

Ihmisen kollageenireseptorin aktivaatio: $\alpha1\beta1$ - ja $\alpha2\beta1$ -integriinien $\alpha1$ -domeenin
aktivaatiomekanismien rakenne ja toiminta

Pro-gradu tutkielma
Turun Yliopisto
Biokemian laitos
Molekyylibiotieteet, Biokemia
Kesäkuu 2022

Liisa Pösö

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

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

PÖSÖ, LIISA: Ihmisen kollageenireseptorin aktivaatio: $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinien αI -domeenin aktivaatiomekanismien rakenne ja toiminta

Pro gradu –tutkielma, 64 s.

Biokemia

kesäkuu 2022

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

Integriinit $\alpha 1\beta 1$ ja $\alpha 2\beta 1$ ovat solukalvolla sijaitsevia kollageenireseptoreita, jotka vaikuttavat merkittävästi useisiin eri solufunktioihin, kuten verihiutaleiden kiinnittymiseen, mesenkymaalisten kantasolujen lisääntymiseen ja kunnollisen immuunivasteen muodostumiseen. Integriinien αI -domeeni on integriinin ligandia sitova domeeni, joka muodostaa suoran kontaktin integriinin ja sen ligandin, tässä tapauksessa kollageenin, välille. Ligandin sitoutuessa αI -domeenin suljettu konformaatio muuttuu avonaiseksi ja ligandi muodostaa suoran kontaktin sitoutumiskohdan metalli-ionin kanssa. Suljetun ja avonaisen konformaation lisäksi $\alpha 1\beta 1$ -integriinillä tiedetään olevan kolmas välimuotokonformaatio, mutta vastaavaa rakennetta ei olla todettu $\alpha 2\beta 1$ -integriinille.

αI -domeenien konformaatiomuutoksen suljetusta muodosta avonaiseen aktiiviseen konformaatioon mahdollistaa αC -heliksissä olevan arginiinin ja $\alpha 7$ -heliksissä olevan glutamaatin välinen ionisidos. Näiden aminohappojen rooleja αI -domeenin konformaatiomuutoksessa ja proteiinin aktiivisuudessa on tutkittu Arg/Ala- ja Glu/Ala-pistemutaatioilla.

Tämän Pro Gradu –tutkimuksen tavoitteena on tutkia ja verrata $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien αC -heliksissä olevan arginiinin roolia αI -domeenin aktivaatiossa. $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien sitoutumistehokkuutta tyyppin I ja IV kollageeniin mitataan kollageenilla päällystettyjen kuoppalevyille tehtyjen sitoutumiskokeilla. Mittausten avulla selvitetään $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien pistemutaatioiden vaikutusta αI -domeenien sitoutumistehokkuuteen. Sitoutumiskokeiden lisäksi arginiinin pistemutaation sisältävä $\alpha 2I$ -domeeni kiteytettiin ilman ligandia paljastamaan mahdollisen aktivoituneen $\alpha 2I$ -domeenin rakenteen ja transitionaalisen konformaation.

Sitoutumiskokeiden tulosten perusteella $\alpha 1\beta 1$ ja $\alpha 2\beta 1$ integriinien aktivaatiomekanismeilla vaikuttaa olevan mekanistinen ero. Kiteytetyn $\alpha 2I$ -domeenin rakenteen alustava analyysi ei kuitenkaan paljastanut selvää välimuotokonformaatiota.

Avainsanat: Integriini, kollageeni, αI -domeeni

Sisällys

LYHENTEET	3
AMINOHAPOT	4
1. JOHDANTO	5
2. KOLLAGEENIRESEPTORI-INTEGRIINIT	7
2.1. Ihmisen kollageenireseptori-integriinit	7
2.2. $\alpha 1\beta 1$ -integriini	7
2.3. $\alpha 2\beta 1$ -integriini	8
2.3.1. Kollageeni	9
3. INTEGRIINIEN RAKENNE JA AKTIVAATIO	11
3.1. α -alayksikkö	11
3.2. β -alayksikkö	12
3.3. Integriinien ”outside in” -aktivaatio	13
3.4. Integriinien ”inside out” -aktivaatio	15
4. α I-DOMEENI	17
4.1. α I-domeeni.....	17
4.2. α I-domeenin evoluutio	17
4.3. α I-domeenin rakenne kollageenireseptori $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriineillä	18
4.3.1. MIDAS-alue	19
5. α I-DOMEENIN AKTIVAATIOMEKANISMI KOLLAGEENIRESEPTORI $\alpha 1\beta 1$ - JA $\alpha 2\beta 1$ -INTEGRIINEILLÄ	21
5.1. α I-domeenin suljettu konformaatio	21
5.2. α I-domeenin avonainen konformaatio.....	23
5.2.1. GFOGER- sekvenssi	24
5.3. α I-domeenin välimuotokonformaatio	26
6. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	29
7. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
7.1. Sitoutumiskoe	30
7.1.2 Villityypin ja mutatoitujen $\alpha 1$ I- ja $\alpha 2$ I -domeenien tuotto	30
7.1.2.1 $\alpha 1$ I ^{WT} -domeenin, $\alpha 1$ I ^{R287A} -domeenin ja $\alpha 1$ I ^{E317A} -domeenin tuotto E. coli:ssa	30
7.1.2.2. $\alpha 2$ I ^{WT} -domeenin, $\alpha 2$ I ^{R288A} -domeenin ja $\alpha 2$ I ^{E318A} -domeenin tuotto E. coli:ssa	31
7.1.3. Villityyppien ja mutatoitujen $\alpha 1$ I- ja $\alpha 2$ I-domeenien puhdistus BL21 E.coli soluista	31

7.1.4. Kuoppalevyjen päällystäminen BSA:lla, Kollageeni I:llä ja Kollageeni IV:llä	32
7.1.5. Sitoutumiskoe	32
7.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytys	33
7.2.1. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenien tuotto ja puhdistus	33
7.2.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytyksen optimointi	33
7.2.3. Röntgensädekristallografia ja proteiinirakenteen selvittäminen	34
8. TULOKSET	35
8.1. αI -domeenien toiminnalliset sitoutumiskokeet	35
8.1.1. αI -domeenien ja $\alpha 2I$ -domeenien saanto eroavat toisistaan	35
8.1.2. αI^{WT} , αI^{R287A} ja αI^{E317A} sitoutuvat tyypin I kollageeniin eri aviditeetilla 36	
8.1.3. αI^{WT} , αI^{R287A} ja αI^{E317A} sitoutuvat eri aviditeetilla tyypin IV kollageeniin	38
8.1.4. $\alpha 2I^{WT}$, $\alpha 2I^{R288A}$ ja $\alpha 2I^{E318A}$ sitoutuvat eri aviditeetilla tyypin I kollageeniin 40	
8.1.5. $\alpha 2I^{WT}$, $\alpha 2I^{R288A}$ ja $\alpha 2I^{E318A}$ sitoutuvat myös tyypin IV kollageeniin	41
8.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin rakenne	43
8.2.1. Kiteytysolosuhteiden optimointi ja muodostuneet kiteet	43
8.2.2. Kiteen keräys, skannaus, resoluutio ja rakenteen muodostaminen	45
8.2.3. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiderakenne ja sen laatuindeksit	46
9. TULOSTEN TARKASTELU	48
9.1. αI - ja $\alpha 2I$ -domeenin toiminnalliset sitoutumiskokeet	49
9.1.1. Ilman αIC - ja $\alpha I7$ -heliksin välistä ionisidosta αI - ja $\alpha 2I$ -domeeni sitovat kollageenia suurella affiniteetilla	49
9.1.3. αI - ja $\alpha 2I$ -domeenin mutaatiot vaikuttavat eri tavalla αI -domeenin ja tyypin I kollageenin sitoutumismekanismiin	52
9.1.4. $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integroinien aktivaatiomekanismeilla on mekanistinen ero 53	
9.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytystulos	55
9.2.1. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeeni kiteytettiin onnistuneesti ilman ligandia	55
9.2.2. $\alpha 2I$ -domeenin alustava rakenneanalyysi ei paljasta samankaltaista transitionaalista konformaatiota kuin αI -domeenilla	56
10. YHTEENVETO	58
11. LÄHTEET	61

LYHENTEET

Lyhenne	Suomeksi	Englanniksi
Bmax	Sitoutumismaksimi	Maximum binding
BSA	Naudan seerumin albumiini	Bovine Serum Albumin
CAM	Soluadheesiomolekyyli	Cell Adhesion Molecule
ECM	Soluväliaine	Extracellular matrix
ERSF	Euroopan synkrotronisäteilylaitokselle	European Synchrotron Radiation Facility
Eu-leima	Europium-leima	Europium label
GST	Glutationi-S-transferaasi	glutathione S-transferase
IPTG	Isopropyyli- β -D-tiogalaktogalaktosidi	isopropyl- β -D-thiogalactoside
Kd	Dissosiaatiovakio	Dissociation constant
LB	Luria-Bertani kasvatusliuos	Luria-Bertani broth
MIDAS	Metalli-ionin sisältävä ligandin sitoutumiskohta	Metal Ion Dependent Adhesion Site
NMR	Ydinmagneettinen resonanssi	Nuclear magnetic resonance
PBS	Fosfaattipuskuroitu suolaliuos	Phosphate-buffered saline
RGD	Tripeptidi Arg-Gly-Asp	Tripeptide Arg-Gly-Asp
RMSD	Neliöllinen keskiarvon keskihajonta	Root Mean Square deviation
WT	Villityyppi	Wild Type
VWA	von Willebrandin A domeeni	von Willebrand A domain

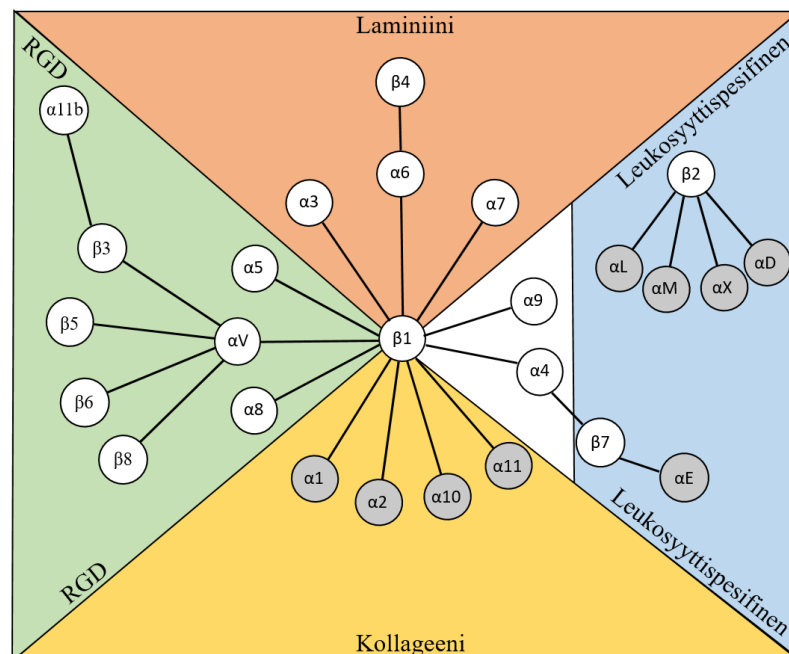
AMINOHAPOT

Nimi	3-kirjaiminen lyhenne	1-kirjaiminen lyhenne
Glysiini	Gly	G
Alaniini	Ala	A
Valiini	Val	V
Leusiini	Leu	L
Isoleusiini	Ile	I
Proliini	Pro	P
Fenyylialaniini	Phe	F
Tyrosiini	Tyr	Y
Tryptofaani	Trp	W
Seriini	Ser	S
Treoniini	Thr	T
Kysteiini	Cys	C
Metioniini	Met	M
Arginiini	Arg	R
Histidiini	His	H
Lysiini	Lys	K
Asparagiinihappo	Asp	D
Glutamiinihappo	Glu	E
Asparagiini	Asn	N
Glutamiini	Gln	Q

1. JOHDANTO

Integriinit ovat merkittäviä solukalvonläpäiseviä soluväliaineproteiineja (*engl.* extracellular matrix, ECM), jotka yhdistävät solun tukirangan (*engl.* cytoskeleton) soluväliaineeseen. Ne ovat soluadheesiomolekyylejä (*engl.* cell adhesion molecule, CAM), jotka viestivät solukalvon (*engl.* cell membrane, plasma membrane) läpi molempiin suuntiin mahdollistaen soluadheesioon soluväliaineen komponentteihin, sekä ympärillä oleviin soluihin. Toiminnallisina soluväliaineproteiineina ne aktivoivat useita solunsisäisiä signalointireittejä ja mahdollistavat monisolujen rakenteiden muodostumisen ja ylläpidon. (Hynes 2002.)

Ihmisellä on 24 erilaista integriiniä, ja ne jaetaan neljään eri alaryhmään: kollageenireseptorit, laminiini-reseptorit, leukosyyttispesifiset reseptorit ja RGD-reseptorit (*engl.* tripeptide Arg-Gly-Asp, RGD) (kuva 1.). Ihmisellä tiedetään olevan neljä kollageenireseptori-integriiniä, jotka sitovat soluväliaineen useita eri kollageenityyppejä. Näitä ovat $\alpha 1\beta 1$ -, $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 10\beta 1$ - ja $\alpha 11\beta 1$ -integriinit. Runsaimmin ihmisessä esiintyvät kollageenireseptorit ovat $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinit ja niiden uskotaankin olevan mukana lukuisissa eri solun fysiologisissa toiminnoissa, kuten kunnollisen immuunivasteen muodostumisessa, solujen erikoistumisessa ja verihiutaleiden kiinnittymisessä.



Kuva 1 – Integriiniperheet ligandeittain. Kuvassa näkyy kaikki nisäkkäissä ilmenevät integriinialayksiköt ja miten ne muodostavat heterodimeerejä keskenään. RGD-reseptorit ovat vihreällä pohjalla, laminiinireseptorit oranssilla, kollageenireseptorit keltaisella ja leukosyyttispesifiset reseptorit sinisellä. Valkoisella pohjalla olevat integriiniryhmät sitovat ligandeja epäspesifisesti. (Hynes 2002.)

Kollageenireseptori-integriinit ovat heterodimeerejä ja koostuvat α - ja β -alayksiköistä (Takada ja muut 2007). Integriinin alayksiköt reagoivat keskenään, kun kollageeniligandi sitoutuu reseptorin spesifiseen sitoutumiskohtaan aiheuttaen konformaation muutoksen koko makromolekyylissä, joka lopulta aktivoi integriinin (Springer ja Dustin 2012). α -alayksikön α I-domeenilla on merkittävin rooli kollageeniligandin tunnistuksessa, mutta sen spesifistä sitoutumis- ja aktivaatiomekanismia ei vielä tunneta täysin. Kollageenireseptori-integriinien suurin ero uskotaankin olevan α I-domeenien aktivaatiomekanismien eroissa ja vuosien aikana tehty tutkimus on osoittanut alustavasti, että muuten hyvin samankaltaisilla α 1 β 1- ja α 2 β 1- integriinien α I-domeeneilla on selkeä mekanistinen ero. (Lahti ja muut 2011.)

2. KOLLAGEENIRESEPTORI-INTEGRIINIT

2.1. Ihmisen kollageenireseptori-integriinit

Ihmisen 24:stä integriinistä neljän tiedetään sitovan kollageenia. Näitä ovat $\alpha1\beta1$ -, $\alpha2\beta1$ -, $\alpha10\beta1$ - ja $\alpha11\beta1$ -integriinit. Nämä integriinit ovat runsaslukuisimpia soluväliainereseptoreja ja tunnistavat kaikista soluväliaineproteiineista spesifisesti kollageenia. Integriinit eivät tunnista koko kollageenimolekyyliä, vaan spesifisen osan kollageenimolekyylistä, mikä ilmenee samankaltaisena useissa eri kollageenimolekyylin muodoissa. (Zhang ja muut 2003.)

Kollageenireseptori-integriinit ovat rakenteiltaan hyvin samankaltaisia, mutta ne eroavat aktivaatiomekanismeiltaan ja sitoutumistavoiltaan. Tämän lisäksi eri kollageenireseptorit sitovat eri mekanismeilla ja erilaisilla affiniteeteilla eri kollageenimolekyyliä.

Kollageenireseptori-integriinejä on tutkittu pitkään *in vitro* -menetelmillä ja niiden on todettu olevan tärkeitä soluadheesiossa, solujen kulkeutumisessa ja kollageenin synteesissä. Ennen kaikkea kollageenireseptoreilla on tärkeä rooli solujen lisääntymisen kannalta, verihiutaleiden kiinnittymisessä, solujen erikoistumisessa kuin myös syöpäkasvaimien kehityksessä. (Zhang ja muut 2003.)

2.2. $\alpha1\beta1$ -integriini

$\alpha1\beta1$ -integriini on kollageenireseptori-integriini, joka ilmenee tavanomaisesti mesenkymaalisten solujen, kuten endoteelisolujen ja monosyyttien solukalvoilla, immuunijärjestelmässä ja pienessä osassa epiteelikudosta. Sen avulla tapahtuva soluviestintä vaikuttaa mm. soluväliaineen kokoonpanoon, sekä siihen miten solut päätyvät jakautumaan tai kuolemaan. Tämänkaltaisen viestintä on erityistä $\alpha1\beta1$ -integriinille, joka toiminnallaan vaikuttaa mm. autoimmuunisairauksien muodostumiseen ja on täten myös kiinnostava terapeuttisten lääkeaineiden kohde. (Gardner 2014.)

$\alpha1\beta1$ -integriiniä esiintyy runsaslukuisena kaikissa selkärankaisissa ja monimuotoisen toimintaverkostonsa takia niiden uskotaan kehittyneen tukemaan ja vahvistamaan muiden proteiinien ja reseptoreiden toimintaa. Tämän vuoksi $\alpha1\beta1$ -integriinit tunnetaan pitkälti yleishyödyllisinä integriineinä.

$\alpha 1\beta 1$ -integriinillä on yhteensä 14 eri ligandia (Gardner 2014), joista se suosii eniten kollageenia. Kollageenin lisäksi $\alpha 1\beta 1$ -integriini sitoo myös laminiinia, matriiliinia ja galektiinia (Eble ja muut 1993). $\alpha 1\beta 1$ -integriinillä on suurin affiniteetti verkkomaiseen, tyyppin IV kollageeniin (Eble ja muut 1993). $\alpha 1$ -domeni voi sitoutua useaan kohtaan kollageenimolekyylissä ja uskotaan, että useampi kuin yksi kollageeniketju on mukana sitoutumisessa (J. Emsley ja muut 1997).

2.3. $\alpha 2\beta 1$ -integriini

Kollageenireseptori-integriini $\alpha 2\beta 1$ ilmenee tyypillisesti epiteelisolujen, verihiutaleiden, fibroblastien ja megakaryosyyttien pinnalla vaikuttaen suuresti verihiutaleiden toimintaan sekä homeostaasin ylläpitoon. Tämän lisäksi $\alpha 2\beta 1$ -signalointi on tärkeää solujen liikkumisessa, jakautumisessa ja selviytymisessä (Madamanchi ja muut 2014). $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ilmentymiseen ja toimintaan soluissa vaikuttaa se miten aktiivisessa ja erikoistuneessa solutyypissä se sijaitsee. Sen toimintaan vaikuttaa vahvasti se kuinka paljon viestejä se vastaanottaa ympäröiviltä soluilta.

Kollageenireseptori $\alpha 1\beta 1$ -integriinin kaltaisesti, $\alpha 2\beta 1$ -integriinit ilmenevät runsaslukuisina kaikissa selkärangkaisissa ja niiden tiedetään osallistuvan useisiin solun toimintoihin. Niiden rakenne on hyvin konservoitunut ja samankaltainen kuin $\alpha 1\beta 1$ -integriinin rakenne. Yhdessä $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinien uskotaan olevan solun toiminnan kannalta yleishyödyllisiä ja, että ne olisivat kehittyneet tukemaan ja vahvistamaan muiden proteiinien ja reseptorien toimintaa (Ivaska ja Heino 2011). Tämän todistaa $\alpha 1\beta 1$ ja $\alpha 2\beta 1$ knockout hiirillä tehdyt kokeet, jotka osoittivat, että hiirien kehitys on normaalia integriinien puutoksesta huolimatta (Chen ja muut 2002; Gardner ja muut 1996; Holtkötter ja muut 2002.)

Kollageenireseptori $\alpha 2\beta 1$ -integriini sitoo nimensä mukaisesti kollageenia, mutta sillä on kollageenin lisäksi lukuisia muitakin soluvälialieligandeja. Näitä ovat mm. tenaskiini C glykoproteiini, laminiini ja dekoriini proteoglykaani (Ojalill ja muut 2018). Suurin aviditeetti integriinillä on kolmoisheliksiseen, säikeiseen kollageeniin, etenkin tyyppin I kollageeniin. (Madamanchi ja muut 2014.)

2.3.1. Kollageeni

Kollageeni on soluväliaineessa ilmenevä tukikudosten säiemäinen proteiini, joka vaikuttaa kudosten rakenteeseen, muotoon ja mekaanisiin ominaisuuksiin. Kollageeni on eri reseptoreiden, kuten kollageenireseptori-integriinien, kautta vuorovaikutuksessa soluun ja säätelee mm. niiden jakautumista, erilaistumista ja liikkumista (Ricard-Blum 2011). Tämä tekee siitä ihmiselle välttämättömän proteiinin ja sitä esiintyy nisäkkäissä runsaslukuisesti.

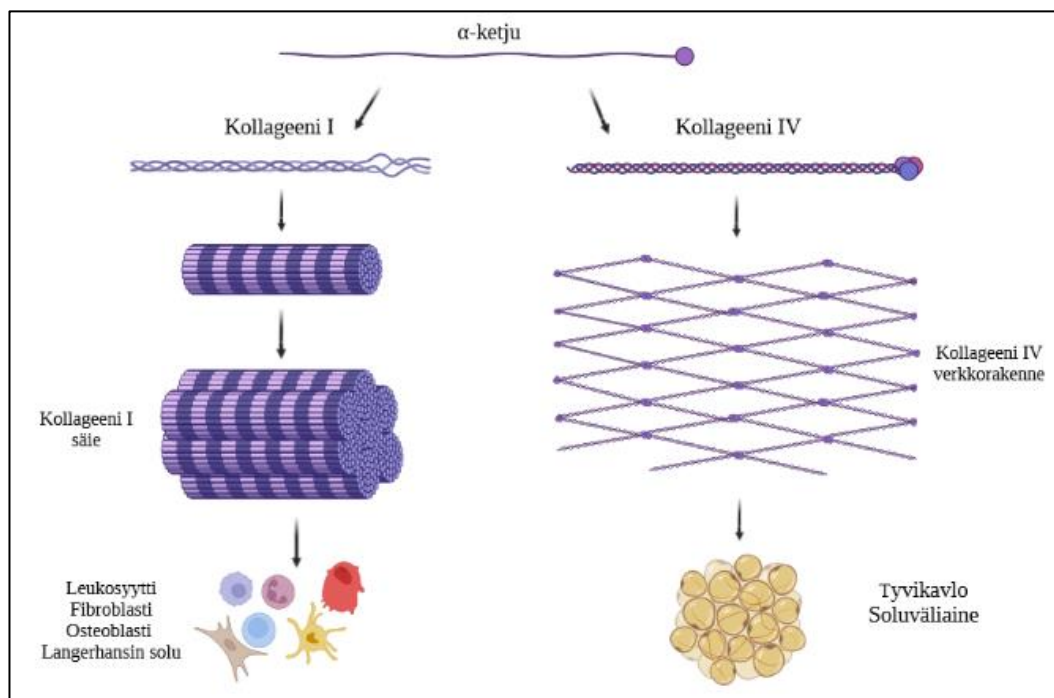
Kollageenia on soluissa 28 erilaista muotoa, joissa kaikissa on vähintään yksi kolmoishelikaalinen domeeni. Säikeisen kollageenin kolmoisheliksi koostuu kollageenimolekyylistä riippuen joko samanlaisista tai erilaisista α -kierteistä, jotka ovat kiertyneet yhteen köyden kaltaiseksi rakenteeksi. Kollageenit ilmenevät soluissa usein suurina erilaisina kokonaisuuksina eli supramolekyyleinä (*engl.* supramolecule). Kollageenisupramolekyylit vaikuttavat soluissa eri tavoin. (Ricard-Blum 2011.)

Tyypin I kollageeni on yksi ihmisen eniten ilmenevistä kollageenimuodoista ja se on erittäin tärkeä elementti ihmisen tukikudoksessa, luissa ja ihossa. Se on säiemäinen heterotrimeerinen kollageenimolekyylit (kuva 2.), joka koostuu tyypillisesti kahdesta identtisestä $\alpha 1$ -ketjusta, sekä yhdestä $\alpha 2$ -ketjusta. Jokainen yksittäisistä ketjuista kiertyy vasemmalle, muodostaen oikeakätisen kolmoisheliksin (Rossert ja de Crombrughe 2002). Kolmoisheliksien rakenteen mahdollistaa $\alpha 1$ - ja $\alpha 2$ -ketjuissa joka kolmannen aminohapon kohdalla oleva glysiini-aminohappo, jotka sitoutuvat keskenään muodostaen koko supramolekyylille selkärangan kolmoisheliksin keskelle. (Karsdal 2019.)

Tyypin IV kollageeni vuorostaan on tyvikalvon (*engl.* basal lamina) primäärinen kollageenimolekyylit, joka toimii telineproteiinina (*engl.* scaffold) muille ECM-proteiineille ja kasvutekijöille kuten laminiinille ja TGF β 1:lle (Khoshnoodi ja muut 2008). Tämän lisäksi kollageeni IV vaikuttaa soluadheesioon ja -jakautumiseen, solujen liikkumiseen ja erikoistumiseen. Tyypin IV kollageenin rakenne on poikkeava tyypin I kollageenista, sillä se muodostaa paljon suuremman ja monimutkaisemman tasomaisen rakenteen, joka ei muistuta lainkaan tyypin I kollageenin muodostavia köysiä (kuva 2.). Kuusi erilaista α -ketjua pystyy muodostamaan tyypin IV kollageenille kolme erilaista heterotrimeeristä kolmoisheliksiä, jotka muodostuttuaan kiinnittyvät toisiinsa

muodostaen verkkomaisen suuren rakenteen. Näistä eniten ilmenee kuitenkin $\alpha 1$ - sekä $\alpha 2$ -ketjujen muodostama kollageeni IV. (Karsdal 2019; Khoshnoodi ja muut 2008.)

Kollageenilla on useita eri reseptoreja, jotka tunnistavat kollageenin spesifisesti. Näitä reseptoreita on mm. kollageenireseptori-integriinit joiden αI -domeenit sitovat kollageenia suurella affiniteetilla. (Calderwood ja muut 1997; Leitinger ja Hohenester 2007; Tuckwell ja muut 1995.). Integriinin αI -domeeni tunnistaa kollageenimolekyylistä suurella affiniteetilla useita eri sitoutumiskohtia, joista GFOGER-sitoutumiskohta on tutkituin. Muita tunnettuja sitoutumiskohtia ovat GLOGEN, GROGER, GLOGER, GMOGER, GLSGER, GQRGER, GAOGER, GVOGEA, GFKGER, GLQGER ja GASGER (Rappu ja muut 2019). Integriinin MIDAS alueella sijaitseva magnesiumioni sitoo kollageenimotiivin glutamaatin täydentääkseen metalli-ionin koordinaation. (Emsley ja muut 2000; Knight ja muut 1998.)



Kuva 2 – Kollageenien I ja IV rakenteet. Molemmat kollageenit muodostuvat kahdesta $\alpha 1$ -ketjusta ja yhdestä $\alpha 2$ ketjusta. Kollageeni I ilmenee tukikudoksen, huiden ja ihon solutyypeistä. Kollageeni IV ilmenee tyvikalvolla ja soluväliaineessa. (Ricard-Blum 2011.) Kuva piirretty BioRender:illä.

3. INTEGRIINIEN RAKENNE JA AKTIVAATIO

Integriinit ovat suuria heterodimeerisiä proteiineja, jotka koostuvat aina yhdestä α -alaysiköstä ja yhdestä β -alaysiköstä. Molemmissa alaysiköissä on N-terminaalinen solunulkoinen osa, C-terminaalinen solunsisäinen osa ja solukalvon kerran läpäisevä transmembraaninen domeeni. Alaysiköt ovat sitoutuneet toisiinsa ei-kovalenttisesti. Tunnettuja α -alaysiköitä on 18 erilaista ja β -alaysiköitä kahdeksan, ja yhdessä nämä alaysiköt muodostavat rakenteellisesti 24 erilaista integriiniä (kuva 1.). (Springer ja Dustin 2012.) Tämän lisäksi integriinit jaetaan alaryhmiksi niiden ligandien perusteella. α - ja β -alaysiköt eivät ole keskenään homologisia, mutta α -alaysiköillä on keskenään paljon samankaltaisuuksia. (Barczyk ja muut 2010.)

Integriinien aktivoituessa, ensin aktivoituu α -alaysikkö, joka vuorostaan aktivoi β -alaysikön. Aktivaation yhteydessä koko makromolekyylissä tapahtuu konformaation muutos, jolloin integriinin rakenne muuttuu suljetusta avonaiseksi. Integriinien konformaatioita tunnetaan yhteensä kolme: taipunut suljettu muoto, ojentunut suljettu muoto sekä ojentunut aktiivinen muoto. (Springer ja Dustin 2012.) Integriinien kompleksisen solunulkoisen osan uskotaan mahdollistavan integriinien suuren dynaamisen rakennemuutoksen sen aktivoituessa. Integriinien monidomeenisen solunulkoisen osan uskotaan myös olevan olennainen syy integriinien suurelle ja monipuoliselle toimintaverkostolle, sekä sille, että integriinit kykenevät siirtämään solunsisäisiä signaaleja solun ulkopuolelle ja päinvastoin. (Johnson ja Chouhan 2014.)

3.1. α -alaysikkö

Runsaasti ilmenevät, evolutiivisesti merkittävät RGD-integriinit tunnistavat ligandinsa molempien α - ja β -alaysiköidensä avulla. Myöhemmin integriinien kehityksessä on tapahtunut muutos, jolloin integriinien α -alaysikkö on ottanut suuremman roolin integriinimakromolekyylin spesifisessä ligandin tunnistuksessa. α -alaysikkö koostuu ihmisellä ~ 1500 aminohaposta (Johnson ja Chouhan 2014), jotka muodostavat alaysikön rakenteessa useita eri domeeneja. α -alaysiköt ovat keskenään samankaltaisia, mutta yhdeksässä α -alaysikössä erillisenä lisäyksenä α I-domeeni (Larson ja muut 1989).

α I-domeenillisissa integriineissä, kuten kollageenireseptori-integriineissä, α -alaysikön päällimmäinen solunulkoinen domeeni on α I-domeeni (kuva 3.). Tämä domeeni on

vastuussa integriinin ligandin, kuten kollageenin, tunnistuksesta ja sitomisesta. α I-domeeni sijaitsee α -alayksikön β -propellin (*engl.* β -propeller) terien 2 ja 3 välissä. β -propelli on seitsemänteräinen domeeni, joka α I-domeenin puuttuessa on vastuussa integriinin ligandin tunnistamisesta ja sitomisesta. β -propelli on myös yhteydessä β -alayksikön β I-domeeniin. (Liddington 2014.) β -propelli on sitoutunut α -alayksikön ”reisi”-domeeniin (*engl.* thigh domain) ja kahteen ”pohje”-domeeniin, C1 ja C2 (*engl.* calf-1 domain, calf-2 domain). β -propelli yhdessä α I-domeenin ja reisidomeenin kanssa muodostavat integriinin ”pää”-domeenin. Pohjedomeenit muodostavat integriinin jalan, joka tukee integriinin pää-domeenia. α -alayksikön päätä ja jalkaa erottaa taitoskohta, eli genu (*engl.* genu) (Barczyk ja muut 2010). Näitä solunulkoisia domeeneja seuraa α -alayksikön transmembraaninen alue ja suhteellisen lyhyt C-terminaalinen sytoplasminen sekvenssi, josta tiedetään toistaiseksi vielä hyvin vähän.

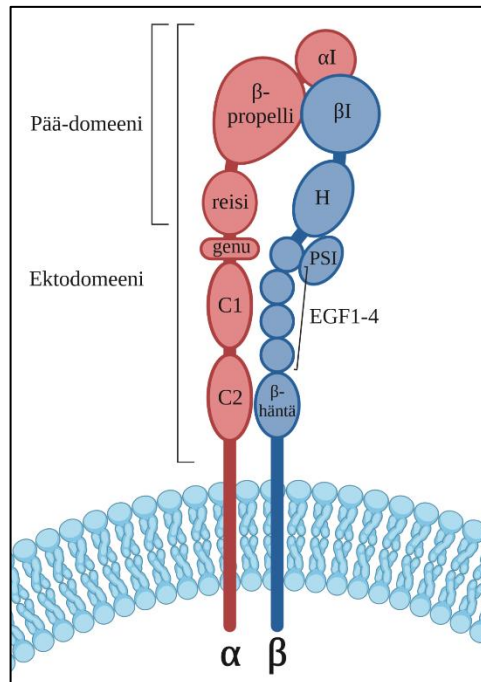
3.2. β -alayksikkö

Toinen osa integriinin heterodimeeristä on β -alayksikkö, joka muodostuu ~800 aminohappotähteestä (Johnson ja Chouhan 2014). β -alayksikkö on merkittävässä roolissa sitomassa solun tukirangan integriiniin, sekä siirtämässä integriinin aktivaation aiheuttaman konformaationmuutoksen solun sisälle. (Springer ja Dustin 2012.)

β -alayksikkö koostuu α -alayksikön tavoin useista eri domeeneista, joista päällimmäisenä solunulkoisena osana on β I-domeeni (kuva 3.). β I-domeeni on α I-domeenin kaltainen metalli-ionin sisältävä domeeni, joka osallistuu ligandin sitomiseen integriineissä, joilla ei ole erillistä α I-domeenia. β I-domeeni sisältää MIDAS-alueen, sekä ADMIDAS-alueen, joka sitoo inhiboivan kalsiumionin. Tämän ADMIDAS alueen uskotaan myös sitovan magnesium-ionin, joka johtaa integriinin aktivoituun konformaatioon. (Humphries ja muut 2003.)

β I-domeeni on sitoutunut β -alayksikön solunulkoiseen hybrididomeeniin (H, kuvassa 3.), joka on kiinni alayksikön pleksiini-semaforiini (*engl.* plexin-semaphorin-integrin, PSI) domeenissa. Nämä ovat yhteydessä neljään kysteiniä sisältävään epidermaaliseen kasvutekijätoistoihin (*engl.* epidermal growth factor, EGF). Viimeinen EGF sitoo β -hännän. β -häntää seuraa β -alayksikön transmembraaninen alue sekä C-terminaalinen solunsisäinen osa. α -alayksikön tavoin, β -alayksikön C-terminaalisesta solunsisäisestä

alueesta ei tiedetä paljon. Yhdessä α - ja β -alaysiköiden solunulkoiset osat muodostavat integriinin ektodomeenin (*engl.* ectodomain) (Johnson ja Chouhan 2014) (kuva 3.).



Kuva 3 – α I-domeenin sisältävän integriinin rakennemalli. α -alaysikkö näkyy kuvassa punaisena ja β -alaysikkö sinisenä. (Barczyk ja muut 2010.) Kuva piirretty BioRender:illä.

3.3. Integriinien ”outside in” -aktivaatio

Integriinin aktivaatiomekanismille on ehdotettu useita eri malleja, mutta tässä kirjallisuuskatsauksessa keskitymme näistä vain yhteen. Kuten aikaisemmin mainittu, integriinit käyvät aktivoituessaan läpi konformaatiomuutoksen, ja tähän aktivaatiomekanismiin liittyy kolme eri konformaatiota (kuva 4.). Tämän lisäksi integriinit pystyvät viestimään kaksisuuntaisesti, jolloin aktivaatio tapahtuu eri tavoin. Tässä kappaleessa käydään läpi integriinin aktivaatio solun ulkoisella ligandilla (*engl.* outside in signaling).

Ligandiin sitoutumaton, pienimmän affiniteetin ligandiinsa omaava konformaatio on integriinin taipunut, suljettu muoto (kuva 4a.). Tässä integriinin pää-domeeni ja siinä oleva ligandin spesifinen sitoutumiskohta on taittunut lähelle solukalvoa ja integriinin C-terminaalia. Tämän kaltainen taipunut proteiinitopologia ei ole ligandin sitoutumiselle suotuisaa, sillä pää-domeeni on suljettu pois soluväliaineen proteiineilta. Tämän vuoksi

taittunut konformaatio on funktionaalisesti inaktiivinen ja affiniteettia ligandia kohtaan ei ole. Tällä hetkellä taipuneen muodon uskotaan olevan kuitenkin fysiologisesti relevantein ja solujen eniten ilmentämä integriinikonformaatio. (Takagi ja muut 2002.)

Integriinin aktivoituessa taipunut muoto muuttuu linkkuveitsen kaltaisen liikkeen kautta ojentuneeseen konformaatioon (kuva 4b.). Ojentuneessa konformaatioissa α - ja β -alaysiköiden rakenne on ojentunut alaysikön genun kohdalta, jolloin pää-domeeni nousee. Tässä konformaatioissa molempien alaysiköiden transmembraaniset domeenit ovat kuitenkin vielä kiinni toisissaan, jonka vuoksi konformaatiolla ei ole vielä suurta affiniteettia ligandia kohtaan. Alaysiköt eivät aktiivisesti välitä viestiä toisilleen tässä konformaatioissa, josta puhutaan nimellä ojentunut suljettu muoto. (Springer ja Dustin 2012.)

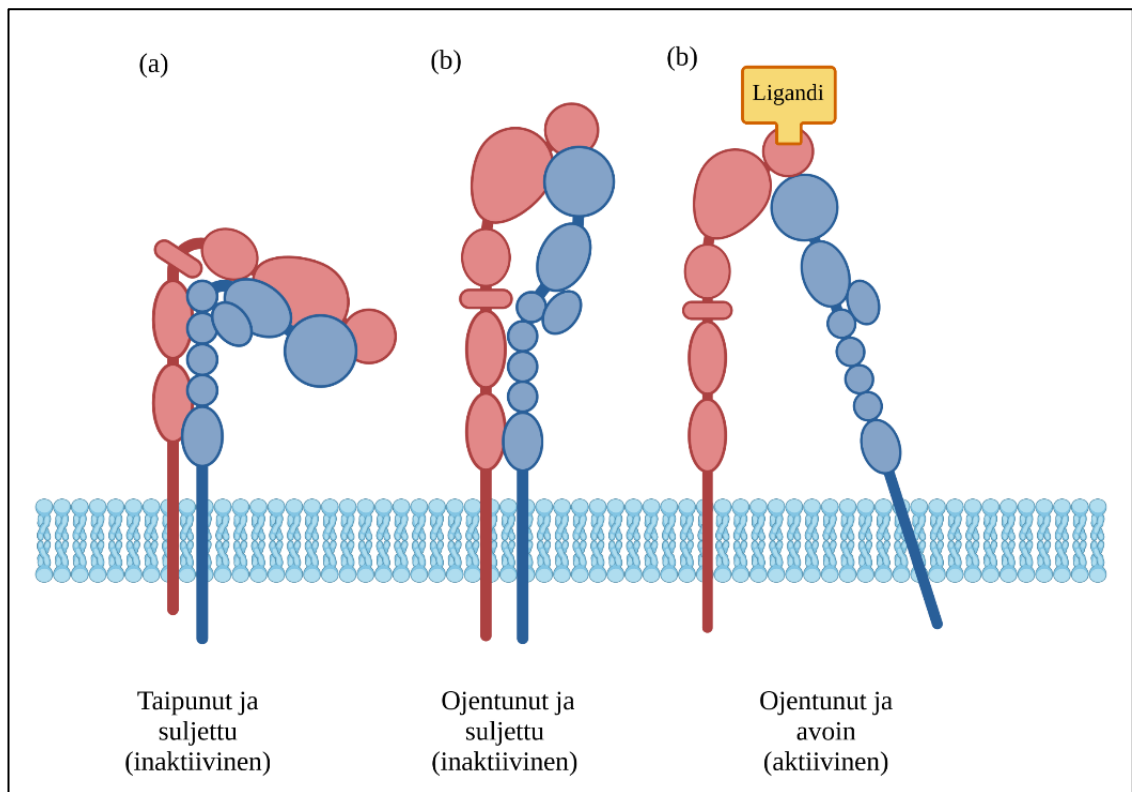
α I-domeenin omaavissa integriineissä viimeinen, aktiivinen integriinin konformaatio saavutetaan, kun ligandi sitoutuu integriinin I-domeeniin. I-domeeni aktivoituu ligandin sitoutumisen seurauksena, jolloin sen konformaatio muuttuu entistä avonaisemmaksi. α I-domeenin aktivoituttua se liikkuu β -alaysikköä kohti aktivoiden β -alaysikön I-domeenin. (Yang ja muut 2004.) α - ja β -alaysiköiden I-domeenit ovat rakenteellisesti homologisia ja β I-domeenin aktivaatio aiheuttaa sen rakenteessa samankaltaisen konformaationmuutoksen kuin α I-domeenissa, jonka seurauksena loppu β -alaysikkö aktivoituu. Tämän seurauksena joustava ja liikkuva β -alaysikön transmembraaninen domeeni, eli β -jalka siirtyy, avaten koko integriiniheterodimeerin konformaation. Siirtynyt β -jalka stabiloi tätä uutta korkean affiniteetin omaavaa rakennetta, jossa integriinien pää-domeeni on avonaisessa muodossa ja aktiivinen. Tästä integriinin kolmannesta konformaatiosta puhutaan ojentuneena aktiivisena muotona (kuva 4c.). Jos integriinillä ei ole α I-domeenia, β I-domeeni sitoo ligandin ja aktivoituu, jonka seurauksena integriinin konformaatio muuttuu korkean affiniteetin omaavaan ojentuneeseen aktiiviseen muotoon. Minkä signaalin perusteella integriinit muuttuvat inaktiiviseen ojentuneeseen muotoon ennen ligandin sitoutumista, ei vielä tiedetä. (Liddington 2014.)

3.4. Integriinien ”inside out” -aktivaatio

Integriinit ovat toiminnaltaan kaksisuuntaisia ja pystyvät viestimään myös solun sisällä tapahtuvia muutoksia solun ulkopuolelle. Integriinien solunsisäinen aktivaatio on osoittautunut mutkikkaaksi tutkia ja toistaiseksi tarkkaa mekanismia integriinin aktivoimiseksi solun sisäisellä ligandilla ei vielä tiedetä. (Qin ja muut 2004.)

Aktivaation aikana sytoplasman proteiinien, kuten taliinin (*engl.* talin), uskotaan sitoutuvan joko yhteen tai molempiin integriinien solunsisäisiin häntiin aiheuttaen niiden erottumisen toisistaan. Integriinin jalkojen avautuminen aktivoi konformaationmuutoksen integriinin pää-domeenissa, joka nousee inaktiivisesta taipuneesta muodosta pystyyn (Liddington 2014). Tämän seurauksena integriini saavuttaa avonaisen, korkean affiniteetin omaavan muotonsa, jossa se on täysin ojentunut. Konformaation muutoksen jälkeen integriinin α I-domeeni tai β I-domeeni on valmis sitomaan kohdeproteiinin soluväliaineesta, joka reagoi solun sisällä tapahtuvaan muutokseen. (Qin ja muut 2004.)

Solun sisältä ulos siirtyvän signaloinnin aiheuttaa siis se, että integriinin jalka-domeenit erottuvat toisistaan, kun sytoplasminen proteiini on tarttunut integriinin solunsisäisiin häntä-domeeneihin. Nämä sytoplasmit hännät ovat topologisesti hyvin esillä eri ligandien sitoutumiselle ja niiden uskotaan olevan ehdottoman tärkeitä integriinien solunsisäiselle aktivaatiolle. Tätä tukee myös rakenteen evolutiivinen tutkimus, jossa häntien sekvenssit ovat todistetusti konservoituneita useissa eri selkärangkaisissa. (Ginsberg ja muut 1992.)



Kuva 4 – α I-domeenin omaavan integriinin kolme tunnettua konformaatiota. α -alayksikkö näkyy kuvassa punaisena ja β -alayksikkö sinisenä. (Springer ja Dustin 2012). Kuva piirretty BioRender:illä.

4. α I-DOMEENI

4.1. α I-domeeni

Kuten aikaisemmin mainittu, α I-domeeni (joka tunnetaan myös A-domeenina) ilmenee vain yhdeksässä integriinin α -alalyksikössä. α I-domeeni ilmenee kaikissa β 2-integriinien, sekä kollageenia sitovien β 1-integriinien rakenteissa. Tämän lisäksi α E- ja α X-integriiniessä on α I-domeeni. (Barczyk ja muut 2010.) α I-domeenin sisältävät integriinit ovat hyvin samankaltaisia ja α I-domeenillisia integriinejä löytyy tunnetusti vain selkärangaisista (Johnson et al 2009).

Ihmisen α I-domeenin omaavat integriinit voidaan jakaa kahteen alaryhmään: kollageenireseptori-integriineihin sekä leukosyyttispesifisiin reseptori-integriineihin. Vaikka näillä kahdella ryhmällä on erilaiset ligandit, ovat molempien ryhmien α I-domeenit rakenteeltaan hyvin samankaltaisia. (Heino 2007.)

4.2. α I-domeenin evoluutio

Integriinien evoluutio on kiinnostanut integriinitutkijoita siitä asti, kun α I-domeeni tunnistettiin erilliseksi lisäykseksi integriinien α -alalyksiköissä. Integriinien α - ja β -alalyksikoilla on pitkä evolutiivinen historia, ja niiden uskotaan olevan peräisin jo yksisoluisista eukaryooteista, jotka ovat edeltäneen monisoluisia eläinkuntaa (*engl.* metazoa). Bakteereista ja muista eläinkuntaan kuulumattomista eukaryooteista ei olla löydetty integriinien alalyksiköitä. (Johnson ja Chouhan 2014.)

Useita erilaisia integriinin α - ja β -alalyksiköitä on löydetty jo *Capsaspora owczarzaki*: sta, jonka perusteella uskotaan, että integriinit ovat toimineet useissa eri solufunktioissa jo ensimmäisistä tumallisista eliöistä lähtien. Ennen α I-domeenin kehitystä, integriinien on uskottu sitovan ligandiaan pitkälti β I-domeenin avulla sekä α -alalyksikön β -propellilla. Ensimmäisten integriinien ligandien uskottiin sisältäneen ligandeille tyypillisiä RGD-tunnistusekvenssejä, jotka sitoutuivat β -propellin ja β I-domeenin väliin jäävään sitoutumiskohtaan. (Johnson ja Chouhan 2014.)

Integriinien domeenien on uskottu pysyneen muuttumattomina selkärangattomista (*engl.* invertebrates) eliöistä piikkihahkasiin (*engl.* Echinodermata) eliöihin asti. Suikulaisten

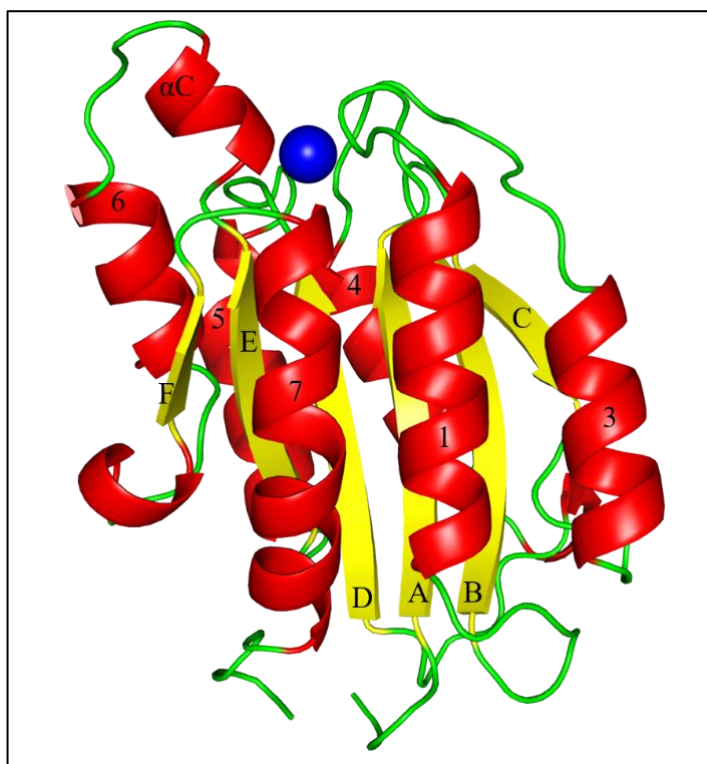
(*engl.* cephalochordates) uskotaan olleen ensimmäisiä alkeellisia selkäjänteisiä eliöitä, joiden integriinirakenne on ollut poikkeava. (Johnson ja Chouhan 2014.) Juuri ennen selkärankaisten (*engl.* vertebrates) eliöiden kehitystä, integriinin α -alaysiköiden geeneissä tapahtui merkittävä muutos, jossa von Willebrandin tekijän kaltainen domeeni lisättiin α -alaysikön β -propellin aminohppoketjuun (Humphries ja muut 2003). Tämä domeeni oli α I-domeeni. Vaippaeläinten (*engl.* tunicata), kuten *Halocynthia roretzi*:n (*engl.* Sea Pineapple), tiedetään olevan ensimmäinen eliöryhmä, jolta löydettiin uudenlainen α I-domeeni. Ensimmäiset α I-domeenit eivät kuitenkaan olleet samoja, jotka löytyvät ihmisen kollageenireseptori- ja leukosyyttireseptori-integriineistä.

α I-domeenin uskotaan kehittyneen auttamaan integriinin sitoutumiskohdan paljastamista, sillä α I-domeenin muodostuminen mahdollisti sen, että ligandien ei enää tarvinnut sitoutua β -propellin ja β I-domeenin väliin jäävään kapeaan sitoutumisalueeseen. Sitoutumisalueen vaikea topologia vaati ligandeilta hyvin liikkuvia ketjurakenteita, ja täten α I-domeenin muodostuminen mahdollisti myös isompien ja jäykempien ligandien suoran sitoutumisen integriiniin. Osittain uskotaankin, että α I-domeeni on edistänyt selkärankaisten kehityksessä tapahtuneita suuria solutason muutoksia. Integriinien α I-domeenin kehittyminen mahdollisti mm. uusien soluväliaineproteiinien ja solutyypin tunnistamisen, mikä on ollut edellytys monisoluisten selkärankaisten eliöiden kehitykselle. (Johnson ja Chouhan 2014.)

4.3. α I-domeenin rakenne kollageenireseptori α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriineillä

α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinien α I-domeeni on integriinin ligandia sitova domeeni, joka muodostaa suoran kontaktin integriinin ja kollageeniligandin välille. Se koostuu noin 200 aminohaposta ja on ~25 kDa:n kokoinen (Tuckwell ja muut 1995).

α I-domeenilla on tyypillinen Rosmannin laskos, joka muistuttaa von Willebrandin faktorin A domeenia (*engl.* von Willebrand A domain, VWA), jossa seitsemän α -heliksiä ympäröi kuutta β -laskosta (Whittaker ja Hynes 2002) (kuva 5.). Poikkeuksena Rosmannin laskokselle α I-domeeni sisältää myös yhden ylimääräisen α C-heliksin. Tällä α C-heliksellä on merkittävä rooli siinä, miten α I-domeeni sitoo kollageenia. Toinen tärkeä tekijä α I-domeenin ligandin tunnistukselle ja sitoutumiselle on α I-domeenin rakenteessa oleva metalli-ionin sisältävä ligandin sitoutumiskohta (MIDAS, metal ion dependent adhesion site) (J. Emsley ja muut 1997).



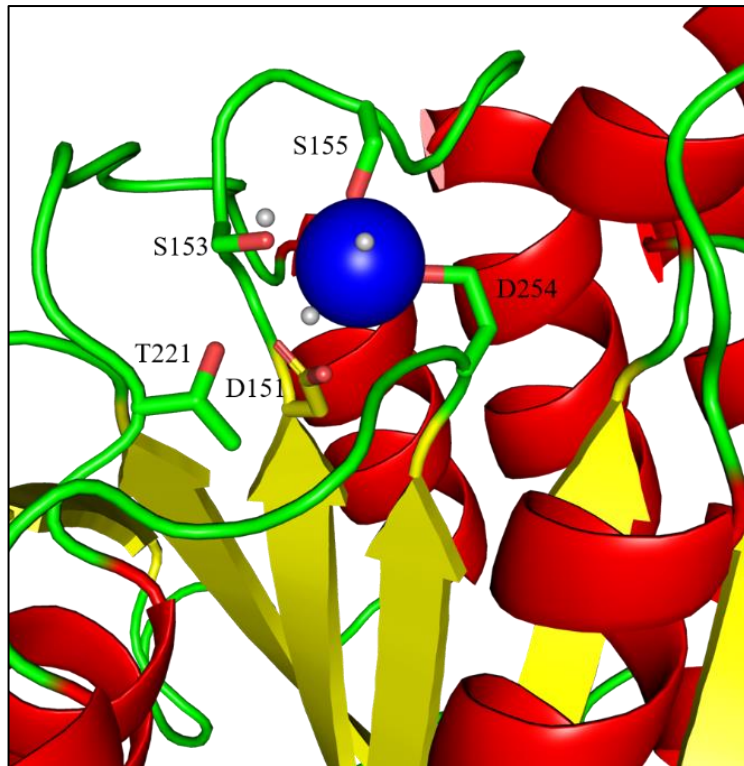
Kuva 5 – $\alpha 2I$ -domeeni. α -heliksit ovat kuvassa punaisella, β -levyt keltaisella ja ketjut vihreällä. MIDAS-alueen metalli-ioni on kuvattu sinisenä pallona. PDB ID: 1AOX. (Emsley ja muut 1997.)

4.3.1. MIDAS-alue

αI -domeenit sisältävät ligandin sitoutumiskohtaan, eli MIDAS-alueen. MIDAS-alue sisältää metalli-ionin, johon kollageenimolekyylillä muodostaa suoran sidoksen. MIDAS-alue sijaitsee αI -domeenin keskimmäisen β -levyn C-terminaaliosassa ja metallin koordinaatioon vaikuttaa kolme sen ympärillä olevaa αI -domeenin aminohappoketjua, ja niissä sijaitsevat viisi aminohappotähdettä (Smith ja muut 2000). αI -domeenin metallia ympäröivien ja sitovien aminohappojen merkitys on osoitettu kohdistettujen mutaatioiden (engl. site directed mutagenesis) avulla välttämättömiksi integriinin sitoutumiskyvyn kannalta. (Smith ja muut 2000.)

Metalli-onia koordinoivat kolmen peptidiketjun aminohapot: D151, S153, S155, T221 ja D254 (kuva 6.). Nämä aminohapot ovat konservoituneita kaikissa αI -domeeneissa ja niiden on osoitettu olevan välttämättömiä kollageenin sitoutumisen kannalta. Aminohapot sitovat metalli-ionin siten, että metalli muodostaa viisi sidosta ympärillä oleviin aminohappoihin (pentahedraalinen geometria). Saavuttaakseen oktahedraalisen (engl. octahedral) molekulaarisen geometrian, metalli-ioni pyrkii muodostamaan vielä yhden sidoksen. Tämä kuudes sidos muodostuu kollageenimolekyylin α -ketjun

glutamiinihapon kanssa. Ligandin sitoutumisen yhteydessä metalli-ionin molekulaarinen geometria muuttuu, yhdessä muun α I-domeenissa tapahtuvan konformaationmuutoksen kanssa. (Emsley ja muut 2000; Liddington 2014; Smith ja muut 2000.)



Kuva 6 - α 2I-domeenin MIDAS-alue. α -heliksit ovat kuvassa punaisella, β -levyt keltaisella ja ketjut vihreällä. Metallioni on kuvattu sinisenä pallona ja ympäröivät tärkeät vedet harmaina pieninä palloina. Tärkeät aminohapot on nimetty. PDB ID: 1AOX. (Emsley ja muut 1997.)

5. α I-DOMEENIN AKTIVAATIOMEKANISMI KOLLAGEENIRESEPTORI α 1 β 1- JA α 2 β 1-INTEGRIINEILLÄ

Vaikka integriinien yleisestä aktivaatiosta tiedetään jo paljon, α I-domeenien aktivaatiomekanismi on vielä jokseenkin epäselvä. Ymmärtääksemme, miten integriinit makromolekyyleinä todellisesti aktivoituvat, tulee meidän myös perehtyä spesifisesti integriinien ligandia sitovan domeenin, eli α I-domeenin aktivaatio- ja sitoutumismekanismiin. Tämän spesifisen aktivaatiomekanismin tutkiminen on tärkeää, sillä se mahdollistaa α I-domeenin omaavien integriineihin kohdistettujen lääkeaineiden kehittämisen, jotka näiden integriinien monipuolisten toimintaverkostoidensa takia voivat osoittautua elintärkeiksi lääkeaineiksi. Alustavasti uskotaan, että erot α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinien α I-domeenien aktivaatiomekanismeissa aiheuttavat integriinien väliset toiminnalliset erot sekä preferenssin eri kollageenimolekyylien sitoutumiseen.

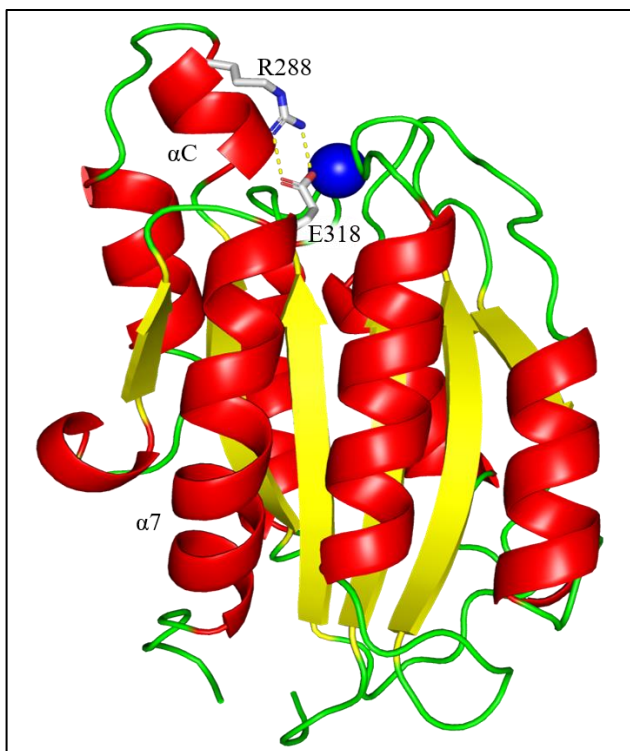
α 1I- ja α 2I-domeenin aktivaatiomekanismin uskotaan muistuttavan toisiaan niiden rakenteellisen ja genomisen homologisuuden vuoksi. Molempia α I-domeeneja on tutkittu ligandiin sitoutuneena sekä sitoutumattomana, ja näitä tuloksia vertaamalla on saatu alustava käsitys α I-domeenien aktivaatiomekanismista. Tutkimus on osoittanut, että α I-domeenissa tapahtuu merkittävä konformaation muutos ligandin sitoutuessa siihen (J. Emsley ja muut 2000). α I-domeeneille on toistaiseksi todettu yhteensä 3 tunnettua erilaista konformaatiota: Suljettu, välimuoto ja avoin konformaatio. Näiden eri konformaatioiden uskotaan edustavan kahta eri affiniteettitilan omaavaa α I-domeenia eli kollageeniin sitoutumatonta ja sitoutunutta α I-domeenia. (Tulla ja muut 2008.)

5.1. α I-domeenin suljettu konformaatio

α 2I-domeenin suljetun muodon kiderakenne selvitettiin vuonna 1997 (J. Emsley ja muut 1997) ja α 1I-domeenin kiderakenne vuonna 2004 (Nymalm ja muut 2004). Näiden α I-domeenien rakenteet osoittautuivat päällekkäin heijastettuna lähes identtisiksi, sillä niiden välinen neliöllisen keskiarvon keskihajonta, eli RMSD (*engl.* Root Mean Square Deviation, RMSD) oli vain 0.62Å (Lahti ja muut 2011). Tämä tukee ennako-oletusta siitä, että näiden tutkittavien integriinien toiminta olisi niiden rakenteen tavoin samankaltainen.

Kumpikaan $\alpha 1$ - tai $\alpha 2$ -domeeneista ei sido kollageenia suljetussa konformaatioissa (kuva 7.). Tämä johtuu siitä, että suljetussa konformaatioissa MIDAS-alueen metalli-ioni on suljettu pois siten, että yhden kollageenin α -heliksin glutamiinihappo ei pääse tarpeeksi lähelle metalli-ioniä sitoutuakseen siihen. Metallionin ja kollageenin sitoutumisen estää αC - ja $\alpha 7$ -heliksi, jotka ovat sitoutuneet tiiviisti yhteen ionisidoksen välityksellä. Tämän olennaisen ionisidoksen muodostaa $\alpha 1$ -domeenissa αC -heliksin arginiini 287 ja $\alpha 7$ -heliksin glutamiinihappo (glutamiini) 317, ja $\alpha 2$ -domeenissa vastaavat aminohapot eli arginiini 288 ja glutamiinihappo 318. Kohdistetun mutaatioiden avulla on voitu osoittaa, että ilman näiden aminohappojen välistä sidosta αI -domeenin suljettu muoto ei olisi stabiili ja sen affiniteetti kollageenia kohtaan kasvaa. (Lahti ja muut 2011.)

Suljettua, matalan affiniteetin omaavaa αI -domeenin konformaatiota tarkastellessa tulee huomata myös MIDAS-alueen koordinaatio. MIDAS on pentahedraalisessa (engl. pentahedral) molekulaarisessa geometriassa, muodostaen sidoksen vain viiteen eri atomiin. Tässä koordinaatiossa MIDAS on kykenemätön sitomaan kollageenimolekyylin glutamiinihappoa ja täten aktivoitumaan. (Liddington 2014.)



Kuva 7 - $\alpha 2$ -domeenin suljettu konformaatio. α -heliksit ovat kuvassa punaisella, β -levyt keltaisella ja ketjut vihreällä. Metallioni on kuvattu sinisenä pallona ja tärkeät aminohapot on nimetty. Ionisidokset on kuvattu keltaisella katkoviivalla. PDB ID: 1AOX. (Emsley ja muut 1997.)

5.2. α I-domeenin avonainen konformaatio

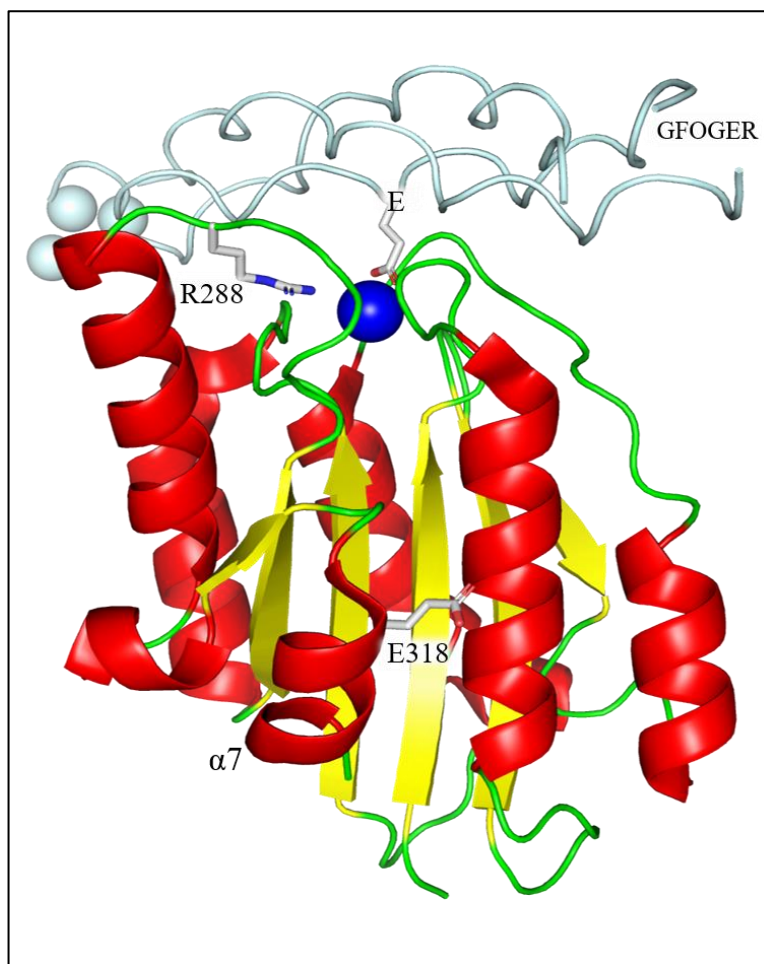
α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriineissä α I-domeenin avonainen konformaatio on sen kollageenia sitova, korkean affiniteetin muoto (Tulla ja muut 2008). α 2 β 1-integriinin α I-domeenin avonaisen konformaation kiderakenne selvitettiin vuonna 2000 (J. Emsley ja muut 2000), jolloin eristetty α 2I-domeeni kiteytettiin kompleksissa synteettisen GFOGER-peptidin kanssa (kuva 8.). Vuonna 2013 α 1I-domeenin avonaisen konformaation rakenne kompleksissa GLOGEN-peptidin kanssa selvitettiin hyödyntäen NMR-spektroskopiaa (*engl.* nuclear magnetic resonance, NMR) (Chin ja muut 2013). Molemmat rakenteet ovat jälleen hyvin samankaltaisia, ja niistä näkyy selvästi, että α I-domeenin rakenteessa on tapahtunut konformaationmuutos ligandin sitoutuessa.

α I-domeenin avonaisessa konformaatiossa α C-heliksin arginiini 287/288 ja α 7-heliksin glutamaatti 317/318 välinen vahva ionisidos on katkennut. Tämän seurauksena α C-heliksi on purkautunut ketjuksi ja liikkunut kauemmaksi α I-domeenin MIDAS-alueen metalli-ionista. (J. Emsley ja muut 2000) Tämä muutos mahdollistaa kollageenimolekyylin α -ketjun glutamiinihapon kunnollisen sitoutumisen metalli-ionin. Samanaikaisesti α 7-heliksi on liikkunut 12 Å alaspäin avaten koko α I-domeenin rakenteen entisestään. α 7-heliksin liikkuminen vuorostaan aiheuttaa konformaation muutoksen integriinin koko makromolekyylisiin. α 7-heliksin C-terminaalinen glutamiinihappo (E336) aktivoi integriinin β -alaysikön β I-domeenin sitoutumalla sen MIDAS-alueen metalli-ioniin, jonka seurauksena integriinin α - ja β -alaysiköt liikkuvat kauemmas toisistaan ja koko integriini saavuttaa aktiivisen muotonsa (Yang ja muut 2004).

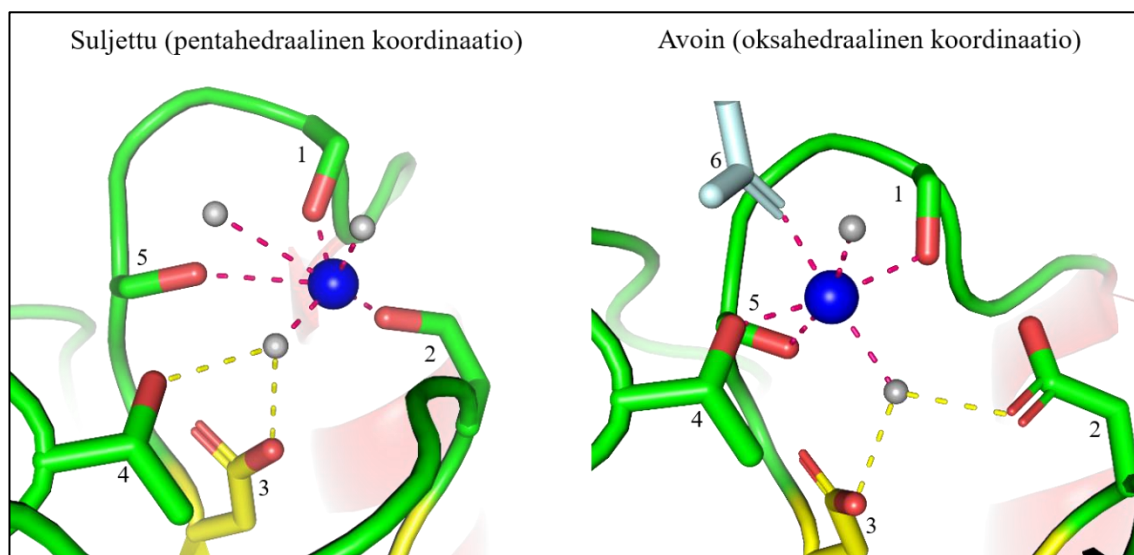
Toinen merkittävä ero α I-domeenin suljetun ja avonaisen konformaation välillä näkyy MIDAS-alueen koordinaatiossa. Happaman aminohapon, eli kollageenin glutamiinihapon sitoutuminen MIDAS-alueen metalli-ioniin aiheuttaa vaihdoksen metalli-ionin koordinaatiossa. Suora ionisidos aspartaatti D254 ja metallin välillä katkeaa ja sidos metallin ja treoniini T221 välille muodostuu. Toisin sanoen MIDAS muuttuu pentaedrisestä molekulaarisesta geometriasta oktaedriseen molekulaariseen geometriaan (kuva 9.). Tässä metalli-ioni sitoo viiden atomin sijasta kuusi atomia, näistä tärkeimpänä kollageenimolekyylin glutamaatin. Koordinaation muutoksen myötä MIDAS liikkuu α I-domeenin sitoutumiskohdassa noin 2.5 Å. (Liddington 2014.) Tällä muutoksella on merkittävä rooli α I-domeenin aktivaatiossa, sillä kollageenimolekyylin glutamaatin sitoutuminen itsessään aktivoi α I-domeenin.

5.2.1. GFOGER-sekvenssi

GFOGER-sekvenssi on kuusi aminohappotähdettä sisältävä lyhyt sekvenssi, jonka molemmat $\alpha 1$ - ja $\alpha 2$ -domeenit tunnistavat kollageenin kolmoisheliksistä (Knight ja muut 2000). Sekvenssin glutamiinihapolla on tärkein rooli kollageenin tunnistuksen suhteen, sillä se sitoutuu suoraan $\alpha 1$ -domeenin MIDAS-alueen metalli-ioniin. Kohdistettua mutaatiota käyttämällä on osoitettu, että kyseisen glutamiinihapon vaihtaminen asparagiinihapoksi johtaa siihen, että kollageenin ja $\alpha 1$ -domeenin välille ei muodostu sidosta ja affiniteetti kollageeniin häviää (Knight ja muut 2000). GFOGER-sekvenssin uskotaan olevan tärkeässä roolissa useissa eri kollageenein muodoissa, ja $\alpha 1$ -domeenin uskotaan sitoutuvan GFOGER-sekvenssin kautta vain yhteen kollageenin α -heliksiin. (Emsley ja muut 2000.) GFOGER-sekvenssin tunnistaminen on mahdollistanut synteettisten kollageeni-peptidien ja niiden variaatioiden valmistamisen. GFOGER ja GLOGEN peptidit on kiteytetty yhdessä $\alpha 1$ -domeenien kanssa ja sen avulla on pystytty perehtymään tarkemmin integriinin ja kollageenin välisiin vuorovaikutuksiin (kuva 8.). Peptidien käyttö rakennetutkimuksissa on tehnyt integriini-kollageeni-kompleksin kiteytyksestä ja rakenteen selvittämisestä ongelmattomampaa.



Kuva 8 - $\alpha 2 I$ -domeenin avoin konformaatio sitoutuneena kollageenipeptidiin (GFOGER). α -heliksit ovat kuvassa punaisella, β -levyt keltaisella ja ketjut vihreällä. Metallioni on kuvattu sinisenä pallona ja tärkeät aminohapot on nimetty. Kollageenipeptidi näkyy vaaleansinisenä. PDB ID: 1DZI. (Emsley ja muut 2000.)



Kuva 9 - MIDAS-alueen molekulaarisen geometrian muutos pentaedrisestä oktaedriseen koordinaatioon. αI -domeeni näkyy vihreänä ja keltaisena ja kollageenipeptidi vaaleansinisenä. Vesimolekyylit näkyvät harminä pieninä palloina. Metallisidokset on kuvattu pinkillä katkoviivalla ja vetysidokset keltaisella katkoviivalla. PDB ID: 1A0X ja 1DZI. (Emsley ja muut 1997, 2000.)

5.3. α 1I-domeenin välimuotokonformaatio

Avonaisen ja suljetun α I-domeenin konformaatioero on merkittävä ja se on herättänyt kysymyksiä siitä, onko näiden kahden konformaatioiden välillä vielä kolmas tai useampi konformaatio. Tämän lisäksi α 1-domeenin aktivaatiomekanismia tutkiessa on ehdotettu, että α I-domeenin avoin konformaatio olisi mahdollinen myös ilman ligandia (Lahti ja muut 2011). Tätä on lähdetty tutkimaan kohdistetun mutaation avulla, jossa jompikumpi α C- tai α 7-heliksin yhteen sitovista aminohapoista on mutatoitu siten, että sidosta ei pääse muodostumaan. Ilman tätä sidosta, α I-domeenin metalli-ioni on entistä enemmän suoraan ligandin saavutettavissa. Tällaista tilaa kutsutaan integriinin α I-domeenin esiaktivoituksi (*engl.* preactivated) tilaksi.

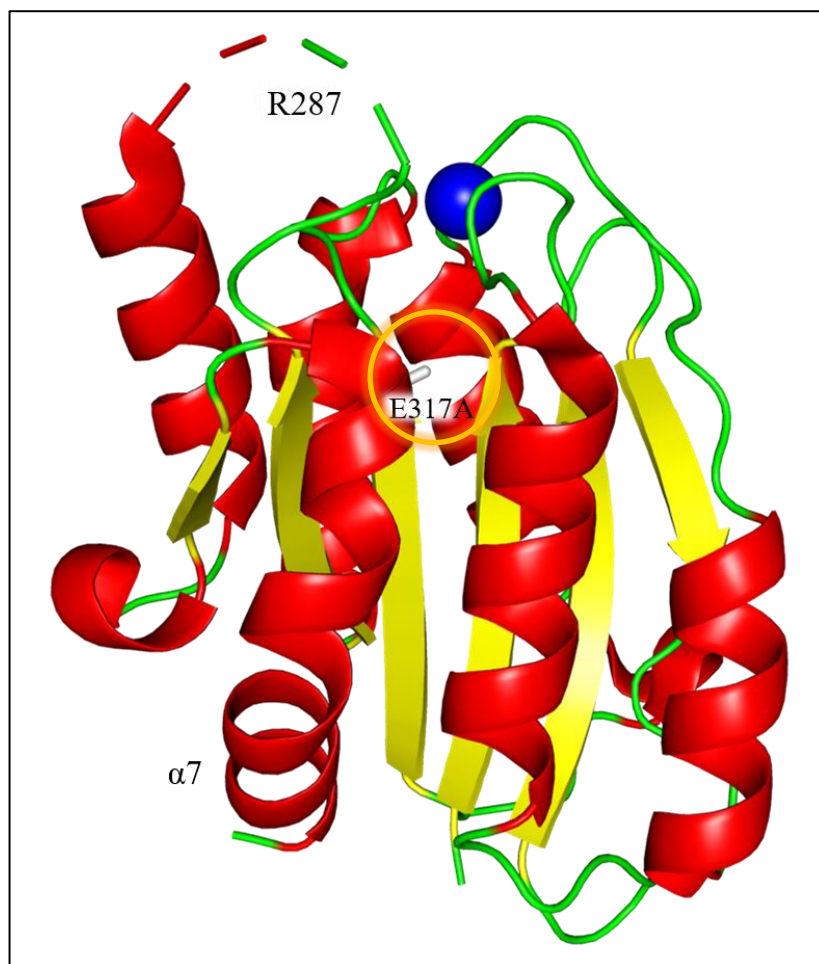
Molemmille α 1I- ja α 2I-domeeneille on pystytty tekemään kohdistettuja mutaatioita ionisidoksen glutamiinihappoon. Sitoutumiskokeilla on todistettu, että esiaktivoitu α I-domeeni sitoo paremmin kollageeniligandia. (Lahti ja muut 2011; Tulla ja muut 2008.) Tuloksista kuitenkin huomattiin, että α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinien α I-domeenit reagoivat eri tavoin mutaatioihin. Eroavaisuudet olivat odottamattomia integriinien välisen rakenteellisen samankaltaisuuden takia, ja antoi myös uuden näkökulman selittämään integriinien välisiä toiminnallisia eroja (Lahti ja muut 2011).

α 1 β 1-integriinin esiaktivoitun α 1-domeenin rakenne selvitettiin vuonna 2011 (Lahti ja muut 2011). Tämä rakenne aikaansaatiin muuttamalla ionisidoksen muodostama glutamiinihappo 317 alaniiniksi (E317A), jonka seurauksena ionisidosta ei muodostunut α C- ja α 7-heliksin välille. Saatu rekombinantti α 1I-domeeni kiteytettiin ja sen kiderakenne selvitettiin. Tämän suuremman kollageeniaffiniteetin omaavan α I-domeenin kiderakenne paljasti uudenlaisen välimuotoisen konformaation α 1I-domeenille (kuva 10.).

α 1I-domeenin välimuotoisessa konformaatiossa E317:n ja R287:n välinen ionisidos, joka on vastuussa domeenirakenteen sulkemisesta, ei ole muodostunut ja rakenne muistuttaa enemmän α 1I-domeenin avonaista rakennetta. Transitionaalisen ja avonaisen muodon välillä on niiden samankaltaisesta toiminnasta huolimatta muutama suuri ero. Välimuotokonformaatiossa α C-heliksi on purkautunut ketjuksi ja siirtynyt kauemmas

MIDAS-alueen metalli-ionista avoimen konformaation kaltaisesti. $\alpha 7$ -heliksi ei kuitenkaan ole liikkunut lainkaan alaspäin, kuten avonaisessa konformaatiossa, jolloin αI -domeeni ei pysty aktivoimaan βI -domeenia c-terminaalaisella glutamiinihapollaan. Tämän lisäksi MIDAS-alue on pentaedrisessä molekulaarisessa geometriassa, eikä avoimen konformaation kaltaisessa oktahedraalisessa koordinaatiossa. (Lahti ja muut 2011.) Tämän välimuotoisen konformaation uskotaan olevan $\alpha 1\beta 1$ -integriinin αI -domeenin aktivaatiomekanismissa avoimen ja suljetun konformaation välissä, kuvastaen tilaa, jossa αI -domeenin R287 – E317 välinen ionisidos on juuri katkennut.

Sama mutaatio on suoritettu myös $\alpha 2 I$ -domeenille, joka kiteytettiin ja sen rakenne selvitettiin. Rakennetta ei olla toistaiseksi julkaistu, mutta sen analysoinnissa ei huomattu uudenlaista välimuotoista konformaatiota $\alpha 2 I$ -domeenille (Tiina Salminen, Åbo Akademi, henkilökohtainen tiedonanto 26.10.2021). Tämän eron uskotaan olevan merkittävä tekijä siinä miksi $\alpha 1 I$ - ja $\alpha 2 I$ -domeenit, jotka ovat rakenteellisesti samankaltaisia, toimivat eri tavoin eri tehtävissä. Tätä välimuotoista konformaatiota ei ole todettu ilman mutaatiota αI -domeeniin, joten sen ilmeneminen luonnollisissa olosuhteissa on vielä epäselvä. (Lahti ja muut 2011.)



Kuva 10 - $\alpha 1$ -domeenin välimuotoinen konformaatio. α -heliksit ovat kuvassa punaisella, β -levyt keltaisella ja ketjut vihreällä. Metallioni on kuvattu sinisenä pallona ja tärkeät aminohapot on nimetty. Mutaatio rakenteessa ympyröity. PDB ID: 4AOQ. (Lahti ja muut 2011.)

6. TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Vaikka α I-domeenin rooli integriineissä on tunnettu, sen spesifistä sitoutumismekanismia ei vielä tiedetä. Tämän lisäksi on epäselvää, miten α I-domeenin sitoutuminen ligandeihin eri integriinien välillä eroaa ja miten se vaikuttaa integriinien lopulliseen funktioon. α 1I- ja α 2I-domeenin sitoutumismekanismeja ja sitoutumista on tutkittu tutkimusryhmässämme jo jonkin aikaa, ja sitoutumiskokeiden perustella on pystytty todistamaan, että α 1I- ja α 2I-domeenien toiminta eroaa toisistaan niiden hyvin samankaltaisesta rakenteesta huolimatta. Aikaisemmin kiteytetyn α 1I^{E317A}-domeenin rakenne paljastaa α 1I-domeenilla olevan esiaktivoitu, välimuotoinen konformaatio, mutta tutkimus ei ota kantaa α 2I-domeeniin ja sen sitoutumismekanismiin. (Lahti ja muut 2011.)

Tämän pro gradu –tutkielman tavoitteena oli tutkia ja verrata kollageenireseptori-integriinien α 1 β 1 ja α 2 β 1 α I-domeenien α C-heliksissä olevan arginiinin (R287/288) roolia α I-domeenin aktivaatiossa toiminnallisella ja rakenteellisella tasolla. Tutkimme rakenteellisia eroja α 1I- ja α 2I-domeenin välillä kiteyttämällä R288A pistemutaatiolla aktivoitu α 2I-domeenia ja selvittämällä kiderakenteen röntgensädekristallografialla. Kiteytyksen ohella tutkimme aktivoitujen mutaatioiden vaikutusta α I-domeenien ja kollageenin väliseen sitoutumistehokkuuteen sitoutumiskokeiden avulla, jonka tuloksista määritimme aktivoituille α I-domeeneille suuntaa-antavat laskennalliset sitoutumisvakiot. Vertasimme saatuja arvoja keskenään, selvittääksemme onko mutaatioilla samankaltainen vaikutus sekä α 1 β 1- ja α 2 β 1- integriinien α I-domeenien aktivaatioon.

7. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

7.1. Sitoutumiskoe

7.1.2 Villityypin ja mutatoitujen α I- ja α 2I -domeenien tuotto

7.1.2.1 α I^{WT} -domeenin, α I^{R287A} -domeenin ja α I^{E317A} -domeenin tuotto *E. coli*:ssa

Ihmisen kolme erilaista α 1-integriinin α I-domeenia oli etukäteen lisätty pGex-2T – tuottovektoriin (Cytiva Lifesciences). Tuottovektoreihin oli siirretty α I-domeenin villityyppi (*engl.* wild-type, WT) ja R287A ja E317A pistemutatoidut α I-domeenit. Tuottovektorissa oli kloonauskohdan edessä valmiina glutationi-S-transferaasi-proteiinin (*engl.* glutathione S-transferase, GST) geeni, jolloin tuotetut α I-domeenit ilmenivät GST-fuusioproteiineina. Tämän lisäksi pGex-2T-tuottovektori sisälsi trombiinin katkaisukohdan GST:n ja kloonauskohdan välissä, fuusioproteiinin muodostamista varten BamHI- ja EcoRI-restriktiokohdat, sekä ampisilliiniresistenssigeenin. Plasmidien sekvenssit oltiin tarkastettu sekvensoimalla ja siirretty BL21 *E. coli*-soluihin.

Jokaisesta α I-domeenista tehtiin erilliset 50 ml esikasvatukset LB-mediumiin (*engl.* Luria-Bertani broth, LB), johon oli lisätty 100 μ g/ml ampisilliini-antibioottia. Esikasvatusta kasvatettiin yön yli 37 °C:ssa 250 rpm ravistelussa. Seuraavana päivänä jokaisesta kolmesta eri α I-domeenista tehtiin viiden litran tuottokasvatus LB-mediumiin, jossa oli 100 μ g/ml ampisilliinia. Soluja kasvatettiin 37 °C:ssa 180 rpm ravistelussa, kunnes OD₆₀₀ arvo saavutti vähintään 0,6. BL21-solujen proteiinituotto käynnistettiin 0,4 mM IPTG:llä (*engl.* isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG), jonka annettiin vaikuttaa kuusi tuntia huoneenlämmössä 23°C 180 rpm ravistelussa.

Tämän jälkeen solut kerättiin sentrifugoimalla (6200 x g, 10 min, +4°C) ja muodostunut solupelletti otettiin talteen ja pakastettiin -20°C.

7.1.2.2. $\alpha 2I^{WT}$ -domeenin, $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin ja $\alpha 2I^{E318A}$ -domeenin tuotto *E. coli*:ssa

pGex-2T-tuottovekoriin oli etukäteen siirretty $\alpha 2I$ -domeenin villityyppi ja pistemutatoitunut $\alpha 2I^{R288A}$ -domeeni ja $\alpha 2I^{E318A}$ -domeeni. Nämä mutaatiot olivat vastaavanlaiset kuin $\alpha 1I$ -domeenilla. $\alpha 2I$ -domeenin geenin eteen oli lisätty $\alpha 2I$ -tuottovektorin tavoin GST-proteiini ja $\alpha 2I$ -GST-fuusioproteiinin tuotto ja solujen säilytys tapahtuivat samalla tavalla kuin kohdassa 7.1.2.1.

7.1.3. Villityyppien ja mutatoitujen $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien puhdistus *BL21 E.coli* soluista

Pakastettu solupelletti suspensoitiin PBS:ssään (*engl.* Phosphate-buffered saline, PBS), jonka jälkeen solut hajotettiin sonikoimalla 4 kertaa 15 sekunnin ajan pitäen näyteputkea samalla jäähauteessa. Solususpensioon lisättiin tämän jälkeen 2 % Triton X-100 reagenssia ja suspensiota sekoitettiin hitaasti pyöritellen 30 minuuttia +4°C:ssa. Tämän jälkeen solususpensio sentrifugoitiin (35 000 x g, 10 min, +4°C) ja supernatantti otettiin talteen.

Supernatanttiin lisättiin 2 ml 50 % PBS:ssä olevaa glutationisefaroosia affiniteettikromatografiaa varten. Näytettä inkuboitiin matriksin kanssa 30 minuuttia hitaasti pyöritellen +4°C:ssa. Sefaroosimatriksi sentrifugoitiin (500 x g, 5 min, +4°C) pelletiksi ja siirrettiin 10 ml pylvääseen. Sefaroosipylväs pestiin kolmesti kylmällä PBS:llä, jonka jälkeen fuusioproteiini eluoiitiin 3 ml eluutiopuskurilla (30 mM pelkistetty glutationi TRIS puskurissa, pH 8,5) 0,5 ml fraktioihin. Jokaiselle eluoidulle fraktiolle tehtiin nopea Bradford-testi määrittämään konsentroiduimmat proteiinifraktiot dialyysia varten. Bradford-näyte sisälsi 10 μ l proteiininäytettä, 790 μ l PBS:ää ja 200 μ l Bradford-reagenssia (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Dialyysissa käytettiin 3 ml 10000 MW dialyysikasettia (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific), joka täytettiin αI -domeenin sisältävillä proteiinifraktioilla. Kasettia inkuboitiin PBS:ssä +4°C:ssa samalla sekoittaen kahden tunnin ajan. Tämän jälkeen proteiini kerättiin talteen, sen konsentraatio mitattiin Bradford-menetelmällä edellä mainitusti ja säilöttiin -20 °C:seen.

7.1.4. Kuoppalevyjen päällystäminen BSA:lla, Kollageeni I:llä ja Kollageeni IV:llä

96-kuoppalevy (DELFI[®]A Microtitration Plate, PerkinElmer Inc.) päällystettiin sitoutumiskoetta varten tyypin I ja IV kollageeneilla (Corning[®]) sekä BSA:lla (*engl.* Bovine Serum Albumin, BSA). Kollageenimäärä oli laskettu siten, että sitä olisi kuopassa 5 ug/cm² kun liuosta pipetoitiin 100 µl/kaivo. BSA:na käytettiin 3.75 % Diluent II (DELFI[®]A/AutoDELFI[®]A, PerkinElmer Inc.). Molemmat liuokset valmistettiin PBS:ään. Kaivoliuokset inkuboituivat levyllä yön yli +4°C:ssa.

7.1.5. Sitoutumiskoe

Päällystetyt kaivot pestiin PBS + 2 mM MgCl₂. Pesun jälkeen kaivot blokattiin BSA:lla (Diluent II ja PBS 1:1, 100 µl/kaivo) tunnin ajan huoneenlämmössä. Blokkauksen jälkeen kaivot pestiin edellä mainitusti.

Tämän jälkeen jokaiseen kaivotyyppiin (kol I, IV ja BSA) tehtiin αI-domeeni-proteiininäytesarja (10–2000 ng/100 µl). Proteiininäytteet tehtiin DELFI[®] Assay Buffer:iin, johon on lisätty 2 mM MgCl₂. Näytteitä inkuboitiin kaivoissa huoneenlämmössä tunnin ajan, mahdollistaen αI-domeenin sitoutuminen kollageeniin. Tunnin jälkeen kaivot pestiin kolmesti edellä mainitusti. Pesun jälkeen kaivoihin lisättiin Europium-leimattu anti-GST vasta-ainelaimennos (1:1000) (DELFI[®]Eu-N1-anti-GST, PerkinElmer Inc.), jota inkuboitiin tunti huoneenlämmössä. Lopulta kaivot pestiin kolmesti ja niihin lisättiin 100µl/kaivo DELFI[®] Enhancement solution:ia (PerkinElmer Inc.) jonka annettiin vaikuttaa 5 min huoneenlämmössä. Europium-leimatusta anti-GST vasta-aineesta saatu signaali mitattiin aikaerotteisella fluoresenssilla (PerkinElmer Inc., Victor³).

7.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytys

7.2.1. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenien tuotto ja puhdistus

Ihmisen $\alpha 2$ integriinin αI^{R288A} -domeeni siirrettiin pGex-2T-tuottovektoriin. $\alpha 2I$ -domeenien perään lisättiin GST-proteiini. Fuusioproteiinin tuotto tapahtui samalla tavalla kuin kohdassa 7.1.2.2.

Proteiini puhdistettiin samalla tavalla kuin kohdassa 7.1.3., mutta sefaroosimatriksin pesupuskurina käytettiin 40 mM Tris + 2mM MgCl₂ (pH 7,4), ja pylväs pestiin sillä viidesti ennen proteiinin eluointia. Matriksin pesun jälkeen pylvääseen lisättiin 3 ml 100 NIH/ml trombiinia (Abcam plc.), joka laimennettiin Tris-pesupuskuriin. Trombiinin annettiin vaikuttaa pylväässä yön yli huoneenlämmössä ja se eluoiitiin seuraavana päivänä samalla puskurilla. Eristetyn $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin konsentraatiot mitattiin Bradford-menetelmällä ja konsentroidiin tarvittaessa Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filer Device:lla (Millipore Co.), jotta proteiinikonsentraatio oli lopulta vähintään 10 mg/ml.

7.2.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytyksen optimointi

$\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytysolosuhteen optimointi aloitettiin seulomalla kiteytysolosuhteita kahdella kaupallisella puskurisarjalla (engl. screen) kahdessa eri lämpötilassa. Käytetyt sarjat olivat PACT premier™ HT-96 / FX-96 (MD1-36 / MD1-36-FX) (Molecular Dimensions) ja JCSG-plus™ (MD1-37) (Molecular Dimensions). Molempia sarjoja valmistettiin kaksi, joiden annettiin inkuboitua huoneenlämmössä ja +10 °C:ssa. Kuoppalevyt pipetoitiin Mosquito® crystal laitteella (SPT Labtech Ltd.) ja kiteytys tehtiin käyttäen ns. istuvia pisaroita (engl. sitting drop) ja höyrydiffuusiomenetelmää (eng. Vapour diffusion).

Kiteytyspisaroita pipetoitiin kolmessa erilaisessa tilavuudessa: 150 nL proteiiniliuosta + 75 μ l kaivoliuosta, 100 nL proteiiniliuosta + 100 μ l kaivoliuosta ja 75 nL proteiiniliuosta + 150 μ l kaivoliuosta. Tämän jälkeen kiteytyslevyt peitettiin muovikalvolla ja jätettiin inkuboitumaan. Levyjä inkuboitiin, kunnes niihin muodostui kiteitä.

Kiteiden muodostuttua kolme parasta olosuhdetta kiteiden muodostumiselle valittiin, jonka jälkeen näitä olosuhteita optimoitiin entisestään muuttamalla kaivoliuoksen ja

proteiiniliuoksen suhdetta. Optimointilevyjä valmistettiin sekä huoneenlämpötilaan, että +10 °C:seen. Levyjen annettiin jälleen inkuboitua kiteiden muodostumiseen asti.

7.2.3. Röntgensädekristallografia ja proteiinirakenteen selvittäminen

Parhaimpien kiteiden kyky heijastaa röntgensäteitä testattiin alustavasti PX-Scanner laitteella (Agilent Technologies Inc.) suoraan kuoppalevyiltä varmistamaan, etteivät muodostuneet kiteet olleet suolakiteitä ja niiden heijastuskapasiteetin soveltuvuus rakennemääritykseen. Tämän jälkeen kiteet jäädytettiin nestemäisellä tyypellä ja jäädytetystä kiteestä mitattiin röntgensädeheijastusdata sekä Turun Biotiedekeskuksen röntgensädelaitteistolla (engl. home source) että ESRF:n sykrotronilla (European Synchrotron Radiation Facility, ERSF, Grenoble, Ranska).

Dosentti Tomi Airene Åbo Akademin luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunnasta prosessoi saadusta röntgensädeheijastusdatasta $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenille 3D-rakenteen käyttämällä XDS-ohjelmaa (Kabsch 2010) ja molekyylikorvaus (engl. molecular replacement) –menetelmää ja suljetun $\alpha 2I$ -domeenin rakennetta (PDB ID: 1AOX) mallina CCP4i ohjelmistolla (Winn ja muut 2011). Tämän jälkeen rakenteen hienosäätöön käytettiin CCP4i:n lisäksi myös COOT ohjelmaa (P. Emsley ja Cowtan 2004). Rakenteen visualisointiin käytettiin PyMol-ohjelmaa (Schrödinger Inc.).

8. TULOKSET

8.1. α I-domeenien toiminnalliset sitoutumiskokeet

8.1.1. α 1I-domeenien ja α 2I-domeenien saanto eroavat toisistaan

α 1I- ja α 2I-domeenia tuotettiin α I-domeeni – GST-fuusioproteiinina *E. coli*:ssa. Molempien integriinien α I-domeeneja tuotettiin villityyppeinä, sekä kahtena erilaisena mutanttina (α 1I^{R287A}/ α 2I^{R288A} ja α 1I^{E317A}/ α 2I^{E318A}). Nämä mutantit valittiin tarkasteltavaksi siksi, koska *in silico* –rakennetutkimus ja aikaisemmat tutkimustulokset todistivat, että näiden aminohappojen mutatoiminen molempien integriinien rakenteissa estäisi α I-domeenin suljetun konformaation muodostumisen. Mutaatio α I-domeenien α C-heliksin arginiinissa (R287/R288) tai α 7-heliksin glutamaatissa (E317/E318) aiheuttavat sen, että heliksien välinen ionisidos ei pysty muodostumaan, jolloin heliksit eivät sitoudu yhteen ja sulje α I-domeenin kollageenia sitovaa MIDAS-alueen metalli-onia pois. Mutaatiot aiheuttavat täten α I-domeeneissa esiaktivaation, jolloin domeenien affiniteetti kollageeniligandiin on suuri jo ennen ligandin sitoutumista.

Jokaista versiota α 1I- ja α 2I-domeenista tuotettiin kaksi erää. α I-domeenit puhdistettiin GST-affiniteettikromatografialla ja keräämällä parhaimmat proteiini-fraktiot talteen. Näistä fraktioista määritettiin jokaiselle proteiinierälle konsentraatio. Erien konsentraatiot laskettiin käyttämällä Bradford-menetelmää ja BSA:n avulla ennalta määritettyä standardisuoran yhtälöä (kaava 1.).

α I-domeenien saantojen ero vaihteli α I-domeenien, sekä proteiinierien välillä (taulukko 1). Eroavaisuus oli suuri α 1I- ja α 2I-domeenien välillä, ja α 1I-domeenit tuottuivat huomattavasti huonommin kuin α 2I-domeenit. Huono saanto näkyi etenkin α 1I-domeenien mutanttien tuotossa, jotka osoittautuivat poikkeuksellisen vaikeaksi tuottaa riittävässä määrin. α 2I-domeenien mutantit tuottuivat lähes yhtä hyvin kuin villityyppi. Ero molempien integriinien α I-domeenien villityyppien välillä oli hyvin pieni ja tuki käsitystämme siitä, että molempien α I^{WT}-domeenin tuotto suuremmissa määrin itsenäisinä domeeneina oli mahdollista (Larson ja muut 1989).

$$[c] = \frac{A595 - y - \text{akselin leikkauspiste}}{\text{kulmakerroin}}$$

Taulukko 1 - $\alpha 1$ - ja $\alpha 2$ -domeenien keskiarvoinen saanto.

$\alpha 1$-domeenien saanto			
	$\alpha 1$ WT	$\alpha 1$ R287A	$\alpha 1$ E317A
[c] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	13,0	2,2	2,3
$\alpha 2$-domeenien saanto			
	$\alpha 2$ WT	$\alpha 2$ R288A	$\alpha 23$ E318A
[c] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	20,1	14,6	16,8

8.1.2. $\alpha 1$ ^{WT}, $\alpha 1$ ^{R287A} ja $\alpha 1$ ^{E317A} sitoutuvat tyypin I kollageeniin eri aviditeetilla

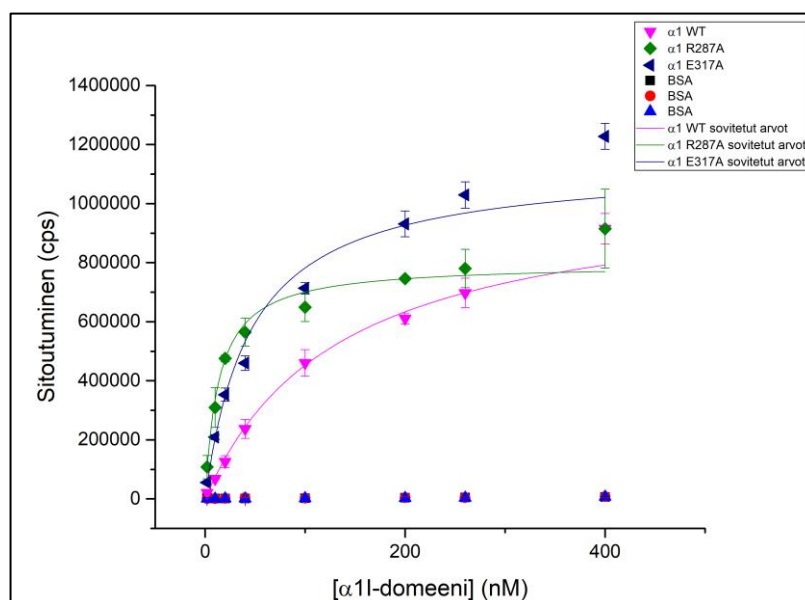
Proteiinituoton ja eristyksen jälkeen $\alpha 1$ ^{WT}-, $\alpha 1$ ^{R287A}- ja $\alpha 1$ ^{E317A}-domeeneille suoritettiin sitoutumiskokeet. $\alpha 1$ -domeenien sitoutumista tutkittiin tyypin I kollageenilla ja taustana käytettiin BSA:n sitoutumista. Sitoutumistehokkuutta tyypin I kollageeniin mitattiin Eu-leimatun anti-GST-vasta-aineen avulla, joka tunnisti GST-hännän GST- $\alpha 1$ -domeeni fuusioproteiinista. Kaivoihin viimeiseksi lisätty DELFIA[®] Enhancement solution irrotti vasta-aineesta europium-leiman, joka kelatoitui ja alkoi fluoresoida. Syntyneen fluoresenssin voimakkuus mitattiin aikaerotteisella fluoresenssilla.

Kaivolevyn useiden eri pesujen ansiosta kaikki sitoutumaton $\alpha 1$ -GST-fuusioproteiini sekä vasta-aine oli pesty pois, jolloin fluoresenssin tiedettiin tulevan vain $\alpha 1$ -kollageeni I kompleksin muodostavista fuusioproteiineista. Muodostunut fluoresenssi korreloi siis suoraan kollageenin sitoutuneeseen $\alpha 1$ -domeenin määrään.

$\alpha 1$ -domeenien sitoutumista mitattiin usealla eri $\alpha 1$ -domeeni konsentraatiolla selvittääksemme miten domeenin sitoutumistehokkuus kollageeniin korreloi kasvavan substraatin määrään. Tämä korrelaation avulla pystyttiin piirtämään saaduista tuloksista Michaelis-Mentenin yhtälön muotoista vastaavat kuvaajat, joista pystyttiin määrittämään jokaiselle $\alpha 1$ -domeenille laskennallinen dissosiaatiiovakion approksimaatio (engl. dissociation constant, K_d) ja sitoutumisen maksimaalinen määrä (B_{max}) (kaava 2., kuvat 11 ja taulukko 2). K_d -arvo arvioi sitä, kuinka tehokkaasti eri domeenit sitoivat kutakin kollageeniligandia. Sitoutumiskokeet toistettiin uskottavuuden vuoksi kolmesti.

$$\text{Sitoutuminen} = \frac{B_{\max}}{\left(1 + \frac{Kd}{[L]}\right)}$$

Kuvasta 11 voi nähdä, että $\alpha 1I^{\text{WT}}$, $\alpha 1I^{\text{R287A}}$ ja $\alpha 1I^{\text{E317A}}$ kaikki sitoutuvat tyypin I kollageeniin. Villityypin sitoutuminen kollageeniin verrattuna mutaatioihin on huonompi ja tämä näkyy korkeana Kd-arvona taulukossa 2. $\alpha 1I^{\text{E317A}}$ sitoutuminen on määrällisesti tehokkainta tyypin I kollageeniin sen korkean B_{\max} -arvon perusteella, mutta $\alpha 1I^{\text{R287A}}$ sitoutuu pienen Kd-arvon perusteella voimakkaimmin tyypin I kollageeniin. Kuvaajat ja laskennalliset Kd-arvot kuitenkin kertovat, että molemmat $\alpha 1I$ -domeenin mutantit sitovat tyypin I kollageenia paremmin kuin villityyppi.



Kuva 11 - $\alpha 1I$ -domeenin sitoutuminen tyypin I kollageeniin. Sitoutumiskoe suoritettiin 96-kuoppalevyllä, joka oli päällystetty tyypin I kollageenilla sekä BSA:lla, joka toimi negatiivisena kontrollina. $\alpha 1I$ -domeenin sitoutumista mitattiin kahdeksalla eri konsentraatiolla ja jokaista konsentraatiota kohti tehtiin kolme rinnakkaista näytettä.

Taulukon kuvaajat sovitettiin hyödyntämällä yhtälöä: $\text{sitoutuminen} = B_{\max} * x / (Kd + x)$.

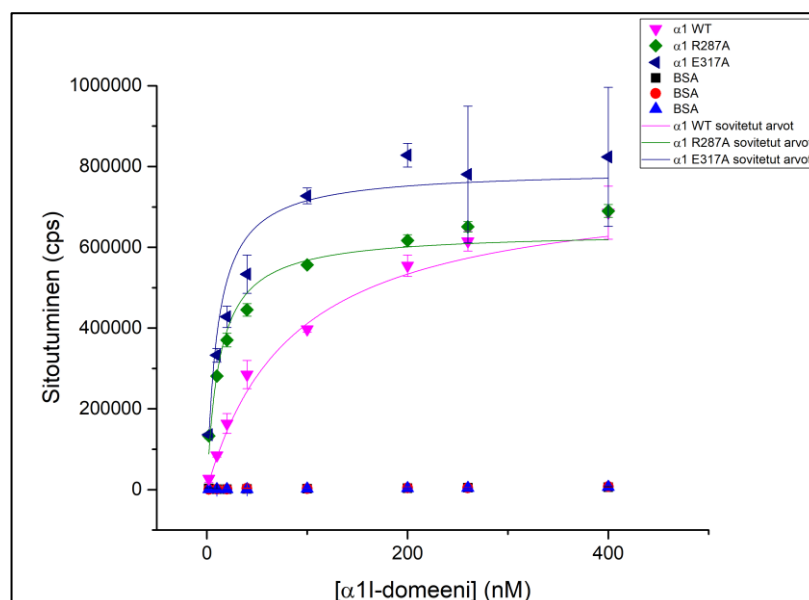
Taulukko 2 - $\alpha 1I$ -domeenin sitoutuminen tyypin I kollageeniin. Kuvan 11 tulokset taulukoituna.

$\alpha 1I$-domeenin sitoutuminen kollageeni I			
$y = B_{\max} * x / (Kd + x)$			
	$\alpha 1$ WT	$\alpha 1$ R287A	$\alpha 1$ E317A
Bmax (cps)	1056620 ± 107649	796501 ± 6922	1136820 ± 90464
Kd (nM)	134 ± 22	14 ± 1	45 ± 8

8.1.3. $\alpha 1I^{WT}$, $\alpha 1I^{R287A}$ ja $\alpha 1I^{E317A}$ sitoutuvat eri aviditeetilla tyypin IV kollageeniin

$\alpha 1I$ -domeenien sitoutumista tyypin IV kollageeniin mitattiin samanlaisilla sitoutumiskokeilla kuin tyypin IV kollageeniin. Sitoutumistehokkuutta tyypin IV kollageeniin mitattiin siksi, koska sen uskotaan olevan $\alpha 1\beta 1$ -integriinin preferoima ligandi verrattaessa sitä $\alpha 2I$ -sitoutumista vasten. $\alpha 1I$ -domeeni sitoo lähes yhtä hyvin tyypin I ja IV kollageenia, mutta mutaatioiden vaikutusta kollageeni IV:n verkkomaisen rakenteen sitoutumiseen haluttiin tutkia ymmärtääksemme $\alpha 2I$ -domeenin ligandispesifiteettiä entisestään. Kollageeni I:n ja IV:n rakenteen merkittävä eroavaisuus tarjoaa myös uuden näkökulman ja mahdollisuuden tutkia αI -domeenin sitoutumisen spesifiteettiä sekä eroja mahdollisissa sitoutumiskohdissa.

Saatujen tulosten perusteella (kuva 12.) $\alpha 1I^{WT}$, $\alpha 1I^{R287A}$ ja $\alpha 1I^{E317A}$ sitoutuvat kaikki myös tyypin IV kollageeniin suhteellisen hyvin. Tämä oli odotettavaa sillä, kollageeni IV on $\alpha 1I$ -domeenin tunnettu ligandi. Erot mutatoitujen $\alpha 1I$ - ja villityypin $\alpha 1I$ -domeenien välillä olivat pieniä, sillä sitoutumistehokkuudessa (K_d) ja sitoutumismäärässä (B_{max}) ei näkynyt kovin suuria eroja. Tämä tukee ennakkotietoa siitä, että $\alpha 1I$ -domeeni sitoo paremmin tyypin IV kollageenia kuin tyypin I (Eble ja muut 1993). Taulukosta 3 kuitenkin näkee, että K_d -arvot ovat molemmille mutanteille pienemmät kuin villityypin. Tämä viittaa mutanttien parempaan sitoutumistehokkuuteen. Paras mutantti tyypin IV kollageenin sitomiseen on $\alpha 1I^{E317A}$, joka poikkeaa yllättäen kollageeni I sitoutumistuloksista, jossa $\alpha 1I^{R287A}$ -domeenille mitattiin parempi sitoutumistehokkuus kuin $\alpha 1I^{E317A}$ -domeenille.



Kuva 12 - $\alpha 1$ I-domeenin sitoutuminen tyypin IV kollageeniin. Sitoutumiskoe suoritettiin 96-kuoppalevyllä, joka oli päällystetty tyypin IV kollageenilla sekä BSA:lla, joka toimii negatiivisena kontrollina. $\alpha 1$ I-domeenin sitoutumista mitattiin kahdeksalla eri konsentraatiolla ja jokaista konsentraatiota kohti tehtiin kolme rinnakkaista näytettä.

Taulukon kuvaajat sovitettiin hyödyntämällä yhtälöä: $\text{sitoutuminen} = B_{\text{max}} * x / (K_d + x)$.

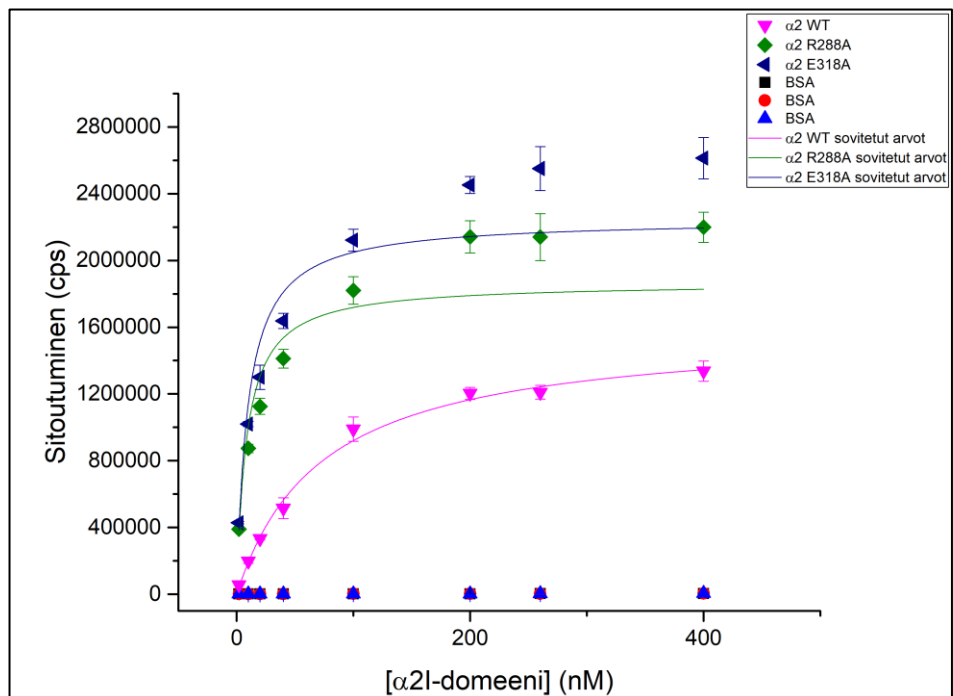
Taulukko 3 - $\alpha 1$ I-domeenin sitoutuminen tyypin IV kollageeniin. Kuvan 12 tulokset taulukoituna.

$\alpha 1$ I-domeenin sitoutuminen kollageeni IV			
$y = B_{\text{max}} * x / (K_d + x)$			
	$\alpha 1$ WT	$\alpha 1$ R288A	$\alpha 1$ E318A
B_{max} (cps)	760632 ± 49419	638327 ± 21671	791724 ± 46303
K_d (nM)	85 ± 12	12 ± 2	11 ± 2

Molempien sitoutumiskokeiden (kuvat 11 ja 12) tuloksista huomataan kuitenkin se, että $\alpha 1$ I^{E317A}-domeenilla on kaikista korkein B_{max}-arvo suhteessa muihin mitattuihin $\alpha 1$ I-domeeneihin. Tämä voisi viitata siihen, että $\alpha 1$ I^{E317A}-domeenilla on tiedetyn sitoutumiskohdan lisäksi toinenkin sitoutumiskohta, jonka vuoksi se pystyy määrällisesti sitomaan enemmän kollageenia. Sitoutumiskokeiden tuloksiin vaikuttaa kuitenkin se, että reaktioissa käytetään kokonaisligandin määrää reaktiossa eikä vapaan ligandin määrää mitä Michaelis-Mentenin kaltainen yhtälö vaatisi. Tämän vuoksi laskennalliset K_d- ja B_{max}-arvot ovat vain suuntaa-antavia, ja matalimmissa arvoissa ilmenee yhtälön ja siitä saatujen arvojen suhteen suurin virhe. Tämän lisäksi tämän tyyppisellä sitoutumiskokeella ei pystytä määrittämään sitoutumispaikkojen lukumäärää, jonka vuoksi tarkkaa ymmärrystä tuloksista on vaikeaa saada. Yhdistämällä molemmat tulokset voidaan kuitenkin todeta, että molemmat $\alpha 1$ I-domeenin mutaatiot ovat onnistuneet sekä ovat odotetusti ”gain of function”-mutantteja.

8.1.4. $\alpha 2I^{WT}$, $\alpha 2I^{R288A}$ ja $\alpha 2I^{E318A}$ sitoutuvat eri aviditeetilla tyypin I kollageeniin

Vastaavanlaiset sitoutumiskokeet suoritettiin $\alpha 2I$ -domeenin villityypille ja kahdelle aktivoitulle mutantille. Saadut tulokset (kuva 13 ja taulukko 4) osoittavat, että kaikilla $\alpha 2I$ -domeenin muodoilla on aviditeettia tyypin I kollageeniin. Paras sitoutumistehokkuus on $\alpha 2I^{R288A}$ -mutantilla, mutta $\alpha 2I^{E318A}$ -mutantin Kd-arvo on hyvin lähellä sitä. Työ toistettiin kolmeen kertaan, jonka perusteella voitiin todeta, että molempien mutanttien vaikutus kollageeni I: n sitoutumistehokkuuteen oli lähes sama. Tämän lisäksi $\alpha 2I^{WT}$ -arvot eivät ole kovin kaukana mutanteista, joka oli odotettavissa, sillä tyypin I kollageenin tiedetään sitoutuvan $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin suurella aviditeetilla. (Madamanchi ja muut 2014.)



Kuva 13 – $\alpha 2I$ -domeenin sitoutuminen tyypin I kollageeniin. Sitoutumiskoe suoritettiin 96-kuoppalevyllä, joka oli päällystetty tyypin I kollageenilla sekä BSA:lla, joka toimi negatiivisena kontrollina. $\alpha 2I$ -domeenin sitoutumista mitattiin kahdeksalla eri konsentraatiolla ja jokaista konsentraatiota kohti tehtiin kolme rinnakkaista näytettä.

Taulukon kuvaajat sovitettiin hyödyntämällä yhtälöä: $\text{sitoutuminen} = B_{\text{max}} * x / (K_d + x)$.

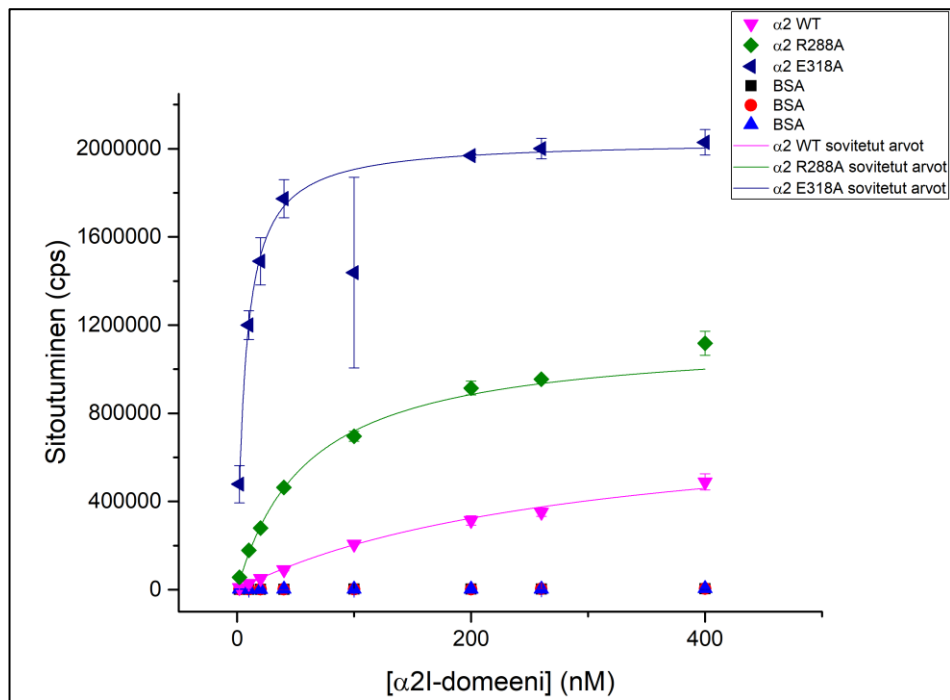
Taulukko 4 – $\alpha 2I$ -domeenin sitoutuminen tyypin I kollageeniin. Kuvan 13 tulokset taulukoituna.

$\alpha 2I$-domeenin sitoutuminen kollageeni I			
$y = B_{\text{max}} * x / (K_d + x)$			
	$\alpha 2I^{WT}$	$\alpha 2I^{R288A}$	$\alpha 2I^{E318A}$
B_{max} (cps)	1590020 ± 72941	1866280 ± 170565	2246800 ± 190756
K_d (nM)	73 ± 6	9 ± 2	10 ± 2

8.1.5. $\alpha 2I^{WT}$, $\alpha 2I^{R288A}$ ja $\alpha 2I^{E318A}$ sitoutuvat myös tyypin IV kollageeniin

$\alpha 2I$ -domeenien sitoutumista tyypin IV kollageeniin mitattiin tekemällä sitoutumiskokeet kaikille kolmelle eri $\alpha 2I$ -domeenille. Sitoutumiskokeet suoritettiin samalla tavalla kuin $\alpha 1I$ -domeeneille, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia. Sitoutumiskokeista saadut tulokset (kuva 14 ja taulukko 5) osoittivat, että molemmat aktivoituneet $\alpha 2I$ -domeenin mutantit sekä luonnollisesti myös $\alpha 2I$ -domeenin villityyppi sitoivat $\alpha 1I$ -domeenin kaltaisesti myös tyypin IV kollageenia. $\alpha 2I^{E318A}$ -mutantti sitoutui huomattavasti tehokkaammin tyypin IV kollageenin verrattaessa toiseen mutanttiin ja villityyppiin. Tämä tulos vastasi myös $\alpha 1I$ -domeenin ja kollageeni IV välillä mitattuja tuloksia, jossa paras sitoutumistehokkuus mitattiin $\alpha 1I^{E317A}$ -domeenilla. Tulokset $\alpha 2I$ -domeenien sitoutumisesta tyypin IV kollageeniin antoivat varmistuksen siitä, että molemmat $\alpha 2I$ -mutantit olivat ”gain of function” -mutantteja niiden huomattavasti pienempien K_d -arvojen perusteella.

$\alpha 2I$ -domeenien sitoutumismäärät (B_{max}) erosivat toisistaan eniten tyypin IV kollageenin sitoutumisen suhteen. $\alpha 2I^{E318A}$ -mutantti satoi huomattavasti enemmän tyypin IV kollageenia kuin villityyppi ja erot molempien aktivoituneiden mutanttien välillä olivat myös poikkeuksellisen suuret verrattuna aikaisempiin tuloksiin. Tämä ero viittasi siihen, että tyypin IV kollageenissa saattaisi olla useampi mahdollinen sitoutumiskohta $\alpha 2I^{E318A}$ -mutantin sitoutumiselle jolloin domeenin spesifisiteetti olisi vähentynyt mutaation yhteydessä. Toiseksi kyse saattaisi olla siitä, että samaan sitoutumiskohtaan sitoutuisi enemmän kuin yksi domeeni, joka näkyisi B_{max} arvon kasvuna. $\alpha 2I$ -domeenin villityyppi näyttää tulosten perusteella sitoutuvan paljon huonommin tyypin IV kollageenin verkkomaiseen rakenteeseen, kuin tyypin I säiemäiseen kollageeniin. Tämä näkyy erittäin korkeana K_d -arvona ($K_d = 289 \pm 49$), joka viittaa $\alpha 2I$ -villityypin ja tyypin IV kollageenin väliseen heikkoon aviditeettiin.



Kuva 14 – $\alpha 2I$ -domeenin sitoutuminen tyypin IV kollageeniin. Sitoutumiskoe suoritettiin 96-kuoppalevyllä, joka oli päällystetty tyypin IV kollageenilla sekä BSA:lla, joka toimi negatiivisena kontrollina. $\alpha 2I$ -domeenin sitoutumista mitattiin kahdeksalla eri konsentraatiolla ja jokaista konsentraatiota kohti tehtiin kolme rinnakkaista näytettä.

Taulukon kuvaajat sovitettiin hyödyntämällä yhtälöä: $\text{sitoutuminen} = B_{\text{max}} * x / (K_d + x)$.

Taulukko 5 - $\alpha 2I$ -domeenin sitoutuminen tyypin IV kollageeniin. Kuvan 14 tulokset taulukoituna.

$\alpha 2I$-domeenin sitoutuminen kollageeni IV			
$y = B_{\text{max}} * x / (K_d + x)$			
	$\alpha 2$ WT	$\alpha 2$ R288A	$\alpha 2$ E318A
B_{max} (cps)	792955 ± 103811	1149920 ± 108429	2037650 ± 6757
K_d (nM)	289 ± 49	60 ± 9	7 ± 1

8.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin rakenne

$\alpha 2I$ -domeenista on olemassa kaksi röntgensädekristallografialla selvitettyä ja tunnettua rakennetta. Nämä rakenteet kuvaavat $\alpha 2I$ -domeenin avonaista, kollageenin sitoutunutta muotoa (Kuva 8. PDB ID: 1DZI), sekä sen suljettua sitoutumatonta muotoa (Kuva 7. PDB ID: 1AOX). Toistaiseksi ei olla kuitenkaan pystytty määrittämään, millaisia konformaation muutoksia näiden kahden tunnetun rakenteen välillä tapahtuu ja onko myös $\alpha 2I$ -domeenilla $\alpha 1I$ -domeenin kaltainen välimuotoinen konformaatio.

Sitoutumiskokeiden tulokset antavat arviota siitä, että molempien $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien suljetun konformaation suolasiltaan osallistuvien aminohappojen mutatoiminen aiheuttaa lisääntyneen affiniteetin tyyppin I ja IV kollageeneihin. Tämän perustella on ollut syytä uskoa, että $\alpha 2I$ -domeenilla voisi olla myös välimuotoinen esiaktivoitu konformaatio.

Tämän oletuksen todentamista varten $\alpha 2I$ -domeeni on kiteytetty aikaisemmin E318A mutantilla ja tässä työssä ionisidoksen vastaparin, R288A mutaatiolla. Tämän toivottiin selvittävän, aiheuttaako kummankin ionisidoksen muodostavien aminohappojen yksittäinen mutatoiminen samanlaisen vaikutuksen $\alpha 2I$ -domeenin rakenteeseen ja, onko $\alpha 2I$ -domeenilla kolmatta välimuotoista konformaatiota. Toiminnallisista sitoutumiskokeista huomattiin, että E318A ja R288A mutantit vaikuttivat eri intensiteetillä $\alpha 2I$ -domeenin toimintaan, joten rakennetulos $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenista pystyisi mahdollisesti selventämään, mitkä kyseisten aminohappojen roolit ovat $\alpha 2I$ -domeenin aktivaatiossa.

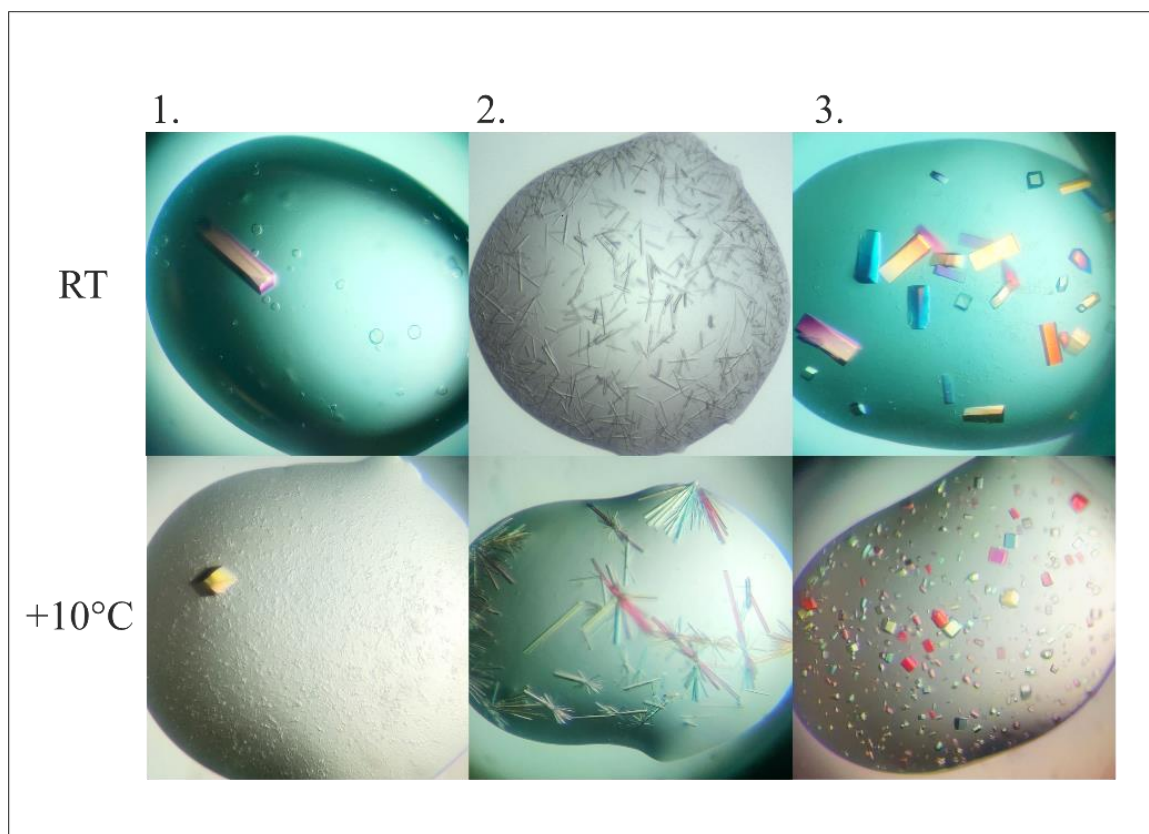
8.2.1. Kiteytysolosuhteiden optimointi ja muodostuneet kiteet

$\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytystä lähdettiin optimoimaan kahdella kaupallisella puskurisarjalla. Paremmaksi sarjaksi osoittautui Molecular Dimensionsin JCSG-plus™ (MD1-37). Kiteitä muodostui useassa eri olosuhteessa sekä huoneenlämmössä, että +10°C. Parhaimmiksi olosuhteiksi $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytykseen osoittautui taulukkoon 6 listatut olosuhteet. Näitä kolmea olosuhdetta optimoitiin vielä entisestään muuttamalla proteiinimäärää ja sen suhdetta kiteytysolosuhteeseen. Kaikissa olosuhteissa isommat yksittäiset kiteet saatiin kasvattamalla proteiiniliuoksen tilavuutta.

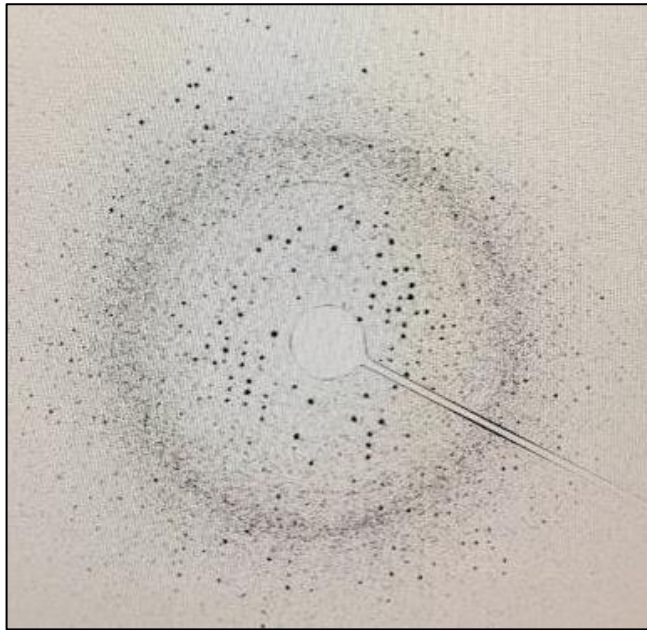
Taulukko 6 - $\alpha 21^{R288A}$ -domeenin alustavan optimoinnin tulokset. Kaikki kolme parasta olosuhdetta saatu JCSG-plus™ skriinillä.

$\alpha 21^{R288A}$ -domeenin kiteytysolosuhteiden alustava optimointi						
	suola	[c] suola	puskuri	[c] puskuri	pH	°C
1	Ammoniumsulfaatti	2 M	BIS-Tris-metaani	0,1 M	5,5	RT
2	Tri-natriumsitraatti dihydraatti	1 M	Natriumkakodylaatti	0,1 M	6,5	RT
3	Ammoniumsulfaatti	2 M,	Natriumkakodylaatti	0,1 M	6,5	+10
	Natriumkloridi	0,2 M				

Taulukkoon valikoituneet olosuhteet muodostivat kuvassa 15 olevia kiteitä, ja parhaimmaksi kiteytysolosuhteeksi osoittautui olosuhde 1. Kiteet muodostuivat kahden viikon aikana pisaroiden tekemisestä ja kiteet olivat suurimmillaan 0,1 mm. Kiteet tarkastettiin proteiinikiteiksi Agilent Technologies:n PX Scannerilla ennen kiteiden poimintaa. Kaikki valitut kiteet osoittautuivat proteiinikiteiksi, jonka todistaa kuvassa 16 oleva diffraktiokartta yhdestä skannatusta kiteestä.



Kuva 15 – $\alpha 21^{R288A}$ -domeenin kiteitä. Kiteet noudattavat taulukossa 6 lueteltuja olosuhteita.



Kuva 16 - Esimerkki 1. kiteytysolosuhteen kiteen muodostamasta heijastuskuvasta. Kide heijastaa vahvasti lähelle keskellä olevaa röntgensädettä ja vastaa tyypillistä proteiinin aiheuttamaa heijastuskuvaa.

8.2.2. Kiteen keräys, skannaus, resoluutio ja rakenteen muodostaminen

Kaksi eri olosuhteessa muodostunutta $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenikidettä kerättiin kiteytyslevyltä ja jäädytettiin nestemäisellä typellä. Keräys tapahtui käyttämällä 0,1 mm keräyssilmukkaa. Yksi kiteistä kuvattiin Turun Biotiedekeskuksen röntgensädekristallografialaitteistolla ja toinen kiteistä lähetettiin Ranskaan Euroopan synkrotronisäteilylaitokselle (*engl.* European Synchrotron Radiation Facility, ESRF). Turun yliopiston Biotiedekeskuksessa kuvatun kiteen resoluutioksi saatiin 1,9 Å ja ESRF:ssä 1,7 Å. Molemmissa olosuhteissa kiteytys onnistui onneksemme ilman ulkoista ligandia, joka oli osoittautunut aikaisemmissa tutkimuksissa haastavaksi.

Datankeruu suoritettiin dosentti Tomi Airenten ohjauksessa. Rakennemäärittelykseen käytettävien tietokoneohjelmien, sekä teoreettisen taustan opetteluun olisi tarvittu enemmän aikaa kuin erikoistyön puitteissa oli mahdollista, jonka vuoksi dosentti Airene demonstroi muut rakennemäärittelyksen vaiheet. Dosentti Airene ratkaisi kiteen heijastuksesta saadusta datasetista $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenille aikaisemmin tuntemattoman kiderakenteen.

8.2.3. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiderakenne ja sen laatuindeksit

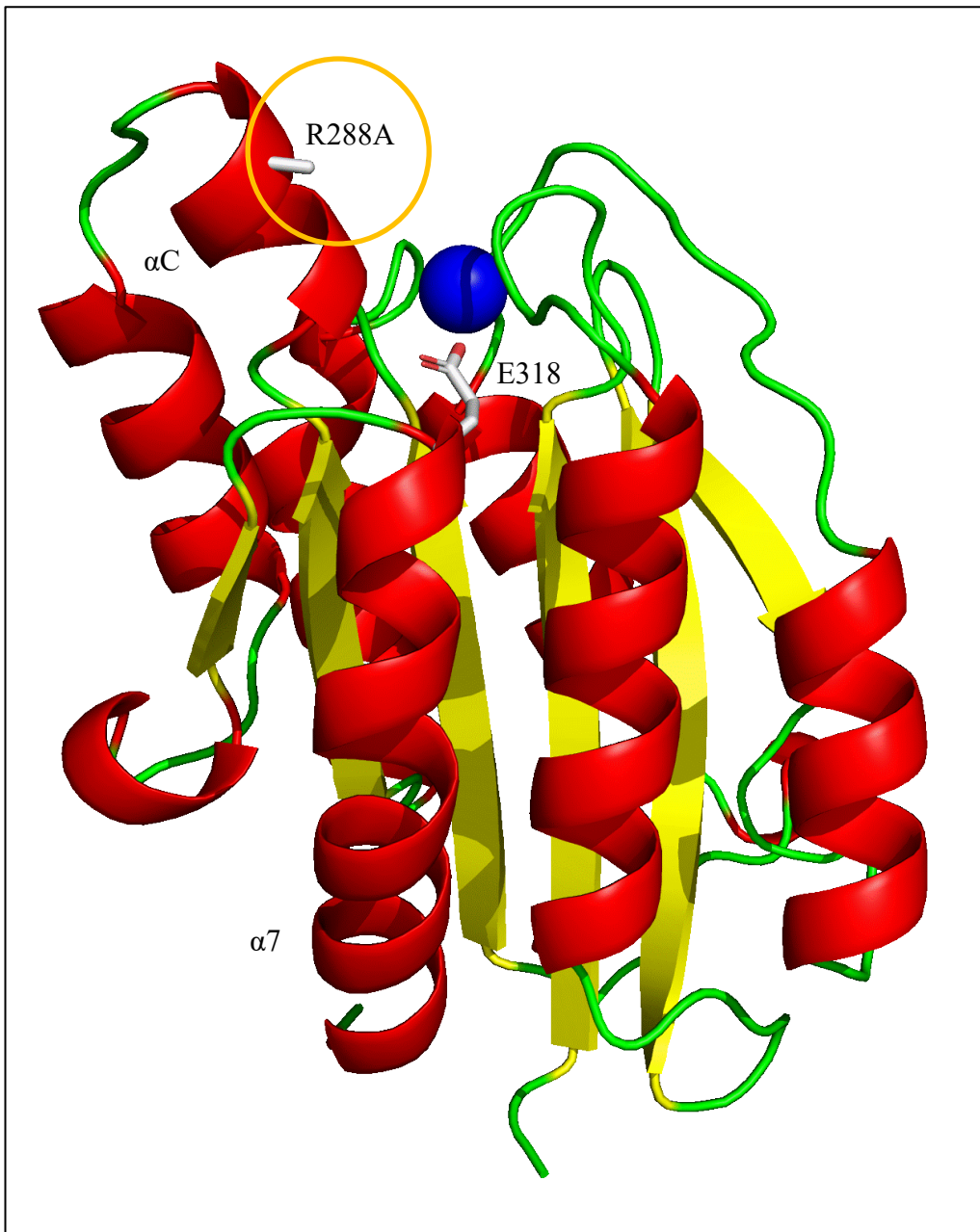
Dosentti Airenne ratkaisi $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin rakenteen Turusta saadun datasetin, sekä ERSF datasetin perusteella. Näissä saaduista dataseiteistä hän keskittyi ensimmäiseen Turun Biotiedekeskuksessa kerättyyn datasettiin (Taulukko 7). Datasetin avulla selvitettyä rakennetta on jatkokäsitelty ja hiottu, mutta rakenne ei ole vielä täysin valmis.

Taulukko 7 - Selvitetyt $\alpha 2I^{R288A}$ -kiderakenteen tiedot.

Resoluutio (Å)	1,90 - 19,57
Alkeiskoppi	$\alpha = \beta = \gamma = 90,00$ $a = 79,3$ $b = 79,3$ $c = 70,4$
Avaruusryhmä	P 42 21 2 (94)

$\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin rakenteesta halusimme erityisesti tutkia αC - ja $\alpha 7$ -heliksien sijaintia verrattuna suljettuun ja avonaiseen $\alpha 2I$ -domeenin konformaatioon. Tämä oli kiinnostavaa, sillä halusimme tietää, oliko aktivoitulla $\alpha 2I$ -domeenilla myös rakenteellisesti esiaktivoitu välimuotoinen konformaatio. Meitä kiinnosti tietää, oliko $\alpha 2I$ -domeenilla vastaavanlainen välimuotoinen konformaatio kuin $\alpha 1I$ -domeenilla, jossa αC - tai $\alpha 7$ -heliksien sijainti olisi poikkeava $\alpha 2I$ -domeenin suljetusta ja avonaisesta rakenteesta.

Kuten kuvasta 17 näkee, $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenilla ei ole suljetusta tai avonaisesta konformaatiosta poikkeavaa välimuotoista konformaatiota. Kuvasta näkee myös, että αC -heliksi arginiini 288 on onnistuneesti mutatoitu alaniiniksi. Alaniini 288:n ja $\alpha 7$ -heliksin glutamaatti E318:n välille ei ole mutaation vuoksi muodostu ionisidosta, joka aiheuttaisi $\alpha 2I$ -domeenin suljetun konformaation. Rakennetta selvittäessä kuitenkin elektronitiheyskartan huomattiin olevan vähemmän tiheä juuri näiden kahden tutkittavan heliksin kohdalta. Tämä viittaisi siihen, että molemmat heliksi ovat todennäköisesti hyvin liikkuvia näillä alueilla, joten jokin tuntematon hetkellinen konformaatio saattaa olla olemassa myös $\alpha 2I$ -domeenilla.



Kuva 17 – $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiderakenne. α -heliksit ovat punaisella, β -levyt keltaisella ja ketjut vihreällä. Metallioni on kuvattu sinisenä pallona ja tärkeät aminohapot on nimetty. Mutaatio rakenteessa ympäröity. Kuva tehty PyMol:illa.

9. TULOSTEN TARKASTELU

Integriinien täydellistä aktivaatiomekanismia ei toistaiseksi tunneta varmaksi. α I-domeenin omaavista integriineistä kuitenkin tiedetään se, että α I-domeenilla on hyvin merkitsevä rooli koko integriinin aktivaatiossa ja integriinin ligandin sitoutumisessa. Tutkimusryhmämme on perehtynyt jo pitkään kollageenireseptori α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinien α I-domeenien aktivaatiomekanismiin niin toiminnallisella kuin rakenteellisella tasolla.

Vuonna 2011 tutkimusryhmämme julkaisi α 1I^{E317A}-domeenista rakenteen, josta kävi ilmi α 1I-domeenin esiaktivoitu rakenne (Lahti ja muut 2011). Julkaisu ei kuitenkaan ottanut kantaa α 2I-domeeniin ja sen mahdolliseen esiaktivaatioon samaisella mutantilla. Ymmärtääksemme paremmin näiden kahden integriinin välisiä toiminnallisia eroja α 2I-domeenin E318A mutanttia on yritetty tämän jälkeen kiteyttää, mutta sen kiteyttäminen ilman ligandia on osoittautunut haastavaksi.

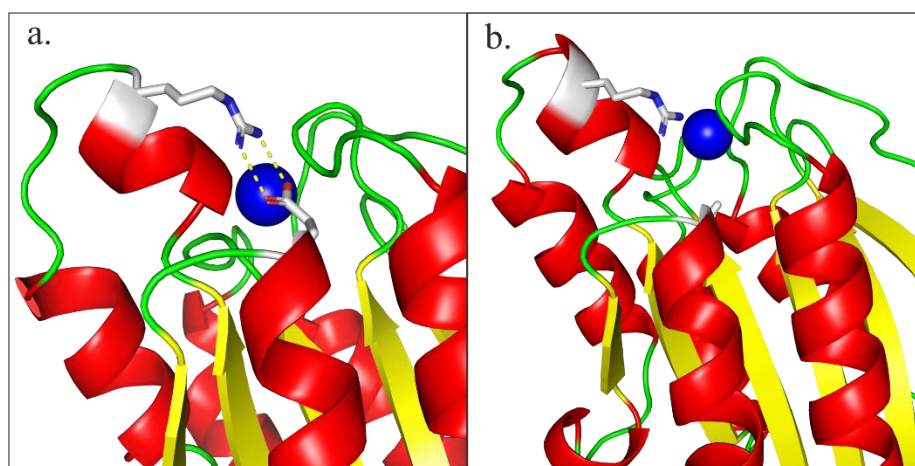
Kollageenireseptori α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinien tarkkaa aktivaatiomekanismia on tässä tutkimuksessa lähdetty tarkastelemaan kahdesta eri näkökulmasta. Mekanistisia ja toiminnallisia eroja integriinien välillä on tutkittu sitoutumiskokeiden avulla, jossa kahta eri kollageenityyppiä, kahta eri α I-domeenia ja niiden mutaatioita on verrattu keskenään. Tämän lisäksi α 2I-domeenin aktivaatioon on perehdytty entisestään myös kiteyttämällä α 2I^{R288A}-domeeni ilman ligandia ja ratkaisemalla alustavasti sen rakenne. Yhdistämällä saatuja tuloksia α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinille on voitu todeta selkeä mekanistinen ero ja rakennetutkimuksen toivotaan tuovan uusia selityksiä integriinien välisille toiminnallisille eroille.

9.1. $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenin toiminnalliset sitoutumiskokeet

9.1.1. Ilman αC - ja $\alpha 7$ -heliksin välistä ionisidosta $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeeni sitovat kollageenia suurella affiniteetilla

$\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien sitoutumistehokkuutta mitattiin kuoppalevyille tehdyillä sitoutumiskokeilla. Kuoppalevyn pohjaan kiinnitettiin tyypin I ja IV kollageenia ja αI -GST-fuusioproteiinin sitoutumista kollageeniin mitattiin Eu-leimatulla anti-GST-vastaaineella. Kontrollina kokeissa toimi BSA, jonka mitatut sitoutumistasot pysyivät alhaisina.

Sitoutumiskokeissa molempien $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien villityyppiä ja kahta eri mutanttia verrattiin keskenään. Mutantit olivat molemmissa domeeneissa samat: joko αI -domeenin αC -heliksin arginiini R287/R288 tai $\alpha 7$ -heliksin glutamaatti E317/E318 oli mutatoitu alaniiniksi. Arg \rightarrow Ala mutantissa elektropositiivinen ja suuri arginiiniaminohappo muutetaan pieneksi hydrofobiseksi alaniiniksi. Ilman elektropositiivista arginiinia Arg-Glu välinen ionisidos ei pääse muodostumaan. Vuorostaan Glu \rightarrow Ala pistemutaatiossa suuri elektronegatiivinen glutamiiniaminohappo muutetaan alaniiniksi. Alaniini ei ole negatiivisesti varautunut, jolloin se ei muodosta ionisidosta arginiinin kanssa. Kuten kuvasta 18 voi nähdä, tämä Arg-Glu välinen ionisidos vetää αC - ja $\alpha 7$ -heliksit yhteen, mahdollistaen αI -domeenin suljetun konformaation. Ilman heliksien välistä ionisidosta αI -domeenin MIDAS-alueen metalli-ioni on jatkuvasti kollageenin saavutettavissa.



Kuva 18 – a. $\alpha 2I^{WT}$ -domeeni suljetussa konformaatiossa. b. $\alpha 2I^{E318A}$ -domeeni esiaktivoitussa muodossa ilman heliksien välistä ionisidosta.

Tämä näkyy sitoutumiskokeissa molempien mutanttien matalissa K_d -arvoissa. K_d -arvoa, eli dissosiaatiovakiota, käytetään kuvaamaan proteiinin sitoutumisvoimakkuutta ligandiin. Mitä matalampi arvo sen tehokkaammin proteiini sitoo ligandiaan, eli sen affiniteetti ligandia kohtaan on suurempi. Molemmat mutantit sekä $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenilla omaavat pienemmän K_d -arvon verrattuna villityyppisiin, joten se on selkeää, että molemmat mutantit ovat aktivoituja (*engl.* ”gain of function”) -mutantteja. Tämä näkyy tuloksissa myös jyrkempinä reaktiokäyrinä. Tulokset olivat odotettuja, sillä ionisidoksen katkaisemisen merkitystä oli tutkittu aikaisemmin proteiinimallinnusta käyttämällä.

B_{max} -arvot eivät kerro meille sitoutumistehokkuuden voimakkuudesta, mutta tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että mutantit lisäävät sitoutuvan ligandin määrää. Tämä voi johtua joko siitä, että mutaatioiden myötä $\alpha 1$ -domeenien ligandispesifisyys heikkenee ja se pystyy sitoutumaan useampaan sitoutumiskohtaan kollageenimolekyylissä. Toinen syy B_{max} -arvon kasvuille voi olla myös se, että useampi kuin yksi αI -mutantti pystyy sitoutumaan samaan sitoutumiskohtaan kasvattaen sitoutuvan kokonaisligandin määrää.

9.1.2. Tyypin IV kollageenin suhteen molemmilla integriineillä on yhdenmukaisempi sitoutumismekanismi

Tyypin IV kollageenin kanssa tehdyistä sitoutumiskokeista voi huomata selkeät yhtäläisyydet molempien integriinien välillä. Näistä kahdesta $\alpha 1I$ -domeenin villityyppi sitoo paremmin tyypin IV kollageenia kuin verrattaessa $\alpha 2I$ -domeenin villityyppiin. Tämä oli odotettavissa, sillä αI -domeenin tiedettiin suosivan sitoutumista tyypin IV kollageeniin. $\alpha 2I$ -domeenin villityyppi sitoo myös tyypin IV kollageenia, mutta ei yhtä hyvin kuin $\alpha 1I$ -domeeni.

Molemmilla integriineillä Glu \rightarrow Ala mutaatio vaikutti eniten αI -domeenin ja tyypin IV kollageenin sitoutumistehokkuuteen. $\alpha 1I$ -domeenilla erot mutanttien ja villityypin välillä eivät ole kovin suuria. $\alpha 2I$ -domeenilla vuorostaan $\alpha 2I^{E318A}$ -domeeni sitoutuu tyypin IV kollageeniin merkittävästi paremmin kuin $\alpha 2I^{R288A}$ - ja $\alpha 2I^{WT}$ -domeenit. $\alpha 2I^{E318A}$:n laskennallinen K_d -arvo (7 ± 1) on 40 kertaa pienempi kuin villityypin K_d -arvo (289 ± 49). Tämän lisäksi sen B_{max} arvo on poikkeuksellisen korkealla, mutta tarkkaa syytä tälle ei toistaiseksi tiedetä. Oletamme, että $\alpha 2I^{E318A}$ -domeenilla on useampi sitoutumiskohta tyypin IV kollageenissa tai useampi αI -domeeni kykenee sitoutumaan samaan

sitoutumiskohtaan kollageenimolekyylissä. Tämän varmistaminen vaatisi tyypin IV kollageenin ja $\alpha 2\text{I}$ -domeeni -kompleksin molekulaarista mallinnusta, joka on haastavaa tyypin IV kollageenin verkkomaisen rakenteen kanssa. Tämän lisäksi $\alpha 2\text{I}$ -domeeni tulisi kiteyttää tyypin IV kollageenin kanssa ja kompleksin rakenne tulisi ratkaista.

Tuloksista on mielenkiintoista huomata miten arginiinin ja glutamaatin mutaatiot vaikuttavat eri tavalla kollageenin sitoutumistehokkuuteen, vaikka mutaatiot aiheuttavat fyysisesti saman muutoksen proteiinirakenteessa. Molemmat mutaatiot aiheuttavat sen, että αC - ja $\alpha 7$ -heliksien välille ei muodostu ionisidosta. Tulokset kertovat, että $\alpha 1\text{I}$ - ja $\alpha 2\text{I}$ -domeenit sitoutuvat tehokkaammin tyypin IV kollageeniin, kun $\alpha 7$ -heliksin glutamaatti on mutatoitu. Arginiinin mutaatio vaikuttaa myös domeenien sitoutumistehokkuuteen laskemalla K_d -arvoa, mutta ei yhtä suuresti kuin glutamaatin mutaatio. Ero mutanttien tehokkuuksien välillä on merkittävä etenkin $\alpha 2\text{I}$ -domeenilla.

Sitoutumiskokeen perusteella voidaan kuitenkin todeta, että molemmat mutaatiot vaikuttavat samankaltaisesti molempien integriinien αI -domeenien aktivaatiomekanismeihin ja, että integriineillä on tyypin IV kollageenin suhteen yhdenmukainen sitoutumismekanismi. Tämä ei ole yllättävää, kun otetaan huomioon integriinien rakenteellinen samankaltaisuus. On kuitenkin selvää, että $\alpha 7$ -heliksin glutamaatin muuttaminen alaniiniksi vaikuttaa merkittävämmiin integriinin sitoutumiseen tyypin IV kollageeniin, kuin arginiinin mutatoiminen. Tämä saattaa johtua siitä, että arginiinin mutatoiminen muuttaa mahdollisesti MIDAS-alueen orientaatiota sitoutumisen suhteen epäsuotuisammaksi kuin glutamaatin mutatoiminen. Tätä ei olla kuitenkaan toistaiseksi tutkittu tarkemmin. Verrattaessa arginiinimutaation sisältävän αI -domeenin toimintaa villityypin αI -domeenin huomataan kuitenkin parantunut sitoutumistehokkuus. Tämä voisi viitata siihen, että arginiinin läsnäolo villityypin αI -domeenissa saattaa mahdollisesti häiritä positiivisen varauksensa takia MIDAS-alueen orientaatiota ja täten myös kollageenin sitoutumista MIDAS:een.

9.1.3. $\alpha 1\text{I}$ - ja $\alpha 2\text{I}$ -domeenin mutaatiot vaikuttavat eri tavalla αI -domeenin ja tyypin I kollageenin sitoutumismekanismiin

Tyypin I kollageenin sitoutumiskoetulokset poikkeavat tyypin IV kollageenin sitoutumiskokeesta saaduista tuloksista. Ensinnäkin tuloksista voi huomata selkeästi, että $\alpha 2\text{I}$ -domeeni suosii ligandikseen tyypin I kollageenia, kun taas $\alpha 1\text{I}$ -domeeni sitoutuu siihen heikommin. Tämä näkyy siinä, että $\alpha 2\text{I}$ -domeenin villityypin sitoutumisvaste ($B_{\max} = 1590020 \pm 72941$) ja tehokkuus ($K_d = 73 \pm 6$) tyypin I kollageeniin on suurempi kuin $\alpha 1\text{I}$ -domeenin ($B_{\max} = 1056620 \pm 107649$, $K_d = 134 \pm 22$). Tulos oli pääteltävissä, sillä $\alpha 2\text{I}$ -domeenin tiedettiin sitovan paremmin kolmoishelikaalista, tyypin I kollageenin kaltaista rakennetta.

Molemmat mutaatiot vaikuttivat αI -domeenin sitoutumiseen laskien domeenien K_d -arvoja, eli tehostaen αI -domeenin sitoutumista tyypin I kollageeniin. Arginiinin ja glutamaatin mutaatiot vaikuttivat enemmän $\alpha 2\text{I}$ -domeenin sitoutumismekanismiin ja tuloksista voi huomata, että näiden kolmen $\alpha 2\text{I}$ -domeenin välillä erot ovat suuremmat kuin $\alpha 1\text{I}$ -domeenilla. Mutaatiot aiheuttavat $\alpha 2\text{I}$ -domeenilla myös suuremman kasvun sitoutuneen kollageenin määrässä (B_{\max}), kun $\alpha 1\text{I}$ -domeenilla sitoutuneen ligandin määrä pysyy suhteellisen samana verrattuna villityyppeihin. B_{\max} arvon kasvu todennäköisesti johtuu siitä, että useampi αI -domeeni pystyy sitoutumaan samaan sitoutumiskohtaan kollageeni I:ssä, jolloin sen sitoutuminen ei ole täysin spesifistä. Tekemämme sitoutumiskoe ei tosin todista tätä hypoteesia.

Merkittävä ero $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinien αI -domeenien välillä näkyy siinä, että tehdyt mutaatiot vaikuttavat yllättäen eri tavalla integriinien sitoutumismekanismiin. $\alpha 1\text{I}$ -domeenin sitoutumiseen vaikutti merkittävämmiin R287 mutatoiminen alaniiniksi, pienentäen K_d -arvoa kahdeksankertaisesti villityypistä. E317 mutantti laski $\alpha 1\text{I}$ -domeenin K_d -arvoa, mutta ei yhtä tehokkaasti kuin arginiinin mutaatio. $\alpha 2\text{I}$ -domeeni, joka sisälsi E318-mutaation vuorostaan satoi tyypin I kollageenia tehokkaammin kuin vastaavan arginiinin mutaatio. Ero molempien mutanttien K_d -arvojen välillä ei ole suuri, mutta kokeesta tehdyt toistoista ilmenee kuitenkin trendi, jossa $\alpha 2\text{I}^{\text{E}318\text{A}}$ -mutantti on testatuista $\alpha 2\text{I}$ -domeeneista tehokkain. Tämä tulos oli ristiriidassa saatujen $\alpha 1\text{I}$ -domeenin sitoutumiskokeiden tulosten kanssa, jossa sitoutumistehokkuudeltaan paras mutantti oli $\alpha 1\text{I}^{\text{R}287\text{A}}$ -mutantti.

Vaikka integriinien α I-domeeneilla oli selkeä ero mutanttien toimivuuden välillä, oli molempien integriinien α I-domeenien B_{\max} arvot samankaltaiset ja käyrät noudattivat huomattua trendiä. Eniten tyyppin I kollageeniä sitoi α 1I^{E317A}- ja α 2I^{E318A}-domeenit. Arginiinin mutaatio lisäsi myös sitoutumisen määrää verrattuna villityyppisiin, mutta vähemmän kuin glutamaatin mutaatio. Tämä samankaltainen tulos integriinien välillä viittaisi siihen, että α 1I- ja α 2I-domeenit sitovat lähtökohtaisesti saman verran kollageenia ja, että mutantit vaikuttavat yhdenmukaisesti molempien α I-domeenien kykyyn sitoa suurempi määrä kollageenia. α 1I- ja α 2I-domeenien mekanistinen ero näkyi siis vain K_d -arvoissa, eli sitoutumisen tehokkuudessa.

9.1.4. α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriinien aktivaatiomekanismeilla on mekanistinen ero

Työn tavoitteena oli määrittää, onko α 1 β 1- ja α 2 β 1-integriineillä samanlainen sitoutumismekanismi kollageeniin. Oletus integriinien samankaltaisesta sitoutumismekanismista on muodostunut molempien integriinien koevoluutiosta ja hyvin konservoituneesta α 1-domeenin rakenteesta. Tämän lisäksi molempien integriinien tiedetään sitovan sekä tyyppin I ja IV kollageenia, joka viittaa siihen, että suurta eroa sitoutumismekanismeissa ei välttämättä ole.

Tutkimusryhmämme on vuonna 2011 todistanut, että α 1I-domeenilla on aktivaatiomekanismin kahden erilaisen konformaation lisäksi vielä yksi välimuotoinen konformaatio. Tämä huomattiin, kun α 1I^{E317A}-domeeni kiteytettiin ilman ligandia ja kiderakenne selvitettiin. Vastaavanlaista konformaatiota ei ole löydetty α 2I^{E318A}-domeenista. Tätä eroa aktivaatiomekanismeissa tuki myös α I-domeeneille tehdyt sitoutumiskokeet, joista selkeästi huomattiin affiniteetin kasvu α 1I^{E317A}-domeenilla suhteessa villityyppiin, joka tukee tietoa siitä, että välimuotoinen konformaatio omaa korkeamman affiniteetin kollageeniin kuin suljettu konformaatio.

Tämä työ tehtiin ymmärtääksemme, onko integriineillä samankaltainen sitoutumismekanismi kollageeniin ja varmistaaksemme oletuksen siitä, että α 2I-domeenilla ei ole välimuotoista konformaatiota. Tämä tapahtui mutatoimalla α C-heliksin arginiini, joka sitoo suljetussa konformaatiossa α 7-heliksin sulkien metalli-ionin pois ligandin läheltä. Tämä arginiini on suljetun konformaation mahdollistavassa ionisidoksessa glutamaatin vastapari. Glutamaatti on mutatoitu jo entuudestaan ja oletimme, että tulokset pysyisivät samanlaisina arginiinin mutaation kanssa.

Työssä saadut tulokset viittaavat siihen, että α I-domeeneilla on erilaiset sitoutumismekanismit, sillä sitoutumiskokeiden tulokset osoittavat, että α I-domeenit reagoivat toisistaan poikkeavasti α C-heliksin arginiinin mutaatioon. Tyypin IV kollageenin sitoutuminen α I-domeeniin on molemmilla integriineillä samankaltainen, mutta syytä sille ei vielä tiedetä. Ero sitoutumismekanismien välillä huomataan tyypin I kollageenin kanssa tehdyissä sitoutumiskokeissa, jossa α 1I-domeenin sitoutumistehokkuus (K_d) kasvaa arginiinin mutaation yhteydessä, kun taas α 2I-domeenin sitoutumistehokkuus ei. Sitoutumiskokeiden useat toistot tukevat saatua tulosta. Saatu tulos ennakoii sitä, että arginiinin pois mutatoimisella on suurempi merkitys α 1I-domeenin konformaatioon kuin α 2I-domeenilla, antaen sille entistä suuremman aviditeetin tyypin I kollageenia kohtaan. α 2I-domeenilla arginiini 288 mutatoiminen ei vaikuta yhtä merkitsevästi sen aviditeettiin.

Sitoutumiskokeiden tuloksista voidaan siis päätellä, että α 1I- ja α 2I-domeenien sitoutumismekanismit poikkeavat toisistaan. α 2I-domeenilla arginiini 288 mutatoiminen vaikuttaa molempien mitattujen kollageenien sitoutumistehokkuuteen huonommin kuin glutamaatti 318:n mutatoiminen. α 2I^{E318A}-domeeni on α 2I-domeenin aviditeetin suhteen paras mutanti. Tämän perusteella voidaan todeta, että arginiinilla on todennäköisesti jokin muu rooli kollageenin sitomisessa, kuin pelkästään α C-heliksin ja α 7-heliksin välisen ionisidoksen muodostaminen.

α 1I-domeenilla arginiini 287 mutatoiminen vaikutti eri tavoin tyypin I ja IV kollageenin aviditeettiin. Tyypin I kollageenin suhteen arginiinin poissaololla oli aviditeettia parantava vaikutus, kun taas tyypin IV kollageenin suhteen arginiinin mutatoiminen aiheutti α I-domeenin ja kollageenin välisen aviditeetin heikentymisen suhteessa glutamaatin mutaatioon. Tämän perusteella voidaan todeta, että α 1I-domeeni sitoo eri mekanismeilla tyypin I ja IV kollageenia ja, että α 1I- ja α 2I-domeenien sitoutumisella tyypin I kollageeniin on selkeä mekanistinen ero.

9.2. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytystulos

9.2.1. $\alpha 2I^{R288A}$ -domeeni kiteytettiin onnistuneesti ilman ligandia

$\alpha 2I^{R288A}$ -domeeni onnistuttiin kiteyttämään useassa eri olosuhteessa käyttämällä höyrydiffuusiomenetelmää. Valitsimme testatuista olosuhteista ne, jotka muodostivat parhaiten yksittäisiä kiteitä ilman mahdollista ylimääräistä ligandia kuten esim. malonaattia. Valittuja olosuhteita uudelleenoptimoitiin, jotta saisimme mahdollisimman suuria ja yksittäisiä proteiinkiteitä, jotka olisi mahdollisimman symmetrisiä ja helposti testattavia. Parhaimmat kiteet muodostuivat, kun proteiiniliuoksen suhdetta kaivoliuokseen nostettiin.

Halusimme erityisesti kiteyttää $\alpha 2I$ -domeenin mutantin ilman ligandia, selvittääksemme ilmeneekö ligandiin sitoutumatonta $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenia avonaisessa tai jossain muussa avoimen ja suljetun välillä olevassa konformaatiossa. Aikaisemmat $\alpha 2I^{R288A}$ -domeenin kiteytysyritykset eivät olleet sitoutumismekanismien ymmärtämisen kannalta olleet kovin hyödyllisiä, sillä $\alpha 2I^{R288A}$ -domeeni oli suostunut kiteytymään vain ulkoisen ligandin kanssa. Kiteytettävät proteiinit ovat biologisesti aktiivisia ja niiden sitoutumista ligandiin on vaikea kontrolloida, jonka vuoksi proteiinin kiteytyminen halutulla tavalla voi olla erittäin haastavaa. Onneksemme käyttämämme kiteytysmenetelmä tuotti tulosta ja onnistuimme keräämään useita eri kiteitä kuvattavaksi. Suolakiteet heijastivat myös röntgensädettä, joten varmistimme PX-scannerilla, että saatujen kiteiden heijastuskuvat vastasivat todella proteiinkiteelle tyypillistä heijastusta. Onneksemme kaikki valitsemamme kiteet heijastivat röntgensäteitä proteiinkiteen kaltaisesti, joten pystyimme olemaan suhteellisen varmoja siitä, että kuvattavat kiteet olisivat todella proteiinkiteitä, eivätkä suolakiteitä. Tarkastelimme erilaisia ja eri olosuhteissa muodostuneita kiteitä varmistaaksemme saadun proteiinin rakenteen oikeaksi.

9.2.2. $\alpha 2I$ -domeenin alustava rakenneanalyysi ei paljasta samankaltaista transitionaalista konformaatiota kuin $\alpha 1I$ -domeenilla

Kaksi $\alpha 2I$ R288A-domeenikidettä onnistuttiin skannaamaan rakenneanalyysiä varten. Ensimmäinen skannaus, jonka tulokset näkyvät tässä työssä suoritettiin Turku Biotiedekeskuksessa ja mittaus tapahtui 21° astetta kidettä kääntämällä. Myös ESRF:ään lähetettiin useampi proteiinikide mitattavaksi hyvin tuloksin. ESRF tuotti parhaimman datan ja resoluution $\alpha 2I$ R288A-domeenille, sillä siellä mittaus tapahtuu 360° astetta kidettä kääntämällä. Dataa ei ole toistaiseksi vielä julkaistu, jonka vuoksi käytämme tässä työssä Turku Biotiedekeskuksessa kerättyä dataa.

Kerätystä datasta dosentti Tomi Airene ratkaisi $\alpha 2I$ ^{R288A}-domeenin rakenteen hyödyntämällä molekulaarista korvaamista. Menetelmässä hyödynnettiin jo tunnettua $\alpha 2I$ -domeenin suljettua rakennetta (PDB: 1A0X). Tämän rakenteen avulla pystyttiin saamaan alustava rakenne $\alpha 2I$ ^{R288A}-domeenille hyödyntämällä tunnetun rakenteen vaihekulmaa (engl. phase angle).

Saadun rakenteen alustavat laatuindeksit olivat hyviä. Rakenteen resoluutio oli 1,9 Å eli erinomainen ja alkeiskopin avaruusryhmäksi saimme P 42 21 2 (94) (Taulukko 7), joka vastasi ortorombista kiderakennetta. Arvot olivat hyvät rakenteen hienosäätöä varten ja lopullisesta rakenteesta voidaan tutkia muun muassa metalli-ionin ja vesimolekyylien koordinaatiota sekä saada selville yksittäisten aminohapposivuketjujen sijainnit erittäin tarkasti.

Kuten kuvassa 17 näkyy, saatu $\alpha 2I$ ^{R288A}-rakenne on samankaltainen kuin tunnettu $\alpha 2I$ -domeenin suljettu rakenne. Saatu rakenne ei kerro, että $\alpha 2I$ -domeenilla olisi kahdesta pääkonformaatiosta poikkeavaa välimuotoista konformaatiota, kuten $\alpha 1I$ -domeenilla. $\alpha 2I$ ^{R288A}-domeenin uudessa alustavassa rakenteessa αC -heliksi ei ole purkautunut lainkaan ja $\alpha 7$ -heliksi ei ole liikkunut lainkaan alaspäin. Analyysimme perusteella, jos domeenia ei olisi mutatoitu rakenne vastaisi täysin $\alpha 2I$ -domeenin suljettua rakennetta. Elektronitiheyskartta on kuitenkin αC - ja $\alpha 7$ -heliksien kohdalta vähemmän tiheä, jonka perusteella tiedämme heliksien olevan hyvin liikkuvia. Saatu tulos ei siis välttämättä ole ainoa mahdollinen konformaatio suuren kollageeniaffiniteetin omaavalle $\alpha 2I$ ^{R288A}-domeenin rakenteelle. Mutaatio on kuitenkin onnistunut rakenneanalyysin perusteella, ja αC -heliksin arginiini on onnistuneesti mutatoitunut alaniiniksi. Tämä selittää miksi αC -

heliksin ja $\alpha 7$ -heliksin välille ei ole muodostunut ionisidosta ja $\alpha 2$ I-domeenirakenne sitoo suurella affiniteetilla kollageenia. Toivomme, että rakenteen jatkokäsittely varmistaisi saadun konformaation todelliseksi.

Rakenteen analyysin perusteella $\alpha 1$ I- ja $\alpha 2$ I-domeenit poikkeavat toisistaan myös rakennetasolla, sillä vain $\alpha 1$ I-domeenille on todettu välimuotoinen konformaatio. Tämän uskotaan selittävän sitoutumiskokeissa mitattujen affiniteettien eroja. $\alpha 2$ I-domeenin R288A ja E318A mutatoituidet ja kiteytetyt $\alpha 2$ I-domeenit paljastivat saman konformaation $\alpha 2$ I-domeenille, joka paljastaa, että $\alpha 2$ I-domeenilla ei ole kolmatta ja välimuotoista konformaatiota. Domeenien väliset konformaatioerot olisi kuitenkin hyvä vielä varmistaa kiteyttämällä $\alpha 1$ I-domeenin vastaava R287A mutantti ja ratkaisemalla sen rakenne.

10. YHTEENVETO

Ihmisen kollageenireseptori-integriinit ovat merkittäviä soluväliaineproteiineja, jotka yhdistävät solun tukirangan soluväliaineeseen. Soluadheesiomolekyyleinä ne viestivät solukalvon läpi molempiin suuntiin mahdollistaen soluadheesion soluväliaineen kollageenimolekyyleihin, sekä ympärillä oleviin soluihin. Toiminnallaan ne aktivoivat useita solunsisäisiä signaalintireittejä ja mahdollistavat omalta osuudeltaan monisoluisten rakenteiden muodostumisen ja ylläpidon.

Tässä työssä tutkittiin ihmisen $\alpha 1\beta 1$ ja $\alpha 2\beta 1$ kollageenireseptori-integriinejä, jotka vaikuttavat merkittävästi muun muassa verihiutaleiden kiinnittymiseen, mesenkymaalisten kantasolujen lisääntymiseen ja kunnollisen immuunivasteen muodostumiseen. Nämä kollageenireseptori-integriinit vaikuttavat soluissa tapahtuviin muutoksiin sitoutumalla spesifisesti soluväliaineessa olevaan tyyppin I ja IV kollageeniin. Näiden integriinien αI -domeenit ovat integriinin ligandia sitovia domeeneita, jotka muodostavat suoran kontaktin kollageenimolekyyliin. Kollageenimolekyylin sitoutuminen αI -domeenin aktivoi integriinin αI -domeenin, jonka seurauksena αI -domeenin suljettu matalan affiniteetin omaava konformaatio muuttuu avonaiseksi ligandia korkealla affiniteetillä sitovaksi konformaatioksi.

αI -domeenin roolia kollageenin tunnistusdomeenina on tutkittu jo pitkään, mutta sen spesifistä sitoutumismekanismia ei vielä tiedetä. Tämän lisäksi on epäselvää, miten αI -domeenin sitoutuminen ligandeihin eri integriinien välillä eroaa ja miten se vaikuttaa integriinien lopulliseen funktioon. $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeeneilla tehdyt sitoutumistutkimukset ovat osoittaneet, että $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ -domeenien toimintamekanismeissa on eroja niiden hyvin samankaltaisesta rakenteesta huolimatta. Vuonna 2011 kiteytetty $\alpha 1I^{E317A}$ -domeenin rakenne paljasti $\alpha 1I$ -domeenilla olevan esiaktivoitu, välimuotoinen konformaatio, mutta tutkimus ei ottanut lainkaan kantaa $\alpha 2I$ -domeeniin ja sen sitoutumismekanismiin.

Tämän pro gradu –tutkielman tavoitteena oli tutkia ja verrata $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ - domeenien αC -heliksissä olevan arginiinin roolia αI -domeenien aktivaatiossa. $\alpha 1I$ - ja $\alpha 2I$ - domeenien sitoutumistehokkuutta tyyppin I ja IV kollageeniin mitattiin sitoutumiskokeilla hyödyntäen molempien integriinien αI -domeenin villityyppejä ja kahta eri mutanttia. Pistemutaatiolla pystyimme saamaan lisätietoa siitä, miten αC - ja $\alpha 7$ -heliksissä olevat, suljetulle konformaatiolle tärkeän ionisidoksen muodostavat aminohapot vaikuttavat αI -

domeenien sitoutumistehokkuuteen. Sitoutumiskokeiden ohella arginiini 288 pistemutaation sisältävä $\alpha 2\text{I}$ -domeeni kiteytettiin ilman ligandia paljastamaan, onko $\alpha 2\text{I}$ -domeenilla olemassa $\alpha 1\text{I}$ -domeenin tavoin kolmas mahdollinen välimuotoinen konformaatio.

Sitoutumiskokeiden tulokset paljastivat, että $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinien αI -domeenien aktivaatiomekanismeilla vaikuttaa olevan mekaaninen ero. Tämä näkyi verrattaessa $\alpha 1\text{I}$ - ja $\alpha 2\text{I}$ -domeenien reaktiota mutatoituihin αI -domeeneihin, joista oli vaihdettu joko αC -heliksin arginiini tai $\alpha 7$ -heliksin glutamaatti alaniiniksi. αI -domeenit eivät reagoineet mutaatioihin samalla tavalla, joka oli yllättävää ottaen huomioon domeenien rakenteellinen samankaltaisuus. Tämä osoittaa, että domeenien aktivaatiomekanismit poikkeavat mekaanisesti toisistaan, sillä arginiinin ja glutamaatin mutaatiot vaikuttivat eri tavoin αI -domeenien ja kollageenin väliseen sitoutumistehokkuuteen. Ero näkyi pitkälti tyypin I kollageenin kanssa suoritetuista sitoutumiskokeissa, jossa $\alpha 1\text{I}^{\text{R}287\text{A}}$ -domeeni sitoutui paremmin tyypin I kollageenin kuin $\alpha 2\text{I}^{\text{R}288\text{A}}$ -domeeni, jonka sitoutumistehokkuus kollageeniin oli vuorostaan heikompi kuin $\alpha 2\text{I}^{\text{E}318\text{A}}$ -domeeni.

$\alpha 2\text{I}^{\text{R}288\text{A}}$ -kiteytystulos ei paljastanut selvää välimuotoista konformaatiota $\alpha 2\text{I}$ -domeenille. Kiteytystulos paljasti, että $\alpha 2\text{I}$ -domeeniin tehty R288A pistemutaatio oli onnistunut ja, että rakenne oli kiteytynyt ilman ligandia. Tämä tarkoitti sitä, että kiderakenne kuvasti $\alpha 2\text{I}$ -domeenin suuren aviditeetin konformaatiota ilman tyypillisesti sen mahdollistavaa ligandia.

Alustava kiteytystuloksen analyysi paljasti, että $\alpha 2\text{I}^{\text{R}288\text{A}}$ -domeenin $\alpha 7$ -heliksi oli pysynyt samassa paikassa kuin $\alpha 2\text{I}$ -domeenin suljetussa konformaatioissa. Se ei ollut liikkunut alaspäin, jonka seurauksena $\alpha 7$ -heliksin C-terminaalinen glutamiini E336 ei pääse aktivoimaan integriinin β -alaysikön I-domeenia. Tämän lisäksi αC -heliksi ei ollut purkautunut ja siirtynyt kauemmaksi MIDAS-alueen metalli-ionista. Tämä oli yllättävää ottaen huomioon kuitenkin kyseisen mutantin kasvanut aviditeetti tyypin I ja IV kollageenin suhteen.

Tulosten perusteella voidaan todeta, että $\alpha 1\text{I}$ - ja $\alpha 2\text{I}$ -domeenien aktivaatiomekanismit eroavat toisistaan myös rakennetasolla. $\alpha 2\text{I}$ -domeenin jyrkempi konformaation muutos suljetusta avonaiseen muotoon ilman välimuotoista konformaatiota voisi selittää $\alpha 1\text{I}$ -domeenin suhteen verrattuja tuloksia. $\alpha 2\text{I}$ -domeeni sitoo enemmän ja nopeammin

kollageeniligandia, joka voisi osittain johtua siitä, että se siirtyy täysin avonaiseen muotoon nopeammin ilman välivaihetta. Syy aktivaatiomekanismien eroon johtuu myös todennäköisesti siitä, että $\alpha 1\beta 1$ - ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinit ilmenevät erilaisissa soluissa jossa niiden toimintaympäristönsä vaativat erilaista aktiivisuutta. $\alpha 2\beta 1$ -integriinit ilmenevät epiteelisolujen, verihiutaleiden, fibroblastien ja megakaryosyyttien pinnalla, jossa niiden tulee reagoida tehokkaasti solun signaaleihin liittyen verihiutaleiden toimintaan ja homeostaasin ylläpitoon. Tämä voisi osittain selittää $\alpha 2$ I-domeenin dramaattisen konformaation muutoksen. $\alpha 1\beta 1$ -integriinit vuorostaan ilmenevät mesenkymaalisissa soluissa ja immuunijärjestelmässä, jossa integriinin esiaktivoidulla konformaatiolla on merkittävämpi rooli soluen toiminnassa ja reaktiokyvyssä. Tämä hypoteesi tulisi kuitenkin todistaa mittaamalla α I-domeenien todelliset assosiaationopeudet ($M^{-1}s^{-1}$), sekä tutkimalla integriinien toimintaa eri solutyypeissä, erilaisten solustressien alla.

11. LÄHTEET

- Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* **339**:269–280.
- Calderwood, D. A., Tuckwell, D. S., Eble, J., Kühn, K. & Humphries, M. J. (1997) The Integrin $\alpha 1$ A-domain Is a Ligand Binding Site for Collagens and Laminin. *Journal of Biological Chemistry* **272**:12311–12317.
- Chen, J., Diacovo, T. G., Grenache, D. G., Santoro, S. A. & Zutter, M. M. (2002) The $\alpha 2$ Integrin Subunit-Deficient Mouse. *The American Journal of Pathology* **161**:337–344.
- Chin, Y. K.-Y., Headey, S. J., Mohanty, B., Patil, R., McEwan, P. A., Swarbrick, J. D., ... Scanlon, M. J. (2013) The Structure of Integrin $\alpha 1$ Domain in Complex with a Collagen-mimetic Peptide. *Journal of Biological Chemistry* **288**:36796–36809.
- Eble, J. A., Golbik, R., Mann, K. & Kühn, K. (1993) The alpha 1 beta 1 integrin recognition site of the basement membrane collagen molecule [$\alpha 1(\text{IV})$] $\alpha 2(\text{IV})$. *EMBO J* **12**:4795–4802.
- Emsley, J., King, S. L., Bergelson, J. M. & Liddington, R. C. (1997) Crystal Structure of the I Domain from Integrin $\alpha 2\beta 1$. *Journal of Biological Chemistry* **272**:28512–28517.
- Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J. & Liddington, R. C. (2000) Structural Basis of Collagen Recognition by Integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell* **101**:47–56.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) *Coot*: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**:2126–2132.
- Gardner, H. (2014) Integrin $\alpha 1\beta 1$. *Adv Exp Med Biol* **819**:21–39.
- Gardner, H., Kreidberg, J., Koteliansky, V. & Jaenisch, R. (1996) Deletion of Integrin $\alpha 1$ by Homologous Recombination Permits Normal Murine Development but

- Gives Rise to a Specific Deficit in Cell Adhesion. *Developmental Biology* **175**:301–313.
- Ginsberg, M. H., Du, X. & Plow, E. F. (1992) Inside-out integrin signalling. *Current Opinion in Cell Biology* **4**:766–771.
- Heino, J. (2007) The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays* **29**:1001–1010.
- Holtkötter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Müller, W., Hafner, M., Schulte, V., ... Eckes, B. (2002) Integrin $\alpha 2$ -Deficient Mice Develop Normally, Are Fertile, but Display Partially Defective Platelet Interaction with Collagen. *Journal of Biological Chemistry* **277**:10789–10794.
- Humphries, M. J., Symonds, E. J. & Mould, A. P. (2003) Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Current Opinion in Structural Biology* **13**:236–243.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins. *Cell* **110**:673–687.
- Ivaska, J. & Heino, J. (2011) Cooperation Between Integrins and Growth Factor Receptors in Signaling and Endocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**:291–320.
- Johnson, M. S. & Chouhan, B. S. (2014) Evolution of Integrin I Domains. Teoksessa D. Gullberg (Toim.), *I Domain Integrins* (Vsk. 819, ss. 1–19). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**:125–132.
- Karsdal, M. A. (Toim.) (2019) *Biochemistry of collagens, laminins and elastin: Structure, function and biomarkers*. (Second edition). London, United Kingdom: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. & Hudson, B. G. (2008) Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* **71**:357–370.

- Knight, C. G., Morton, L. F., Onley, D. J., Peachey, A. R., Messent, A. J., Smethurst, P. A., ... Barnes, M. J. (1998) Identification in Collagen Type I of an Integrin $\alpha 2\beta 1$ -binding Site Containing an Essential GER Sequence. *Journal of Biological Chemistry* **273**:33287–33294.
- Knight, C. G., Morton, L. F., Peachey, A. R., Tuckwell, D. S., Farndale, R. W. & Barnes, M. J. (2000) The Collagen-binding A-domains of Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Recognize the Same Specific Amino Acid Sequence, GFOGER, in Native (Triple-helical) Collagens. *Journal of Biological Chemistry* **275**:35–40.
- Lahti, M., Bligt, E., Niskanen, H., Parkash, V., Brandt, A.-M., Jokinen, J., ... Salminen, T. A. (2011) Structure of Collagen Receptor Integrin $\alpha 1$ Domain Carrying the Activating Mutation E317A. *Journal of Biological Chemistry* **286**:43343–43351.
- Larson, R. S., Corbi, A. L., Berman, L. & Springer, T. (1989) Primary structure of the leukocyte function-associated molecule-1 alpha subunit: An integrin with an embedded domain defining a protein superfamily. *Journal of Cell Biology* **108**:703–712.
- Leitinger, B. & Hohenester, E. (2007) Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology* **26**:146–155.
- Liddington, R. C. (2014) Structural Aspects of Integrins. Teoksessa D. Gullberg (Toim.), *I Domain Integrins* (Vsk. 819, ss. 111–126). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Madamanchi, A., Santoro, S. A. & Zutter, M. M. (2014) $\alpha 2\beta 1$ Integrin. Teoksessa D. Gullberg (Toim.), *I Domain Integrins* (Vsk. 819, ss. 41–60). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Nymalm, Y., Puranen, J. S., Nyholm, T. K. M., Käpylä, J., Kidron, H., Pentikäinen, O. T., ... Salminen, T. A. (2004) Jararhagin-derived RKKH Peptides Induce

- Structural Changes in α 1I Domain of Human Integrin α 1 β 1. *Journal of Biological Chemistry* **279**:7962–7970.
- Ojalill, M., Parikainen, M., Rappu, P., Aalto, E., Jokinen, J., Virtanen, N., ... Heino, J. (2018) Integrin α 2 β 1 decelerates proliferation, but promotes survival and invasion of prostate cancer cells. *Oncotarget* **9**:32435–32447.
- Qin, J., Vinogradova, O. & Plow, E. F. (2004) Integrin Bidirectional Signaling: A Molecular View. *PLOS Biology* **2**:e169.
- Rappu, P., Salo, A. M., Myllyharju, J. & Heino, J. (2019) Role of prolyl hydroxylation in the molecular interactions of collagens. *Essays in Biochemistry* **63**:325–335.
- Ricard-Blum, S. (2011) The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**:a004978–a004978.
- Rossert, J. & de Crombrughe, B. (2002) Type I Collagen. Teoksessa *Principles of Bone Biology* (ss. 189–XVIII). Elsevier.
- Smith, C., Estavillo, D., Emsley, J., Bankston, L. A., Liddington, R. C. & Cruz, M. A. (2000) Mapping the Collagen-binding Site in the I Domain of the Glycoprotein Ia/IIa (Integrin α 2 β 1). *Journal of Biological Chemistry* **275**:4205–4209.
- Springer, T. A. & Dustin, M. L. (2012) Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Current Opinion in Cell Biology* **24**:107–115.
- 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. 13.
- Tuckwell, D., Calderwood, D. A., Green, L. J. & Humphries, M. J. (1995) Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens. *Journal of Cell Science* **108**:1629–1637.

- Tulla, M., Lahti, M., Puranen, J. S., Brandt, A.-M., Käpylä, J., Domogatskaya, A., ...
Heino, J. (2008) Effects of conformational activation of integrin $\alpha 11$ and $\alpha 21$
domains on selective recognition of laminin and collagen subtypes.
Experimental Cell Research **314**:1734–1743.
- Whittaker, C. A. & Hynes, R. O. (2002) Distribution and Evolution of von
Willebrand/Integrin A Domains: Widely Dispersed Domains with Roles in Cell
Adhesion and Elsewhere. *MBoC* **13**:3369–3387.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., ...
Wilson, K. S. (2011) Overview of the CCP 4 suite and current developments.
Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**:235–242.
- Yang, W., Shimaoka, M., Salas, A., Takagi, J. & Springer, T. A. (2004) Intersubunit
signal transmission in integrins by a receptor-like interaction with a pull spring.
Proc Natl Acad Sci USA **101**:2906–2911.
- Zhang, W.-M., Käpylä, J., Puranen, J. S., Knight, C. G., Tiger, C.-F., Pentikäinen, O. T.,
... Gullberg, D. (2003) $\text{A11}\beta 1$ Integrin Recognizes the GFOGER Sequence in
Interstitial Collagens*. *Journal of Biological Chemistry* **278**:7270–7277.