

# **Uuden fibronectiinireseptorin embigiinin toiminta ja sijainti kudoksissa**

Pro gradu -tutkielma  
Turun yliopisto  
Biokemian laitos  
Molekulaarinen solubiologia  
tammikuu 2020

Ville Jokinen

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

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

JOKINEN, VILLE: Uuden fibronektiinireseptorin embigiinin toiminta ja sijainti kudoksissa

Pro gradu -tutkielma, 63 s.

Molekulaarinen solubiologia

tammikuu 2020

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

---

Embigiini on transmembraaninen glykoproteiini, joka kuuluu immunoglobuliinisuperperheeseen. Embigiini koostuu kahdesta solun ulkoisesta immunoglobuliinidomeenista ja sillä on lyhyt solun sisäinen häntä. Embigiiniä on havaittu ilmentyvän erityisesti hiiren sikiön kehityksen aikana, mutta sen sijainti kudoksissa yleisesti on vielä huonosti tunnettu. Embigiinin tarkkaa toimintamekanismia tai mikä sen tehtävä solussa on ei vielä tiedetä, mutta sen epäillään vaikuttavan solujen erilaistumiseen, jakautumiseen ja solu-soluväliaine vuorovaikutuksiin. Ryhmämme aikaisemman tutkimuksen mukaan embigiinin on todettu tarttuvan proteiinitasolla erityisesti fibronektiiniin.

Hiiren embigiinin toimintaa tutkittiin solutason adheesiokokeilla käyttäen endogeenistä embigiiniä ilmentäviä hiiren ihon keratinosyyttejä. Näiden solujen käyttäytymistä seurattiin, kun embigiinin tuottoa vähennettiin RNA-interferenssillä tai lisättiin tuottovektorilla. Solujen tarttumista seurattiin xCELLigence laitteella, joka mittaa solun kiinnittymisestä ja leviämisestä johtuvaa sähkövirran muutosta kasvatusalustalla. Adheesiokokeiden lisäksi embigiinin funktiota pyrittiin selvittämään täysikasvuisista villityypin sekä embigiini poistogeenisistä hiiristä otettujen tiettyjen kudoksenäytteiden avulla. Näytteistä selvitettiin, missä kudoksissa embigiiniä ilmennetään eristämällä hiiren elimistä RNA sekä proteiinit ja katsomalla havaitaanko niissä embigiiniä PCR- sekä western blot -menetelmillä. Tämän lisäksi embigiinin tarkempaa sijaintia kudoksissa tutkittiin immunofluoresenssimikroskopian avulla hiiren elimistä tehdyistä leikkeissä. Embigiinin vaikutusta solujen jakautumiseen tutkittiin seuraamalla stabiilisti embigiiniä yliekspressoivien solujen kasvua.

Tutkimuksessa solujen todettiin tarttuvan embigiinivälitteisesti fibronektiiniin. Solujen tarttuminen oli heikompaa fibronektiinillä päällystettyyn kasvatusalustaan, kun embigiinin tuotto hiljennettiin ja voimakkaampaa, kun sitä lisättiin. Kudoksissa embigiiniä havaittiin useissa elimissä ja erityisen todennäköisesti keuhkoissa, ihossa, lisäkiveksissä sekä munuaisissa. Kasvatuskokeissa embigiinin todettiin hidastavan solujen jakautumista.

Avainsanat: embigiini, fibronektiini, soluadheesio, solureseptori

Kiitos Johanna Jokiselle ja Salli Keinäselle ohjauksesta ja opastuksesta

Kiitos Jyrki Heinolle mahdollisuudesta

Kiitos kaikille integriini-ryhmän jäsenille tuesta ja neuvoista

Tällä kertaa aloitetaan koirakuvalla



# Sisällys

<b>Lyhenteet</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Johdanto: Soluadheesio ja mitä se tarkoittaa eläinsolulle</b> .....	<b>6</b>
1.1 Solut, soluväliaine ja soluadheesio .....	6
1.2 Soluadheesiomolekyylit .....	7
1.2.1 Integriinit .....	7
1.2.2 Selektiinit .....	10
1.2.3 Kadheriinit.....	12
1.2.4 Immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyylit.....	15
1.2.5 Soluadheesiomolekyyliden neljän pääryhmän yhteenveto .....	18
1.2.6 Muut soluadheesiomolekyylit .....	19
1.3 Soluadheesio evoluutio .....	21
1.4 Soluadheesiomolekyylit solun elämässä .....	23
1.4.1 Liike: Valkosolujen tarttuminen endoteelisoluihin ja siirtyminen endoteelin lävitse .....	23
1.4.2 Jakautuminen: Soluadheesiomolekyylit, solusykli ja kontakti-inhibitio .....	26
1.4.3 Erileistuminen: Solujen ja alkion kehittyminen.....	29
1.4.4 Virheet ja toimintahäiriöt soluadheesiossa .....	31
1.5 Yhteenveto.....	35
<b>2 Työn tavoitteet</b> .....	<b>37</b>
<b>3 Materiaalit ja menetelmät</b> .....	<b>38</b>
3.1 Hiiret ja niistä kerätyt elimet.....	38
3.2 Kokeissa käytetyt solulinjat ja niiden ylläpito.....	38
3.3 Solujen embigiinin tuoton vähentäminen siRNA-interferenssillä ja lisääminen ekspressiovektorilla.....	39
3.4 Proteiinien ja RNA:n eristäminen hiiren elimistä sekä RNA-näytteiden käsittely	40
3.5 Embigiinin sijainti hiiren elimissä immunofluoresenssimikroskopian avulla .....	41
3.6 Solujen tarttumisen seuraaminen xCELLigence-laitteella .....	42
3.7 Embigiinin havaitseminen western blot -menetelmällä.....	42
3.8 Embigiinin tuoton lisäyksen vaikutus solujen jakautumiseen .....	43
3.9 Tulosten tilastollinen tarkastelu.....	44

<b>4 Tulokset</b> .....	<b>45</b>
4.1 Embigiinin sijainti hiiren elimistössä.....	45
4.2 Embigiinin määrän vaikutus solun tarttuessa fibronektiiniin .....	48
4.3 Embigiinin vaikutus solujen jakautumisessa .....	51
4.4 Solujen irrotukseen käytetyn tekniikan vaikutus.....	52
<b>5 Tulosten tarkastelu</b> .....	<b>54</b>
5.1 Solujen irrotustekniikalla on vaikutus solujen sitoutumiseen .....	54
5.2 Embigiiniä on useissa hiiren elimissä .....	55
5.3 Embigiini vaikuttaa todennäköisesti solujen jakautumiseen .....	59
5.4 Embigiini osallistuu solujen sitoutumisessa fibronektiiniin.....	60
<b>6. Päätelmät</b> .....	<b>63</b>
<b>Lähteet</b> .....	<b>64</b>

## Lyhenteet

	<b>Suomeksi</b>	<b>Englanniksi</b>
ADMIDAS	MIDAS-kohdan viereinen	adjacent to the MIDAS
AMP	adenosiinimonofosfaatti	adenosine monophosphate
BSA	naudan seerumin albumiini	bovine serum albumin
C-CAM1	solu-solu adheesiomolekyyli 1	cell-cell adhesion molecule 1
CDK1	sykliineistä riippuva kinaasi 1	cyclin-dependent kinase 1
cDNA	komplementaarinen DNA	complementary DNA
DABCO	1,4-diatsabisyklo[2.2.2]oktaani	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DMEM	Dulbeccon modifioitu Eagle medium	Dulbecco's Modified Eagle medium
Dsg1/3	desmogleiini 1/3	desmoglein 1/3
EDTA	etyleenidiamiinitetra-etikkahappo	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermaalinen kasvutekijä	epidermal growth factor
EMB	embigiini	embigin
Erk1/2	solun ulkopuolisen signaalin säätelemä kinaasi 1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ICAM1	solujenvälinen adheesiomolekyyli 1	intercellular adhesion molecule 1
IFMS	immunofluoresenssimikroskopia	immunofluorescence microscopy

IgSF CAM	immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyyli	immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule
LAD1/2/3	leukosyyttien adheesio häiriö 1/2/3	leukocyte adhesion deficiency 1/2/3
LATS1/2	suurien kasvainten estäjä 1/2	large tumor suppressor 1/2
LIMBS	ligandiin liittyvän metallin sitoutumiskohta	ligand-associated metal binding site
MIDAS	metalli-ioniriippuvainen sitoutumiskohta	metal ion dependent adhesion site
mRNA	lähetti-RNA	messenger RNA
MST1/2	nisäkkäiden steriili20-tyyppinen 1/2	mammalian sterile20-like 1/2
NCAM	hermosolujen adheesiomolekyyli	neural cell adhesion molecule
Nectl	nektiinejä muistuttava molekyyli	nectin-like molecule
OX	yliekspressio	overexpression
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos	phosphate-buffered saline
PCR	polymeraasiketjureaktio	polymerase chain reaction
PDGF	verihiutaleista lähtöisin oleva kasvutekijä	platelet derived growth factor
PECAM1	verihiutaleiden ja endoteelisolujen soluadheesiomolekyyli 1	platelet and endothelial cell adhesion molecule 1
PSGL-1	P-selektiini glykoproteiiniligandi-1	P-selectin glycoprotein ligand-1



RGD	arginiini-glysiini- asparagiinihappo	arginine-glycine-aspartate
RT-PCR	käänteistranskriptio- polymeraasiketjureaktio	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAV1	salvador proteiinin homologi 1	protein salvador homolog 1
SCR	lyhyt yhtenäinen toistuva	short consensus repeat
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaatti- polyakryyliamidigeeli- elektroforeesi	sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	pieni häiritsevä RNA	small interfering RNA
SPRY2	sprouty 2	sprouty 2
SyBMS	synergeettinen metalli-ionin sitoutumiskohta	synergistic metal ion-binding site
TBST	tris-puskuroitu suolaliuos + Tween 20	tris-buffered saline + Tween 20
WB	western blot	western blot
VCAM1	verisuonten solujen adheesiomolekyyli 1	vascular cell adhesion molecule 1
YAP1	yes-liittyvä proteiini 1	yes-associated protein 1

# 1 Johdanto: Soluadheesio ja mitä se tarkoittaa eläinsolulle

## 1.1 Solut, soluväliaine ja soluadheesio

**Solu** on elävän organismin perusyksikkö, joka pitää kalvon sisällään kaikki elämään tarvittavat aineet. Usein yksi solu onkin kokonainen organismi itsessään kuten paljaalle silmälle näkymätön bakteeri. Toisaalta solut voivat toimia myös yhdessä, kommunikoiden toistensa kanssa, erilaistuen eri toimintoihin, muodostaen monisoluisia organismeja kuten kasveja tai eläimiä. Tässä tutkielmassa keskityn lähinnä eläinsoluihin. Vaikka soluja on monenlaisia, jakavat ne keskenään useita ominaisuuksia. Niin silmän verkkokalvon valoa aistivat sauvasolut, kuin ihon pintakerroksen solut ovat muodoltaan ja tarkoitukseltaan hyvin erilaisia, mutta tästä huolimatta ne käyttävät samanlaisia tekniikoita perustoimintoihinsa kuten itsensä suojaamiseen, ylläpitämiseen ja jakautumiseen. Tämä ei kuitenkaan tee soluista yksinkertaisia tai niiden toimintojen ymmärtämisestä helppoa. Solujen toimiessa yhdessä syntyy biologisia systeemejä ja prosesseja, joista emme vielä ymmärrä kuin pienen osan.

**Soluväliaine** on solujen ulkopuolinen tukirakenne, joka auttaa soluja toimimaan yhdessä. Se on kolmiulotteinen verkko, joka koostuu useista erilaisista proteiineista, kuten kollageeneista, suurista glykoproteiineista, kuten fibronectiinistä, ja soluväliainetta muokkaavista entsyymeistä. Soluväliaine toimii esimerkiksi välittäjänä solujen välisessä kommunikaatiossa, ohjaa solujen erilaistumista ja osallistuu kudosten muodostumiseen ja kasvuun. Yksi sen tärkeimmistä tehtävistä on toimia tarttumispintana soluille, jotka käyttävät soluväliaineen makromolekyylejä eräänlaisina kädensijoina.

**Soluadheesio** on prosessi, jolla solu tarttuu sitä ympäröivään soluväliaineeseen tai muihin soluihin. Soluadheesio vaikuttaa kuitenkin moneen muuhunkin asiaan kuin vain solun kiinnittymiseen ja liikkumiseen. Se on tärkeä keino, jolla solu tunnistaa ja mukautuu sen ulkopuolella tapahtuviin muutoksiin. Soluadheesio on avainasemassa solujen toimiessa yhdessä ja kudosten muodostumisessa. Virheet soluadheesiossa voivatkin olla yksi syy vakavien sairauksien kehitykseen, koska solu ei vastaa oikein ympäristön signaaleihin. Ympäristön tunnistamiseen ja soluadheesioon solu käyttää sen pinnalla sijaitsevia soluadheesiomolekyylejä.

## 1.2 Soluadheesiomolekyylit

Soluadheesiomolekyylit ovat solun pinnalla olevia, tyypillisesti kerran solukalvon lävitse kulkevia, proteiineja, jotka sitoutuvat soluväliaineeseen tai toisten solujen pinnalla oleviin molekyyleihin. Niiden tehtävä solujen kiinnittämisen lisäksi on toimia reittinä solukalvon ylitse kulkeville signaaleille luoden yhteyden solun sisäisen tukirangan sekä soluväliaineen ja toisten solujen kanssa. Soluadheesiomolekyylit jaetaan yleensä neljään ryhmään: Integriineihin, selektiineihin, kadheriineihin sekä immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyyleihin.

### 1.2.1 Integriinit

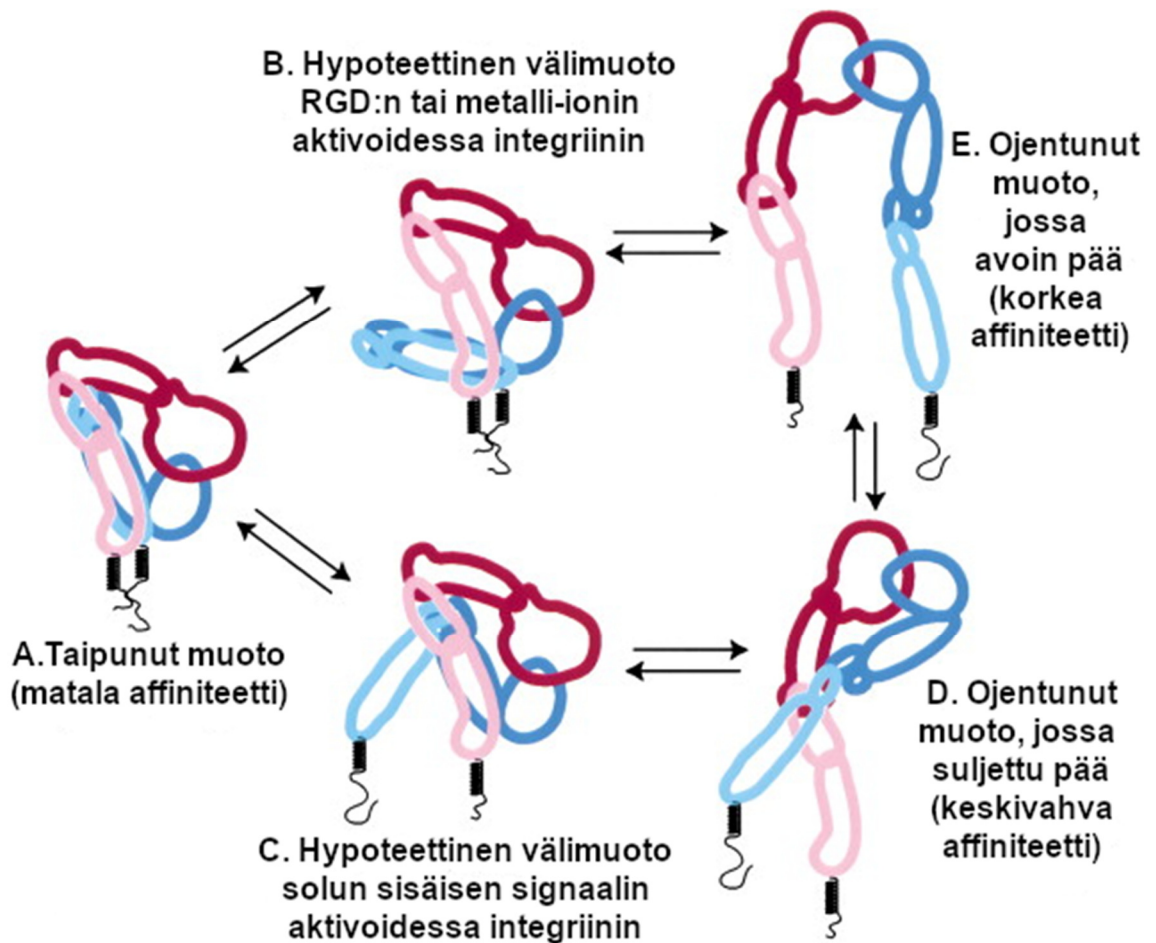
Integriinit ovat suuria heterodimeerisiä proteiineja, jotka koostuvat  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaysiköistä. Molemmista alaysiköistä on useita eri muotoja, joita yhdistelemällä integriinit pystyvät toimimaan monissa eri sitoutumistehtävissä solun tarpeen mukaan. Esimerkiksi ihmisessä esiintyy 18  $\alpha$ -alaysikköä ja 8  $\beta$ -alaysikköä, jotka pystyvät muodostamaan 24 erilaista integriiniä (katsausartikkelissa Takada 1994). Nämä alaysiköt muodostavat integriinin solun ulkopuolisen osan, ligandeja sitovan pään sekä kaksi useasta domeenista koostuvaa jalkaa, sekä solun sisäisen osan, joka koostuu molempien alaysiköiden transmembraanisista helikseistä sekä alaysiköiden lyhyistä solun sisäisistä hännistä. (Takagi ja muut 2002.)

Integriinit sitoutuvat soluväliaineessa esimerkiksi kollageeni tai fibronektiini nimisiin soluväliaineen proteiineihin tai muiden solujen pinnalla oleviin reseptoreihin. Ligandiin integriinit sitoutuvat joko  $\alpha$ -alaysikön I-domeenin avulla tai  $\beta$ -alaysikön I-domeenin kaltaisella domeenilla.  $\alpha$ I-domeeni on integriinin pääomainen ligandin sitoutumiskohta niissä  $\alpha$ -alaysiköissä, joissa sellainen on.  $\alpha$ I-domeenin päässä on MIDAS kohta (engl. metal ion dependent adhesion site), johon  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  tai  $\text{Mn}^{2+}$  metalli-ionit voivat sitoutua ja säädellä ligandiin sitoutumista. Integriineissä, joiden  $\alpha$ -alaysiköissä ei ole I-domeenia, sitoutumisesta vastaa samankaltainen  $\beta$ I-domeeni, jossa on MIDAS kohdan lisäksi kaksi muuta metalli-ionin sitoutumiskohtaa: SyBMS (engl. synergistic

metal ion-binding site), joka tunnetaan myös nimellä LIMBS (engl. ligand-associated metal binding site) sekä ADMIDAS (engl. adjacent to the MIDAS). Näitä eri sitoutumiskohtia hyödyntäen sekä metalli-ioni konsentraatioita vaihtelemalla keho säätelee integriinien sitoutumista. (Xiao ja muut 2004; katsausartikkelissa Zhang ja Chen 2012.)

Solukalvolla ollessaan integriinit voivat olla ainakin kolmessa eri muodossa riippuen integriinin tarvittavasta aktiivisuudesta (kuva 1). Matalan affiniteetin muodossa integriini on taipunut, eikä se pysty sitoutumaan soluväliaineen proteiineihin ja sen solun sisäiset hännät ovat kietoutuneet toisiinsa. Tämän lisäksi integriinillä on kaksi muotoa, joissa se on ojentuneena. Toisessa näistä sen ligandia sitova pää on suljettu, jolloin integriini on affiniteetin kannalta välimuodossa, ja toisessa sen pää on avoin, jolloin sillä on korkein affiniteetti ligandeihin. Se, missä muodossa integriini on, riippuu solun tai sen ympäristön senhetkisestä tarpeesta. (Takagi ja muut 2002.)

Signaali muodonmuutokselle voi tulla joko solun ulkopuolelta tai sen sisältä. Solun ulkopuolisen signaalin voi tuottaa esimerkiksi joissain soluväliaineen proteiineissa oleva arginiinistä, glysiinistä sekä asparagiinihaposta muodostuva RGD aminohapposekvenssi tai  $Mn^{2+}$ -ioni. Ulkopuolelta tuleva signaali johtaa integriinin solun sisäisissä hännissä olevien sitoutumiskohtien paljastumiseen, minkä seurauksena esimerkiksi erilaiset adapteriproteiinit voivat sitoutua niihin. Nämä adapteriproteiinit sitoutuvat solun tukirangan muodostaviin aktiinisäikeisiin luoden suoran linkin solun ympäristön ja sen tukirangan välille mahdollistaen solujen liikkuvuuden. Solun sisäpuolella aktiivisuuden lisääntymiseen johtava signaali voi olla esimerkiksi taliini, joka kilpailee  $\alpha$ -alaysikön hännän kanssa sitoutumiskohdasta  $\beta$ -alaysikön hännässä. Taliini estää sitoutuessaan häntien sitoutumisen toisiinsa pakottaen ne erilleen ja näin aktivoiden myös solun ulkopuolisen osan. (kirjassa Alberts ja muut 2002; katsausartikkelissa Takada ja muut 2007.)



**Kuva 1: Integriinin eri muodot.**  $\alpha$ -alayksikkö on piirretty punaisella,  $\beta$ -alayksikkö sinisellä ja transmembraaninen osa sekä solun sisäinen häntä mustalla. Muodot A, D ja E ovat elektronimikroskopiolla varmistettuja muotoja. Muodot B ja C ovat hypoteettisia muotoja, joiden kautta integriini kulkee solun ulkoa tai sisältä tulevan signaalin seurauksena. Muokattu kuvasta Takagi ja muut 2002.

Yksi hyvin tunnettu ja tärkeä prosessi johon integriinit osallistuvat on veren hyytyminen. Hyytymisprosessi alkaa verihitaleissa, kun solun ulkopuolinen trombiini sitoutuu solun pinnalla olevaan G-proteiinikytkentäiseen reseptoriin. G-proteiini aktivoituu ja aloittaa signaaliketjun, joka johtaa taliinin siirtymiseen solukalvolle, jossa se sitoutuu integriiniin aktivoitua sen. Aktivoitunut integriini tarttuu solun ulkopuolella esimerkiksi fibrinogeeniin, ja solun sisällä taliinin avulla solun tukirankaan. Tämän ketjun tapahtuessa useissa verihitaleissa muodostuu vuotokohtaan hyytymä. (katsausartikkelissa Li, Z. ja muut 2010.)

### 1.2.2 Selektiinit

Selektiinit ovat solun pinnalla olevia transmembraanisia glykoproteiineja, jotka sitoutuvat toisten solujen pinnalla oleviin hiilihydraatteihin. Ne osallistuvat muun muassa immuunijärjestelmän solujen liikkumiseen verisuonissa ja erilaisten tulehdustilojen torjumiseen. Selektiinit jaetaan löytöpaikkojensa mukaan nimettyihin kolmeen eri ryhmään, jotka ovat leukosyyttien eli valkosolujen pinnalla olevat L-selektiinit, muun muassa verihituleiden (engl. platelet) pinnalla ilmentyvät P-selektiinit sekä endoteelisolujen eli verisuonten sisäpinnan solujen pinnalla olevat E-selektiinit. (katsausartikkelissa Kansas 1996; kirjassa Alberts ja muut 2002.)

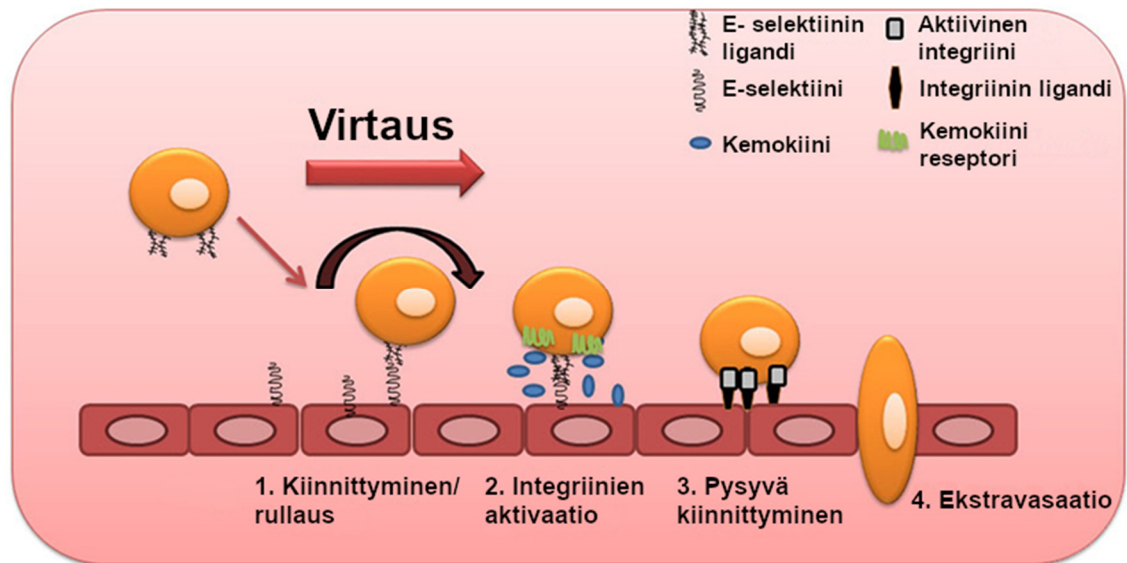
Kaikki selektiiniperheen jäsenet jakavat samanlaisen rakenteen ja ovat isolta osin homologisia keskenään lukuun ottamatta transmembraanisia ja solun sisäisiä osia. Homologisuudesta huolimatta selektiinien sijainti ja toiminta kudoksissa vaihtelee paljon. Solun ulkopuolelta sisäpuolelle kuljettaessa selektiinit koostuvat C-tyypin lektiinidomeenista, joka sitoutuu hiilihydraatteihin, jota seuraa epidermaalista kasvutekijää muistuttava domeeni (engl. EGF-like domain), kahdesta yhdeksään SCR-domeenia (engl. short consensus repeat domains), transmembraaninen alue sekä solun sisäinen häntä. (katsausartikkelissa Kansas 1996.)

Kaikkien selektiinien domeenien tarkoitusta ei vielä täysin tiedetä. EGF:ä muistuttavan domeenin sekä SCR-domeenien ei uskota osallistuvan suoraan selektiinien ligandiin sitoutumiseen. L-selektiinin EGF:ä muistuttavan domeenin on huomattu vaikuttavan sidoksen pysyvyyden säätelyyn ja siten valkosolujen liikkumiseen endoteelisolujen pinnalla. Selektiinin muodostavia domeeneja löytyy monista muista proteiineista, mutta missään muussa tunnetussa proteiinissa ei ole kaikkia kolmea yhdessä, mikä kertoo siitä, että niillä on todennäköisesti jokin spesifinen tarkoitus molekyylin kannalta. (katsausartikkelissa Kansas 1996; Waldron ja muut 2006.)

Selektiinien sitoutuessa ne vaihtelevat ojentuneen ja taipuneen muodon välillä. Kyse ei kuitenkaan ole suoraan sitoutumisen aktiivisuuden muuttumisesta. Selektiinien ollessa taipuneessa muodossa ne pystyvät sitoutumaan ligandiinsa, mutta vain sen päähän. Ojentuneessa muodossa selektiinit voivat tarttua

pidemmälle ligandiin luoden vahvemman sidoksen. Kun selektiini on taipuneessa muodossa, se voi ojentua hyvin nopeasti tarttuakseen paremmin ligandiin. Selektiinit sitoutuvat pääosin solujen pinnalla oleviin glykosyloituihin proteiineihin, kuten PSGL-1 (engl. P-selectin glycoprotein ligand) proteiiniin, joiden päässä on Sialyl-Lewis<sup>x</sup> niminen tetrasakkaridi. Selektiinien sitoutuminen on eukaryoottisolujen kannalta erikoista sillä ne sitoutuvat eräänlaisilla tarttuvilla sidoksilla (engl. catch bond). Näistä sidoksista tekee erikoisen se, että ne vahvistuvat, mitä enemmän voimaa niihin kohdistuu tiettyyn pisteeseen asti, jonka jälkeen sidos alkaa heikentyä. Tämä eroaa useista muista sidoksista, jotka tyypillisesti heikentyvät, kun niitä rasitetaan. (Waldron ja muut 2006; Jizhong Lou ja muut 2006.)

Yksi selektiinien tärkeimmistä tehtävistä on valkosolujen rullauksen mahdollistaminen (kuva 2). Valkosolujen rullauksella tarkoitetaan niiden kykyä tarttua väliaikaisesti verisuonten seiniin, pysyen silti liikkeessä mutta hitaammin kuin ympärillä virtaava veri. Tämä on mahdollista selektiinien edellä mainittujen ominaisuuksien, nopeasti tapahtuvan sitoutumisen sekä rasituksen alla tiukkana pysyvän sidoksen, takia. (katsausartikkelissa Lasky 1992; katsausartikkelissa Silva ja muut 2017.) Selektiinit voivat toimia myös osana signaalien välitystä. Valkosolujen selektiinien sitoutuessa endoteelisoluihin, valkosolujen pinnan  $\beta_2$ -integroinit aktivoituvat ja niiden ilmentyminen selektiinien yhteydessä lisääntyy. (Simon ja muut 1999.)



**Kuva 2. Selektiinit valkosolujen adheesiossa verenkierrassa.** 1. Solu tarttuu ja rullaa endoteelisolujen pinnalla selektiinien avulla. 2. Integriinit aktivoituvat selektiinien ja kemokiinien ansiosta. 3. Valkosolu tarttuu pysyvästi verisuonen pintaan. 4. Valkosolu tunkeutuu endoteelisolujen välistä verisuonesta kudokseen. Muokattu kuvasta katsausartikkelissa Silva ja muut 2017.

### 1.2.3 Kadheriinit

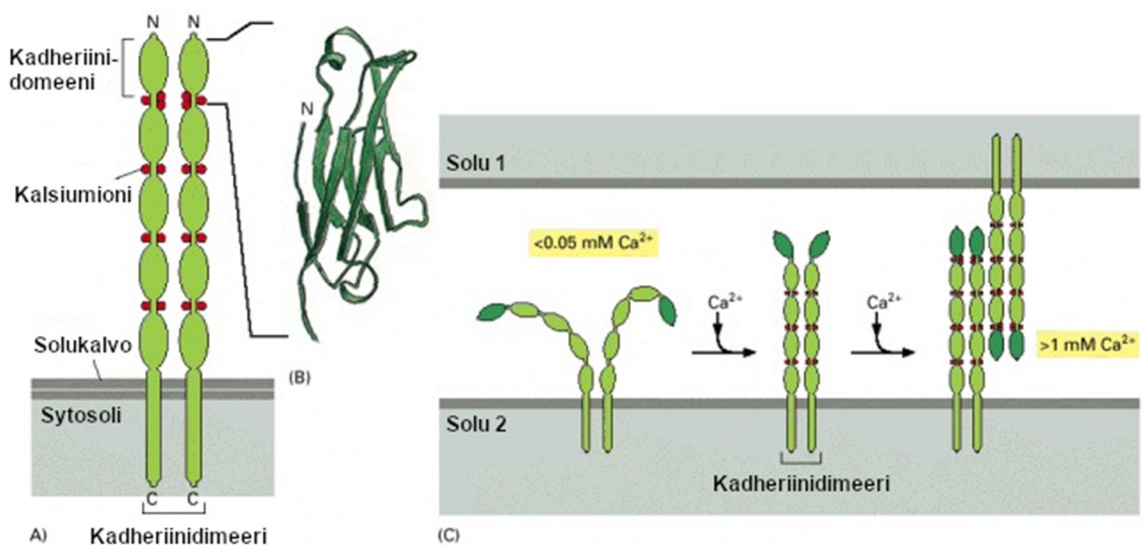
Kadheriinit ovat transmembraanisia proteiineja, jotka ovat tärkeässä osassa monisoluisien eläinten kudosten kehityksessä ja niiden homeostaasin ylläpidossa. Kadheriinit osallistuvat solujen väliseen sitoutumiseen kudoksissa ja niiden on todettu säätelevän muun muassa solujen muotoa ja sijaintia useiden eri eläinten kehityksen aikana, esimerkiksi hedelmäkärpäsen verkkokalvon kehityksessä. Lisäksi niiden tiedetään osallistuvan solujen erilaistumiseen ja jakautumiseen johtavien signaalien välittämiseen. Kadheriineja on useita eri tyyppisiä. Pelkästään selkärangkaisissa uskotaan olevan yli 100 erilaista kadheriinia, joita koodaavat useat eri geenit, joiden vaihtoehtoinen silmukointi lisää monimuotoisuutta vielä enemmän. (katsausartikkelissa Maître ja Heisenberg 2013.)

Useimmat kadheriinit ovat kerran solukalvon läpäiseviä glykoproteiineja, jotka muodostavat solun pinnalla homodimeerejä tai oligomeerejä. Ne koostuvat lyhyestä solun sisäisestä osasta, transmembraanisesta alueesta sekä useasta solun ulkopuolisesta kadheriinidomeenista, jotka muistuttavat rakenteeltaan



immunoglobuliinidomeeneja. Kadheriinidomeenien tarkkaa toimintamekanismia ei vielä tiedetä, mutta niiden tiedetään hyödyntävän  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneja sitoutumisessa.  $\text{Ca}^{2+}$ -ionit sitoutuvat kadheriinidomeenien väleihin jäykistäen kadheriinin solun ulkopuolisen rakenteen (kuva 3). Ilman  $\text{Ca}^{2+}$ -ioneja kadheriini pysyy velttona eikä pysty toimimaan, mikä johtaa sen hajottamiseen. (kirjassa Alberts ja muut 2002; katsausartikkelissa Shapiro ja Weis 2009.)

Sitoessaan soluja toisiinsa kadheriinit sitoutuvat yleensä toisiin samanlaisiin kadheriineihin muodostaen homofiilisiä sidoksia. Kadheriinit sitoutuvat solun sisällä  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -kateniinien sekä muiden proteiinien avulla solun aktiinitukirankaan. Kadheriinien solun ulkoisten osien sitoutuessa toisiinsa tämä vyöliitokseksi kutsuttu kompleksi liittää vierekkäisten solujen tukirangat toisiinsa pitäen ne tiukasti kiinni toisissaan. Jotkin kadheriinit sitoutuvat aktiinitukirangan sijaan muihin solun tukirangan komponentteihin kuten välikokoisiin säikeisiin. (katsausartikkelissa Marie ja muut 2014.)



**Kuva 3. Kadheriinien rakenne ja  $\text{Ca}^{2+}$ -ionien toiminta.** **A)** Tyypillisen kadheriinin rakenne solukalvolla, jossa se muodostaa homodimeerin toisen kadheriinin kanssa. **B)** Kadheriinidomeenin kolmiulotteinen rakenne. **C)** Kalsiumionien vaikutus kadheriinin rakenteeseen. Ionikonsentraation noustessa kadheriini jäykistyy ja sitoutuu toisen solun pinnalla olevaan kadheriiniin. Muokattu kuvasta kirjassa Alberts ja muut 2002.

Kadheriinit vaikuttavat sitoutumisen lisäksi solun sisäiseen signalointiin. Kadheriinien kanssa vyöliitoksien muodostumiseen osallistuva  $\beta$ -kateniini osallistuu myös Wnt/ $\beta$ -kateniini signalointireittiin, joka säätelee esimerkiksi monen solun jakautumiselle tärkeän geenin ilmentämistä. Wnt/ $\beta$ -kateniini signaloinnissa Wnt-proteiinit estävät  $\beta$ -kateniinin hajoamisen solun sisällä, mikä johtaa sen kerääntymiseen tumassa, jossa se voi vaikuttaa geenien säätelyyn. Wnt/ $\beta$ -kateniini signalointi sekä kadheriinien sitoutuminen ”kilpailevat” samasta  $\beta$ -kateniinistä solun sisällä. Tämä näkyy esimerkiksi Wnt/ $\beta$ -kateniini signalointireitin aktiivisuuden lisääntymisenä, kun solun muodostamat kadheriinisisidokset katkeavat, mikä johtaa solun sisäisen vapaan  $\beta$ -kateniinin määrän kasvuun. Useat Wnt/ $\beta$ -kateniini signaloinnin säätelemistä geneistä koodaavat proteiineja, jotka säätelevät solujen välistä adheesiota ja esimerkiksi lisäävät solujen liikkuvuutta. Päinvastainen reaktio  $\beta$ -kateniini vapautumiseen sidosten katketessa nähdään esimerkiksi kadheriinin määrää lisätessä yliekspressiolla, jolloin suurempi määrä  $\beta$ -kateniinia on käytössä solujen pinnalla, mikä vähentää Wnt/ $\beta$ -kateniini signalointia. (katsausartikkelissa Heuberger ja Birchmeier 2010; katsausartikkelissa Marie ja muut 2014.)

Kadheriinien luomat solujen väliset sidokset ovat erityisen tärkeitä erilaisten kudosten muodostumisessa. Kadheriinit osallistuvat kudosten muodostumiseen esimerkiksi lajittelemalla soluja. Eri kudosten solut ilmentävät eri kadheriineja, mikä yhdistettynä kadheriinien muodostamien homofiilisten sidosten kanssa johtaa samanlaisten solujen ryhmittymiseen. Lisäksi kadheriinien määrä solussa ja siitä johtuva sidoksen vahvuus osallistuu solujen lajitteluun riippumatta kadheriinien tyypistä. (katsausartikkelissa Gumbiner 2005.) Kudosten muodostumisen lisäksi useat eri kadheriinit osallistuvat erilaisten kantasolujen säätelyyn. N-kadheriinin on esimerkiksi todettu säätelevä mesenkymaalisten sekä hematopoieettisten kantasolujen erilaistumista. (Arai ja muut 2012; katsausartikkelissa Marie ja muut 2014.)

#### 1.2.4 Immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyylit

Immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyylit (IgSF CAM, engl. immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule) muodostavat suuren ja erittäin monimuotoisen proteiiniperheen. Kaikilla proteiineilla, jotka kuuluvat tähän ryhmään, on yksi tai useampi immunoglobuliinidomeeni osana rakennettaan. Immunoglobuliinidomeeni on immunoglobuliinimolekyylien mukaan nimetty kahdesta vastakkaisiin suuntiin kulkevista  $\beta$ -laskoksista muodostunut tiukka rakenne. Tyypillisesti IgSF CAM perheen proteiinit koostuvat suuresta solun ulkopuolisesta osasta, joka sisältää immunoglobuliinidomeenit, transmembraanisesta alueesta sekä solun sisäisestä hännästä. Toisin kuin monet muut soluadheesiomolekyylit, IgSF CAM perheen proteiinit eivät tarvitse kalsiumioneita sitoutumiseen tai sen säätelyyn. (katsausartikkelissa Juliano 2002; katsausartikkelissa Wai Wong ja muut 2012.)

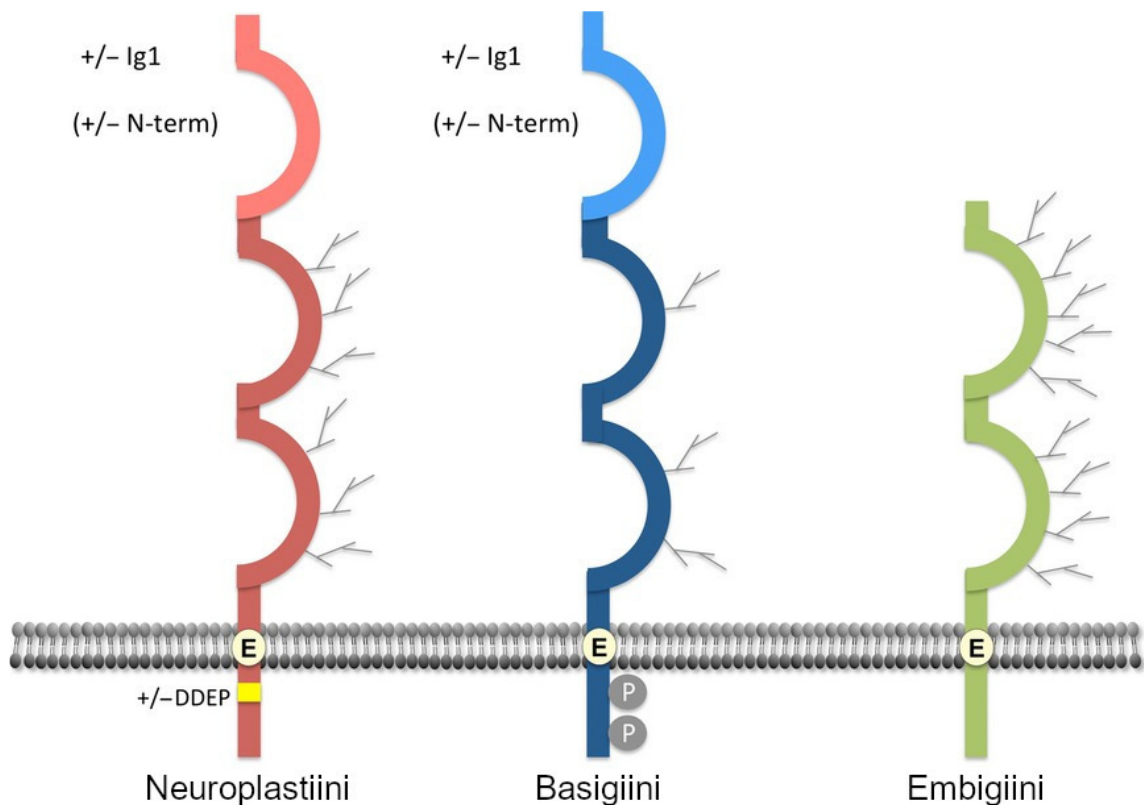
IgSF CAM perheen proteiinit osallistuvat monimuotoisuutensa takia useisiin eri biologisiin prosesseihin useissa eri solutyypeissä. Ne ovat esimerkiksi tärkeässä osassa hermoston kehityksessä, jossa useat IgSF CAM perheen proteiinit, kuten NCAM (engl. neural cell adhesion molecule) ja L1, ohjaavat aksonien liikettä ja osallistuvat niiden ylläpitoon. IgSF CAM perheen proteiinit sitoutuvat usein homofiilisesti, toisten solujen pinnalla oleviin samanlaisiin proteiineihin, mutta voivat myös sitoutua heterofiilisesti esimerkiksi hiilihydraatteihin tai toisiin soluadheesiomolekyyleihin kuten integriineihin. Niiden muodostamat solujen väliset sidokset eivät ole kuitenkaan yhtä vahvoja kuin esimerkiksi kadheriinien muodostamat sidokset ja niiden tehtävä onkin todennäköisesti solujen välisten sidosten tarkempi säätely kudosten muodostumisen aikana kuin varsinaisen kudoksen rakenteen ylläpito. (katsausartikkelissa Juliano 2002; kirjassa Alberts ja muut 2002.)

Monimuotoisuutensa vuoksi IgSF CAM perheen proteiinien toimintamekanismeista, kuten ligandeihin sitoutumisesta sekä solun sisäisten proteiinien kanssa toimimisesta, ei vielä tiedetä kovin paljon. Niiden tiedetään sitoutuvan niin toisten solujen pinnalla oleviin kuin myös soluväliaineen proteiineihin. Lisäksi niiden tiedetään sitoutuvan solun sisällä solun aktiinitukirankaan erilaisten adapteriproteiinien avulla, mutta on todennäköistä,

että IgSF CAM perheen proteiinien, toisten solujen sekä solun tukirangan välillä on vielä monia tuntemattomia mekanismeja. (katsausartikkelissa Juliano 2002.) Yksi tämän tutkielman kannalta hyvin tärkeä IgSF CAM perheen proteiini, josta ei vielä tiedetä paljoakaan, on embigiini.

Embigiini, joka tunnetaan myös sen vanhalla nimellä GP70, on transmembraaninen vahvasti glykosyloitu soluadheesiomolekyyli, jonka toiminnasta tiedetään hyvin vähän. Kuten muutkin IgSF CAM perheen proteiinit, se koostuu, embigiinin tapauksessa kahdesta, solun ulkopuolisesta immunoglobuliinidomeenista sekä solukalvon läpäisevästä ja solun sisäisestä osasta. Embigiini kuuluu samaan ryhmään basigiini ja neuroplastiini nimisten soluadheesiomolekyylien kanssa, joita se muistuttaa rakenteellisesti (kuva 4). Embigiinin ydinproteiini on noin 30 kDa kokoinen ja glykosyloinnin jälkeen se kasvaa noin 50-90 kDa kokoiseksi. (Ozawa ja muut 1988; Lain ja muut 2009.) Toisin kuin monet muut samaan perheeseen kuuluvat proteiinit, embigiinin ei ole todettu sitoutuvan homofiilisesti toisiin soluihin, jotka ilmentävät embigiiniä, mutta sen on huomattu osallistuvan solun sitoutumiseen sen ympäristöön (Huang ja muut 1993).

mRNA tasojen perusteella embigiinin ilmentymisen on todettu olevan vahvimmissaan hiiren alkion kehityksen aikana. Sitä on aikaisemmin havaittu pieniä määriä myös useissa aikuisen hiiren elimissä kuten esimerkiksi aivoissa, munuaisissa ja kiveksissä. (Huang ja muut 1990.) Embigiinin on todettu osallistuvan laktaatteja solukalvon ylitse kuljettavan monokarboxylaattien kuljettajaproteiini 2 (engl. monocarboxylate transporter 2) toimimisen avustamiseen ylläpitämällä sen aktiivisuutta sekä osallistumalla sen kuljettamisessa solukalvolle (Wilson ja muut 2005).



**Kuva 4: Embigiinin ja sen lähisukulaisten, basigiinin sekä neuroplastiinin, rakenne.** Kaikki kolme proteiinia koostuvat vähintään kahdesta immunoglobuliinidomeenista, mutta basigiinista ja neuroplastiinista on havaittu myös muodot, joissa on kolmas immunoglobuliinidomeeni (+/- Ig1). Kuvaan on harmailla symboleilla merkitty näiden proteiinien ennustetut glykosylaatiokohtat hiirissä ja ihmisissä. Kaikissa kolmessa on glutamiinihappo (E) samassa kohtaa solukalvon sisäistä osaa. Neuroplastiinin solun sisäinen häntä voi vaihtoehdoisen silmukoinnin seurauksena sisältää neljän aminohapon alueen, joka koostuu kahdesta asparagiinihaposta, glutamiinihaposta sekä proliinista (+/- DDEP). Basigiinin solun sisäisessä hännässä on tunnistettu kaksi fosforylaatiokohtaa, joita ei ainakaan vielä ole havaittu kahdessa muussa proteiinissa. Muokattu kuvasta katsausartikkelissa Beesley ja muut 2014.

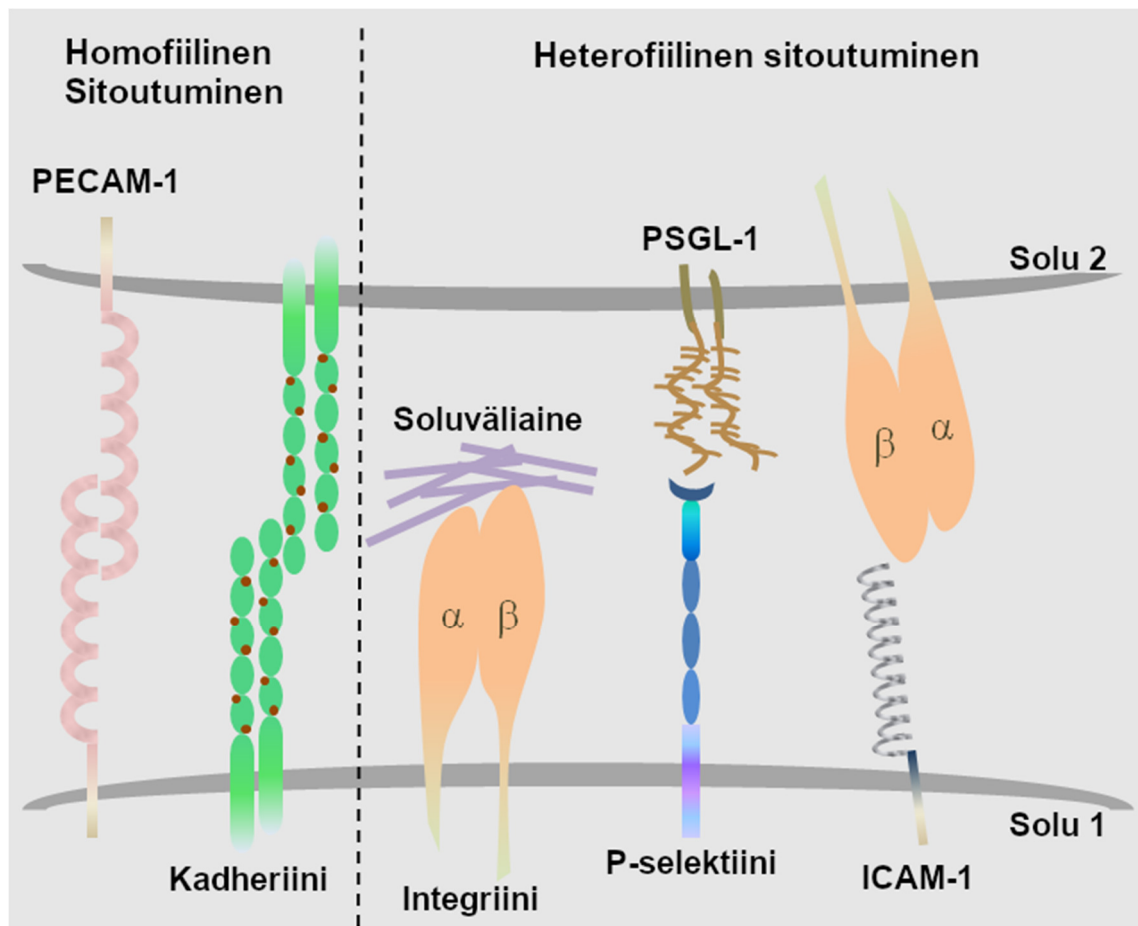
Embigiinin on muutamissa tutkimuksissa huomattu toimivan yhdessä muiden soluadheesiomolekyyliden kanssa erilaisissa biologisissa prosesseissa. Sen arvellaan toimivan integriinien yhteydessä tehostamaan sitoutumista tilanteissa, joissa solun ympäristössä on normaalia vähemmän soluväliaineen proteiineja, mikä on mahdollista esimerkiksi tietyissä alkionkehityksen vaiheissa (Huang ja muut 1993). Tämän lisäksi embigiinin arvellaan säätelevän ja osallistuvan toisen IgSF CAM perheen proteiinin NCAM:n kanssa hermo-lihasliitosten muodostumisessa mahdollisesti säätelemällä matriksin metalloproteiinaasien

toimintaa estämällä solukalvolla olevien proteiinien solun ulkopuolisen osan katkaisemisen (Lain ja muut 2009). Tutkimusta embigiinin yhteistyöstä muiden soluadheesiomolekyylien kanssa on kuitenkin tehty hyvin vähän eikä mahdollisista toimintamekanismeista ole vielä tietoa.

Embigiinin on havaittu osallistuvan erilaisten syöpien kehitykseen, mutta sen tarkkaa roolia ei vielä tiedetä ja tulokset ovat ristiriitaisia. Sen on esimerkiksi todettu vaikuttavan hidastavasti rintasyövän kehitykseen. Embigiinin tuotannon vähentämisen on huomattu lisäävän solujen migraatiota ja jakautumista rintasyöpäsoluissa ja lisäksi matalien embigiinitasojen on huomattu olevan suhteessa huonompaan mahdollisuuteen parantua rintasyövästä. (Chao ja muut 2015.) Embigiinin on havaittu osallistuvan myös haimasyövän etenemiseen, mutta tässä tapauksessa sen on todettu nopeuttavan syövän etenemistä. Embigiinin tasojen on todettu olevan koholla haimasyövässä ja sen tuotannon vähentämisen on todettu vähentävän solujen migraatiota ja kasvua, mikä on päinvastoin verrattuna sen vaikutukseen rintasyövässä. (Jung ja muut 2016.)

### **1.2.5 Soluadheesiomolekyylien neljän pääryhmän yhteenveto**

Edellä mainitut neljä soluadheesiomolekyyli ryhmää ovat yleisimmät ja parhaiten tunnetut ryhmät (kuva 5). Nämä ryhmät luokitellaan usein vielä sitoutumistapojensa mukaan. Esimerkiksi sen perusteella onko niiden ligandi soluväliaineen proteiini vai toisen solun pinnalla oleva molekyyli ja onko sitoutuminen heterofiilistä vai homofiilistä. Usein ne luokitellaan myös sen perusteella tarvitsevatko ne kalsiumioneja sitoutuakseen. Neljän yleisimmän soluadheesiomolekyyli perheen lisäksi on kuitenkin useita muitakin soluadheesiomolekyyliä, jotka eivät sovi rakenteeltaan näihin ryhmiin.



**Kuva 5: Yleiskuva soluadheesiomolekyyleistä ja niiden sitoutumisesta.** Kuvassa sitoutuminen on jaettu homofiiliseen ja heterofiiliseen. Homofiilisessä sitoutumisessa kaksi samanlaista molekyyliä sitoutuvat toisiinsa kuten kadheriinit ja IgSF CAM perheeseen kuuluva PECAM-1 (engl. platelet endothelial cell adhesion molecule 1). Heterofiilisessä sitoutumisessa kaksi erilaista molekyyliä sitoutuvat toisiinsa kuten P-selektiinin sitoutuessa solupinnalla olevaan PSGL-1 molekyyliin, integriinien sitoutuessa soluväliaineeseen tai IgSF CAM perheen ICAM-1 (engl. intercellular adhesion molecule 1) sitoutuessa integriiniin. Muokattu kuvasta katsausartikkelissa Dhaliwal 2013.

### 1.2.6 Muut soluadheesiomolekyylit

On olemassa soluadheesiomolekyylejä, jotka eivät sovi edellä mainittuihin proteiiniperheisiin. Tämän lisäksi ei ole aina helppoa määrittellä mitkä proteiinit luokitellaan soluadheesiomolekyyleiksi, koska luokitukset eivät ole aivan vedenpitäviä. Esimerkiksi EpCAM (engl. epithelial cell adhesion molecule) on epiteelisoluissa esiintyvä transmembraaninen glykoproteiini, joka toimii solujen välisessä adheesiossa sitoutumalla homofiilisesti toisten solujen pinnalla oleviin

EpCAM-molekyyleihin. EpCAM muistuttaa IgSF CAM perheen proteiineja siinä määrin että se ei tarvitse sitoutumiseen kalsiumioneita, mutta sen rakenteeseen ei kuitenkaan kuulu yhtään immunoglobuliinidomeenia. EpCAM koostuu solun ulkopuolisista EGF:ä muistuttavasta domeenista sekä tyreoglobuliinidomeenista, solukalvon sisäisestä osasta sekä lyhyestä solun sisäisestä hännästä. (Litvinov ja muut 1994; katsausartikkelissa Munz ja muut 2009.)

EpCAM:n toiminnasta ei vielä tiedetä paljoakaan, mutta soluadheesion lisäksi sen epäillään osallistuvan transkription ja solujen jakautumisen säätelyyn. Normaaleissa soluissa EpCAM:n on todettu olevan lähinnä solun sisällä eristyksissä, mutta sen on todettu ilmentyvän erityisen vahvasti solun pinnalla esimerkiksi rinta- ja paksusuolensyövissä, joissa sen epäillään nopeuttavan kasvainten muodostumista. EpCAM:n hajotessa sen solun sisäinen osa vapautuu ja aktivoi solun jakautumiseen johtavia geenejä ja sen solun ulkoinen osa vapautuu soluväliaineeseen, jossa se voi sitoutua muiden solujen EpCAM:eihin aktivoiden niiden hajoamista. (katsausartikkelissa Munz ja muut 2009; Maetzel ja muut 2009.)

Toinen luokittelematon soluadheesionmolekyylili on CD44, jota esiintyy lähes kaikkien nisäkässolujen pinnalla. Se osallistuu solujen sekä solun ja soluväliaineen välisten sidosten muodostamiseen. CD44 proteiinilla on monia eri muotoja vaihtoehtoisen silmukoinnin takia, mutta monien muiden adheesiomolekyyliden tapaan se on transmembraaninen glykoproteiini, joka koostuu solun ulkopuolisesta, solukalvon sisäisestä ja lyhyestä solun sisäisestä osasta. Kaikkien CD44 muotojen solun ulkoisessa osassa on kohtia, joilla se sitoutuu hyaluronaani nimiseen polysakkaridiin, joka on lähes kaikkialla soluväliaineessa esiintyvä molekyylili. Hyaluronaani on CD44:n pääomainen sitoutumisen kohde, mutta sen uskotaan voivan sitoutua myös esimerkiksi kollageeneihin ja fibronectiiniin. (katsausartikkelissa Goodison ja muut 1999.)

CD44 osallistuu pääosin kudosten rakenteen ylläpitämiseen sitoutumalla soluväliaineen proteiineihin tai sitoutumalla toisiin CD44-molekyyleihin toisten solujen pinnalla. Tämän lisäksi se osallistuu vaihtoehtoisen silmukoinnin takia moniin muihinkin biologisiin prosesseihin. Sen on osoitettu toimivan esimerkiksi kokoontumispaikkana solun ulkopinnalla erilaisille entsyymeille kuten matriksin



metalloproteinaaseille sekä erilaisille kasvutekijöille. CD44:n uskotaan osallistuvan monien muiden soluadheesiomolekyylien tapaan solusignaalointiin toimimalla esimerkiksi apureseptorina ErbB tyrosiinikinaasireseptoriperheelle sekä sitoutumalla adapteriproteiinien avulla solun tukirankaan. (katsausartikkelissa Ponta ja muut 2003.)

### 1.3 Soluadheesio evoluutio

Monisoluisien ja yksisoluisien eliöiden erot tuntuvat suunnattomilta. Erot eivät kuitenkaan ole välttämättä niin suuria kuin ensivilkaisulla näyttää. Ensimmäisten monisoluisien eliöiden uskotaan olleen erilaisia yhdyskunnissa eläviä mikrobeja sekä erilaisia syanobakteereja muistuttavia organismeja, jotka elivät noin 2-3 miljardia vuotta sitten. (Pennisi 2018.) Näitä ensimmäisiä monisoluisia organismeja tutkaillessa on helpompaa nähdä yhteys yksisoluisien ja monisoluisien eliöiden välillä. Yksisoluisuudesta monisoluisuuteen hyppääminen ei joidenkin tutkimusten mukaan edes ole niin suuri harppaus kuin voisi kuvitella. Tavallinen *Saccharomyces cerevisiae* hiivakin alkaa valintapaineen alla kasvamaan monisoluisina rykelminä, joissa solut kasvavat ja kiinnittyvät toisiinsa eivätkä vain aggregoidu ajalehtivien solujen kanssa. (Ratcliff ja muut 2012.)

Ensimmäisten eläinten uskotaan kehittyneen noin 600 miljoonaa vuotta sitten ja todennäköisesti niiden mukana kehittyi myös soluadheesio solujen välillä sekä soluväliaineen kanssa. Eri genomeja vertailtaessa näyttää siltä, että soluadheesio syntyessä sitä varten kehittyi useita erilaisia uusia proteiineja sekä niiden domeeneja kuten immunoglobuliinidomeenit, selektiinien sitoutumiseen käyttämät C-typin lektiinidomeenit, kadheriinit sekä integriinit. Sitoutumisesta vastaavien proteiinien lisäksi myös soluväliaineen proteiinit näyttävät kehittyneen samoihin aikoihin, mikä on ymmärrettävää, sillä solujen kiinnittyminen on tärkeää elimiä ja kudoksia suojaavan epiteelikudoksen kiinnittymiselle sekä solujen polaarisuuden ylläpitämiselle, joista molemmat ovat tärkeitä monisoluisuuden ominaisuuksia. Esimerkiksi laminiinit sekä kollageenin kolmoisheliksirakenne kehittyivät todennäköisesti samaan aikaan soluadheesiomolekyylien kanssa. (katsausartikkelissa Hynes ja Zhao 2000; katsausartikkelissa Abedin ja King 2010.)

Tutkimuksen mukaan eläinten kehityksen jälkeen näitä uusia proteiineja onkin käytetty uudestaan ja uudestaan ja ne ovat pysyneet vahvasti konservoituneina. Monet solujen tarttumiseen käyttämät mekanismit ovat nähtävästi pysyneet eläinten välillä hyvin samanlaisina. Tosin monimutkaisemmissa eläimissä on nähtävästi kehittynyt joitain uusia mekanismeja, täysin uusien proteiinien sekä jo olemassa olevista domeeneista kehittyneiden uusien proteiinikokonaisuuksien kautta, esimerkiksi hermoston ja verenkierron yhteydessä. (katsausartikkelissa Hynes ja Zhao 2000.)

Yksi keino tutkia monisolujen eläinten ja soluadheesion evoluutiota on tutkia verraten yksinkertaisia yksisoluisia organismeja, jotka ovat eläinten läheisiä sukulaisia. Kaulussiimaeliöt (engl. choanoflagellate) ovat yksisoluisia tai yhdyskuntia muodostavia organismeja, joiden on todettu olevan eläinten lähimpiä elossa olevia sukulaisia. Ne ilmentävät yksinkertaisuudestaan huolimatta useita eläinsoluille tyypillisiä proteiineja mukaan lukien soluadheesiolle tärkeitä proteiineja ja proteiinidomeeneja kuten kadheriineja, C-tyypin lektiinejä sekä epidermaalista kasvutekijää muistuttavia rakenteita. Tämä löydös näyttäisi kertovan siitä, että, toisin kuin aikaisemmin käsittelemäni tutkimuksen mukaan, soluadheesio kehittyi ennen eläinten syntyä. (katsausartikkelissa King ja muut 2003.)

Evoluution aikajanasta huolimatta yksisoluiset organismit kuten kaulussiimaeliöt voivat kertoa paljon soluadheesion evoluutiosta ja esimerkiksi siitä oliko niillä mahdollisesti jokin muunlainen funktio ennen monisoluisen elämän kehitystä. Esimerkiksi eläinsoluissa solujen välisiä sidoksia tekevät kadheriinit ovat voineet toimia aiemmin konjugaation tai yhdyskuntien muodostamisen yhteydessä, kun taas selektiinien hyödyntämisen C-tyypin lektiinidomeeni on voinut toimia auttamaan erilaisten bakteerien tunnistamisessa ja niihin tarttumisessa sitoutumalla niiden soluseinän sokereihin. (katsausartikkelissa King ja muut 2003.)

## **1.4 Soluadheesiomolekyylit solun elämässä**

Soluadheesio on osana monissa solujen, ja niistä muodostuvien organismien, selviytymiselle tärkeissä prosesseissa. Monet normaalisti toimivat solut eivät pysty edes selviytymään ilman kontaktia muihin soluihin, soluväliaineeseen tai johonkin muuhun tukirakenteeseen, jolla kasvaa. Seuraavaksi esittelen näiden mekanismien monimuotoisuutta käymällä lävitse joitain prosesseja solujen liikkumisessa, jakautumisessa ja erilaistumisessa, joissa monet eri soluadheesiomolekyylit osallistuvat tapahtumaketjun eri vaiheisiin. Tarkoitukseni on tuoda ilmi kuinka erilaiset soluadheesiomolekyylit toimivat yhdessä ja samalla esitellä jo tunnettuja prosesseja, joiden kautta voisi saada ideoita siitä, mikä embigiinin tehtävä solussa voisi olla.

### **1.4.1 Liike: Valkosolujen tarttuminen endoteelisoluihin ja siirtyminen endoteelin lävitse**

Monien solujen tarvitsee liikkua elinkaarensa aikana ja soluadheesiomolekyylit tekevät tämän mahdolliseksi. Aikaisemmin selektiinien yhteydessä esittelin hyvin lyhyesti, miten valkosolut käyttävät selektiinejä hidastamaan itseään verenkierrossa niiden siirtyessä tulehduskohtaan. Kyseinen prosessi, johon osallistuu myös muun tyyppisiä soluadheesiomolekyylejä, on kuitenkin paljon monimutkaisempi kuin mitä esimerkiksi kuvassa 2 on esitetty.

Valkosolujen sitoutuminen (kuva 6) alkaa, kun ne tarttuvat endoteelisoluihin L-, P- ja E-selektiinien avulla, jotka sitoutuvat PSGL-1 proteiiniin, jota ilmentyy niin valkosolujen kuin joidenkin endoteelisolujenkin pinnalla. Valkosolut ilmentävät L-selektiinejä, kun taas P- ja E-selektiinejä ilmentävät tulehtuneet endoteelisolut. Endoteelisolut, jotka tunnistavat jonkin tulehduksesta kertovan ärsykkeen, kuten patogeenin tai vahingoittuneita soluja, ilmentävät P- ja E-selektiinejä värvätäkseen valkosoluja tulehtuneeseen kohtaan. Valkosolu tarttuu P- ja E-selektiineihin, minkä seurauksena ne pyörivät endoteelisolujen pinnalla veren virratessa. Tämän mahdollistaa selektiinien nopea tarttumisen säätely sekä selektiinien sidosten ominaisuus vahvistua, kun niihin kohdistuu voimaa, mikä mahdollistaa uusien sidosten syntymisen ennen kuin vanhat sidokset ovat katkenneet. Tämä hidastaa verenkierrossa kulkevia valkosoluja, minkä

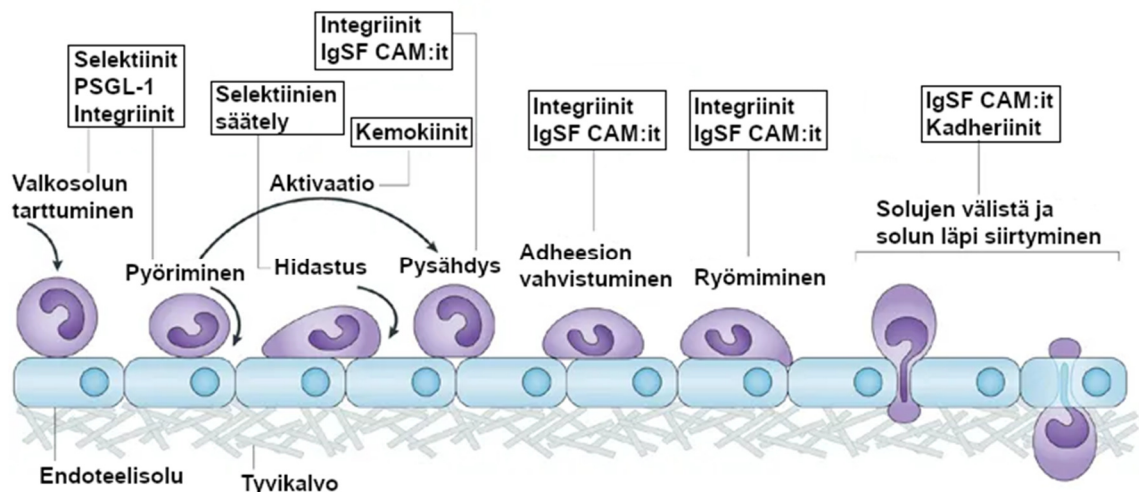
seurauksena niiden pinnalla olevat L-selektiinit tarttuvat toisiin valkosoluihin keräten niitä tulehtuneiden endoteelisolujen läheisyyteen. (Milestone ja muut 2000; katsausartikkelissa Cybulsky ja muut 2007.)

Kun valkosolut ovat hidastaneet verenkierrossa tulehdusalueelle ja kerääntyneet sen ympäristöön, valkosolujen pysyvä sitoutuminen alkaa. Tulehtuneet endoteelisolut tuottavat erilaisia sytokiineja, jotka johtavat erilaisten immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyylien kuten ICAM1 (engl. intercellular adhesion molecule 1) sekä VCAM1 (engl. vascular adhesion molecule 1) ilmentämiseen solujen pinnalla, sekä kemokiinien tuottoon ja vapautumiseen solujen ulkopuolelle. Kemokiinit sitoutuvat muun muassa valkosolujen G-proteiinikytkentäisiin reseptoreihin, aiheuttaen niiden, eri  $\alpha$ -alaysiköiden kanssa pareja muodostavien,  $\beta_1$ - sekä  $\beta_2$ -integriinien nopean aktivoitumisen. Aktivoituneet integriinit sitoutuvat endoteelisolujen pinnalla oleviin ICAM1 sekä VCAM1 proteiineihin, mikä johtaa integriinien laajempaan aktivoitumiseen sitoen valkosolun tiukasti endoteelisolun pintaan. (katsausartikkelissa Cybulsky ja muut 2007.)

Valkosolujen pysähtymisen jälkeen alkaa niiden siirtyminen endoteelin lävitse tulehtuneeseen kudokseen. Suurin osa valkosoluista kulkevat endoteelisolujen välistä. Valkosolut hakeutuvat endoteelisolujen saumakohtaan ICAM1:n sekä  $\alpha_M\beta_2$ -integriinien avulla. Valkosolujen sitoutuminen näiden soluadheesiomolekyylien avulla stimuloi endoteelisoluja muodostamaan useista ICAM1- ja VCAM1-molekyyleistä koostuvia sitoutumiskohtia pinnalleen, jotka edistävät valkosolun ryömimistä endoteelin lävitse. Endoteelisolujen välissä on kuitenkin useita solujen välisiä liitoksia muodostavia molekyylejä, kuten kadheriinejä, jotka vaikeuttavat valkosolujen siirtymistä. Eri IgSF CAM perheen proteiinien kuten ICAM1:n on havaittu vaikuttavan endoteelisolujen välisiin sidoksiin aktivoimalla niissä Rho-signaalointia, mikä johtaa esimerkiksi kadheriinien hajottamiseen solujen välisten liitosten heikentämiseksi (Millan ja Ridley 2005). Solujen välissä on myös useita solujen välisiä liitoksia muodostavia IgSF CAM perheen proteiineja, jotka edistävät valkosolujen siirtymistä homo- ja heterofiilisillä sidoksilla. Endoteelisolujen on huomattu myös supistuvan solun sisäisen kalsiumionikonsentraation muuttumisen seurauksena, jolloin ne väistävät tehden tilaa valkosolulle. (katsausartikkelissa Cybulsky ja muut 2007.)

Valkosolut voivat siirtyä endoteelin lävitse myös kulkemalla suoraan endoteelisolujen lävitse. Tämä reitti on vähemmän käytetty kuin solujen välistä siirtyminen, mutta sitä on havaittu keskushermostossa ja joissain muissa tulehdustilanteissa. Siirtyminen endoteelisolun lävitse alkaa kohdissa, joissa ilmennetään suuria määriä ICAM1 soluadheesiomolekyylejä. Tämä aloittaa solun sisäisen signalointiketjun, mikä johtaa kanavien muodostumiseen endoteelisolujen solukalvoon, joiden kautta valkosolut voivat kulkeutua endoteelisolujen lävitse. (katsausartikkelissa Engelhardt ja Wolburg 2004; katsausartikkelissa Cybulsky ja muut 2007.)

Tunkeuduttuaan endoteelisolujen ohitse, valkosolujen pitää vielä siirtyä laminiineistä ja kollageeneista muodostuvan tyvikalvon lävitse. Näiden soluväliaineen proteiinien lävitse valkosolut liikkuvat erilaisten integriinien, kuten pääosin laminiiniin sitoutuvan  $\alpha_6\beta_1$ -integriinin, avulla, joita IgSF CAM perheen PECAM1 aktivoi siirtymään solun sisältä solukalvolle. Näin valkosolu tarttuu tyvikalvon muodostaviin proteiineihin ja kulkeutuu sen lävitse tulehduskohtaan. (katsausartikkelissa Cybulsky ja muut 2007.)



**Kuva 6: Valkosolujen tarttumisen tapahtumaketju.** Yhteenveto valkosolujen tartumisesta ja tunkeutumisesta endoteelin lävitse. Prosessin vaiheet on nimetty ja niihin osallistuvat molekyylit laatiokoitu. Muokattu kuvasta katsausartikkelissa Cybulsky ja muut 2007.

### **1.4.2 Jakautuminen: Soluadheesiomolekyylit, solusykli ja kontakti-inhibitio**

Solusykli on terveessä solussa tiukasti säädelty prosessi, jossa solu, eri vaiheiden kautta, tekee kopion genomistaan, jakaa sen tarkasti kahteen samanlaiseen settiin ja jakautuu kahdeksi eri soluksi. Solusyklin etenemisen säätelystä vastaavat useat sykliinit sekä niistä riippuvat kinaasit (CDK, engl. cyclin-dependent kinase), jotka pitävät huolen siitä, että solusykli etenee oikein esimerkiksi pitämällä huolen, että solun genomien osat jakautuvat vain kerran syklin aikana. Isolle osalle soluista solusyklin alussa prosessi vaatii solun olevan tarttuneena soluväliaineeseen ja ilman näitä sidoksia solu ei normaalisti pysty tuomaan solusykliä päätökseen. Myöhemmin solusyklissä, solu pyöristää itsensä katkaisemalla sidoksensa soluväliaineeseen ennen mitoosiin etenemistä varmistaakseen kromosomien tasaisen jakautumisen. Tämän jälkeen solu ottaa jälleen kiinni soluväliaineesta solun ja sen tytärsolun erottamiseksi. (Schulze ja muut 1996; Jones, M. C. ja muut 2018.)

Mekanismeja, joilla soluadheesiota säädellään solusyklissä, ei vielä tiedetä. Solun pyöristymisen ennen mitoosia on todettu johtuvan CDK1 proteiinista ja sitä säätelevistä sykliini A2 sekä B1 proteiineista. Kun CDK1:n tai sykliini A2:n toiminta estetään, solu ei pysty säätelemään integriinien ja soluväliaineen välisiä sidoksia eikä niitä synny lisää solusyklin interfaasissa niin kuin normaalisti. Tämä johtaa solusyklin pysähtymiseen ja estää solua jakautumasta. Sykliini B1 toisaalta osallistuu solun luomien sidosten katkaisuun inaktivoimalla CDK1 proteiinia interfaasin lopussa ennen mitoosia. CDK1:n substraatteihin kuuluu monia proteiineja, jotka osallistuvat solun tukirangan toiminnan säätelyyn, minkä uskotaan olevan tapa, jolla se muuttaa solun sitoutumista soluväliaineeseen ja sitä kautta solun muotoa sen jakautumisen mahdollistamiseksi. (Robertson ja muut 2015; Jones, M. C. ja muut 2018.)

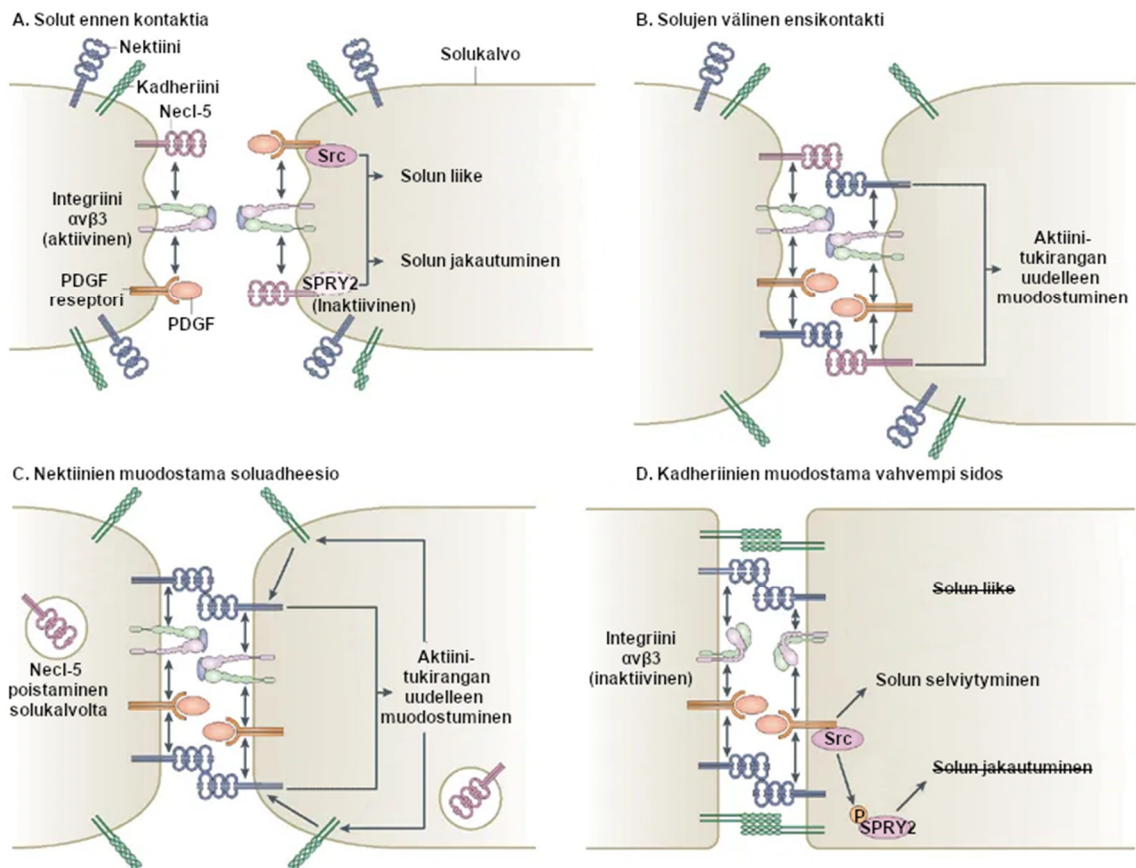
Soluadheesio säätelee jakautumista myös solusyklin ulkopuolella. Normaalisti toimivat solut tarvitsevat tilaa, johon jakautua ja solujen kasvaessa liian tiheästi niiden jakautuminen hidastuu tai pysähtyy. Soluadheesiomolekyyliden kyky luoda sidoksia solun ympäristöön ja välittää signaaleja solun sisälle tekee niistä erinomaisia säätelemään solujen kasvua suhteessa niiden ympäristöön. Erityisesti solujen välisiä sidoksia muodostavat soluadheesiomolekyylit, kuten

kadheriinit, ovat erinomaisia kandidaatteja jakautumisen kontakti-inhibition ylläpitoon. Niistä erityisesti epiteelisoluissa ilmenevän E-kadheriinin on todettu vaikuttavan solujen jakautumiseen. E-kadheriini on yksi ensimmäiseksi tunnistetuista ja myös yksi eniten tutkituista kadheriiniperheen proteiineista. (katsausartikkelissa van Roy ja Berx 2008; katsausartikkelissa McClatchey ja Yap 2012.)

Soluissa toimiva Hippo signalointireitin tiedetään välittävän solussa monia signaaleja, jotka vaikuttavat jakautumiseen ja apoptoosiin, ja näiden avulla säätelevän muun muassa elinten kokoa ja kudosten uusiutumista. Solun jakautumisessa kanonisessa Hippo signaalireitissä nisäkässolujen MST1/2 (engl. mammalian sterile20-like 1/2 (Hippo nimellä *Drosophila* kärpäsissä)) kinaasit muodostavat kompleksin SAV1 (engl. protein salvador homolog 1) proteiinin kanssa, jolloin ne aktivoituvat. MST1/2 fosforyloivat ja aktivoivat LATS1/2 (engl. large tumor suppressor 1/2) kinaasit, jotka fosforyloivat ja inhiboivat YAP1 (engl. yes-associated protein 1) proteiinin toimintaa. YAP1 inhibointi estää sitä aktivoimasta kasvutekijöitä, jotka aktivoisivat solun jakautumista edistäviä geenejä. E-kadheriinien on todettu osallistuvan tähän prosessiin, sillä kadheriinien toiminnan estämisen konfluenteissa solukasvatuksissa, joissa YAP1 proteiini ei pääse tumaan, on huomattu palauttavan YAP1 proteiinin toiminnan edistäen solun jakautumista. YAP1 inhibitiolla sen pääsy tumaan estetään pitämällä se solukalvolla ja sen uskotaan tapahtuvan  $\alpha$ - ja  $\beta$ -kateniinin avulla.  $\alpha$ - ja  $\beta$ -kateniinit ovat tärkeässä osassa kadheriinien muodostaessa solujen välisiä sidoksia ja tämän uskotaankin olevan yhteys kadheriinien ja kasvun säätelyn välillä solujen kontakti-inhibitiolla. (katsausartikkelissa McClatchey ja Yap 2012; katsausartikkelissa Kodaka ja Hata 2015.)

Nektiinien sekä nektiinejä muistuttavien molekyylien (Nect1, engl. nectin-like molecule) on myös huomattu toimivan solun kasvun säätelyssä (kuva 7). Nektiinit ja Nect1-molekyylit ovat immunoglobuliinisuperperheeseen kuuluvia soluadheesiomolekyylejä, joiden solun ulkoinen osa koostuu kolmesta immunoglobuliinidomeenista. Nect1-molekyylit eroavat nektiineistä sitoutumalla eri kohteisiin solun sisällä: Nect1-molekyylit sitoutuvat tukiproteiineihin (engl. scaffold protein), jotka auttavat signaalimolekyylien kokoontumisessa ja nektiinit sitoutuvat aktiiniin sitoutuvaan proteiiniin afadiiniin. Nektiinien on todettu toimivan

solujen välisessä adheesiossa kadheriinin yhteydessä sitoutumalla ennen kadheriineja, jotka värvätään sitoutumiskohtiin nektiinien jälkeen luomaan vahvempia sidoksia. Necl perheen proteiinit osallistuvat useisiin eri tehtäviin liittyen solujen muodostumiseen sekä erilaistumiseen. Necl-5 proteiinin on todettu osallistuvan myös solujen kasvun ja liikkumisen säätelyyn. (katsausartikkelissa Takai ja muut 2008.)



**Kuva 7: Nektinien ja nektiinejä muistuttavien molekyylien (Necl) vaikutus solun kasvuun ja liikkumiseen.** **A.** Solun pinnalla oleva Necl-5:n,  $\alpha\beta_3$ -integriniin sekä PDGF reseptorin (engl. platelet-derived growth factor receptor) muodostama kompleksi edistää solun liikettä ja jakautumista indusoimalla Src kinaasia ja inhiboimalla sprouty 2 (SPRY2) proteiinia. **B.** Solujen ensikontakti muodostuu Necl-5:n sitoutuessa nektiini-3:n kanssa, mikä aloittaa signaalin solun aktiinitukirangan uudelleen muodostamiseksi. **C.** Necl-5 siirretään pois solukalvoilta ja nektiinit sitoutuvat toisiinsa. **D.** Kadheriinit värvätään nektiinien sitoutumiskohtiin vahvistamaan solujen välisiä sidoksia. Necl-5 poistumisen takia  $\alpha\beta_3$ -Integrini inaktivoituu, mikä johtaa solun liikkumisen vähenemiseen, ja SPRY2 vapautuu, mikä johtaa sen aktivoitumiseen fosforylaation takia ja solun jakautumisen vähenemiseen. Kontakti toiseen soluun aktivoi signaalimolekyyliä, jotka ylläpitävät solun selviytymistä. Muokattu kuvasta katsausartikkelissa Takai ja muut 2008.



Necl-5:tä ilmennetään liikkuvien solujen johtavalla reunalla (engl. leading edge) sekä jakautuvien solujen pinnalla, jossa se muodostaa kompleksin PDGF-reseptorin (engl. platelet-derived growth factor receptor) ja  $\alpha_v\beta_3$ -integriinin kanssa. Necl-5 sitoutuu solujen välisen sitoutumisen alussa toisen solun pinnalla olevaan nektiini-3 proteiiniin. Tämä johtaa Necl-5:n poistamiseen solukalvolta ja sen muodostaman kompleksin hajoamiseen, mikä johtaa solun liikkumista lisäävien signaalien vähenemiseen. Liikkumisen vähentämisen lisäksi Necl-5 poistaminen solukalvolta vähentää solun jakautumista. Necl-5 ollessa solukalvolla se vaikuttaa sprouty2 nimisen, solun kasvua hidastavan, proteiinin toimintaan estämällä sen aktivaation. Necl-5:n poistuminen solukalvolta solujen välisen kontaktin takia, johtaa sprouty2:n toiminnan palautumiseen ja solun kasvun hidastumiseen. (katsausartikkelissa Takai ja muut 2008.)

Embigiininkin on todettu osallistuvan solujen jakautumisen säätelyyn. Sen toiminnan estäminen johtaa häiriöihin hematopoieettisten kantasolujen liikkumisessa sekä solujen jakautumisen lisääntymiseen. Solusyklissä embigiinin uskotaan toimivan solusyklin ulkoisen G0-vaiheen aktivoijana. G0-vaiheessa solun jakautuminen on pysähtynyt, mutta se pystyy kuitenkin tarvittaessa palautumaan normaaliin solusykliin ja jakautumaan. (Silberstein ja muut 2016.)

### **1.4.3 Erilaistuminen: Solujen ja alkion kehittyminen**

Erilaistumisella tarkoitetaan prosessia, jossa solu vaihtaa tyyppiä. Erilaistuessa useat solun ominaisuudet, kuten sen koko, muoto ja aineenvaihdunta, muuttuvat tehden siitä sopivamman sen uuteen tehtävään osana monisoluisia organismeja. Solujen erilaistumista tapahtuu monisoluisen eliön koko elämän ajan; sen alussa alkionkehityksessä ja loppuun asti muun muassa kudosten uusiutuessa ja parantuessa vahingoittumisen jälkeen. Erilaistuminen tapahtuu, kun solu alkaa ilmentämään tiettyjä geenejä sen genomista. Nämä geenit löytyvät kaikista soluista, mutta mitä yhdistelmiä niistä ilmennetään, riippuu solun ulkoisista signaaleista ja johtavat sen erilaistumiseen. Kasvutekijöiden, hermotukisolujen ja soluväliaineen lisäksi soluadheesiomolekyylit osallistuvat näiden signaalien tuottamiseen. (katsausartikkelissa Li, L. ja muut 2012.)

Kadheriiniperheeseen kuuluvan desmogleiini 1:n (Dsg1) on huomattu tukevan ihon keratinosyyttien erilaistumista. Dsg1 edistää solujen erilaistumista vähentämällä EGF-reseptorien ja Erk1/2 (engl. extracellular signal-regulated kinase) proteiinien välistä signalointia soluissa, jotka ovat siirtyneet ihon tyvikerroksesta ylempiin kerroksiin. Dsg1:n on huomattu pystyvän vähentämään signalointia, vaikka se ei ole sitoutunut solun ulkopuolella mihinkään. Dsg1:n solun sisäinen häntä koostuu kadheriineille tyypillisistä osista, kuten kateniinien sitoutumiskohdasta, mutta myös useista alueista, joita ei ole muissa kadheriineissä. Näiden alueiden uskotaan toimivan sitoutumiskohtina solun sisäisille proteiineille, jotka säätelevät EGF-reseptorin toimintaa. (Getsios ja muut 2009.)

Muutkin kadheriinit on todettu hyvin tärkeiksi solujen erilaistumisen ja kudosten muodostumisen kannalta. Esimerkiksi E-kadheriinia ilmentämättömät hiiren alkiot kuolevat hyvin aikaisessa kehityksen vaiheessa alkion kiinnittyessä kohdun seinään ja alkiot, jotka eivät ilmennä N-kadheriiniä, kuolevat 10 päivään mennessä. N-kadheriini poistogeenisissä alkioissa havaitaan niitä kudoksia, joita 10 päiväisen alkiossa kuuluisi olla, mutta esimerkiksi sydämessä ja hermostoputkessa on suuria kehitysvirheitä. Tämä kertoo mahdollisesti muiden kadheriinien pystyvän paikkaamaan puuttuvaa N-kadheriiniä. Ero kadheriini poistogeenisten hiirien kehityksessä, johtuu todennäköisesti erilaisista tavoista, joilla kadheriinit vaikuttavat solujen erilaistumiseen. (katsausartikkelissa Vleminckx ja Kemler 1999.)

Myös integriinit osallistuvat solujen erilaistumiseen ja alkiot, joiden soluista tiettyjen integriinien geeni on tehty mutaatiolla toimintakyvyttömäksi, kuolevat noin 5,5-14,5 päivän sisällä hedelmöityksestä samoin kuin aiemmin kadheriinien yhteydessä. Esimerkiksi  $\beta_1$ -integriinien poistaminen johtaa alkion kuolemaan noin viidennen päivän kohdalla, koska, vaikka alkio pystyy kiinnittymään kohdun seinään, sen alkiorakkulan sisäinen solumassa ei ala erilaistumaan, mikä johtaa sen rappeutumiseen. Alkiot, joiden  $\alpha_4$ -integriiniä koodaava geeni on tehty toimintakyvyttömäksi, kuolevat viimeistään noin 14,5 päivää hedelmöityksestä. Tässä tapauksessa ensimmäiseksi noin 9,5 päivän kohdalla havaitaan ongelmia, alkion aineenvaihduntaan osallistuvien rakkokalvon ja suonikalvon toisiinsa liittymisessä. Seuraavaksi 12,5 päivän kohdalla huomataan sydämen

epämuodostumia, joiden takia sydän vuotaa verta. Vastaavanlainen fenotyyppi havaitaan alkiossa, joissa on poistettu IgSF CAM perheen VCAM-1, jonka tiedetään sitoutuvan  $\alpha_4$ -integriiniin. Tämä viittaa näiden kahden proteiinin vuorovaikutusten olevan tärkeä alkionkehityksen kannalta.  $\alpha_4$ -integriinin epäillään osallistuvan myös esimerkiksi lihasolujen erilaistumisessa sekä alkion hermostopienan solujen siirtymisessä eri puolelle alkioita, jossa niistä muodostuu useita erilaisia soluja eri elimissä. (katsausartikkelissa Brown ja Yamada 1995; katsausartikkelissa Beauvais-Jouneau ja Thiery 1997.)

Myös embigiinin on todettu osallistuvan alkionkehityksen alkuvaiheisiin ja sen ilmenemisen on todettu olevan vahvaa ensimmäisen 10 päivän aikana. Alkion kiinnittyä embigiiniä ilmentyy erityisesti alkion sisimmässä solukerroksessa eli endodermisissä. Alkionkehityksen edetessä embigiinin ilmentyminen vähenee ja 10 päivän jälkeen elinten muodostumisen aikana sitä ei juurikaan enää havaita. Juuri ennen elinten muodostumisen alkua yhdeksännen päivän aikoihin embigiiniä on havaittu erityisen vahvasti esimerkiksi aivoissa ja vatsan alueella. (Huang ja muut 1990; Fan ja muut 1998.)

#### **1.4.4 Virheet ja toimintahäiriöt soluadheesiossa**

Edellä mainitut prosessit, joissa soluadheesio on tärkeässä osassa, antavat osviittaa siitä kuinka monipuolisia ja tärkeitä tehtäviä soluadheesiolla on solujen ja niistä muodostuvan organismin kannalta. Entä kun soluadheesiossa tapahtuu virheitä? Edellä mainituissa alkion kehityksen vaiheissa tuli jo ilmi soluadheesio-olevan elintärkeää eikä sen merkitys vähene vanhetessa. Onhan selvä, että ilman soluadheesiota hajoisimme lähes kirjaimellisesti palasiksi. Soluadheesio- virheet johtavat myös moniin pintaa syvemmillä oleviin sairauksiin ja sen normaalista poikkeava säätely on tavalla tai toisella tärkeää kaikkien syöpien etenemisessä.

Pemfigus on harvinainen, noin 50-60 ikävuoden kohdalla ilmenevä, autoimmuunisairaus, jossa kadheriiniperheeseen kuuluvien desmogleiinien toiminta estyy kehon omien vasta-aineiden toiminnan seurauksena. Desmogleiinit osallistuvat desmosomien muodostamiseen, jotka ovat vahvoja solujen välisiä liitoksia. Desmosomit ovat erityisen tärkeitä usein mekaaniselle

rasitukselle altistuvien kudosten kuten ihon rakenteen kannalta. Pemfiguksessa kehon tuottamat vasta-aineet estävät desmogleiini 1:n, desmogleiini 3:n tai molempien toiminnan keratinosyyteissä, mikä johtaa limakalvojen rikkoutumiseen ja rakkuloiden muodostumiseen iholle. Vasta-aineiden sitoutumisen uskotaan estävän desmogleiinien sitoutumisen, kun ne tarttuvat niiden tarttumisesta vastaaviin domeeneihin, luoden steerisen esteen, tai sitoutumalla johonkin muualle proteiinin rakenteeseen, säädellen sen toimintaa allosteerisesti. On myös mahdollista, että vasta-aineiden sitoutuminen johtaa desmogleiinien proteolyyttiseen hajotukseen. Pemfigusta hoidetaan lähinnä erilaisilla kortikosteroideilla, joita ilman sairaus voi johtaa kuolemaan. (katsausartikkelissa Yeh ja muut 2003; katsausartikkelissa Waschke 2008.)

$\beta_2$ -integriinin toiminnan häiriö aiheuttaa harvinaisen sairaiden, joka johtaa valkosolujen adheesion puutokseen (LAD, engl. leukocyte adhesion deficiency). Tämä vaikuttaa valkosolujen sitoutumiseen jo aiemmin mainitussa prosessissa, jossa valkosolut tarttuvat tulehtuneisiin endoteelisoluihin ja tunkeutuvat tulehtuneeseen kudokseen. LAD sairauksiin kuuluu kolme eri versiota, joista LAD1 ja 3 johtuvat integriinien toimintahäiriöistä. LAD2 johtuu P- ja E-selektiinien Sialyl-Lewis<sup>x</sup> ligandin puutteesta, mikä estää valkosolujen pyörimisen endoteelin pinnalla. LAD1:ssä useat mahdolliset mutaatiot  $\beta_2$ -integriinin geenissä johtavat sen huomattavasti normaalia heikompaan ilmentämiseen tai kokonaan puuttumiseen, mikä heikentää valkosolujen tunkeutumista kudoksiin. LAD3 tyyppissä  $\beta_2$ -integriinin ilmeneminen on normaalia, mutta sen sitoutumisessa on häiriöitä, mikä johtuu kindliini 3 proteiinia koodaavan geenin mutaatioista. Kindliini 3 on integriinin solunsisäiseen häntään sitoutuva proteiini, jonka tiedetään olevan tärkeä sen toiminnalle, vaikka sen tarkkaa toimintamekanismia ei vielä tunneta. LAD3 ja LAD1 tautien oireet muistuttavat toisiaan, mutta lisäksi LAD3:ssä ilmenee muun muassa taipumus lisääntyneeseen verenvuotoon. LAD sairauksien ainoa hoito on kantasolusiirros, mutta sitä pidetään hyvänä kohteena geeniterapialle. (katsausartikkelissa Becker ja Lowe 1999; katsausartikkelissa Etzioni 2014.)

Kaikki soluadheesiomolekyyliperheet osallistuvat tavalla tai toisella syöpien etenemiseen sekä etäpesäkkeiden syntyyn ja usein niiden rooli näissä prosesseissa on hyvin merkittävä. Soluadheesiomolekyylien osa solujen

liikkumisessa ja niiden kasvuun johtavissa signaaleissa tekee niistä tärkeitä syövän etenemisen kannalta, mutta myös syövän torjumisen kannalta. Useiden eri integriinien ja selektiinien on todettu osallistuvan syövän etäpesäkkeiden syntymiseen. Useissa syövissä havaitaan selektiinien Sialyl-Lewis<sup>x</sup> ligandin ilmentymisen lisääntymistä ja useissa eri kokeissa on todettu ainakin yhden selektiinin sitoutuvan mihin tahansa ihmisen epiteelikudoksesta lähtöisin olevaan syöpään, mikä kertoo selektiinien kyvystä vaikuttaa syöpäsolujen sitoutumiseen verenkierrassa ja siten niiden etäpesäkkeiden syntyyn. Saman suuntaisia tuloksia on saatu myös integriinien kohdalla. Useat syöpäsolut ilmentävät erilaisia integriinejä, joiden avulla ne tarttuvat eri soluväliaineen komponentteihin, mikä saattaa vaikuttaa siihen, mihin kohtiin etäpesäkkeet syntyvät riippuen soluväliaineen koostumuksesta. Integriinit osallistuvat myös verisuonten muodostumiseen, mikä on tärkeä osa kasvainten muodostumista, koska syöpäsolut vaativat normaaleja soluja enemmän ravinteita, joita laajempi verisuoniverkosto tuo. (katsausartikkelissa Bendas ja Borsig 2012.)

Immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyylit ovat usein osana säätelemässä syöpäsolujen kasvua. Esimerkiksi C-CAM1:n (engl. cell-cell adhesion molecule 1) ilmentymisen on huomattu vähenevän eturauhassyövän ja myös joidenkin muiden syöpätyyppien yhteydessä. Eturauhassyövässä sen on todettu toimivan kasvaimia ehkäisevässä roolissa inhiboimalla kasvaimen verisuonten muodostumista, mikä takia sen normaali ilmentyminen vähenee syövän edetessä. (katsausartikkelissa Okegawa ja muut 2004.)

Embigiini on toinen IgSF CAM perheen proteiini, joka osallistuu syövän etenemiseen joskin, kuten aiemmin mainitsin, prosessit, joihin se osallistuu, ovat vielä pääosin tuntemattomia ja sen vaikutuksesta syöpien etenemiseen on ristiriitaista tietoa. Yksi prosessi, johon sen on todettu osallistuvan, on toimiminen S100A4 proteiinin reseptorina. S100A4 on kalsiumia sitovia proteiini, joka osallistuu moniin solun sisäisiin ja ulkoisiin mekanismeihin, joihin kuuluvat muun muassa osallistuminen soluadheesioon kadheriinien kanssa sekä osallistuminen syöpäsolujen liikkumiseen ja etäpesäkkeiden muodostumiseen (Hernández ja muut 2013). S100A4:n sitoutumisen embigiiniin on todettu tehostavan muun muassa eturauhassyöpäsolujen liikkumista ja eturauhassyövän etenemistä

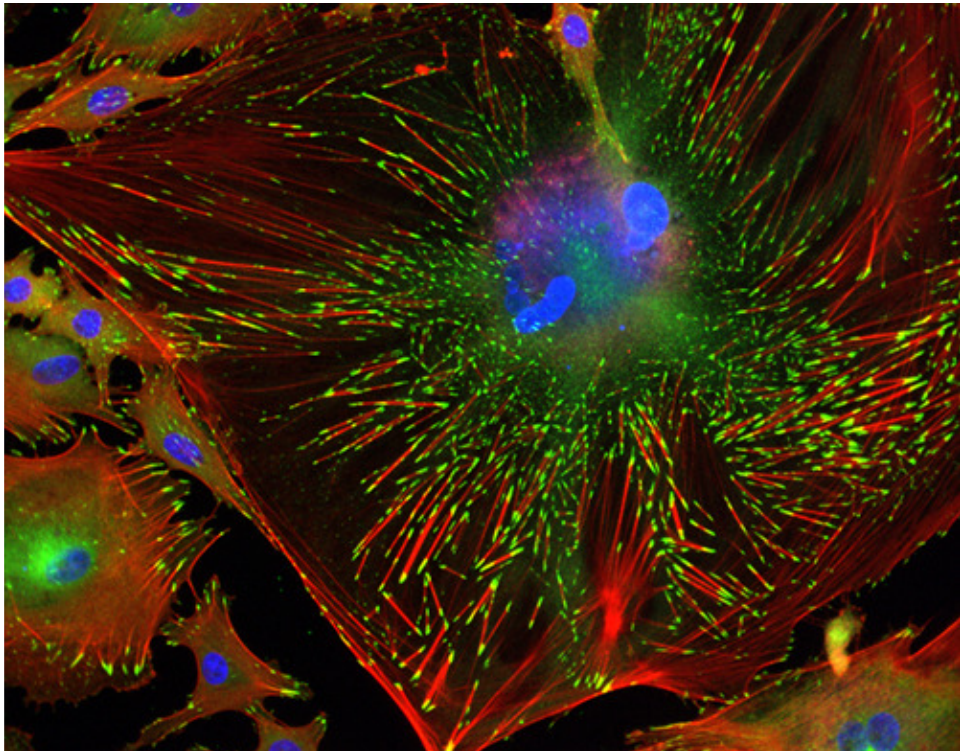
inhiboimalla AMP:n aktivoiman kinaasin toimintaa, joka osallistuu muun muassa useisiin solun jakautumista inhiboiiviin signalointireitteihin. (Ruma ja muut 2018.)

Koska soluadheesiomolekyylit ovat tärkeässä osassa eri syöpien kasvua ja leviämistä, ne ovat myös lupaavia kohteita syöpien hoidossa. Niiden käyttöön liittyy kuitenkin monia ongelmia johtuen niiden monipuolisista mekanismeista ja osallistumisesta moniin elintärkeisiin prosesseihin. Esimerkiksi  $\alpha_v$ - ja  $\beta_1$ -integriinejä on pidetty lupaavina kohteina syöpähoidoissa, koska niitä ilmennetään paljon useissa syövässä (katsausartikkelissa Harjunpää ja muut 2019). Useat syöpähoidot keskittyvät kasvainten tuhoamiseen eivätkä etäpesäkkeiden syntymisen estämiseen. Joidenkin tutkimusten mukaan esimerkiksi hepariinia voitaisiin mahdollisesti käyttää verenkierrossa etäpesäkkeiden muodostumisen estämiseksi, sillä se häiritsee P- ja L-selektiinien sekä integriinien sitoutumista. Hepariinia käytetään jo syöpien yhteydessä verisuonitukosten ehkäisemiseksi, mutta ei suoraan syövän hoitamiseksi, vaikka sen positiivisesta vaikutuksesta selviytymisen kannalta on joitain raportteja. (katsausartikkelissa Bendas ja Borsig 2012.)

Soluadheesiomolekyylit voivat olla myös kohde erilaisille viruksille, joiden avulla virukset läpäisevät solukalvon ja pääsevät solun sisälle. Virukset käyttävät erilaisia soluadheesiomolekyylejä näin ja erityisesti IgSF CAM perheen proteiinit ovat virusten suosimia reseptoreja. Tällaisista viruksia ovat esimerkiksi herpestä aiheuttava virus, joka hyödyntää nektiinejä tunkeutuakseen soluun, sekä vesikauhua aiheuttava virus, joka käyttää NCAM proteiinia reseptorina. Toisin kuin voisi kuvitella, virusten sitoutuminen ei näytä hyödyntävän soluadheesiomolekyyliin sitoutumiskohtaan. Sen sijaan virusten tunkeutuminen soluun soluadheesiomolekyyliin avulla näyttäisi perustuvan soluadheesiomolekyyliin endosytoosiin. Joidenkin virusten on todettu pystyvän häiritsemään soluadheesiomolekyyliin rakennetta, mikä johtaa niiden poistamiseen solukalvolta, jolloin siihen tarttunut virus pystyy myös siirtymään solun sisälle. Tämän lisäksi soluadheesiomolekyyliin endosytoosi on yleinen säätelymekanismi eri signalointireiteissä sekä mekanismi solujen liikkumisessa, jotka molemmat toimisivat virusten reiteinä päästä solun sisälle. (katsausartikkelissa Bhella 2015.)

## 1.5 Yhteenveto

Oli kyse kadheriineistä, integriineistä, selektiineistä tai immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyyleistä ei soluadheesion tärkeyttä kaiken monisoluisen elämän kannalta voi liioitella. Solujen väliset sekä solujen ja soluväliaineen väliset sidokset ovat tärkeä osa sitä kokonaisuutta, mikä rakenteellisesti mahdollistaa monipuolisten ja suurien organismien olemassaolon ja elämän niin kuin sen tunnemme. Rakenteellisten tehtävien lisäksi soluadheesiomolekyylit tekevät eri biokemiallisten signalointireittien osana tekee niistä tärkeitä myös monissa prosesseissa, jotka ovat elintärkeitä soluille ja siten myös niistä muodostuville organismeille. Yksittäisiä soluadheesiomolekyylejä ja niiden tehtäviä käsitellessä on helppo unohtaa suurempi kokonaisuus, jossa yksittäinen soluadheesiomolekyylit harvoin toimii yksin (kuva 8).



**Kuva 8: Porsaan silmän trabekkelikudoksen soluja, joista värjättyinä soluadheesioon osallistuvia proteiineja.** Solun tukirangan proteiini aktiini on värjätty punaisella, solun tuma sinisellä ja solun ja soluväliaineen väliset sidoskohdat vihreällä. Kuva: Carmen Laethem, IN Cell Image Competition 2009.

Soluadheesio on haastava tutkimuskohde ja monista soluadheesiomolekyyleistä, kuten esimerkiksi embigiinistä, tiedetään vielä hyvin vähän. Soluadheesiomolekyylit, soluväliaineen proteiinit sekä soluadheesioyhteydessä toimivat signaalintekompleksit ovat itsessään kaikki hyvin monimutkaisia systeemejä, jotka solun muiden toimintojen kanssa luovat hämmästyttävän monimutkaisen kokonaisuuden, josta tiedämme vielä hyvin vähän. Soluadheesioyhteyden tutkimisessa on kuitenkin paljon potentiaalia ja uudet löydökset siihen liittyen saattavat johtaa esimerkiksi uusien hoitokeinojen löytämiseen monille sairauksille.



## **2 Työn tavoitteet**

Embigiinin toiminnasta tiedetään vielä hyvin vähän. Sen epäillään osallistuvan solun jakautumiseen ja erilaistumiseen, mutta tarkkaa toimintamekanismia tai tarkoitusta ei tunneta. Tutkimusryhmämme aikaisemman tutkimuksen mukaan embigiini sitoutuu fibronektiiniin proteiinitasolla. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli jatkaa jo aiemmin saatujen tulosten pohjalta ja selvittää, miten embigiinin toimii solutasolla tutkimalla soluadheesiota sekä solujen jakautumista embigiinin määrän vaihdellessa. Lisäksi yritettiin selvittää missä kudoksissa ja millaisissa rakenteissa embigiiniä ilmenee elimistössä.

## **3 Materiaalit ja menetelmät**

### **3.1 Hiiret ja niistä kerätyt elimet**

Kokeissa käytettiin villityypin hiiriä sekä embigiini poistogeenistä hiirilinjaa, joka on kuvailtu artikkelissa Silberstein ja muut 2016. Hiiristä kerättiin näyte ihosta (korva), keuhkot, kivekset, lisäkivekset, lisämunuaiset, maksa, munasarjat, munuaiset, perna, osa ohutsuolta sekä sydän. Hiiriä ylläpidettiin Turun yliopiston koe-eläinkeskuksessa.

### **3.2 Kokeissa käytetyt solulinjat ja niiden ylläpito**

Adheesiokokeissa käytetyt hiiren keratinosyytit saatiin FT Kalle Sipilältä Fiona Wattin laboratorion (King's College London). Soluja kasvatettiin inkubaattorissa 37 asteessa, 5 % CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa FAD-mediumissa (DMEM (Lonza), johon lisättiin 25 % Ham's F-12 Nutrient Mix (Thermo Fisher Scientific), 10 % naudan sikiön seerumi (Biowest), 2 mM L-glutamiini (Lonza), 1 % Pen-Strep (Lonza), 200 µM adeniini (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml Insuliini, 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich), 16,8 ng/ml koleratoksiini (Sigma-Aldrich) sekä 0,5 µg/ml hydrokortisoni (Sigma-Aldrich)). Solut jaettiin normaalisti kokeiden ulkopuolella trypsiinillä irrottaen 2-3 päivän välein noin 80-90 % konfluensissa.

NIH3T3 hiiren alkion fibroblastit olivat peräisin American Type Culture Collectioniltä. Soluja kasvatettiin inkubaattorissa 37 asteessa, 5 % CO<sub>2</sub>-pitoisuudessa DMEM:ssä (Lonza), johon lisättiin 10 % naudan sikiön seerumi (Biowest), 2 mM L-glutamiini (Lonza) sekä 1 % Pen-Strep (Lonza). Solut jaettiin normaalisti kokeiden ulkopuolella trypsiinillä irrottaen 2-3 päivän välein noin 60-70 % konfluensissa.

### **3.3 Solujen embigiinin tuoton vähentäminen siRNA-interferenssillä ja lisääminen ekspressiovektorilla**

Solujen embigiinin tuottoa vähennettiin siRNA-interferenssillä käyttäen Mm\_Emb\_1 (siRNA1) sekä Mm\_Emb\_4 (siRNA2) FlexiTube siRNA-molekyylejä (QIAGEN) sekä kontrollina AllStars Negative Control siRNA:ta (QIAGEN). Transfektiossa käytettiin siLentFect-reagenssia (Bio-Rad), jonka ohjeita seuraten transfektio suoritettiin käyttäen 75 nM siRNA loppukonsentraatiota. Transfektio aloitettiin kasvatusmaljojen ollessa noin 50 % konfluentteja ja transfektion annettiin tapahtua noin 24 tunnin ajan.

Embigiinin tuottoa lisättiin yliekspressoimalla sitä ekspressiovektorin avulla. Konstrukti rakennettiin liittämällä hiiren embigiinin koko sekvenssi (GeneID 13723) nisäkässoluille sopivaan pcDNA3.1(+) (Invitrogen) ekspressiovektoriin. Sekvenssi liitettiin vektoriin geenin 3' päähän lisätyllä BamHI-restriktiokohdalla ja 5' päähän lisätyllä EcoRI-restriktiokohdalla. Lisäksi BamHI kohdan ja geenin alun väliin lisättiin GCC emässekvenssi toimimaan osana Kozak konsensussekvenssiä, joka osallistuu eläinsoluissa translaatioon. Vektoriin liitetty embigiinin sekvenssi sekvensoitiin ennen transfektiota Eurofins Genomicsin toimesta sekvenssin täydellisyyden varmistamiseksi. Transfektio tehtiin HilyMax-reagenssilla (Dojindo) valmistajan ohjeiden mukaan käyttäen 4 µl HilyMax reagenssia 1 µg DNA:ta kohden. Yliekspression kontrollina käytettiin tyhjää pcDNA3.1(+) vektoria. Stabiili yliekspressio NIH3T3 soluille tehtiin transfektoimalla edellä mainitulla tavalla. Noin 24 tuntia transfektion jälkeen kasvatusmediumiin lisättiin 500 µg/ml genetisiiniä (Gibco), jossa soluja kasvatettiin selektiopaineen ylläpitämiseksi.

### 3.4 Proteiinien ja RNA:n eristäminen hiiren elimistä sekä RNA-näytteiden käsittely

Hiiristä leikatut elimet oli kerätty RNAlater (QIAGEN) liuokseen, jossa ne säilytettiin +4 asteessa näytteiden käsittelyyn asti. Elimistä prosessoitiin noin 10 mg kudosta per näyte, joka siirrettiin NucleoSpin Bead Tubes Type F (Macherey-Nagel) putkeen NucleoSpin RNA/Protein (Macherey-Nagel) kitin ohjeiden mukaisesti. Putkia pidettiin voimakkaassa ravistelussa +4 asteessa noin 10-30 minuuttia kunnes kudosta oli hajonnut. Hajotuksen jälkeen näytteen käsittelyä jatkettiin NucleoSpin RNA/Protein kitin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Saaduista proteiininäytteistä etsittiin embigiiniä western blot -menetelmällä sille omistetussa kappaleessa selitetyllä tavalla. RNA-näytteet käännettiin cDNA:ksi SensiFAST cDNA Synthesis Kitillä (Bioline) välittömästi RNA:n eristyksen jälkeen käyttäen mahdollisimman paljon RNA:ta valmistajan ohjeiden mukaisesti.

cDNA:sta tunnistettiin embigiinin sekvenssi PCR:llä, jossa käytettiin hiiren embigiiniä vastaavia alukkeita: 5'-TCTGGCCATACTTGCCGAAG-3' ja 5'-GTACTTCTTCCCAGGGCGAG-3', sekä kontrollina  $\beta$ -aktiinia vastaavia alukkeita, 5'-TGCTTCTAGGCGGACTGTTAC-3' ja 5'-CTCCTCTTAGGAGTGGGGGT (Eurofins Genomics). 50  $\mu$ l PCR-reaktioon laitettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti 1,25 U DreamTaq DNA polymeraasia (Thermo Fisher Scientific); DreamTaq puskuri; 0,2 mM dNTP mixiä (Thermo Fisher Scientific); 0,2  $\mu$ M molempia alukkeita; 4  $\mu$ l cDNA:ta ja reaktiutilavuus täytettiin vedellä. PCR ohjelmana käytettiin 95 °C, 3 min, jonka jälkeen toistettiin 35 kertaa sykliä: 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 60 s, jonka jälkeen 72 °C, 10 min. PCR-tuotteisiin lisättiin latauspuskuriksi FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific) valmistajan ohjeiden mukaan, jonka jälkeen ne ajettiin 1,3 % agarosigeelille, jossa väriaineena Midori Green Advance (Nippon Genetics) valmistajan ohjeen mukaan lisättynä. Kokomarkkerina käytettiin Quick-Load 100 bp DNA ladder (New England BioLabs).

### **3.5 Embigiinin sijainti hiiren elimissä immunofluoresenssimikroskopian avulla**

Parafiiniin valetuista hiiren elimistä oli etukäteen leikattu 4 µm paksuisia leikkeitä, jotka oli asetettu mikroskooppilaseille. Leikkeistä poistettiin parafiini ja ne rehydroitiin seuraavasti: kaksi kertaa 3 min ksyleenissä, 5 min ksyleenissä, kolme kertaa 2 min 100 % etanolissa, kaksi kertaa 2 min 96 % etanolissa, kaksi kertaa 2 min 70 % etanolissa, 2 min 50 % etanolissa, 5 min vedessä, 5 min PBS:ssä. Seuraavaksi leikkeitä käsiteltiin proteinaasi K:lla (Dako) antigeenien esiin tuomiseksi. Valmistajan tuottamaa käyttövalmista proteinaasi K liuosta lisättiin leikkeiden peittämiseksi ja sitä inkuboitiin 3 min kosteissa olosuhteissa huoneenlämmössä valmistajan ohjeiden mukaisesti. Proteinaasi K pestiin leikkeistä pesemällä kaksi kertaa PBS:llä kolmen minuutin ajan.

Epäspesifisen sitoutumisen vähentämiseksi leikkeitä blokattiin tunnin ajan PBS:ään laimennetulla 1 % BSA:lla huoneenlämmössä kosteassa, jonka jälkeen leikkeille lisättiin 1 % BSA:han laimennettuna primäärivasta-aineet (1:200 Embigin Monoclonal Antibody (G7.43.1) (Thermo Fisher Scientific) sekä 1:300 Collage I Antibody (Novus Biologicals)), joita inkuboitiin +4 asteessa kosteissa olosuhteissa yön yli. Seuraavaksi leikkeitä pestiin kolme kertaa viiden minuutin ajan PBS:llä, minkä jälkeen niille lisättiin 1 % BSA:han laimennetut sekundäärivasta-aineet (1:400 Alexa Fluor 488 sekä Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific)), joita inkuboitiin huoneenlämmössä kosteassa tunnin ajan. Leikkeitä pestiin kolmesti viiden minuutin ajan, minkä jälkeen leikkeille laitettiin PBS:ään laimennettuna tumaväri (1:5000 Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific)), jota inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuutin ajan.

Leikkeet huuhdeltiin PBS:llä ja vedellä, jonka jälkeen ne kuivattiin ja leikkeiden päälle kiinnitettiin peitelasit Mowiol-liuoksella, johon lisättiin 2,5 m-% DABCO:a värien haalistumisen estämiseksi. Leikkeet kuvattiin seuraavana päivänä Zeiss LSM 880 mikroskoopilla. Kuvia käsiteltiin Fiji kuvankäsittelyohjelmalla.

### **3.6 Solujen tarttumisen seuraaminen xCELLigence-laitteella**

Hiiren keratinosyyttien kykyä tarttua fibronektiiniin, kun niiden embigiinin tuottoa vähennettiin ja lisättiin, seurattiin xCELLigence RTCA SP -laitteella (ACEA Biosciences). Koetta varten E-Plate 96 (ACEA Biosciences) kuoppalevyttä pinnoitettiin tarvittava määrä kuoppia  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  fibronektiinillä (Sigma-Aldrich),  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  kollageeni I:llä (Sigma-Aldrich) tai 0,1 % BSA:lla (Biowest). Proteiinien annettiin tarttua yön yli neljässä asteessa. Seuraavaksi kuopat pestiin PBS:llä (Lonza) ja kuoppien sitoutumattomat kohdat päällystettiin 0,1 % BSA:lla noin tunnin ajan 37 asteessa. Tämän jälkeen kuopat pestiin uudelleen ja jokaiseen kaivoon lisättiin 50  $\mu\text{l}$  seerumitonta FAD-mediumia, jonka jälkeen levy laitettiin xCELLigence-laitteeseen laitteen kalibroinnin ajaksi.

Solut irrotettiin 5 mM EDTA:lla, jonka jälkeen solut laskettiin ja jokaiseen kuoppaan lisättiin 15 000 solua lisäämällä 50  $\mu\text{l}$  soluja sisältävää seerumitonta FAD-mediumia kuopissa jo olevan mediumin lisäksi. Jokaisesta solutyypistä tehtiin kolme rinnakkaista näytettä jokaisella pinnoitteella. Soluja kasvatettiin 37 asteessa, 5 %  $\text{CO}_2$  ja niiden sitoutumista seurattiin 4-24 tunnin ajan niin että ensimmäisen tunnin aikana laite mittasi soluista aiheutuvan impedanssin minuutin välein, seuraavan neljän tunnin ajan 5 minuutin välein ja lopun ajasta 15 minuutin välein.

### **3.7 Embigiinin havaitseminen western blot -menetelmällä**

xCELLigence-kokeiden proteiininäytteet valmistettiin hajottamalla käytettyjä soluja näytepuskurissa (5 til-% glyseroli; 1,7 m-% natriumdodekyylisulfaatti; 1,6 m-% ditiotreitoli; 0,002 % bromifenolisininen; 0,05 M Tris-HCl (pH 6,8)). Näytteitä kuumennettiin 98 asteessa viiden minuutin ajan ja sentrifugoitiin nopeasti. RNA/protein kitillä saatuja proteiininäytteitä käsiteltiin valmistajan ohjeen mukaan. Tämän jälkeen näytteet ajettiin 10 % SDS-PAGE-geelille proteiinien erottelemiseksi. Kokomarkkerina käytettiin BlueStar Plus Prestained Protein Markeria (Nippon Genetics). Erotellut proteiinit siirrostettiin nitroselluloosa membraanille (GVS) 350 mA, 100 min, 4 asteessa.

Siirroituksen jälkeen membraani blokattiin maito-TBST-liuoksessa (5 m-% maitojauhe; 150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 til-% Tween 20) tunnin verran tai pidempään. Seuraavaksi membraani inkuboitiin kevyessä sekoituksessa noin kahden tunnin ajan 5 % maito-TBST-liuoksessa, johon lisättiin primäärivasta-aineet (1:1 000 Embigin Monoclonal Antibody (G7.43.1) (Thermo Fisher Scientific) sekä 1:20 000 Monoclonal Anti- $\beta$ -tubulin I antibody (Sigma-Aldrich)). Membraania pestiin neljä kertaa noin kolmen minuutin ajan TBST-liuoksessa (150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 % Tween 20), minkä jälkeen sitä inkuboitiin noin tunnin ajan valolta suojattuna kevyessä sekoituksessa maito-TBST-liuoksessa, johon lisättiin sekundäärivasta-aineet (1:15 000 Odyssey anti-rat IRDye 800CW sekä Odyssey anti-mouse IRDye 680ER (LI-COR)). Membraania pestiin valolta suojattuna neljä kertaa noin kolmen minuutin ajan TBST-liuoksessa, jonka jälkeen se kuvattiin Odyssey CLx -laitteella. Kuva käsiteltiin ja proteiinien määrät kvantitoitiin Image Studio -ohjelmalla (LI-COR).

### **3.8 Embigiinin tuoton lisäyksen vaikutus solujen jakautumiseen**

Embigiinin tuoton lisäyksen vaikutusta solujen jakautumiseen tutkittiin Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo) -reagenssin avulla. Määrityksessä käytettiin NIH3T3 hiiren alkion fibroblasteihin perustuvaa solulinjaa, johon oli stabiilisti transfektoitu embigiinin tuottovektori aiemmin mainitulla tavalla. Solut irrotettiin kasvatusaljoista kumisella raaputtimella PBS:ään. Kyseisiä soluja sekä kontrollina NIH3T3 soluja, joihin oli pysyvästi transfektoitu tyhjä pcDNA3.1(+), laitettiin 96-kuoppalevyille 2 000 solua per kaivo, jolla niiden annettiin kasvaa 48 tuntia 37 asteessa, 5 % CO<sub>2</sub>. Tämän jälkeen kaivoihin lisättiin CCK-8 -reagenssi solujen laskemiseksi valmistajan ohjeiden mukaisesti. Kaivojen absorbanssit mitattiin Cytation 5 (BioTek) -laitteella.

### 3.9 Tulosten tilastollinen tarkastelu

Tilastoanalyysiä varten käytettiin SPSS (IBM) ohjelmaa. Analysoidut kokeet oli toistettu vähintään kolme kertaa. Kaikissa analyyseissä tulokset todettiin tilastollisesti merkittäväksi, kun p-arvo oli pienempi kuin 0,05. xCELLigence adheesiokokeista saadut tulokset käsiteltiin valitsemalla kaksi aikapistettä, 30 minuutin ja kahden tunnin kohdat, joissa embigiini siRNA:lla käsiteltyjen solujen arvo vähennettiin kontrollin arvosta. Erotuksien testattiin olevan normaalisti jakautuneita Shapiro-Wilk testillä. Populaation ollessa normaalisti jakautuneita tilastollista merkittävyyttä tutkittiin yhden otoksen t-testillä. Populaation poiketessa normaalijakaumaoletuksesta käytettiin Wilcoxonin testiä. Embigiinin yliekspression vaikutusta solujen kasvuun tutkivissa kokeissa mitatut absorbanssit todettiin normaalisti jakautuneiksi Shapiro-Wilk testillä ja niiden tilastollinen merkittävyys testattiin parillisella t-testillä.

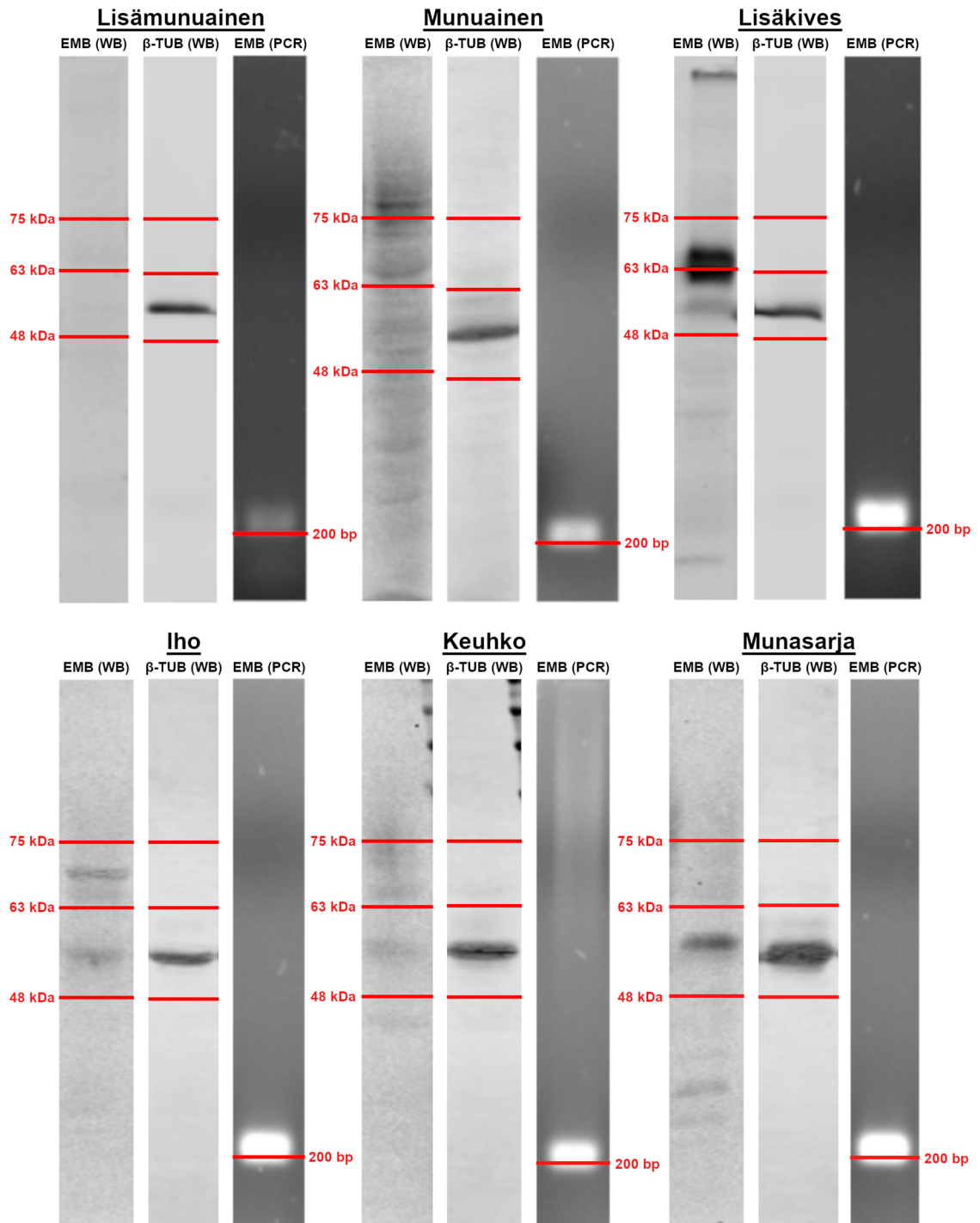


## 4 Tulokset

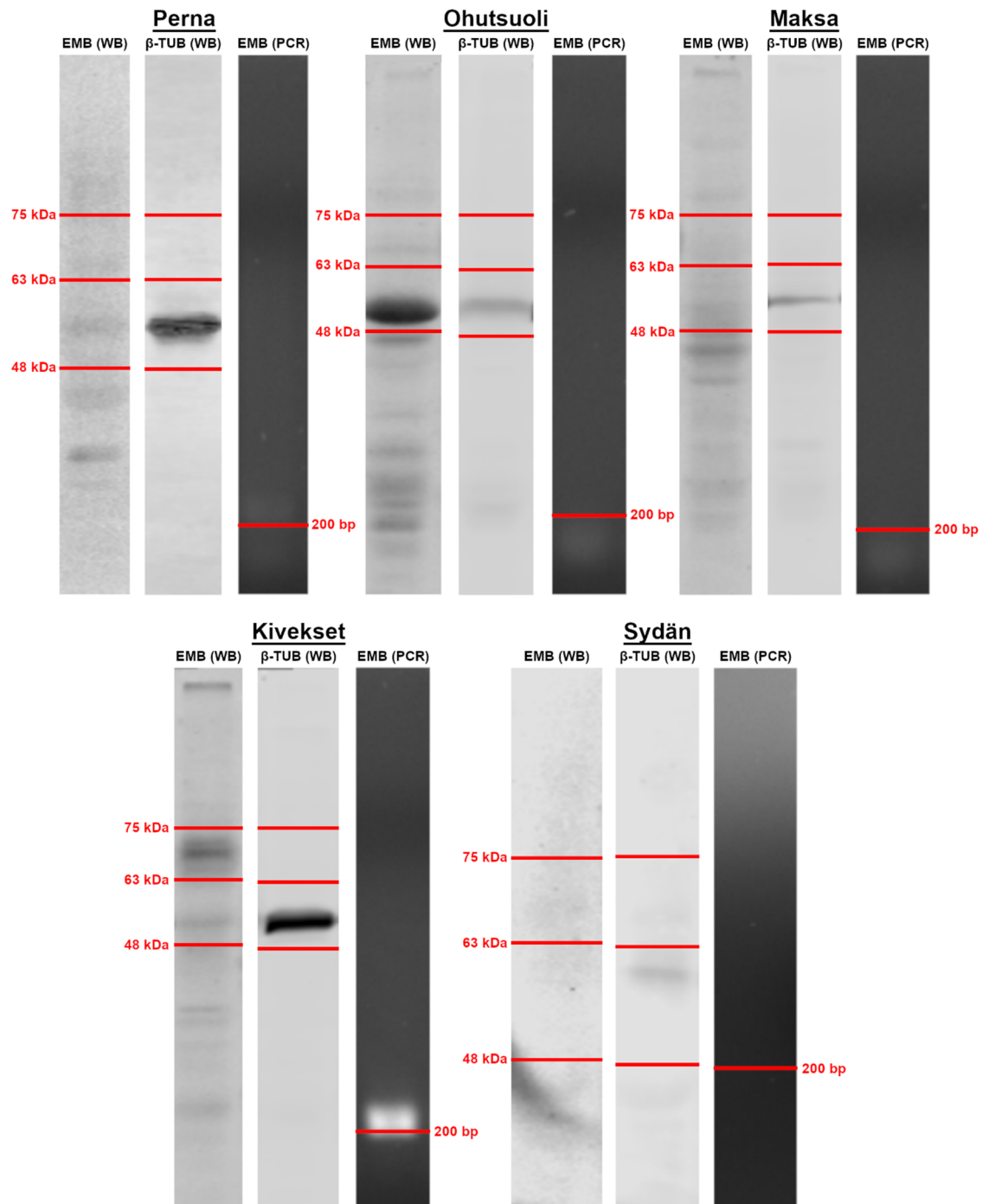
### 4.1 Embigiinin sijainti hiiren elimistössä

Embigiinin sijaintia hiiren elimistössä lähdettiin kartoittamaan keräämällä hiiristä näyte ihosta, keuhkot, kivekset, lisäkivekset, lisämunuaiset, maksa, munasarjat, munuaiset, perna, osa ohutsuolta sekä sydän. Elimiä kerättiin embigiini poistogeenisistä sekä villityypin hiiristä, molemmista uroksista sekä naaraista. Elimet käsiteltiin NucleoSpin RNA/Protein kitillä, jolla samasta palasta kudosta voidaan eristää molemmat RNA ja proteiinit. Proteiininäytteistä tunnistettiin embigiini western blot -menetelmällä ja RNA-näytteet muutettiin cDNA:ksi, josta tunnistettiin embigiinin geeni PCR:llä (Kuva 9 ja kuva 10). Proteiininäytteissä sekä RNA-näytteissä embigiinin havaitseminen tarkasti osoittautui vaikeaksi embigiinin vahvan glykolysaation, mahdollisen epäspesifisen sitoutumisen sekä näytteiden laadun vaihtelevuuden takia. Tästä huolimatta proteiininäytteissä embigiiniä havaittiin olevan munuaisissa, keuhkoissa, lisäkiveksissä, ihossa, munasarjoissa, kiveksissä sekä ohutsuolessa. RNA-näytteissä embigiiniä havaittiin muuten samoissa elimissä kuin proteiininäytteissä paitsi, että niiden lisäksi sitä havaittiin lisämunuaisissa mutta ei ohutsuolessa.

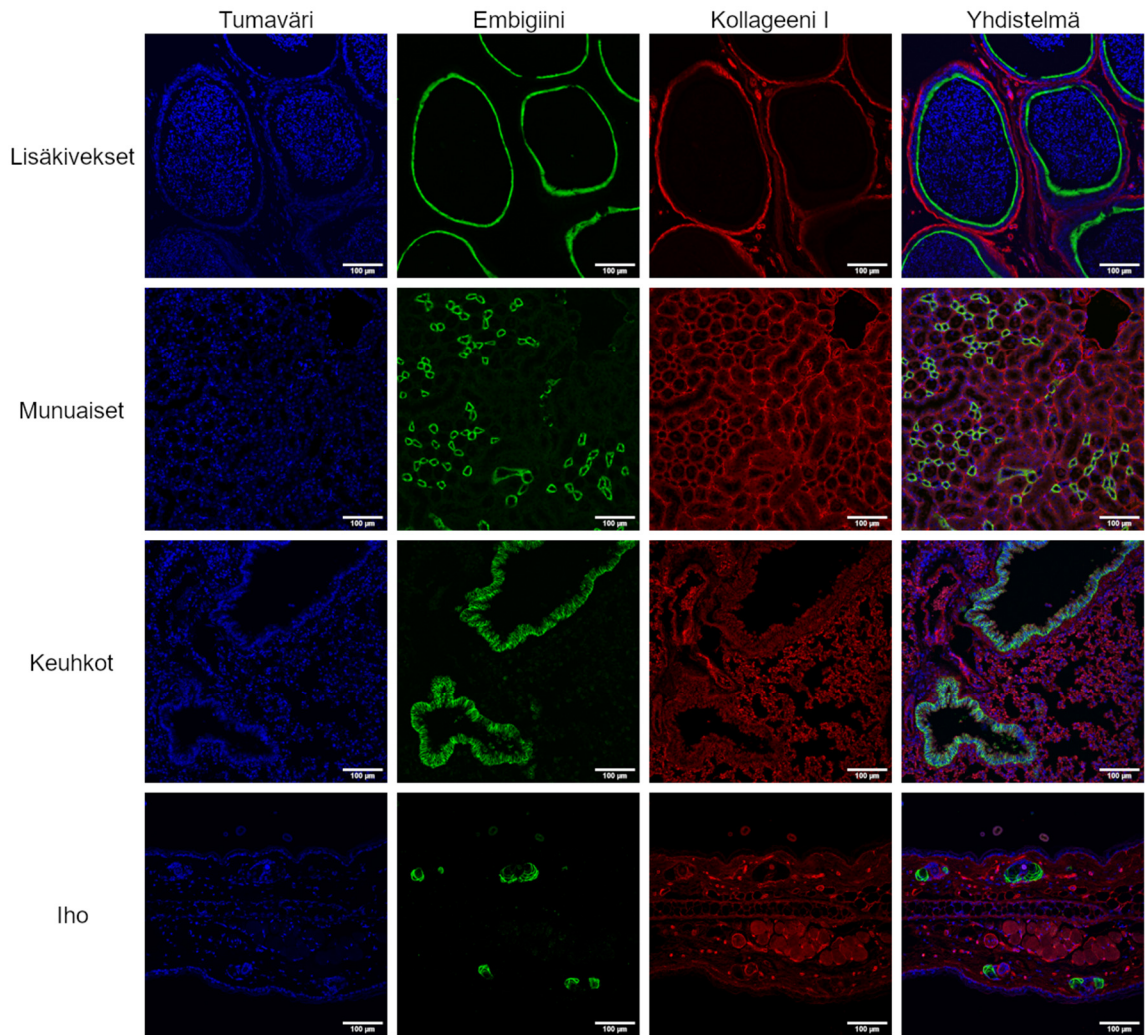
Embigiinin sijaintia hiirten elimissä tutkittiin immunovärjäämällä parafiiniin valetuista elimistä tehtyjä leikkeitä, jotka kuvattiin konfokaalimikroskoopilla. Leikkeistä värjättiin embigiinin lisäksi kollageeni I sekä solujen tumat. Embigiiniä havaittiin lisäkiveksissä, munuaisissa, keuhkoissa sekä ihossa (Kuva 11). Usein embigiiniä havaittiin näiden kudosten putkimaisten rakenteiden seinissä. Embigiiniä ei havaittu mikroskoopilla kiveksissä, lisämunuaisissa, maksassa, munasarjoissa, pernassa, sydämessä eikä ohutsuolessa.



**Kuva 9. Western blot (WB) sekä PCR analyysit RNA/protein kitillä käsitellyistä lisämunuaisista, munuaisista, lisäkiveksistä, ihosta, keuhkoista sekä munasarjoista. Kuvissa esitetynä koko näyte geelillä eroteltuna. Kuviin merkattu punaisella viivalla kokomarkkerien tärkeitä kohtia. WB analyyseissä  $\beta$ -tubuliini ( $\beta$ -TUB) bandin intensiteetin avulla arvioitiin näytteen onnistuneisuutta ja kokonaisproteiinimäärää. Embigiinin (EMB) odotetaan näkyvän western blotissa laajana tummana alueen noin 75 kDa kohdalla. PCR tuloksissa odotetun bandin koko oli noin 220 emäsparia.**



**Kuva 10. Western blot (WB) sekä PCR analyysit RNA/protein kitillä käsitellyistä pernasta, ohutsuolesta, maksasta, kiveksistä ja sydämeistä. Kuvissa esitettynä koko näyte geelillä eroteltuna. Kuviiin merkattu punaisella viivalla kokomarkkerien tärkeitä kohtia. WB analyysissä  $\beta$ -tubuliini ( $\beta$ -TUB) bandin intensiteetin avulla arvioitiin näytteen onnistuneisuutta ja kokonaisproteiinimäärää. Embigiinin (EMB) odotetaan näkyvän western blotissa laajana tummana alueen noin 75 kDa kohdalla. PCR tuloksissa odotetun bandin koko oli noin 220 emäsparia.**

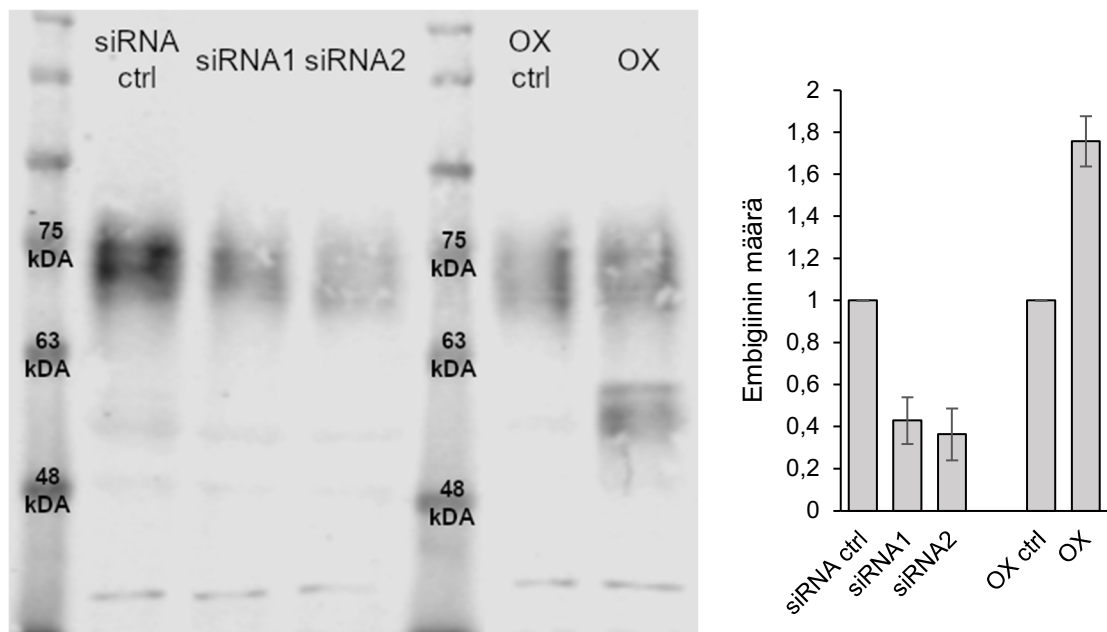


**Kuva 11: Elimistä tehtyjen leikkeiden immunovärjäys.** Embigiiniä havaittiin lisäkiveksissä, munuaisissa, keuhkoissa sekä ihossa. Havaittu embigiini sijaitsi usein kudosten putkimaisten rakenteiden seinämissä. Kuvien mittapalkki vastaa 100 µm.

#### 4.2 Embigiinin määrän vaikutus solun tarttuessa fibronektiiniin

Ryhmässämme tehdyn aikaisemman, vielä julkaisemattoman, tutkimuksen mukaan embigiini sitoutuu proteiinitasolla fibronektiiniin. Embigiinin osallistumista solun tarttumisessa fibronektiiniin lähdettiin tutkimaan endogeenistä embigiiniä ilmentävien hiiren keratinosyyttien avulla. Solujen embigiinitasoja laskettiin RNA-interferenssillä tai lisättiin tuottovektorilla. RNA-interferenssissä käytettiin vertailun vuoksi kahta reaktiota, joissa oli eri embigiini siRNA:t. siRNA käsittelyn todettiin laskevan embigiinin tuotantoa noin 60 prosentilla ja yliekspression nostavan sitä noin 80 prosentilla solun normaaliin embigiinitasoon verrattuna.

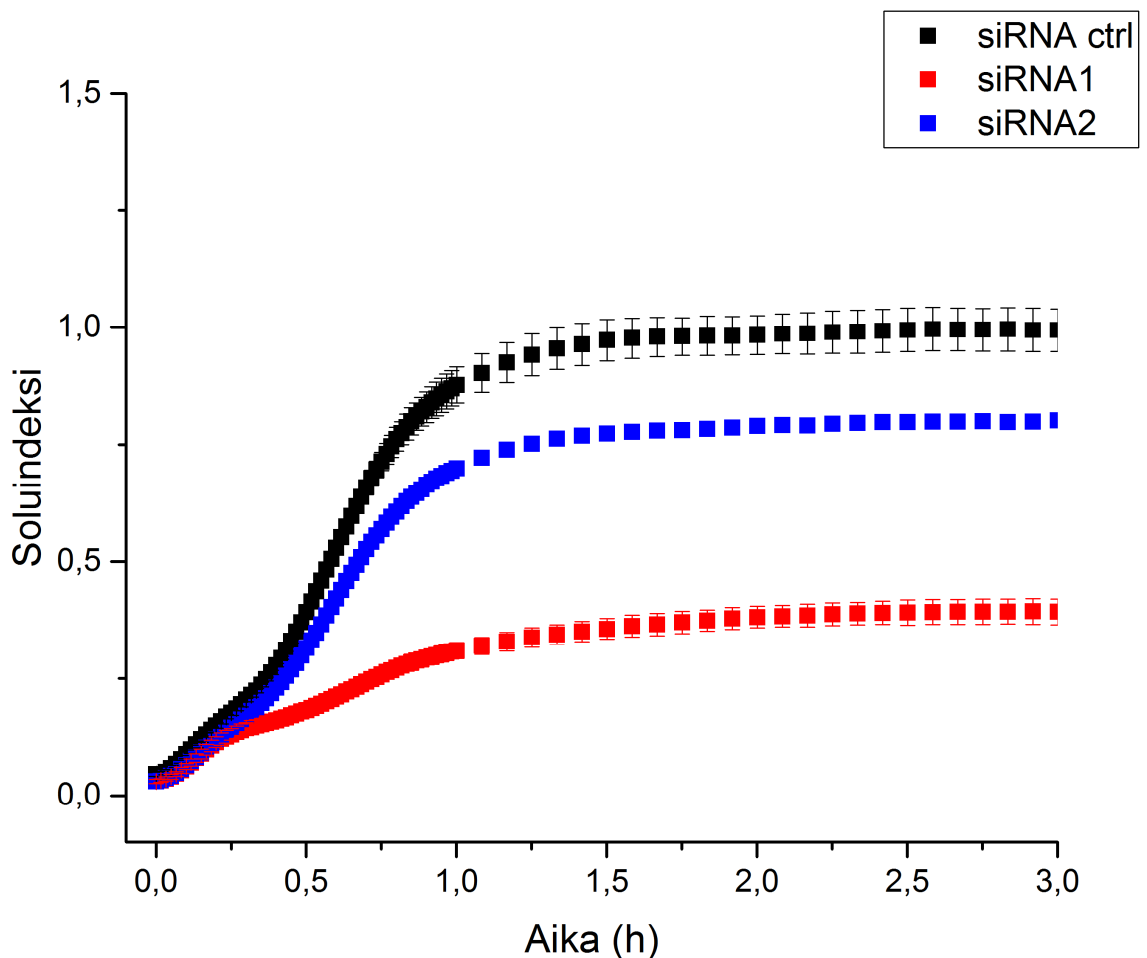
Transfektoidut solut irrotettiin noin 24 tuntia transfektion aloittamisen jälkeen EDTA:lla. Kokeessa ei käytetty trypsiiniä, sillä sen havaittiin vaikuttavan adheesiokokeissa solujen kykyyn sitoutua ympäristöönsä. Irrotettuja soluja laitettiin 15 000 per kaivo E-Plate 96 -kuoppalevylle, jonka kaivot oli päällystetty fibronektiinillä tai kontrolliksi BSA:lla. Loput soluista kerättiin talteen western blot -määrittystä varten, jossa embigiinin tasojen muutosten onnistuminen tarkistettiin (Kuva 12).



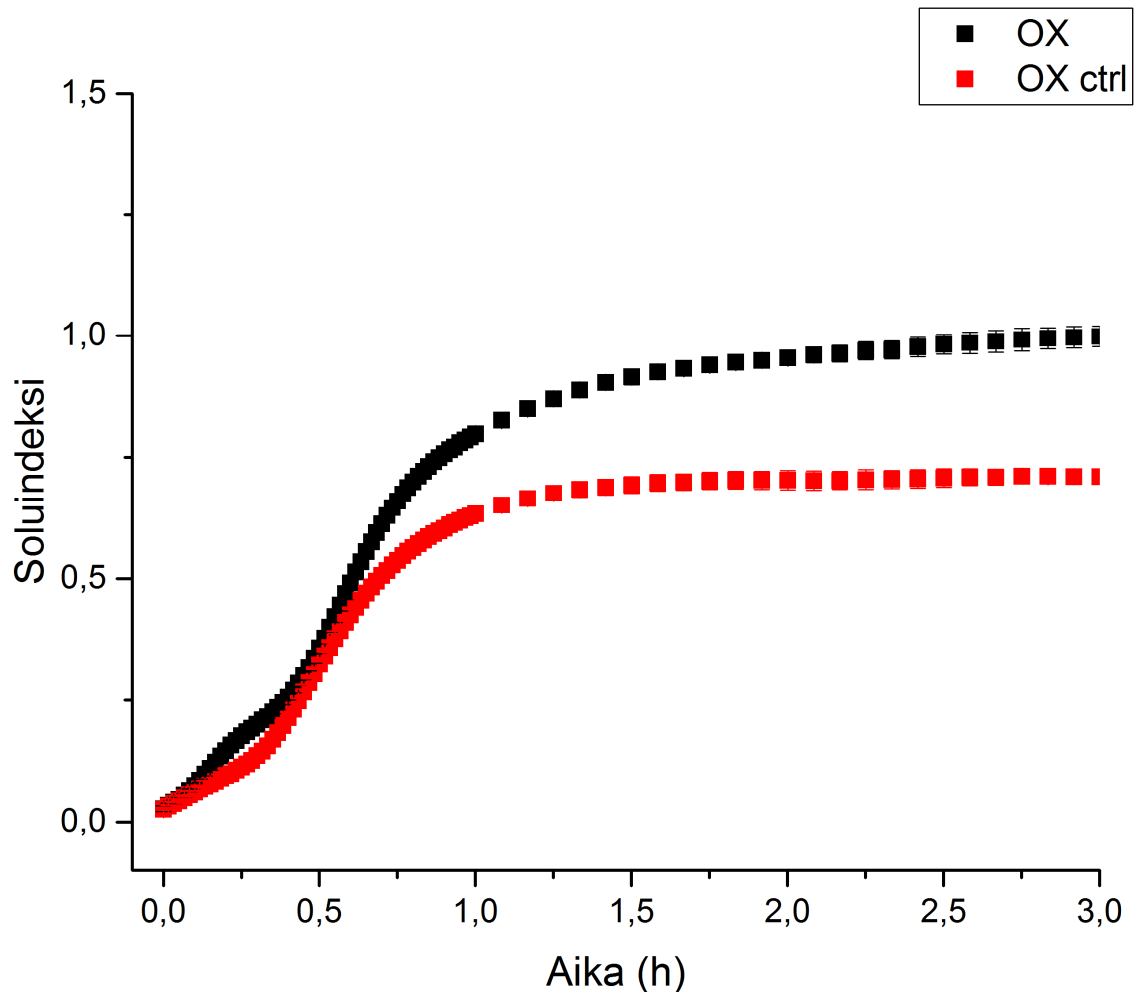
**Kuva 12. Embigiini siRNA:n ja tuottovektorin vaikutus embigiinitasoihin western blotissa.** Kvantitoidut embigiinin määrät on normalisoitu omiin kontrolleihinsa (ctrl) verrattuna. Embigiini nähdään western blotissa levinneenä vyöhykkeenä noin 75 kDa kohdalla. Leviäminen johtuu todennäköisesti embigiinin voimakkaasta glykolysoitavuudesta. Embigiinin hiljentämiseen käytettiin kahta eri siRNA:ta (siRNA 1 ja 2). Yliekspressioissa (OX) havaittiin myös toinen vyöhyke noin 50 kDa kohdalla, jonka uskotaan olevan embigiinin osittain glykosyloimaton muoto.

Kuoppalevy asetettiin xCELLigence-laitteeseen, joka mittaa solujen sitoutumisesta, leviämisestä ja jakautumisesta aiheutuvaa impedanssia. Laitteelle tarkoitetun kuoppalevyn ollessa laitteessa sen kuopissa kulkee heikko sähkövirta, jonka kulkemiseen solujen kiinnittyminen vaikuttaa. Solujen kiinnittymistä seurattiin vähintään neljän tunnin ajan kunnes soluista aiheutuva impedanssi oli tasaantunut. Embigiinin tuottoa vähennettäessä havaittiin

xCELLigence laitteen mittaaman arvon olevan puolen tunnin kohdalla kontrolliin verrattuna keskimäärin 37 % matalampi siRNA1:llä ja 33 % siRNA2:lla. Kahden tunnin kohdalla mitatut arvot olivat keskimäärin 52 % matalampia siRNA1:llä ja 27 % matalampia siRNA2:lla. (Kuva 13). Kun embigiinin tuottoa lisättiin, arvo oli kontrolliin verrattuna keskimäärin noin 24 % korkeampi puolen tunnin kohdalla ja 53 % korkeampi kahden tunnin kohdalla (Kuva 14). Erot todettiin tilastollisesti merkittäviksi. Yhden otoksen t-testillä yliekspression puolen tunnin ja kahden tunnin aikapisteiden p-arvoiksi saatiin 0,001. siRNA1:n ja siRNA2:n puolen tunnin aikapisteissä Wilcoxonin testiä käyttäen p-arvoiksi saatiin 0,001. Kahden tunnin kohdalla yhden otoksen t-testiä käyttäen p-arvoiksi saatiin siRNA1:lle <0,001 sekä siRNA2:lle 0,007.



**Kuva 13. Embigiinin tuoton vähennyksen vaikutus solun sitoutumisessa fibronectiiniin. Yksittäinen koe.** Solujen sitoutumisen fibronectiiniin huomattiin olevan heikompaa, kun embigiinin tuottoa vähennettiin RNA-interferenssillä. Soluindeksi mittaa solun tartumisesta, leviämisestä ja jakautumisesta syntyvää impedanssin muutosta.



**Kuva 14. Embigiinin tuoton lisäyksen vaikutus solun sitoutumisessa fibronectiiniin. Yksittäinen koe.** Embigiinin tuottoa lisättäessä yliekspressiolla (OX) solujen huomattiin sitoutuvan fibronectiiniin paremmin. Soluindeksi mittaa solun tartumisesta, leviämisestä ja jakautumisesta syntyvää impedanssin muutosta.

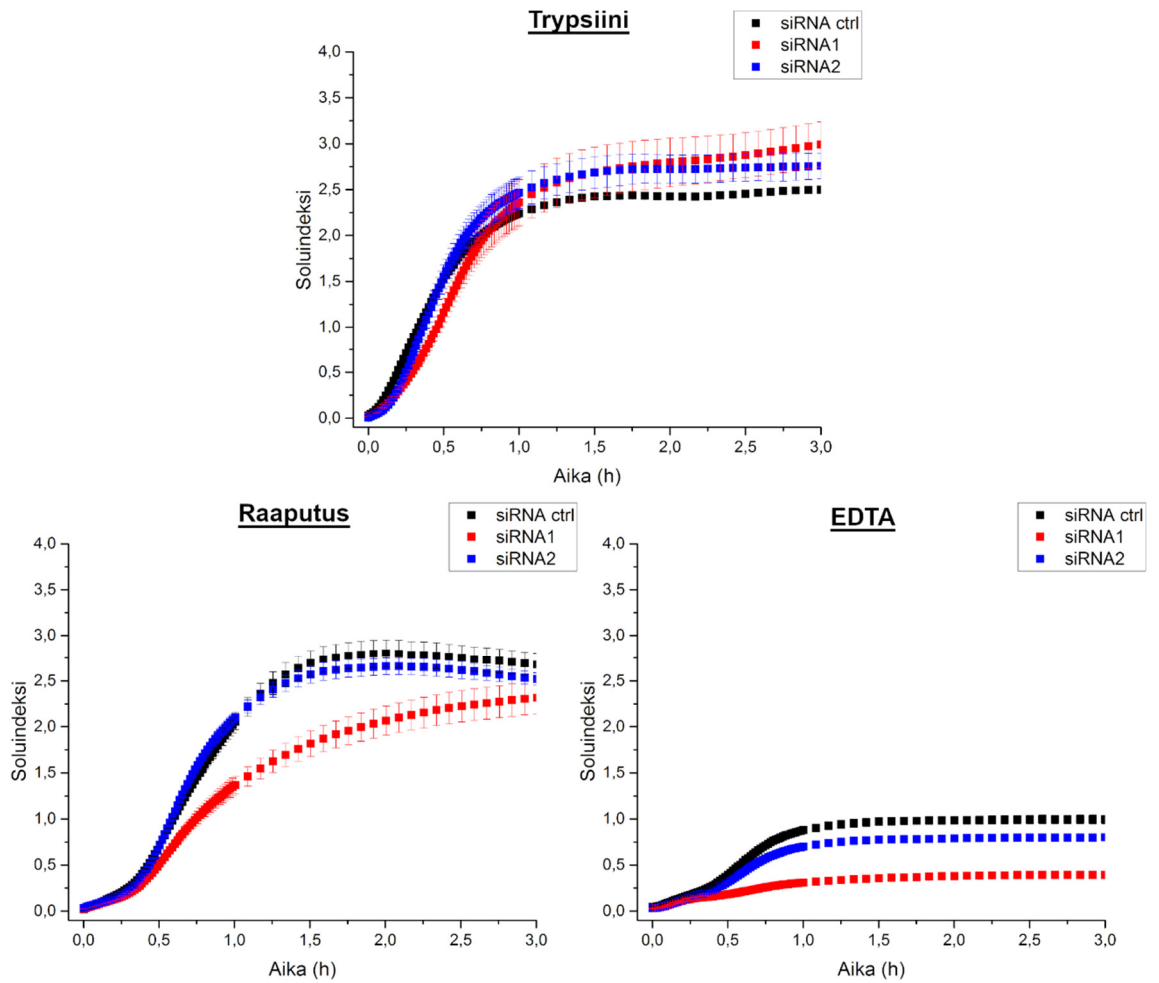
### 4.3 Embigiinin vaikutus solujen jakautumisessa

Embigiinin vaikutusta solujen jakautumiseen tutkittiin hiiren alkion fibroblasteihin perustuvan solulinjan avulla, johon oli pysyvästi transfektoitu embigiinin tuottovektori. Kontrollina käytettyjä soluja sekä soluja, joiden embigiinin tuotantoa oli lisätty, laitettiin sama määrä kuoppalevyille, jossa niiden annettiin jakautua noin 48 tunnin ajan. Tämän jälkeen solujen määrät laskettiin CCK-8 -reagenssilla. Solujen, joiden embigiinin tuotantoa oli lisätty, huomattiin kasvavan hitaammin, sillä niitä oli kahden päivän jälkeen noin 21 % vähemmän verrattuna kontrolliin. Ero todettiin tilastollisesti merkittäväksi.

#### **4.4 Solujen irrotukseen käytetyn tekniikan vaikutus**

xCELLigence kokeiden yhteydessä huomattiin, että solujen irrotustekniikalla on vaikutus solujen sitoutumiseen xCELLigence mittauksissa (Kuva 15). Aluksi solut irrotettiin yleisesti käytetyllä trypsiinillä. Koska solut eivät käyttäytyneet hypoteesin mukaisesti, irrotukseen kokeiltiin EDTA:ta, joka tuotti odotuksia vastaavia tuloksia. Lisäksi solujen irrotusta kokeiltiin raaputtamalla ne irti kasvatusmaljasta kumisella lastalla pelkässä PBS:ssä, ilman mitään irrotusta edistäviä aineita. Trypsiinin todettiin aiheuttavan solujen epänormaalin sitoutumisen, mikä johti embigiinin hiljentämisen tai yliekspression vaikutusten häviämiseen. Solujen irrotus EDTA:lla ja raaputtamalla tuotti toisiinsa verrattuna samanlaisen signaalin paitsi, että EDTA:ta käytettäessä signaali oli heikompi. Kokeissa päätettiin käyttää pääosin EDTA irrotusta, koska se arvioitiin hellemmäksi solujen kannalta.





**Kuva 15. Irrotustekniikan vaikutus solujen sitoutumiseen xCELLigence kokeissa.** Trypsiinin vaikutus solujen sitoutumiseen xCELLigence kokeissa, kun sitä käytettiin solujen irrottamiseen, näkyi näytteiden välisten erojen tasoittumisena sekä epäloogisina tuloksina. EDTA:n ja kumisen raaputtimen käyttö irrotuksessa johti toisiinsa verrattuna samanlaisiin tuloksiin, vaikka EDTA:ta käytettäessä signaali oli huomattavasti matalampi.

## 5 Tulosten tarkastelu

Embigiinistä aiemmin tehtyä tutkimusta on haitannut hyvien embigiini vasta-aineiden puute, minkä takia iso osa embigiinin määrään tai sijaintiin liittyvästä tutkimuksesta on perustunut erilaisiin RNA-menetelmiin. Tämä on myös rajoittanut muiden tutkimusmenetelmien käyttämistä. Tässä työssä käytetyn hiiren embigiinin vasta-aineen todettiin toimivan erinomaisella tarkkuudella lähes kaikissa menetelmissä, joissa sitä käytettiin. Tämä tulee todennäköisesti helpottamaan embigiinin tutkimista huomattavasti tulevaisuudessa ja mahdollistaa erilaisten tutkimusmenetelmien käytön.

### 5.1 Solujen irrotustekniikalla on vaikutus solujen sitoutumiseen

Adheesiokokeissa huomattiin solujen sitoutuvan eri tavalla riippuen siitä, miten ne irrotettiin ennen adheesiokokeen aloitusta. Trypsiinillä irrotettaessa eri solunäytteiden erot tasaantuivat ja ne vaikuttivat sitoutuvan ja selviytyvän seerumittomassa kasvatusmediumissa paremmin kuin muilla irrotustekniikoilla. Jälkiviisaana tuntuu selvältä, että trypsiinin käytöllä solujen irrotukseen juuri ennen adheesiokokeen aloitusta olisi vaikutus solujen sitoutumiseen, sillä trypsiiniliuoksen soluja irrottava vaikutus perustuu pääosin proteolyyysiin, joka hajottaa solujen pinnalla olevia proteiineja kuten soluadheesiomolekyylejä. Pitkällä aikavälillä, esimerkiksi solujen irrotuksessa niiden ylläpidon yhteydessä, trypsiinillä ei todennäköisesti ole vaikutusta solun sitoutumiseen sillä soluadheesiomolekyylit uusiutuvat eikä trypsiinin vaikutus siirry tytärsoluihin. Trypsiinillä on havaittu olevan vaikutusta solujen sitoutumiseen myös muissa tutkimuksissa. Esimerkiksi tutkimuksessa Miyata ja muut (2000) trypsiinin todettiin stimuloivan tutkittujen solujen jakautumista sekä niiden  $\alpha_5\beta_1$ -integroinien sitoutumista fibronektiiniin.

Solujen irrotusta kokeiltiin myös EDTA:lla sekä raaputtamalla soluja PBS:ssä. EDTA:lla irrotettaessa solut antoivat adheesiokokeissa matalamman signaalin kuin raaputtamalla irrotetut solut, mutta muuten tulokset muistuttivat toisiaan. EDTA:n vaikutus perustuu sen kykyyn kelatoida eri metalli-ioneja, kuten kalsium- sekä magnesiumioneja, joita integriinit käyttävät sitoutumiseen. Matalampi

signaali johtui mahdollisesti EDTA jäämistä, joita kulkeutui solususpension mukana, kun se pipetoitiin kuoppalevylle. Tämä jäämä mahdollisesti sisälsi tarpeeksi EDTA:ta häiritsemään integriinien sitoutumista, mikä johti matalaan signaaliin. Solususpensiota kuitenkin laimennettiin kasvatusmediumilla ja sentrifugoitiin, jonka jälkeen solupelletti liuotettiin kasvatusmediumiin, mikä laimensi EDTA pitoisuutta hyvin paljon.

Matalasta signaalista huolimatta EDTA valittiin paremmaksi irrotustekniikaksi. Matalan signaalin ei pitäisi huonontaa adheesiokokeiden tulosten laatua xCELLigence laitteen mittausherkkyyden takia. Solujen irrotus EDTA:lla tuntui raaputtamiseen verrattuna hellemmältä ja solut pysyivät paremmin erossa toisistaan EDTA:lla irrotettaessa, mikä teki niistä helpommin käsiteltäviä. Lisäksi immunoglobuliinisuperperheen soluadheesiomolekyylien sitoutuminen ei vaadi kalsium tai magneesiumioneita, kuten joidenkin muiden soluadheesiomolekyyliperheiden, minkä takia EDTA:n ei pitäisi häiritä embigiinin sitoutumista.

## **5.2 Embigiiniä on useissa hiiren elimissä**

Embigiinin sijainnin kartoitus hiiren elimistössä osoittautui hankalaksi näytteiden ja menetelmien tulosten välisten erojen takia. Sijaintia tutkittiin kudoksista eristetyistä proteiininäytteistä ja RNA-näytteistä. Lisäksi sitä tutkittiin myös immunovärjäyistä leikkeistä mikroskoopilla. Kaikilla näillä kolmella menetelmällä embigiiniä löydettiin ihosta, keuhkoista, lisäkiveksistä sekä munuaisista. Millään näistä kolmesta menetelmästä embigiiniä ei löydetty pernasta, maksasta ja sydäimestä. Vaikeasti tulkittavaksi osoittautuivat munasarjat, lisämunuaiset, ohutsuoli sekä kivekset, joista embigiiniä havaittiin vain yhdellä tai kahdella kolmesta menetelmästä. Munasarjoissa ja kiveksissä embigiiniä havaittiin molemmissa proteiininäytteissä sekä RNA-näytteissä mutta ei leikkeissä. Lisämunuaisissa embigiiniä havaittiin vain RNA-näytteissä ja ohutsuolessa vain proteiininäytteissä.

Tulosten epä johdonmukaisuus vaikeuttaa niiden tulkintaa. Tulosten toistaminen RNA- ja proteiininäytteiden eristykseen käytetyllä kitillä osoittautui hyvin

vaikeaksi. Kitin käyttö sisälsi useita kohtia, jotka loivat vaikeasti hallinnoitavia muuttujia, joiden takia näytteiden välinen vertailu oli vaikeaa. Muuttujia olivat esimerkiksi se mistä kohtaa elintä kudospala leikattiin, kuinka suuri osa kudoksesta milloinkin hajosi, vaikka hajotukseen käytetty aika ja voima pidettiin samana, sekä kuinka paljon proteiinia tai RNA:ta lopullisessa näytteessä oli. Kitillä saatujen proteiininäytteiden pitoisuuden mittaaminen ei ollut mahdollista ja se perustui lähinnä silmämääräiseen arvioon muodostuneen proteiinipelletin koon perusteella.

Käytetyn kitin luomien vaikeuksien lisäksi proteiininäytteiden tulkintaa vaikeutti embigiinin vahva glykosylaatio, minkä takia embigiini voi näkyä ”tahrana” (engl. smear band) yhden tarkkarajaisen bandin sijaan. Tämän lisäksi glykosylaatio säätelee embigiinin toimintaa ja on mahdollista, että eri elimissä embigiini on glykosyloitu eri tavoin, minkä takia embigiinin bandit tai bandit voivat olla eri paikoissa eri näytteissä. Vaihtoehtoisen glykosylaation on todettu säätelevän useita eri proteiineja kuten joitain soluadheesiomolekyylejä sekä esimerkiksi immunoglobuliini G:tä (katsausartikkelissa Gornik ja muut 2012).

Hyvällä varmuudella voi sanoa, että iho, keuhkot, lisäkivekset ja munuaiset sisältävät embigiiniä, sillä niissä sitä havaittiin kaikilla menetelmillä. RNA-näytteissä havaittu embigiini on teoriassa vahva tulos, sillä PCR on herkkä menetelmä ja RNA-näytteiden epäpuhtaudet johtavat todennäköisemmin PCR-reaktion epäonnistumiseen kuin väärän positiivisen tuloksen syntymiseen. Lisäksi PCR-reaktiossa tehdyt positiiviset sekä negatiiviset kontrollit tekevät vääristä positiivista tuloksista vielä epätodennäköisempiä. Embigiini poistogeenisten hiiren elimistä eristettiin proteiininäytteet embigiinin löytämisen helpottamiseksi vertaamalla poistogeenistä ja villityypin näytettä, mutta edellä mainittujen toistettavuusongelmien sekä vasta-aineen mahdollisen epäspesifisen sitoutumisen takia näytteiden vertailu oli edelleen vaikeaa.

Embigiinin sijaintia on tutkittu ainakin kahdessa julkaistussa tutkimuksessa (taulukko 1). Huang ja muut (1990) artikkelissa embigiinin sijaintia hiiren elimissä tutkittiin RNA:n havaitsemiseen perustuvalla northern blot -menetelmällä. Artikkelissa tutkituista täysikasvuisen hiiren elimistä tutkittiin myös tässä työssä tutkitut perna, kivekset, munuaiset, maksa, sydän, ohutsuoli sekä munasarjat.

Artikkelissa tutkittiin myös aivot sekä poikkijuovainen lihas, mutta siitä puuttuivat tässä työssä tutkitut lisämunuaiset, lisäkivekset, iho sekä keuhkot. Huang ryhmineen totesi kaikkien testattujen elinten, maksaa lukuun ottamatta, ilmentävän embigiiniä, vaikka mRNA:n määrät olivat hyvin matalia. Artikkelin tulokset vastaavat työssä saatujen RNA-näytteiden tuloksia kivesten, munuaisten ja munasarjojen kohdalla, joissa embigiiniä havaittiin, sekä maksan kohdalla, jossa ei havaittu embigiiniä. Ohutsuolen, pernan sekä sydämen tulokset poikkeavat toisistaan.

**Taulukko 1. Embigiinin sijainti täysikasvuisen hiiren elimissä eri lähteiden tuloksien mukaan.** Elimet, joissa havaittiin embigiiniä, on merkattu ympyrällä (O) ja elimet, joissa sitä ei havaittu, on merkattu vinoristillä (X). Jos elintä ei tutkittu lähteessä, se on merkattu viivalla (—). Omista tuloksista on ilmoitettu kaikki kolme käytettyä menetelmää: RNA-näytteet, proteiininäytteet sekä immunofluoresenssimikroskopiolla (IFMS) tutkitut leikkeet.

Elin	Omat tulokset	Huang ja	Guenette ja
	RNA/Proteiini/IFMS	muut (1990)	muut (1997)
Aivot	—	O	O
Iho	O/O/O	—	—
Keuhkot	O/O/O	—	O
Kivekset	O/O/X	O	O
Lisäkivekset	O/O/O	—	—
Lisämunuainen	O/X/X	—	—
Maksa	X/X/X	X	O
Munasarjat	O/O/X	O	—
Munuaiset	O/O/O	O	O
Ohutsuoli	X/O/X	O	—
Perna	X/X/X	O	—
Poikkijuovainen lihas	—	O	—
Rakkularauhanen	—	—	O
Sydän	X/X/X	O	O

Myös artikkelissa Guenette ja muut (1997) tutkittiin embigiinin ilmentymistä täysikasvuisen hiiren elimissä, tässä tapauksessa RT-PCR menetelmällä. Embigiiniä havaittiin kaikissa tutkituissa elimissä, joihin kuuluivat kivekset, munuaiset, aivot, sydän, maksa, keuhkot sekä rakkularauhanen. Tämä poikkeaa työssä saaduista tuloksista jälleen sydämen kohdalla sekä maksan kohdalla. Aiemmissä tutkimuksissa, joissa on tutkittu embigiinin ilmentymistä, on tutkittu vain, miten se näkyy RNA:ssa. Aikaisempiin tutkimuksiin verrattuna, tälle tutkimukselle tuo lisäarvoa embigiini vasta-aineen käyttö, mikä laajentaa näkökulmaa siihen, miten varsinainen embigiini proteiini näkyy kudoksissa.

Mitä tämä kaikki sitten tarkoittaa yhteen laitettuna? Näillä näkymin kaikki tulokset osoittavat siihen, että tässä työssä käsitellyissä hiiren elimissä iho, keuhkot, lisäkivekset sekä munuaiset sisältävät embigiiniä. Muiden käsiteltyjen elinten kohdalla tuloksissa on enemmän tulkinnanvaraa. On kuitenkin todennäköistä, että embigiiniä löytyy myös munasarjoista sekä kiveksistä sillä, vaikka niissä havaittiin embigiiniä vain RNA- ja proteiininäytteissä, muiden tutkimusten tulokset osoittavat samaan suuntaan. Maksassa taas ei todennäköisesti ilmennyt embigiiniä.

Loppujen elinten kohdalla tilanne vaatii lisää tutkimusta. Ohutsuolessa embigiiniä havaittiin vain proteiininäytteissä, mikä voi olla vain vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista. Toisaalta, koska Huang ryhmineen havaitsi embigiiniä ohutsuolessa, on myös mahdollista, että RNA-näytteiden negatiivinen tulos on väärä. Ohutsuolen tapauksessa leikkeiden tarkastelu mikroskooppisesti on hankalaa suolen suuren koon takia, mikä voi selittää, miksi sitä ei havaittu kyseisellä menetelmällä. Kyse voi olla siitä, että embigiiniä ilmenee vain tietyssä osassa ohutsuolta, jota ei sattumalta käsitelty tämän työn yhteydessä. Esimerkiksi lisäkiveksissä embigiiniä havaittiin vain tietyssä osassa elintä. Sama teoria voi selittää myös, miksi sydäimestä tai pernasta ei havaittu embigiiniä, vaikka muissa tutkimuksissa sitä havaittiin. Lisämunuaisen kohdalla ongelmana voi olla lisämunuaisen pieni koko. Käsitellyt lisämunuaiset painoivat noin 2-6 mg, minkä takia on mahdollista, että niissä on liian vähän embigiiniä työssä käytetyn kitin sekä western blot menetelmän luotettavasti havaittavaksi. Tämä voisi myös selittää kuvassa 9 nähdyn normaalia himmeämmän bandin lisämunuaisten PCR-tuloksessa.

Embigiinin funktiosta ei saatu konkreettista tietoa elimistökartoituksen yhteydessä. On kuitenkin mielenkiintoista, että embigiiniä löytyy monista lisääntymiselimistön osista sekä uroksissa että naaraissa. Tämä saattaa viitata embigiinin toimiseen lisääntymiseen liittyvissä prosesseissa. Joitain viitteitä embigiinin osallistumisesta siittiöiden muodostumiseen on löydetty aikaisempien tutkimusten mukaan (Mannowetz ja muut 2012). Tämän lisäksi immunovärjätyissä leikkeissä embigiinin todettiin sijaitsevan lähinnä erilaisissa putkirakenteissa. Esimerkiksi lisäkiveksissä embigiiniä havaittiin vain sen häntäosassa (*cauda*) olevissa putkissa eikä ollenkaan sen keskiosassa (*corpus*) tai pääosassa (*caput*). Pääosaan saapuessaan siittiöt eivät pysty liikkumaan itsenäisesti eivätkä pysty hedelmöittämään munasolua. Siittiöt kypsyvät kulkiessaan päästä häntään, jossa kypsät siittiöt säilyvät. (katsausartikkelissa Jones, R. C. 1999.) Embigiinin löytyminen vain häntäosasta voi viitata embigiinin rooliin siittiöiden kehittämisessä kuten artikkelissa Mannowetz ja muut (2012) epäiltiin. Lisäkiveksen lisäksi embigiiniä havaittiin keuhkojen ilmatiehyiden seinämissä sekä munuaisissa olevissa pienissä putkissa. Ihossa embigiiniä havaittiin talirauhasten yhteydessä.

### **5.3 Embigiini vaikuttaa todennäköisesti solujen jakautumiseen**

Ensimmäiset havainnot embigiinin vaikutuksesta solujen kasvuun tulivat embigiiniä stabiilisti yliekspressoivista solulinjoista, jotka normaalin ylläpidon aikana vaikuttivat jakautuvan hieman hitaammin saman solulinjan villityyppiin verrattuna. Sama vaikutus havaittiin varsinaisissa kokeissa, joissa embigiinin yliekspressio hidasti kasvua hieman. Tulosta heikentää toistojen välinen hajonta. Vaikka tulos todettiin tilastollisesti merkittäväksi, teknisten replikaattien keskiarvojen hajonta oli joissain näytteissä suurempaa kuin biologisten replikaattien hajonta. Tämä kertoo mahdollisesta menetelmän tai koejärjestelyn epäluotettavuudesta. Hajonta johtuu todennäköisesti solumäärän vaikeasta määrittämisestä koetta aloitettaessa. Käytetty menetelmä perustui solujen määrän laskuun, mikä tekee kriittisen tärkeää siitä, että jokaisessa rinnakkaisnäytteessä olisi saman verran soluja lähtöpisteessä. Pieni ero solujen määrässä lähtöpisteessä, johtaa solujen jakautuessa mahdollisesti jopa

eksponentiaalisiin eroihin solujen määrässä, mikä helposti suurentaa hajontaa. Solumäärän tarkasta määrittämisestä teki vaikeaa solujen taipumus muodostaa rykelmiä, jotka vääristivät solumäärien laskuja ja solujen määrää kokeen alkupisteessä kuoppalevyille laitettaessa.

Kokeissa embigiinin yliekspression kuitenkin huomattiin hidastavan hiiren alkion fibroblastien (solulinja NIH3T3) jakautumista. Muiden tutkimusten tulokset embigiinin vaikutuksesta solujen kasvuun ovat ristiriitaiset. Chao ja muut (2015) havaitsivat embigiinin hiljentämisen lisäävän ihmisen rintakasvaimen solujen (solulinja MCF10A) jakautumista, mikä vastaa tässä työssä saatua tulosta. Artikkelissa Ruma ja muut (2018) ihmisen eturauhassyöpäsoluissa (solulinja DU145) embigiinin yliekspression havaittiin lisäävän ja hiljentämisen vähentävän solujen jakautumista, mikä ei vastaa tässä työssä saatua tulosta.

Mielenkiintoisesti Ruma ja muut huomasivat tutkimuksessaan, että pelkän embigiinin solunsisäisen hännän yliekspressio soluissa vähensi solujen jakautumista. Tämän uskotaan johtuvan vapaan solunsisäisen hännän kilpailevasta sitoutumisesta embigiinin kanssa toimiviin signaalintiproteiineihin, mikä johtaa kokonaisen embigiinin välittämien signaalien inhiboimiseen ja siten kasvun hidastumiseen. Tässä työssä tehdyissä western bloteissa, kuten kuvassa 11, soluissa, joissa embigiiniä yliekspressoitiin, havaittiin normaalin embigiini alueen lisäksi toinen massaltaan pienempi noin 55 kDa kohdalla oleva alue, johon embigiini vasta-aine tarttui. On mahdollista, että tällä kooltaan pienemmällä embigiinillä on samalaisia vaikutuksia, kuin mitä Ruma ja muut havaitsivat embigiinin pelkällä hännällä olevan. Tätä tukevia huomioita tehtiin myös sitoutumiskokeiden yhteydessä, joista tarkemmin niiden omassa osiossa.

#### **5.4 Embigiini osallistuu solujen sitoutumisessa fibronektiiniin**

Ryhmässämme tehdyn vielä julkaisemattomien tutkimusten mukaan embigiini sitoutuu fibronektiiniin proteiinitasolla ja tämän työn tulosten perusteella se sitoutuu näin myös solutasolla. Kokeissa käytettiin kahta eri embigiini siRNA:ta tulosten varmistamiseksi. Toisen siRNA:n kohdalla vaikutus sitoutumiseen havaittiin jokaisessa kokeessa, mutta toisen kohdalla vain osassa. Kokeissa



käytetyillä soluilla tehdyissä western bloteissa molempien embigiini siRNA-molekyylien kuitenkin todettiin vähentäneen embigiinin määrää suunnilleen samoissa määrin, mikä tekee eroista siRNA-molekyylien välillä erikoisia. Yliekspressiossa havaittu ero kontrollin ja embigiinin välillä on pieni verrattuna hiljennyksessä havaittuun eroon. Tämä johtuu todennäköisesti matalasta transfektioprosentista, sillä käytetyt solut olivat vain väliaikaisesti transfektoituja. Kaikki erot havaittiin kuitenkin tilastollisesti merkittäviksi.

Ennen adheesiokokeiden aloitusta soluja laskettaessa huomattiin, että säännöllisemmin vaikuttavalla siRNA1:llä käsitellyjä soluja oli usein 10-20 % vähemmän kuin kontrollissa. On mahdollista, että kyseinen siRNA toimii osittain epäspesifisesti, mikä johti solujen hitaampaan jakautumiseen ja heikompaan sitoutumiseen. Embigiinitasojen kuitenkin todettiin aina olevan alhaisempia siRNA:lla käsitellyissä soluissa molempien siRNA-molekyylien kohdalla, mikä kertoo siRNA:n toimivan oikein. Onkin myös mahdollista, että epäspesifisen sitoutumisen sijaan embigiinin hiljennys aiheutti solujen heikomman jakautumisen niin kuin joissain muissa tutkimuksissa on havaittu. Tätä tukee embigiini yliekspressiossa havaittu sitoutumisen lisääntyminen. Havainnot tehtiin myös eri solulinjoissa ja on mahdollista, että ne reagoivat eri tavalla embigiinin määrän vaihteluun.

Mielenkiintoisesti kasvussa huomattu ero on päinvastainen huomio aikaisemmin kertomieni kasvatuskokeiden tuloksiin verrattuna. Kyseessä voi kuitenkin olla ”ylimääräisen” embigiinin vaikutuksesta, jonka aikaisemmin mainitsin liittyen tuloksiin artikkelissa Ruma ja muut (2018), jossa vapaan solunsisäisen embigiinin hännän huomattiin hidastavan solujen kasvua. Tämä tukisi teoriaa, jossa yliekspressiossa havaittu pienempi embigiini häiritsee embigiinin normaalia toimintaa ja peittää alleen embigiinin normaalin solujen kasvua tehostavan vaikutuksen. Tästä on kuitenkin mahdoton vetää johtopäätöksiä ilman jatkotutkimuksia.

Embigiinin sitoutumiseen liittyen ei ole aiemmin julkaistu montaa tutkimusta. Huang ja muut (1993) tutkivat sitoutumista tarkkailemalla, miten hiiren L-solut sitoutuivat ja sitten laskemalla tietyssä ajassa sitoutuneiden solujen määrän. Solujen huomattiin tarttuvan hyvin fibronektiinillä päällystettyyn ja huonosti

esimerkiksi kollageeni I:llä päällystettyyn kasvatusalustaan, mikä vastaa tässä työssä saatuja tuloksia. Huang ja muut totesivat embigiinin toimivan joko pääosaisena molekyylinä sitoutumisessa tai apumolekyylinä toiselle soluadheesiomolekyylille. Huang ryhmineen piti jälkimmäistä vaihtoehtoa todennäköisempänä, koska integriinit vastaavat tyypillisesti solujen sitoutumisesta soluväliaineen proteiineihin. He arvelivat embigiinin toimivan avustavassa roolissa helpottaen integriinien sitoutumista tilanteissa, joissa solun ympäristössä on vain vähän soluväliaineen proteiineja. Tässä työssä saadut tulokset eivät kumoa mahdollisuutta integriinien ja embigiinin välisestä yhteystyöstä, mutta tulosten perusteella näyttää vahvasti siltä, että embigiini osallistuu suoraan sitoutumiseen fibronectiiniin.

## 6. Päätelmät

Tässä työssä embigiinin todettiin osallistuvan solun ja soluväliaineen proteiinin fibronektiinin väliseen sitoutumiseen. Tämän lisäksi embigiinillä huomattiin olevan vaikutus solujen jakautumiseen. Kokeissa vaikutuksen todettiin olevan jakautumisen hidastaminen, mutta muissa kokeissa tehtyjen huomioiden ja muun kirjallisuuden perusteella vaikutus voikin olla jakautumisen lisääntyminen. Asia vaatii lisää tutkimusta tulevaisuudessa esimerkiksi tekemällä embigiini poistogeenisen solulinjan ja tarkkailemalla sen kasvua. Embigiiniä havaittiin useissa aikuisen hiiren elimissä ja sen huomattiin olevan usein osana erilaisia putkimaisia rakenteita. Sijaintinsa perusteella embigiini saattaa olla osana siittiöiden kypsyntiprosessia.

Embigiinistä tiedetään edelleen hyvin vähän. Tulevaisuudessa on mielestäni tärkeää keskittyä sen vaikutuksiin solun aineenvaihdunnassa ja sen jakautumisessa. Embigiinin on havaittu mahdollisesti vaikuttavan näihin prosesseihin ja niiden tutkiminen voisi tuoda monia konkreettisia hyötyjä esimerkiksi syöpätutkimuksessa, jossa embigiini voisi toimia mahdollisena biomarkkerina. Toinen mielenkiintoinen tutkimuskohde embigiiniin liittyen on sen glykosylaatio. Embigiini on vahvasti glykosyloitu, mikä todennäköisesti vaikuttaa sen toiminnan säätelyyn. Työn aikana glykosylaation nähtiin käyttäytyvän erikoisesti esimerkiksi soluissa, joissa embigiinin tuotantoa oli lisätty. Lisäksi elimistä eristettyjen proteiininäytteiden mukaan embigiini on mahdollisesti glykosyloitu eri tavalla eri elimissä.

## Lähteet

Abedin, M. & King, N. (2010) Diverse evolutionary paths to cell adhesion. *Trends Cell Biol* **20**:734-742.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition, Garland Science.

Arai, F., Hosokawa, K., Toyama, H., Matsumoto, Y. and Suda, T. (2012) Role of N-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. In *Hematopoietic Stem Cells VIII* ed. Kanz, L., Fibbe, W.E., Lengerke, C. and Dick, J.E., Blackwell Science Publ, Oxford pp. 72-77.

Beauvais-Jouneau, A. & Thiery, J.P. (1997) Multiple roles for integrins during development. *Biol Cell* **89**:5-11.

Becker, D.J. & Lowe, J.B. (1999) Leukocyte adhesion deficiency type II. *Biochim Biophys Acta* **1455**:193-204.

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

Bendas, G. & Borsig, L. (2012) Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol* **2012**:676731.

Bhella, D. (2015) The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**.

Brown, K.E. & Yamada, K.M. (1995) The role of integrins during vertebrate development. *Seminars in Developmental Biology* **6**:69-77.

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

Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., Ley, K. & Laudanna, C. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* **7**:678-689.

Engelhardt, B. & Wolburg, H. (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* **34**:2955-2963.

Etzioni, A. (2014) Leukocyte adhesion deficiency III - when integrins activation fails. *J Clin Immunol* **34**:900-903.

- Fan, Q.W., Kadomatsu, K., Uchimura, K. & Muramatsu, T. (1998) Embigin/basigin subgroup of the immunoglobulin superfamily: Different modes of expression during mouse embryogenesis and correlated expression with carbohydrate antigenic markers. *Dev Growth Diff* **40**:277-286.
- Getsios, S., Simpson, C.L., Kojima, S., Harmon, R., Sheu, L.J., Dusek, R.L., Cornwell, M. & Green, K.J. (2009) Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *J Cell Biol* **185**:1243-1258.
- Goodison, S., Urquidi, V. & Tarin, D. (1999) CD44 cell adhesion molecules. *J Clin Pathol -Mol Pathol* **52**:189-196.
- Gornik, O., Pavić, T. & Lauc, G. (2012) Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* **1820**:1318-1326.
- Guenette, R.S., Sridhar, S., Herley, M., Mooibroek, M., Wong, P. & Tenniswood, M. (1997) Embigin, a developmentally expressed member of the immunoglobulin superfamily, is also expressed during regression of prostate and mammary gland. *Dev Genet* **21**:268-278.
- Gumbiner, B.M. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**:622-634.
- Harjunpää, H., Lloret Asens, M., Guenther, C. & Fagerholm, S.C. (2019) Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol* **10**.
- Hernández, J.L., Padilla, L., Dakhel, S., Coll, T., Hervas, R., Adan, J., Masa, M., Mitjans, F., Martinez, J.M., Coma, S., Rodríguez, L., Noé, V., Ciudad, C.J., Blasco, F. & Messeguer, R. (2013) Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody. *PLoS ONE* **8**:e72480.
- Heuberger, J. & Birchmeier, W. (2010) Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**:a002915.
- Huang, R.P., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1990) Developmentally Regulated Expression of Embigin, a Member of the Immunoglobulin Superfamily Found in Embryonal Carcinoma-Cells. *Differentiation* **45**:76-83.
- Huang, R.P., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1993) Embigin, a member of the immunoglobulin superfamily expressed in embryonic cells, enhances cell-substratum adhesion. *Dev Biol* **155**:307-314.
- Hynes, R.O. & Zhao, Q. (2000) The Evolution of Cell Adhesion. *J Cell Biol* **150**:89-96.

Jizhong Lou, Tadayuki Yago, Arkadiusz G. Klopocki, Padmaja Mehta, Wei Chen, Veronika I. Zarnitsyna, Nicolai V. Bovin, Cheng Zhu & Rodger P. McEver (2006) Flow-Enhanced Adhesion Regulated by a Selectin Interdomain Hinge. *The Journal of Cell Biology* **174**:1107-1117.

Jones, M.C., Askari, J.A., Humphries, J.D. & Humphries, M.J. (2018) Cell adhesion is regulated by CDK1 during the cell cycle. *J Cell Biol* **217**:3203-3218.

Jones, R.C. (1999) To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Androl* **22**:57-67.

Juliano, R.L. (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**:283-323.

Jung, D.E., Kim, J.M., Kim, C. & Song, S.Y. (2016) Embigin is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF- pathway. *Mol Carcinog* **55**:633-645.

Kansas, G.S. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**:3259-3287.

King, N., Hittinger, C.T. & Carroll, S.B. (2003) Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* **301**:361-363.

Kodaka, M. & Hata, Y. (2015) The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell Mol Life Sci* **72**:285-306.

Lain, E., Carnejac, S., Escher, P., Wilson, M.C., Lomo, T., Gajendran, N. & Brenner, H.R. (2009) A Novel Role for Embigin to Promote Sprouting of Motor Nerve Terminals at the Neuromuscular Junction. *J Biol Chem* **284**:8921-8930.

Lasky, L.A. (1992) Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* **258**:964-969.

Li, L., Bennett, S.A.L. & Wang, L. (2012) Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr* **6**:59-70.

Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A. & Du, X. (2010) Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**:2341-2349.

Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J. & Warnaar, S.O. (1994) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology* **125**:437-446.

Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., Kieu, C., Papior, P., Baeuerle, P.A., Munz, M. & Gires, O. (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature cell biology* **11**:162-171.

- Maître, J. & Heisenberg, C. (2013) Three Functions of Cadherins in Cell Adhesion. *Curr Biol* **23**:R626-R633.
- Mannowetz, N., Wandernoth, P. & Wennemuth, G. (2012) Basigin interacts with both MCT1 and MCT2 in murine spermatozoa. *J Cell Physiol* **227**:2154-2162.
- Marie, P., Haÿ, E., Modrowski, D., Revollo, L., Mbalaviele, G. & Civitelli, R. (2014) Cadherin-Mediated Cell–Cell Adhesion and Signaling in the Skeleton. *Calcif Tissue Int* **94**:46-54.
- McClatchey, A.I. & Yap, A.S. (2012) Contact inhibition (of proliferation) redux. *Curr Opin Cell Biol* **24**:685-694.
- Millan, J. & Ridley, A.J. (2005) Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodelling. *Biochem J* **385**:329-337.
- Milstone, D.S., O'Donnell, P.E., Stavrakis, G., Mortensen, R.M. & Davis, V.M. (2000) E-selectin Expression and Stimulation by Inflammatory Mediators are Developmentally Regulated during Embryogenesis. *Laboratory Investigation* **80**:943-954.
- Miyata, S., Koshikawa, N., Yasumitsu, H. & Miyazaki, K. (2000) Trypsin stimulates integrin alpha(5)beta(1)-dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* **275**:4592-4598.
- Munz, M., Baeuerle, P.A. & Gires, O. (2009) The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Res* **69**:5627-5629.
- Okegawa, T., Pong, R., Li, Y. & Hsieh, J. (2004) The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. *Acta Biochim Pol* **51**:445-457.
- Ozawa, M., Huang, R.P., Furukawa, T. & Muramatsu, T. (1988) A teratocarcinoma glycoprotein carrying a developmentally regulated carbohydrate marker is a member of the immunoglobulin gene superfamily. *J Biol Chem* **263**:3059-3062.
- Pennisi, E. (2018) The momentous transition to multicellular life may not have been so hard after all. **2019**.
- Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P.A. (2003) CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:33-45.
- Ratcliff, W.C., Denison, R.F., Borrello, M. & Travisano, M. (2012) Experimental evolution of multicellularity. *PNAS* **109**:1595-1600.
- Robertson, J., Jacquemet, G., Byron, A., Jones, M.C., Warwood, S., Selley, J.N., Knight, D., Humphries, J.D. & Humphries, M.J. (2015) Defining the

phospho-adhesome through the phosphoproteomic analysis of integrin signalling. *Nature communications* **6**:6265.

Ruma, I.M.W., Kinoshita, R., Tomonobu, N., Inoue, Y., Kondo, E., Yamauchi, A., Sato, H., Sumardika, I.W., Chen, Y., Yamamoto, K., Murata, H., Toyooka, S., Nishibori, M. & Sakaguchi, M. (2018) Embigin Promotes Prostate Cancer Progression by S100A4-Dependent and-Independent Mechanisms. *Cancers* **10**:239.

Schulze, A., Zerfass-Thome, K., Bergès, J., Middendorp, S., Jansen-Dürr, P. & Henglein, B. (1996) Anchorage-dependent transcription of the cyclin A gene. *Molecular and cellular biology* **16**:4632-4638.

Shapiro, L. & Weis, W.I. (2009) Structure and Biochemistry of Cadherins and Catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**.

Silberstein, L., Goncalves, K., Kharchenko, P., Turcotte, R., Kfoury, Y., Mercier, F., Baryawno, N., Severe, N., Bachand, J., Spencer, J., Papazian, A., Lee, D., Chitteti, B., Srour, E., Hoggatt, J., Tate, T., Lo Celso, C., Ono, N., Nutt, S., Heino, J., Sipilä, K., Shioda, T., Osawa, M., Lin, C., Hu, G. & Scadden, D. (2016) Proximity-Based Differential Single-Cell Analysis of the Niche to Identify Stem/Progenitor Cell Regulators. *Cell Stem Cell* **19**:530-543.

Silva, M., Videira, P.A. & Sackstein, R. (2017) E-Selectin Ligands in the Human Mononuclear Phagocyte System: Implications for Infection, Inflammation, and Immunotherapy. *Front Immunol* **8**:1878.

Simon, S.I., Cherapanov, V., Nadra, I., Waddell, T.K., Seo, S.M., Wang, Q., Doerschuk, C.M. & Downey, G.P. (1999) Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18. *J Immunol* **163**:2891-2901.

Takada, Y. (1994) Integrins, CRC Press, Boca Raton u.a.

Takada, Y., Ye, X. & Simon, S. (2007) The integrins. *Genome Biol* **8**:215.

Takagi, J., Petre, B.M., Walz, T. & Springer, T.A. (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**:599-511.

Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W. & Ogita, H. (2008) Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:603-615.

van Roy, F. & Berx, G. (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* **65**:3756-3788.

Vleminckx, K. & Kemler, R. (1999) Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays* **21**:211-220.



Wai Wong, C., Dye, D.E. & Coombe, D.R. (2012) The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis. *International journal of cell biology* **2012**:340296-9.

Waldron, T.T., Springer, T.A. & Phan, U.T. (2006) Remodeling of the lectin-EGF-like domain interface in P- and L-selectin increases adhesiveness and shear resistance under hydrodynamic force. *Nature Immunology* **7**:883-889.

Waschke, J. (2008) The desmosome and pemphigus. *Histochem Cell Biol* **130**:21-54.

Wilson, M.C., Meredith, D., Fox, J.E.M., Manoharan, C., Davies, A.J. & Halestrap, A.P. (2005) Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4 - The ancillary protein for the insensitive MCT2 is embigin (gp70). *J Biol Chem* **280**:27213-27221.

Xiao, T., Takagi, J., Collier, B.S., Wang, J. & Springer, T.A. (2004) Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* **432**:59-67.

Yeh, S.W., Ahmed, B., Sami, N. & Razzaque Ahmed, A. (2003) Blistering disorders: diagnosis and treatment. *Dermatol Ther* **16**:214-223.

Zhang, K. & Chen, J. (2012) The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adh Migr* **6**:20-29.