Tampereen yliopisto

Frans Ek

FÖRSTERIN RESONANSSI-ENERGIANSIIRRON KÄYTTÖ TUMAN LINC-KOMPLEKSIIN KOHDISTUVIEN VOIMIEN TUTKIMISESSA

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta
Kandidaatintutkielma
Heinäkuu 2021

TIIVISTELMÄ

Frans Ek: Försterin resonanssienergiansiirron käyttö tuman LINC-kompleksiin kohdistuvien voimien tutkimisessa
Kandidaatintutkielma
Tampereen yliopisto
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan kandidaattiohjelma
Heinäkuu 2021

Biokemiallisten signaalien ohella myös mekaaniset signaalit aiheuttavat vasteita soluissa. Prosessia, jossa ympäristön mekaaninen signaali saa aikaan solussa vasteen, kutsutaan mekanotransduktioksi, ja sen tutkimiseen on erikoistunut mekanobiologian ala.

Tuman tiedetään olevan mekanosensitiivinen soluelin, joka havaitsee mekaanisia signaaleja kuten fyysisiä voimia. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia tapausta, jossa solun aktiinitukirangasta kantautuvat fyysiset voimat välittyvät tumakotelolla sijaitsevan LINC-kompleksin kautta tumaan. Tavoitteena oli selvittää, miten nämä voimat reagoivat epiteelisolukon tiheyden kasvuun.

Tutkimuksessa käytettiin apuna nesprin-TS -nimistä molekulaarista voimasensoria, jonka toiminta perustuu Försterin resonanssienergiansiirtoon. Sensorissa kaksi FRET:iin kykenevää fluoresoivaa molekyyliä on linkitetty toisiinsa elastisella peptidillä. Kun sensori venyy siihen kohdistuvien voimien vaikutuksesta, FRET:n tehokkuus laskee. Jousi mahdollistaa sensorin palaamisen lepopituuteensa ja FRET:n palautumisen. Tutkimuksessa sensori oli asetettu osaksi mininespriini-2G:tä, joka korvaa normaalisti LINC-kompleksissa esiintyvää nespriini-2G:tä. Tämän avulla saatiin havainnoitua suoraan aktiinitukirangasta LINC-kompleksiin välittyviä voimia.

Tutkimuksessa havaittiin 3- ja 5-päiväisiä epiteelisoluja tutkimalla, että epiteelisolukon kasvaessa tiiviimmäksi solujen tumiin kohdistuvat voimat kasvavat. Voimien kasvun esitetään johtuvan epiteelin maturaatiossa ja mesenkyymi-epiteelitransitiossa tapahtuvista radikaaleista aktiinitukirangan muutoksista. Tutkimuksessa huomattiin myös, että mitattaessa FRET:iä on mittausalueen maskaus kohdistettava nimenomaan tumakoteloon luotettavimman tuloksen saamiseksi.

Tutkimuksessa selvitettiin myös solujen aktiinipolymerisaatiota inhiboivan sytokalasiini D -myrkyn vaikutusta tumaan kohdistuviin voimiin. Tulosten pohjalta 3-päiväisten solujen tumiin kohdistuvat voimat kasvavat myrkyn vaikutuksesta, mutta 5-päiväisiin soluihin se ei vaikuta. Tämän esitetään johtuvan siitä, että 3-päiväiset solut kykenevät vielä liikkumaan, jolloin niiden aktiinitukiranka on dynaaminen, kun taas 5-päiväiset solut ovat polarisoituneet osaksi epiteeliä, eivätkä tarvitse enää dynaamista aktiinitukirankaa, johon sytokalasiini D vaikuttaa.

Käytetyn voimasensorin kontrollisensori nesprin-HL ei tuottanut odotettuja tuloksia, vaan viittasi sensoriin kohdistuvan hyvin suuria voimia, mikä ei ole mahdollista, sillä sensorin toinen pää on katkaistu. Kontrollisensorin epäillään mutatoituneen, ja kontrollin puutteen vuoksi tutkimuksen tuloksia ei voida pitää täysin luotettavina. Nesprin-TS:n tulokset ovat kuitenkin järkeviä, joten itse sensorin voidaan olettaa toimivan halutunlaisesti. Kontrollilinja tulisi transfektoida uudelleen, ja suorittaa uudet kontrollimittaukset tulosten varmentamiseksi.

Tutkimuksen tulosten pohjalta esitetään, että epiteelisolukon tiheyden kasvu johtaa aktiinitukirangasta LINC-kompleksiin välittyvien voimien kasvuun. Seuraavana vaiheena olisi tutkia samojen voimien vaikutusta nespriini-1:een, sekä välikokoisista säikeistä nespriini-3:een ja mikrotubuluksista nespriini-4:ään kohdistuvien voimien muutoksia. Näin saataisiin parempi kuva siitä, miten tumaan kohdistuu voimia epiteelisolukon tiivistyessä.

Avainsanat: aktiinitukiranka, epiteeli, Försterin resonanssienergiansiirto, LINC-kompleksi, mekanotransduktio, nespriini, tuma.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

ALKUSANAT

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopistossa, lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunnassa, Cellular Biophysics -tutkimusryhmässä. Haluan kiittää ryhmän johtaja dosentti Teemu Ihalaista tästä mielettömästä mahdollisuudesta päästä mukaan tekemään tieteellistä tutkimusta, sekä ohjauksesta tämän kandidaatintutkielman ja yleisesti sen ympärille sijoittuvan aihealueen parissa. Lisäksi haluan esittää kiitokseni koko tutkimusryhmälle äärimmäisen mukavan ja innostavan työympäristön luomisesta, sekä kaikille läheisilleni, jotka auttoivat minua moninaisilla tavoilla tämän tutkielman valmiiksi saattamisessa.

Tampereella, 28.7.2021

Frans Ek

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO 4
1.1 Tumakotelo ja LINC-kompleksi 4
1.2 Försterin resonanssienergiansiirto eli FRET 6
1.3 Nesprin-TS 8
1.4 MDCK II -solut 9
1.5 Tutkimuksen tarkoitus 10
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT 11
2.1 Soluviljelymenetelmät ja näytteiden valmistus 11
2.2 Näytteiden kuvaaminen 11
2.3 Sytokalasiini D -käsittely 11
2.4 FRET-arvojen laskeminen 12
2.5 Tilastolliset menetelmät 13
3. TULOSTEN TARKASTELU 15
3.1 Epäluotettavat tulokset 17
3.2 Maskaustyylin vaikutus 19
3.3 Eri sensorien vertailu, TS ja HL 21
3.4 3- ja 5-päiväiset voimasensorisolut 23
3.5 Sytokalasiini D:n vaikutus 23
3.6 Johtopäätökset 25
4. YHTEENVETO 30
LÄHTEET 32

1. JOHDANTO

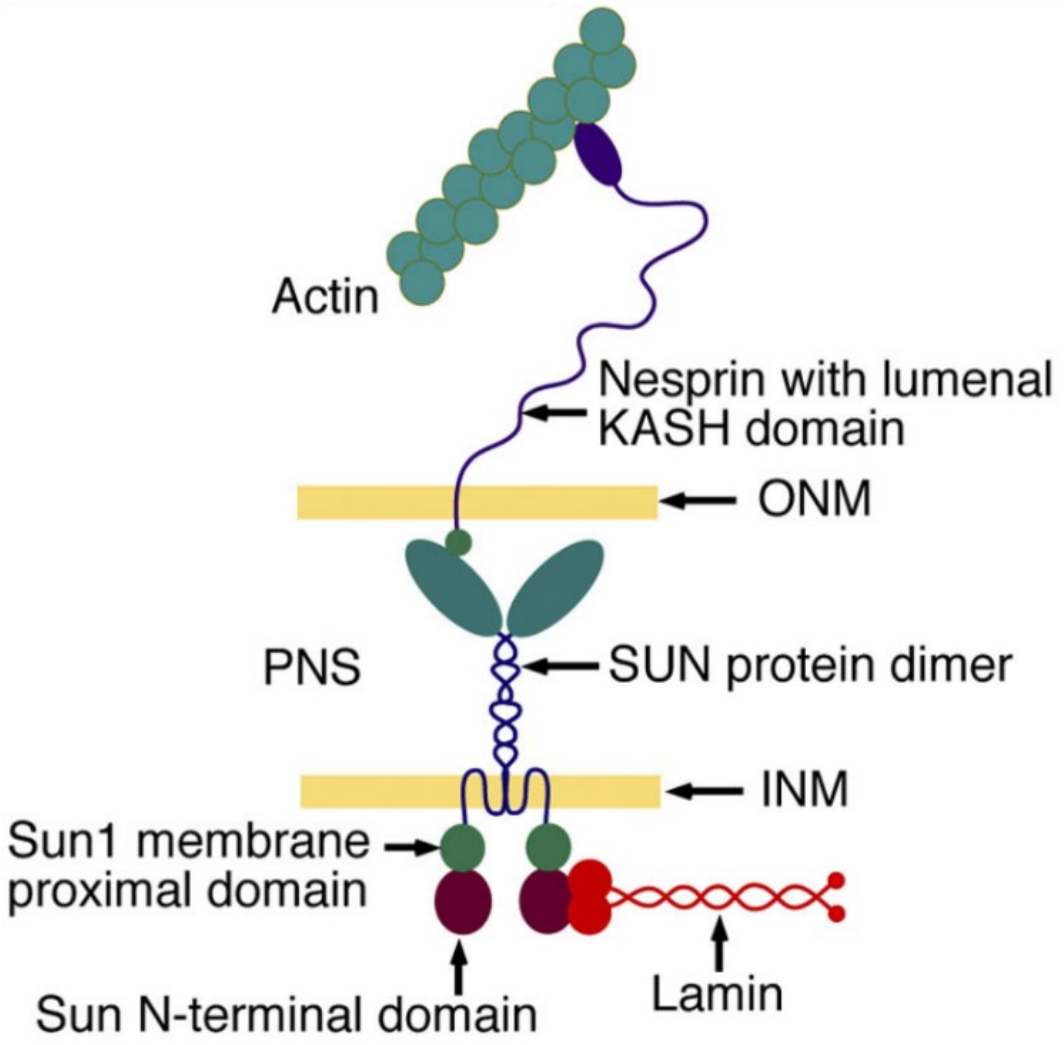
Mekanobiologia on nopeasti kehittyvä tieteenala, joka pyrkii ymmärtämään fysikaalisten tekijöiden vaikutuksia solun toimintaan. Biokemiallisten signaalien lisäksi myös mekaaniset signaalit, kuten solun rakenteisiin kohdistuvat fyysiset voimat vaikuttavat solun toimintaan ja rakenteeseen. Prosessia, jossa mekaaninen signaali muutetaan biokemialliseen muotoon, kutsutaan mekanotransduktioksi, mutta mekanotransduktio-termiä käytetään nykyään myös laajemmassa mittakaavassa viittaamaan yleisesti solun vasteisiin sen fysikaalisen ympäristön muutoksiin. Mekanotransduktion tarkempaa osuutta solun toimintaan tutkitaan vielä, mutta on jo selvää, että sen merkitys solun toiminnalle on elintärkeä. Mekanotransduktiivisten prosessien tiedetäänkin vaikuttavan ainakin tuman liikkeeseen ja asemoitumiseen solun sisällä, solun tukirangan järjestäytymiseen, solun polarisaatioon, solun migraatioon sekä solujen erilaistumiseen. Lisäksi nykytutkimuksen valossa tiedetään, että kaikki solutyypit reagoivat mekaanisiin ärsykkeisiin. (Engler ym. 2006, Isermann ym. 2013)

1.1 Tumakotelo ja LINC-kompleksi

Eräs mekanotransduktiivinen prosessi tapahtuu, kun solu välittää ympäristöstään aktiinitukirankaansa kohdistuvan mekaanisen rasitteen tumaansa LINC-kompleksin (LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton, tuman tukirangan ja solun tukirangan yhdistäjä) kautta. Yleisesti tumaan kohdistuvien voimien on osoitettu aiheuttavan tuman deformaatiota, ja on teoretisoitu, että tämä puolestaan voisi vaikuttaa esimerkiksi kromatiinin rakenteeseen tai transkriptiofaktoreiden säätelyyn (Isermann ym. 2013). Hyvänä esimerkkinä tuoreessa tutkimuksessaan Carley ym. (2021) esimerkiksi osoittivat, että LINC-kompleksi välittää β1 integriineihin sitoutuneen aktiinitukirangan jännitteen tumalaminaan, ja säätelee suoraan epidermaalista erilaistumista ohjaavien geenien ilmentymistä keratinosyyteissä. LINC-kompleksin tehtävänä on siis läpäistä tumakotelo, ja tarjota reitti, jota pitkin näitä mekaanisia voimia voidaan välittää tumaan, sekä luoda linkki tuman ja solun tukirangan välille.

Tumakotelo on kahdesta kaksoislipidikerroksesta, ulommasta ja sisemmästä tumakalvosta (ONM ja INM), koostuva rakenne. Kalvojen välissä on noin 50 nanometriä leveä perinukleaarinen tila (PNS). Ulompi tumakalvo ja perinukleaarinen tila ovat solulimakalvoston (ER) jatke, ja sisemmän tumakalvon tuman puoleisella pinnalla sijaitsee vielä tumalevy, joka on noin 50 nanometriä paksu proteiiniverkosto. Tumalevyn pääasialliset proteiinit ovat A-tyypin (lamiinit A ja C) ja B-tyypin (lamiinit B1 ja B2) lamiinit, jotka kuuluvat välikokoisten säikeiden perheeseen ja muodostavat kontakteja sekä sisemmän tumakalvon rakenteiden että kromatiiniproteiinien välille tarjoten näin ankkuroitumiskohtia kromatiinirakenteille. (Crisp ym. 2006)

LINC-kompleksi itsessään on suuri, useasta osasta koostuva proteiinikompleksi. Kuten Crisp ym. (2006) tutkimuksessaan osoittivat, LINC-kompleksi muodosta ketjun, jossa ensimmäisenä tuman ulkopuolella aktiiniin on kiinnittyneenä nespriini N-terminaalisesta domeenistaan. Nespriinin rakenne ulottuu ulomman tumakalvon lävitse, ja liittyy SUN-kompleksin (Sad1p and UNc-84) C-terminaaliseen osaan omasta C-terminaalisesta KASH-domeenistaan (Klarsicht, Anc-1 and Syne Homology). SUN-kompleksin rakenne jatkuu sisemmän tumakalvon läpi, ja yhdistyy tuman nukleaarisella puolella lamiineista muodostuvaan tumalevyyn N-terminaalisesta osastaan. LINC-kompleksin rakenne on esitelty alla kuvassa 1 sellaisena kuin Crisp ym. (2006) sen alun perin esittivät.



Kuva 1: LINC-kompleksin rakenne, joka käsittää tuman ulkopuolella aktiiniin sitoutuvaan nespriinistä ja KASH-domeenista koostuvan osan, sekä sisemmän tumakalvon läpäisevän tuman sisällä lamiiniin sitoutuvan SUN-proteiinikompleksin. (Crisp ym. 2006)

Nespriinit (Nuclear Envelope Spectrin-Repeat ProteINS, NESPRINS) ovat tumaa ja sytoskeletaalisia proteiineja toisiinsa linkittävien proteiinien perhe. Nespriinien perheeseen kuuluvat nespriinit 1–4. Näistä erityisesti nespriini-1 ja nespriini-2 ovat olennaisia tumakotelon ja solun aktiinitukirangan linkittämisessä, sillä juuri ne kykenevät kiinnittymään aktiinin polymerisoituneeseen muotoon,

eli F-aktiiniin, N-terminaalisten kalponiinihomologidomeeniensa avulla. Nespriini-3 puolestaan toimii linkkinä tumakotelon ja välikokoisten filamenttien välillä, ja nespriini-4 kytkeytyy kinesiini-1:n alayksikköön nimeltä kif5b. Nespriineistä on olemassa myös useita eri isoformeja, jotka saattavat lokalisoitua muuallekin kuin tumakotelolle, ja toimia muiden solun osien linkkereinä. (Rajgor ym. 2013) Tämän tutkimuksen kannalta tärkein nespriini on nespriini-2. Nespriini-2 (myös Nespriini-2 Giant, Nespriini-2G) koostuu N-terminaalisesta kalponiinihomologiadomeenista, jota seuraa 56 kappaletta niin kutsuttuja spektriinitoistojaksoja, jotka koostuvat tyypillisesti vasenkätisestä kolmen alfaheliksin muodostamasta kierrerakenteesta. Spektriinitoistoja seuraa vielä KASH-domeeni, joka kiinnittyy LINC-kompleksin SUN-domeeniin perinukleaarisessa tilassa. (Rajgor ym. 2013)

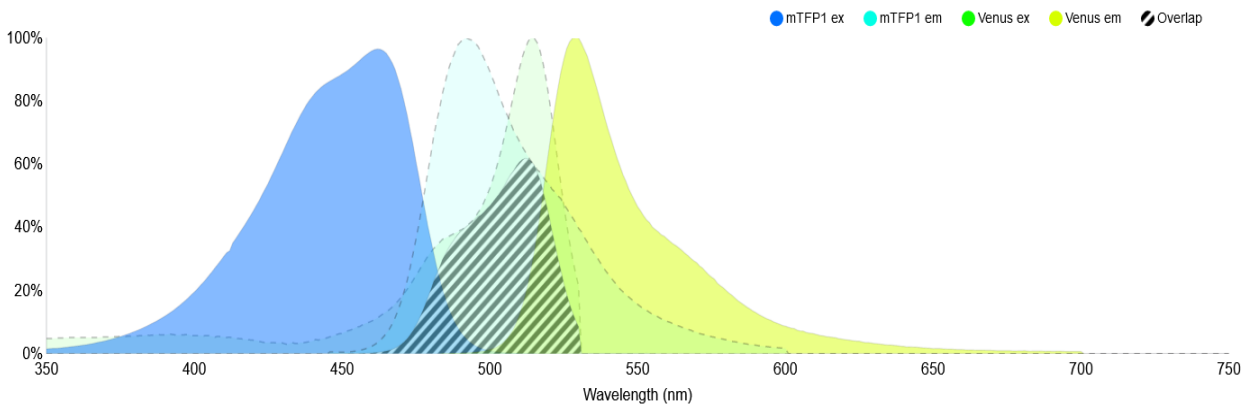
Lamiinit ovat tyypin V välikokoisia säikeitä, jotka tunnetaan myös nimellä tumalamiini. Tyypin A ja B lamiinit toimivat sisemmän tumakalvon sisäpuolella eräänlaisena mekaanisena tukirankana sekä osallistuvat moniin tuman toimintoihin. Tumalevy koostuu myös muista proteiineista, mutta juuri lamiinit muodostavat valtaosan tästä rakenteesta. Tumalevy ankkuroituu tumahuokosiin sekä sisempään tumakalvoon, ja tarjoaa sitoutumispaikkoja kromatiinille. Yksittäiset lamiiniproteiinit koostuvat α-helikaalisesta varsirakenteesta, jota rajaavat N-terminaalinen globulaarinen päärakenne (head), ja C-terminaalinen häntärakenne (tail). Lamiinit muodostavat coiled-coil-dimeerejä, ja vaikka on osoitettu, että myös A- ja B-tyypin lamiinit vuorovaikuttavat keskenään itsensä lisäksi, ei tumalevyn lamiinipolymeerien rakenteita tunneta kovin hyvin. (Dechat ym. 2008) Vaikka Dechat ym. (2008) tutkimuksesta on jo aikaa, todettiin ainakin Makarov ym. (2019) tutkimuksessa, että lamiinien molekulaarisesta rakenteesta ja järjestäytymismekanismeista tiedetään edelleen hyvin vähän. Sama koskee myös muita välikokoisia säikeitä, ja olemassa oleva tieto pohjautuu lähinnä elektronimikroskopiaan sekä yksittäisten fragmenttien kristallirakenteisiin. Lamiineilla on osoitettu olevan yhteyksiä muun muassa yksilönkehitykseen, solujen erilaistumiseen, kromosomien asemoimiseen tumassa ja heterokromatiinin organisaatioon, DNA:n replikaation säätelyyn, geenien transkriptioon, ja moniin muihin solulle elintärkeisiin toimintoihin. (Dechat ym. 2008)

1.2 Försterin resonanssienergiansiirto eli FRET

Försterin resonanssienergiansiirto (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) on ei-radiatiivinen energiansiirtoprosessi, jossa virittyneen fluoresoivan luovuttajamolekyylin energia siirtyy perustilassa olevalle fluoresoivalle vastaanottajamolekyylille ilman säteilyä (Govorov ym. 2016). Prosessin löysi alun perin Theodor Förster (1946), mutta hänen alkuperäisten julkaisujensa ollessa saksaksi joudutaan tässä tukeutumaan toiseen lähteeseen ilmiötä käsiteltäessä. Förster julkaisi ilmiöstä kaikkiaan 11 artikkelia.

FRET-prosessin tapahtuminen vaatii, että luovuttaja- ja vastaanottajafluoroforit ovat avaruudellisesti hyvin lähellä toisiaan. Käytännössä niiden etäisyyden täytyy olla alle 10 nanometriä, mutta

joissain tapauksissa etäisyys voi olla jopa 20 nanometriä. Lisäksi vaaditaan, että luovuttajan emissiospektri asettuu osittain päällekkäin vastaanottajan absorptiospektrin kanssa. (Govorov ym. 2016) Esimerkki fluoroforien spektraalisesta lomittumisesta on havainnollistettu kuvassa 2.



Kuva 2: mTFP1:n ja Venuksen spektraalinen lomittuminen. Kuvassa näkyy kuinka mTFP1:n emissio asettuu osittain päällekkäin Venuksen absorptioalueen kanssa noin 460–530 nm kohdalla (kuvassa nimellä Overlap). Luotu FPbase FRET Calculator -työkalulla osoitteessa https://www.fpbase.org/fret/.

Ei-radiatiivinen energiansiirtoprosessi eroaa tavallisista radiatiivisista energiansiirtoprosesseista prosessin välittäjänä toimivan hiukkasen osalta. Tavallisissa radiatiivisissa energiansiirtoprosesseissa energian välittäjänä toimii fotoni, joka kuljettaa esimerkiksi fluoresenssissa fluoroforin emittoiman viritystilan energian eteenpäin. Ei-radiatiivisissa energiansiirtoprosesseissa sen sijaan energian välittäjänä toimii niin sanottu virtuaalifotoni. (Govorov ym. 2016)

Virtuaalifotoni on virtuaalihiukkanen, ja virtuaalihiukkaset ovat Heisenbergin epätarkkuusperiaatteen rajoissa syntyviä, kahden todellisen hiukkasen välillä vaihdettavia vuorovaikutusten välittäjiä. Koska epätarkkuusperiaate määrittää, että äärimmäisen lyhytikäisen systeemin energia on hyvin epätarkka, virtuaalihiukkasia voi ilmestyä välituotteina atomien välisissä vuorovaikutuksissa. Virtuaalihiukkaset täytyy absorboida takaisin osaksi todellisia hiukkasia lähes välittömästi, jotta epätarkkuusperiaate ei rikkoudu, ja hiukkaset eivät realisoidu, sillä se rikkoisi energian säilymislakia. (Weinberg 1977)

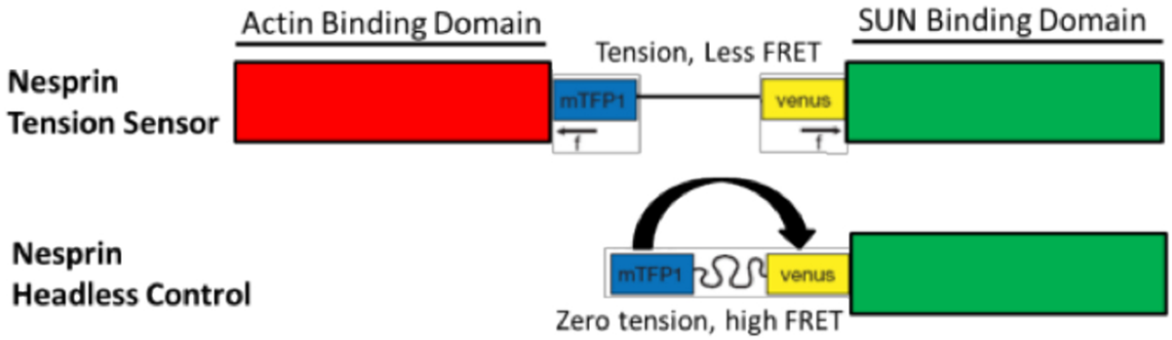
Försterin resonanssienergiansiirrossa, joka on siis ei-radiatiivisen energiansiirron erikoistapaus fluoresenssille, virittyneen luovuttajafluoroforin energia siirtyy ilman oikean fotonin emittointia vastaanottajafluoroforille virtuaalifotonin kautta. Ilmiö voidaan nähdä toisaalta myös kahden fluoroforin pitkän kantaman dipoli-dipolivuorovaikutuksina, jossa virtuaalifotoni toimii siis välittäjänä. Energiansiirron tehokkuus riippuu neljästä tekijästä, eli 1) kuinka paljon luovuttajan emissiospektri ja vastaanottajan absorptiospektri asettuvat päällekkäin, 2) mikä on luovuttajan kvanttisaanto (eng. quantum yield), 3) transitiodipolien avaruudellisesta suuntautumisesta ja 4) luovuttajan ja vastaanottajan

avaruudellisesta etäisyydestä. Lisäksi niin kutsuttujen vibronisten siirtymätilojen luovuttajan ja vastaanottajan välillä täytyy linkittyä ja olla resonanssissa keskenään, mistä sana ”resonance” onkin saatu ilmiön nimeen. Vasta kun kaikki kyseiset ehdot täytetään, voi energiaa siirtyä FRET:n välityksellä. (Govorov ym. 2016)

1.3 Nesprin-TS

Nesprin-TS on molekulaarinen voimasensori, joka käyttää hyväkseen FRET:iä (Arsenovic ym. 2016). Tämän tyyppiset molekulaariset voimasensorit toimivat hyödyntämällä kahden fluoresoivan molekyylin välillä tapahtuvaa FRET-ilmiötä. Kun valitaan spektraalisesti lomittuvat fluoroforit saadaan mahdollistettua tilanne, jossa FRET voi tapahtua. Valitut fluoroforit yhdistetään toisiinsa venyvällä molekyylillä, joka mahdollistaa fluoroforien etääntymisen toisistaan voimien vaikutuksesta. Samalla kuitenkin estetään fluoroforien karkaaminen liian kauas toisistaan. Koska FRET-tehokkuus on etäisyysriippuvainen ja vaimenee etäisyyden kuudenteen potenssiin (Govorov ym. 2016), nähdään fluoroforien etääntyessä toisistaan nopea FRET:n lasku. FRET:n lasku indikoi fluoroforien etääntymistä toisistaan, mikä puolestaan kertoo, että sensorin päihin kohdistuu kasvavia vetäviä voimia. FRET:n lasku on siis suora merkki sensoriin kohdistuvien voimien kasvusta.

Nesprin-TS:n toiminta perustuu mTFP1- ja Venus-fluoroforipariin, joiden välillä FRET tapahtuu. Fluoroforiparien spektraalinen lomittuminen on nähtävissä kuvasta 2. Fluoroforit on yhdistetty toisiinsa venyvällä hämähäkin silkistä eristetyllä proteiinilla $(GPGGA)_8$, joka mahdollistaa fluoroforien vetäytymisen erilleen niihin kohdistuvien voimien vaikutuksesta. Nesprin-TS on johdettu Grashoff ym. (2010) kehittämästä TSmod-nimisestä voimasensorista koodaamalla tämä sensori osaksi Östlund ym. (2009) keinotekoisesti luomaa mininespriini-2G:tä. Mininespriini-2G:n ja siihen linkitetyn sensorin on osoitettu toimivan lähes kuten nespriini-2G, ja yhdistävät aktiinitukirangan tumakoteloon LINC-kompleksin kautta. Lisäksi konstruktin osoitettiin tukevan aktiinista riippuvaa tuman liikettä. (Arsenovic ym. 2016) Nesprin-TS:n rakenne on esitelty alla kuvassa 3.



Kuva 3: Nesprin-TS:n ja kontrollisensori nesprin-HL:n rakenne. (Arsenovic ym. 2017) Kun sensori on voimien aiheuttamassa venyneessä tilassa, FRET:n määrä vähenee. Kontrollisensorin aktiiniin sitoutuneen pään ollessa katkaistuna sensoriin ei tulisi kohdistua voimia, ja FRET:n tulisi kasvaa.

Koska sensorissa on nyt nespriini-2G:n tilalla mininespriini-2G, puuttuu kyseisestä konstruktista monia tärkeitä sitoutumispaikkoja, kuten FHOD1:n sekä kinesiinin ja dyneiinin sitoutumispaikat. Kuten Arsenovic ym. (2016) tutkimuksessaan osoittivat, tätä voidaan kuitenkin käyttää approksimoimaan tumaan kohdistuvia aktiinipohjaisia voimia, vaikka konstruktista puuttuvat sitoutumiskohdat voivatkin vaikuttaa siihen kohdistuviin voimiin. Sensori ei myöskään huomioi mikrotubuluksien tai välikokoisten säikeiden tumaan kohdistamia voimia. Lisäksi Arsenovic ym. (2018) mukaan huomiotta jäävät tuman ympärillä ja päällä oleva aktiinirakenteen, aktiinihatun (eng. actin cap), kautta tumaan kohdistuvien voimien vaikutukset, joita Khatau ym. (2009) teoretisoivat. Heidän mukaansa nämä voimat saattavat olla LINC-kompleksista riippuvaisia tai riippumattomia. Khatau ym. (2009) tutkimuksen mukaan aktiinihattu kuitenkin kytkeytyy tumakoteloon LINC-kompleksin kautta, ja lisäksi Chambliss ym. (2013) esittivät, että aktiinihattu on suoraan kytköksissä LINC-kompleksin kautta tumalevyyn ja kykenee välittämään mekanotransduktiivisia signaaleja tumaan. Koska aktiinihattu näyttäisi vaikuttavan suoraan LINC-kompleksiin, Arsenovic ym. (2018) saattavat viitata riippumattomuuden mahdollisuudella johonkin tuoreempaan tutkimukseen aktiinihatusta, jota ei ole mainittu heidän lähteissään. Lisäksi Li ym. (2015) esittivät, että LINC-kompleksista riippumattomat voimat solukalvolta voivat aiheuttaa tumaan kompressiota. Tämän vuoksi mininespriini-2G-pohjainen sensori on puutteellinen, mutta mahdollistaa silti nimenomaan aktiinitukirangasta saapuvien tumaan kohdistuvien LINC-kompleksivälitteisten voimien havainnoimisen. (Arsenovic ym. 2018)

Sensorista on kehitetty myös kontrolliversio, nesprin-HL, jonka rakenne on esitetty myös kuvassa 3. Suurin ero kontrollin ja sensorin välillä on nesprin-HL:stä puuttuva aktiiniin sitoutuva domeeni. Tämän vuoksi, vaikka sensori lokalisoituukin nesprin-TS:n tavoin tumakotelolle, lokalisaatio ei ollut yhtä voimakasta, ja toisin kuin nesprin-TS, joka muodostaa sytoplasmisia kuitumaisia rakenteita kuten endogeeninen nespriini, nesprin-HL ei osoittanut merkkejä samanlaisista rakenteista. Kontrollisensori ei näin ollen ole sitoutunut aktiiniin, eikä siis ole sensitiivinen aktiinitukirangasta kohdistuville voimille. Koska kontrollisensori on relaksoituneessa muodossa, siitä saadaan havainnoitua paljon suurempaa FRET-pohjaista fluoresenssia kuin nesprin-TS:sta, eikä sen FRET-arvoissa tulisi näkyä missään tilanteessa suuria muutoksia, vaan tulosten tulisi olla kutakuinkin samoja. (Arsenovic ym. 2016)

1.4 MDCK II -solut

MDCK II -solut ovat koiran munuaisesta eristettyjen epiteelisolujen johdannaisia. Solut on alun perin eristetty syyskuussa 1958 näennäisesti normaalilta naarascockerspanielilta. (ATCC, 2016) Tutkimuksessa käytettyihin MDCK II -soluihin (ATCC® CCL-34™) oli transfektiolla tuotu nesprin-TS (AddGene plasmidi 68127) ja nesprin-HL (AddGene plasmidi 68128) geenit, joiden avulla solut itse tuottivat voimasensoreita. TSmod on myös saatavilla erikseen (AddGene plasmidi 26021), samoin kuin mTFP11 (AddGene plasmidi 54613) ja Venus (AddGene plasmidi 27793).

1.5 Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää miten epiteelisolukon tiheys vaikuttaa solujen tumiin, ja tarkemmin niiden LINC-komplekseihin, kohdistuviin voimiin. Tutkimus toteutettiin vertailemalla selkeästi solutiheydeltään eroavia 3 tai 5 päivää kasvatettuja nesprin-TS:a ja nesprin-HL:a ilmentäviä MDCK II -soluja, ja niiden tumista havaittavan FRET-signaalin voimakkuuseroja. Lisäksi tutkimuksessa selvitettiin, vaikuttaako solujen altistaminen sytokalasiini D:lle, jonka tiedetään inhiboivan aktiinin polymerisaatiota (Dubinsky ym. 1999), FRET:n voimakkuuteen. Tutkimuksessa haluttiin myös selvittää, onko saadun FRET-signaalin kannalta olennaista mitata tumien intensiteetti tumakotelon alueelta kuten Arsenovic ym. (2016) tutkimuksessaan, vai riittääkö jos intensiteetin mittaa koko tuman alueelta.

2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Soluviljelymenetelmät ja näytteiden valmistus

MDCK II -solujen viljelyssä käytettiin Gibco Minimum Essential Media (MEM) -mediumia (Thermo Fisher Scientific, USA), johon lisättiin 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) -seerumia (Thermo Fisher Scientific, USA) ja 0,25 mg/ml G418-antibioottia (Sigma-Aldrich, USA) selektiota varten. Solunäytteet kasvatettiin 22x22 mm peitinlaseille, jotka pinnoitettiin ennen solujen lisäämistä kollageeni I -liuoksella (Thermo Fisher Scientific, USA) joka laimennettiin 0,02 N etikkahappoliuokseen siten, että loppukonsentraatioksi saatiin 0,05 mg/ml. Näytteitä kasvatettiin laseilla joko 3 tai 5 päivää kuvausta varten.

2.2 Näytteiden kuvaaminen

FRET-signaalin laskemista varten kuvaaminen täytyy suorittaa monikanavakuvauksena, jossa käytetään kolmea eri kanavaa: luovuttajakanavaa, FRET-kanavaa ja vastaanottajakanavaa.

Solut kuvattiin Zeiss LSM 780 laserskannauskonfokaalimikroskoopilla (Zeiss, Saksa). Objektiivina käytettiin Zeiss C-Apochromat 63x/1.20 W Korr M27 -objektiivia (Zeiss, Saksa), jossa immersioaineena käytettiin Zeiss Immersol W 2010:tä (Zeiss, Saksa). Detektorina käytettiin valomonistinputkea, jossa gain-arvona oli 840 V. Kuvauslaserina käytettiin argonlaseria, jossa fluoroforien viritykseen käytettiin aallonpituudeltaan 458 nm valoa 25 prosentin teholla, ja aallonpituudeltaan 514 nm valoa 1,6 prosentin teholla. Emissiota havainnoitiin 460–517 nm aallonpituusalueella luovuttajakanavalla, ja 517–651 nm aallonpituusalueella FRET- ja vastaanottajakanavalla. Kuvaamisessa käytettiin nelinkertaista keskiarvostusta kuvan laadun parantamiseksi. Kuvat otettiin 512x512 pikselin alueelta, jossa pikselin koko oli 0,13x0,13 µm.

Näytteistä otettiin kuvia siten, että 3 päivää kasvatetuista nesprin-TS- ja nesprin-HL-soluista otettiin kolmena eri kertana 5 kuvaa, ja 5 päivää kasvatetuista nesprin-TS- ja nesprin-HL-soluista kolmena eri kertana 5 kuvaa. Jokaisesta kuvasta valittiin mahdollisuuksien mukaan korkeintaan viisi eri tumaa, joista mitattiin intensiteetit kahdella eri tavalla maskaamalla: kokotumamaskilla ja tumakotelomaskilla. Maskaamisella tarkoitetaan tässä yhteydessä mittausalueen rajaamista tiettyyn osaan kuvasta.

2.3 Sytokalasiini D -käsittely

Sytokalasiini D -käsittely (Sigma-Aldrich, USA) toteutettiin sekä kolmen että viiden päivän ikäisille nesprin-TS-soluille, että 3-päiväisille HL-soluille. 5-päiväisille HL-soluille ei tehty käsittelyä, sillä

tässä vaiheessa tuloksista oli huomattu, että HL-solujen tulokset ovat epäluotettavia. Näytteitä inkuboitiin noin 2 tuntia 10 µg/ml sytokalasiini D:n vaikutuksen alaisina, jonka jälkeen ne niistä otettiin 5 kuvan sarja. Kuten edellä, myös näistä kuvista valittiin maksimissaan 5 tumaa mittauksia varten.

2.4 FRET-arvojen laskeminen

FRET:n intensiteetti voidaan laskea mittaamalla luovuttaja-, FRET- ja vastaanottajakanavien intensiteetit, joista voidaan laskea FRET:n intensiteetti. Intensiteetti lasketaan vähentämällä FRET-kanavan intensiteetistä luovuttajafluoroforin fluoresenssin läpivuoto FRET-kanavalle, ja vastaanottajafluoroforin suora virittyminen FRET-kanavalla. Lisäksi taustafluoresenssi, jota voi tulla mm. mediumista, sytosolista tai mikroskoopin kohinasta on otettava huomioon ja vähennettävä arvoista.

Luovuttajafluoroforin läpivuoto voidaan laskea jakamalla pelkkää mTFP1:tä ilmentävistä soluista FRET-kanavan suhde luovuttajakanavaan, ja huomioimalla tausta-arvot laskussa käyttämällä kaavaa

$$BT_{Donor} = \frac{A458_{mTFP1} - BG_{A458,mTFP1}}{D458_{mTFP1} - BG_{D458,mTFP1}} \quad (1)$$

jossa BT_{Donor} on luovuttajakanavan läpivuotokerroin FRET-kanavalle, $A458_{mTFP1}$ on pelkkää luovuttajafluoroforia ilmentävien solujen FRET-kanavan intensiteetti, $BG_{A458,mTFP1}$ kanavaa vastaava tausta-arvo, $D458_{mTFP1}$ on pelkkää luovuttajafluoroforia ilmentävien solujen luovuttajakanavan intensiteetti, ja $BG_{D458,mTFP1}$ on kanavaa vastaava tausta-arvo.

Vastaavasti vastaanottajafluoroforin suora virittyminen voidaan laskea tausta-arvot huomioiden FRET-kanavan suhteena vastaanottajakanavaan pelkkää Venusta ilmentävistä soluista käyttämällä kaavaa

$$DE_{Acceptor} = \frac{A458_{Venus} - BG_{A458,Venus}}{A514_{Venus} - BG_{A514,Venus}} \quad (2)$$

jossa $DE_{Acceptor}$ on vastaanottajamolekyylin suoran virityksen kerroin FRET-kanavalle, $A458_{Venus}$ on pelkkää vastaanottajafluoroforia ilmentävien solujen FRET-kanavan intensiteetti, $BG_{A458,Venus}$ kanavaa vastaava tausta-arvo, $A514_{Venus}$ on pelkkää vastaanottajafluoroforia ilmentävien solujen vastaanottajakanavan intensiteetti, ja $BG_{A514,Venus}$ kanavaa vastaava tausta-arvo.

Kun läpivuotokertoimet tiedetään, voidaan FRET:n intensiteetti laskea kaavalla

$$FRET = (A458 - BG_{A458}) - BT_{Donor} \cdot (D458 - BG_{D458}) - DE_{Acceptor} \cdot (A514 - BG_{A514}) \quad (3)$$

jossa $A458$ on FRET-kanavan intensiteetti, BG_{A458} on FRET-kanavan tausta-arvo, $D458$ on luovuttajakanavan intensiteetti, BG_{D458} on luovuttajakanavan tausta-arvo, $A514$ on vastaanottajakanavan

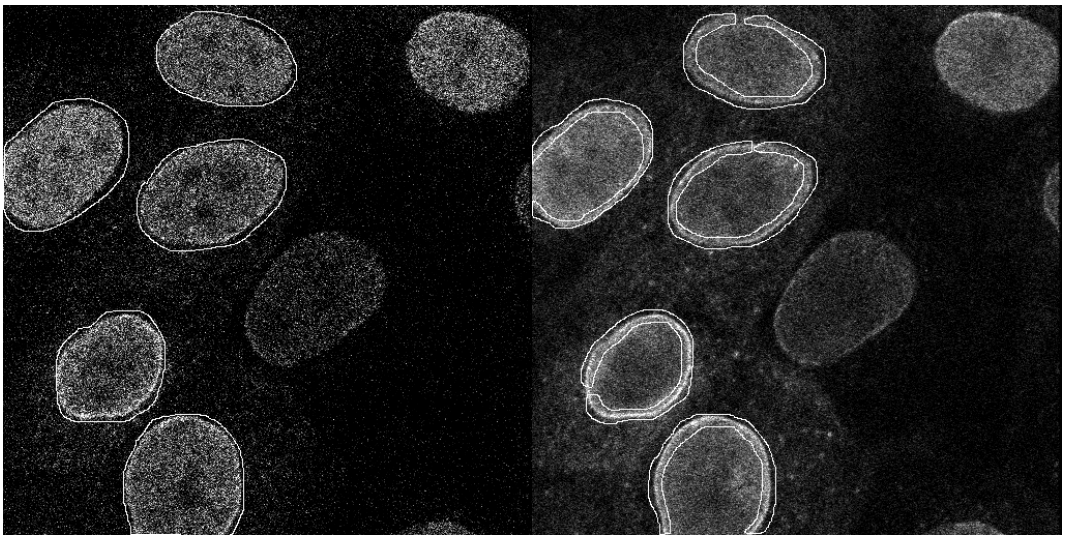
intensiteetti ja BG_{A514} on vastaanottajakanavan tausta-arvo. (Youvan ym. 1997, muuttujien nimiä muutettu vastaamaan itse käyttämääni notaatiota)

Mitatusta FRET:n arvosta voidaan vielä laskea normalisoitu FRET:n arvo, joka huomioi tilanteet, joissa luovuttajan tai vastaanottajan ekspressiotasot voivat vaihdella solusta toiseen. Normalisoidut FRET-arvot voidaan laskea kaavalla

$$NFRET = \frac{FRET}{\sqrt{(D458 - BG_{D458}) \cdot (A514 - BG_{A514})}} \tag{4}$$

jolloin luovuttajan ja vastaanottajan mahdollisesti toisistaan poikkeavat ekspressiotasot saadaan huomioitua. Normalisoidut FRET-arvot ovat huomattavasti parempia FRET:n vertailuun, sillä muuten vertailu jouduttaisiin suorittamaan ainoastaan sellaisten solujen välillä, joiden proteiiniekspressiotasot ovat vertailtavissa. (Xia ym. 2001)

FRET voidaan myös mitata useammasta kohtaa solua. Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää, kuinka suuri ero saadussa FRET:n intensiteetissä on, mikäli suoritetaan mitattavan alueen rajaaminen joko tumakoteloon, joka näkyy kuvissa selkeämmin kuin muut tuman osat, tai koko tumaan. Nämä erilaiset maskaustavat on esitelty alla kuvassa 4.



Kuva 4: Kaksi FRET:n mittaamiseen käytettyä rajaustapaa. Vasemmalla koko tuman rajaus luovuttajakanavalla, ja oikealla tumakotelon rajaus FRET-kanavalla. Kuvat 3-päiväisistä nesprin-TS soluista.

2.5 Tilastolliset menetelmät

Tutkimuksessa vertaillaan useaan otteeseen kahta toisistaan riippumatonta populaatiota. Tilastolliset testit tehtiin käyttämällä Excel-taulukkolaskentaohjelmaa. Kahden riippumattoman populaation vertailuun käytettiin riippumattomien muuttujien t-testiä olettaen joko varianssit yhtä suuriksi tai erisuuriksi tilanteesta riippuen. Varianssien eroa tutkittiin käyttämällä kahden otoksen F-testiä vari-

ansseille. Ryhmien vertailuun käytettiin normaalijakautuneisuudesta riippumatta aina kahden riippumattoman muuttujan t-testiä, sillä Kwak ym. (2017) esittelemän keskeisen raja-arvolauseen mukaan otoskoon kasvaessa voidaan olettaa jakauman lähestyvän normaalijakaumaa populaation omasta jakaumasta riippumatta. Yleisesti kun n>30 voidaan tehdä normaaliapproksimaatio, sillä jakauman voidaan olettaa olevan likimain normaali (Kwak ym. 2017). Koska tässä tutkimuksessa otoskoot olivat tilastollisessa vertailussa aina vähintään n=25, ja usein 50-75, voidaan keskeistä raja-arvolausetta soveltaa käytäntöön, sillä jo n=25 kohdalla populaation approksimointi normaalisti jakautuneeksi ei tuota merkittävän suurta eroa lopputulokseen. Tilastollisten testien p-arvorajana tilastolliselle merkitsevyydelle käytettiin p-arvoa 0,05.

3. TULOSTEN TARKASTELU

Mikroskoopilla otetuista kuvista voitiin ensimmäisenä määrittää mikroskoopin tausta-arvot joka kanavalle ottamalla mittauksia kuvissa olevilta tyhjiltä alueilta. Tausta-arvoiksi saatiin luovuttajakanavalle kaavalla 1 $BG_{D458} = 0{,}553$, FRET-kanavalle $BG_{A458} = 3{,}165$ ja vastaanottajakanavalle kaavalla 2 $BG_{A514} = 2{,}987$. Laskuissa käytettiin pyöristämättömiä versioita arvoista.

Tausta-arvojen jälkeen voitiin laskea luovuttajakanavan läpivuoto FRET-kanavalle ja vastaanottajan suora viritys 458 nm laserista. Luovuttajan läpivuotokertoimeksi saatiin 20:stä mittauksen keskiarvona $BT_{Donor} = 0{,}458$ hajonnalla 0,052. Vastaanottajan suoran virityksen kertoimeksi saatiin 25:stä mittauksen keskiarvona $DE_{Acceptor} = 0{,}324$ hajonnalla 0,008. Laskuissa käytettiin jälleen pyöristämättömiä versioita arvoista.

Läpivuotokertoimien määrittämisen jälkeen voitiin lopulta laskea kaavan 3 avulla kuvista valituille tumille FRET:n absoluuttinen arvo, jonka jälkeen kaavalla 4 laskettiin normalisoitu FRET-arvo kaikille absoluuttisille FRET-arvoille. Normalisoituja arvoja käytettiin tulosten vertailuun. Jokaisen mittaussetin keskiarvot ja hajonnat on esitelty alla taulukoissa 1–4.

Taulukko 1: Normitetut FRET:n arvot ja keskihajonnat 3-päiväisissä voimasensorisoluissa kahdella eri maskaustavalla mitattuna.

Maskaustyyli	Kokotuma		Tumakotelo	
Nesprin-TS	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta
3-päiväinen, 1	0,29	0,05	0,33	0,05
3-päiväinen, 2	0,23	0,04	0,29	0,05
3-päiväinen, 3	0,42	0,06	0,55	0,06
3-päiväinen, 4 (sytokalasiini D)	0,15	0,06	0,19	0,05

Taulukko 2: Normitetut FRET:n kontrolliarvot ja keskihajonnat 3-päiväisissä kontrollisoluissa kahdella eri maskaustavalla mitattuna.

Maskaustyyli	Kokotuma		Tumakotelo	
Nesprin-HL	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta
3-päiväinen, 1	0,07	0,02	0,09	0,03
3-päiväinen, 2	0,05	0,03	0,09	0,03
3-päiväinen, 3	0,14	0,06	0,22	0,05
3-päiväinen, 4 (sytokalasiini D)	0,26	0,08	0,25	0,06

Taulukko 3: Normitetut FRET:n arvot ja keskihajonnat 5-päiväisissä voimasensorisoluissa kahdella eri maskaustavalla mitattuna.

Maskaustyyli	Kokotuma		Tumakotelo	
Nesprin-TS	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta
5-päiväinen, 1	0,71	0,28	0,77	0,27
5-päiväinen, 2	0,26	0,06	0,30	0,06
5-päiväinen, 3	0,19	0,06	0,25	0,06
5-päiväinen, 4 (sytokalasiini D)	0,22	0,06	0,27	0,04

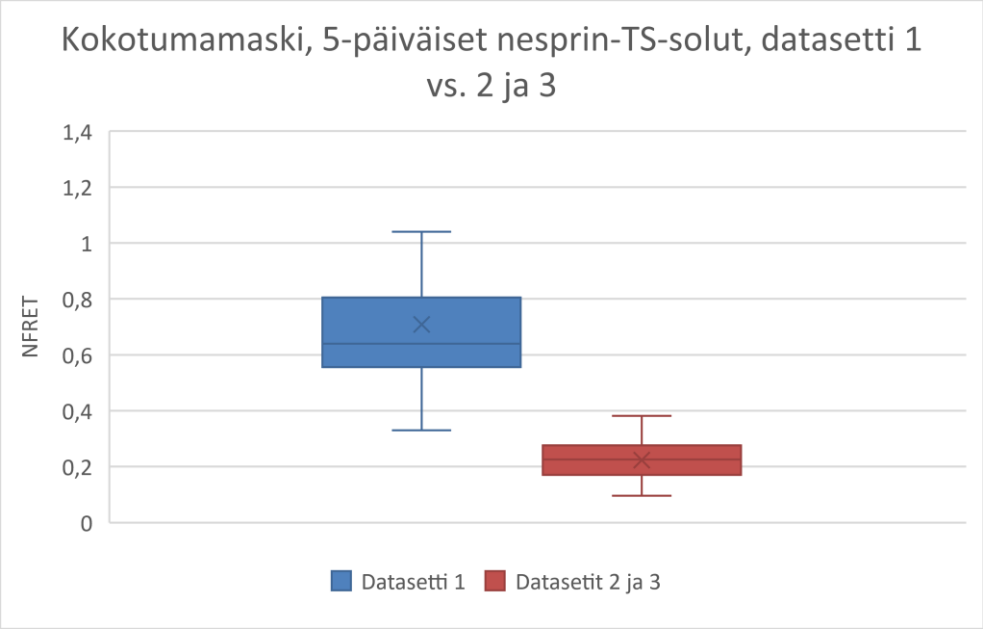
Taulukko 4: Normitetut FRET:n kontrolliarvot ja keskihajonnat 5-päiväisissä kontrollisoluissa kahdella eri maskaustavalla mitattuna.

Maskaustyyli	Kokotuma		Tumakotelo	
Nesprin-TS	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta	Normitettu keskiarvo	Keskihajonta
5-päiväinen, 1	0,15	0,05	0,17	0,04
5-päiväinen, 2	0,30	0,18	0,34	0,19
5-päiväinen, 3	0,18	0,10	0,20	0,07

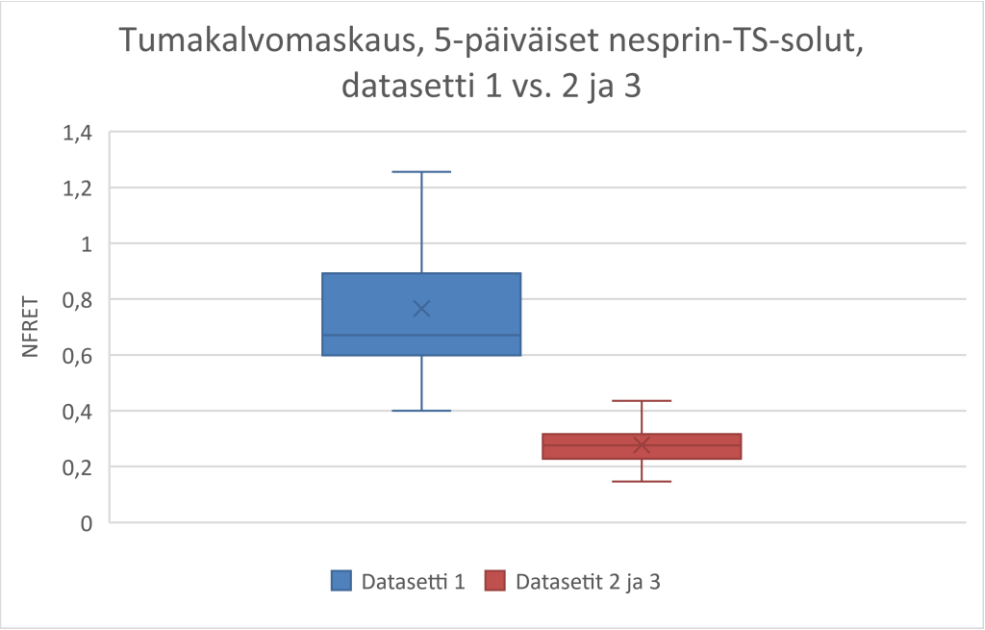
3.1 Epäluotettavat tulokset

Viisi päivää kasvatettujen nesprin-TS-solujen 1. FRET-arvot poikkeavat selkeästi 2. ja 3. toistomittauksesta, joiden arvot ovat keskenään huomattavasti samankaltaisempia. Lisäksi datasetin hajonta on huomattavasti suurempaa. Datasetti poistetaan tulosten analysoinnista, sillä se vääristäisi tuloksia selkeästi eikä ole itsessään millään tavalla järkevä eikä luotettavalta vaikuttava tulos. Lisäksi 5-päiväisten kontrollisolujen 2. datasetissä on havaittavissa sama ilmiö, jossa keskiarvo poikkeaa selkeästi tuloksesta, ja hajonta on huomattavasti suurempaa. Epäluotettavilta vaikuttavien tulosten poistamisen vahvistamiseksi tehtiin vielä kahden riippumattoman muuttujan testit siten, että TS-solujen 1. 5-päiväinen setti asetettiin 2. ja 3. setin muodostamaa populaatiota vastaan, ja HL-solujen 2. 5-päiväinen setti asetettiin 1. ja 3. setin muodostamaa populaatiota vastaan. Testi suoritettiin molemmilla maskaustavoilla, ja kummallakin saatiin tulos, jonka mukaan poikkeavilta vaikuttavat datasetit eroavat tilastollisesti merkittävästi vertailukohteistaan.

Voimasensorisolujen kokotumamaskilla mitattu 1. 5-päiväinen mittaussetti eroaa keskiarvolla 0,71 ja hajonnalla 0,29 2. ja 3. mittaussetistä yhdistetyllä keskiarvolla 0,22 ja hajonnalla 0,07 erisuurilla variansseilla (p=$6{,}87 \cdot 10^{-17}$) tilastollisesti merkitsevästi p-arvolla $1{,}14 \cdot 10^{-8}$. Tumakotelomaskilla vastaavasti 1. setti eroaa keskiarvolla 0,77 ja hajonnalla 0,28 2. ja 3. setistä yhdistetyllä keskiarvolla 0,28 ja hajonnalla 0,07 erisuurilla variansseilla (p=$9{,}35 \cdot 10^{-17}$) tilastollisesti merkitsevästi p-arvolla $5{,}78 \cdot 10^{-9}$. Populaatiot on esitelty alla kuvissa 5 ja 6.

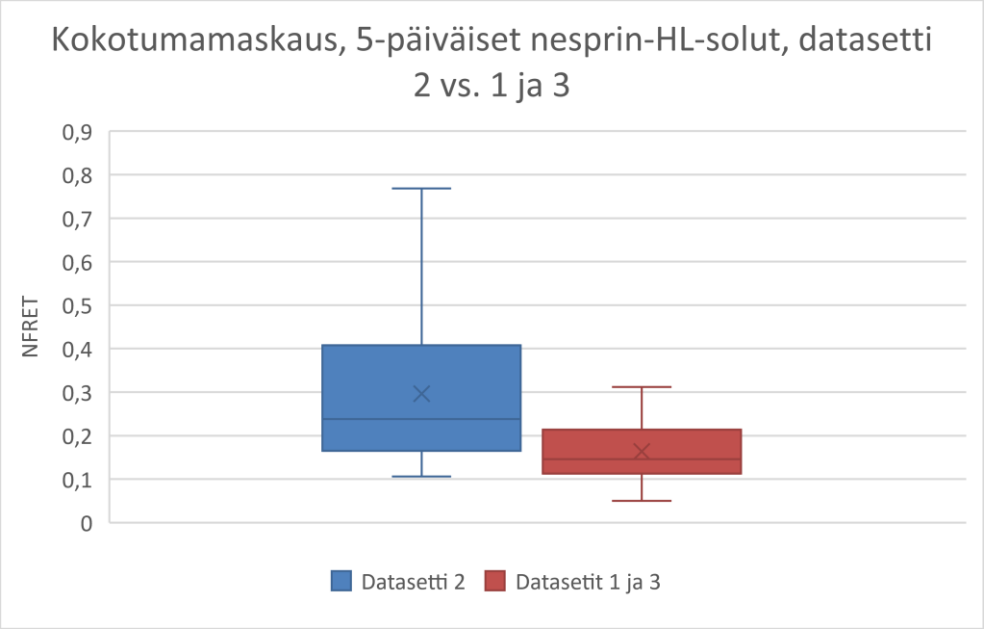


Kuva 5: Voimasensorisolulinjan (TS) datajoukon 1 ero joukkoihin 2 ja 3, kun maskaustapana käytetään koko tuman maskaamista.

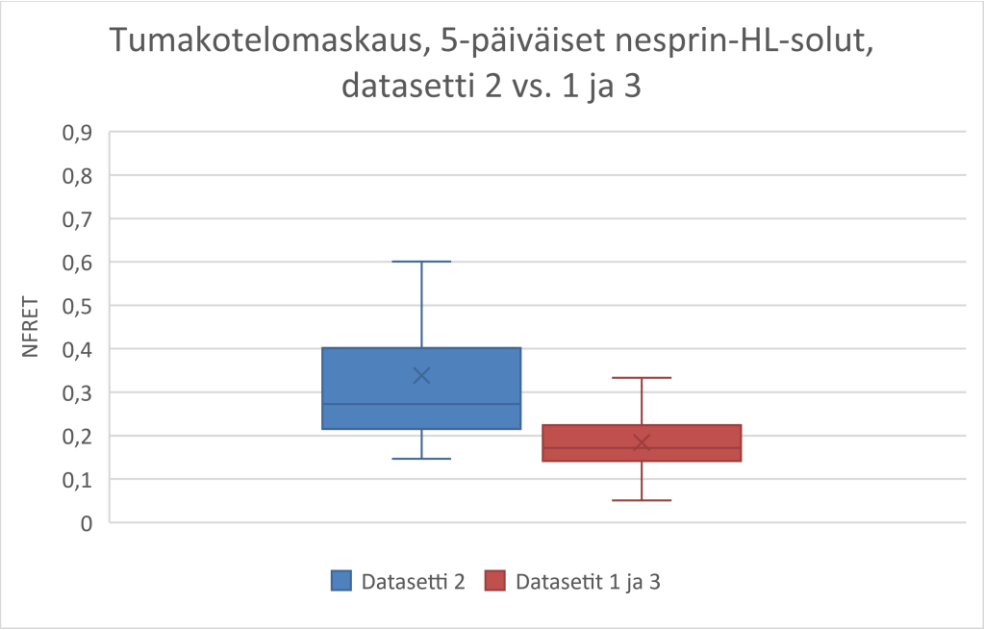


Kuva 6: Voimasensorisolulinjan (TS) datajoukon 1 ero datajoukkoihin 2 ja 3, kun maskaustapana käytetään tumakotelon maskausta.

Vastaavalla tavalla voitiin osoittaa, että 5-päiväisten kontrollisolujen 2. mittaussetti eroaa tilastollisesti merkitsevästi 1. ja 3. populaatioista. Kokotumamaskilla 2. setin keskiarvolla 0,30 ja hajonnalla 0,18 sekä 1. ja 3. setin yhdistetyllä keskiarvolla 0,16 ja hajonnalla 0,08 saatiin erisuurilla variansseilla (p=$4{,}11 \cdot 10^{-7}$) tilastollisesti merkitsevä ero populaatioiden välille p-arvolla $0{,}001$. Tumakotelomaskilla saatiin 2. setin keskiarvolla 0,34 ja hajonnalla 0,19 sekä 1. ja 3. setin keskiarvolla 0,18 ja hajonnalla 0,06 erisuurilla variansseilla (p=$2{,}09 \cdot 10^{-11}$) populaatioiden välille tilastollisesti merkitsevä ero p-arvolla $0{,}0005$. Populaatiot on esitelty kuvissa 7 ja 8.



Kuva 7: Kontrollisolulinjan (HL) datajoukon 5d_2 ero datajoukkoihin 5d_1 ja 5d_3, kun maskaustapana käytetään koko tuman maskausta.

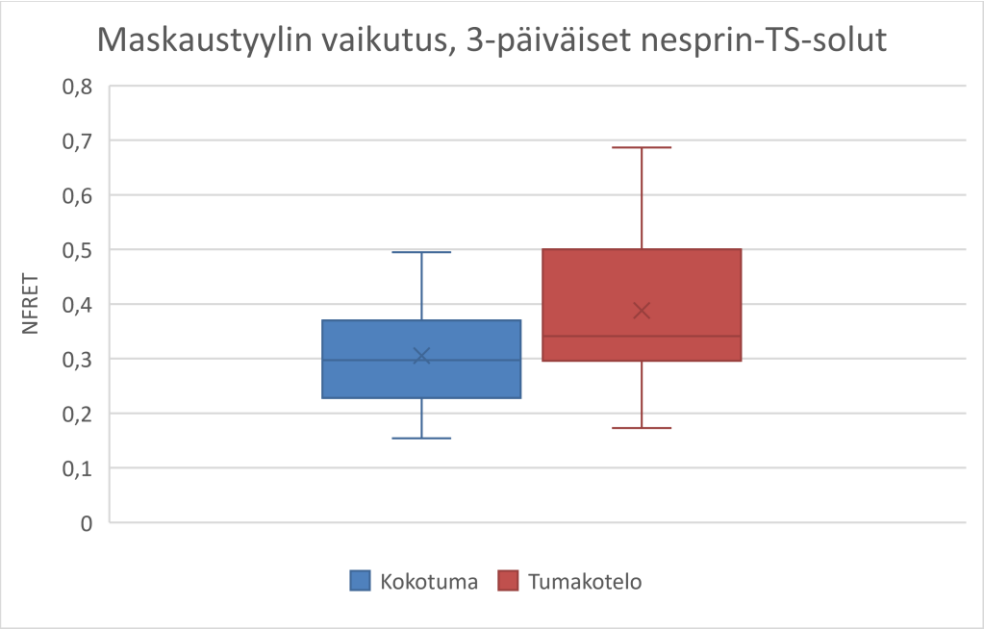


Kuva 8: Kontrollisolulinjan (HL) datajoukon 5d_2 ero datajoukkoihin 5d_1 ja 5d_3, kun maskaustapana käytetään tumakotelon maskausta.

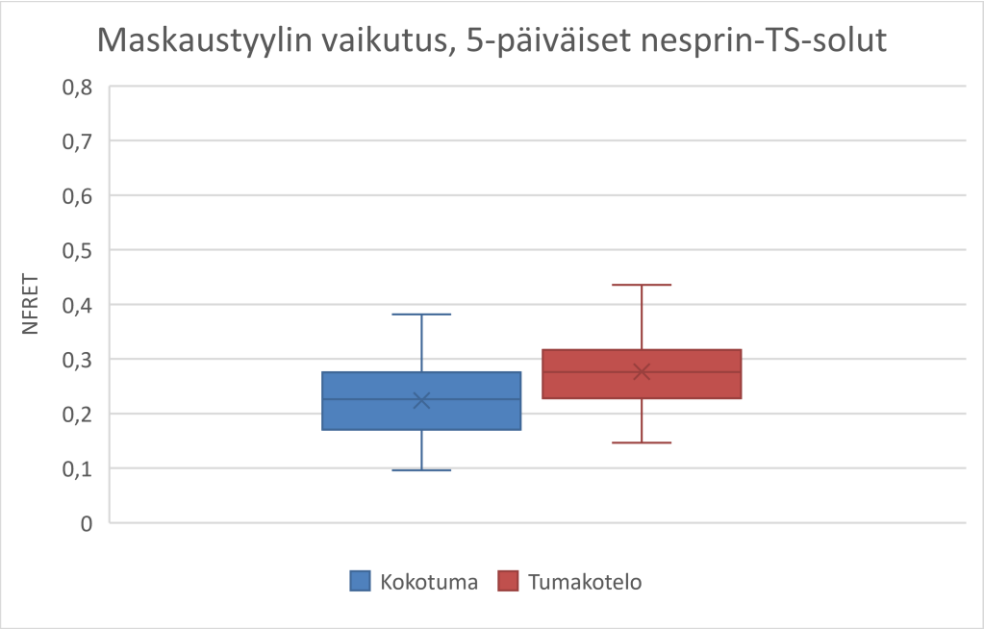
Tulosten perusteella 5-päiväisten nesprin-TS-solujen 1. mittaussetti ja nesprin-HL-solujen 2. mittaussetti hylättiin pois tuloksista niiden suuren tulosten vääristämismahdollisuuden ja mittauksen todennäköisen epäonnistumisen vuoksi.

3.2 Maskaustyylin vaikutus

Maskaamalla koko tuma saatiin selvästi erilaisia tuloksia, kuin maskaamalla tumakotelo. Taulukoiden 1 ja 2 arvoista voidaan nähdä, että 3-päiväisillä soluilla kokotumamaskin arvot ovat keskimäärin 73 prosenttia tumakotelomaskin arvoista. Taulukoista 3 ja 4 nähdään, että 5-päiväisillä soluilla vastaava suhde oli 85 prosenttia. Ero varmistettiin vielä riippumattomien muuttujien erisuurien varianssien t-testillä, jossa saatiin 3-päiväisille soluille kokotumamaskin keskiarvolla 0,31 ja hajonnalla 0,09, ja tumakotelomaskin keskiarvolla 0,39 ja hajonnalla 0,13 populaatioille tilastollisesti merkitsevä ero varianssien p-arvolla 0,007 ja populaatioiden välisellä p-arvolla $1{,}79 \cdot 10^{-5}$. 5-päiväisille soluille saatiin yhtä suurien varianssien riippumattomien muuttujien t-testillä varianssien p-arvolla 0,45 ja populaatioiden p-arvolla 0,0001 myös tilastollisesti merkitsevä ero, kun kokotumamaskin keskiarvo oli 0,22 ja hajonta 0,07, ja tumakotelomaskin keskiarvo oli 0,28 ja hajonta 0,07. Populaatiot on esitetty seuraavalla sivulla kuvissa 9 ja 10.



Kuva 9: Maskaustyylin vaikutus saatuun normalisoituun FRET:n intensiteettiin (NFRET) 3-päiväisissä voimasensorisoluissa.

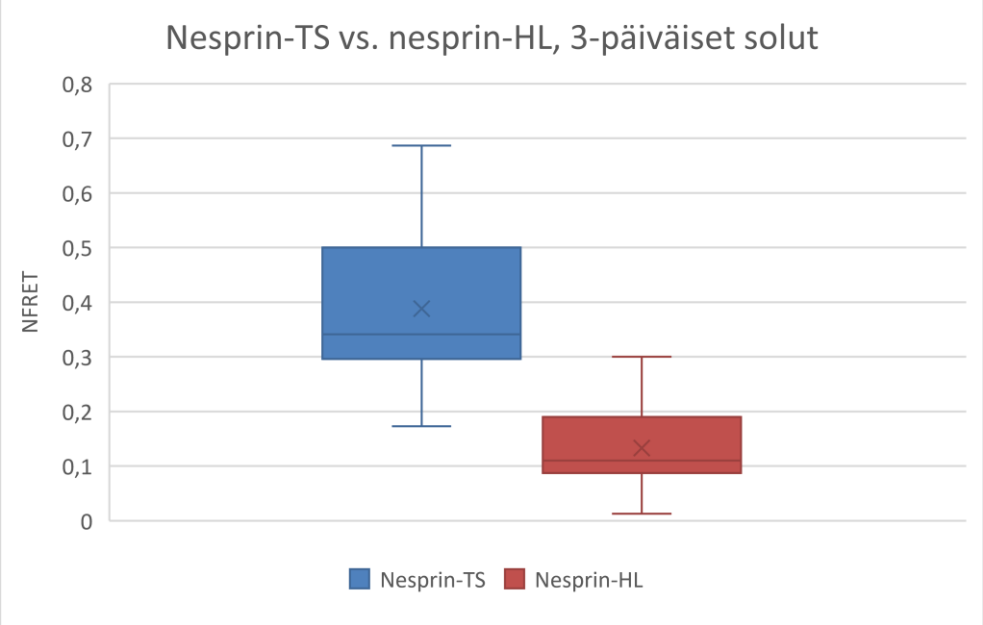


Kuva 10: Maskaustyylin vaikutus saatuun normalisoituun FRET:n arvoon (NFRET) 5-päiväisissä voimasensorisoluissa.

Tulosten perusteella valittiin seuraavissa kohdissa käytettäväksi ainoastaan tumakotelomaskaustyyliä. Tumakotelolla sensorin lokalisaatio on myös vahvempaa, ja näin saadaan parempia tuloksia LINC-kompleksin sijaintia ajatellen.

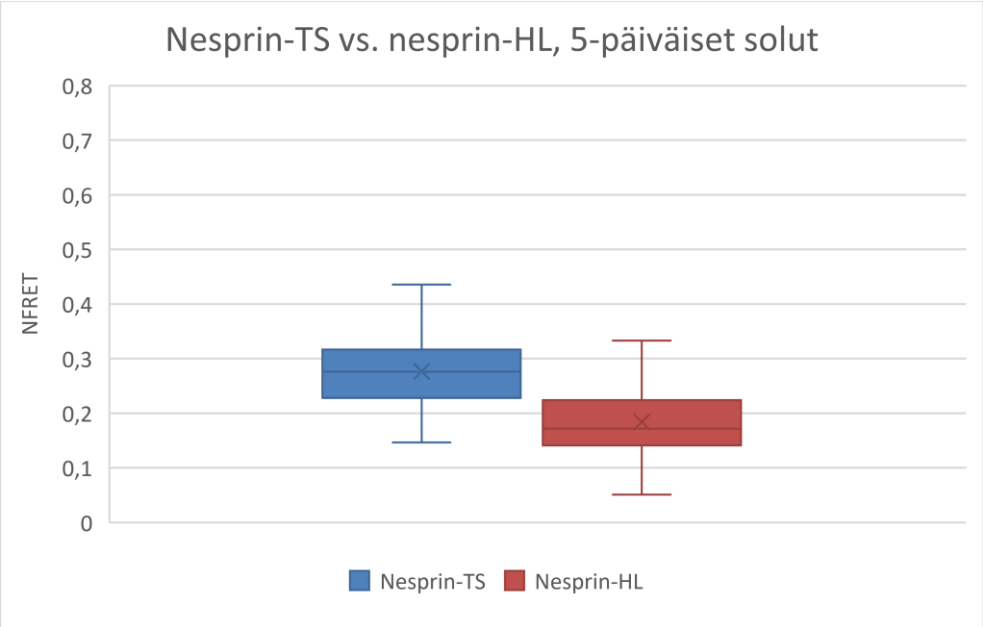
3.3 Eri sensorien vertailu, TS ja HL

Nesprin-TS:n ja Nesprin-HL:n väliltä löydettiin myös tilastollisesti merkitsevä ero. 3-päiväisissä soluissa TS:n keskiarvolla 0,39 ja hajonnalla 0,13 sekä HL:n keskiarvolla 0,13 ja hajonnalla 0,07 saatiin eroavilla variansseilla (p=$6{,}70 \cdot 10^{-7}$) p-arvoksi $8{,}12 \cdot 10^{-29}$. Populaatioiden jakaumat on esitetty kuvassa 11.



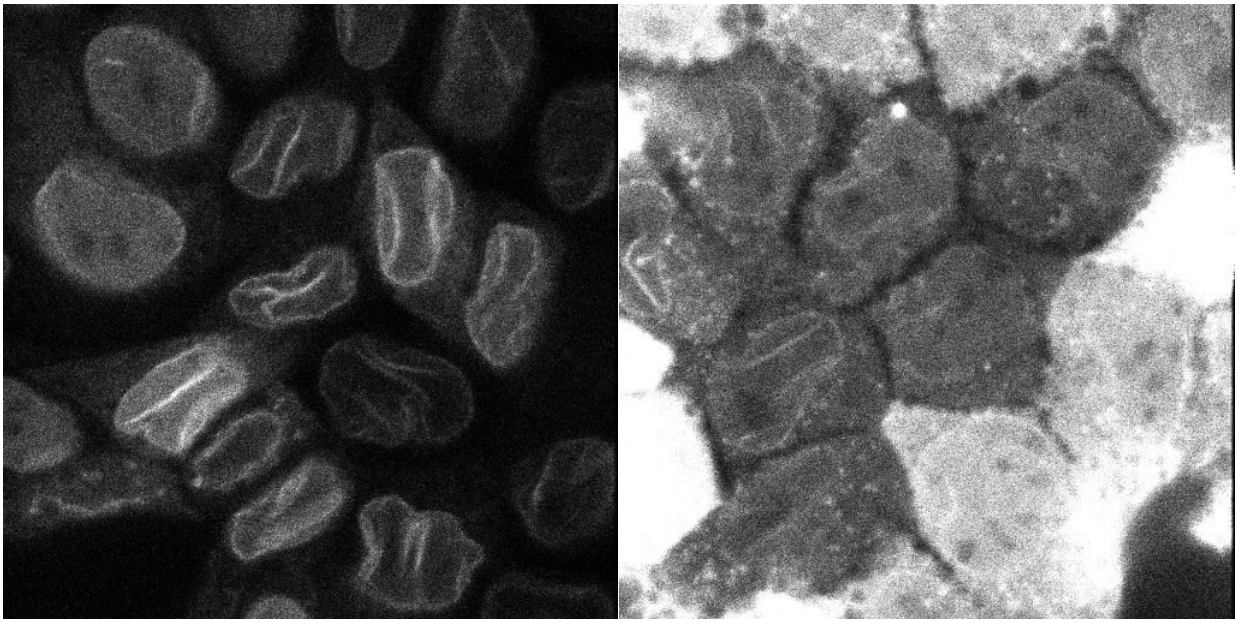
Kuva 11: Normalisoidun FRET:n (NFRET) ero 3-päiväisissä voimasensori- ja kontrollisoluissa.

5-päiväisissä soluissa saatiin tulokseksi TS:n keskiarvolla 0,28 ja hajonnalla 0,07 ja HL:n keskiarvolla 0,18 ja hajonnalla 0,06 olettaen yhtä suuret varianssit (p=0,29) p-arvoksi $8{,}17 \cdot 10^{-11}$. Jakaumat on esitelty kuvassa 12.



Kuva 12: Normalisoidun FRET:n (NFRET) ero 5-päiväisissä voimasensori- ja kontrollisoluissa.

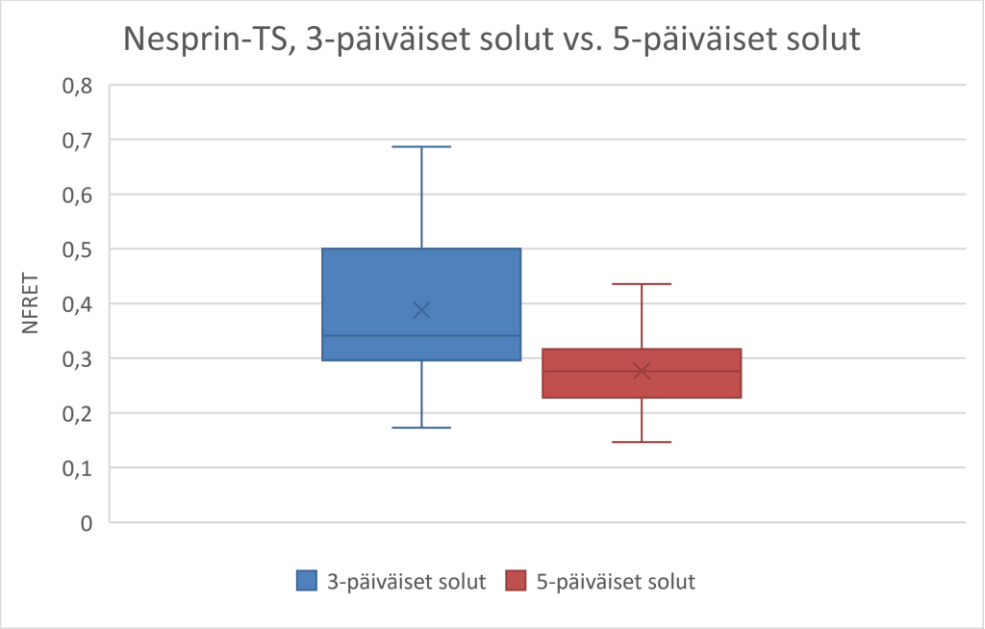
Tuloksista nähdään, että voimasensorin ja sen kontrollin välillä on sekä 3- että 5-päiväisten solujen kohdalla selkeä ero. Kontrollisensorin tulos on kuitenkin väärä suhteessa voimasensoriin, sillä saadun FRET:n tulisi olla huomattavasti korkeampaa, eikä matalampaa. Tulosten pohjalta HL:a ei voida luotettavasti käyttää muiden tulosten arvioinnissa. Vertailemalla nesprin-TS:n ja nesprin-HL:n kuvia huomattiin, että nesprin-HL:n lokalisaatio ei ole keskittynyt tumakoteloon, vaan tasaisesti koko tuman alueelle. Ero lokalisaatiossa on havainnollistettu alla kuvassa 13.



Kuva 13: Nesprin-TS:n (vas.) ja nesprin-HL:n (oik.) luovuttajakanavat. Kuvista nähdään, että nesprin-HL, tai ainakin mTFP1 lokalisoituu todella huonosti tumakotelolle verrattuna nesprin-TS:iin, ja vaikuttaisi leviävän tasaisesti myös tuman ulkopuolelle sytosoliin.

3.4 3- ja 5-päiväiset voimasensorisolut

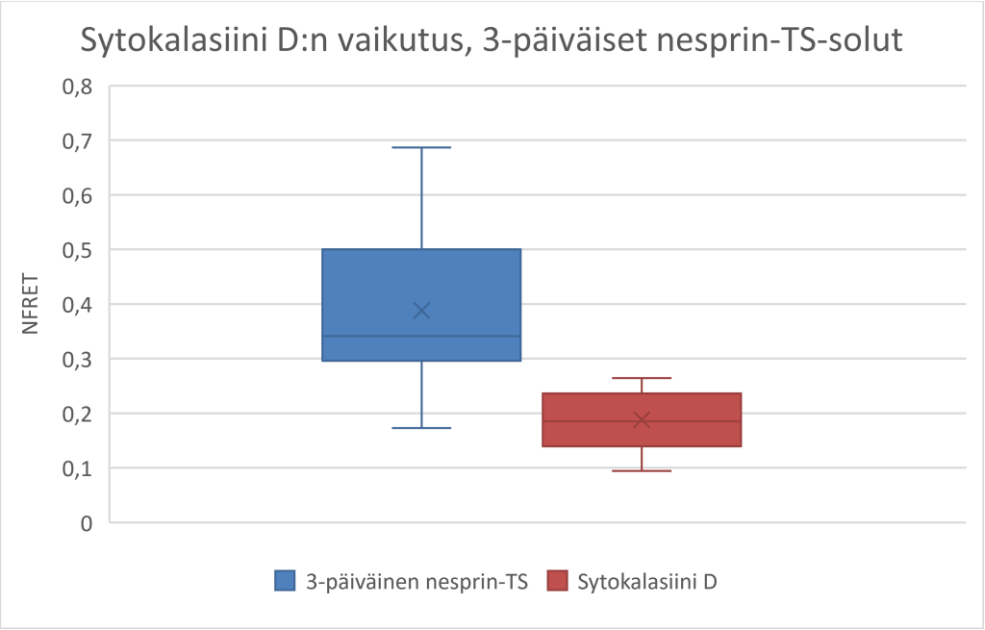
Kolme ja viisi päivää kasvatettujen solujen väliltä löydettiin myös ero. 3-päiväisten solujen keskiarvolla 0,39 ja hajonnalla 0,13 sekä 5-päiväisten solujen keskiarvolla 0,28 ja hajonnalla 0,07 saatiin olettaen erisuuret varianssit (p=$1{,}71 \cdot 10^{-6}$) populaatioiden välille tilastollisesti merkitsevä ero p-arvolla $4{,}64 \cdot 10^{-9}$. Populaatiot on esitelty kuvassa 14.



Kuva 14: 3- ja 5-päiväisten solujen tuottaman normalisoidun FRET:n (NFRET) ero.

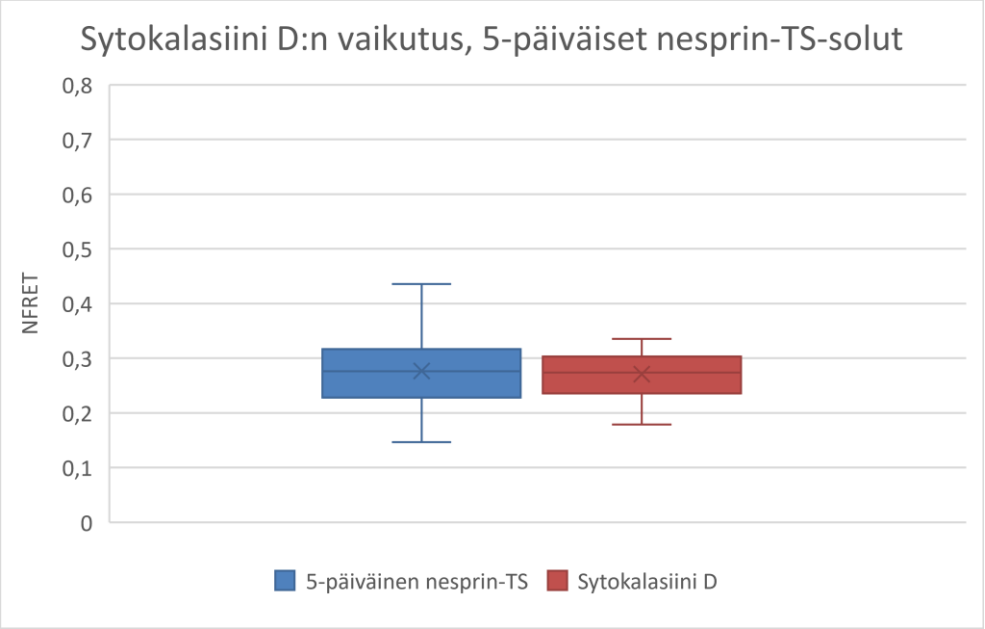
3.5 Sytokalasiini D:n vaikutus

Sytokalasiini D:n lisäämisen vaikutuksesta saatiin 3-päiväisten voimasensorisolujen keskiarvolla 0,39 ja hajonnalla 0,13 sekä sytokalasiini D:n vaikutuksen alaisten 3-päiväisten solujen keskiarvolla 0,19 ja hajonnalla 0,05 olettaen erisuuret varianssit (p=$6{,}84 \cdot 10^{-6}$) p-arvoksi $2{,}11 \cdot 10^{-18}$. Populaatioiden jakaumat on esitelty kuvassa 15.



Kuva 15: Sytokalasiini D:n lisäyksen vaikutus 3-päiväisten voimasensorisolujen tuottamaan normalisoituun FRET:iin (NFRET).

Vastaavasti 5-päiväisille soluille saatiin voimasensorisolujen keskiarvolla 0,28 ja hajonnalla 0,07 sekä sytokalasiini D:n vaikutuksen alaisena olleiden 5-päiväisten solujen keskiarvolla 0,27 ja hajonnalla 0,04 olettaen erisuuret varianssit ($p=0{,}008$) p-arvoksi $0{,}64$. Populaatiot on esitelty alla kuvassa 16.



Kuva 16: Sytokalasiini D:n lisäyksen vaikutus 5-päiväisten voimasensorisolujen tuottamaan normalisoituun FRET:iin (NFRET).

3.6 Johtopäätökset

Tuloksista nähdään, että maskaustavalla on selkeä vaikutus siihen, minkälainen arvo mitatulle FRET:lle saadaan. Tämän vuoksi on ehdottomasti parempi valita maskaustavaksi aina tumakotelo LINC-kompleksia tutkiessa kuten juuri Arsenovic ym. (2016) ovat tehneet, sillä LINC-kompleksin lokalisaatio on lähtökohtaisesti tumakotelolla, ja tällöin saadaan kalvorakenne myös tarkennettua hyvin mikroskoopilla mahdollisimman tarkkaa maskausta varten. Vertailemalla maskaustyylien arvoja nähtiin myös, että koko tuman kattavalla maskilla saadut intensiteettiarvot ovat noin 75–85 prosenttia vain tumakotelon maskaamalla saatuihin tuloksiin verrattuna. Vaikka tumakotelon maskaaminen viekin huomattavasti enemmän aikaa, on se analyysin tarkkuuden vuoksi välttämätöntä.

Voimasensorisolujen ja kontrollisolujen välillä tuloksissa näkyvä ero on kyseenalainen. Nyt kontrollisolut tuottavat äärimmäisen pientä FRET:iä, joka viittaisi valtavan suureen voimaan, sillä voiman kasvaessa FRET-signaalin voimakkuus laskee. Tämä tulos on erittäin ristiriitainen, sillä kontrollisolujen nesprin-HL:ssa aktiiniin sitoutuva pää on katkaistu, minkä tulisi rentouttaa sensori, ja antaa varsinaista sensoria huomattavasti suurempia FRET-arvoja. Tulos on huolestuttava, sillä se viittaa siihen, että kontrollisensori ei toimi. Sen perusteella ei voida olla täysin varmoja, että myöskään itse nesprin-TS:ia sisältävät solut toimivat oikealla tavalla. Koska kaikista TS-soluista on kuitenkin saatu yhteneväisiä tuloksia yhtä 5-päiväistä mittaussarjaa lukuun ottamatta, voidaan olettaa, että sensori itsessään toimii, ja vain HL-soluissa on jotain vialla. Voi olla mahdollista, että kontrollisoluissa on tapahtunut jokin mutaatio, joka on vaikuttanut esimerkiksi sensorin jousirakenteeseen, tai sitten katkaistuun aktiiniin sitoutuvaan päähän. Mikäli mutaatio on tapahtunut aktiiniin sitoutuvaan päähän, se voisi johtaa esimerkiksi sensorin sitoutumiseen johonkin täysin toisenlaiseen rakenteeseen, mikä voisi taas johtaa siihen, että sensori venyy ja näyttäisi indikoivan kasvavaa voimaa. Tämä on toki hyvin epätodennäköistä, mutta ei täysin poissuljettua. Lisäksi kuvassa 13 esitelty ero lokalisaatiossa kielii myös jonkinlaisesta ongelmasta sensorissa. Arsenovic ym. (2016) toteavat artikkelissan, että nesprin-HL ei lokalisoidu tumakalvolle aivan niin hyvin kuin nesprin-TS. Artikkelissa (Arsenovic ym. 2016, Fig. 1B) on kuitenkin nähtävissä paljon parempi lokalisaatio nesprin-HL:lle juuri tuman osalta, kuin tässä tutkimuksessa käytetyissä soluissa. Joka tapauksessa koska kontrollisolujen tulokset ovat hyvin epäluotettavia, keskityttiin muissa tuloksissa vain voimasensorilinjan tuloksiin. Mikäli mahdollista, tulisi nyt tulosten varmentamiseksi transfektoida täysin uusi kontrollisolulinja, ja suorittaa vastaavat mittaukset näille soluille uudestaan. Mikäli lokalisaatiossa nähtäisiin edelleen eroja, ja FRET-tulokset olisivat päälaellaan, olisi todennäköisesti itse mittausasetelmassa jotain ongelmallista.

Tärkein tulos itse päätutkimuskysymyksen kannalta saadaan tutkittaessa 3 ja 5 päivää kasvatettujen voimasensorisolujen FRET-eroja. Tuloksissa näkyy selkeä ero, mikä tarkoittaa, että tumaan kohdistuvat LINC-kompleksin kautta välittyvät voimat ovat suurempia viisi päivää kasvatetuissa soluissa, sillä näiden solujen FRET-arvot ovat pienempiä, eli sensori on venyneessä tilassa. Viisi

päivää kasvatetut solut olivat lähtökohtaisesti konfluentteja, kun taas 3-päiväset eivät vielä olleet, joten yksi selitys kasvaneille voimille voisi löytyä nyt nimenomaan epiteelisolukon tiheydestä. Toki aivan suoraan tällaista johtopäätöstä ei vielä tästä tuloksesta yksin voida tehdä, sillä muutoksessa 3-päiväisistä 5-päiväisiksi soluiksi tapahtuu myös muita muutoksia esimerkiksi solujen kasvuympäristössä kuin ainoastaan solujen konfluenssiuden kasvu. Esimerkiksi solujen mediumin vähenevä ravintotaso voisi vaikuttaa omalta osalta solujen toimintaan, samoin kuin solujen itse ympäristöönsä erittämät aineet, kuten signalointimolekyylit tai ekstrasellulaarisen matriksin komponentit. Nämä muutokset eivät kuitenkaan välttämättä ole ympäristön suurin muutos matkalla 3-päiväisistä 5-päiväisiksi soluiksi, joten solukon tiiviyden kasvu on hyvin potentiaalinen ehdokas kasvaneita voimia selittämään.

Kun epiteelisolukko kasvaa ja muuttuu konfluentimmaksi, solut alkavat muodostaa keskenään liitoksia vierekkäisten solujen kanssa. Muodostuvien liitosten joukossa on tiivisliitoksia ja vyöliitoksia, joista molemmat kykenevät sitomaan vierekkäisten solujen aktiinitukirangat yhteen. Tämä puolestaan johtaa siihen, että soluille muodostuu selkeä apikaalinen ja basolateraalinen puoli, eli solu polarisoituu. (Alberts ym. 2015) Lisäksi epiteelin maturaatiossa tapahtuu mesenkyymi-epiteelitransitiota (MET). MET:ssa mesenkymaaliset solut muuntuvat epiteelimäisiksi, ja saavat apikaalis-basolateraalisen polariteettinsa. Polariteettia muodostaessa solun polariteettiin liittyvät pintareseptorit luovat eri kalvodomeeneja, jotka lopulta johtavat tiivisliitosten muodostumiseen sekä solun tukirangan että organellien uudelleenorganisaatioon. (Pei ym. 2019) MET:lla on olemassa myös käänteisprosessi, epiteeli-mesenkyymitransitio (EMT), jossa taas epiteelisolut menettävät polariteettinsa, solu-soluliitoksensa ja osittain myös adheesionsa kehittäessään kyvyn migroida pois epiteelistä (Francou ym. 2020). Koska solun poistuessa epiteelistä se saa mesenkymaalisia ominaisuuksia, on siis vielä kasvuvaiheessa olevalla epiteelisolukolla oltava mesenkymaalisia ominaisuuksia, sillä solut eivät ole muodostaneet täyttä epiteelisolukkoa ja käyneet täydellisesti läpi MET:ta. Lisäksi esimerkiksi vyöliitoksissa mekaaninen stressi saa aikaan α-kateniinin avautumisen, joka johtaa vinkuliinin sitoutumiseen, joka puolestaan johtaa lisääntyneeseen aktiinin sitoutumiseen liitoskohtaan, joka puolestaan vahvistaa liitosta (Alberts ym. 2015). Pei ym. (2019) esittävät myös, että MET:ssa kortikaalinen eli solukalvonalainen aktiiniverkko muuttuu kontraktiiliksi, mikä vaikuttaa esimerkiksi luumenin muodostumiseen solu-solukontakteissa. MET:ssa tapahtuu myös kortikaalisen aktiiniverkon stabiloitumista, joka johtaa vyöliitosten vahvistumiseen. Kortikaalisen aktiiniverkoston osallistuminen vyöliitosten vahvistamiseen vaikuttaa prosessilta, joka liittyisi suoraan aiemmin mainittuun vinkuliinin sitoutumiseen vyöliitoksen α-kateniineihin ja täten aktiinin sitoutumisen tehostamiseen.

Koska epiteelisolukon vanhentuessa 3-päiväisestä 5-päiväiseksi tapahtuu solukon selkeää kypsymistä ja täydellisen konfluenssiuden saavuttaminen, olisi loogista, että edellä mainittuja epiteelisolukon muutoksia tapahtuu tässä prosessissa. Arsenovic ym. (2016) osoittivat, että nespriini-2G

reagoi nimenomaan aktomyosiinijännitteeseen sekä solun muodon muutoksiin. Heidän käyttämänsä solut olivat kuitenkin hiiren NIH3T3 fibroblasteja. Koska kyseessä oli nimenomaan nespriini-2G:n reagointi jännitteeseen, voidaan olettaa, ettei reaktio olennaisesti muutu fibroblastien ja epiteelisolujen välillä, sillä LINC-kompleksi ja siihen liittyvät komponentit sekä toiminnot ovat hyvin konservoituneita ainakin nisäkkäissä, vaikka lajikohtaisia eroja on olemassa (Kim ym. 2015). Epiteelin maturaatiossa ja MET:ssa käydään lävitse aktiinitukirangan jännitettä kasvattavia tapahtumia, kuten kortikaalisen aktiiniverkon stabiloitumista ja kontraktiota. Tämän perusteella vaikuttaa siltä, että mitattu vähentynyt FRET eli kasvanut voima 5-päiväisissä soluissa voisi liittyä näihin prosesseihin. Kuvista 4 ja 13 nähdään myös, että 5-päiväisten solujen täytyy olla kontraktoituneempia kuin 3-päiväisten, sillä kuvissa selkeästi näkyvien tumien määrä on paljon suurempi kuvassa 13 kuin kuvassa 4, mikä viittaa samankokoisella alueella olevan enemmän soluja. Lisäksi monet 5-päiväisten solujen tumista ovat pitkulaisemman näköisiä kuin 3-päiväiset, ja Arsenovic ym. (2016) esittivätkin havainnon siitä, että ainakin fibroblasteissa solujen elongaatio voisi kasvattaa LINC-kompleksiin kohdistuvia voimia. Heidän mukaansa nespriini-2G myös kääntyisi tämän fyysisen voiman suuntaisesti, mikä taas mahdollisesti voisi johtaa kuvassa 13 havaittavaan tumien elongaatioon. Koska nyt 3 ja 5 päivän välille sijoittuu monia solun aktiinitukirankaa sekä solun muotoa jäykistäviä tapahtumia, jotka hyvin todennäköisesti välittyvät nimenomaan aktiinitukirangan jännitettä aistivaan nespriini-2:een ja sitä kautta LINC-kompleksiin, voidaan esittää, että havaittu tumaan kohdistuvien voimien kasvu johtuu nimenomaan solujen aktiinitukirangan jäykistymisestä, eikä jostain ulkoisesta tekijästä, joiden osuus tällaisten tapahtumien rinnalla on todennäköisesti äärimmäisen marginaalinen. Tästä puolestaan voidaan edelleen esittää, että epiteelisolukon kasvanut tiheys kasvattaa siis tuman LINC-komplekseihin kohdistuvia voimia. Päätelmää tukevat aiemmin esitetyt tutkimukset, joissa todetaan epiteelisolukon maturaatioon kuuluvan tapahtumia, jotka vaikuttavat aktiinitukirangan jännitykseen.

Sytokalasiini D:n vaikutuksen alaisissa nesprin-TS-soluissa havaittiin mielenkiintoinen ilmiö: 3-päiväisissä soluissa sytokalasiini D:n lisääminen kasvatti huomattavasti LINC-kompleksivälitteisiä voimia, kun taas 5-päiväisissä TS-soluissa ei löydetty minkäänlaista eroa voimissa. Koska sytokalasiini inhiboi aktiinitukirangan polymerisaatiota, voisi olla mahdollista, että 3-päiväisissä soluissa, joissa aktiinitukiranka on vielä dynaamisempi, sillä ne eivät todennäköisesti ole käyneet läpi esimerkiksi kortikaalisen aktiinitukirangan stabiloitumista muodostaessaan vahvempia liitoksia naapurisolujensa kanssa, polymerisaation inhibointi vaikuttaa rankemmin soluun. Jos oletetaan, että 3-päiväiset solut omaavat vielä mesenkymaalisempia ominaisuuksia ja kykenevät helpommin migroimaan, on aktiinin polymerisaatio näille soluille äärimmäisen tärkeää esimerkiksi niiden liikkumisen kannalta. Alberts ym. (2015) kertoo epiteelisolujen liikkuvan nimenomaan aktiinitukirankaan liittyvällä polymerisaatiomekanismilla, joka työntää soluja. Nyt käytännössä siis sytokalasiini D:n

täytyy rampauttaa solujen liikkumiskyky, mutta se, miten tämä kasvattaa tumaan kohdistuvia voimia, ei selity suoraan. Yksi selitys voisi liittyä tuman sijoitteluun solussa: kuten Gundersen ym. (2013) esittävät, migroivissa soluissa tuma on usein sijoitettuna solun peräosaan kauas etenevästä reunasta. Kenties sytokalasiini D:n rampauttaessa solujen migraatioprosesseja tuma siirtyy toiseen kohtaan solua. Aktiinisäikeet, mikrotubulukset ja moottoriproteiinit ovat isoimmassa osassa tuman siirtelyä, joten solun liikkeen pysähtymisestä johtuva tuman siirtäminen, ja tätä kautta aktiinitukirangasta nespriini-2:een ja siitä LINC-kompleksiin kohdistuvien voimien kasvaminen voisi selittää nyt muutokset FRET-signaalissa. Toki kaikki 3-päiväiset solut eivät välttämättä enää liiku, mutta aktiinitukirangassa tapahtuu joka tapauksessa muutoksia sen polymerisaation inhiboituessa. Se, miksi 5-päiväisissä soluissa tällaisia muutoksia ei havaita, voisi johtua siitä, että solut ovat jo tiukasti ankkuroituneet paikalleen, aktiinitukiranka on jo stabiloitunut eikä näin enää niin suuren polymerisaation alla, ja solulla ei myöskään ole tarvetta alkaa siirtämään tumaa, sillä se on jo valmiiksi oikealla paikallaan.

Tuloksia tulkitessa on myös huomioitava, että FRET-sensorin yliekspressointi voi aiheuttaa huomattavia muutoksia tuloksiin. Arsenovic ym. (2016) esittävät, että heidän tutkimuksissaan sensori oli ekspressoitunut matalalla tasolla, ja tarkasteltaessa tässä tutkimuksessa otettuja kuvia sensoreista, sekä saatuja FRET-arvoja, voidaan tulla samaan johtopäätökseen. Kenties nesprin-HL-soluissa voi olla tapahtunut yliekspressiota, sillä solut ja tumat ovat kuvissa huomattavasti kirkkaampia kuin nesprin-TS-solut, ja HL-soluista saadut kanavien fluoresenssiarvot saattoivat olla jopa yli viisinkertaisia. Tämä yhdessä mahdollisen mutaation kanssa on todennäköisesti syynä nesprin-HL:n epäluotettaviin tuloksiin. Lisäksi on mahdollista, että kuten Arsenovic ym. (2016) esittävät, myös intermolekulaarinen FRET on mahdollista, mikäli nespriinit dimerisoituvat. He kuitenkin esittävät, että mininespriini-2G:llä on rajoittunut kyky dimerisoitua, mikä vähentää tätä mahdollisuutta tutkimuksessa huomattavasti.

Tämän tutkimuksen tulosten pohjalta on nyt esitetty, että tuman LINC-kompleksiin kohdistuvat voimat kasvavat epiteelin tiheyden kasvaessa. Tietääkseni yhtään vastaavaa tulosta ei ole esitetty aiemmin, tai jos on, ei sellaisia tuloksia esitteleviä artikkeleja ole ainakaan helposti löydettävissä. Seuraava vaihe tutkimuksessa voisi olla selvittää, miten nespriini-1-välitteiset voimat vaikuttavat LINC-kompleksiin, sillä nespriini-1:n on osoitettu myös sitoutuvat aktiiniin, ja Arsenovic ym. (2016) esittävät jo, että myös sillä voisi olla osuutta LINC-kompleksiin kohdistuvien aktiiniperäisten voimien kannalta. Myös välikokoisten säikeiden, jotka sitoutuvat nespriini-3:een, ja mikrotubulusten, jotka sitoutuvat nepsriini-4:ään (Arsenovic ym. 2016, Rajgor ym. 2013) vaikutukset tumaan kohdistuviin voimiin tulisi selvittää. Näin voidaan saada lisää todistusaineistoa sille, että voimat todella kasvavat epiteelin tiheyden kasvaessa, tai löytää kenties jotain uusia tuloksia, mikäli jokin näistä voimista selkeästi heikkenisi. Välikokoisista säikeistä tiedetään, että ne muodostavat desmosomeja vierekkäisten solujen kanssa ja kontribuoivat osaltaan solujen jäykkyyteen (Alberts ym.

2015), ja mikrotubuluksilla puolestaan on erityisen suuri osuus mitoosissa, mutta niiden tiedetään myös osallistuvan apikaalisten värekarvojen muodostamiseen sekä vesikkeliliikenteeseen jolla kuljetetaan proteiineja solu-soluliitoksiin (Vasileva ym. 2018). Mikrotubulusten orientaatio epiteelisoluissa muuttuu myös radikaalisti solun polarisoituessa (Vasileva ym. 2018, Fig. 1). Tämän tiedon sekä välikokoisista säikeistä että mikrotubuluksista pohjalta voisi olettaa, että ainakin nespriini-3-välitteisissä voimissa näkyisi samankaltaista kasvua kuin nespriini-2G-välitteisissä solujen muodostaessa useampia liitoksia keskenään, ja myös nespriini-4-välitteisissä voimissa voitaisiin nähdä jonkinlaisia muutoksia, mutta on hanakala sanoa mihin suuntaan. Lisäksi nespriini-1-välitteisissä voimissa oletettavasti nähtäisiin samoja vaikutuksia kuin nespriini-2G-välitteisissä voimissa, sillä molemmat ovat aktiinitukirangasta kohdistuviin voimiin reagoivia proteiineja. Seuraavana olisi olennaista kehittää voimasensorit näille nespriineille, sillä sellaisia ei vielä ole olemassa, tai ainakaan esiteltynä julkaistuissa tutkimuksissa. Tämän jälkeen näillä voitaisiin tutkia lisää epiteelin tiivistymisestä tumaan kohdistuvia voimia.

4. YHTEENVETO

Mekanobiologian noustessa yhä tärkeämmäksi osaksi biologista tutkimusta sen jälkeen, kun mekaanisten signaalien huomattiin vaikuttavan solujen toimintaan, mekanotransduktiivisten prosessien tutkimisen tärkeys on korostunut. Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää, vaikuttaako epiteelisolukon tiheys yksittäisten epiteelisolujen tumien LINC-komplekseihin kohdistuviin voimiin.

Tutkimus toteutettiin tutkimalla koiran munuaisesta eristettyjä MDCK II -soluja (ATCC® CCL-34™), joihin oli transfektiolla tuotu TSmodista (Grashoff ym. 2010) ja mininespriini-2G:stä (Östlund ym. 2009) rakennettu nesprin-TS-niminen molekulaarinen voimasensori (Arsenovic ym. 2016), jonka toiminta perustui Theodor Försterin 1946 esittämään Försterin resonanssienergiansiirtoilmiöön, FRET:iin (Förster 1946). FRET:ssä kahden toisiinsa kytketyn fluoresoivan molekyylin systeemissä luovuttajafluoroforin energia siirtyy ilman säteilyä vastaanottajafluoroforille (Govorov ym. 2016). Koska prosessin tehokkuus heikkenee hyvin nopeasti etäisyyden kasvaessa (Govorov ym. 2016), nähdään suoraan nesprin-TS:n tuottaman FRET:n määrästä onko sensori venynyt jonkin siihen kohdistuvan voiman vaikutuksesta.

Tutkimuksessa havaittiin, että maskaamalla kuvista koko tuma saadaan noin 80 % siitä FRET-arvosta, joka saadaan maskaamalla tumakotelo. Tämän vuoksi LINC-kompleksiin kohdistuvia voimia tutkittaessa tulisi aina maskata nimenomaan tumakotelo LINC-kompleksin lokalisaation vuoksi. Tutkimuksessa havaittiin myös, että nesprin-TS:n kontrollisensori nesprin-HL, jonka aktiiniin sitoutuva pää on katkaistu, ei lokalisoidu kunnolla, ja tuottaa kyseenalaisia FRET-arvoja. Arvot viittaavat sensoriin kohdistuvan hyvin suuria voimia, minkä ei pitäisi olla mahdollista. Kontrollisensorin uskotaan mutatoituneen, mutta luotettavan kontrollin puute vaikuttaa myös muihin tutkimustuloksiin negatiivisesti. Kontrollisolulinja tulisi pystyttää kokonaan uusiksi, ja suorittaa uudet mittaukset tulosten varmentamiseksi.

Voimasensorilla saaduista tuloksista kävi ilmi, että 5 päivää kasvatettujen solujen tumiin kohdistuu selkeästi suurempia voimia kuin 3 päivää kasvatettujen solujen tumiin. Tämän havainnon esitetään johtuvan nimenomaan epiteelin tiiviyden lisääntymisestä. Prosesseissa, joita 3-päiväiset solut käyvät läpi matkalla 5-päiväisiksi, eli epiteelin maturaatio ja MET, tapahtuu radikaaleja aktiinitukirangan muutoksia (Alberts ym. 2015, Pei ym. 2019, Francou ym. 2020). Muutokset ovat niin merkittäviä, että kaikki muut tumaan kohdistuviin voimiin mahdollisesti vaikuttavat tekijät, kuten esimerkiksi muutokset solujen kasvumediumissa, jäävät hyvin vähäisiksi.

Tutkittaessa aktiinin polymerisaatiota inhiboivan sytokalasiini D:n vaikutusta 3- ja 5-päiväisiin soluihin huomattiin, että 3-päiväisten solujen LINC-kompleksivälitteiset voimat kasvavat, mutta 5-päi-

väisissä soluissa ei tapahdu merkittävää muutosta. Tämä johtuu mahdollisesti siitä, että 3-päiväisten solujen liikkuessa niiden tuma on sijoiteltuna liikkeen kannalta solun peräosaan (Gundersen ym. 2013), ja kun sytokalasiini D rampauttaa solujen liikkumiskyvyn (Dubinsky ym. 1999), aletaan tumaa siirtämään kohti solun keskiosaa kuten polarisoituneilla epiteelisoluilla. Tuman siirto aiheuttaisi voimia LINC-kompleksiin, sillä tumaa siirretään osittain aktiinitukirankaa hyödyntäen (Alberts ym. 2015). Koska 5-päiväiset solut ovat jo asettuneet epiteeliin ja polarisoituneet, jonka vuoksi niiden aktiinitukiranka ei ole enää yhtä dynaaminen kuin 3-päivisillä soluilla, eikä tumaa ole tarvetta siirtää, ei sytokalasiini D:stä havaita mitään vaikutuksia voimiin.

Molekulaaristen voimasensorien käyttöön liittyy tiettyjä epävarmuustekijöitä, kuten sensorin ekspressiotaso. Nesprin-TS:n ekspressio on kuitenkin optimaalinen mittauksia varten, mutta nesprin-HL oli mahdollisesti yliekspressoitunut. Tämä ja huonompi lokalisaatio kuin nesprin-TS:lla johtivat todennäköisesti huonoihin kontrollituloksiin. Lisäksi itse nesprin-TS:n on mahdollista dimerisoitua, mikä johtaa intermolekulaariseen FRET:iin, mutta tämän on näytetty Arsenovic ym. (2016) aiemmissa tutkimuksissa olevan epätodennäköistä.

Tutkimuksessa saatujen tulosten pohjalta esitetään, että epiteelin tiivistyminen johtaa tuman LINC-kompleksiin kohdistuvien voimien kasvamiseen. Seuraavana vaiheena tulisi selvittää miten nespriini-1-välitteiset voimat reagoivat epiteelin tiivistymiseen, sillä myös nämä nespriinit oletettavasti välittävät aktiinitukirangasta kohdistuvia voimia tumaan (Arsenovic ym. 2016). Tätä seuraisi nespriini-3:n ja sen kautta välikokoisten säikeiden aiheuttamien voimien tutkiminen epiteelin tiivistyessä, ja nespriini-4:n ja sitä kautta mikrotubulusten aiheuttamien voimien tutkiminen vastaavassa tilanteessa. Kaikkien näiden rakenteiden on osoitettu muokkautuvan epiteelisolujen polarisoituessa tai käydessä läpi MET:ta (Alberts ym. 2015, Vasileva ym. 2018), minkä pohjalta voidaan alustavasti olettaa, että epiteelin tiivistyessä tultaisiin näkemään muutoksia myös näistä rakenteista tumaan kohdistuvissa voimissa.

LÄHTEET

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., ja Walter, P. (2015). *Molecular Biology of the Cell.* Kuudes painos. New York: W. W. Norton & Company.

Arsenovic, P.T., Ramachandran I., Bathula, K., Zhu, R., Narang, J.D., Noll, N.A., Lemmon, C.A., Gundersen, G.G., ja Conway, D.E. (2016). ”Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension”, *Biophysical Journal*, 110 (1), s. 34–43. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.11.014

Arsenovic, P.T., Bathula, K., ja Conway, D.E. (2017). “A Protocol for Using Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-force Biosensors to Measure Mechanical Forces across the Nuclear LINC Complex”, *Journal of Visualized Experiments*, 122, s. 54902. DOI: 10.3791/54902

Arsenovic, P.T., ja Conway, D.E. (2018). “Using Nesprin Tension Sensors to Measure Force on the LINC Complex”, *Methods in Molecular Biology*, 1840, s. 59–71. DOI: 10.1007/978-1-4939-8691-0_6

ATCC (2016). *MDCK (NBL-2) (ATCC® CCL-34™)*. Saatavilla osoitteesta: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-34.aspx?geo_country=fi#generalinformation (Viitattu: 25.4.2021).

Carley, E., Stewart, R.M., Zieman, A., Jalilian, I., King, D.E., Zubek, A., Lin, S., Horsley, V., ja King, M.C. (2021). “The LINC complex transmits integrin-dependent tension to the nuclear lamina and represses epidermal differentiation”, *eLife*, 10, e58541. DOI: 10.7554/eLife.58541

Chambliss, A.B., Khatau, S.B., Erdenberger, N., Robinson, D.K., Hodzic, D., Longmore, G.D., ja Wirtz, D. (2013). “The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction”, *Scientific Reports*, 3, s. 1087. DOI: 10.1038/srep01087

Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D., ja Hodzic, D. (2006). “Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex”, *Journal of Cell Biology*, 172 (1), s. 41–53. DOI: 10.1083/jcb.200509124

Dechat, T., Pfleghaar, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., ja Goldman, R.D. (2008). “Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin”, *Genes & Development*, 22 (7), s. 832–853. DOI: 10.1101/gad.1652708

Dubinsky, W.P., Mayorga-Wark, O., ja Schultz, S.G. (1999). “Volume regulatory responses of basolateral membrane vesicles from Necturus enterocytes: Role of the cytoskeleton”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (16), s. 9421-9426. DOI: 10.1073/pnas.96.16.9421

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., ja Discher, D.E. (2006). “Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification”, *Cell*, 126 (4), s. 677-689. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.044

Francou, A., ja Anderson, K.V. (2020). ”The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Development and Cancer”, *Annual Review of Cancer Biology*, 4, s. 197–220. DOI: 10.1146/annurev-cancerbio-030518-055425

Förster, T. (1946). “Energiewanderung und Fluoreszenz”, *Naturwissenchaften*, 33, s. 166-175.

Govorov, A., Hernandez Martinez, P.D., ja Demir, H.V. (2016). *Understanding and Modeling Förster-type Resonance Energy Transfer (FRET): Introduction to FRET, Vol. 1*. Toimittanut: Hilmi Volkan Demir. Singapore: Springer.

Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., ja Schwartz, M.A. (2010). “Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics”, *Nature*, 466, s. 263-266. DOI: 10.1038/nature09198

Gundersen, G.G., ja Worman, H.J. (2013). ”Nuclear Positioning”, *Cell*, 152 (6), s. 1376-1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.031

Isermann, P., ja Lammerding J. (2013). ”Nuclear Mechanics and Mechanotransduction in Health and Disease”, *Current Biology*, 23 (24). DOI: 10.1016/j.cub.2013.11.009

Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, P.J., Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., ja Wirtz, D. (2009). ”A perinuclear actin cap regulates nuclear shape”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (45), s. 19017–19022. DOI: 10.1073/pnas.0908686106

Kim, D.I., Birendra, K.C., ja Roux, K.J. (2015). “Making the LINC: SUN and KASH protein interactions”, *Biological Chemistry*, 396 (4), s. 295-310. DOI: 10.1515/hsz-2014-0267

Kwak, S.G., ja Kim, J.H. (2017). ”Central limit theorem: the cornerstone of modern statistics”, *Korean Journal of Anesthesiology*, 70 (2), s. 144–156. DOI: 10.4097/kjae.2017.70.2.144

Li, Y., Lovett, D., Zhang, Q., Neelam, S., Kuchibhotla, R.A., Zhu, R., Gundersen, G.G., Lele, T.P., ja Dickinson, R.B. (2015). “Moving Cell Boundaries Drive Nuclear Shaping during Cell Spreading”, *Biophysical Journal*, 109 (4), s. 670-686. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.07.006

Makarov, A.A., Zou, J., Houston, D.R., Spanos, C., Solovyova, A.S., Cardenal-Penalta, C., Rappsilber, J., ja Schirmer, E.C. (2019). ”Lamin A molecular compression and sliding as mechanisms behind nucleoskeleton elasticity”, *Nature Communications*, 10, s. 3056. DOI: 10.1038/s41467-019-11063-6

Pei, D., Shu, X., Gassama-Diagne A., ja Thiery J.P. (2019). ”Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming”, *Nature Cell Biology*, 21, s. 44–53. DOI: 10.1038/s41556-018-0195-z

Rajgor, D., ja Shanahan, C.M. (2013). ”Nesprins: from the nuclear envelope and beyond”, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15, e5. DOI: 10.1017/erm.2013.6

Vasileva, E., ja Citi, S., (2018). ”The role of microtubules in the regulation of epithelial junctions”, *Tissue Barriers*, 6 (3), s. 1539596. DOI: 10.1080/21688370.2018.1539596

Weinberg, S. (1997). “The Search for Unity: Notes for a History of Quantum Field Theory”, *Daedalus*, 106 (4), s. 17–35.

Xia, Z., ja Liu, Y. (2001). ”Reliable and Global Measurement of Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Fluorescence Microscopes”, *Biophysical Journal*, 81 (4), s. 2395–2402. DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75886-9

Youvan, D. C., Silva, C. M., Bylina, E. J., Coleman, W. J., Dilworth, M. R., ja Yang, M. M. (1997). “Calibration of Fluorescence Resonance Energy Transfer in Microscopy Using Genetically Engineered GFP Derivatives on Nickel Chelating Beads”, *Biotechnology et alia*, 3, s. 1–18.

Östlund, C., Folker, E.S., Choi, J.C., Gomes, E.R., Gundersen, G.G., ja Worman, H.J. (2009). “Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins”, *Journal of Cell Science*, 122 (22), s. 4099-4108. DOI: 10.1242/jcs.057075