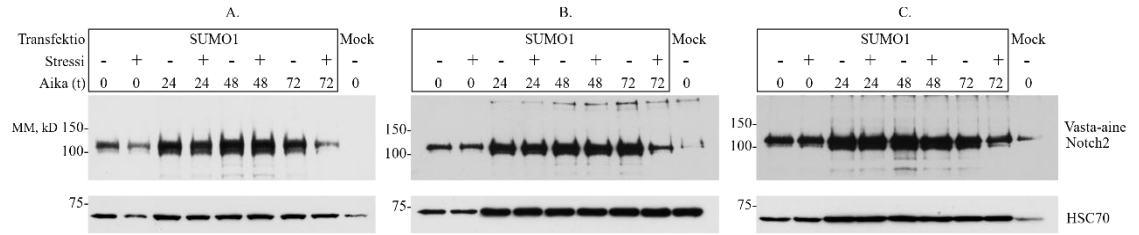


## 7.3 Erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaaninen stressi

### 7.3.1 Sumolaatio erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaanisessa stressissä



### 7.3.2 Notch2 erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaanisessa stressissä



### 7.3.3 Desmiini erilaistumattomien ja erilaistuneiden solujen mekaanisessa stressissä

