

Nina Tiusanen

Screw-proteiinin proteolyyttisen muokkauksen merkitys banaanikärpäsän alkionkehityksessä

| | |
|--|--|
| Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika | Nina Tiusanen Screw-proteiinin proteolyyttisen muokkauksen merkitys banaanikärpäsen alkionkehityksessä 67 sivua + 3 liitettä 5.5.2012 |
| Tutkinto | Insinööri (AMK) |
| Koulutusohjelma | Bio- ja elintarviketekniikka |
| Ohjaajat | Filosofian tohtori Osamu Shimmi Filosofian tohtori Annika Järviluoma Filosofian maisteri Jaana Vulli |
| <p>Transformoiva kasvutekijä β (Transforming growth factor β, TGF-β) -suurperheen signaalimolekyylit tuotetaan soluissa suurina inaktiivisina esiasteina, joista vain aktiivinen ligandiosa eritetään ulos soluista proteolyyttisen pilkkomisen jälkeen. Näin ollen proteiinien prosessoinnilla on tärkeä rooli TGF-β-signaloinnissa. Decapentaplegic (Dpp) ja Screw (Scw) ovat banaanikärpäsen (<i>Drosophila melanogaster</i>) luun morfogeneettisiä proteiineja (Bone morphogenetic proteins, BMPs) ja kuuluvat TGF-β-suurperheeseen. Dpp ja Scw toimivat heterodimeerinä banaanikärpäsen alkionkehityksen aikana muodostaen morfogeenin tavoin pitoisuusgradientin kehittyvässä kudoksessa. Dpp-proteiinin on todettu olevan välttämätön banaanikärpäsen alkion oikeanlaiselle kehitykselle ja sen taustalla olevia molekyylimekanismeja onkin tutkittu ahkerasti. Kuitenkin Scw-signaloinnin säätelystä tiedetään vähän. Tässä työssä tutkittiin Scw:n proteolyyttistä muokkausta ja sen vaikutusta banaanikärpäsen alkionkehitykseen.</p> <p>Tulokset osoittivat, että Scw-proteiinin esiaste pitää pilkkoa kahdesta eri kohdasta, jotta solusta ulos eritettävä ligandi olisi täysin aktiivinen; furiinin tunnistuskohdasta I (FSI), joka sijaitsee aktiivisen domeenin ja prodomeenin välissä sekä furiinin tunnistuskohdasta II (FSII), joka sijaitsee prodomeenialueella. Mutaatio furiinin tunnistuskohdassa I tai II johti toimivan ligandin tuottoon <i>Drosophilan</i> S2-soluviljelmässä, mutta ligandin erityis soluista oli alhainen. Lisäksi mutaatio furiinin tunnistuskohdassa I johti normaalia suurempikokoisen ligandin tuottoon. Tutkimukset Scw-rekombinanttiproteiinien funktionaalisuudesta <i>in vivo</i> osoittivat, että normaali Scw-proteiini pystyi pelastamaan toimimattoman Scw-geenin omaavan genotyypin, mutta furiinin tunnistuskohdasta I ja II mutatoitunut Scw-rekombinanttiproteiini eivät. Lisäksi mutaatio Scw-proteiinin furiinin tunnistuskohdassa I tai II vaikutti negatiivisesti Dpp-signalointiin. Scw-proteiinin esiasteen proteolyyttinen pilkkominen on siis välttämätöntä banaanikärpäsen oikeanlaiselle alkionkehitykselle.</p> <p>Saadut tulokset ovat tärkeitä, koska Scw-signaloinnin merkityksestä banaanikärpäsen alkionkehityksessä tiedetään hyvin vähän. BMP-perheen proteiinit ovat myös hyvin konservoituneita eri eläinlajeissa, mikä mahdollistaa tulosten soveltamisen jopa ihmisiin. Työn tulokset on esitetty käsikirjoituksessa, joka lähetetään julkaistavaksi tieteelliseen lehteen.</p> | |
| Avainsanat | Morfogeneeni, Transformoiva kasvutekijä β , Luun morfogeneettiset proteiinit, Banaanikärpäsen, Decapentaplegic, Screw |

| | |
|--|--|
| Author Title Number of Pages Date | Nina Tiusanen The Significance of Proteolytic Processing of Screw Protein in Embryogenesis of <i>Drosophila Melanogaster</i> 67 pages + 3 appendices 5 May 2012 |
| Degree | Bachelor of Engineering |
| Degree Programme | Biotechnology and Food Engineering |
| Instructors | Osamu Shimmi, Doctor of Philosophy Annika Järviluoma, Doctor of Philosophy Jaana Vulli, Master of Philosophy |
| <p>Signaling molecules belonging to the Transforming growth factor β (TGF-β) superfamily are produced as large inactive precursor forms and secreted as mature ligands after cleavage. Therefore, a proteolytic processing of precursor proteins of TGF-β type ligands plays an important role in their signaling. Decapentaplegic (Dpp) and Screw (Scw) in fruit fly <i>Drosophila melanogaster</i> belong to the family of Bone morphogenetic proteins (BMPs), a subgroup of the TGF-β superfamily. In <i>Drosophila</i> embryo, Dpp and Scw function as a heterodimer to provide an activity gradient as morphogen. Even though molecular mechanisms of Dpp has been intensely studied, little is known about how Scw signaling is precisely regulated during embryogenesis. In this work the significance of Scw processing in <i>Drosophila</i> development has been investigated.</p> <p>Results showed that Scw precursor needs to be cleaved at two different sites being fully functional: a furin recognition site adjacent to the ligand domain (FSI) and a furin recognition site of the prodomain (FSII). Mutation analysis of cleavage site I suggested that a larger form of functional ligand is produced and secreted in <i>Drosophila</i> S2 cells but the amount of secreted proteins is significantly reduced. Mutation of the prodomain FSII resulted into poor production and secretion of mature ligands. We also tested the <i>in vivo</i> function of Scw cleavages and found that mutant flies with unfunctional <i>Scw</i>-gene were rescued by wild type Scw, but not by its cleavage mutants. Moreover, mutation of FSI and FSII showed dominant negative effect on Dpp-signaling. Taking together, the cleavage of Scw precursor is critical for successful embryogenesis of <i>Drosophila</i>.</p> <p>The outcome is prominent because it provides more information on the significance of Scw signaling in <i>Drosophila</i> embryogenesis. Furthermore, the proteins belonging to the BMPs are highly conserved between various species that allow applying these findings even to humans. The results of this work will be part of the manuscript that will be sent for publication.</p> | |
| Keywords | Morphogen, Transforming growth factor β , Bone morphogenetic proteins, <i>Drosophila melanogaster</i> , Decapentaplegic, Screw |

Sisällys

| | |
|--|----|
| KIRJALLINEN OSA | 1 |
| 1 Johdanto | 1 |
| 2 Banaanikärpänen | 2 |
| 2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> | 2 |
| 2.2 Banaanikärpästutkimuksen historiaa | 3 |
| 2.3 Elinkierto ja kehityksen pääpiirteet | 4 |
| 2.4 Banaanikärpänen malliorganismina | 6 |
| 2.5 Banaanikärpästutkimuksen työkalut | 6 |
| 3 Morfogeenit | 7 |
| 3.1 Tunnetuimmat signaalimolekyylien perheet | 9 |
| 3.1.1 Hedgehog | 9 |
| 3.1.2 Wnt | 10 |
| 3.1.3 Transformoiva kasvutekijä β | 11 |
| 3.2 Morfogeenien kulkeutuminen kudoksessa | 12 |
| 3.3 Muut gradientin muodostumiseen vaikuttavat tekijät | 14 |
| 3.3.1 Hajotus | 14 |
| 3.3.2 Solupinnan reseptorit | 15 |
| 3.3.3 Hepariniisulfaattiproteoglykaanit | 15 |
| 3.3.4 Argosomit | 16 |
| 3.3.5 "Solusäikeet" | 17 |
| 4 Luun morfogeneettiset proteiinit | 17 |
| 4.1 BMP-tyyppinen signaalinvälitys | 18 |
| 4.2 Proproteiini-konvertaasit | 20 |
| 4.3 Decapentaplegic | 20 |
| 5 Decapentaplegic ja Screw alkionkehityksessä | 22 |
| 5.1 Signaalinvälitys | 23 |
| 5.2 Dpp-Scw-kompleksiin sitoutuvat proteiinit | 24 |

| | |
|---|----|
| KOKEELLINEN OSA | 26 |
| 6 Työn tausta ja tavoitteet | 26 |
| 7 Materiaalit ja menetelmät | 28 |
| <i>In vitro</i> -kokeet | 28 |
| 7.1 Plasmidit | 28 |
| 7.2 Schneider 2 -solulinja | 30 |
| 7.3 Transfektio | 30 |
| 7.3.1 Fugene | 31 |
| 7.3.2 Effectene | 31 |
| 7.4 Solujen kerääminen ja lysis | 31 |
| 7.5 Immunoblottaus | 32 |
| 7.6 Vasta-ainesaostus | 35 |
| 7.7 Signaalintikoe | 36 |
| <i>In vivo</i> -kokeet | 37 |
| 7.8 Risteytykset | 37 |
| 7.9 Alkioiden keräys | 39 |
| 7.10 Alkioiden P-Mad-vasta-ainevärjäys | 40 |
| 7.11 Alkioiden <i>in situ</i> -hybridisaatio | 41 |
| 8 Tulokset ja tulosten tarkastelu | 43 |
| 8.1 Eri pilkkomiskohtien vaikutus Scw-proteiinin prosessointiin | 43 |
| 8.2 Heterodimeerin muodostus | 47 |
| 8.3 P-Mad-signaalin muodostus | 50 |
| 8.4 Pelastuskokeet | 52 |
| 9 Yhteenveto | 60 |
| Lähteet | 62 |
| | |
| Liitteet | |
| Liite 1. Liuosten koostumukset | |
| Liite 2. Geelien koostumukset | |
| Liite 3. <i>In situ</i> -hybridisaatio | |

Lyhenteet

| | |
|-------|---|
| Amon | Amontillado, banaanikarpäsen proproteiini-konvertaasi |
| Babo | Baboon, banaanikarpäsen tyypin I reseptori |
| BMPs | Bone morphogenetic proteins, luun morfogeneettiset proteiinit, proteiiniperhe |
| Dally | Division abnormally delayed, banaanikarpäsen glypikaani |
| DFur1 | Dfurin1, banaanikarpäsen proproteiini-konvertaasi |
| DFur2 | Dfurin2, banaanikarpäsen proproteiini-konvertaasi |
| Dhh | Dessert hedgehog, Hedgehog-perheeseen kuuluva kasvutekijä |
| Dpp | Decapentaplegic, BMP-perheeseen kuuluva proteiini |
| FS | Furin recognition site, furiinin tunnistuskohta |
| GAG | Glycosaminoglycan, glykosaminoglykaani |
| GFP | Green fluorescent protein, vihreä fluoresoiva proteiini |
| Gdnf | Glia-cell-line-derived neurotrophic factor, gliasoluperäinen hermokasvutekijä, TGF- β -perheeseen kuuluva signaalimolekyyli |
| Gsk3 | Glycogen synthase kinase 3, glykogeenisyntaasikinaasi-3-entsyymi |
| HA | Hemagglutiniini, antigeeninen glykoproteiini |
| Hh | Hedgehog, signaalimolekyyliperhe |
| HSPG | Heparin sulfate proteoglycan, hepariinisulfaattiproteoglykaani |
| Ihh | Indian hedgehog, Hedgehog-perheeseen kuuluva kasvutekijä |
| Int-1 | Integrase-1, Wnt-signaalimolekyyliperheen kasvutekijä |
| kDa | Kilodalton, atomi- ja molekyyliainemassojen ilmaisemiseen käytetty massan yksikkö |
| Mad | Mothers against Decapentaplegic, banaanikarpäsen Smad-perheeseen kuuluva solunsisäinen transkriptiotekijä |
| MFS | Mutated furin recognition site, mutatoitu furiinin tunnistuskohta |
| MIS | Müllerian inhibiting substance, Müllerin tiehyeen muodostamista estävä tekijä, TGF- β -perheeseen kuuluva signaalimolekyyli |
| PC | Protein convertase, proproteiini-konvertaasi |
| Ptc | Patched, Hedgehog-proteiinin reseptori solun pinnalla |
| PVDF | Polyvinylidene fluoride, polyvinyli-deenifluoridi |
| Sax | Saxophone, banaanikarpäsen tyypin I reseptori |

| | |
|--------------|--|
| Scw | Screw, BMP-perheeseen kuuluva proteiini |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, natriumdodekyylisulfaatti-polyakryliamidigeelielektroforeesi |
| Shh | Sonic hedgehog, Hedgehog-perheeseen kuuluva kasvutekijä |
| Smo | Smoothened, Hedgehog-proteiinin reseptori solun pinnalla |
| Sog | Short gastrulation, Dpp-proteiinin antagonistti |
| TGF- β | Transforming growth factor β , transformoiva kasvutekijä β , signaalimolekyyliperhe |
| Tkv | Thick veins, banaanikärpäsen tyypin I reseptori |
| Tld | Tolloid, metalloproteaasi |
| Tsg | Twisted gastrulation, Dpp-proteiinin antagonistti |
| Wg | Wingless, Wnt-signaalimolekyyliperheen kasvutekijä |
| Wit | Wishful thinking, banaanikärpäsen tyypin II reseptori |
| Wnt | Wingless, signaalimolekyyliperhe |

KIRJALLINEN OSA

1 Johdanto

Viimeisen 20 vuoden aikana on tapahtunut paljon edistystä tutkittaessa yksilön kehityksen taustalla olevia perusmekanismeja. On huomattu, että yksilön muovautumisesta vastuussa oleva verkosto on verrattain melko pieni. Signaalimolekyylit ovat avainasemassa tässä verkostossa. Osa signaalimolekyyleistä toimii morfogeenien tavoin. Morfogeeni on soluista eritettävä proteiini, joka kulkeutuu kudoksessa kauemmas lähteestään ja muodostaa pitoisuusgradientin. Eri pitoisuudet ohjaavat vastaanottavia soluja kehittymään eri tavalla.

Alkionkehityksessä vaikuttavia signaalimolekyyliperheitä tunnetaan useita. Suurin niistä on transformoiva kasvutekijä β (TGF- β) -suurperhe, jonka sisällä luun morfogeneettiset proteiinit (Bone morphogenetic proteins, BMPs) muodostavat suuren alaperheen. BMP-proteiinit säätelevät monia biologisia prosesseja, kuten solujen jakautumista, erilaistumista ja apoptoosia. Nämä monitoiminnalliset kasvutekijät muodostavat perustan yksilönkehitykselle. Decapentaplegic (Dpp) on banaanikärpäsen BMP-tyyppinen proteiini ja ortologi nisäkkäiden BMP2/4-proteiineille. Dpp:n on osoitettu olevan välttämätön banaanikärpäsen alkionkehitykselle. Se toimii morfogeenin tavoin ja ohjaa muun muassa alkion selkäpuolen rakenteiden kehittymistä erityisen signaalinvälitysreitien kautta.

Dpp muodostaa sekä homo- että heterodimeerejä. Heterodimeerin se muodossa toisen banaanikärpäsen BMP-tyyppisen proteiinin, Screw'n (Scw), kanssa. Scw on ortologinen nisäkkäiden BMP5/6/7/8-proteiineille. Dpp-Scw-heterodimeeri aikaansaa vahvemman signaalin kudoksessa kuin Dpp-Dpp-homodimeeri, minkä takia myös Scw-proteiinilla on suuri merkitys banaanikärpäsen varhaisen alkionkehityksen aikana. Scw:n molekyyli-mekanismeista tiedetään kuitenkin melko vähän.

Tämän työn tarkoituksena on selvittää Scw-signaaliin vaikuttavia tekijöitä ja täten ymmärtää paremmin banaanikärpäsen morfogeneesin taustalla olevia molekyyli-mekanismeja. Tämä työ tehtiin Helsingin Yliopiston Biotekniikan Instituutissa, kehitysbiologian tutkimusryhmässä, jonka johtajana toimii filosofian tohtori Osamu Shimmi.

2 Banaanikärpänen

2.1 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (kuva 1) on yksi *Drosophila*-suvun mahlakärpäslaji, joka tunnetaan yleisemmin nimellä banaanikärpänen. Banaanikärpänen viihtyy lämpimissä maissa ympäri maailman. Suomessakin sitä tavataan, mutta vain lämpiminä vuodenaikoina, sillä se ei pysty selviytymään Suomen kylmistä talvista. Suomen banaanikärpäs-kanta onkin riippuvainen muun muassa tuontihedelmistä. Banaanikärpänen syö ylikyp-sien hedelmien mehua ja niiden sisällä kasvavaa hiivaa. (Portin, 2005; FlyMove, 2012)



Kuva 1. *Drosophila melanogaster*. Kuvassa vasemmalla on banaanikärpäsnaaras ja oikealla banaanikärpäsnaaras. (Flymove, 2012)

Banaanikärpäsillä on punaiset silmät ja niiden vartalot ovat kellanruskeita ja raidallisia. Naaraat ovat noin 2,5 mm pitkiä ja koiraat hieman pienempiä. Koiraiden takaruumis on kapeampi ja tummempi kuin naarailla. Koirilla on myös etummaisessa raajaparissa tummat harjakset, joista on hyötyä parittelussa. (FlyMove, 2012) Banaanikärpäsnaaras ja -koiras on esitetty kuvassa 1.

2.2 Banaanikärpästutkimuksen historiaa

Banaanikärpäsellä on pitkä historia kokeellisen biologian tutkimuksen saralla. Sitä on käytetty jo yli sadan vuoden ajan geneettisissä, fysiologisissa ja evoluutiobiologisissa tutkimuksissa. Ensimmäisenä sen otti tutkimuskohteekseen 1900-luvun alussa alkionkehitystä tutkinut professori William Castle Harvardin yliopistosta. (Portin, 2005) Kärpästutkimuksen genetiikan isänä tunnetaan kuitenkin yhdysvaltalainen tutkija, Columbian yliopiston professori Thomas Hunt Morgan. Hän löysi vuonna 1910 banaanikärpästen ensimmäisen mutantin, jolla oli punaisten silmien sijasta täysin valkoiset silmät. Morgan paikallisti mutatoituneen geenin sukupuolen määräävään X-kromosomiin. Morgan todisti samalla, että geenit sijaitsevat kromosomeissa. (Bier, 2005) Vuonna 1933 Morganille myönnettiin Nobelin fysiologian ja lääketieteen palkinto banaanikärpästen genetiikkaan kohdistuneista tutkimuksista. Mutaatiotutkimuksen uranuurtajana tunnetaan Hermann J. Muller. Hän aloitti mutaatiotutkimukset banaanikärpäksillä ja todisti muun muassa, että röntgensäteily aiheuttaa mutaatioita. Tästä keksinnöstään Muller sai Nobelin fysiologian ja lääketieteen palkinnon vuonna 1946. Banaanikärpästutkimuksessa on otettu suuria harppauksia 1900-luvulla ja banaanikärpäset ovat valloittaneet tutkimuslaboratorioita ympäri maailman. (Portin, 2005) Lajin koko genomien emäsjärjestys selvitettiin vuonna 2000 (Adams ym., 2000).

Banaanikärpänen toimii loistavana malliorganismina tutkittaessa erilaisia kehitys- ja soluprosesseja. Tutkimuskäytössä on nykyään tuhansia genotyyppiltään erilaisia mutanttikantoja, joiden avulla on tehty hyvin moninaisia tutkimuksia esimerkiksi muistin toiminnasta, oppimisesta ja erilaisista sairauksista. Myös vanhenemisen, immunitetin ja käyttäytymisen taustalla olevia mekanismeja on selvitetty. (Bier, 2005) Erityisesti yksilönkehitys on ollut kiivaan tutkimuksen alla. On huomattu, että samankaltainen signaalimolekyylien järjestelmä, joka ohjaa banaanikärpästen kehitystä, ohjaa myös selkärankaisten eläinten yksilönkehitystä. (Portin 2005) Kärpästen tehokas hyödyntäminen ihmisten tautien tutkimuksissa on mahdollista, sillä useat geneettiset säätelyjärjestelmät ja biokemialliset mekanismit ovat ihmisten ja kärpästen välillä hyvin samankaltaisia (Bier, 2005). Itse asiassa 70 %:lle ihmisten tautigeeneistä löytyy vastine banaanikärpäsen genomista (Adams ym., 2000).

2.3 Elinkierto ja kehityksen pääpiirteet

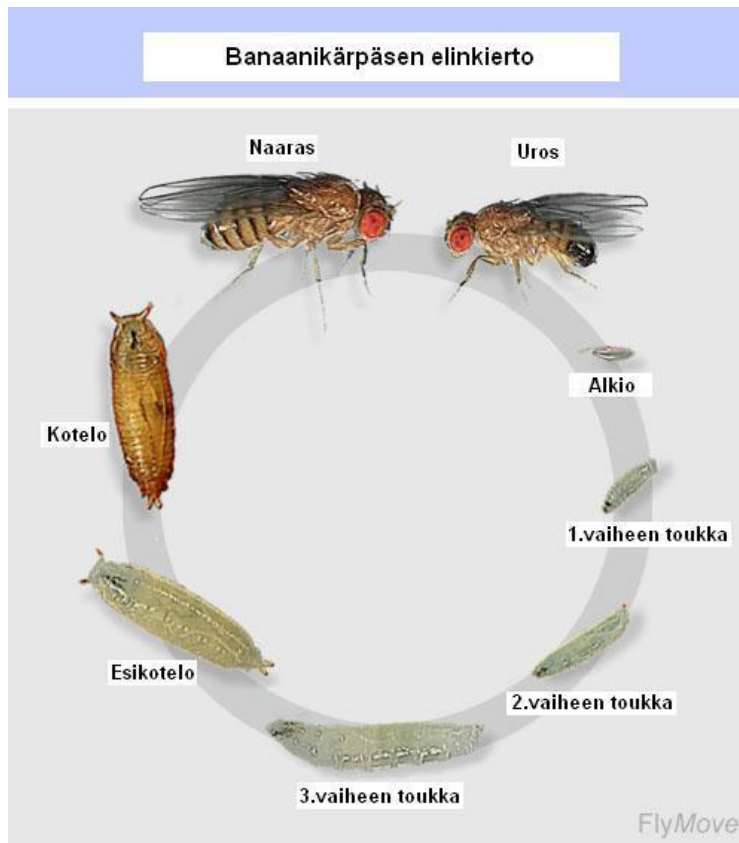
Banaanikärpänen on vaihtolämpöinen eliö, eli sen lämpötila muuttuu ympäristön mukaan. Näin ollen sen liikkeet ja elintoiminnot hidastuvat kylmässä. Tämä vaikuttaa myös banaanikärpäsen elinkiertoon. Banaanikärpäsen optimaalinen elinlämpötila on 25 °C, ja tällöin uusi sukupolvi voi syntyä aina 10 päivän välein. Tämä tapahtuu noin puolet hitaammin, jos lämpötila on 18 °C. (Ashburner ym., 2005: 122, 162-163; FlyMove, 2012).

Naaraat laskevat hedelmöittyneen munan sopivalle alustalle yleensä heti parittelun jälkeen. Hedelmöittyneen alkion tumat ovat aluksi yhteisen soluliman sisällä (synsytiaalinen blastodermi) ja jakautuvat samanaikaisesti. Vasta kunkin tumen jakauduttua 13 kertaa solukalvot alkavat muodostua syntyneiden tumien ympärille. Tämän jälkeen alkio on blastodermivaiheessa, jossa alkion oma geenitoiminta alkaa. (Sariola ym., 2003: 103) Blastodermivaihetta seuraa gastrulaatio. Gastrulaatio on tapahtumasarja, joka johtaa alkiokerrosten (mesodermi, endodermi ja ektodermi) syntyyn ja alkion kaavoittumiseen. Gastrulaation aikana muodostuvat myös etu- ja takapään keskisuolet. (Ashburner ym., 2005: 148-149; FlyMove, 2012) Gastrulaation jälkeen ruumiin jaokkeet tulevat näkyviin. Tätä kutsutaan segmentaatioksi. Segmentaatiota seuraa organogeneesi eli elinten muovautuminen, jonka jälkeen alkiosta kuoriutuu toukka. (Sariola ym., 2003: 103) Alkionkehitys kestää kokonaisuudessaan 22-24 tuntia.

Toukan kasvu perustuu lähes täysin yksittäisten solujen koon kasvuun eikä solujen lukumäärän lisääntymiseen. Osa toukkavaiheen soluista säilyy diploideina ja muodostaa pieniä solupesäkkeitä tai suurikokoisempia levymäisiä rakenteita eli imaginaalilevyjä eri puolilla alkiota. Jokaiselle aikuisen kärpäsen ulokkeelle kuten esimerkiksi jaloille, siiville ja silmille on oma imaginaalilevyensä, jonka solut ovat määräytyneet jo varhaisen alkionkehityksen aikana. Toukkavaiheessa imaginaalilevyt saavat luonteenomaisen muotonsa, mutta niiden solut vaikuttavat erilaistumattomilta. (Sariola ym., 2003: 103)

Toukka käy läpi kolme nahanluontia, joiden perusteella toukkavaihe on jaettu L1-, L2- ja L3-vaiheisiin. L viittaa englanninkieliseen sanaan "larvae", mikä tarkoittaa toukkaa. L1- ja L2 -vaiheet kestävät molemmat 24 tuntia ja L3-vaihe kestää 48 tuntia (kuva 2). L1-vaiheen toukat käyttävät ravinnokseen kasvualustan ravintoa ja vasta L2-vaiheessa

ne alkavat kaivautua ja liikkua. Toukat keräävät siis ravintoa noin 4 päivää, kunnes ne jättävät ruoan ja alkavat vaeltaa etsien sopivaa paikkaa koteloitumista varten. Koteloituminen tapahtuu noin 120 tuntia munimisen jälkeen. (Ashburner ym., 2005: 122) Kotelovaihe kestää noin 4-5 päivää, jonka aikana imaginaalilevyjen solut erilaistuvat aikuisen kärpäsen rakenteiksi ja toukasta muodostuu kärpänen. Tätä täydellistä muodonvaihdosta kutsutaan metamorfoosiksi. (Sariola ym., 2003: 102-103) Banaanikärpäsen elinkierto on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Banaanikärpäsen elinkierto. Naaraan munima muna läpikäy alkionkehityksen sekä toukka- ja koteloitumisvaiheet ennen kuin siitä kuoriutuu kärpänen. (FlyMove, 2012, muokattu)

Kuoriutuessaan kärpästen vartalot ovat pitkiä, ohuita ja vaaleita. Lisäksi niiden siivet ovat tyngät. Siivet kasvavat kuitenkin täyteen mittaansa noin tunnin kuluessa kuoriutumisesta ja vartalon pigmentti ilmenee 2-3 tunnissa. (Ashburner ym., 2005: 122) Kuoriutuneet naaraat ovat lisääntymiskykyisiä muutaman tunnin kuluttua kuoriutumisesta (FlyMove, 2012). Aikuiset yksilöt elävät noin 6-8 viikkoa (Sariola ym., 2003: 102).

2.4 Banaanikärpänen malliorganismina

Banaanikärpäset ovat loistavia malliorganismeja monesta syystä. Niiden ylläpito on helppoa ja halpaa, elinkierto on lyhyt ja jälkeläisten määrä suuri. Lisäksi kärpänen kehittyy munasta aikuiseksi vartalon ulkopuolella, jolloin kehityksen kaikkia vaiheita on helppo seurata. (FlyMove, 2012; Bier, 2005) Ennen kaikkea banaanikärpäsen genomista löytyy vastine noin 70 %:lle ihmisen tautigeneistä (Adams ym., 2000). Myös monet geneettiset säätelyjärjestelmät ja biokemialliset mekanismit ovat ihmisten ja kärpästen välillä hyvin samankaltaisia (Bier, 2005). Ainoat tutkimuseettiset kysymykset banaanikärpästen käytöstä liittyvät geenimuunneltujen kärpästen ympäristövaikutuksiin. Kärpästen pääsy laboratorion ulkopuolelle on kuitenkin hyvin epätodennäköistä, sillä laboratorio on suljettu. Lisäksi laboratoriossa ei ole tarjolla ruokaa kärpäksille, minkä takia ne eivät selviydy hengissä kovin kauan.

Banaanikärpästen avulla tehtäviä tutkimuksia helpottaa banaanikärpäsen yksinkertainen kromosomisto. Banaanikärpäsen diploidinen kromosomiluku on 8. Kromosomipareista yksi on sukupuolikromosomipari, ja sitä merkitään yleensä numerolla 1. Kolme muuta ovat autosomeja, joista viimeinen, kromosomipari 4, on kooltaan niin pieni, että se jätetään usein huomioimatta tehtäessä banaanikärpäsristeytyksiä. Banaanikärpästen geeneissä on myös vähän päällekkäisyyttä. (Adams ym., 2000) Lisäksi synsytiaalisen blastodermin esiintyminen varhaisen alkionkehityksen aikana mahdollistaa geneettisen muokkauksen päätyminen kaikkiin soluihin. Vieras DNA viedäänkin soluun juuri tämän kehitysvaiheen aikana. Mutanttikantojen kehittäminen on siis helppoa. (Bier, 2005)

2.5 Banaanikärpästutkimuksen työkalut

Risteyttämiskaavioita suunniteltaessa tulee ottaa huomioon meioosin aikana tapahtuvan tekijäinvaihdunnan mahdollisuus. Meioosi on suvullisen lisääntymisen solunjakautumistapahtuma, johon kuuluu kaksi tuman- ja solunjakautumista, mutta vain yksi kromosomien kahdentuminen eli replikaatio. Näin ollen meioosissa muodostuu neljä haploidista sukusolua. Kromosomien replikaatiossa vastinkromosomien rihmat kahdentuvat ja asettuvat rinnakkain muodostaakseen kromosomipareja. Konjugoituessaan vastinkromosomien rihmat saattavat mennä ristiin muodostaen kiasmoja. Tällöin ta-

pahtuu tekijäinvaihdunta eli crossing over, jossa kromosomit katkeavat ja vaihtavat osia keskenään. (Lodish ym., 2008: 892-894)

Banaanikärpästen meioosissa tapahtuvaa tekijäinvaihduntaa pystytään valvomaan balanserikromosomien avulla, mikä tekee banaanikärpästen risteyttämiskaavioista hyvin luotettavia. Balanserikromosomit ovat sekvenssiltään niin katkonaisia ja sekoittuneita, että niiden konjugoituessa normaalin vastinkromosomin kanssa syntyy kromosomistoltaan viallisia, toimintakyvyttömiä sukusoluja. Balanserikromosomeissa on lisäksi jokin vallitsevasti periytyvä ilmiösumarkkeri, jonka avulla kromosomin periytymistä pystytään seuraamaan. Useat mutaatiot eivät näy heterotsygoottien ilmiössä, mutta balanserikromosomien avulla voidaan varmistaa myös tällaisten ominaisuuksien siirtyminen jälkeläisiin. (Ashburner, 2005: 527-528) Banaanikärpäksillä tekijäinvaihduntaa tapahtuu vain naarailla (Snustad ja Simmons, 2003: 172).

Banaanikärpäksiristeytyksissä käytetään usein villityyppi-kantana yellow-white (yw) -kärpäsiä. Niillä on mutaatio silmän värin määräävässä geenissä X-kromosomissa, mikä estää normaalin punaisen silmänvärin pigmentin muodostumisen. Näillä kärpäksillä silmien väri onkin valkoinen. Risteyttäessä tätä yw-kantaa mutanttikärpästen kanssa voidaan syntyvien kärpästen silmien väriä käyttää eräänlaisena markkerina. Syntyvien kärpästen silmien väri on punainen, jos ne ovat saaneet risteytyksessä toiselta osapuolelta toimivan silmän värin määräävän geenin. (Snustad ja Simmons, 2003: 117-118)

3 Morfogeenit

Solut kommunikoivat keskenään saadakseen tietoa ympäristöstään ja kehityksensä suunnasta (Lodish ym., 2008: 665). Viestintä voi tapahtua suoran fyysisen kontaktin avulla, missä solujen sytoplasmat voivat olla jopa yhteydessä toisiinsa solukalvot läpäisevän kanavan välityksellä. Useimmiten solujen viestinsä tapahtuu kuitenkin liukoisten välittäjäaineiden, signaalimolekyylien, avulla. (Heino ja Vuento, 2010: 247) Tällaisia ovat esimerkiksi rauhasten erittämät hormonit. Verenkierron mukana ne kulkeutuvat kaikkialle elimistöön ja vaikuttavat monien solujen toimintaan. Tällaista tiedonsiirtoa ohjaavaa säätelyjärjestelmää kutsutaan endokriiniseksi säätelyksi. Useat solut säätelävät myös niiden välittömässä läheisyydessä olevia soluja tuottamalla paikallisesti vai-

kuttavia signaalimolekyylejä. Mekanismia kutsutaan parakriiniseksi säätelyksi. Solu voi säädellä myös omaa käyttäytymistään tuottamalla signaalimolekyylejä ympärilleen. Tällöin kyseessä on autokriininen säätely. (Lodish ym., 2008: 623-627)

Paikallisesti vaikuttavista signaalimolekyyleistä käytetään yleisesti termiä kasvutekijä, joskin ne voivat vaikuttaa myös autokriinisesti (Sariola ym., 2003: 61-62). Kasvutekijät ovat proteiineja, jotka nimensä mukaisesti vaikuttavat muun muassa solun kasvuun, jakautumiseen ja erilaistumiseen. Vaikka termi kasvutekijä viittaa jakautumista edistävään ominaisuuteen, voivat ne myös inhiboida solujen kasvua. (Alberts ym., 2002: 1015) Kasvutekijät vaikuttavat vastaanottavan solun toimintaan muuttamalla geenien ilmentymistä. Toiminta perustuu niiden kiinnittymiseen kohdesolun pinnalla olevaan tunnustusmolekyylin eli reseptoriin. Reseptoriin tarttuvaa molekyyliä kutsutaan ligandiksi. Kasvutekijän sitoutuminen reseptoriinsa saa aikaan solunsisäisen ketjureaktion, jonka seurauksena geenien transkriptiota säätelevä molekyyli, transkriptiotekijä, siirtyy tumaan. Siellä se osallistuu geenien säätelyyn yhdessä muiden transkriptiotekijöiden kanssa. (Sariola ym., 2003: 61-62)

Kasvutekijöiden vaikutustapa riippuu solutyypistä ja olosuhteista (Alberts ym., 2002: 1015). Eri signaalimolekyylit aiheuttavat soluissa luonnollisesti erilaisen vasteen. Signaalin vaikutus riippuu myös solun kehityshistoriallisesta tilanteesta sillä hetkellä, kun se vastaanottaa viestimolekyylin (Sariola ym., 2003: 65). Eräät kasvutekijät vaikuttavat solujen toimintaan pitoisuudesta riippuvalla tavalla. Tällöin puhutaan morfogeneeistä. (Lodish ym., 2008: 623-627, 700) Morfogeneetit ovat tietyn tyyppisiä signaalimolekyylejä, jotka kulkeutuvat pitkiäkin matkoja pois lähteestään ja muodostavat pitoisuusgradientin kehittyvässä kudoksessa. Vasteen luonne vaihtelee morfogeneejä vastaanottavassa solussa sen mukaan, miten kaukana lähteestä se sijaitsee. Toisin sanoen mitä kauempana solu on morfogeneejä erittävästä solusta, sitä pienempi on sen vastaanottama morfogeneettinen signaalitaso. Tämä signaalitaso määrää vastaanottavan solun kehityksen suunnan, kun eri pitoisuudet säätelevät eri geenien ilmentymistä. (Tabata ja Takei, 2004)

Morfogeneeni tarkoittaa sanatarkasti "muotoa antavaa", mikä kuvaa hyvin sen toimintaa. Morfogeneetit vastaavat uuden alkion solujen ja kudosten järjestäytymisestä sekä ohjaavat elinten ja organismien muovautumista eli morfogeneesiä. Kehittyvälle yksilölle on

taloudellisempaa käyttää yhtä signalointisysteemiä tuottamaan useita erilaisia solutyyppejä kuin kehittää jokaiselle solutyypille oma signalointimekanismi. (Tabata ja Takei, 2004; Tabata, 2001)

3.1 Tunnetuimmat signaalimolekyylien perheet

Signaalimolekyyliä on useita satoja, joista biologiseen tapahtumaan samansuuntaisesti vaikuttavat muodostavat geeniperheitä. Yhteen geeniperheeseen kuuluvat signaalimolekyylit käyttävät samantyyppisiä reseptoreita, jotka nekin muodostavat perheitä. Saman perheen reseptoreiden solunsisäiset signaalireitit ovat useimmiten samoja ja johtavat samojen transkriptiotekijöiden aktivoitumiseen. (Sariola ym., 2003: 62)

Kasvutekijät säätelevät toisten kasvutekijöiden ja niiden reseptorien ilmentymistä. Usein puhutaankin kasvutekijäverkostosta. Yksittäisten kasvutekijöiden vaikutusta voi olla vaikea eritellä yhteisvaikutuksesta. Kuitenkin useilla kasvutekijöillä on myös tarkasti rajoitettuja vaikutuksia, joissa ne eivät ole korvattavissa muilla kasvutekijöillä. Eri signaalimolekyyliperheiden kasvutekijät muodostavat siis tarkasti organisoidun, toiminnallisen säätelyverkoston, joka vastaa käytännöllisesti katsoen kaikkien alkion ja sikiön rakenteiden kehityksestä. (Heino ja Vuento, 2010: 252; Sariola ym., 2003: 64)

3.1.1 Hedgehog

Hedgehog (Hh) -perheen kasvutekijät säätelevät alkion kehitystä ja kudosten erilaistumista niin selkärangkaisissa kuin selkärangattomissakin eläinlajeissa. *Hedgehog*-geeni löydettiin alun perin banaanikarpäseltä vuonna 1992 (Lee ym., 1992). Myöhemmin tämän geeniperheen jäseniä on löydetty monista muistakin eläinlajeista. (Ingham ja McMahon, 2001) Banaanikarpäsellä on vain yksi *Hh*-geeni, mikä vaikuttaa mm. siiven, silmän ja segmenttien kaavoittumiseen. Ihmisellä *Hh*-geenejä on kolme: *Sonic (Shh)*, *Indian (Ihh)* ja *Dessert (Dhh)*. *Ihh* ja *Dhh* säätelevät siittiöiden sekä ruston ja luun erilaistumista. *Shh* vaikuttaa taas hyvin laajasti, vasen-oikea-epäsymmetrian säätelystä hermostoputken ja raajojen kaavoitukseen. *Shh* on myös välttämätön useimpien elinten, kuten aivojen, ihon ja haiman kehitykselle. (Sariola ym., 2003: 67) Sekä ba-

naanikärpäsen Hh-proteiinin että ihmisten Shh:n on osoitettu toimivan morfogeeneinä (Tabata ja Takei, 2004).

Hedgehog-proteiinin reseptori solun pinnalla on Patched (Ptc). Ptc estää toista solun pinnan reseptoria, Smoothenedia (Smo), aktivoitumasta, mutta Hedgehogin sitoutuessa Ptc:n estovaikutus loppuu ja Smo aktivoituu. Sinkkisormiproteiini Gli (banaanikärpäsellä Ci) on transkriptiotekijä, joka välittää Hedgehog-signaloinnin tumaan. *Ptc*-geenin inaktivoivat mutaatiot aiheuttavat ihmisellä muun muassa ihon pahanlaatuisia kasvaimia, sillä inaktiivinen *Ptc* ei estä Hedgehog-viestintää ja kasvaimet johtuvat Hedgehog-signaloinnin käynnistymisestä aikuisessa ihossa, jossa Ptc normaalisti estää Smo:n vaikutusta. (Sariola ym., 2003: 67)

3.1.2 Wnt

Wnt-signaloinnin tutkimus lähti käyntiin 1980-luvun lopulla, kun *Wnt*-geeniperheeseen kuuluvat banaanikärpäsen *Wingless (Wg)* ja hiiren *Integrase-1 (Int1)* -geenit löydettiin. Näiden huomattiin myös olevan keskenään homologisia. (Rijsewijk ym., 1987) *Wnt*-geeniperheen nimi onkin muodostettu "Wingless" ja "Integrase-1" -nimien yhdistelmästä. (von Amerongen ja Nusse, 2009) Myöhemmin tämän geeniperheen jäseniä on löydetty useita, ja tällä hetkellä niitä tunnetaan nisäkkäillä jopa 20 (Sariola ym., 2003: 66-67).

Banaanikärpäsen *Wingless* on morfogeeni, ja se säätelee muun muassa ruumiin jaokkeiden sekä siiven ja useiden elinten kehitystä. Hiirillä *Wnt*-geenit ilmenevät käytännössä kaikissa elimissä. (Sariola ym., 2003: 66-67) Ihmisillä *Wnt*-signaali kontrolloi monia tärkeitä kehitystapahtumia, kuten raajojen kaavoittumista, aivojen kehitystä ja organogeneesiä. On myös osoitettu, että *Wnt*-signaalinolla on suuri rooli luun kehityksessä, sillä se kontrolloi osteoblastien eli eräiden luusolujen tuottoa. *Wnt*-perheen kasvutekijät vastaavat myös kantasolujen ylläpidosta. (Lodish ym., 2008: 699) *Wnt*-geenien yliaktivaatio on yhdistetty useisiin syöpä- ja rappeutumissairauksiin, minkä takia sitä pidetään potentiaalisena kohteena kehiteltäessä uusia terapeuttisia hoitokeinoja. (von Amerongen ja Nusse, 2009)

Wnt-signaali tapahtuu Frizzled-reseptorin välityksellä, joita tunnetaan noin kymmenen. Sitoutuessaan reseptoriin Wnt aktivoi Dishevelled-proteiinin, joka estää glykoogenisyntaasikinaasi-3-entsyymin (Gsk3) toiminnan. Tämä stabiloi β -kateniinin (*Drosophila* Armadillo), joka ilman Wnt-signaalia hajotetaan. (Sariola ym., 2003: 66-67) β -kateniini on monitoiminnallinen proteiini, joka toimii transkriptiotekijänä Wnt:n toimesta sekä linkkerinä solupinnan ja solun tukirangan välillä edesauttaen solun tarttumista ympäristöönsä. (Lodish ym., 2008: 699-700)

3.1.3 Transformoiva kasvutekijä β

Ensimmäiset transformoiva kasvutekijä β (Transforming growth factor β , TGF- β) -suurperheeseen kuuluvat geenit eristettiin 1980-luvun alussa, ja nykyisin se edustaa suurinta morfogeeniperhettä (Massagué ym., 2005). Rakenteeltaan ja toiminnaltaan samankaltaisia proteiineja on löydetty jo useita kymmeniä. TGF- β -perheen proteiineilla on tärkeä rooli kudosten erilaistuminen säätelyssä. Ne vaikuttavat solun jakautumisessa, erilaistumisessa ja organisoitumisessa, migraatiossa ja adheesiossa sekä solukuolemassa. Aikuisella TGF- β :t osallistuvat kudolvaurioiden korjautumiseen, kuten haavan ja luunmurtuman parantumiseen. (Massagué ym., 2005; Heino ja Vuento, 2010: 263-266)

TGF- β :t jaetaan useisiin alaryhmiin, joista varsinaiset TGF- β :t eli TGF- β 1, TGF- β 2 ja TGF- β 3 muodostavat yhden. Muita alaryhmiä ovat luun morfogeneettiset proteiinit (Bone morphogenetic proteins, BMPs), nodal-proteiinit, aktiiviinit, inhibiinit, myostatiinit, Müllerin tiehyeen muodostamista estävä tekijä (Müllerian inhibiting substance, MIS) ja gliasoluperäinen hermokasvutekijä (Glia-cell-line-derived neurotrophic factor, Gdnf). (Heino ja Vuento, 2010: 263-266; Sariola ym., 2003: 69-71). Ihmisen genomissa on kaiken kaikkiaan 42 geeniä, jotka kuuluu TGF- β -perheeseen, banaanikärpäsen genomissa niitä on seitsemän ja sukkulamadon (*Caenorhabditis elegans*) genomissa neljä. Monet näistä ovat keskenään ortologisia. (Massagué ym., 2005; Massagué ym., 2000) TGF- β -signaalien alaluokista on eniten tutkittu aktiiviinia, BMP-perheen jäseniä BMP2- ja BMP4-proteiinia sekä niiden *Drosophila*-homologia Decapentaplegicia (Dpp). Näillä morfogeneeinä toimivilla proteiineilla on suuri merkitys kaavoituksessa, solujen varhaisessa määräytymisessä ja morfogeneesin säätelyssä (Sariola ym., 2003: 69-71).

TGF- β :t tuotetaan soluissa latenteina esimuotoina, joilla ei ole biologista aktiivisuutta. Esimuodossa prodomeeni laskostuu aktiivisen osan päälle ja estää sen toiminnan. Aktivoituminen tapahtuu, kun prodomeenit pilkotaan proteolyttisesti niiden dimerisoitumisen jälkeen (Shi ym., 2011) TGF- β -perheen kasvutekijät sitoutuvat kahden eri reseptorin muodostamaan kompleksiin, jotka ovat molemmat seriini-treoniinikinaaseja. Molekyylit, jotka välittävät TGF- β -reseptorien viestit, kuuluvat Smad-proteiineihin. Nämä sitoutuvat useisiin transkriptiotekijöihin ja vaikuttavat lukuisten geenien säätelyyn joko aktivoiden tai estäen geenien ilmentymistä. (Sariola ym., 2003: 69-71; Heino ja Vuento, 2010: 263-266)

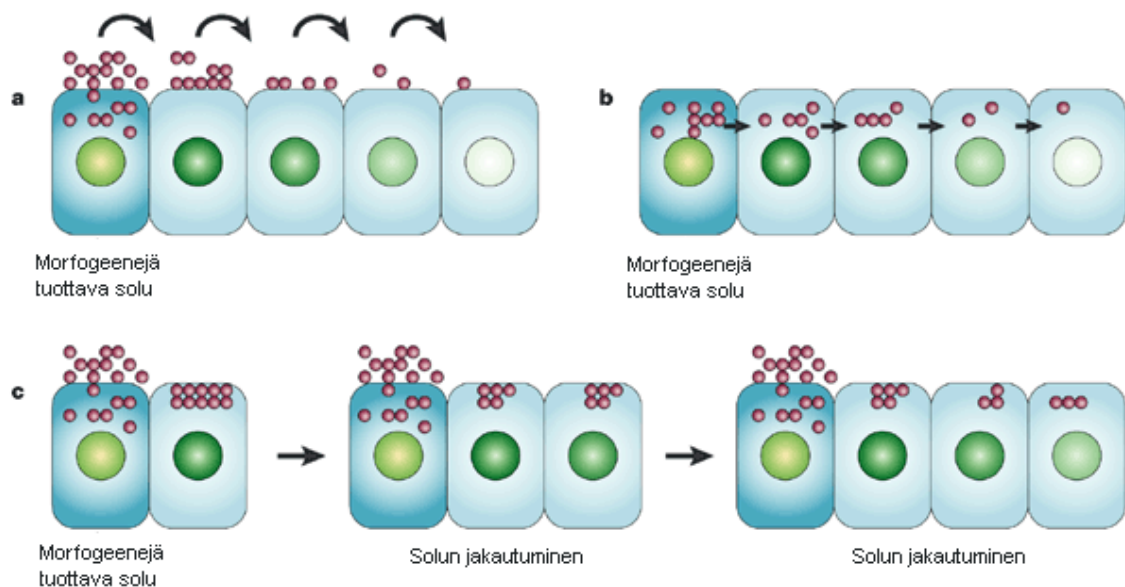
TGF- β -perheen kasvutekijöillä uskotaan olevan keskeinen rooli fibrooseissa eli sairauksissa, joihin liittyy sidekudoksen liikakertyminen. TGF- β :t estävät myös useiden solutyypin jakautumisesta säätelemällä niiden solusykliä. On huomattu, että monissa syövässä tämä säätely on häiriintynyt TGF- β -reseptorien tai Smad-proteiinien mutaatioiden seurauksena. (Heino ja Vuento, 2010: 263-266)

3.2 Morfogeenien kulkeutuminen kudoksessa

Morfogeenien taustalla olevat toimintamekanismit ovat vielä hämärän peitossa. Signaloivien molekyylien liikkumistavoista ja pitoisuusgradientin synnystä on esitetty useita malleja, mutta yksimielisyyteen ei ole päästy. Nähtävästi toimintamekanismit vaihtelevat riippuen signaloivasta molekyylistä ja kehittyvästä kudoksesta (Lander ym., 2002).

Yksinkertaisin malli esittää, että signaalimolekyylit liikkuisivat solunulkoisessa tilassa vapaan diffuusion avulla (Crick, 1970). Vapaa diffuusio -malli on esitetty kuvassa 3a. Sammakon (*Xenopus*) TGF- β -suurperheeseen kuuluvan aktiviinin on esitetty leviävän kudoksessa juuri tällä tavoin (Gurdon ym., 1994). Kuitenkin Entchev ym. osoittivat vuonna 2000, ettei vapaa diffuusio voi yksinään selittää gradientin muodostumista, ja nostivat esiin endosytoosin osallisuuden morfogeenien kulkeutumisessa. Endosytoosi on tapahtuma, jossa solu ottaa sisäänsä materiaalia muodostamalla solukalvon painauman, johon kulkeutuu solunulkoista materiaalia. Painaumasta muodostuu rakkula, joka kuroutuu irti solukalvosta solun sisälle. (Heino ja Vuento, 2010: 187) Entchev ym. tutkivat banaanikärpäsen Decapentaplegic (Dpp)-proteiinin leviämistä siiven imaginaalilevyssä havainnollistamalla sitä vihreällä fluoresoivalla proteiinileimalla (green fluore-

cent protein, GFP). Tutkijat huomasivat, että Dpp:n leviäminen oli rajoittunut mutanteilla, joiden endosytoosi oli puutteellinen. (Entchev ym., 2000) Tässä tasomaisena transsytoosina tunnetussa mallissa molekyylit kulkeutuvat kudoksessa ikään kuin sykleinä: molekyylit otetaan ensin solun sisään endosytoosilla, kuljetetaan solun sisällä toiselle puolelle ja sen jälkeen eritetään ulos solusta seuraavan solun ulottuville. Tämä menetelmä ei kuitenkaan poissulje diffuusion osallisuutta morfogeenien kulkeutumisessa (Tabata ja Takei, 2004). Tasomainen transsytoosi on esitetty kuvassa 3b.



Kuva 3. Morfogeenien kulkeutuminen kudoksessa. a) Morfogeenit kulkeutuvat solunulkoisessa tilassa diffuusion välityksellä, b) morfogeenit kulkeutuvat solusta soluun tasomaisen transsytoosin avulla, c) morfogeenit kulkeutuvat solunjakautumisen myötä. (Tabata, 2001, muokattu)

Lander ym. osoittivat vuonna 2002, että tasomainen transsytoosi on jossain tapauksissa liian hidask mekanismi. Tutkijat eivät kuitenkaan kumonneet tasomaisesta transsytoosista saatuja lupaavia tuloksia, vaan toivat esille mahdollisuuden, että morfogeenien toimintamekanismit vaihtelevat eri tilanteissa. (Lander ym., 2002) Teoreettiset tutkimukset tukevatkin rajoitettua diffuusiomallia. Rajoitettu diffuusio eroaa vapaasta diffuusiosta siinä, että se sisältää mahdolliset interaktiot morfogeenien ja solun pintamolekyylien kanssa. Tällaisia molekyylejä ovat esimerkiksi solupinnan reseptorit ja hepariinisulfaattiproteoglykaanit (heparan sulfatiproteoglycans, HSPGs). Rajoitettu diffuusio -malli on ikään kuin vapaan diffuusion ja tasomaisen transsytoosin välimuoto. (Tabata ja Takei, 2004)

On myös esitetty, että morfogeenit kulkeutuisivat kudoksessa solun jakautumisen kautta (kuva 3c). Solut, jotka ovat vastaanottaneet morfogeenejä, laajentavat gradienttia siirtäessään morfogeenit jälkeläisilleen (Lecuit ym., 1998). Tämänkin mallin kohdalla on esitetty myös argumentteja, jotka ovat mallin vastaisia (Tabata, 2001).

3.3 Muut gradientin muodostumiseen vaikuttavat tekijät

Morfogeenien on esitetty kulkeutuvan kudoksessa monin eri tavoin. Yksiselitteistä mekanisme ei ole löydetty. Näyttäisi siltä, että gradientin syntymekanismit vaihtelevat eri morfogeenien ja solutyypin kohdalla. Soluilla on huomattu olevan myös erilaisia mekanismeja morfogeenin gradientin säätelyä ja ylläpitoa varten. Tällaisia tekijöitä on esitetty olevan muun muassa solupinnan reseptorit, hepariinisulfaattiproteoglykaanit (Heparin sulfate proteoglycans, HSPGs), "solusäikeet" sekä argosomit eli solukalvosta kuroutuvat rakkulat, jotka ovat kiivaan tutkimuksen alla. On myös esitetty, että jossain tapauksissa morfogeenien pitoisuuden säätely perustuu hajotukseen. (Tabata, 2001; Lander ym., 2002)

3.3.1 Hajotus

Molekyylien organisoitu hajotus on solujen tapa säädellä tiettyjen proteiinien läsnäoloa. Solusisäisten antagonistien läsnäolo sekä solunulkoiset inhibiittorit ovat myös tärkeässä asemassa morfogeenin gradientin säätelyssä alkionkehityksen aikana. Kuitenkin esimerkiksi banaanikärpäsen eräällä kasvutekijällä, Winglessillä (Wg), ei inhibiittoreita ole, joten Wg-signaaloinnin säätely perustuu hajotukseen. Solut, jotka sijaitsevat alkion takapäässä, hajottavat kyseistä proteiinia nopeammin kuin solut, jotka sijaitsevat alkion etupäässä. Näin aikaansaadaan epäsymmetrinen gradientti, joka on Wg-signaaloinnille ominaista. (Dubois ym., 2001) Myös banaanikärpäsen Dpp-proteiinin muodostaman gradientin arvellaan säilyvän vakaana juuri solunsisäisen hajotusreitillä avulla (Entchev ym., 2000).

Eldar ym. esittivät vuonna 2003, että morfogeenit, jotka ovat lähellä morfogeenejä erittävää solua, hajotetaan nopeasti, kun taas kaukana lähteestään olevat morfogeenit hajotetaan hitaammin. Tämä mahdollistaa pitkäaikaisen ja vakaan gradientin muodos-

tumisen Wg- ja Hh-proteiinien kohdalla banaanikärpäsen siiven kehityksen aikana. (Eldar ym., 2003)

3.3.2 Solupinnan reseptorit

Solupinnan reseptorit tunnistavat eri molekyyliä, mutta ne voivat myös muokata morfogeneettistä signaalia. Esimerkiksi banaanikärpäsen Decapentaplegic (Dpp)-proteiinin muodostamaa pitoisuusgradienttia säätelee siiven imaginaalilevyssä Dpp-reseptori, thick veins (tkv). Tkv-reseptoria ilmennetään vaihtelevasti pitkin etu-taka-akselia. Tkv-reseptoria esiintyy vähän alueella, missä Dpp-signaali on voimakasta ja kasvavasti mentäessä kauemmas Dpp:tä erittävästä lähteestä. Dpp säätelee siis negatiivisesti *Tkv*:n ilmenemistä. Tkv-reseptorin tiheä esiintyminen taas herkistää soluja pienille Dpp-pitoisuuksille ja myös rajoittaa Dpp:n liikkumista kohdealueen ulkopuolella. (Lecuit ja Cohen, 1998) On osoitettu, että myös toisen banaanikärpäsen proteiinin, Hedgehogin (Hh), solun pintareseptorit ovat osallisena morfogeneettisen gradientin säätelyssä. (Chen ja Struhl, 1996).

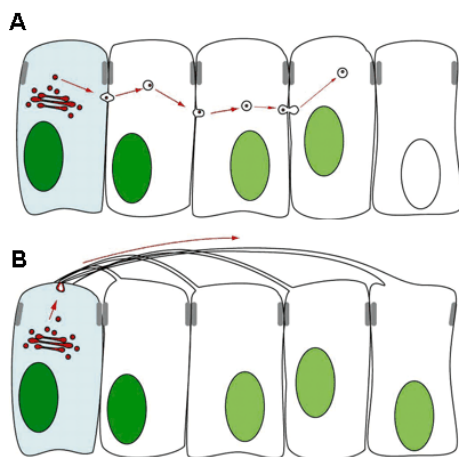
3.3.3 Hepariniisulfaattiproteoglykaanit

Hepariniisulfaattiproteoglykaanit (Heparin sulfate proteoglycans, HSPGs) ovat suuria makromolekyyliä, joita esiintyy runsaasti solujen pinnalla. HSPG:t ovat myös solunulkoisen väliaineen komponentteja. Ne koostuvat proteiiniosasta, kuten syndekaanista tai glypikaanista, johon on tarttunut hepariniisulfaatti-glykosaminoglykaani-sokeriketjuja (heparan sulfate glycosaminoglycan, HS GAG). (Zhu ja Scott, 2004; Tabata ja Takei, 2004; O'Connell ym., 2007) Pitkien sokeriketjuiensa avulla HSPG:t pystyvät sitoutumaan moniin solunulkoisen väliaineen molekyyliin kuten moniin signaalimolekyyliin. HSPG:illa voi olla passiivinen rooli morfogeneenien pitoisuusgradientin muovaamisessa tarjoamalla proteiineille väliaikaisen kiinnittymispinnan. HSPG:t voivat toimia myös aktiivisesti, jolloin ne helpottavat molekyylien sitoutumista kohdesolujen pintaan katalyyttisellä tavalla ja tällä tavoin ovat osana morfogeneettisen signaalin muokkauksessa ja morfogeneenien kulkeutumisessa. (Jackson ym., 1997; Zhu ja Scott, 2004)

Banaanikärpäsestä on löydetty useita geenejä, jotka ovat homologisia selkärankaisten hepariinisulfaattiglykosaminoglykaaneja koodaaville geeneille. Esimerkiksi banaanikärpäsen glypikaania, dallya (division abnormally delayed), on käytetty ahkerasti tutkittaessa HSPG:ien osuutta morfogeneenien kuljetukseen ja signalointiin. Muun muassa vuonna 1997 Jackson kollegoineen osoittivat, että Dally on osallisena banaanikärpäsen Decapentaplegic (Dpp)-signaalin muodostuksessa. (Tabata ja Takei, 2004; Jackson ym., 1997)

3.3.4 Argosomit

Monilla morfogeeneilla on taipumus tarttua tiukasti solujen pintaan hepariinisulfaatti-proteoglykaanien avulla tai kolesteroli- ja palmitaattiryhmien välityksellä, mistä voisi päätellä, että molekyyleillä on taipumus pysyä lähellä ilmenemispaiikkaansa. Useimmissa tapauksissa nämä proteiinit kuitenkin kulkeutuvat kudoksessa pitkiä matkoja. Tämän ristiriidan selvittämiseksi Greco ym. tutkivat vuonna 2001 solukalvorakenteiden toimintaa banaanikärpäsen siiven imaginaalilevyssä ja osoittivat, että solujen basolateraalisesta solukalvosta kuroutuu irti rakkuloita, jotka kulkevat imaginaalilevyn epiteelikerroksen läpi samankaltaisesti kuin transsytoosisissa. Tutkijat nimesivät nämä rakenteet argosomeiksi. (Greco ym., 2001; Vincent ja Magee, 2002) Basolateraalinen solukalvo tarkoittaa epiteelisolun sitä pintaa, joka on vasten muita soluja tai solujen alla olevaa tyvikalvoa tai sidekudosta (Heino ja Vuento, 2010: 195).



Kuva 4. Argosomit ja "solusäikeet" morfogeneettisen gradientin muodostumisessa. A) Molekyylit kulkeutuu epiteelikerroksen läpi basolateraalista solukalvosta kuroutuvien rakkuloiden, argosomien avulla, B) molekyylit kulkeutuvat solujen välillä pitkien "solusäikeiden" avulla. (Tabata ja Takei, 2004, muokattu)

On myös esitetty, että argosomit olisivat osallisena banaanikärpäsen Wingless (Wg)-proteiinin kuljetuksessa siiven kehityksen aikana (Greco ym., 2001). Muiden morfogeeni- en kohdalla ei ole vielä näyttöä argosomien osallisuudesta. Argosomit ovat kuitenkin kiivaan tutkimuksen alla, sillä ne ovat potentiaalinen vaihtoehto suuren solukalvo- affiniteetin omaavien morfogeeni- en kuljetuksessa. (Tabata ja Takei, 2004) Morfogeeni- en kulkeutuminen argosomien avulla on esitetty kuvassa 4A.

3.3.5 "Solusäikeet"

Vuonna 1999 Ramirez-Weber ja Kornberg havaitsivat pitkiä ja ohuita, aktiivista koostu- via säikeitä banaanikärpäsen imaginaalilevyissä. Englanninkielinen termi näille säikeille on "cytoneme" (neme = thread = säie). Tutkijoille heräsi ajatus näiden "solusäikeiden" osallisuudesta morfogeeni- en kuljetukseen. "Solusäikeiden" avulla kaukanakin sijaitsevat solut olisivat suorassa yhteydessä morfogeenejä erittävään soluun. (Ramirez-Weber ja Kornberg, 1999; Tabata ja Takei, 2004) Tähän mennessä ei kuitenkaan ole näyttöä "solusäikeiden" yhteydestä signaloiviin molekyyliin (Zhu ja Scott, 2004). Morfogeeni- en kulkeutuminen "solusäikeiden" avulla on esitetty kuvassa 4B.

4 Luun morfogeneettiset proteiinit

Luun morfogeneettiset proteiinit (bone morphogenetic proteins, BMPs) kuuluvat trans- formoiva kasvutekijä β (TGF- β) -suurperheeseen ja muodostavatkin sen alla suurim- man alaperheen. BMP-proteiineja on identifioitu yhteensä yli 20, niin selkärangaisista kuin selkärangattomista lajeista. BMP-perheen proteiinien toiminta on hyvin konservoi- tunut eri eläinlajien välillä. Nämä monitoiminnalliset kasvutekijät säätelevät monia bio- logisia prosesseja, kuten solujen jakautumista, erilaistumista ja solukuolemaa, apop- toosia. Siksi ne ovatkin välttämättömiä varhaisen alkionkehityksen aikana, jolloin ku- dosten ja elinten muodostuminen on nopeaa. (Xiao ym., 2007; Yamamoto ja Oelgesch- läger, 2004; Hogan, 1996)

Banaanikärpäsestä on löydetty seitsemän TGF- β -suurperheen geeniä, joille kaikille on löydetty ortologi nisäkkäistä. Kolme näistä, Decapentaplegic (Dpp), Screw (Scw) ja Glass bottom boat (Gbb), ovat BMP-tyyppisiä proteiineja. (Raftery ja Sutherland, 1999)

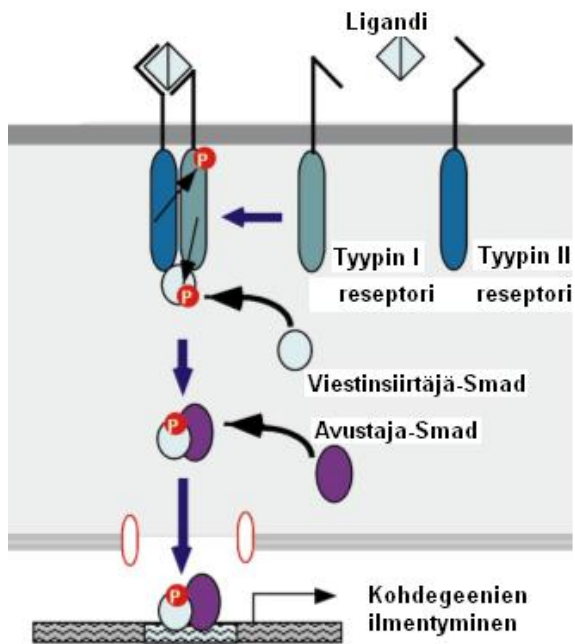
Dpp on ortologinen ihmisen BMP2/4-proteiineille ja Scw sekä Gbb BMP5/6/7/8-proteiineille (Padgett ym., 1993; Arora ym., 1994; Raftery ja Sutherland, 1999).

BMP:t tuotetaan solussa suurina proteiinin esiasteina, jotka glykosyloituvat ja dimerisoituvat. Tämän jälkeen dipeptidi pilkkotaan proteolyytisesti spesifisistä pilkkoutumiskohdista ja vain karboksyylipään aktiivinen osa, kypsä ligandi, eritetään ulos solusta joko homo- tai heterodimeerinä. (Xiao ym., 2007; Hogan, 1996)

4.1 BMP-tyyppinen signaalinvälitys

BMP:t vaikuttavat hyvin konservoituneen signalointireitin kautta (kuva 5). Signaalinvälitys alkaa, kun BMP-proteiini sitoutuu solun pinnalla olevan spesifiseen seriini-treoniinikinaasireseptoriin. Reseptoreita on aina kaksi erilaista, tyyppin I ja tyyppin II reseptorikinaasi. Ligandi sitoutuu ensin tyyppin II reseptoriin. Ligandin sitoutuminen aktivoi tyyppin II reseptorikinaasin, mikä taas fosforyloi tyyppin I reseptorin. Ihmisestä on löydetty seitsemän erilaista tyyppin I reseptorikinaasia ja viisi tyyppin II reseptorikinaasia. Banaanikärpäsellä on vain kolme tyyppin I reseptoria, Thick veins (tkv), Saxophone (sax) ja Baboon (babo), ja kaksi tyyppin II reseptoria, Punt ja Wishful thinking (Wit). Eri reseptorikinaasit sitovat eri proteiineja. (Raftery ja Sutherland, 1999; Yamamoto ja Oelgeschläger, 2004)

BMP-proteiinien signaalinvälittäjinä toimivat Smad-proteiinit (Smads). Ne ovat solunsisäisiä transkriptiotekijöitä, jotka välittävät solunulkoiset signaalit tumaan. (Massagué ym., 2005) Nimi Smad ei itsessään tarkoita mitään vaan on yhdistelmä banaanikärpäsensä Mad- ja sukkulamadon (*Caenorhabditis elegans*) Sma-proteiineista, jotka ovat toiminnaltaan ja rakenteeltaan samankaltaisia proteiineja (Heino ja Vuento, 2010: 265).



Kuva 5. BMP-tyyppinen signaalinvälitys. Signaalinvälitys alkaa ligandin sitoutuessa tyypin II reseptoriin. Tyypin II reseptori aktivoi tyypin I reseptorin, jolloin se fosforyloituu. Viestinsiirtäjä-Smad-proteiini fosforyloituu aktiivisen tyypin I reseptorin toimesta ja muodostaa kompleksin avustaja-Smad-proteiinin kanssa. Kompleksi ajautuu tumaan ja sitoutuu DNA:han. Sitoutuminen DNA:han säätelee kohdegeenien transkriptiota. (Raftery ja Sutherland, 1999, muokattu)

Smad-proteiinit koostuvat noin 500 aminohaposta, ja niiden rakenne on melko konservoitunut. Proteiinit ovat muodostuneet kahdesta pallomaisesta domeenista, joita yhdistää linkkerialue. (Massagué ym., 2005) Smad-proteiini aktivoituu sen karboksyyliipään fosforyloitua tyypin I reseptorikinaasin toimesta. Smad-proteiineja on useita, ja eri reseptorit aktivoivat niille ominaisen Smad-proteiinin. Näitä kutsutaan viestinsiirtäjä-Smad-proteiineiksi (Heino ja Vuento, 2010:265). Tämän jälkeen Smad-proteiini muodostaa kompleksin toisen Smadin, Smad4-proteiinin, kanssa. Smad4-proteiinia kutsutaan avustaja-Smad-proteiiniksi (Heino ja Vuento, 2010:265). Tämä kompleksit ajautuu tumaan, missä se sitoutuu DNA:han. Smad4-proteiinia tarvitaan, jotta kompleksit voi sitoutua DNA:han. DNA:han sitoutuminen säätelee kohdegeenien transkriptiota. (Massagué ym., 2005; Raftery ja Sutherland, 1999; Yamamoto ja Oelgeschläger, 2004)

Ihmisestä ja hiirestä Smad-proteiineja on löydetty kahdeksan, banaanikärpäsestä neljä ja sukkulamadosta kolme. Mad oli ensimmäinen Smad-perheen proteiini, joka löydettiin banaanikärpäsestä (Raftery ja Sutherland, 1999). Se on ortologi nisäkkäiden Smad1/5:lle. Banaanikärpäsen muut Smad-proteiinit, dSmad2, Medea ja Dad, ovat ortologeja nisäkkäiden Smad2/3, Smad4 ja Smad5/6 -proteiineille, tässä järjestyksessä. (Massagué ym., 2005) BMP-proteiinien signaalinvälitys on esitetty kuvassa 5.

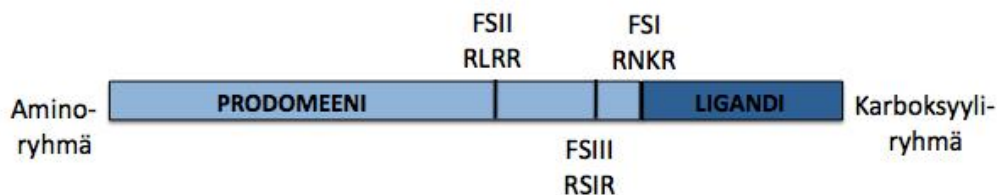
4.2 Proproteiini-konvertaasit

Proproteiini-konvertaasit (proprotein convertase, PC) ovat endoproteaaseja, jotka aktivoivat proteiinien esiasteita ja osallistuvat solun lukuisiin biologisiin prosesseihin samalla ylläpitäen sisäistä tasapainoa soluissa ja kudoksissa. Ne tunnistavat proteiinien esiasteista tietyn aminohapposekvenssin, minkä jälkeen ne katalysoivat peptidisidoksen katkaisun. (Constam ja Robertson, 1999; Steiner ym., 1992; Thomas, 2002) On osoitettu, että ainakin osa näistä proteaaseista tunnistaa spesifisesti aminohapposekvenssin R-X-X-R tai R-X-K/R-R, missä R viittaa arginiiniin (arginine), L lysiniin (lysine) ja X mihin tahansa aminohappoon. (Molloy ym., 1992; Creemers ym., 1993)

Banaanikärpäsestä on löydetty kolme PC-proteaasia: DFurin1 (DFur1), DFurin2 (DFur2) ja Amontillado (Amon). DFur1 ja DFur2 ovat rakenteellisesti nisäkkäiden furiinin kaltaisia proteaaseja ja Amon on nisäkkäiden PC2-proteaasin ortologi (Roebroek ym., 1991; Roebroek ym., 1992; Siekhaus ja Fuller, 1999).

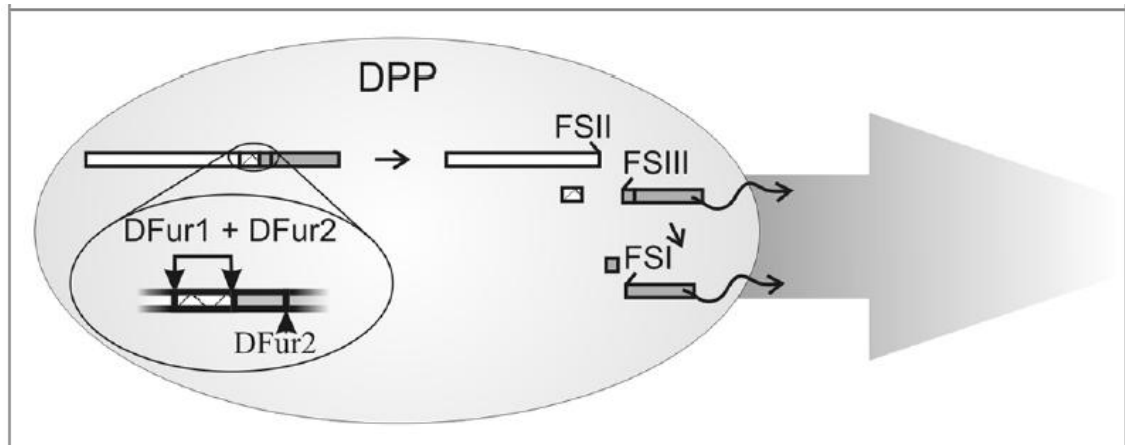
4.3 Decapentaplegic

Decapentaplegic (Dpp) on banaanikärpäsen TGF- β -suurperheeseen kuuluva proteiini, jonka tiedetään toimivan morfogeenin tavoin (Nellen ym., 1996). Dpp on maailmalla eniten tutkittu morfogeeni, ja sitä käytetäänkin usein mallina tutkittaessa signaalimolekyylien toimintamekanismeja (Tabata, 2001). Dpp on ortologinen nisäkkäiden BMP2/4-proteiineille (Padgett ym., 1993). Dpp ohjaa pitoisuudesta riippuvalla tavalla muun muassa banaanikärpäsen alkion selkäpuolen ja imaginaalilevyjen kaavoittumista sekä vatsa-selkäakselin, siiven suonten ja keskisuolen muodostumista (Ferguson ja Anderson, 1992; Nellen ym., 1996; Yu ym., 1996; Hoch ja Pankratz, 1996)



Kuva 6. Dpp:n rakenne. Dpp:llä on kolme furiinin tunnistuskohtaa: FSII sijaitsee prodomeenin alueella, FSIII prodomeenin ja ligandiosan välissä ja FSI ligandiosassa. Kuvassa prodomeeni on merkitty vaalean sinisellä ja ligandiosa tumman sinisellä.

Dpp:tä tuotetaan soluissa 588 aminohapon proteiinin esiasteena, minkä jälkeen se muodostaa dimeerin disulfididosten kautta. Tämän jälkeen dipeptidi pilkkotaan proteolyttisesti spesifisistä pilkkomiskohdista ja vain karboksyylipään aktiivinen osa eritetään ulos solusta joko homodimeerinä tai Scw-proteiiniin sitoutuneena heterodimeerinä. Dpp:llä on kolme furiinin tunnistuskohtaa, jotka on esitetty kuvassa 6. FSII (furiinin tunnistakohta II) sijaitsee prodomeenin alueella, FSIII prodomeenin ja ligandiosan välissä ja FSI ligandiosassa. Kuvassa 7 esitetty prosessointi alkaa, kun Dpp katkaistaan furiinin tunnistuskohdista II ja III DFur1- ja DFur2-proteaasien toimesta, minkä seurauksena ensimmäinen Dpp:n ligandi vapautuu. Tämän jälkeen DFur2-proteaasi pilkkoo proteiinin vielä kohdasta FSI, jolloin vapautuu edellistä ligandia hieman pienempi Dpp:n ligandi. Dpp eritetään siis solusta kahtena erikokoisena ligandina, mikä eroaa muista BMP-perheen proteiineista. (Panganiban ym., 1990; Künnapuu ym., 2009; Künnapuu ja Shimmi, 2010) Tämä onkin tyypillistä nimenomaan kaksisiipisille hyönteisille. Lisäksi furiinin tunnistuskohhta III esiintyy vain kaksisiipisillä hyönteisillä, vaikka muutoin furiinin tunnistuskohdat ovatkin hyvin konsevoituneita eri lajien välillä. (Künnapuu ym., 2009)



Kuva 7. Dpp:n prosessointi. Dpp pilkkotaan furiinin tunnistuskohdista II ja III DFur1- ja DFur2-proteasien toimesta, minkä seurauksena suurempi Dpp:n ligandi vapautuu Dpp:n karboksyyli-päästä. Tämän jälkeen DFur2-proteasi pilkkoo proteiinin vielä kohdasta FSI, jolloin pienempi Dpp:n ligandi vapautuu. Dpp eritetään siis solusta kahtena erikokoisena ligandina. (Künnapuu ja Shimmi, 2010)

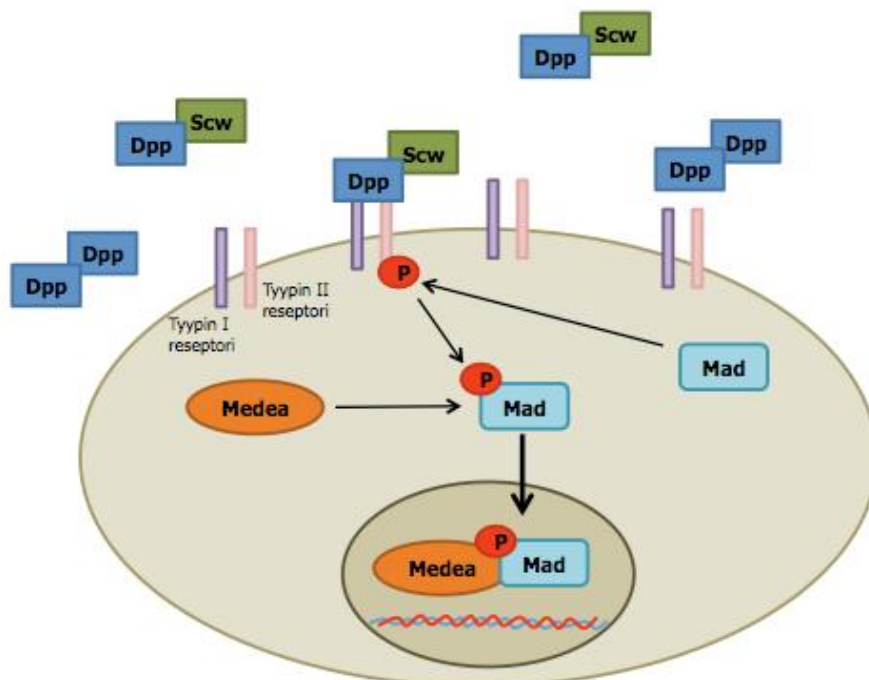
5 Decapentaplegic ja Screw alkionkehityksessä

Dpp:n on osoitettu vaikuttavan banaanikärpäsen alkion selkäpuolen kudosten muovaamiseen pitoisuudesta riippuvalla tavalla: korkea Dpp-pitoisuus ohjaa solujen kehitystä selkäpuolen rakenteiksi ja matala alkion sivujen rakenteiksi. Ilman Dpp-signaalia solut kehittyvät vatsapuolen rakenteiksi. Dpp vaikuttaa varhaisen alkion kehityksen aikana. (Ferguson ja Anderson, 1992; Ross ym., 2001; Shimmi ym., 2005)

Dpp muodostaa sekä Dpp-Dpp-homodimeerejä että Dpp-Scw-heterodimeerejä. Heterodimeerin Dpp muodostaa toisen banaanikärpäsen TGF- β -perheeseen kuuluvan proteiinin, Screw'n (Scw), kanssa. Scw on ortologinen nisäkkäiden BMP5/6/7/8 -proteiineille. (Arora ym., 1994) Shimmi kollegoineen osoittivat vuonna 2005, että Dpp-Scw-heterodimeeri aikaansaa jopa kymmenen kertaa vahvemman signaalin kudoksessa kuin Dpp-Dpp-homodimeeri (Shimmi ym., 2005). Homodimeerien aikaansaama signaali ei ole yksinään tarpeeksi vahva alkionkehityksen onnistumiselle, minkä takia Scw on myös välttämätön pitoisuusgradientin muodostuksessa (Arora ym., 1994).

5.1 Signaalinvälitys

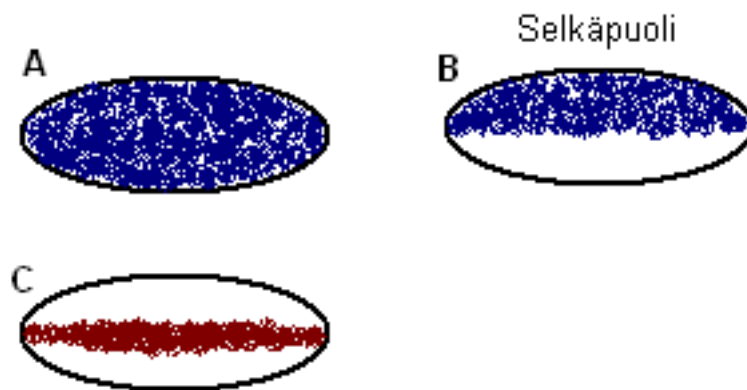
Dpp-Scw-heterodimeeri tai Dpp-Dpp-homodimeeri sitoutuu spesifisesti solun pinnalla olevaan tyypin I seriini-treoriinikinaasireseptoriin, joka muodostaa kompleksin tyypin II reseptorikinaasin kanssa. Tyypin I reseptori aktivoituu ligandin sitoutuessa siihen. Aktivoitunut tyypin I reseptori fosforyloi puolestaan tyypin II reseptorikinaasin. Signaalinvälityksessä tyypin II reseptorikinaasina toimii Punt ja tyypin I reseptorikinaasina Thick veins (tkv) tai Saxophone (sax). Dpp voi sitoutua Tkv-reseptoriin ja Scw Sax-reseptoriin. Viestiketjussa transkriptiotekijänä toimii Smad-perheeseen kuuluva Mad-proteiini (Mothers against Decapentaplegic). Tämä fosforyloituu aktiivisen tyypin II reseptorikinaasin toimesta. Fosforyloitunut Mad (P-Mad) sitoutuu toiseen Smad-perheeseen kuuluvaan proteiiniin, Medea-proteiiniin. Tämä kompleksiksi siirtyä tumaan, missä se sitoutuu DNA:han toimien näin geenien ilmenemistä säätelevien koaktivaattorien ja korepressorien sitoutumiskohtana. (Massagué ym., 2005; Shimmi ym., 2005) Signaalinvälitys on esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Dpp-proteiinin signaalinvälitys. Signaalinvälitys alkaa Dpp-Dpp-homodimeerin tai Dpp-Scw-heterodimeerin sitoutuessa tyypin I reseptoriin. Tyypin I reseptori aktivoi tyypin II reseptorin, joka fosforyloituu. Mad-proteiini fosforyloituu aktiivisen tyypin II reseptorin toimesta ja muodostaa kompleksin Medea-proteiinin kanssa. Kompleksi siirtyy tumaan ja sitoutuu DNA:han. Sitoutuminen DNA:han säätelee Dpp:n kohdegeenien transkriptiota.

5.2 Dpp-Scw-kompleksiin sitoutuvat proteiinit

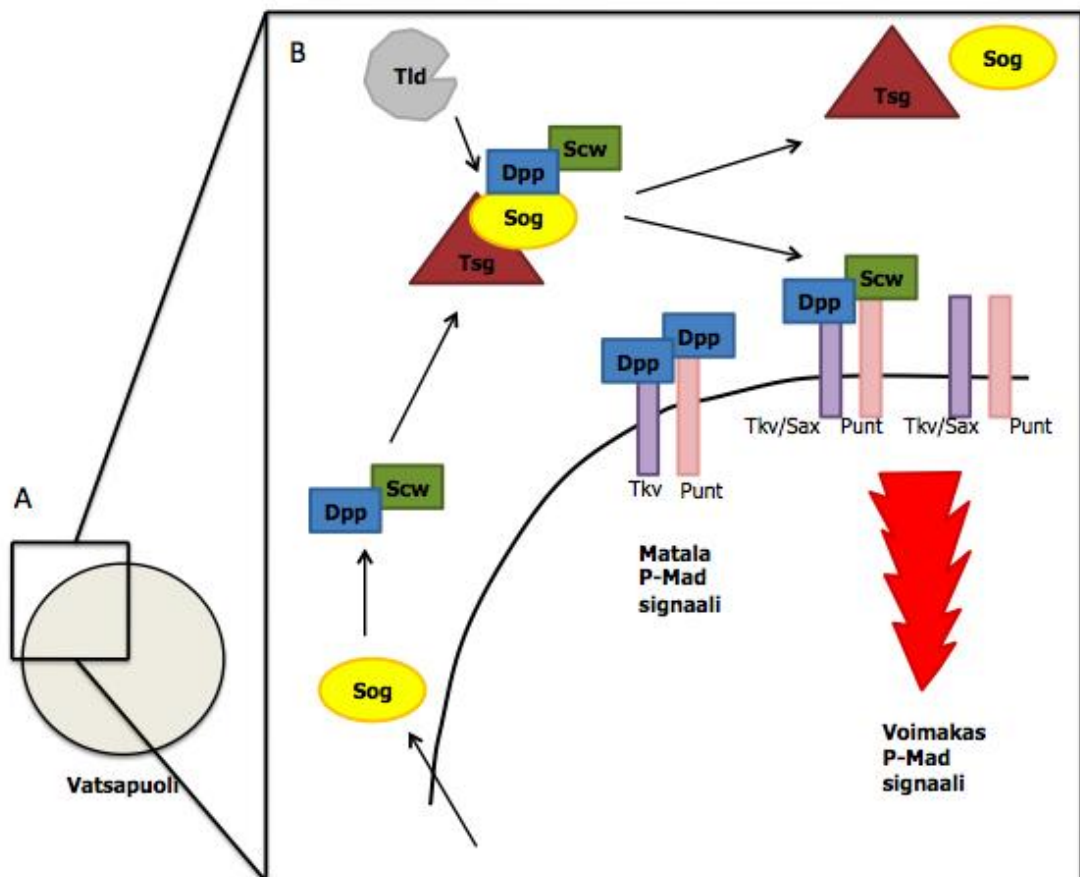
Banaanikärpäsän varhaisen alkion selkäpuolen kudosten muovautuminen vaatii onnistuakseen ainakin viiden eritettävän proteiinin läsnäoloa. Dpp:n ja Scw:n lisäksi alkion kehityksessä ovat mukana proteiinit Short gastrulation (Sog), Twisted gastrulation (Tsg) ja Tollloid (Tld). Dpp:n tiedetään olevan avainasemassa tässä proteiinijoukossa. Kuvasta 9 nähdään, että Dpp:tä ilmennetään koko banaani-kärpäsän alkion selkäpuolen alueella. Kuitenkin P-Mad-signaali, joka kertoo solunsisäisen viestiketjun aktivoitumisesta, muodostuu alkion selkäpuolen keskiviivan kohdalle (kuva 9). Tutkimukset osoittavatkin, että Scw, Sog, Tsg ja Tld vaikuttavat nimenomaan tämän terävän P-Mad-signaalin muodostumiseen. (Ferguson ja Anderson, 1992; Francois ym., 1994; Marques ym., 1997; Mason ym., 1994; Ross ym., 2001)



Kuva 9. Dpp:n ilmentäminen ja P-Mad-signaalin muodostus banaani-kärpäsän alkiossa. Dpp:tä ilmennetään (merkitty sinisellä) alkiossa koko selänpuoleisen ektodermin alueella, mutta P-Mad-signaali (merkitty punaisella) muodostuu alkion selänpuoleisen keskiviivan kohdalle. A) Dpp:n ilmentäminen, kun alkiota tarkastellaan selkäpuoli ylöspäin, B) Dpp:n ilmentäminen, kun alkiota tarkastellaan sivusta, C) P-Mad-signaali, kun alkiota tarkastellaan selkäpuoli ylöspäin.

Sog-proteiini on Dpp:n antagonisti ja sitä ilmennetään vain vatsapuolen molemmilla sivuilla. Se liikkuu selkäpuolen suuntaan ja muodostaa kompleksin Dpp-Scw-heterodimeerin tai Dpp-Dpp-homodimeerin kanssa sekä toisen antagonistin, Tsg:n kanssa. Kompleksi estää Dpp-Dpp- tai Dpp-Scw-ligandia sitoutumasta solupinnan reseptoreihin, kunnes metalloproteaasi, Tld, vapauttaa sen signalointia varten. Näin ligandi ei pääse tarttumaan reseptoreihin alkion sivuilla olevissa soluissa vaan kulkeutuu selkäpuolen keskiviivaa kohti. (Francois ym., 1994; Marques ym., 1997; Ross ym., 2001; Shimmi ja O'Connor, 2003) Shimmi ym. osoittivat vuonna 2005, että Sog ja Tsg

sitoutuvat suuremmalla affiniteetillä Dpp-Scw-heterodimeeriin kuin Dpp-Dpp-homodimeeriin. Tällöin heterodimeeriä kuljetetaan siis pidemmälle kohti selänpuoleista keskiviivaa, mikä myös vaikuttaa terävän P-Mad-signaalin muodostumiseen. (Shimmi ym., 2005) P-Mad-signaalin muodostumiseen vaikuttavien proteiinien rooli on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. P-Mad-signaalin muodostumiseen vaikuttavien proteiinien rooli. A) Poikkileikkaus banaanikärpäsen alkioista (merkitty beigellä). Kuvassa alkion vatsapuoli on alaspäin. B) Suurennos kohdan A alkioista. Sog liikkuu selkäpuolen suuntaan ja muodostaa kompleksin Dpp-Scw-heterodimeerin tai Dpp-Dpp-homodimeerin sekä toisen antagonistin, Tsg:n, kanssa. Kompleksi estää dimeeriä sitoutumasta solupinnan reseptoreihin, kunnes metalloproteaasi, Tld, vapauttaa ligandin signalointia varten. Sog ja Tsg sitoutuvat suuremmalla affiniteetillä Dpp-Scw-heterodimeeriin kuin Dpp-Dpp-homodimeeriin. Tällöin heterodimeeriä kuljetetaan pidemmälle kohti selänpuoleista keskiviivaa, mikä edesauttaa terävän P-Mad-signaalin muodostumista. Lisäksi heterodimeeri aikaansaa jopa kymmenen kertaa voimakkaamman P-Mad-signaalin kuin homodimeeri.

KOKEELLINEN OSA

6 Työn tausta ja tavoitteet

Decapentaplegic (Dpp) on morfogeeni ja sen on osoitettu olevan välttämätön banaanikärpäsän alkionkehitykselle. Dpp vaikuttaa muun muassa alkion selkäpuolen rakenteiden muovautumiseen pitoisuudesta riippuvalla tavalla. (Ferguson ja Anderson, 1992) Dpp toimii sekä homo- että heterodimeerimuodossa. Heterodimeerin se muodostaa toisen banaanikärpäsän BMP-tyyppisen proteiinin, Screw'n (Scw), kanssa. (Arora ym., 1994)

Dpp-signalointi tapahtuu erityisen signaalinvälitysreitit kautta, jossa Dpp-Dpp-homodimeerin tai Dpp-Scw-heterodimeerin sitoutuminen solupinnan reseptoriin laukaisee solunsisäisen ketjureaktion. Tässä ketjureaktiossa transkriptiotekijänä toimii Smad-perheeseen kuuluva Mad-proteiini, joka aktivoituu fosforylaation kautta. Aktivoitunutta Mad-proteiinia kutsutaan nimellä P-Mad, ja tästä syystä puhutaan usein Dpp:n aiheuttamasta P-Mad-signaalista kudoksessa. (Massagué ym., 2005; Shimmi ym., 2005) Shimmi kollegoineen osoittivat vuonna 2005, että Dpp-Scw-heterodimeeri saa aikaan vahvemman P-Mad-signaalin kudoksessa kuin Dpp-Dpp-homodimeeri, mikä selittää myös sen, miksi Dpp-Dpp-homodimeerien aikaansaama vaste soluissa ei ole yksinään tarpeeksi vahva alkionkehityksen onnistumiselle. Vaikuttaisi siis siltä, että myös Scw-proteiinin läsnäolo on hyvin tärkeää banaanikärpäsän varhaisen alkionkehityksen aikana. Scw:n molekyylimekanismeista tiedetään kuitenkin melko vähän. (Shimmi ym., 2005)

Dpp ja Scw tuotetaan soluissa suurina inaktiivisina proteiinien esiasteina. Dimerisaation jälkeen Dpp ja Scw pilkotaan proteolyttisesti, ja vain proteiinien aktiivinen ligandiosa eritetään ulos solusta. Näin ollen proteiinien oikeanlainen post-translationalinen muokkaus on avainasemassa toimivien proteiinien erityykselle. Tässä työssä tutkittiinkin Scw-proteiinin proteolyttisen muokkauksen merkitystä Scw-proteiinin funktionaalisuudelle ja erityykselle solusta sekä sen vaikutusta Dpp-signalointiin ja näin ollen ba-

naanikärpäsän alkionkehitykseen. Työn tavoitteena oli ymmärtää paremmin banaanikärpäsän morfogeneesin taustalla olevia molekyylimekanismeja.

Tutkimukset koostuivat hyönteissolujen avulla tehdyistä *in vitro* -proteiinikokeista sekä banaanikärpäsillä tehdyistä *in vivo* -kokeista. *In vitro* -kokeet ovat helppoja ja nopeita toteuttaa, mutta niiden avulla pystytään tekemään vain alustavia johtopäätöksiä. Ne ovat kuitenkin välttämättömiä, sillä ne ohjaavat paljon aikaa vievien *in vivo* -kokeiden suunnittelua. Hypoteesin varmentamiseksi tehtiin *in vivo* -kokeita genotyypiltään erilaisilla banaanikärpäsillä ja niiden alkioilla.

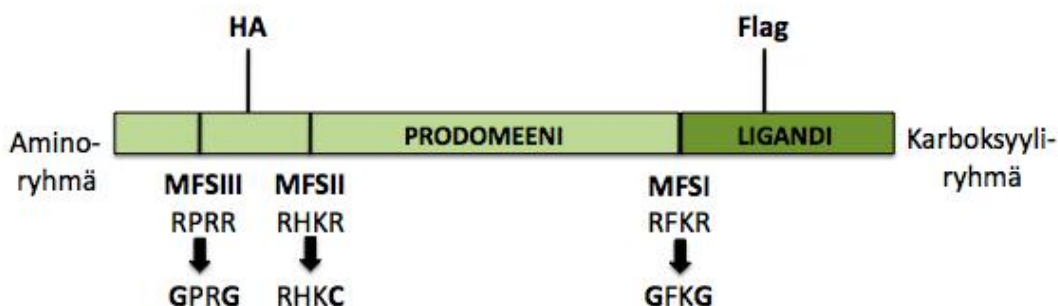
7 Materiaalit ja menetelmät

In vitro -kokeet

7.1 Plasmidit

In vitro -kokeissa käytettiin plasmideja, joihin oli liitetty haluttu DNA-sekvenssi. Nämä plasmidit transfektoitiin soluihin. Plasmidit ovat itsenäisesti replikoituvia DNA-molekyylejä, joita käytetään muun muassa geeninsiirtovektoreina ja rekombinanttiproteiinien tuotossa. (Lodish ym., 2008: 178-179) Kokeissa käytettiin pFBAC-plasmideja, jotka sopivat erinomaisesti rekombinanttiproteiinien tuottoon aktiini-promoottorin ansiosta. Promoottori säätelee transkription aloitusta. Transkriptio käynnistyy spesifisen aktivaattorin sitoutuessa promoottoriin. Aktiini on proteiini, jota tuotetaan normaalisti kaikissa soluissa ja kudoksissa. Näin ollen transkription käynnistymiseen vaadittavat olosuhteet ovat sopivat kaikissa soluissa.

Scw:lla on kolme potentiaalista pilkkomiskohtaa: FSI (furiinin tunnistuskohta I), FSII ja FSIII ja FSIII. FSII ja FSIII sijaitsevat prodomeenialueella ja FSI prodomeenin ja ligandiosan välissä. Kokeissa käytetyt plasmidit sisälsivät proteolyyttisen pilkkomisen estäviä pistemutaatioita näissä furiinin tunnistuskohdissa. Scw-geenin pistemutaatioita on esitetty kuvassa 11. Kuvasta nähdään, että furiinin tunnistuskohdan I ja III aminohapposekvenssien, RFKR ja RPRR, ensimmäinen ja viimeinen arginiini (R) oli muutettu glysiiniksi (G) ja furiinin tunnistuskohdan II aminohapposekvenssin, RHKR, jälkimmäinen arginiini oli muutettu kysteiiniksi (C). (Künnapuu ym., 2012)



Kuva 11. Scw-geenin pistemutaatiot. Scw:lla on kolme potentiaalista pilkkomiskohtaa: FSII ja FSIII sijaitsevat prodomeenialueella ja FSI prodomeenin ja ligandiosan välissä. Prodomeeni on esitetty kuvassa vaaleanvihreällä ja kypsä ligandiosa tummanvihreällä. Scw-geenin sisältävissä plasmideissa yhteen tai kahteen furiinin tunnistuskohtaan on tehty proteolyyttisen pilkkomisen estäviä pistemutaatiota. Furiinin tunnistuskohtaan I ja III aminohapposekvenssien, RFKR ja RPRR, ensimmäinen ja viimeinen arginiini (R) oli muutettu glysiiniksi (G) ja furiinin tunnistuskohtaan II aminohapposekvenssin, RHKR, jälkimmäinen arginiini oli muutettu kysteiniiksi (C). MFS tarkoittaa mutatoitua furiinin tunnistuskohtaa (mutated furin site). Scw-konstruktit sisälsivät mutatoitua Scw-geenin lisäksi FLAG- ja hemagglutiniini (HA) -epitootit.

Käytetyt plasmidit sisälsivät mutatoitua Scw-geenin lisäksi sekvenssit FLAG- ja hemagglutiniini (HA) -epitootteille. (Künnapuu ym., 2012) Nämä ovat pienikokoisia, tietyn vasta-aineen tunnistamia rakenteita, jotka mahdollistavat rekombinanttiproteiinituotteiden havainnollistamisen spesifisten vasta-aineiden avulla (Lodish ym., 2008: 78-79). Scw-mutanttigeenin sisältäviä plasmideja oli viisi erilaista, joissa yksi tai kaksi furiinin tunnistuskohtaa oli tehty toimimattomaksi. Näiden plasmidien vertailukohteena käytettiin plasmidia, jossa Scw-geenin pilkkomiskohdissa ei ollut mutaatiota. (Shimmi ym., 2005) Kokeissa käytetyt Scw-geenin sisältävät plasmidit on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Kokeissa käytetyt Scw-geenin sisältävät plasmidit.

| Plasmidin nimi | Lyhenne | Mutaatio |
|--|--------------------------|-------------|
| pFPac-scw ^{MFSI} HA(N)-flag(C) | Scw ^{MFSI} | FSI |
| pFPac-scw ^{MFSII} HA(N)-flag(C) | Scw ^{MFSII} | FSII |
| pFPac-scw ^{MFSIII} HA(N)-flag(C) | Scw ^{MFSIII} | FSIII |
| pFPac-scw ^{MFSI/II} HA(N)-flag(C) | Scw ^{MFSI/II} | FSI, FSII |
| pFPac-scw ^{MFSII/III} HA(N)-flag(C) | Scw ^{MFSII/III} | FSII, FSIII |
| pFPac-scwHA(N)-flag(C) | Wt-Scw (Wild type Scw) | - |

Osassa tutkimuksista käytettiin plasmidia, joka sisälsi Dpp:tä koodaavan geenin ja sekvenssin HA-epitootille (kuva 12), sekä plasmidia, joka sisälsi Mad-proteiinia koodaavan geenin ja sekvenssin FLAG-epitootille. Lisäksi käytettiin vihreää fluoresoivaa proteiinia

(green fluorescent protein, GFP) ilmentävää plasmidia, joka sisälsi UAS-promoottorin. GFP-geenin transkriptio käynnistettiin Gal4-proteiinia ilmentävän plasmidin avulla. Gal4-proteiini toimii transkriptioaktivaattorina UAS-promoottorille. (Shimmi ja O'Connor, 2003; Ross ym., 2001)

7.2 Schneider 2 -solulinja

Proteiinien ilmentämiseen käytettiin Schneider 2 -solulinjaa (S2). Se on banaanikärpäsen yleisimmin käytetty hyönteissolulinja. S2-solulinja polveutuu banaanikärpäsen myöhäisen vaiheen (20-24 h) alkioden primäärisoluviljelmästä (Schneider, 1972). Kun S2-solulinja perustettiin, solut kasvoivat ulos heterogeenisestä populaatiosta kolmen kuukauden tiheän kasvatuksen jälkeen ja saavuttivat immortaalisesti eli ikuisesti jakautuvan kasvun. (Kirkpatrick ja Shatzman, 1999: 290-291) Solujen ylläpitoon käytettiin M3-kasvatusalustaa (M3, ks. liite 1), johon oli lisätty 2 % vasikan sikiön seerumia (fetal calf serum, Sigma-Aldrich). Seerumi sisältää muun muassa kasvutekijöitä, jotka tukevat solujen jakautumista (Järviluoma, 2011). Soluja jaettiin kerran viikossa 2×10^6 solua/ml tiheyteen. Soluja kasvatettiin +25 °C lämpötilassa soluinkubaattorissa.

7.3 Transfektio

Transfektiossa vieras DNA viedään solun sisään. Transfektioon toteutukseen on olemassa niin kemiallisia kuin fysikaalisia menetelmiä. Kemiallisten menetelmien tarkoitus on sitoa DNA positiivisesti varautuneeseen kantajaan, joka auttaa DNA:ta pääsemään solun sisään, koska solukalvo ja DNA ovat negatiivisesti varautuneita ja hylkivät toisiaan. (Järviluoma, 2011) Markkinoilla on laaja valikoima erilaisia transfektioagenssejä, kuten FuGENE® ja Effectene®, joita tässä työssä on käytetty. Nämä ovat molemmat ei-liposomaalisia lipidivalmisteita. Transfektoituja S2-solulinjan soluja käytetään yleensä ilman erillistä selektiota, sillä ne eivät pysty kasvamaan, jos tiheys on liian pieni (Kirkpatrick ja Shatzman, 1999: 297). Tässä työssä tehdyissä kokeissa plasmidin sisältämättömistä soluista ei ollut haittaa, joten selektiota ei tehty.

7.3.1 Fugene

Tässä työssä pieniä solumääriä transfektoitaessa käytettiin kaupallista FuGENE®-transfektioagenssia (Roche). Reagenssia lisättiin 7 µl/ 50 µl DNA-laimennosta, joka sisälsi transfektiosta riippuen 1-2 µg DNA:ta. Liuoksen annettiin inkuboitua huoneenlämmössä puoli tuntia, jonka jälkeen liuos lisättiin yhteen millilitraan solususpensiota, jonka solutiheys oli 2×10^6 solua/ml M3-kasvatusalustaa. Soluja inkuboitiin +25 °C lämpötilassa viiden vuorokauden ajan ennen niiden keräämistä.

7.3.2 Effectene

Transfektoitaessa kokonaisia solumaljoja käytettiin kaupallista Effectene®-transfektioikittiä (Qiagen). Transfektioikitti koostui kolmesta eri reagenssista: effectene-reagent, enhancer ja buffer EC. Buffer EC:tä lisättiin 5 µg:n joukkoon DNA:ta niin paljon, että yhteistilavuus oli 280 µl. Liuokseen lisättiin 40 µl effectene-reagenssia ja inkuboitiin huoneenlämmössä 2-5 minuuttia. Tämän jälkeen liuokseen lisättiin vielä 40 µl enhancer-reagenssia ja inkuboitiin 5-10 minuuttia. Lopuksi liuos lisättiin solumaljalle, jossa oli 45×10^6 solua kymmenessä millilitrassa M3-kasvatusalustaa. Maljaa inkuboitiin +25 °C lämpötilassa kolmen vuorokauden ajan ennen solujen keräämistä.

7.4 Solujen kerääminen ja lyysaus

Proteiineilla on taipumus tarttua muovipintoihin, mikä voi vaikuttaa suuresti proteiinisaantoihin etenkin pienillä proteiinipitoisuuksilla (Rudolph ym., 1997: 84). Tämän välttämiseksi solususpension joukkoon lisättiin 0,1 % BSA:ta eli naudan seerumista eristettyä albumiinia (albumin bovine serum, Sigma-Aldrich). BSA sitoutuu proteiineihin ja estää niitä tarttumasta muovipintoihin, näin pienetkin pitoisuudet proteiinia saadaan talteen. Solususpensio kerättiin silikonisoituihin eppendorffputkiin (Alpha Laboratories), mikä myös estää proteiinien tarttumista putken reunoille. Solususpensiota sentrifugoitiin 10 minuutin ajan 6000 rpm nopeudella +4 °C lämpötilassa (Eppendorf). Tässä nopeudessa solut eivät hajoa, mutta ne painuvat putken pohjalle, jolloin ne voidaan erottaa supernatantista. Yleisesti proteiineja tutkittaessa suositellaan työskentelyä jäällä, sillä monet proteiinit ovat hyvin labiileja (Roe, 2001: 9).

Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti siirrettiin solujen päältä uuteen silikonisoituun eppendorffputkeen ja solut lyysattiin lyysauspuskurilla (ks. liite 1). Lyysauspuskuria lisättiin 100 µl/ml solususpensiota. Putkia inkuboitiin jäällä vielä 20 minuutin ajan, jonka jälkeen soluriekaleet sentrifugoitiin tuubin pohjalle +4 °C lämpötilassa ja 14 680 rpm nopeudella 10 minuutin ajan. Supernatantti siirrettiin uuteen silikonisoituun eppendorffputkeen. Suoritettavasta kokeesta riippuen työtä jatkettiin käyttämällä kirkasta supernatanttia, lyysattua solunestettä tai molempia. Seuraava askel oli joko näytteiden valmistaminen immunoblottausta varten tai vasta-ainesaostus.

7.5 Immunoblottaus

Immunoblottaus on yleisesti käytetty proteiinien erottelu- ja analyysimenetelmä. Immunoblottauksessa näytteen proteiinit erotellaan ensin molekyyllipainonsa mukaan geelielektroforeesilla. Erotus perustuu negatiivisesti varautuneisiin näytteisiin, jotka liikkuvat geelillä positiivista napaa kohti, pienimmät molekyylit nopeimmin. (Sariola ym., 2003: 151) Kokeissa käytettiin natriumdodekyylisulfaatti-polyakryyliamidigeelielektroforeesia (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE).

Näytteiden proteiinit tulee denaturoida ennen geelielektroforeesiajtoa, koska proteiinien natiivi konformaatio mahdollisine interaktioineen muiden molekyylien kanssa voi vaikuttaa proteiinien kulkeutumiseen geelissä. Lisäksi näytteiden tulee olla negatiivisesti varautuneita. Supernatantti- ja lyaattinäytteiden sekaan lisättiin nelinkertaista näytepuskuria (4 X näytepuskuri, ks. liite 1) ¼ näytteen tilavuudesta. Näytepuskuri sisältää pelkistävää merkaptoetanolia, joka hajottaa proteiinien tertiäärirakenteiden rikkisillat, sekä anionista detergenttiä, natriumdodekyylisulfaattia (sodium dodecyl sulphate, SDS), joka tekee näytteistä negatiivisesti varautuneita. SDS-molekyylien aiheuttama suuri negatiivinen varaus peittää proteiinien alkuperäisen varauksen alleen, jolloin ne liikkuvat geelissä molekyyllipainonsa mukaisesti. Näytepuskuri sisältää myös väriainetta, bromofenolisinistä, jolloin näytteiden kulkeutumisesta geelissä voidaan seurata sekä glyserolia, mikä tekee näytteet raskaiksi ja saa ne geelille pipetoitaessa painumaan kaivon pohjalle. (Walker, 2001: 588-606) Näytepuskurin lisäämisen jälkeen näytteitä inkuboitiin 95

°C lämpötilassa viiden minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet siirrettiin välittömästi jälle. Tämä varmistaa näytteiden pysymisen denaturoituneessa muodossa.

Kaikissa kokeissa näytteitä pipetoitiin geelin kaivoihin 15 µl ja molekyylipainostandardia 10 µl (Prestained protein ladder, broad range, Promega). Näytteitä ajettiin elektrofooresissa noin 60 minuuttia 20 mA/geeli voimakkuudella (Bio-Rad). Geelien huokoskoon voidaan vaikuttaa akryyli/metyleenibisakryyliamidin määrällä. Geelijaissa käytettiin 12,5 % geelejä, lukuun ottamatta yhtä ajoa, jossa käytettiin 10 % geeliä. Kyseessä oli suuria proteiineja, jolloin niiden erottelu on helpompaa, jos geelin huokoskoko on suurempi. Geelien koostumukset on esitetty liitteessä 2.

SDS-PAGE:n avulla eroteltut proteiinit voidaan siirtää geeliltä nitroselluloosa- tai polyvinyyli-deenifluoridi (polyvinylidene fluoride, PVDF) -kalvolle sähkövirran avulla, mikäli vyöhykkeiden paikantamisessa halutaan käyttää vasta-aineita (Baines, 2001: 38-46). Käytössä oli Milleporen PVDF-kalvo, joka käsiteltiin metanolilla ennen käyttöä. Sähkövirtaa syötettiin 90 minuutin ajan 40 V jännitteellä (Bio-Rad). Membraania blokattiin 5 % maitojauheliuoksessa puolen tunnin ajan huoneenlämmössä. Blokkaukset minimoivat vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista ja näin ollen membraanin taustavärjäytymistä (Soutar ja Wade, 1997: 144-145). Maitojauhe sekoitettiin TBST-puskuriin (TBST, ks. liite 1).

Haluttu proteiini voidaan paikantaa membraanilta spesifisen vasta-aineen avulla, joka sitoutuu kyseiseen proteiiniin. Menetelmässä käytetään yleensä kahta vasta-ainetta, joista ensimmäinen vasta-aine (primaarinen vasta-aine) tunnistaa kalvolla olevan anti-geenin ja sekundaarinen vasta-aine sitoutuu ensimmäiseen vasta-aineeseen, sillä se on tehty ensimmäisen vasta-aineen tuottaneen eläimen immunoglobuliineja vastaan (Sariola ym., 2003: 151). Sekundaariseen vasta-aineeseen on konjugoitu entsyymi tai fluoresoiva leima, jonka avulla etsitty proteiini voidaan detektoida (Lodish ym., 2008: 98-99).

Taulukko 2. Immunoblottauksessa käytetyt vasta-aineet ja niiden käyttökonsentraatiot.

| Primaarivasta-aineet | Valmistaja |
|---|---------------------------|
| anti-flag m2 mouse mAb, 0,2 µg/ml | Sigma-Aldrich |
| anti-HA12Ca5 mouse IgG, 0,5 µg/ml | Roche |
| anti-GFP rabbit IgG, 0,2 µg/ml | Santa Cruz Biotechnology |
| PS1, Phospho-Smad1/5 (41D10) rabbit mAb, 1:5000 | Cell Signaling Technology |
| Sekundaarivasta-aineet | |
| goat anti-mouse IRDye 680, 0,1 µg/ml | LI-COR |
| goat anti-rabbit IRDye 800, 0,1 µg/ml | LI-COR |

Tässä työssä käytettiin useita primaari- ja sekundaarivasta-aineita, jotka on esitetty taulukossa 2. Vasta-ainelaimennokset tehtiin TBST-puskuriin (TBST, ks. liite 1) ja vasta-aineinkubaatioiden välissä tehdyt pesut suoritettiin myös kyseisellä puskurilla. Membraaneja inkuboitii primaarivasta-aineliuoksessa yön yli +4 °C lämpötilassa ja sekundaarivasta-aineliuoksessa puoli tuntia huoneenlämmössä. Käytössä olleet sekundaarivasta-aineet sisälsivät fluoresoivan leiman, joka viritettiin ja detektoitiin LI-COR Odyssey CLx -laitteella. Virittynyt leima emittoi valoa tietyllä aallonpituudella. Sekundaarivasta-aineita oli käytössä sekä aallonpituudelle 680 että 800. Tämä mahdollisti kahden eri proteiinin samanaikaisen detektoinnin, jos proteiineja tunnistavat primaarivasta-aineet oli tuotettu eri eläimissä.

Membraanilla nähtyjen vyöhykkeiden intensiteetit määritettiin Odyssey-laitteen tietokoneohjelmalla (Odyssey V3.0). Vyöhykkeiden ympärille piirrettiin samankokoiset laatikot, ja tietokoneohjelma laski tämän alueen pikseleiden muodostaman pinta-alan. Tausta voitiin vähentää tuloksista eri menetelmillä. Tässä työssä tietokoneohjelma määrittä taustan laskemalla mitattavan vyöhykkeen ylä- ja alapuolelta saatujen intensiteettien keskiarvon. Tämä lukuarvo vähennettiin mitattavan vyöhykkeen intensiteettiarvosta. Saadut tulokset muutettiin prosenteiksi vertaamalla niitä kunkin membraanin positiivisen kontrollin intensiteettiarvoon, joka merkittiin 100 %:ksi. Nämä tulokset normalisoiittiin kokeen sisäisen kontrollin avulla. Membraanien sisäisten kontrollien vyöhykkeet muutettiin prosenteiksi kuten edellä ja kunkin näytteen mitattu intensiteettiarvo jaettiin näytteen sisäisen kontrollin intensiteettiarvolla. Tulokset muutettiin prosenteiksi. Sisäinen kontrolli kuvasi transfektion onnistumista tai kunkin näytteen kohdalla käytettyä solumäärää.

7.6 Vasta-ainesaostus

Vasta-ainesaostus (engl. Immunoprecipitation, IP) on yleinen vasta-aineiden käyttöön perustuva tekniikka, jossa heterogeenisestä proteiinijoukosta voidaan poimia tietty proteiini sille spesifisen vasta-aineen avulla. Vasta-aine voi olla sidottu esimerkiksi pienen helmien ympärille, jotka voidaan sentrifugoida yhdessä niihin sitoutuneiden proteiinien kanssa putken pohjalle, ja näin erottaa supernatantista. On myös mahdollista lisätä vasta-aine sellaisenaan proteiiniliuoksen joukkoon ja sentrifugoida vasta-aine-proteiinikompleksit koeputken pohjalle käyttämällä hyväksi liukenemattomia vasta-aineen sitojaproteiineja kuten proteiini A:ta tai G:tä. (Molecular Station)

Kokeissa käytettiin agarosia, joka sisältää pieniä, anti-Flag-vasta-aineella käsiteltyjä helmiä (Sigma Anti-Flag M2-agarose). Ennen agarosin lisäämistä kirkkaan supernatantin joukkoon se pestiin kahdesti kylmällä TBS-puskurilla (TBS, ks. liite 1). Lisäksi supernatantista otettiin pieni näyte ("IP1"-näyte) ennen helmien lisäämistä. Tämä näyte kertoi, mitä proteiineja liuoksessa oli ennen vasta-ainesaostusta. Esipestyä agarosisuspensiota lisättiin 20 µl/ml supernatanttia. Näytteitä inkuboitii koeputken pyörittäjässä (Stuart) +4 °C lämpötilassa noin 17 tuntia.

Inkubaation jälkeen agarosipelletti sentrifugoitiin putken pohjalle ja supernatantista otettiin pieni näyte ("IP2"-näyte). Tämä näyte kertoi, mitkä proteiinit eivät ole sitoutuneet vasta-ainehelmiin. Agarosipelletti pestiin kolme kertaa kylmällä TBS-puskurilla, jonka jälkeen helmiin kiinnittynyt proteiini eluutiin. Eluutioon käytettiin reagenssia Sigma Flag -peptidi, joka syrjäyttää vasta-ainehelmiin kiinnittyneen proteiinin. Reagenssin käyttökonsentraatio oli 20 µl/ml TBS + 0,1 % BSA-puskuria. Tätä liuosta pipetoitiin agarosipelletin päälle 100 µl/20 µl agarosisuspensiota. Näytteitä inkuboitii koeputken pyörittäjässä +4 °C lämpötilassa 60 minuuttia.

Agarosipelletti sentrifugoitiin putken pohjalle ja supernatantista otettiin pieni näyte ("IP3"-näyte). Tämä näyte kertoi, mitkä proteiinit ovat sitoutuneet vasta-ainehelmiin. Loppu supernatantti otettiin talteen jatkokäsittelyä varten. Vasta-ainesaostuksen onnistumista seurattiin immunoblottauksella.

7.7 Signaalintikoe

Signaalintikokeen tarkoituksena oli saada näytteissä olevat Dpp-Scw-heterodimeerit indusoimaan näytteisiin lisätyissä soluissa P-Mad-signaali. Signaalintikokeessa käytettiin näytteitä, joista oli poistettu Dpp-homodimeerit vasta-ainesaostuksen avulla. Ennen signaalintikokeen aloittamista näytteiden heterodimeerikonsentraatiot määritettiin immunoblottauksella avulla. Kalvon Dpp-vyöhykkeiden intensiteetit mitattiin ja tuloksien perusteella näytteistä valmistettiin laimennokset TBS-puskuriin. Tarkoituksena oli, että heterodimeerikonsentraatiot olisivat kaikissa Dpp:tä ja Scw:ta sisältävissä näytteissä samat. Wt-Scw:n ja negatiivisen näytteen heterodimeerikonsentraatiota ei voitu määrittää, sillä negatiivinen näyte ei sisältänyt Dpp- tai Scw-proteiineja ja Wt-Scw-näyte sisälsi vain Scw-homodimeerejä. Negatiivisesta näytteestä tehtiin laimennos 1:4 ja positiivisesta näytteestä laimennos 1:2. Laimennoksia pipetoitiin silikonisoituihin eppendorfputkiin 160 µl, jonka jälkeen laimennusten sekaan lisättiin vielä 360 µl PBS-puskuria (PBS, ks. liite 1).

Signaalintikokeessa proteiininäytteiden sekaan lisättiin 500 µl soluja, jotka ilmensivät Flag-epitooopin sisältävää Mad-proteiinia. Mad-rekombinanttiproteiinien sisältämän Flag-epitooopin avulla voitiin varmistaa, että jokaiseen näytteeseen oli lisätty yhtä paljon soluja. Tämä toimi siis kokeen sisäisenä kontrollina. Putkia inkuboitiin koeputken pyörittäjässä huoneen lämmössä viisi tuntia, jonka jälkeen solut sentrifugoitiin putkien pohjalle. Solupelletit lyysattiin 60 µl:lla nelinkertaista näytepuskuria, joka oli laimennettu veteen suhteessa 1:4. Näytepuskurin sisältämä merkaptoetanolli hajottaa proteiinien tertiäärirakenteen rikkisiltojen ohella myös solun muut rakenteet. Näytepuskurin käyttö sopi solupellettien lyysaamiseen hyvin, koska kyseisistä näytteistä haluttiin tarkastella solujen sisällä esiintyvää Mad-proteiinia, eikä sen tarvinnut olla immunoblottausta varten natiivissa muodossa. Kyseiset näytteet lämpökäsiteltiin muiden immunoblottaukseen valmistettujen näytteiden tapaan. Näytteet ladattiin geelille, ja P-Mad-signaalin muodostumista tarkasteltiin immunoblottauksen avulla. Detektoinnissa käytettiin PS1-vasta-ainetta, joka tunnistaa spesifisesti fosforyloituneen Mad-proteiinin.

In vivo -kokeet

7.8 Risteytykset

Scw- ja *Dpp*-geenit sijaitsevat banaanikärpäsen kromosomissa 2 (Nüsslein-Voldhard ym., 1984). Kokeissa käytettiin genotyypiltään erilaisia kärpäskantoja, joita risteytettiin keskenään tarvittavien genotyyppien aikaansaamiseksi. Risteytykset perustuivat pääosin niin sanottuihin pelastusristeytyksiin, jossa tarkasteltiin banaanikärpäsen kromosomiin 3 liitetyn ylimääräisen *Scw*-mutanttigeenin vaikutusta vertailukohteena käytettyyn genotyyppiin. Käytetyt risteytykset ja niistä peräisin olevat kiinnostavat genotyypit ovat esitetty kuvassa 12.

| <u>Risteytykset 1</u> | |
|---|---|
| <p>A) $\frac{OD16}{CyOFtzlacZ} ; \frac{Scw^{WT/MFSI/MFSII}}{Scw^{WT/MFSI/MFSII}} \times \frac{Scw^5}{CyOFtzlacZ} ; \frac{Scw^{WT/MFSI/MFSII}}{Scw^{WT/MFSI/MFSII}}$</p> <p style="text-align: center;">→ $\frac{OD16}{Scw^5} ; \frac{Scw^{WT/MFSI/MFSII}}{Scw^{WT/MFSI/MFSII}}$</p> | |
| <p>B) $\frac{OD16}{CyOFtzlacZ} \times \frac{Scw^5}{CyOFtzlacZ}$</p> <p style="text-align: center;">→ $\frac{OD16}{Scw^5}$</p> | |
| <p>C) $\frac{Scw^5}{CyOFtzlacZ} \times yw (+)$</p> <p style="text-align: center;">→ $\frac{Scw^5}{+}$</p> | |
| | <u>Risteytykset 2</u> |
| | <p>A) $\frac{OD16}{CyOFtzlacZ} ; \frac{Scw^{WT/MFSI/MFSII}}{Scw^{WT/MFSI/MFSII}} \times \frac{Dpp^{hr4}}{CyOFtzlacZ}$</p> <p style="text-align: center;">→ $\frac{OD16}{Dpp^{hr4}} ; \frac{Scw^{WT/MFSI/MFSII}}{+}$</p> |
| | <p>B) $\frac{OD16}{CyOFtzlacZ} \times \frac{Dpp^{hr4}}{CyOFtzlacZ}$</p> <p style="text-align: center;">→ $\frac{OD16}{Dpp^{hr4}}$</p> |

Kuva 12. Banaanikärpäsellä tehdyt risteytykset ja niistä syntyneet kiinnostavat genotyypit. Genotyyppi vaihteli kromosomin 2 ja 3 osalta, jotka on erotettu kuvassa puolipisteellä. Jos kromosomia 3 ei ole erikseen merkitty, ei siihen ole tehty muutoksia.

Genotyyppi vaihteli kromosomin 2 ja 3 osalta. Risteytyksissä ei ollut merkittävää vaikutusta, kumpi genotyyppi periytyy koiraalta ja kumpi naaraalta. + tarkoittaa normaalia alleelia, joka näissä risteytyksissä oli peräisin peruskantana käytetyiltä yw-kärpäsiltiltä. Scw^5 tarkoittaa *Scw*-mutanttialleelia, josta *Scw*-geeni on poistettu kokonaan ja OD16 mutanttialleelia, jossa *Scw*-geeni on tehty täysin toimimattomaksi. Dpp^{hr4} on hypomorfinen eli osittain toimiva *Dpp*-mutanttialleeli. Osittain toimivan alleelin käytön tarkoitus on herkistää alkioita mutaatioiden vaikutuksille, jolloin niiden tutkiminen olisi helpompaa. Normaalisti toimivassa alleelissa mutaatioiden vaikutuksia ei välttämättä nähdä. CyO on balanserikromosomi, joka on homotsygoottina elinkyvytön. Se sisältää vallitsevasti periytyvän markkerin, mikä nähdään ilmiasussa kärpästen kiharina siipinä. (Ashburner, 2005: 531-532) *FtzlacZ* on β -galaktosidaasia koodaava markkerigeeni, joka voidaan havainnoida vasta-ainevärjäyksessä tai *in situ* -hybridisaatiossa käyttämällä anti- β -galaktosidaasi-vasta-ainetta (Sullivan, 2000: 327).

Risteytyksien tarkoituksena oli kerätä banaanikärpästen alkioita värjäyksiä varten tai tarkastella kärpästen syntyvyyttä ja näin *Scw*-proteiinin pilkkomiskohtien toimimattomuudesta aiheutuvia vaikutuksia banaanikärpäsen kehityksessä. Kaikista risteytyksistä peräisin olevat kiinnostavan genotyypin omaavat alkiot voitiin erottaa ei-kiinnostavista *FtzlacZ*-markkerin avulla. Syntyvillä kiinnostavan genotyypin omaavilla kärpäsiltilä oli taas normaalit siivet, kun ei-kiinnostavilla oli CyO-kromosomista johtuen kiharat siivet.

Elinkykyisyyden määrittämiseksi risteytettiin kymmenen koiras- ja naaraskärpästä. Kärpästen annettiin paritella viiden päivän ajan, jonka jälkeen kärpäset poistettiin purkista ja jäätiin odottamaan jälkeläisten kuoriutumista. Syntyviä jälkeläisiä laskettiin useamman päivän ajan, yhteensä noin 300-400 kärpästä kustakin risteytyksestä. Risteytyskaavioiden perusteella haluttujen genotyyppien omaavien kärpästen oletettu syntyvyys on kuvan 12 risteytyksestä riippuen 25 % tai 50 %. Elinkykyisyysprosentit laskettiin vertaamalla syntyvien kärpäsien määrää niiden risteytyskaavioiden perusteella oletettuun syntyvyyteen eli kuinka paljon kärpäsiä syntyi verrattuna siihen, kuinka paljon niitä risteytyskaavion perusteella pitäisi syntyä. Banaanikärpäsiä kasvatettiin purkeissa, joissa kasvualustana käytettiin mallaspuuro-agarseosta. Kasvatusta ja risteytyksiä varten banaanikärpäsiä pidettiin +25 °C lämpötilassa.

7.9 Alkioiden keräys

Risteytettävät koiras- ja naaraskärpäset laitettiin kammioon, jonka pohjalle oli asennettu omenamehu-agarmalja. Omenamehumaljoista banaanikärpäset saavat tarvittavan ravintonsa. Lisäksi sen tuoksu houkuttelee banaanikärpäsiä munimaan. Omenamehumaljalle levitettiin myös pieni määrä hiivatahnaa. Banaanikärpäset syövät fermentoitumistilassa olevia nesteitä, mutta ne ovat ennen kaikkea hyvin persoja hiivalle (FlyMove, 2012). Hiivan läsnäolo kammiossa luo banaanikärpästen munimiselle erinomaiset olosuhteet ja siksi ne alkavat paritella vilkkaasti. Alkiot kerätään omenamehumaljalta. Banaanikärpästen pitäminen kammiossa riippuu siitä, mitä kerättävistä alkiosta halutaan tutkia. Tässä työssä tutkittiin varhaista alkionkehitystä, minkä takia kärpäsiä pidettiin kammiossa viisi tuntia ennen alkioiden keräämistä.

Alkioiden keräämiseen käytettiin TS-puskuria (TS-puskuri, ks. liite 1). TS-puskuri sisältää solukalvoja hajottavaa Triton X-100 -reagenssia, mikä helpottaa alkioiden irtoamista omenamehumaljalta. Triton X-100 -pitoisuus on TS-puskurissa kuitenkin niin pieni, ettei sen käyttö vahingoita alkiota. Banaanikärpäsen alkiota ympäröi kova kalvo, joka tulee poistaa alkioiden tarkempaa tutkimusta varten. Siksi kerätyt alkiot käsiteltiin 30 % kloorilla (Chlorox, Sigma-Aldrich). Kloorikäsittelyn jälkeen alkiot pestiin hyvin TS-puskurilla. Tämän jälkeen alkiot fiksattiin. Alkiot siirrettiin PBS-puskuriin, joka sisälsi 3,7 % formaldehydiä (Sigma-Aldrich). Alkioiden joukkoon lisättiin 200 % heptaania (Sigma-Aldrich), jonka jälkeen niitä inkuboitiin koeputken pyörittäjässä huoneen lämmössä 15 minuutin ajan. Fiksauksen tarkoitus on korjata kloorikäsittelyssä mahdollisesti aiheutuneet kudosvahingot ja tehdä samalla solut vastaanottavaisiksi eri aineille. Formaldehydillä on taipumus sitoa proteiineja yhteen ja näin ollen se tekee alkiosta ehjiä eikä proteiinien liikkuminen ole enää mahdollista. Formaldehydi pysäyttää myös alkioiden kehityksen. Heptaani taas vaikuttaa solujen kalvorakenteeseen tuhoamalla sen osia. Tämä mahdollistaa alkioiden jatkokäsittelyssä käytettävien aineiden vapaan pääsyn solujen sisälle. (Osamu Shimmi, 2012) Alkiot pestiin useaan kertaan metanolilla ja etanolilla. Pestyt alkiot säilytettiin etanolissa -20 °C lämpötilassa.

7.10 Alkioiden P-Mad-vasta-ainevärjäys

Banaanikärpäsen alkioita voidaan värjätä käyttämällä hyväksi tiettyyn antigeeniin spesifisesti sitoutuvia vasta-aineita. Vasta-aineinkubaatioiden välissä suoritettavissa pesuissa käytettiin PBT-puskuria (ks. liite 1), joka sisälsi BSA:ta. Primaarivasta-aineina käytettiin PS1-vasta-ainetta (taulukko 2, 1:1000). Primaarivasta-aineinkubaatio suoritettiin Can get signal®, immunostain solution B (Toyobo) -puskurissa ja inkubaation kesto oli yön yli +4 °C lämpötilassa.

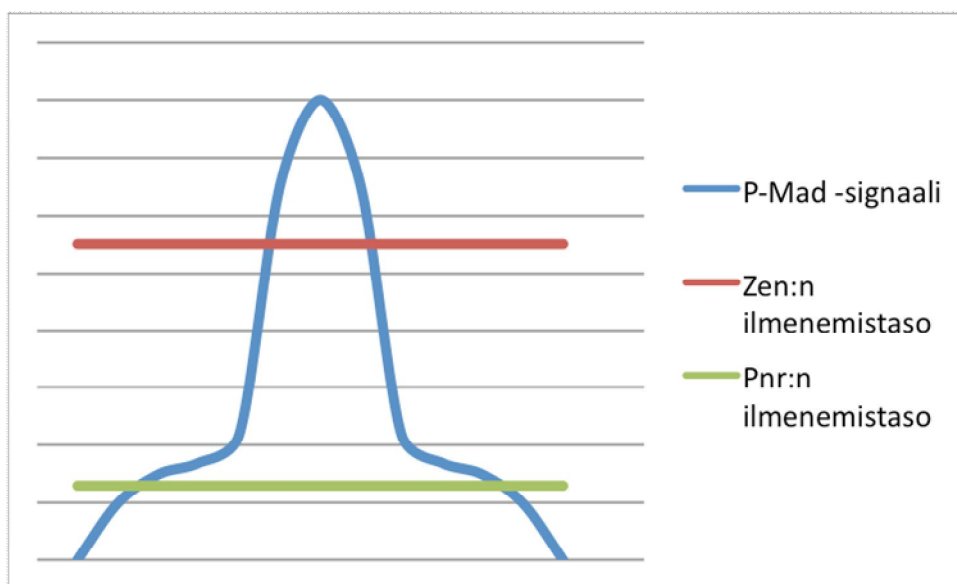
Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin biotiinilla leimattua anti-rabbit-vasta-ainetta (Vector laboratories, 1:1000). Sekundaarivasta-aineinkubaatio suoritettiin PBT-puskurissa ja inkubaation kesto oli 60 minuuttia huoneen lämmössä. Kokeessa käytettiin lisäksi signaalinvahvistajareagenssia (Vector laboratories, 1:200), mikä koostuu avidiinin ja piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase, HRP) -entsyymillä leimatun biotiinin muodostamista komplekseista. Avidiinilla ja biotiinilla on hyvin korkea sidosvuorovaikutus. Niillä on myös monia sitoutumiskohtia, joten lisätessä tätä kompleksia alkioiden joukkoon, jotka on käsitelty biotiinilla leimatulla vasta-aineella, sitoutuu kompleksi vasta-aineen biotiiniin. Näin muodostuu hyvin suuri kompleksi, mikä aikaansaa moninkertaisen signaalin HRP-entsyymin aktivoituessa. HRP aktivoitiin TMR-reagenssia (PerkinElmer, 1:100) hyväksi käyttäen. TMR sisältää tyramidia, mikä toimii substraattina HRP:lle. Tyramidiin on myös sidottu vihreä fluoresoiva leima. Tietyllä aallonpituudella fluoresoivia alkioita tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla (Nikon SMZ1500) ja kiinnostavat alkiot kiinnitettiin mikroskooppilevyille kuvattavaksi mounting medium -aineella (Vectashield®). Alkioiden kuvaamiseen käytettiin konfokaalista mikroskooppia (Leica TCS SP5), missä valonlähteenä toimii laser. Käytössä ollut tietokoneohjelma oli nimeltään Leica Application Suite (LAS).

Kiinnostavan genotyypin omaavat kärpäset pystyttiin tunnistamaan ei-kiinnostavista *FtzlacZ*-markkerin avulla. Kiinnostavilla genotyypeillä ei ollut tätä markkeria. Vasta-ainevärjäyksessä oli tarkoitus käyttää *FtzlacZ*-markkerigeenin tuottaman β -galaktosidaasin tunnistavaa hiiressä tuotettua anti- β -galaktosidase-vasta-ainetta (Promega, 0,2 μ g/ml), mutta jostain syystä se aiheutti alkioiden paljon epäspesifistä värjäytymistä, eikä sitä sen takia voitu käyttää. Ei-kiinnostavat alkiot erotettiin tekemällä alki-

oille ensin *in situ* -hybridisaatio (liite 3), jossa käytettiin *FtzlacZ*:n lähetti-RNA:lle komplementaarista koetinta. Vasta *in situ* -hybridisaation jälkeen alkioille suoritettiin P-Mad-vasta-ainevärjäys. *In situ* -hybridisaatiossa proteinaasi K- sekä toinen fiksaus käsittely jätettiin tekemättä, jotta alkioissa olevat proteiinit säilyisivät vasta-ainevärjäystä varten.

7.11 Alkioiden *in situ* -hybridisaatio

Eri risteytyksistä kerätyille alkioille suoritettiin *in situ* -hybridisaatio (liite 3). Se on menetelmä, jolla tutkitaan geenien ilmenemistä tunnistamalla lähetti-RNA kudoksista tai soluista komplementaarisen RNA-koettimen avulla. Koettiin on tyypillisesti sidottu värireaktion aikaansaava entsyymileima. (Sariola ym., 2003: 299) Kokeissa tarkastelun kohteeksi valittiin kaksi Dpp:n kohdegeeniä: *Zen* ja *Pnr*. Ne koodaavat molemmat transkriptiotekijöitä. Kohdegeeni *Zen* vaatii ilmentyäkseen korkean P-Mad-signaalin, kun taas *Pnr* aktivoituu jo matalasta P-Mad-signaalista (kuva 13).



Kuva 13. *Zen*:n ja *Pnr*:n ilmenemistasot. Kohdegeeni *Zen* vaatii ilmentyäkseen korkean P-Mad-signaalin, kun taas *Pnr* aktivoituu jo matalasta P-Mad-signaalista.

In situ -hybridisaatiossa käytetyt alkio oli fiksattu keräämisen yhteydessä. Tällöin ei kuitenkaan käytetty niin voimakkaita fiksausolosuhteita, koska osalle kerätyistä alkioista oli tarkoitus suorittaa vasta-ainevärjäys, missä spesifinen vasta-aine sitoutuu proteiiniin. Liian voimakas formaldehydikäsittely saattaa nimittäin muuttaa proteiinirakenteita. *In situ* -hybridisaatiossa tarkastelun kohteena oli kuitenkin lähetti-RNA, joten alkio fiksattiin uudelleen käyttämällä 5 % formaldehydi-liuosta. Alkioille tehtiin myös pro-

teinaasi K -käsittely, mikä tuhoaa kaiken läsnä olevan proteiinin. Näin ollen koettimella on enemmän tilaa liikkua, ja sen kulkeutuminen solujen sisään on helpompaa. *In situ* -hybridisaatiossa käytettiin Dpp:n kohdegeenien, *Zen*:n ja *Pnr*:n sekä markkerina toimivan *FtzlacZ*:n lähetti-RNA:lle komplementaarisia koettimia, jotka sisälsivät digoksigeneenileiman. Tämä leima tunnistettiin epäsuorasti käyttämällä siihen spesifisesti sitoutuvaa vasta-ainetta, joka taas sisälsi alkaalisen fosfataasileiman. Alkaalinen fosfataasileima aktivoitiin sopivalla substraatilla, mikä aikaansai värireaktion. Värjättyjä alkioita tarkasteltiin normaalilla valomikroskoopilla (Nikon SMZ1500), ja mielenkiintoiset alkiot siirrettiin mikroskooppilevyille kuvattavaksi (Nikon Eclipse 90i).

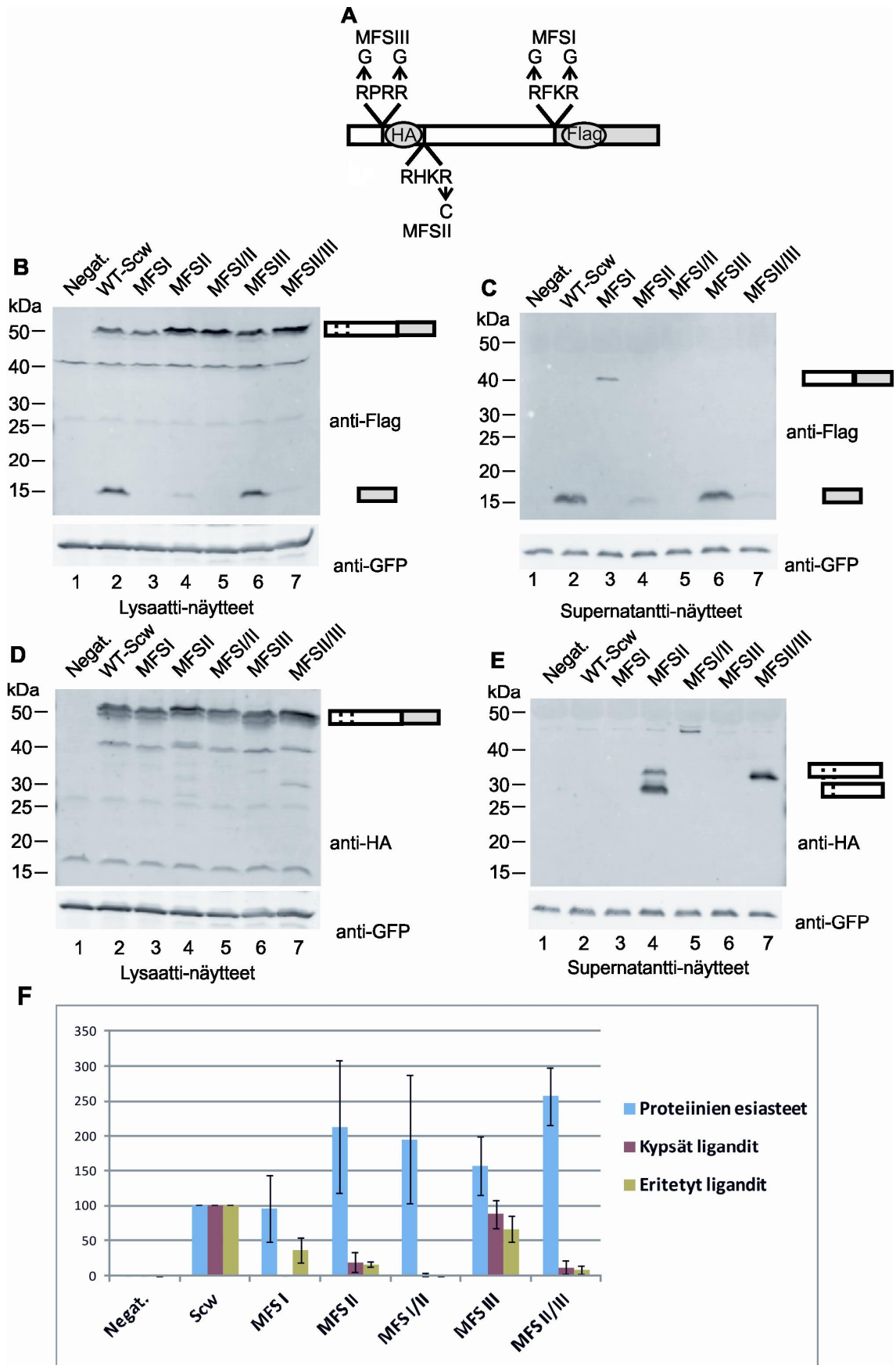
8 Tulokset ja tulosten tarkastelu

8.1 Eri pilkkomiskohtien vaikutus Scw-proteiinin prosessointiin

Kokeen tarkoituksena oli tutkia eri pilkkomiskohtien vaikutusta Scw-proteiinin muokkaukseen ja ligandin eritykseen. Normaalin *Scw*-geenin sisältävä plasmidi, Wt-Scw, sekä kaikki viisi *Scw*-mutanttigeenin sisältävää plasmidia transfektoitiin S2-soluihin yhdessä GFP-plasmidin ja *GFP*-geenin aktivoivan Gal4-plasmidin kanssa. *GFP*:n ilmentymistaso kuvasi transfektion onnistumista eri näytteiden kohdalla ja toimi täten kokeen sisäisenä kontrollina. Kokeen negatiivisena kontrollina toimi S2-soluihin ilman Scw-plasmidia transfektoitu GFP-plasmidi yhdessä Gal4-plasmidin kanssa ja positiivisena kontrollina Wt-Scw.

Kuvassa 14A on esitetty Scw:n eri mutanttien mutatoitut furiinin pilkkomiskohdat ja niiden sijoittuminen Scw-proteiinin ligandin ja prodomeenin välillä. Furiinin tunnistuskohdan I ja III aminohapposekvenssien, RFKR ja RPRR, ensimmäinen ja viimeinen arginiini (R) on muutettu glysiiniksi (G) ja furiinin tunnistuskohdan II aminohapposekvenssin, RHKR, jälkimmäinen arginiini on muutettu kysteiiniksi (C). Flag-epitoppi sijaitsee proteiinin ligandiosassa, minkä takia Scw-proteiinin prosessoinnin tuloksena syntyneet kypsät ligandit voidaan havainnoida immunoblottauksella anti-Flag-vasta-aineella. HA-epitoppi sijaitsee taas pilkkomiskohtien II ja III välissä, jonka avulla voidaan tarkastella mahdollisia muita pilkkomistuotteita, jotka syntyvät, kun jokin furiinin tunnistuskohta on mutatoitu. Lisäksi vielä esiasteina olevat Scw-proteiinit nähdään sekä anti-Flag- että anti-HA-vasta-aineella värjättyllä kalvolla, sillä vielä pilkkomaton Scw-proteiini sisältää sekä HA- että Flag-epitopin.

Kaikki kalvot värjättiin myös anti-GFP:llä, joka havainnoitiin eri aallonpituudella kuin anti-HA ja anti-Flag. GFP:n avulla voitiin tarkastella transfektion tasalaatuisuutta kaikkien näytteiden kohdalla ja näin varmistaa, että tulokset olivat keskenään vertailukelpoisia. GFP:llä värjättyt vyöhykkeet nähdään kuvissa 14B-E alareunassa.



Kuva 14. Eri pilkkomiskohtien vaikutus Scw-proteiinin prosessointiin.

Kuvassa 14B on esitetty anti-Flag-vasta-aineella värjätty kalvo Scw-rekombinanttiproteiinien lyaattinäytteiden immunoblottauksesta. Kalvon vasempaan laitaan on merkitty proteiinituotteiden molekyylipainot kilodaltonneina (kDa). Scw-proteiinin kypsä ligandi on noin 15 kDa:n kokoinen. Negatiivisen näytteen kohdalla ei vyöhykettä tässä kohtaa nähdä. Vyöhykkeet (noin 27 kDa ja 42 kDa), jotka negatiivisen näytteen kohdalla nähdään, ovat epäspesifistä sitoutumista, sillä samat vyöhykkeet nähdään kaikkien näytteiden kohdalla. Näytteen Wt-Scw kohdalla nähdään selkeä vyöhyke 15 kDa:n kohdalla. Scw^{MFSI}-näytteen kohdalla ei kypsää ligandia nähdä, mikä oli odotettavissa, sillä prodomeenin ja ligandin välinen pilkkominen on estetty pistemutaa-tiolla. Scw^{MFSII}-näytteen kypsän ligandin tuotto näyttäisi kuvan perusteella olevan hyvin heikko. Furiinin tunnistuskohtien I ja II ollessa mutatoitu (näyte Scw^{MFSI/II}) ei kypsän ligandin vyöhykettä myöskään nähdä, mutta tämäkin oli odotettavissa, sillä FSI on mutatoitu. Sen sijaan FSIII-mutatoinnilla (näyte Scw^{MFSIII}) ei näytä olevan merkitsevää vaikutusta ligandin tuottoon, sillä vyöhyke on yhtä vahva, kuin villityypin kohdalla. Miellenkiintoista on se, että näytteen Scw^{MFSII/III} kohdalla ligandin tuotto on taas hyvin heikkoa. Kuvassa 14B nähdään myös esiastemuodossa olevat Scw-proteiinit noin 50 kDa:n kohdalla. Näytteiden, jossa FSII on mutatoitu, esiaste-vyöhyke näyttäisi olevan vahvempi kuin muiden näytteiden kohdalla. Tämä kertoo esiastemuodon olevan solussa vallitseva muoto. Negatiivisessa näytteessä tätä vyöhykettä ei luonnollisesti nähdä.

Kuvassa 14C on esitetty anti-Flag-vasta-aineella värjätty kalvo Scw-rekombinanttiproteiinien supernatantinäytteiden immunoblottauksesta. Näistä näyt-teistä nähdään, mitä Scw-proteiinin pilkkomistuotteita soluista on eritetty ulos. Tulokset ovat hyvin samankaltaiset kuin lyaattinäytteiden kohdalla (kuva 14B), eli se, mitä so-luissa on tuotettu, on myös eritetty solun ulkopuolelle. Näytteiden Wt-Scw ja Scw^{MFSIII} kohdalla nähdään edelleen vahva vyöhyke 15 kDa:n kohdalla ja näytteiden Scw^{MFSII} ja Scw^{MFSII/III} kypsän ligandin määrä näyttäisi olevan erittäin alhainen. Scw^{MFSI} -näytteen kohdalla solusta eritetty 40 kDa:n kokoinen proteiinituote, joka on 15 kDa:n ligandia suurempi furiinin pilkkomiskohdan I mutatoimisesta johtuen. Kyseistä vyöhykettä ei nähdä lyaattinäytteiden kohdalla (kuva 14B), mikä johtuu luultavasti kalvolla nähtävän samankokoisen epäspesifisen vyöhykkeen takia. Furiinin tunnistuskohtien I ja II ollessa mutatoitu (näyte Scw^{MFSI/II}) ei proteiinivyöhykettä enää nähdä 40 kDa:n kohdalla.

Kuvassa 14D on esitetty anti-HA-vasta-aineella värjätty kalvo Scw-rekombinanttiproteiinien lyaattinäytteiden immunoblottauksesta. Kalvolla nähdään esiastemuodossa olevat Scw-proteiinit noin 50 kDa:n kohdalla. Ainakin näytteiden Scw^{MFSII} ja Scw^{MFSII/III} vyöhyke näyttäisi tässäkin olevan vahvempi kuin muiden näytteiden kohdalla. Negatiivisessa näytteessä tätä vyöhykettä ei luonnollisesti nähdä. Kuvassa 14E on esitetty anti-HA-vasta-aineilla värjätty kalvo Scw-rekombinanttiproteiinien supernatanttinäytteiden immunoblottauksesta. Tässä huomio kiinnittyy näytteeseen Scw^{MFSII}. Näyttäisi siltä, että solusta on eritetty kaksi melko samankokoista proteiinituotetta, jotka nähdään kuvassa 30 kDa:n molemmin puolin. Suurempi näistä nähdään myös näytteen Scw^{MFSII/III} kohdalla. Tästä voisi päätellä, että pienempi proteiinituote on furiinin tunnistuskohtien I ja III välinen prodomeenin osa, joka on peräisin näiden tunnistuskohtien pilkkomisesta ja suurempi proteiinituote on koko prodomeeniosa. Yleensä prodomeenin osia ei eritetä solusta, vaan ne menevät pilkkomisen jälkeen hajotukseen. Kuitenkin furiinin tunnistuskohtien II tai II ja III ollessa mutatoitu näyttäisi näiden proteiinituotteiden erityis olevan hyvinkin tehokasta, sillä kyseiset proteiinituotteet nähdään vain heikkoina vyöhykkeinä kuvassa 14D.

Kuvassa 14F on esitetty proteiinien esiasteiden, kypsien ligandien ja eritettyjen ligandien määrät pylväinä. Kuvaan on myös lisätty tulosten keskihajonnat, jotka perustuvat viiteen eri kokeeseen. Näytteiden Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSI/II} kohdalla ei tuotettujen 40 kDa:n kokoisten pilkkomistuotteiden määrää kuitenkaan voitu määrittää saman molekyylipainon omaavan epäspesifisen vyöhykkeen takia (kuva 14B). Immunoblottauksen tuloksista voidaan päätellä, että furiinin tunnistuskohdan II ollessa mutatoitu on ligandin tuotto ja erityis hyvin heikkoa. Tällöin myös proteiinin esiaste on solussa vallitseva muoto. Proteiinin prosessoinnin hidastuminen pilkkomiskohdan II mutatoimisen myötä saattaisi selittää saadut tulokset. Pilkkomiskohdan I ollessa mutatoitu soluista eritetään tuote, joka on normaalia ligandia suurempi. Lisäksi tämän ligandin määrä on villityyppiin verrattuna vähäisempää. Pilkkomiskohdalla III ei tulosten perusteella ole merkittävää vaikutusta ligandin prosessointiin ja eritykseen. Tästä syystä työssä keskityttiin rekombinanttiproteiinien Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} pilkkoutumistuotteiden funktionaalisuuden tutkimiseen.

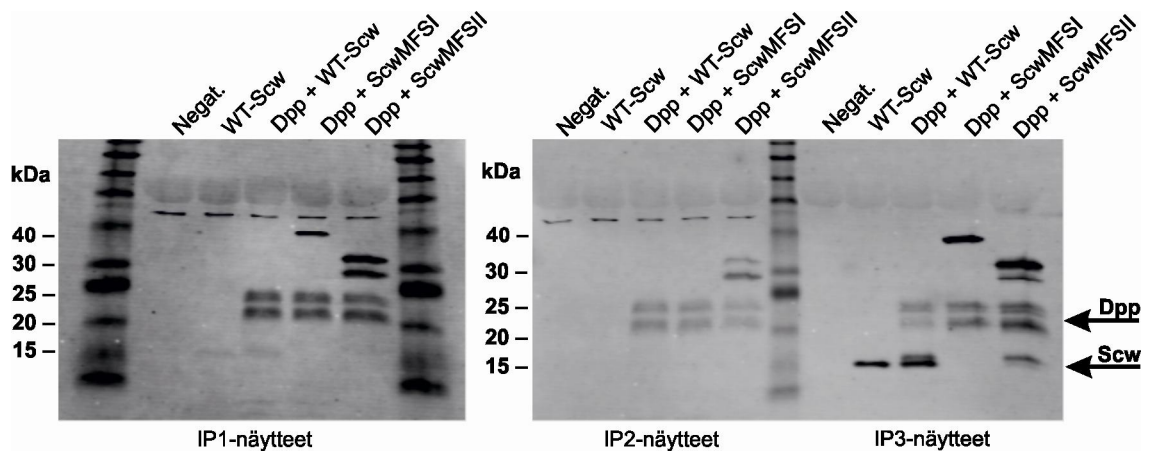
Scw-proteiinin molekyylimekanismeista on julkaistu vain muutama artikkeli. Sen sijaan banaanikärpäsän BMP-proteiini, Glass botton boat (Gbb), on ollut tutkimuskohteena

enemmän suosiossa. Gbb ja Scw ovat hyvin samankaltaisia, ja niillä on yhteiset ortologit nisäkkäissä. Gbb vaikuttaa yhdessä Dpp-proteiinin kanssa banaanikärpäsen myöhemmissä kehitysvaiheissa. Tulokset Scw-proteiinin pilkkomiskohtien vaikutuksesta ligandin tuottoon ja eritykseen osoittavat, että Scw:n ja Gbb:n molekyylimekanismeissa on eroa. Viimeisemmät julkaisut Gbb-proteiinin prosessoinnista osoittivat, että minkä tahansa Gbb:n pilkkomiskohdan mutatoiminen johtaa kypsän ligandin suurempaan tuottoon, mikä näyttäisi olevan täysin päinvastaista Scw-proteiinin prosessoinnissa. Sen sijaan Gbb:n furinin tunnustuskohdan, joka sijaitsee prodomeenin ja ligandiosan välissä, mutatoiminen tuottaa Scw:n tavoin suurempikokoisen proteiinituotteen. (Akiyama ym., 2012; Fritsch ym., 2012)

8.2 Heterodimeerin muodostus

Kokeen tarkoituksena oli tutkia rekombinanttiproteiinien Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} funktionaalisuutta tarkastelemalla näiden pilkkoutumistuotteiden ja Dpp-proteiinin muodostaman heterodimeerin muodostusta. Normaalin Scw-geenin sisältävä plasmidi, Wt-Scw, sekä Scw-mutanttigeenin sisältävät plasmidit, Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII}, transfektoitiin S2-soluihin yhdessä Dpp-plasmidin kanssa. Lisäksi Wt-Scw transfektoitiin ilman Dpp:tä. Yhteen näytteeseen ei transfektoitu mitään, mikä toimi kokeen negatiivisena kontrollina.

Näytteiden supernatanteille suoritettiin vasta-ainesaostus anti-Flag M2 -agarosilla. Dpp-plasmidien sisältämät Dpp-geenit eivät sisällä Flag-epitoppeja, ja tästä syystä ainoastaan heterodimeerimuodossa olevat Dpp-proteiinit tarttuvat anti-Flag-vastaaineella käsitelyihin helmiin. Vasta-ainesaostus kertoo siis rekombinanttiproteiinien Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} pilkkomistuotteiden kyvystä muodostaa heterodimeeri Dpp:n kanssa. Kuva 15 esittää kalvoa, joka kertoo vasta-ainesaostuksen onnistumisesta.



Kuva 15. Rekombinanttiproteiinien pilkkoutumistuotteiden heterodimeerin muodostuksen tutkiminen vasta-ainesaostuksen avulla. Kalvot on värjätty sekä anti-Flag- että anti-HA-vasta-aineilla, jotka tunnistavat rekombinanttiproteiinien HA- ja Flag-epitootit. Scw-proteiinin kypsän ligandin vyöhyke nähdään 15 kDa:n kohdalla ja Dpp-proteiinin kaksi vyöhykettä 23 ja 26 kDa:n kohdalla.

Kuvan 15 membraanit on värjätty sekä anti-Flag- että anti-HA-vasta-aineilla. Kuvassa Scw-proteiinin kypsä ligandi nähdään 15 kDa:n kohdalla. Dpp eritetään ulos solusta kahtena erikokoisena ligandina, jotka nähdään kuvassa vyöhykkeinä 23 ja 26 kDa:n kohdalla. IP1-näytteiden kohdalla nähdään Scw- ja Dpp-proteiinien läsnäolo ja konsentraatio lähtötilanteessa ennen vasta-ainesaostusta. Negatiivisessa näytteessä ei Dpp:n tai Scw:n vyöhykkeitä nähdä. Wt-Scw-näytteessä ei Dpp:tä ole läsnä ollenkaan, mutta Scw:n vyöhyke nähdään näytteessä, joskin erittäin heikkona. Näytteissä Dpp+Wt-Scw, Dpp+Scw^{MFSI} ja Dpp+Scw^{MFSII} nähdään Dpp:n vyöhykkeet selkeästi. Scw:n vyöhyke voidaan erottaa hyvin heikosti näytteen Dpp+Wt-Scw kohdalla, mutta ei enää näytteen Dpp+Scw^{MFSII} kohdalla. Näytteen Dpp+Scw^{MFSI} Scw:n vyöhyke nähdään 40 kDa:n kohdalla. Oletettavasti Scw-proteiinia on myös näytteessä Dpp+Scw^{MFSII}, mutta sen määrä on hyvin pieni.

IP2-näytteiden kohdalla nähdään, mitä ei ole tarttunut anti-Flag -vasta-aineella käsiteltyihin helmiin. Scw:ta ei nähdä näissä näytteissä ollenkaan, mikä kertoo, että kaikki Scw-proteiini on tarttunut helmiin. Dpp nähdään näytteissä Dpp+Wt-Scw, Dpp+Scw^{MFSI} ja Dpp+Scw^{MFSII}. Tämä Dpp on oletettavasti homodimeerimuodossa, koska se ei ole tarttunut helmiin Scw-proteiinin välityksellä.

IP3-näytteet on otettu vasta-ainesaostuksen ja eluution jälkeen. Näiden näytteiden kohdalla nähdään, onko vasta-ainesaostus onnistunut eli onko anti-Flag-vasta-aineella käsiteltyihin helmiin on tarttunut haluttuja proteiineja. Näytteissä olevat Scw-proteiinit

ovat konsentroituneet, mikä nähdään kuvassa huomattavasti vahvempina vyöhykkeinä. IP1-näytteisiin verraten näytteiden Wt-Scw, Dpp+Wt-Scw ja Dpp+Scw^{MFSII} kohdalla nähdään nyt vahvat kypsän ligandin vyöhykkeet 15 kDa:n kohdalla. Myös näytteen Dpp+Scw^{MFSI} 40 kDa:n pilkkomistuote nähdään nyt hyvin voimakkaana. Dpp-vyöhykkeet nähdään edelleen selkeästi näytteissä Dpp+Wt-Scw, Dpp+Scw^{MFSI} ja Dpp+Scw^{MFSII}, mikä tarkoittaa, että myös rekombinanttiproteiinien Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} pilkkoutumistuotteet näyttäisivät olevan funktionaalisia heterodimeerin muodostamisessa. Näytteissä oleva Dpp on myös heterodimeerimuodossa, sillä ilman Scw:ta se ei olisi voinut tarttua helmiin. Koe toistettiin useasti, ja tulokset olivat samankaltaisia. Muutamassa kokeessa Dpp-geenin sisältävä plasmidi transfektoitiin soluihin ilman Scw:ta. Tämän näytteen avulla pystyttiin varmistamaan, ettei Dpp-homodimeerit pystyneet sitoutumaan helmiin.

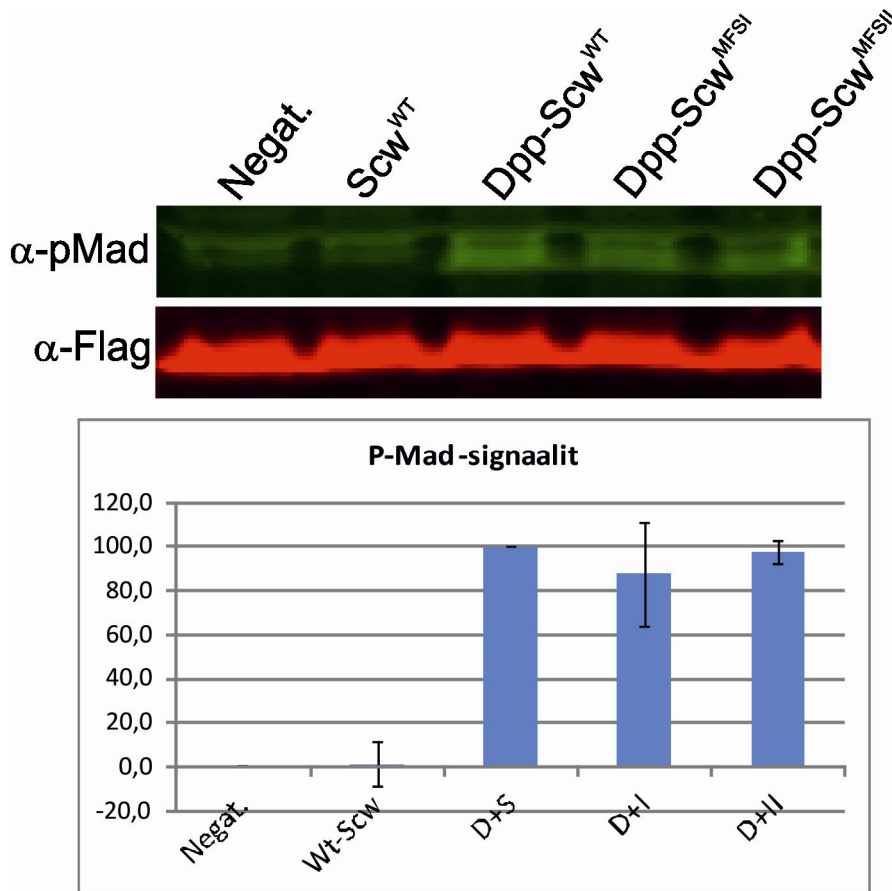
IP3-näytteiden kohdalla tuli myös esiin mielenkiintoinen asia (kuva 15). Näyttäisi siltä, että Scw-proteiinin kypsä ligandi nähdään hieman eri molekyylipainolla, riippuen siitä, onko se homo- vai heterodimeerimuodossa. Tämä nähdään, kun tarkastellaan näytteiden Wt-Scw ja Dpp+Wt-Scw kypsän ligandin vyöhykeitä 15 kDa:n kohdalla. Huomataan, että näytteessä Dpp+Wt-Scw nähdään molekyylipainoltaan hieman suurempi vyöhyke vahvemman 15 kDa:n vyöhykkeen yläpuolella. Tätä ei nähdä näytteessä Wt-Scw, missä Scw on homodimeerimuodossa Dpp-proteiinin puuttuessa. Suuremman molekyylipainon saattaisi selittää jokin glykolysaatio, joka tapahtuu vain heterodimeerien post-translationalisessa muokkauksessa. Tällainen muokkaus on TGF- β -suurperheen proteiineille hyvin ominaista. Tämä saattaisi myös selittää sen, miksi Dpp:n määrä näyttäisi olevan kaikissa IP3-näytteissä lähes sama, vaikka juuri edellisissä tuloksissa todettiin, että furiinin tunnistuskohdan II ollessa mutatoitu on ligandin tuotto ja erityis heikompaa villityyppiin verrattuna. Näytteen Dpp+Scw^{MFSII} kohdalla nähtävän kaksoisvyöhykkeen suurempi vyöhyke on selkeästi vallitseva muoto. Tämä viittäisi siihen, että näytteen lähes kaikki Scw-proteiini on heterodimeerimuodossa, kun taas näytteen Dpp+Wt-Scw kohdalla osa proteiinista näyttäisi olevan heterodimeeri- ja osa homodimeerimuodossa. Voisiko siis olla, että Scw muodostaa ensisijaisesti heterodimeerin Dpp:n kanssa? Eli jos Scw-proteiinin tuotto on heikkoa, vaikuttaa se ensisijaisesti Scw-homodimeerien määrään?

Toinen mielenkiintoinen havainto on, että näytteen Dpp+Scw^{MFSII} prodomeeninosat nähdään myös kalvolla vasta-ainesaostuksen ja eluution jälkeen (30 kDa:n molemmin puolin), vaikka ne eivät sisällä Flag:n epitooppia (kuva 15, IP3-näytteet). Niiden täytyy siis olla jollain tavalla yhteydessä Dpp:n tai Scw:n kypsään ligandiin. Scw-proteiinin kolmiulotteisen rakenteen ja glykolysaatioiden tarkastelu voisi olla seuraava mielenkiintoinen tutkimuskohde.

8.3 P-Mad-signaalin muodostus

Kokeen tarkoituksena oli tutkia rekombinanttiproteiinien Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} funktionaalisuutta tarkastelemalla näiden pilkkoutumistuotteiden ja Dpp-proteiinin muodostaman heterodimeerin aikaansaamaa P-Mad-signaalia soluissa. Kokeessa käytettiin vasta-ainesaostuksesta peräisin olevia näytteitä, jotka eivät sisältäneet Dpp-homodimeerejä. Dpp-homodimeerien läsnäolo aiheuttaisi vääränlaisia tuloksia, sillä Dpp-Dpp-homodimeeri aikaansaa soluissa matalan P-Mad-signaalin. Scw ei taas yksinään aiheuta signaalia.

Ennen signalointikoetta vasta-ainesaostuksesta eluoitujen näytteiden heterodimeerikonsentraatiot tasattiin. Tarkoituksena oli, että heterodimeerikonsentraatiot olisivat kaikissa Dpp:tä ja Scw:ta sisältävissä näytteissä samat. Signalointikokeessa proteiini-näytteiden sekaan lisättiin soluja, jotka ilmensivät Flag-epitoopin sisältävää Mad-proteiinia. Mad-rekombinanttiproteiinien sisältämän Flag-epitoopin avulla voitiin varmistaa, että jokaiseen näytteeseen oli lisätty yhtä paljon soluja. Tämä toimi siis kokeen sisäisenä kontrollina. Signalointikokeen tarkoituksena oli saada näytteissä olevat proteiinit muodostamaan näytteisiin lisätyissä soluissa P-Mad-signaali.



Kuva 16. Dpp- ja Scw-rekombinanttiproteiinien muodostamat P-Mad-signaalit. P-Mad-vyöhykkeistä (kuvassa vihreällä) nähdään rekombinanttiproteiinien synnyttämä P-Mad-signaali soluissa. Flag-signaali toimi kokeen sisäisenä kontrollina (kuvassa punaisella). P-Mad-signaaleista on piirretty taulukko. Taulukon pylväät saatiin jakamalla P-Mad-signaalien intensiteetit kunkin näytteen sisäisen kontrollin intensiteetillä ja muuttamalla saadut lukuarvot prosenteiksi vertailemalla niitä näytteen Dpp+Scw^{WT} lukuarvoon, joka muutettiin 100 %:ksi.

P-Mad-signaalin muodostumista tarkasteltiin immunoblottauksella. Kuvassa 16 kalvolla nähdyt P-Mad-vyöhykkeet on esitetty vihreällä ja Flag-signaalit punaisella. P-Mad-signaaleista on piirretty taulukko. Taulukon pylväiden arvot laskettiin jakamalla vastaaineilla tunnistettujen P-Mad-vyöhykkeiden intensiteetit kunkin näytteen sisäisen kontrollin intensiteetin arvolla (Flag-signaalit). Saadut lukuarvot muutettiin prosenteiksi vertaamalla niitä näytteen Dpp+Scw^{WT} lukuarvoon, joka merkittiin 100 %:ksi.

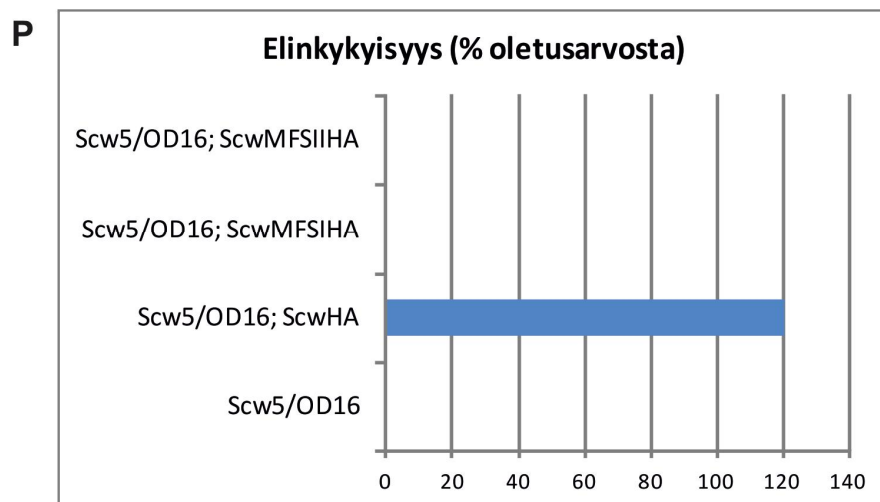
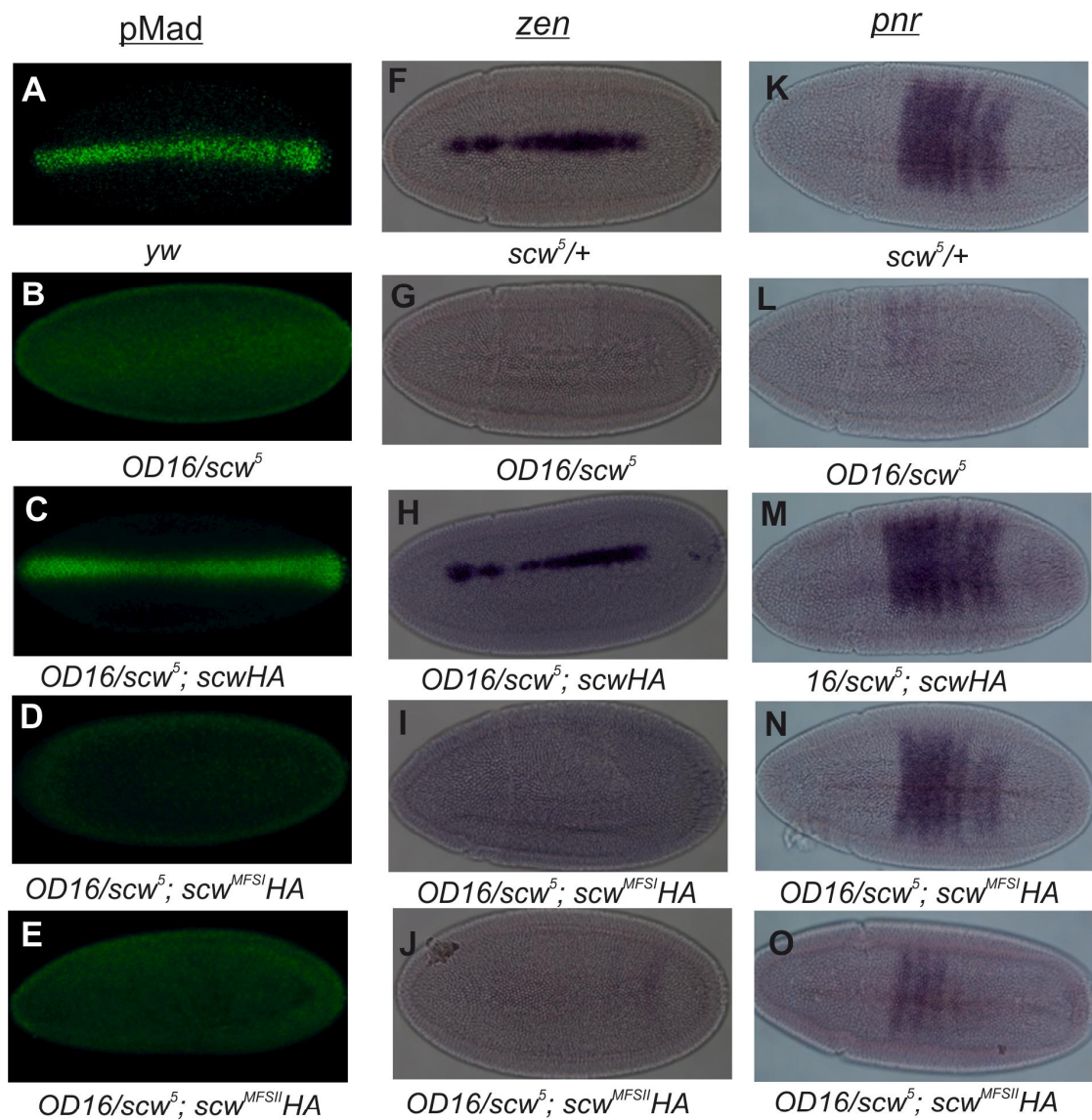
Tuloksista nähdään, että P-Mad-signaalia ei muodostu ilman Dpp-proteiinin läsnäoloa, sillä negatiivisen näytteen ja Scw-homodimeerinäytteen kohdalla P-Mad-signaali on 0 %. Näytteiden Dpp+Scw^{MFSI} ja Dpp+Scw^{MFSII} kohdalla nähdään melko yhtäläiset P-Mad-signaaliympärykset verrattuna. Näytteen Dpp+Scw^{MFSI} signaali on hieman matalampi kuin näytteiden Dpp+Scw^{WT} ja Dpp+Scw^{MFSII} signaalit. Koe toistettiin kuitenkin vain kolme kertaa, joten näiden tulosten perusteella ei voida

sanoa, onko ero merkittävä, tai päinvastoin, ovatko signaalit täysin yhtäläiset. Tulosten perusteella voidaan kuitenkin todeta, että rekombinanttiproteiinien Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} pilkkoutumistuotteet pystyvät muodostamaan P-Mad-signaalin soluissa yhdessä Dpp-proteiinin kanssa. Tämä viittaa siis siihen, että nämä pilkkoutumistuotteet pystyvät muodostamaan heterodimeerin Dpp-proteiinin kanssa, sitoutumaan solupinnan reseptoreihin ja laukaisemaan solunsisäisen ketjureaktion, jonka seurauksena solunsisäinen transkriptiotekijä Mad aktivoituu. Näyttäisi siltä, että rekombinanttiproteiinien Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} pilkkoutumistuotteet ovat funktionaalisia *in vitro*.

8.4 Pelastuskokeet

Eri genotyypin omaavia kärpäsiä risteytettiin kuvan 12 mukaisesti. Risteytyksistä kerättiin alkioita, joille tehtiin P-Mad-vasta-ainevärjäys sekä *in situ* -hybridisaatio, jolla tutkittiin Dpp:n kohdegeenien, *Zen*:n ja *Pnr*:n ilmenemistä. Lisäksi kuvan 12 risteytyksistä määritettiin syntyvien, kiinnostavan genotyypin omaavien kärpästen elinkykyisyys. Elin-kykyisyydet on esitetty prosentteina verraten syntyneiden kärpästen määrää kustakin risteytyksestä (kuva 12) niiden oletettuun syntyvyyteen.

Risteytysten 1 tarkoitus oli tarkastella, voiko kromosomiin 3 liitetty ylimääräinen *Scw*-geeni pelastaa muuten elinkyvyttömän genotyypin OD16/Scw⁵, jossa *Scw*-geeni on täysin toimimaton. Kahtena kopiona kromosomiin 3 lisätyn toimivan *Scw*-geenin (Scw^{WT}=ScwHA) tulisi oletetusti pelastaa elinkyvyttömän genotyyppi. Jos näin ei tapahtuisi, olisi koeasettelussa jotain vikaa. Kokeen tarkastelun kohteena oli ensisijaisesti se, miten kromosomiin 3 liitetty ylimääräinen *Scw*-geeni, johon on tehty pistemutaatio furii-*n* tunnistuskohtaan I tai II vaikuttaa elinkyvyttömään genotyyppiin OD16/Scw⁵. Kokeessa banaanikärpäsen alkion normaalin P-Mad-värjäyksen esittämiseen on käytetty *yw*-kärpästen alkioita. *Zen*- ja *Pnr*-värjäyksen kontrollina on taas käytetty genotyypin alkioita Scw⁵/+. Näillä alkiolla on vain yksi kopio toimivasta *Scw*-geenistä. Kuvassa 17 on esitetty risteytysten 1 alkioiden värjäykset sekä elinkykyisyydet.



Kuva 17. Risteytysten 1 tulokset. Eri genotyypin omaavien alkoiden P-Mad-vasta-ainevärykset (A-E), *in situ*-hybridisaatiot kahta eri koetinta käyttäen (F-J ja K-O) sekä elinkykyisyyden määrittäminen (P). Elinkykyisyydet on ilmoitettu prosentteina verraten syntyneiden kärpästen määrää kustakin risteytyksestä niiden oletettuun syntyvyYTEEN.

Kuvan 17A yw-alkio kuvaa normaalia P-Mad-signaalia kudoksessa. Tätä signaalia ei nähdä kuvan 17B alkiolla, joka on elinkyvytön. Kuitenkin kromosomiin 3 on lisätty *Scw*-geeni palauttaa P-Mad-signaalin (kuva 17C). Sen sijaan, jos kromosomiin 3 lisätyn ylimääräisen *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohta I tai II on mutatoitu, ei P-Mad-signaalia nähdä (kuvat 17D ja 17E).

Zen vaatii ilmentymään korkean P-Mad-signaalin. Tällöin geeni yleensä ilmenee tai ei ilmene, riippuen siitä, onko P-Mad-signaali tarpeeksi vahva. Kuvan 17F alkiolla on vain yksi kopia toimivasta *Scw*-geenistä. Kuitenkin *Zen*-geeniä ilmennetään voimakkaasti. Usein mutaatiot eivät näykään heterotsygootteina. Elinkyvyyttömyyttä osoittavan genotyypin kohdalla ei *Zen*-geeniä ilmennetä (kuva 17G), mikä oli odotettavissa. Jos taas kromosomiin 3 on lisätty ylimääräinen *Scw*-geeni, on *Zen*-värjäys kontrolliin verrattuna jopa voimakkaampi (kuva 17H). Tämä oli sinänsä odotettavissa, sillä kuvan 17H alkiolla on lisätyn *Scw*-geenin ansiosta nyt normaalit kaksi kopiota toimivasta *Scw*-geenistä, kun vertailukohteena olleella alkiolla niitä oli vain yksi (kuva 17F). Jos kromosomiin 3 lisätyn ylimääräisen *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohta I tai II on mutatoitu, ei *Zen*-geeniä ilmennetä soluissa (kuvat 17I ja 17J). Tämä tukee alkoiden P-Mad-värjäyksen tulosta.

Pnr ilmenee jo matalasta P-Mad-signaalista. *Pnr*-geeniä saatetaankin ilmentää, vaikka alkio olisi elinkyvytön. Kontrollialkion kohdalla *Pnr*-värjäys on hyvin selkeä (kuva 17K). Elinkyvyyttömän alkion kohdalla värjäys nähdään, mutta vain heikosti (kuva 17L). Jälleen, jos kromosomiin 3 on lisätty toimiva *Scw*-geeni kahtena kopiona, on kohdegeenin ilmentäminen jopa voimakkaampaa kontrolliin verrattuna (kuva 17M). Jos kromosomiin 3 lisätään *Scw*-geeni, jonka furiinin tunnistuskohdassa I on mutaatio, palauttaa se osan *Pnr*-värjäyksestä (kuva 17N). Värjäys ei ole kuitenkaan yhtä voimakas kuin kontrollialkiossa. Kuvan 17O genotyyppi sisältää kromosomiin 3 lisätyn *Scw*-geenin, jonka furiinin tunnistuskohdassa II on mutaatio. Tällöin *Pnr*-värjäys on osittain palautunut, mutta se on huomattavasti heikompi kuin mutaation I kohdalla (kuva 17N).

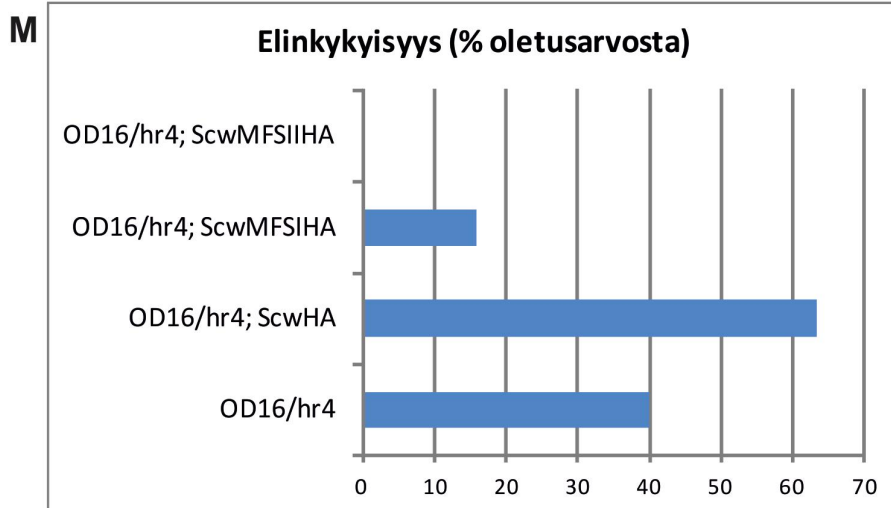
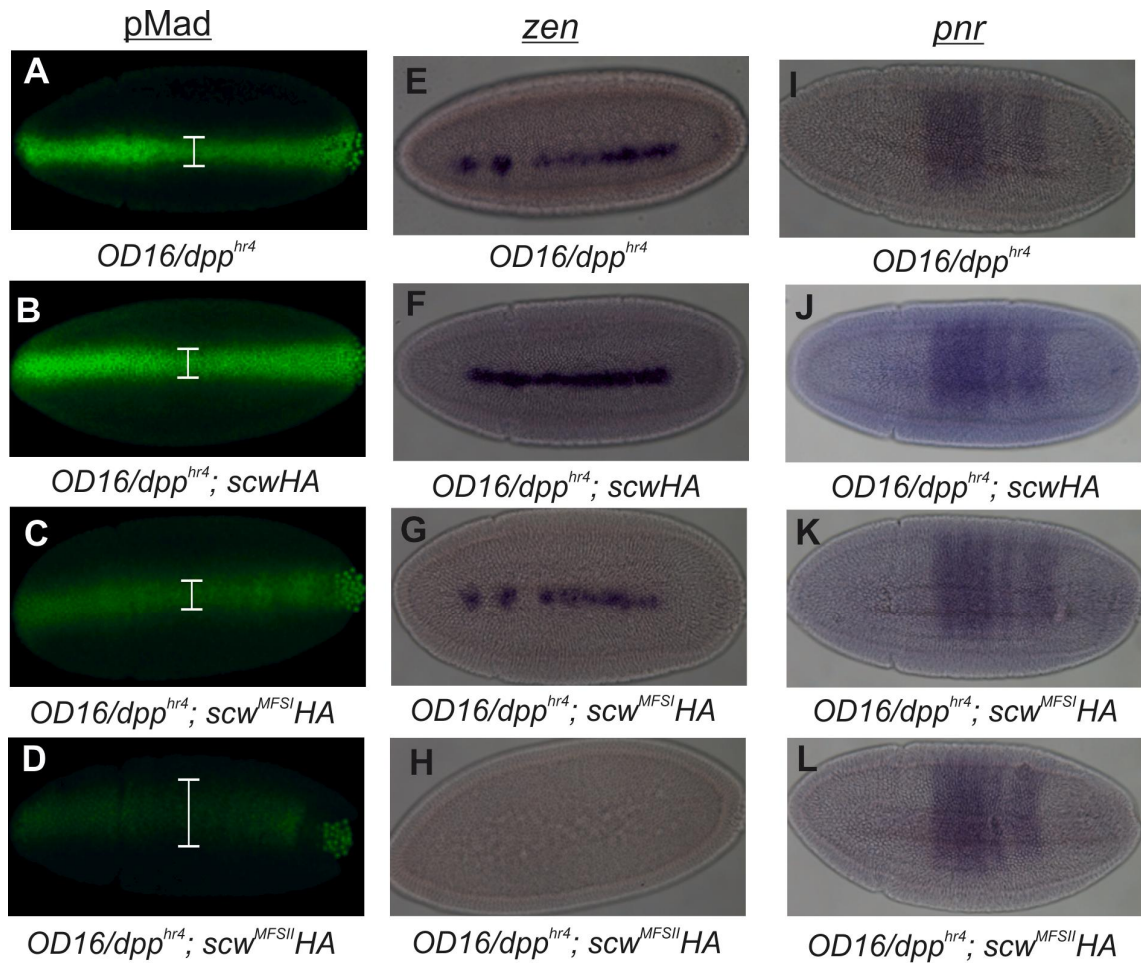
Kuvan 17P taulukossa on esitetty genotyyppien OD16/*Scw*⁵, OD16/*Scw*⁵;*Scw*HA, OD16/*Scw*⁵;*Scw*^{MFSI} ja OD16/*Scw*⁵;*Scw*^{MFSII} elinkykyisyydet, eli se, kuinka paljon kärpäsiä syntyi verrattuna kyseisen risteytyksen oletusarvoon, toisin sanoen, kuinka paljon kärpäsiä syntyi verrattuna siihen, kuinka paljon niitä risteytyskaavion perusteella pitäisi

syntyä. Taulukosta nähdään, että elinkyvyttömyyttä osoittavien karpästen ($Scw^5/OD16$) syntyvyys on oletetusti 0 %. Jos taas kromosomiin 3 on lisätty *Scw*-geeni, on syntyvyys normaali. Sen sijaan, jos kromosomiin 3 lisätyn ylimääräisen *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohta I tai II on mutatoitu, on syntyvyys 0 %. Nämä tulokset tukevat P-Mad-värjäyksestä sekä *in situ* -hybridisaatiosta saatuja tuloksia.

Tämän kokeen perusteella voidaan todeta, että *ScwHA* pystyy pelastamaan muuten elinkyvyttömän genotyypin, mutta Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} eivät. Jos *Scw*:n furiinin tunnistuskohdassa I tai II on mutaatio, näyttäisi signaalinvälitys toimivan kuitenkin osittain Pnr-värjäyksen perusteella. Alkioiden P-Mad-signaali on kuitenkin niin heikko, ettei tarvittavien kohdegeenien transkriptio voi alkaa. Näin ollen alkoiden kehitys häiriintyy eikä elinkykyisiä karpäsiä voi syntyä. Pnr-värjäyksessä tuli myös ilmi, että mutaatio furiinin tunnistuskohdassa II on merkitsevämpi banaanikarpäsen alkionkehityksen kannalta kuin mutaatio furiinin tunnistuskohdassa I. Tämä tukee *in vitro* -kokeissa saatuja tuloksia. Molempien furiinin tunnistuskohtien pilkkominen näyttäisi kuitenkin olevan tärkeää banaanikarpäsen onnistuneen alkionkehityksen kannalta.

Risteytysten 1 kohdalla kokeiltiin myös kromosomiin 3 vain yhden kopion lisäämistä *Scw*-geenistä, mutta tuloksissa ei nähty merkittäviä eroja. Kyseisten tulosten kohdalla *ScwHA* pystyi edelleen pelastamaan elinkyvyttömän genotyypin, mutta Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} eivät.

Risteytyksissä 2 käytettiin vertailukohtena genotyyppiä $OD16/dpp^{hr4}$, missä toinen kopio *Scw*-geenistä on toimimaton ja toinen kopio *Dpp*-geenistä on osittain toimiva. Tällainen osittain toimiva genotyyppi on elinkykyinen, mutta normaaliin verrattua heikompi. Osittain toimivan genotyypin käytön tarkoitus oli herkistää alkion solut muille mutaatiolle, jolloin fenotyypissä tapahtuvat muutokset nähdään selkeämmin, sekä korostaa *Dpp-Scw* -interaktiota. Yhtenä kopiona kromosomiin 3 lisätyn ylimääräisen *Scw*-geenin ($Scw^{WT}=ScwHA$) tulisi oletetusti tuottaa kontrollia ($OD16/dpp^{hr4}$) paremmin toimiva genotyyppi. Jos näin ei tapahtuisi, olisi koeasettelussa jotain vikaa. Kokeen tarkoituksena olikin ensisijaisesti tarkastella, miten kromosomiin 3 liitetty ylimääräinen *Scw*-geeni, johon on tehty pistemutaatio furiinin tunnistuskohtaan I tai II, vaikuttaa osittain toimivaan genotyyppiin. Kuvassa 18 on esitetty risteytysten 2 alkoiden värjäykset sekä elinkykyisyydet.



Kuva 18. Risteytysten 2 tulokset. Eri genotyypin omaavien alkoiden P-Mad-vasta-ainevärykset (A-D), *in situ*-hybridisaatiot kahta eri koetinta käyttäen (E-H ja I-L) sekä elinkykyisyyden määrittäminen (M). Elinkykyisyydet on ilmoitettu prosentteina verraten syntyneiden karpästen määrää kustakin risteytyksestä niiden oletettuun syntyvyyteen.

Kuvan 18A alkio kuvaa osittain toimivan genotyypin omaavan alkion P-Mad-signaalia kudoksessa. P-Mad-signaali on hieman normaalia heikompi, jos verrataan kuvan 17A alkioon. P-Mad-signaali on kuitenkin osittain toimivan genotyypin omaavaan alkioon verrattuna voimakkaampi, jos kromosomiin 3 on lisätty yksi toimiva kopio *Scw*-geenistä (kuva 18B). Sen sijaan, jos kromosomiin 3 lisätyn ylimääräisen *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohta I on mutatoitu, P-Mad-signaali on vertailukohteena käytettyyn alkioon verrattuna heikompi (kuva 18C). P-Mad-signaali on taas hyvin heikko sekä leveä, jos kromosomiin 3 lisätyn ylimääräisen *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohta II on mutatoitu (kuva 18D). P-Mad-signaalien intensiteettejä ei kuitenkaan voida kvantitatiivisesti verrata toisiinsa, sillä värjäyksessä käytettiin signaalinvahvistajaa. Näin ollen intensiteetit eivät ole lineaarisia. Alkioissa nähtävien signaalien vahvuuksista voidaan kuitenkin päätellä, minkä alkion P-Mad-signaali on voimakkaampi kuin toisen.

Tarkasteltaessa *Zen*-geenin ilmenemistä kuvan 18E alkiossa nähdään se voimakkaana. Vielä voimakkaampi se on alkion 18F kohdalla, joka sisältää kromosomissa 3 yhden ylimääräisen kopion *Scw*-geenistä. Jos taas tässä ylimääräisessä *Scw*-geenissä on mutaatio furiinin tunnistuskohdassa I, on *Zen*-värjäys huomattavasti heikompi vertailukohteena käytettyyn alkioon verrattuna (kuva 18G). Jos taas mutaatio on furiinin tunnistuskohdassa II, ei *Zen*-geeniä ilmennetä enää ollenkaan (kuva 18H). *Zen*-värjäysten tulokset tukevat P-Mad-värjäysten tuloksia. *Pnr*-värjäysten kohdalla ei näiden genotyyppien omaavien alkoiden välillä nähdä suurta eroa (kuvat 18I-L). *Pnr*-geeni tarvitseekin vain matalan P-Mad-signaalin ilmentyäkseen, mistä syystä tulos ei ole yllättävä.

Kuvan 18M taulukossa on esitetty genotyyppien OD16/*dpp*^{hr4}, OD16/*dpp*^{hr4};*Scw*HA, OD16/*dpp*^{hr4};*Scw*^{MFSI} ja OD16/*dpp*^{hr4};*Scw*^{MFSII} elinkykyisyydet, eli se, kuinka paljon kärpäsiä syntyi verrattuna kyseisen risteytyksen oletusarvoon, toisin sanoen, kuinka paljon kärpäsiä syntyi verrattuna siihen, kuinka paljon niitä risteytyskaavion perusteella pitäisi syntyä. Taulukosta nähdään, että vertailukohteena käytettyjen, genotyypin OD16/*dpp*^{hr4} omaavien kärpästen syntyvyys on 40 %. Jos taas kromosomiin 3 on lisätty *Scw*-geeni, nousee syntyvyys yli 60 %:iin. Sen sijaan, jos kromosomiin 3 lisätyn ylimääräisen *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohta I on mutatoitu, syntyvyys laskee noin 15 %:iin. Jos mutaatio on taas furiinin tunnistuskohdassa II, on syntyvyys 0 %. Nämä tulokset tukevat alkoiden P-Mad-värjäyksestä sekä *in situ* -hybridisaatiosta saatuja tuloksia.

Saadut tulokset ovat hyvin mielenkiintoisia, sillä näyttäisi siltä, että jos *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohdassa I tai II on mutaatio, vaikuttaa se negatiivisesti Dpp-signalointiin. Jos toinen kopio *Scw*-geenistä on toimiva ja toinen ei, on tämän genotyypin omaavien kärpästen syntyvyys hyvä. Jos tähän kombinaatioon lisätään ylimääräinen *Scw*-geeni, jonka furiinin tunnistuskohdassa I tai II on mutaatio, vaikuttaa se negatiivisesti syntyvyyteen. Jos siis *Scw*-geenin toisen kopion furiinin tunnistuskohdassa I tai II on mutaatio, on se alkion kehityksen kannalta pahempi kuin se, että toinen kopio *Scw*-geenistä on täysin toimimaton eli sitä ei tuoteta ollenkaan. Kuvan 18D alkiolla on mutaatio *Scw*-geenin furiinin tunnistuskohdassa II. Kuvassa nähdään hyvin leveä P-Mad-signaali. Tämä tukee hypoteesia, joka tehtiin tutkittaessa *Scw*-geenin prosessointia *in vitro*. Jos furiinin tunnistuskohda II on mutatoitu, johtaa se *Scw*-proteiinin prosessoinnin hidastumiseen. Dpp-*Scw*-heterodimeeri muodostuu jo proteiinien ollessa esias-temuodossa, joten *Scw*:n hidastunut prosessointi pidättää myös Dpp:n eritystä. Tämä selittäisi sen, miksi toimimaton *Scw*-geeni on vähemmän vahingollinen alkion kehityksen kannalta kuin *Scw*-geeni, jossa on mutaatio furiinin tunnistuskohdassa II. Jos *Scw*-proteiinia ei tuoteta, muodostaa Dpp automaattisesti homodimeerejä, jotka aikaansaa-vat matalan P-Mad-signaalin soluissa. Jos taas *Scw*-proteiinin prosessoinnissa on on-gelmia, sitoo se osan Dpp:stä solun sisään. *Scw*:n hitaan prosessoinnin takia heterodi-meerien erityis on siis vähäistä ja ne, jotka eritetään, eivät yksinkertaisesti ehdi kulkea alkion selänpuoleiselle keskiviivalle asti. Tämä selittäisi kuvassa 18D nähtävän leveän P-Mad-signaalin.

Scw:n prosessoinnin hidastuminen furiinin tunnistuskohdan II ollessa mutatoitu vaikut-taa vakuuttavalta hypoteesilta. Kuitenkin heterodimeerin muodostusta tutkittaessa vas-ta-ainesäostuksella tuli ilmi, että Dpp:n määrä oli melko yhtäläinen mutaatiosta riippu-matta (kuva 15). Näin ollen mutaatio *Scw*:n furiinin tunnistuskohdassa II vaikuttaisi ensisijaisesti *Scw*-homodimeerikonsentraatioon eikä heterodimeerien muodostukseen. Havainto ei kuitenkaan poissulje prosessoinnin hidastumis -hypoteesia, sillä olosuhteet hyönteissoluissa eivät täysin vastaa todellista tilannetta banaanikärpäsessä. Lisäksi hyönteissoluja inkuboitii viisi päivää, kun Dpp:n leviäminen banaanikärpäsen alkion kudoksessa kestää todellisuudessa vain noin puoli tuntia. Tällöin *Scw*-proteiinin hidas-tunut prosessointi voi olla hyvin kohtalokasta, vaikkei se hyönteissoluilla tehdyissä ko-keissa siltä näytäkään.

Vasta-ainesaostuksessa huomattiin myös, että Scw:n furiinin tunnistuskohdan II ollessa mutatoitu eritetään solusta kaksi prodomeenin osaa. Nämä myös interaktioivat jollain tavalla Dpp:n tai Scw:n kypsän ligandin kanssa, sillä ne sitoutuvat anti-flag-vasta-aineella käsiteltyihin helmiin, vaikka ne eivät sisältäneet Flag-epitooppia. Herää siis kysymys: onko mahdollista, että Dpp-homodimeerit olisivat jonkinlaisessa interaktiossa Scw:n furiinin tunnistuskohdan II mutatoimisen seurauksena muodostuvan kompleksin kanssa? Tämä niin sanotusti kasvattaisi vasta-ainesaostuskuvassa olevan Dpp-vyöhykkeen intensiteettiä. Näiden tulosten perusteella ei voida varmasti todistaa, että Scw:n prosessointi hidastuu, jos furiinin tunnistuskohda II on mutatoitu. Hypoteesi vaikuttaa kuitenkin lupaavalta ja sen varmentamiseksi tulisi tehdä lisäkokeita.

Mutaatio furiinin tunnistuskohdassa I aiheuttaa *in vitro* -kokeiden perusteella suurempikokoisen ligandin erityksen soluista. Ligandin erityks oli myös vähäisempää, mikä saattaa johtua siitä, että solu ohjaa osan tästä "väärän kokoisesta" ligandista hajotukseen. Jos näin on, myös Dpp ohjataan hajotukseen. Tämä taas selittäisi sen, miksi mutaatio Scw-geenin furiinin tunnistuskohdassa I on pahempi alkion kehityksen kannalta kuin se, että Scw-geeni on täysin toimimaton. On myös mahdollista, että suurempikokoinen ligandi vaikuttaa negatiivisesti interaktioihin muiden molekyylien kanssa kuten solupinnan reseptoreiden tai Dpp-Scw-heterodimeeriin sitoutuvien proteiinien kanssa. Näiden tulosten perusteella ei kuitenkaan voida antaa tarkkaa selitystä sille, miksi mutaatio furiinin tunnistuskohdassa I vaikuttaa negatiivisesti Dpp-signalointiin. Kuitenkin Scw:n pilkkomiskohdat I ja II näyttäisivät olevan hyvin merkitseviä Dpp-signaloinnin kannalta ja näin ollen Scw-proteiinin pilkkominen tunnistuskohdista I ja II on välttämätön banaanikärpäsen onnistuneelle alkionkehitykselle.

9 Yhteenveto

Tulokset osoittivat, että Scw-proteiinin esiaste on pilkottava kahdesta furiinin tunnistuskohdasta, jotta se olisi toimiva: furiinin tunnistuskohdasta I (FSI), joka sijaitsee prodomeenin ja ligandiosan välissä, sekä furiinin tunnistuskohdasta II (FSII), joka sijaitsee prodomeenialueella. Mutaatio furiinin tunnistuskohdassa I johti suurempikokoisen ligandin tuottoon ja eritykseen S2-soluissa, mutta eritetyjen ligandien määrä oli normaalia vähäisempää. Mutaatio furiinin tunnistuskohdassa II johti taas merkittävästi vähäisempään ligandin eritykseen. Scw-rekombinanttiproteiinien pilkkoutumistuotteet Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} pystyivät kuitenkin muodostamaan heterodomeerin Dpp-proteiinin kanssa sekä sitoutumaan solunpinnan reseptoreihin käynnistäen solunsisäisen viestiketjun, minkä seurauksena solunsisäinen transkriptiotekijä siirtyy tumaan, missä se säätelee kohdegeenien transkriptiota.

Tutkimukset Scw-rekombinanttiproteiinien funktionaalisuudesta *in vivo* osoittivat, että Scw^{WT} pystyy pelastamaan elinkyvyttömyyttä osoittavan, toimimattoman Scw-geenin omaavan genotyypin alkionkehityksen, mutta Scw-rekombinanttiproteiinit Scw^{MFSI} ja Scw^{MFSII} eivät. Lisäksi mutaatio Scw-proteiinin furiinin tunnistuskohdassa I tai II vaikutti negatiivisesti Dpp-signaalointiin. Furiinin tunnistuskohdan I ollessa mutatoitu oli P-Mad-signaali kudoksessa normaalia heikompi. Furiinin tunnistuskohdan II ollessa mutatoitu, oli P-Mad-signaali kudoksessa hyvin heikko sekä normaalia huomattavasti leveämpi. Tulokset osoittivat myös, että mutaatio Scw-geenin furiinin tunnistuskohdassa I tai II on alkion kehityksen kannalta pahempi kuin se, että Scw-geeni on täysin toimimaton, eli sitä ei tuoteta ollenkaan. Tämä johtuu siitä, että Dpp-Scw-heterodimeeri muodostuu jo proteiinien ollessa esiastemuodossa. Nähtävästi Scw:n häiriintynyt prosessointi vaikuttaa negatiivisesti Dpp-signaalointiin joko proteiinien erityksen tasolla tai solunulkoi- sessa tilassa estämällä proteiinien normaalin kulkeutumisen kudoksessa. Jos taas Scw-proteiinia ei tuoteta ollenkaan, muodostaa Dpp automaattisesti homodimeerejä, jotka aikaansaavat matalan P-Mad-signaalin soluissa.

Scw-proteiinin pilkkominen furiinin tunnistuskohdista I ja II vaikutti siis merkittävästi Dpp-signaalointiin ja näin ollen morfogeneettisen gradientin muodostukseen ba-

naanikärpäsen alkiossa. Näiden tulosten perusteella voidaan sanoa, että Scw-proteiinin esiasteen prosessointi on välttämätön banaanikärpäsen oikeanlaiselle kehitykselle.

Scw-proteiinilla on tehnyt kokeita myös Fritsch kollegoineen. Heidän hyönteissoluilla tehdyt kokeet Scw:n pilkkomiskohtien vaikutuksesta sen prosessointiin tukivat tässä työssä esitettyjä tuloksia. He tutkivat myös kärpästen elinkykyisyyttä, kunkin furiinin tunnistuskohdan ollessa mutatoitu. Tulokset osoittivat, että furiinin tunnistuskohdan I tai II ollessa mutatoitu ei elinkykyisiä kärpäsiä syntynyt, kun taas furiinin tunnistuskohdan III ollessa mutatoitu oli kärpästen syntyvyys hyvä. (Fritsch ym., 2012) Nämä tulokset tukevat tässä työssä saatuja tuloksia. Lisäksi furiinin tunnistuskohdalla III, mikä päätettiin jättää tutkimuksen ulkopuolelle tässä työssä jo ensimmäisten *in vitro* -kokeiden jälkeen, ei tosiaan näytä olevan merkittävää vaikutusta Scw-proteiinin prosessointiin ja funktionaalisuuteen, niin kuin epäiltiin.

Tämän työn tulokset ovat tärkeitä, sillä Scw-proteiinin prosessoinnin tärkeydestä banaanikärpäsen alkionkehityksessä tiedetään vielä vähän. Näin kattavia tutkimuksia Scw-proteiinin molekyylimekanismeista ja prosessoinnin merkityksestä Dpp-signaaloinnissa ole vielä esitetty. BMP-perheen proteiinit ovat myös hyvin konservoituja eri eläinlajeissa, mikä mahdollistaa tulosten soveltamisen jopa ihmisiin. Työn tulokset on esitetty käsikirjoituksessa, joka lähetetään julkaistavaksi tieteelliseen lehteen.

Lähteet

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., ym. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Akiyama, T., Marqués, G. ja Wharton, K.A. (2012). A Large Bioactive BMP Ligand with Distinct Signaling Properties Is Produced by Alternative Proconvertase Processing. *Sci. Signal.* 5, ra28.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ja Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4.painos. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Arora, K., Levine, M.S. ja O'Connor, M.B. (1994). The *screw* gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF- β family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 8, 2588-2601.

Ashburner, M., Golic, K.G. ja Hawley, R.S. (2005). *Drosophila*: a laboratory handbook. 2.painos. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Baines, D. (2001). Analysis of purity. Teoksesta Roe, S. Protein Purification Techniques. 2.painos. New York: Oxford University Press Inc. 27-49.

Bier, E. (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 6, 9-23.

Chen, Y. ja Struhl, G. (1996). Dual Roles for Patched in Sequestering and Transducing Hedgehog. *Cell* 87, 553-563.

Constam, D.B. ja Robertson, E.J. (1999). Regulation of Bone Morphogenetic Protein Activity by Pro Domains and Proprotein Convertases. *J. Cell. Biol.* 144, 139-149.

Creemers, J.W.M., Kormelink, P.J.G., Roebroek, A.J.M., Nakayama, K. ja Van de Ven, W.J.M. (1993). Proprotein activity and cleavage site selectivity of the Kex2-like endoprotease PACE4. *FEBS Lett.* 366, 65-69.

Crick, F.H. (1970). Diffusion in Embryogenesis. *Nature* 225, 420-422.

Dubois, L., Lecourtois, M., Alexandre, C., Hirst, E. ja Vincent, J.-P. (2001). Regulated Endocytic Routing Modulates Wingless Signaling in *Drosophila* Embryos. *Cell* 105, 613-624.

Eldar, A., Rosin, D., Shilo, B.-Z. ja Barkai, N. (2003). Self-Enhanced Ligand Degradation Underlies Robustness of Morphogen Gradients. *Dev. Cell* 5, 635-646.

Entchev, E.V., Schwabedissen, A. ja González-Gaitán, M. (2000). Gradient Formation of the TGF- β Homolog Dpp. *Cell* 103, 981-991.

Ferguson, E.L. ja Anderson, K.V. (1992). Localized enhancement and repression of the activity of the TGF-beta family member, decapentaplegic, is necessary for dorsal-ventral pattern formation in the *Drosophila* embryo. *Development* 114, 583-597.

FlyMove. (2012) <http://flymove.uni-muenster.de/>. Luettu 26.01.2012.

Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J.W., Emery, J. ja Bier, E. (1994). Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by short gastrulation gene. *Genes Dev.* 8, 2602-2616.

Fritsch, C., Sawala, A., Harris, R., Maartens, A., Sutcliffe, C., Ashe, H.L. ja Ray, R.P. (2012). Different Requirements for Proteolytic Processing of Bone Morphogenetic Protein 5/6/7/8 Ligands in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 287(8), 5942-5953.

Greco, V., Hannus, M. ja Eaton, S. (2001). Argosomes: A Potential Vehicle for the Spread of Morphogens through Epithelia. *Cell* 106, 633-645.

Gurdon, J.B, Harper, P., Mitchell, A. ja Lemaire, P. (1994). Activin signalling and response to a morphogen gradient. *Nature* 371, 487-492.

Heino, J. ja Vuento, M. (2010). Biokemian ja solubiologian perusteet. 2.painos. Helsinki: WSOYpro Oy.

Hoch, M. ja Pankratz, M.J. (1996). Control of Gut Development by Fork Head and Cell Signaling Molecules in *Drosophila*. *Mech Dev* 58, 3-14.

Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Genes Dev.* 6, 432-438.

Ingham, P.W. ja McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059-3087.

Jackson, S.M., Nakato, H., Sugiura, M., Jannuzi, A., Oakes, R., Kaluza, V., Golden, C. ja Selleck, S.B. (1997). dally, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF- β -related morphogen, Dpp. *Development* 124, 4113-4120.

Järviluoma, A. (2011). Eläinsolutekniikka. Luentomateriaali. Metropolia Ammattikorkeakoulu.

Kirkpatrick, R.B. ja Shatzman, A. (1999). *Drosophila* S2 system for heterologous gene expression. Teoksesta Fernandez, J.M. ja Hoeffler, J.P. Gene expression systems. San Diego: Academic Press. 289-330

Künnapuu-Vulli, J., Tiisanen, N., Löytynoja, A., Matsuda, S., Achuta, S., Aro, K. ja Shimmi, O. (2012). Cleavage of *Drosophila* Screw prodomain is crucial for dynamic spatial Dpp morphogen gradient during dorsal-ventral patterning in the early embryo.

Künnapu, J. ja Shimmi, O. (2010). Evolutional imprints on the sequences of BMP2/4/DPP type proteins. *Fly 4/1*, 21-23.

Künnapu, J., Björkgren, I. ja Shimmi, O. (2009). The *Drosophila* DPP signal is produced by cleavage of its proprotein at evolutionary diversified furin-recognition sites. *PNAS lett.* 106, 8501-8506.

Lander, A.D., Nie, Q. ja Wan, F.Y.M. (2002). Do Morphogen Gradients Arise by Diffusion? *Dev. Cell* 2, 785-796.

Lecuit, T. ja Cohen, S.M (1998). Dpp reseptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* 125, 4901-4907.

Lee, J.J., von Kessler, D.P., Parks, S. ja Beachy, P.A. (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog. *Cell* 71, 33-50.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. ja Matsudaira, P. (2008). Molecular Cell Biology. 6.painos. New York: W. H. Freeman and Company.

Marques, G., Musacchio, M., Shimell, M.J., Wunnenberg-Stapleton, K., Cho, K.W. ja O'Connor, M.B. (1997). Production of a DPP activity gradient in early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* 91, 417-426.

Mason, E.D., Konrad, K.D., Webb, C.D. ja Marsh, J.L. (1994). Dorsal midline fate in *Drosophila* embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor. *Genes Dev.* 8, 1489-1501.

Massagué, J., Seoane, J. ja Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783-2810.

Massagué, J., Blain, S.W. ja Lo, R.S. (2000). TGF β Signaling in Growth Control, Cancer and Heritable Disorders. *Cell* 103, 295-309.

Molecular Station. Immunoprecipitation. <http://www.molecularstation.com/>. Luettu 23.02.2012.

Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R. ja Thomas, G. (1992). Human Furin Is a Calcium-dependent Serine Endoprotease That Recognizes the Sequence Arg-X-X-Arg and Efficiently Cleaves Anthrax Toxin Protective Antigen. *J. Biol. Chem.* 267, 16396-16402.

Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. ja Basler, K. (1996). Direct and Long-Range Action of a DPP Morphogen Gradient. *Cell* 85, 357-368.

Nüsslein-Voldhard, C., Wieschaus, E. ja Kluding, H. (1984). Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zytotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193, 267-282.

O'Connell, M.P., Billings, P.C., Fiori J.L., Deirmengian, G., Roach, H.I., Shore, E.M. ja Kaplan, F.S. (2007). HSPG Modulation of BMP Signaling in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 102, 1493-1503.

Padgett, R.W., Wozney, J.M. ja Gelbart, W.M. (1993). Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2905-2909.

Panganiban, G.E.F., Rashka, K.E., Neitzel, M.D. ja Hoffmann, M. (1990). Biochemical Characterization of the *Drosophila dpp* Protein, a Member of the Transforming Growth Factor β Family of Growth Factors. *Molecular and Cellular Biology* 10, 2669-2677.

Portin, Petter. (2005). 100 vuotta banaanikärpästutkimusta. *Tieteessä tapahtuu* 5/2005.

Rafferty, L.A. ja Sutherland, D.J. (1999). TGF- β Family Signal Transduction in *Drosophila* Development: From *Mad* to Smads. *Dev Biol.* 210, 251-268.

Ramírez-Weber, F.-A. ja Kornberg, T.B. (1999). Cytosomes: Cellular Processes that Project to the Principal Signaling Center in *Drosophila* Imaginal Discs. *Cell* 97, 599-607.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. ja Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50, 649-657.

Roe, S.D. (2001). Purification strategy. Teoksesta Roe, S. Protein Purification Techniques. 2.painos. New York: Oxford University Press Inc. 1-10.

Roebroek, A.J.M., Creemers, J.W.M., Pauli, I.G.L., Kurzik-Dumke, U., Rentrop, M., Gateff, E.A.F., Leunissen, J.A.M. ja Van de Ven, W.J.M. (1992). Cloning and Functional Expression of DFurin2, a Subtilisin-like Proprotein Processing Enzyme of *Drosophila melanogaster* with Multiple Repeats of a Cysteine Motif. *J. Biol. Chem.* 267, 17208-17215.

Roebroek, A.J.M., Pauli, I.G.L., Zhang, Y. ja Van de Ven, W.J.M. (1991). cDNA sequence of a *Drosophila melanogaster* gene, *Dfur1*, encoding a protein structurally related to the subtilisin-like proprotein processing enzyme furin. *FEBS Lett.* 289, 133-137.

Ross, J.J., Shimmi, O., Vilmos, P., Petryk, A., Kim, H., Gaudenz, K., Hermanson, S., Ekker, S.C., O'Connor, M.B. ja Marsh, J.L. (2001). Twisted gastrulation is conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* 410, 479-483.

Rudolf, R., Böhm, G., Lilie, H. ja Jaenicke, R. (1997). Folding proteins. Teoksesta Creighton, T.E. Protein Function, a practical approach. New York: Oxford University Press Inc. 57-99.

Sariola, H., Frilander, M., Heino, T., Jernvall, J., Partanen, J., Sainio, K., Salminen, M. ja Thesleff, I. (2003). *Solusta yksilöksi* Kehitysbiologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27, 353-365.

Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T. ja Springer T.A. (2011). Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 474, 343-349.

Shimmi, O. (2012) Suullinen tiedonanto. 27.2.2012.

Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H. ja O'Connor, M.B. (2005). Facilitated Transport of a Dpp/Scw Heterodimer by Sog/Tsg Leads to Robust Patterning of the *Drosophila* Blastoderm Embryo. *Cell* 120, 873-886.

Shimmi, O. ja O'Connor, M.B. (2003). Physical properties of Tld, Sog, Tsg, and Dpp protein interactions are predicted to help create a sharp boundary in Bmp signals during dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Development* 130, 4673-4682.

Siekhaus, D.E. ja Fuller, R.S. (1999). A Role for *amontillado*, the *Drosophila* Holog of the Neuropeptide Precursor Processing Protease PC2, in Triggering Hatching Behavior. *J. Neurosci.* 19, 6942-6954.

Snustad, D.P. ja Simmons, M.J. (2003). Principles of Genetics. 3.painos. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Soutar, A.K. ja Wade, D.P. (1997). Ligand blotting. Teoksesta Creighton, T.E. Protein Function, a practical approach. New York: Oxford University Press Inc. 131-154.

Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S. ja Chan, S.J. (1992). The New Enzymology of Precursor Processing Endoproteases. *J. Biol. Chem.* 276, 23435-23438.

Sullivan, W., Ahsburner, M. ja Hawley, R.S. (2000). *Drosophila* Protocols. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tabata, T. (2001). Genetics of Morphogen Gradients. *Nat. Rev. Genet.* 2, 620-630.

Tabata, T. ja Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* 131, 703-712.

Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.

Vincent, J.-P. ja Magee, T. (2002). Argosomes: membrane fragments on the run. *TRENDS Cell. Biol.* 12/2, 57-60.

von Amerongen, R. ja Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136, 3205-3214.

Walker, J.M. (2001). Electrophoretic techniques. Teoksesta Wilson, K. ja Walker, J. Principles and techniques of practical biochemistry. 5.painos. New York: Cambridge University Press. 580-617.

Xiao, Y.-T., Xiang, L.-X. ja Shao, J.-Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 550-553.

Yamamoto, Y. ja Oelgeschläger, M. (2004). Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development. *Naturwissenschaften* 91, 519-534.

Yu, K., Sturtevant, M.A., Biehs, B., Francois, V., Padgett, R.W., Blackman, R.K. ja Bier, E. (1996). The Drosophila Decapentaplegic and Short Gastrulation Genes Function Antagonistically during Adult Wing Vein Development. *Development* 122, 4033-4044.

Zhu, A.J. ja Scott, M.P (2004). Incredible journey: how do developmental signals travel through tissue? *Genes Dev.* 18, 2985-2997.

Liuosten koostumukset

S2-solujen M3-kasvatusalusta

Shields and Sang M3 Insect Medium (Sigma-Aldrich)

10 % Insect Medium Supplement 10X (Sigma Aldrich)

1 % Penisilliini (500 U/ml) + Streptomysiini (500 µg/ml)

Lyysayspuskuri

50 mM Tris-Hcl pH 7.5

150 mM NaCl

1 % Triton X-100

4 X näytepuskuri

8 % SDS

20 % β-merkaptoetanol

0,01 % bromifenolisininen

50 % glyseroli

0,2 M Tris-Hcl, pH 6.8

TBS

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

150 mM NaCl

TBST

TBS

0,05 % Tween-20

PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

PBT

PBS

1 % Albumin Bovine Serum (Sigma-Aldrich)

0,05 % Triton X-100

TS-puskuri

0,4 % NaCl

0,03 % Triton X-100

Geelien koostumukset

1a) 12,5 % erotusgeelin koostumus. 1b) 12,5 % konsentroitigeelin koostumus. 2a) 10 % erotusgeelin koostumus. 2b) 10 % konsentroitigeelin koostumus. (AA/BIS = akryyliamidi/metyleenibisakryyliamidi, SDS = natriumdodekyylisulfaatti, TEMED = N,N,N,N-tetrametyylietyleenidiamiini, APS = ammoniumperoksidisulfaatti)

| | | | | | |
|-----|----------------------|--------|-----|----------------------|---------|
| 1a) | Reagenssi | Määrä | 1b) | Reagenssi | Määrä |
| | 30:0,8 AA/BIS | 3,1 ml | | 30:0,8 AA/BIS | 660 µl |
| | 3 M Tris-HCl, pH 8,8 | 0,9 ml | | 3 M Tris-HCl, pH 6,8 | 210 µl |
| | 20 % SDS | 38 µl | | 20 % SDS | 25 µl |
| | H ₂ O | 3,4 ml | | H ₂ O | 4,1 ml |
| | TEMED | 5 µl | | TEMED | 7,5 µl |
| | 10 % APS | 38 µl | | 10 % APS | 37,5 µl |
| 2a) | Reagenssi | Määrä | 2b) | Reagenssi | Määrä |
| | 30:0,8 AA/BIS | 2,5 ml | | 30:0,8 AA/BIS | 660 µl |
| | 3 M Tris-HCl, pH 8,8 | 0,9 ml | | 3 M Tris-HCl, pH 6,8 | 210 µl |
| | 20 % SDS | 38 µl | | 20 % SDS | 25 µl |
| | H ₂ O | 4 ml | | H ₂ O | 4,1 ml |
| | TEMED | 5 µl | | TEMED | 7,5 µl |
| | 10 % APS | 38 µl | | 10 % APS | 37,5 µl |

In situ -hybridisaatio

Käytä alkioita, jotka on säilötty etanoliin.

1. Tee 5 min pesut ilman rotaatiota:
 - 50/50 etanoli/PBT
 - 30/70 etanoli/PBT
 - 2 kertaa PBT:llä
2. Post-fiksaatio: inkuboi alkioita PBT + 5 % formaldehydi -liuoksessa 25 min, käytä rotaatiota
3. Tee 5 kertaa 5 min pesut PBT-puskurilla ilman rotaatiota
4. Inkuboi alkioita 5 min PBT + 4 µg/ml proteinaasi K -liuoksessa
5. Laimenna proteinaasi K nopeasti huuhtelemalla alkioita kahdesti PBT-puskurilla
6. Tee 4 kertaa 2 min pesut PBT-puskurilla ilman rotaatiota
7. Post-fiksaatio: inkuboi alkioita PBT + 5 % formaldehydi -liuoksessa 25 min, käytä rotaatiota
8. Tee 5 kertaa 5 min pesut PBT-puskurilla ilman rotaatiota
9. Inkuboi alkioita 10 min 50/50 alkioden hybridisaatiopuskuri/PBT
10. Huuhtelee 2 kertaa alkioden hybridisaatiopuskurilla
11. Inkuboi alkioita 1 tunti 55 °C:ssa
12. Valmista koetin: lisää 2-5 µl RNA:ta 25 µl:aan alkioden hybridisaatiopuskuria, inkuboi 95 °C:ssa 3 min ja siirrä välittömästi jälle
13. Poista alkioden hybridisaatiopuskuri alkioden päältä ja lisää koetin-liuos, inkuboi alkioita 20-24 tuntia 55 °C:ssa
14. Poista koetin liuos alkioden päältä ja huuhtelee alkioita alkioden hybridisaatiopuskurilla
15. Pesut: tee yhteensä 8 pesua alkioden hybridisaatiopuskurilla, inkuboi aina 45-60 min 55 °C:ssa ja kerran yön yli
16. Tee 20 min pesut ilman rotaatiota:

- 80/20 alkioiden hybridisaatiopuskuri/PBT
- 60/40 alkioiden hybridisaatiopuskuri/PBT
- 40/60 alkioiden hybridisaatiopuskuri/PBT
- 20/80 alkioiden hybridisaatiopuskuri/PBT

17. Tee 4 kertaa 10 min pesut PBT-puskurilla, käytä rotaatiota
18. Inkuboi alkiota PBT + anty-Digoxigenic-AP vasta-ainelaimennoksessa (1:3000) 2 tuntia, käytä rotaatiota
19. Tee 4 kertaa 10 min pesut PBT-puskurilla, käytä rotaatiota
20. Valmista värjäyspuskuri (värjäyspuskuria tulee valmistaa juuri ennen käyttöä)
21. Huuhtelee alkiot värjäyspuskurilla kertaalleen
22. Tee 2 kertaa 5 min pesut värjäyspuskurilla
23. Valmista värinkehityspuskuri: lisää 1 ml:aan värjäyspuskuria 7 µl NBT:tä (50 mg/ml) + 3,5 µl BCIP:tä (50 mg/ml)
24. Lisää 500 µl värinkehityspuskuria alkioiden päälle ja inkuboi pimeässä
25. Seuraa värinkehitystä ja lopeta sopivalla hetkellä huuhtelemalla alkiota 4 kertaa PBT-puskurilla.
26. Säilö alkiot 80 % glyserolissa +4 °C:ssa

Alkioiden hybridisaatiopuskuri

- 50 % formamidi
- 5 X SSC (750 mM NaCl, 75 mM natriumsitraatti)
- 50 µg/ml hepariini
- 0,1 % Tween-20
- lohen sperman DNA (Sigma-Aldrich)
- dH₂O

Värjäyspuskuri

- 100 mM NaCl
- 50 mM MgCl₂
- 100 mM Tris-Hcl, pH 9.5
- 0,1 % Tween-20