

**ESCRT-kompleksien merkitys echovirus 1 -infektiossa
ja kaveosomin monivesikkelisen rakenteen
muodostumisessa**

Pro gradu -tutkielma

Valtteri Siljamäki

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solubiologia

Huhtikuu 2008

ALKUSANAT

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella, solubiologian osastolla kesän 2005 ja kevään 2008 välisenä aikana. Haluan kiittää tutkielmani ohjaajaa, FT Varpu Marjomäkeä erittäin suuresta kärsivällisyydestä tämän pitkän projektin aikana, sekä erinomaisesta ja itsenäisen työskentelyn sallivasta ohjauksesta. Suuret kiitokset myös laboratoriomestari Arja Mansikkaviitalle, joka jakoi vastailia lukemattomiin kysymyksiini ja oli näin suunnaton apu käytännön laboratoriotöissä. Raija Vassiselle kiitos elektronimikroskooppinäytteiden nopeasta ja huolellisesta leikkaamisesta. Suurimmat kiitokset kuuluvat kuitenkin rakkaalleni, Elinalle, joka jakoi uskoa tutkielmani valmistumiseen sekä vastaili lukemattomaan määrään hölmöjä kysymyksiä ja oli erittäin suureksi avuksi tutkielman oikoluvussa. Kiitokset kuuluvat myös veljelleni Samille, joka auttoi englannin kielen oikoluvussa sekä mahdollisti hetkittäiset irtautumiset tutkielman teosta avustamalla köyhää pilviveikkoa. Lisäksi viimeisenä mutta sitäkin suuremmassa määrin haluaisin kiittää vanhempiani vuosien varrella saamastani tuesta ja kärsivällisyydestä.

Jyväskylässä 23.4.2008

Valtteri Siljamäki

| | | |
|----------------------------|--|--------------------------|
| Tekijä: | Veli Valterti Siljamäki | |
| Tutkielman nimi: | ESCRT-kompleksien merkitys echovirus 1 -infektiossa ja kaveosomin monivesikkelisen rakenteen muodostumisessa | |
| English title: | On the meaning of ESCRT complexes in echovirus 1 infection and formation of multivesicular caveosomes | |
| Päivämäärä: | 23.04.2008 | Sivumäärä: 54 + 2 |
| Laitos: | Bio- ja ympäristötieteiden laitos | |
| Oppiaine: | Solubiologia | |
| Tutkielman ohjaaja: | FT Varpu Marjomäki | |

Tiivistelmä:

Monivesikkeliset rakenteet löydettiin alun perin klatriinivälitteiseltä endosytoosireitiltä, jossa nämä rakenteet muodostuvat kuljetukseen tarvittavien endosomaalisten lajittelukompleksien (ESCRT, engl. endosomal sorting complex required for transport) avulla. ESCRT-kompleksit toimivat sisävesikkelien kuroutumisessa ja irtoamisessa ulkokalvon sisään. Sisävesikkelien tarkoituksena on muun muassa saada kalvoproteiinit kokonaan ulkokalvon sisään esimerkiksi hajotusta varten. Vastaavia monivesikkelisiä rakenteita on myöhemmin löydetty myös muilta endosytoosireiteiltä, kuten kaveosomista, mutta näiden tarkoituksesta ja muodostumisesta ei ole vielä tietoa.

Echovirus 1 (EV1) on pikornaviruksiin kuuluva pieni, vaipaton ja yksijuosteinen (+)RNA-virus. Se käyttää reseptorinaan $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä, joka toimii myös kollageenin reseptorina. Solukalvolla EV1 saa aikaan $\alpha 2\beta 1$ -integroinin kasautumisen, joka puolestaan aiheuttaa $\alpha 2\beta 1$ -integroinin ja sen mukana EV1:n siirtymisen solun sisään makropinosytoosin kaltaisen reitin kautta. Tämän reitin on todettu johtavan kaveosomiin, ja EV1:n on myös havaittu löytyvän kaveosomin sisältä.

Tutkimuksessa oli tarkoituksena selvittää, aiheutuuko kaveosomeissa havaittu monivesikkelinen rakenne samoista ESCRT-komplekseista, jotka aiheuttavat klatriinivälitteisen endosomireitin monivesikkeliset rakenteet. Toisena tavoitteena oli selvittää, tarvitseeko EV1 ESCRT-komplekseja solujen infektoimiseen. Näitä kysymyksiä tutkittiin transfektoimalla soluihin dominanttinegatiivinen Vps4-GFP, joka aiheuttaa kuroutuvien rakkuloiden ”jumiutumisen” ulkokalvolle. Lisäksi osassa kokeista soluihin transfektoitiin Tsg101-, HCRPI- ja Vps24-proteiinien geeneille selektiivistä siRNA:ta. Nämä kaikki ovat ESCRT-kompleksien proteiineja. Vasta-aineväryksiä tarkasteltiin sekä konfokaalimikroskooppilla että elektronimikroskooppilla.

Tulokset osoittivat dominanttinegatiivisen (DN) Vps4-GFP:n estävän selvästi EV1:n infektiota. Dominanttinegatiivisissa soluissa infektio olikin pysähtynyt ja EV1 oli kerääntynyt DN Vps4-GFP:n kanssa kolokalisoituihin kertymiin. Vastaavia kertymiä ei kontrollisoluissa nähty, vaan EV1 oli levittäytynyt tasaisesti koko soluun. Vasta-ainevärykset myös osoittivat ESCRT-kompleksien kolokalisoituvan selvästi kaveoliini-1:n, $\alpha 2$ -integroinin ja EV1:n kanssa. Koska kaikkien näiden endosytoosireitit risteävät kaveosomeissa, täytyy ESCRT-kompleksien sijaita klatriinireitin lisäksi myös kaveosomeissa. Lisäksi elektronimikroskooppikokeissa havaittiin kontrolli- ja dominanttinegatiivisten Vps4-GFP-kokeiden välillä suuri ero monivesikkelisten rakenteiden lukumäärässä. Tämä ero johtuu siitä, ettei ”viallinen” ESCRT-kompleksi pysty kuroma sisävesikkeleitä irti ulkokalvosta.

Avainsanat: ESCRT, Vps4, echovirus 1, MVB

Author: Veli Valtteri Siljamäki
Title of thesis: On the meaning of ESCRT complexes in echovirus 1 infection and formation of multivesicular caveosomes
Finnish title: ESCRT-kompleksien merkitys echovirus 1 -infektiossa ja kaveosomin monivesikkelisen rakenteen muodostumisessa
Date: 23.04.2008 **Pages:** 54 + 2
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor: Ph.D. Varpu Marjomäki

Abstract:

Multivesicular bodies were first discovered in clathrin-mediated endocytotic pathway. They are formed by ESCRT complexes, which invaginate inner vesicles out of the membrane and release them inside the outer membrane. The inner vesicles act for example in membrane-bound protein degradation: those proteins that would otherwise be partly outside the outer membrane can now be invaginated with these vesicles. Multivesicular bodies are also found on other endocytotic pathways, like in caveosomes, but their function and mode of formation has not been discovered yet.

Echovirus 1 (EV1) is a small, non-enveloped and single-stranded (+)RNA virus, which belongs to the *Picornaviridae* family. It uses $\alpha 2\beta 1$ integrin as its receptor and competes in binding with $\alpha 2\beta 1$ integrin's natural ligand, collagen. EV1 induces $\alpha 2\beta 1$ integrin clustering and causes endocytosis of the virus particles via macropinosytosis-like entry. Macropinosytosis-like entry has been shown to lead to caveosomes and EV1 is shown to be located inside caveosomes.

The purpose of this research was to find out whether ESCRT complexes act also in caveosomes and whether EV1 needs ESCRT complexes for infection to proceed. Influences of ESCRT complexes were studied using dominant-negative Vps4-GFP transfections and with Tsg101-, HCRPI- and Vps24-selective siRNAs. All of these are proteins in ESCRT complexes and they inhibit vesicle invagination. These experiments were inspected using confocal microscope and electron microscope.

Dominant-negative Vps4-GFP clearly inhibited the EV1 infection. In dominant-negative cells EV1 was accumulated in the same areas as dominant-negative Vps4-GFP. In control cells the infection had also proceeded much further and EV1 was distributed evenly throughout the cell. Antibody-labelings showed that dominant-negative Vps4-GFP colocalized with caveolin-1, $\alpha 2$ integrin and EV1. This means that ESCRT complexes have to be located in caveosomes, as caveolin-1, $\alpha 2$ integrin and EV1 all meet there. Experiments with electron microscope showed a significant decrease in multivesicular body numbers, when cells were transfected with dominant-negative Vps4-GFP. This is because non-functional ESCRT complexes cannot form vesicles in to multivesicular bodies.

Keywords: ESCRT, Vps4, echovirus 1, MVB

SISÄLTÖ

Lyhenteet

| | |
|--|-----------|
| 1. JOHDANTO..... | 9 |
| 1.1. Endosytoosi..... | 9 |
| 1.1.1. Klatriinivälitteinen reitti | 10 |
| 1.1.2. Kaveolivälitteinen reitti | 11 |
| 1.1.3. Klatriinista ja kaveoliinista riippumattomat reitit..... | 11 |
| 1.1.3.1. Makropinosytoosi | 12 |
| 1.2. Endosomien ja kaveosomien sisävesikkelien muodostuminen | 13 |
| 1.2.1. ESCRT-0 eli Vps27 ja Hse1 | 15 |
| 1.2.2. ESCRT-I | 16 |
| 1.2.3. ESCRT-II..... | 18 |
| 1.2.4. ESCRT-III..... | 19 |
| 1.2.5. Vps4..... | 22 |
| 1.2.6. ESCRT-kompleksien lineaarinen- vs. ympyrämalli | 24 |
| 1.3. Monivesikkelinen organelli | 26 |
| 1.3.1. Monivesikkelisistä rakenteista endosomireitillä | 27 |
| 1.3.2. Monivesikkelinen kaveosomi | 27 |
| 1.4. Echovirus 1 | 28 |
| 1.4.1. Reseptorit ja reitit..... | 28 |
| 2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS | 30 |
| 3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT | 31 |
| 3.1. Solut, bakteerit, virukset ja vasta-aineet | 31 |
| 3.2. siRNA-transfektiot..... | 31 |
| 3.3. Transfektiot..... | 32 |
| 3.4. Immunofluoresenssivärjäykset ja konfokaalimikroskopia | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5. Elektronimikroskopia..... | 33 |
| 4. TULOKSET | 35 |
| 4.1. Dominanttinegatiivisen Vps4-GFP:n vaikutus EV1-infektioon | 35 |
| 4.1.1. Virusten seuraaminen 15 minuutin, 2 tunnin ja 7 tunnin aikapisteissä | 35 |
| 4.1.2. Infektioititrus..... | 37 |
| 4.2. Transfektoimattomien solujen ESCRT-I-kompleksin vasta-ainevärjäykset..... | 38 |
| 4.3. $\alpha 2$ -integriinin ja kaveoliini-1:n kolokalisoituminen DN Vps4-GFP:n kanssa | 40 |
| 4.4. Kasautettujen $\alpha 2$ - ja αV -integriinien kolokalisoituminen DN Vps4-GFP:n kanssa..... | 40 |
| 4.5. siRNA-transfektiot..... | 43 |
| 4.6. Elektronimikroskopia..... | 43 |
| 5. TULOSTEN TARKASTELU | 46 |
| LÄHTEET | 50 |
| LIITTEET (1 kpl) | |

Lyhenteet

| | |
|-----------|--|
| AAA | (engl. ATPases associated with diverse cellular activities) |
| CC | kierteisestä kierteestä muodostuva domeeni (engl. coiled coil) |
| CHMP | (engl. human chromatin modifying proteins) |
| DN | dominanttinegatiivinen |
| EGFR | epidermaalinen kasvutekijäreseptori (engl. epidermal growth factor reseptor) |
| ESCRT | kuljetukseen tarvittava endosomaalinen lajittelukompleksi (engl. endosomal sorting complex required for transport) |
| EV1 | echovirus 1 |
| FYVE | nimi tulee sanoista Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 ja EEA1 |
| GLUE | (engl. GRAMlike, ubiquitin binding in EAP45) |
| GMK | viherapinan munuaissolulinja (engl. green monkey kidney) |
| HeLa | ihmisen kohdunkaulan syöpäsolulinja (engl. human cervical adenocarcinoma cells) |
| I-domeeni | (engl. inserted domain) |
| LBPA | lysobisfosfaattihappo (engl. lysobisphosphatidic acid) |
| LDL | alhaisen tiheyden lipoproteiini (engl. low density lipoprotein) |
| MHC-I | (engl. major histocompatibility complex class-I) |
| MIT | (engl. microtubule interacting and transport) |
| MVB | monivesikkelinen rakenne (engl. multivesicular body) |
| MVB12 | monivesikkelisen rakenteen lajittelutekijä (engl. multivesicular body sorting factor of 12 kD) |
| PI(3)P | fosfatidyli-inositoli-3-fosfaatti (engl. phosphatidylinositol-3-phosphate) |
| SAOS | ihmisen luusyöpäsolulinja (engl. human osteosarcoma cells) |
| SH3 | (engl. Src homology 3) |
| UEV | ubikitiini E2 -variantti |
| UIM | ubikitiinin kanssa vuorovaikutuksessa oleva domeeni (engl. ubiquitin-interacting motif) |
| VHS | nimi tulee sanoista VPS-27, Hrs ja STAM |

Vps (engl. vacuolar protein sorting)

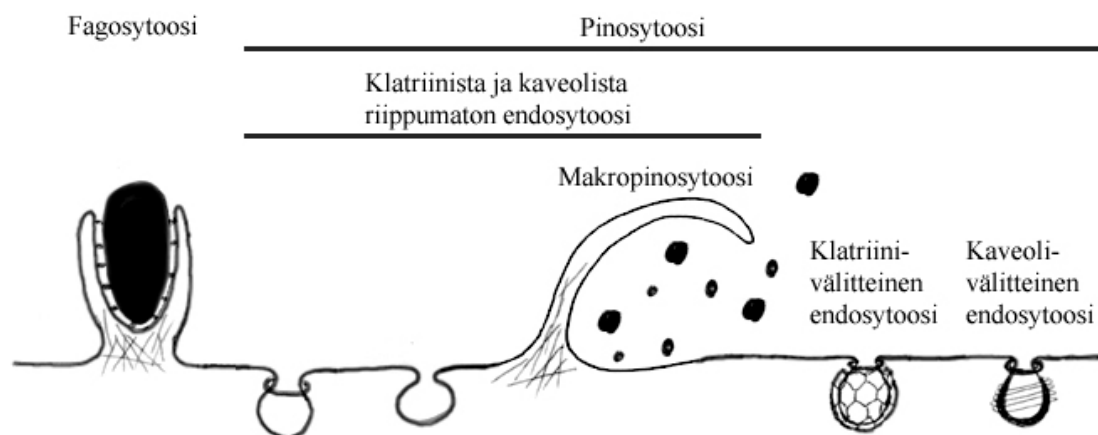
WH (engl. winged helix)

(Tutkielman liitteenä The Journal of Cell Biology -lehden lyhenneluettelo.)

1. JOHDANTO

1.1. Endosytoosi

Endosytoosilla tarkoitetaan yleensä reseptorivälitteistä endosytoosia, jossa esimerkiksi monet kasvutekijät, hormonit ja useat virukset toimivat solukalvolla olevien reseptorien ligandeina. Sitoutuessaan reseptoriin ne saavat aikaan kuljetusrakkulan, jonka avulla ne pääsevät solun sisään. Aikanaan luultiin, että lähinnä klatriinivälitteinen endosytoosi olisi ollut reseptorivälitteistä, mutta nykyään lähes kaikille endosytoosireiteille on löydetty tietty reseptori. Endosytoosi voidaan jakaa karkeasti kahteen luokkaan, fagosytoosiin ja pinosytoosiin. Fagosytoosi on eräänlaista ”solusyöntiä”, eli kiinteiden partikkelien ympäröimistä solukalvolla, jolloin partikkeli saadaan solun sisään. Fagosytoosia tavataan pääasiassa elimistön puolustussoluissa, joissa fagosytoosia käytetään muun muassa patogeenien ja apoptoottisten solujen tuhoamiseen (yleiskatsaus Aderem ja Underhill, 1999; Hart ym., 2008). Pinosytoosia puolestaan tapahtuu lähes kaikissa soluissa ja kansankielellä se tarkoittaa ”solujuomista”, eli pinosytoosissa solun sisään otetaan nestettä sekä liuenneita aineita. Pinosytoosin kolme päämuotoa ovat klatriinivälitteinen reitti, kaveoliinivälitteinen reitti sekä klatriinista ja kaveoliinista riippumattomat reitit, joihin esimerkiksi makropinosytoosi kuuluu (yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003) (kuva 1.1.).



Kuva 1.1. Endosytoosireitit eroavat toisistaan muun muassa endosytoosivesikkelin koon, endosytoitavan partikkelin ja vesikkelin muodostumismekanismien osalta. Kuvassa oikealla puolella on tämän tutkimuksen kannalta tärkeimmät reitit (makropinosytoosi sekä klatriini- ja kaveoliinivälitteinen endosytoosi), sekä vasemmalla hieman vähemmällä tarkastelulla selviävät reitit. (Mukaieltu artikkelista Conner ja Schmid, 2003.)

1.1.1. Klatriinivälitteinen reitti

Klatriini koostuu kolmesta raskaasta ja kolmesta kevyestä proteiinista, jotka muodostavat kolmisakaraisen rakenteen, triskelionin, ja toisiinsa kiinnittyessään verkkomaisen pallon (Kirchhausen ja Harrison, 1981). Klatriinivälitteinen reitti oli ensimmäisiä tunnettuja endosytoosireittejä, ja nykyään sen toiminta tunnetaan jo melko hyvin. Klatriinivuorattujen vesikkelien kuroutuminen solukalvolta perustuu siihen, että klatriinin kiinnittyessä adaptoriproteiinin välityksellä solukalvoon, vääntää klatriini solukalvon pallon malliseksi, jonka jälkeen pääasiassa dynamiini ja amfifysiini irrottavat rakkulan solukalvolta (Takei ym., 1999). Adaptoriproteiineja tunnetaan neljä erilaista heterotetrameerista kompleksia, jotka pystyvät tarttumaan erilaisiin solukalvon reseptorimolekyyleihin ja näin lisäävän klatriinivälitteisissä rakkuloissa kuljetettavien molekyylien määrää (yleiskatsaus Robinson ja Bonifacino, 2001). Klatriinireitti toimii useimmissa solutyypeissä koko ajan, kuljettaen solulle tärkeitä molekyyliä solukalvolta varhaiseen endosomiin. Tällaisia ovat esimerkiksi kolesterolia kuljettava alhaisen tiheyden lipoproteiini (LDL, engl. low-density lipoprotein) sekä solukalvolla sijaitsevat ionipumput, joiden määrää klatriinivälitteinen reitti säätelee. Klatriinireitillä on tärkeä rooli myös hermosoluissa, joissa se säätelee kalsiumkanavien määrää sekä toimii synaptisten vesikkeleiden kalvoproteiinien kierrätyksessä (yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Koska klatriinireitti toimii lähes kaikissa soluissa, ovat myös hyvin monet virukset (esimerkiksi hepatiittivirukset B ja C sekä Semliki Forest virus) oppineet käyttämään tätä reittiä soluun sisäänpääsyssä (yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2003; Cooper ja Shaul, 2006; Blanchard ym., 2006). Jotkut virukset pystyvät lisäksi käyttämään hyväkseen myös useampia reittejä: esimerkiksi tavallinen influenssavirus pystyy tunkeutumaan soluun sekä klatriinivälitteistä, kaveoliinivälitteistä että klatriinista ja kaveoliinista riippumatonta reittiä pitkin (Sieczkarski ja Whittaker, 2002b). Kurouduttuaan solukalvolta klatriinirakkula menettää klatriinivuorauksensa, jolloin kolmihakainen klatriini siirtyy takaisin solukalvolle uudelleenkäyttöä varten. Kuroutuneen rakkulan matka jatkuu varhaiseen endosomiin, josta edelleen myöhäiseen endosomiin ja lysosomiin tai Golgin laitteeseen ja sieltä eteenpäin. Rakkula voi myös kulkea kierrätysendosomin kautta takaisin solun ulkopuolelle (yleiskatsaus Winter ja Hauser, 2006).

1.1.2. Kaveolivälitteinen reitti

Kaveolit löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 1953 sydämen endoteelisoluista (yleiskatsaus Stan, 2005). Silloin niitä ei vielä kutsuttu kaveoleiksi, mutta koska nämä pienet, ~ 70 nm läpimitaltaan olevat rakkulat muistuttivat mikroskooppikuvissa pientä luolaa, nimettiin ne kaveoleiksi (engl. cave = luola). Kaveolit tunnettiin pitkään vain niiden morfologian perusteella, kunnes Rothberg ym. löysivät ensimmäisen pelkästään kaveoleissa tavattavan merkkiaineen, kaveoliini-1:n (Rothberg ym., 1992). Nykyään kaveoliineja tunnetaan kolme erilaista (kaveoliinit 1, 2 ja 3). Kaveoliini-1:tä ja kaveoliini-2:ta esiintyy suurimmassa osassa eri solutyyppejä, mutta kaveoliini-3 esiintyy pääasiassa vain lihassoluissa (Way ja Parton, 1996; Scherer ym., 1997). Kaveoliinien rakenne pitää sisällään hydrofobisen alueen, jolla ne kiinnittyvät solukalvon soluliman puoleiseen osaan. Kaveoliinit eivät kuitenkaan läpäise solukalvoa, vaan sekä niiden N- että C-terminaaliset päät osoittavat solulimaa kohti. Lisäksi kaveoliinit voivat muodostaa hetero-oligomeerisen kompleksin kaveoliinien ja reseptorimolekyylien kanssa, keräten näin kaveolin muodostumisessa tarvittavia rakennusaineita (Sargiacomo ym., 1995; Scherer ym., 1997). Kaveolien syntyminen on hyvin tarkkaan säädelty prosessi, jossa reseptorimolekyylit säätelevät sisään otettavat aineet. Kaveolien muodostumiseen kuuluu myös lipidilauttojen muodostuminen, ja kaveoleissa onkin paljon sfingolipidejä ja kolesterolia (Pelkmans ym., 2001). Solukalvolta kurouduttuaan kaveolit voivat liittyä joko varhaisiin endosomeihin tai kaveosomeihin (Pelkmans ym., 2004). Kaveolireittiä käytetään esimerkiksi kolesterolin kuljetukseen ja myös useat virukset ovat oppineet hyödyntämään tätä reittiä (yleiskatsaus Barnett-Norris ym., 2005). SV40-virus on vaipaton DNA-virus, joka kuuluu polyoomavirusten sukuun. Hummeler ym. (1970) osoittivat jo 1970-luvulla sen käyttävän kaveolivälitteistä endosytoosia: SV40 kulkeutuu kaveoleissa kaveosomeihin ja niistä edelleen sileään solulimakalvostoon (Pelkmans ym., 2001).

1.1.3. Klatriinista ja kaveoliinista riippumattomat reitit

Klatriinivälitteisten reittien ja kaveolien lisäksi on useita endosytoosireittejä, joita klatriini- tai kaveolireitin merkkiaineet eivät tunnista. Näistä ehkä tunnetuin on makropinosytoosi (ks. 1.2.3.1) (yleiskatsaus Nichols ja Lippincott-Schwartz, 2001). Makropinosytoosin lisäksi on

olemassa useita hieman huonommin tunnettuja reittejä, joiden tutkimuksia on vaikeuttanut vain tiettyyn reittiin kuuluvien merkkiaineiden huono löydettävyyys. Yleensä nämä reitit kuitenkin liittyvät solukalvon mikrodomeeneihin, joita myös solukalvon lipidilautat (engl. lipid rafts) ovat. Kaveolien tapaan nämä reitit alkavat usein kolesteroli- ja glykosfingolipidirikkaista alueista, mutta niiden merkkiaineena ei kuitenkaan toimi kaveoliini. Ehkä parhaiten tunnettu merkkiaine eräälle tällaiselle reitille on interleukiini-2-reseptori, jota löytyy myöhäisistä endosomeista ja lysosomeista, mutta ei klatriini- eikä kaveoliinireiteiltä (Lamaze ym., 2001).

1.1.3.1. Makropinosytoosi

Makropinosytoosi eroaa edellisistä endosytoosin muodoista monelta osin. Kokonsa puolesta makropinosomit ovat huomattavasti edellisiä rakenteita suurempia ja epäspesifisempiä. Makropinosytoosin epäspesifisyys liittyy pitkälti makropinosomin suureen kokoon, jolloin solun saadessa tarvittavan ärsykkeen makropinosytoosin alkamiselle, siirtyä makropinosytoosissa paljon myös muita kuin vain ärsykkeen laukaisevia makromolekyylejä solun sisään. Makropinosytoosia tapahtuu solukalvon valejalkojen avulla, jolloin solukalvo poimuuntuu. Näin solukalvon sisään jäävä makropinosomi voi olla läpimitaltaan jopa viisi mikrometriä. Koska valejalat ja solukalvon poimuuntuminen toimivat aktiinin avustuksella, on aktiini elintärkeä makropinosytoosin toiminnalle (Swanson ja Watts, 1995; yleiskatsaus Sieczkarski ja Whittaker, 2002a). Makropinosomin määränpää solun sisällä riippuu pitkälti solutyypistä. Esimerkiksi makrofagien makropinosomit menettävät nopeasti soluun sisäänpääsyn jälkeen vettä ja vaeltavat solun keskustaa kohti. Ne muistuttavat ensin varhaisia endosomeja ja myöhemmin myöhäisiä endosomeja, fuusioituen lopulta lysosomin kanssa. Kuitenkin jo ennen lysosomiin fuusioitumista nämä rakenteet happamoituvat (Racoosin ja Swanson, 1993). Vaikka makropinosytoosin epäspesifisyys kuulostaa hieman epäkäytännölliseltä tavalta saada solun sisään makromolekyylejä – tuleehan samalla sisään myös ei-toivottuja aineita – niin esimerkiksi dendriittisolussa antigeenien epäspesifinen sisäänotto on hyvin tärkeää, koska vielä tunnistamattomalle antigeenille ei voisi ollakaan omaa reseptoria. Näin elimistön puolustussolut saavat tunnistamattomankin antigeenin sisäänsä

tunnistusta varten ja elimistön puolustusmekanismit käynnistyvät (Sallusto ym., 1995). Toisaalta muissa elimistön soluissa kyseistä reittiä sisäänpääsyt patogeeni voi aiheuttaa infektion, vaikka makropinosytoosia käyttäviä patogeneja ei tunneta läheskään niin paljon kuin esimerkiksi klatriinireittiä käyttäviä. Yleensäkin bakteerit tai virukset eivät turvaudu epäspesifisiin reitteihin, vaan niillä on yleensä oma reseptorinsa johon ne sitoutuvat. Makropinosytoosillakin täytyy usein olla joku ärsyke, joka tapahtuman laukaisee, mutta näitä mekanismeja tunnetaan vielä varsin huonosti. Esimerkkinä makropinosytoosia käyttävästä tunnetusta bakteerista on *Salmonella*, joka pystyy indusoimaan makropinosytoosin alkamista. Lisäksi sen pintaproteiini SipB avustaa makropinosytoosin aikana solukalvojen sulautumisessa yhteen (Hayward ym., 2000; Dai ym., 2007). Myös echovirus 1:n (EV1) on todettu kaveoliireitin lisäksi käyttävän myös makropinosytoosin kaltaista reittiä. Sitä, miten echovirus 1 indusoi makropinosytoosin, ei vielä tunneta. Echovirus 1:n indusoiman makropinosomien määränpää poikkeaa kuitenkin edellä kerrotusta sen verran, ettei se liity lysosomiin vaan kaveosomiin. Tämä reitti on kuitenkin kaveoliinista riippumaton eli kaveoliinireitti yhdistyy kyseiseen reittiin vasta kaveosomissa (Karjalainen ym., 2008, painossa).

1.2. Endosomien ja kaveosomien sisävesikkelien muodostuminen

Eri reiteillä ja eri soluissa sisävesikkelien kuroutumisen aiheuttavat mekanismit ovat säilyneet hyvin samanlaisina. Tämä viittaa systeemin evolutiivisesti vanhaan alkuperään sekä myös sen tärkeyteen soluille. Esimerkiksi kaikki endosomaaliset lajittelukompleksit (ESCRT, engl. endosomal sorting complex required for transport) ovat toiminnallisesti suunnilleen samanlaisia niin hiivalla kuin ihmiselläkin (yleiskatsaus Slagsvold ym., 2006). Tästä seuraa, että eri lähteistä saattaa samoista proteiineista löytyä useita eri nimiä, joten vaikka eri lajien sisävesikkelien kuroutumisessa toimivat proteiinit voivat olla täysin erinimisiä, toimivat ne silti usein samoissa tehtävissä. Myöhemmin selitettävissä ESCRT-kompleksien rakenteissa käytetään siis selvyuden vuoksi hiivan proteiinien nimiä, mutta taulukkoon 1.1. on koottu näitä vastaavat ihmisen proteiinit.

Taulukko 1.1. Ensimmäisessä sarakkeessa on proteiinin nimi hiivasoluissa, toisessa sarakkeessa vastaavan proteiinin nimi ihmisen soluissa ja viimeisessä sarakkeessa kompleksi, johon proteiini kuuluu.

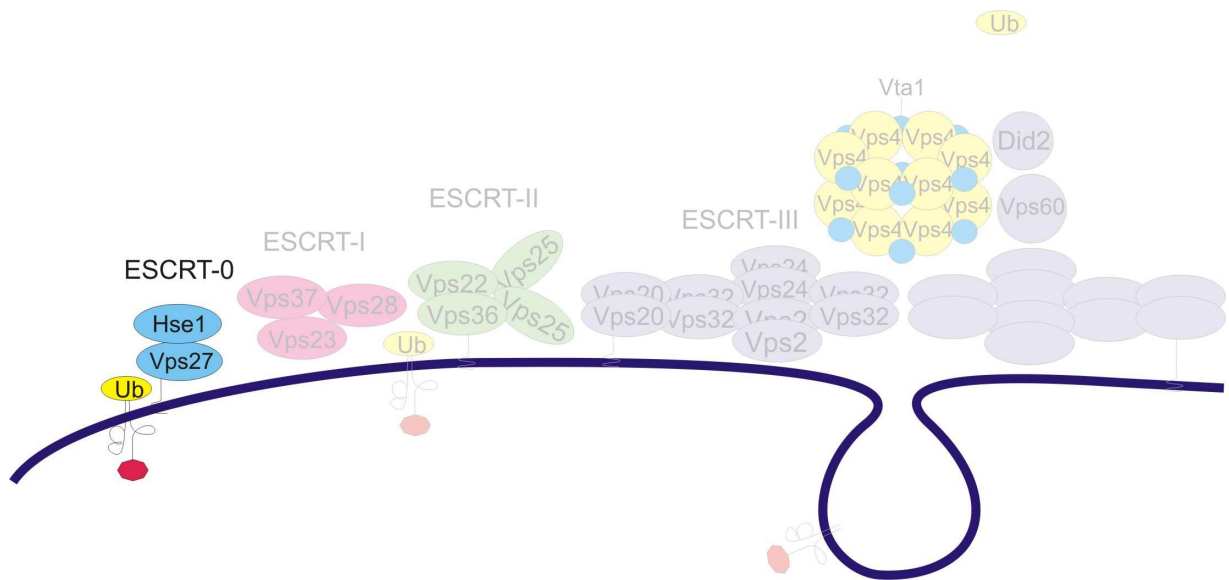
| Hiivan proteiini | Ihmisen proteiini | Kompleksi |
|------------------|-------------------|---------------------|
| Vps27 | HRS | ESCRT-0-kompleksi |
| Hse1 | STAM1, STAM2 | |
| Vps23 | TSG101 | ESCRT-I-kompleksi |
| Vps28 | VPS28 | |
| Vps37 | VPS37 | |
| Vps22 | EAP30 | ESCRT-II-kompleksi |
| Vps25 | EAP25 | |
| Vps36 | EAP45 | |
| Vps2 / Did4 | CHMP2 | ESCRT-III-kompleksi |
| Vps20 | CHMP6 | |
| Vps24 | CHMP3 | |
| Vps32 / Snf7 | CHMP4 | |
| Vps4 | VPS4 | Vps4-kompleksi |
| Vps31 / Bro1 | ALIX / AIP1 | Muut MVB-proteiinit |
| Vps60 | CHMP5 | |
| Vps46 / Did2 | CHMP1 | |
| Vta1 | LIP5 | |

Sisävesikkelien muodostuminen tapahtuu pääpiirteissään siten, että jokin kalvoon kiinnittynyt proteiini halutaan sisävesikkeliin. Tällainen proteiini pitää ensimmäisenä merkitä jotenkin, jotta se osataan ohjata haluttuun paikkaan. Hyvin yleinen ja varsinkin lysosomaalisessa kuljetuksessa tärkeä merkki on ubikitiini, joka on lyhyt polypeptidi. Myös muita kuljetussignaaleja on olemassa, mutta niistä tiedetään vielä varsin vähän (yleiskatsaus Raiborg ym., 2003). Tämän jälkeen kuljetussignaalin omaava proteiini siirretään proteiinilta/ESCRT-kompleksilta toiselle ja lopulta kuroutuvaan vesikkeliin, joka irrotetaan Vps4-kompleksin (engl. vacuolar protein sorting 4) toimesta. Edellä kuvattu kuljetusketju perustuu nimeämistavasta riippuen kolmeen tai neljään ESCRT-kompleksiin sekä muutamiin muihin proteiineihin. Seuraavassa käydään lineaarisesti kuljetettavan lastin matka ESCRT-0-kompleksilta ESCRT-III-kompleksille ja siitä sisäkalvolle, vaikkakin tälle mallille löytyy

myös kritiikkinsä. Kappaleessa 1.3.5. käydään tarkemmin läpi tämän mallin ongelmia ja puutteita.

1.2.1. ESCRT-0 eli Vps27 ja Hse1

ESCRT-0-kompleksi on ehkä paremmin tunnettu siihen kuuluvien proteiinien nimillä, jotka hiivan tapauksessa ovat Vps27 ja Hse1 (kuva 1.2.).



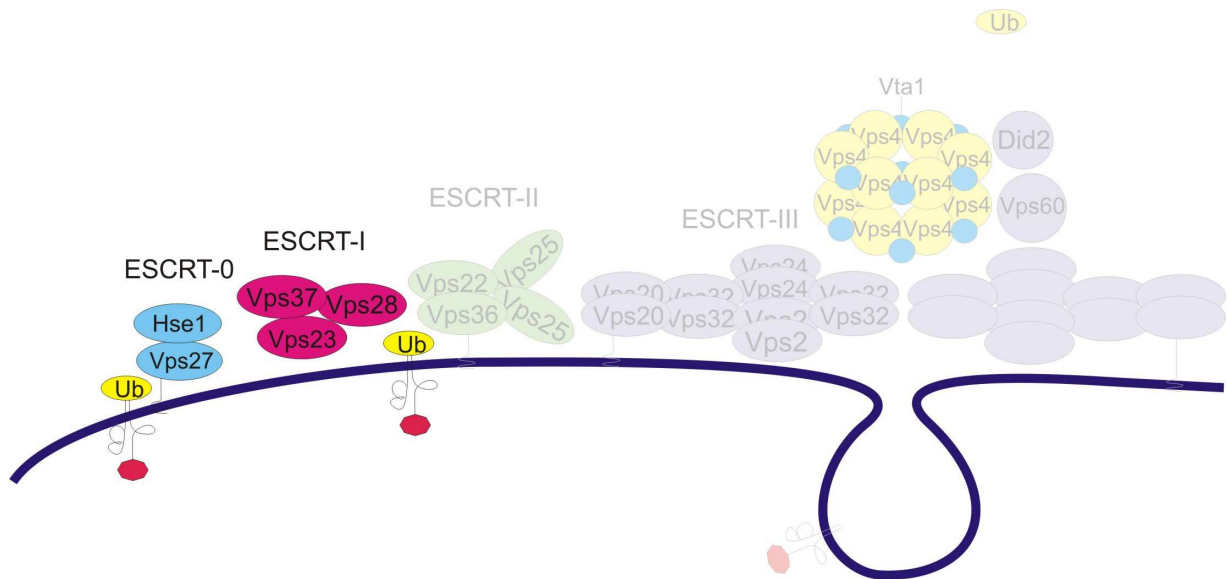
Kuva 1.2. Endosytoitu, punaisella merkitty virus on kiinnittynyt ubiqinoituun $\alpha 2$ -integroiniin, joka sijaitsee monivesikkelisen rakenteen ulkokalvolla. Virus on monivesikkelisen rakenteen sisäpuolella ja ESCRT-kompleksit soluliman puolella. ESCRT-0-kompleksi kiinnittyy ensimmäisenä ubikitiiniin.

Kummankin proteiinin N-terminaalisessa päässä on VHS-domeeni (nimi tulee sanoista VPS-27, Hrs ja STAM), jonka tehtävää ei aivan tarkkaan tiedetä (Mao ym., 2000). Rakenteellisissa tutkimuksissa on viitteitä VHS-domeenin toimimisesta eräänlaisena sitoutumisadapterina FYVE-domeenin (nimi tulee sanoista Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 ja EEA1) kanssa, mutta todellisuudessa VHS-domeenin roolista on vielä melko vähän tietoa. FYVE-domeenin rooli Vps27/Hse1-kompleksissa puolestaan tunnetaan melko hyvin. Se on pieni, noin 70 aminohappoa sisältävä sinkkisormi, jota stabiloi kaksi Zn^{2+} -ionia. Tämän sinkkisormen tehtävä on sitoutua lipidikaksoiskalvolla sijaitsevaan fosfatidyylinoisitol-3-fosfaattiin (PI(3)P, engl. phosphatidylinositol-3-phosphate). FYVE-domeeni on hyvin valikoiva, eikä se

tartu muihin vastaaviin molekyyliin, esimerkiksi fosfatidyli-inositoli-3,4-bifosfaattiin (Misra ja Hurley, 1999). Näin Vps27/Vhs1-kompleksi pystyy kiinnittymään esimerkiksi endosomin kalvoon, jossa FYVE-domeenin ligandi PI(3)P sijaitsee. Hyvin tärkeä domeeni on myös ubikitiinin kanssa vuorovaikutuksessa oleva domeeni (UIM, engl. ubiquitin-interacting motif), joka on ubikitiinia sitova alayksikkö. Vps27:llä niitä on kaksi ja Hse1:llä yksi. Vaikka Vps27:n UIM-domeenit sijaitsevat aivan toistensa vieressä, eivät ne silti sitoudu samaan ubikitiiniin, vaan toimivat täysin itsenäisesti toisistaan riippumatta (Swanson ym., 2003). Lisäksi N-terminaalia lähempänä oleva UIM-domeeni sitoo ubikitiinia huomattavasti tehokkaammin kuin C-terminaalia lähellä oleva (Fisher ym., 2003). Sisävesikkeleihin matkalla oleva lasti merkitään yleensä ubikitiinitähteellä, jonka takia UIM-domeeni on erittäin tärkeä Vps27/Hse1-kompleksissa. Kompleksi kiinnittyy sekä lastiin, jossa on ubikitiinileima, että kalvolla olevaan PI(3)P:iin, jolloin kuljetettava lasti saadaan Vps27/Hse1 kompleksin välityksellä sidottua haluttuun paikkaan esimerkiksi endosomin kalvolla (Bilodeau ym., 2002). Hse1:llä on lisäksi SH3-domeeni (engl. Src homology 3), joka toimii ubiqinaation poistotehtävissä. Tämän domeenin tehtävää ESCRT-kompleksissa ei aivan tarkkaan tunneta, mutta se saattaa toimia esimerkiksi silloin, jos kuljetettavaa proteiinia ei halutakaan viedä vesikkeliin, vaan ubikitiini poistetaan proteiinista. SH3-domeeni ei itsessään varsinaisesti poista ubikitiinia, vaan se värvää ubikitiini-spesifisen peptidaasi 8:n, joka puolestaan poistaa ubikitiinin (Kato ym., 2000).

1.2.2. ESCRT-I

ESCRT-I-kompleksi koostuu kolmesta luokan E Vps-proteiinista, jotka ovat numeroiltaan 23, 28 ja 37 (kuva 1.3.).



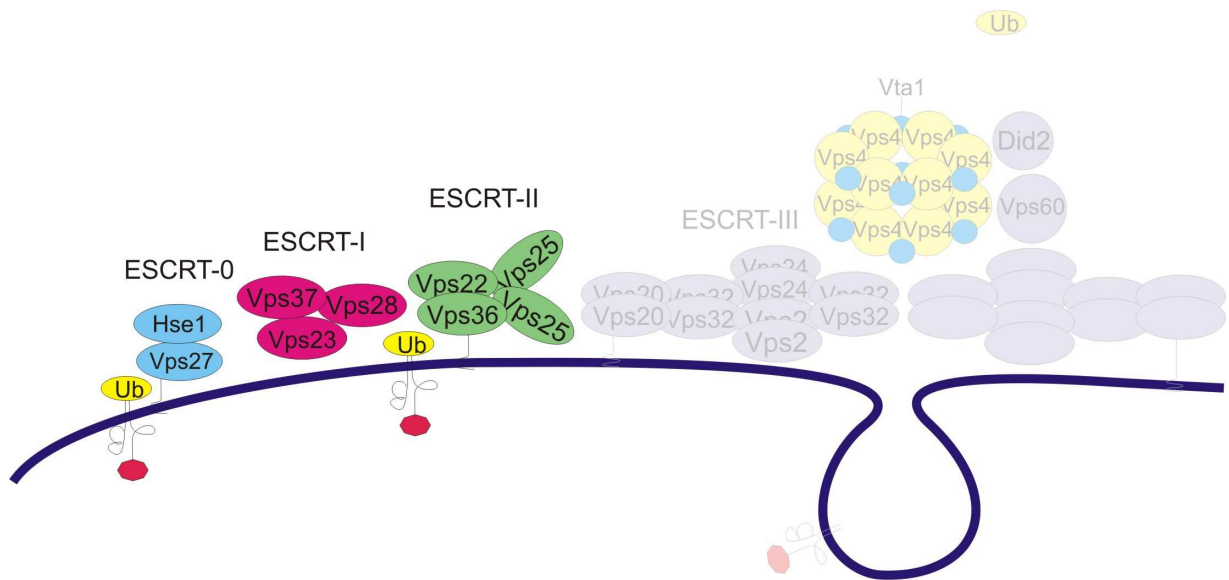
Kuva 1.3. Toisena monivesikkelisen rakenteen ulkokalvolle saapuu ESCRT-I, joka kiinnittyy ubiqinoituun lastiin sekä ESCRT-0-kompleksiin.

Vps23:lla on N-terminaaliossa päässä ubikitiinia sitova ubikitiini E2 -varianttialue (UEV), joka tarttuu myös Vps27:n C-terminaalista päätä lähellä olevaan alueeseen, ja saa näin koko ESCRT-I-kompleksin kiinnittymään kalvoon. Vaikka Vps23:n tarttuminen Vps27:ään estettäisiin, ei tämä kuitenkaan estäisi kaikkien kuljetettavien aineiden pääsyä sisävesikkeliin, joten ESCRT-I-kompleksin tarttuminen ESCRT-0-kompleksiin toimii ikään kuin lastin käsittelyn tehostajana. Tosin joidenkin proteiinien kohdalla pääsy sisävesikkeleihin estyy kokonaan, jos kyseisten kompleksien kiinnittyminen toisiinsa estetään (Bilodeau ym., 2003). Vps27:n C-terminaalisen päään aminohappojärjestys P(S/T)XP, johon UEV-domeeni kiinnittyy, löytyy mielenkiintoisesti myös monista retroviruksista: esimerkiksi ihmisen immuunikatovirus-1 tarvitsee PTAP-motiiviaan silmikoituakseen ulos solusta. Virus siis pystyy värväämään ESCRT-I-kompleksin solukalvolle, jolloin puolestaan ESCRT-I värvää taas seuraavan silmukoitumiseen tarvittavan rakenteen ja niin edelleen (Goila-Gaur ym., 2003). Normaalisti UEV-domeeni, Vps27:ään tarttumisen lisäksi, tarttuu myös kuljetettavana olevan partikkelin ubikitiinileimaan ja näin siirtää lastia eteenpäin kuljetusketjussa (Bilodeau ym., 2003). Monipuolista UEV-domeenia lukuun ottamatta ESCRT-I-kompleksin merkitys on vielä melko tuntematon. Chu ym. (2006) löysivät hiljattain monivesikkelisen rakenteen lajittelutekijän (MVB12, engl. multivesicular body sorting factor of 12 kD), joka sitoutuu

Vps23:n keskivaiheilla olevaan kierteisestä kierteestä muodostuvaan domeeniin (CC, engl. coiled coil), säädellen ESCRT-I-kompleksin muodostumista.

1.2.3. ESCRT-II

ESCRT-II-kompleksi on ESCRT-komplekseista ehkä parhaiten tutkittu. Se koostuu kahdesta Vps25:stä sekä Vps22:stä ja Vps36:n C-terminaalaisesta päästä (Hierro ym., 2004) (kuva 1.4.).



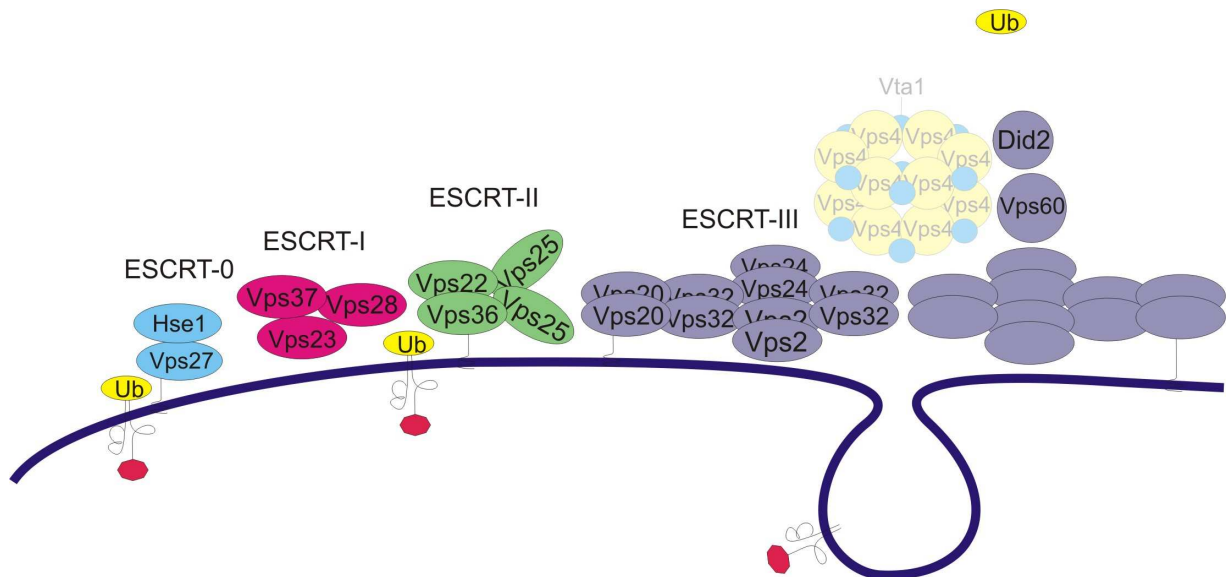
Kuva 1.4. ESCRT-II-kompleksi kiinnittyy monivesikkelisen rakenteen ulkokalvon lisäksi sekä ubiqinoituun lastiin että ESCRT-I-kompleksiin.

ESCRT-II-kompleksi toimii eräänlaisena linkkinä ESCRT-I- ja ESCRT-III-kompleksien välissä sekä ubiqinoidun lastin ja kalvon kanssa (Babst ym., 2002b). Ulkomuodoltaan kompleksi näyttää Y-kirjaimelta, jossa yksi sakara koostuu Vps25:stä, toinen sakaroista toisesta Vps25:stä ja kolmas sakara Vps22:stä ja Vps36:n C-terminaalaisesta päästä (Hierro ym., 2004). Kaikki nämä proteiinit sisältävät kaksi kappaletta WH-domeeneja (engl. winged helix), joita löydetään yleensä transkriptiotekijöistä, joissa WH-domeeni sitoutuu DNA:han. ESCRT-kompleksissa WH-domeenilla ei kuitenkaan ole mitään tekemistä DNA:n kanssa, vaan niillä on suuri merkitys ESCRT-II-kompleksin muodostumisessa, eli ne auttavat kompleksin Vps-proteiinien kiinnittymisessä toisiinsa. Vps25-proteiinin WH-domeeni liittyy myös ESCRT-III-kompleksin Vps20:een, ja se toimiikin ESCRT-III-kompleksin

värväämisessä paikalle (Teo ym., 2004). ESCRT-II-kompleksin paikalle värvääjänä puolestaan toimii ESCRT-I-kompleksi, jonka Vps28-proteiinin C-terminaaliseen päähän kiinnittyy ESCRT-II-kompleksin Vps36:n GLUE-domeeni (engl. GRAMlike, ubiquitin binding in EAP45). Kyseisellä GLUE-domeenilla on myös muita käyttötarkoituksia. Hiivalla se sisältää kaksi sinkkisormea, joista N-terminaalinen puoleinen kiinnittyy Vps28:aan ja C-terminaalinen puoleinen puolestaan sitoo ubikitiinia. Ihmisellä tätä ubikitiiniä sitovaa sinkkisormea ei ole, mutta kyseisen domeenin on silti osoitettu sitovan ubikitiinia. Kun ESCRT-I- ja ESCRT-II-kompleksit kiinnittyvät toisiinsa, siirtyy kuljetettava lasti taas eteenpäin, tässä kohtaa Vps36:n GLUE-domeenin sitomaksi. Vaikkakin GLUE-domeeni kattaa vain Vps36:n C-terminaalisen pään ensimmäiset 289 aminohappoa ja sitoo jo valmiiksi ESCRT-I-kompleksin ja ubiqiniloidun lastin, sitoutuu se lisäksi myös kalvoon. Kalvolla se sitoutuu ESCRT-0-kompleksin tapaan PI(3)P:iin, mutta se sitoo myös muita vastaavia molekyyliä, vaikkakaan ei yhtä suurella voimakkuudella (Teo ym., 2006). Toinen alue, jonka on uskottu muodostavan sidoksia proteiinien välille, on Vps22:n C-terminaalissa oleva CC-domeeni. Sen luultiin sitoutuvan Vps20:een, mutta sen ei ainakaan nykytietämyksen valossa uskota muodostavan sidoksia muiden ESCRT-kompleksien kanssa (Teo ym., 2004).

1.2.4. ESCRT-III

ESCRT-III-kompleksi muodostuu kahdesta alakompleksista, joihin kuuluvat proteiinit Vps2, Vps24 ja Vps20 sekä Snf7, joka tunnetaan myös nimellä Vps32. Näiden lisäksi ESCRT-III-kompleksiin kuuluu vielä kaksi proteiinia, Vps60 ja Did2, joiden poistaminen ei kuitenkaan estä ESCRT-III-kompleksin toimintaa monivesikkelisen rakenteen muodostumisessa (Babst ym., 2002a) (kuva 1.5.).

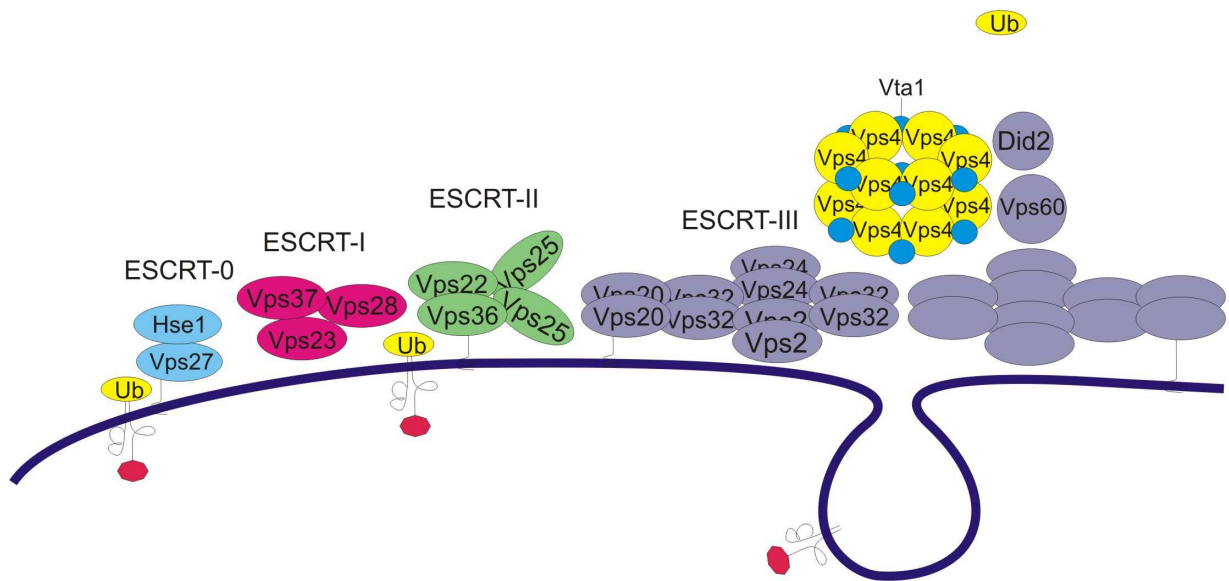


Kuva 1.5. ESCRT-III-kompleksi muodostuu lukuisista proteiini-parien alakomplekseista, jotka kiinnittyvät toisiinsa ja muodostavat ESCRT-III-kompleksin. Tämä puolestaan kiinnittyy monivesikkelisen rakenteen ulkokalvoon ja ESCRT-II-kompleksiin.

Kuten aikaisemmin todettiin, kiinnittyy Vps25 Vps20:een ja kiinnittää näin ESCRT-III-kompleksin pitenevään kuljetusketjuun. Vps20, kuten myös muut ESCRT-III:n proteiinit, on soluliman proteiini, joka kalvolle saapuessaan kiinnittyy Vps25:n lisäksi myös itse kalvoon (Babst ym., 2002a). Vaikka suurin osa tutkijoista onkin sitä mieltä, että ESCRT-kompleksien värväys tapahtuu lineaarisessa järjestyksessä kompleksilta toiselle, eivät kaikki sitoutumiset silti noudata tätä kaavaa. Vps20 sitoutuukin tästä poiketen edellä mainittujen molekyylien lisäksi myös ESCRT-I-kompleksin Vps28 proteiiniin (Bowers ym., 2004). Myös Vps20:n alakompleksipari Snf7 kiinnittyy kalvoon, vaikka siltä ei olekaan löydetty mitään aminohappoaluetta millä tämä tapahtuu. Onkin mahdollista, että varautunut Snf7 proteiini kiinnittyy fosfolipidien varautuneisiin päihin. Sekä Vps20 että Snf7 pystyvät siis toisistaan riippumatta kiinnittymään lipidikalvoon. Kaikki neljä ESCRT-III-kompleksin tärkeintä proteiinia ovatkin hyvin samankaltaisia, eli kaikki sisältävät CC-domeeneja ja kaikkien proteiinien C-terminaalinen pää sisältää hyvin happamia sivuketjuja, kun taas N-terminaalinen pää on hyvin emäksinen (Babst ym., 2002a). Lin ym. (2005) esittivät mallin Snf7:n avautumisesta sen aktivoituessa. Mallin mukaan inaktivoituessaan proteiinin eri päät kääntyvät yhteen, jolloin proteiinin CC-domeenien alfa-heliksit sitoutuisivat toisiinsa antiparalleelisti.

Koska C-terminaali on hapan ja N-terminaali emäksinen, on näillä eri varaukset ja näin proteiini pysyisi kiinni vastakkaisten varausten pitämänä. Tähän viittaa se, että solulimassa kyseiset proteiinit pysyvät irrallaan muista samanlaisista proteiineista, vaikka ne avonaisessa muodossa muodostaisivat kertymiä. Avautuessaan Snf7 kiinnittyy myös lipidikalvoon, joten se pitää solulimassa olla inaktiivisessa muodossa. Tämä malli saattaisi selittää myös Vps2, Vps24 ja Vps20:n konformaation. Snf7:ään kiinnittyy edellä mainittujen lisäksi myös proteiini, jota ei yleensä lasketa kuuluvaksi ESCRT-III-kompleksiin. Tällainen proteiini on Bro1, jota myös Vps31:ksi kutsutaan. Ihmisellä kyseinen proteiini on nimeltään ALIX, ja sen toiminta poikkeaa hiivan Bro1:n toiminnasta siten, että se sitoutuu sekä CHMP4:ään (engl. chromatin modifying protein 4) että Vps23:een, muodostaen näin sidoksen ESCRT-I- ja ESCRT-III-kompleksien välille. Tällaista sidosta ei ole kuitenkaan havaittu hiivan Bro1:llä (Bowers ym., 2004). Hiivankaan Bro1 ei silti ole mikään jäännös, vaan sillä on roolinsa ubikitiinin poistossa. Jotta ubikitiini ei jäisi sisävesikkeleihin kuljetettavan lastin mukana, poistetaan ubikitiini ESCRT-III-kompleksin kohdalla Doa4-proteiinin toimesta. Tässä puolestaan tarvitaan Bro1:tä, joka värvää Doa4:n paikalle (Luhtala ja Odorizzi, 2004). Näiden lisäksi ESCRT-III-kompleksiin kuuluvat Vps24 ja Vps2 (tunnetaan myös nimellä Did4), muodostavat oman alakompleksinsa Vps20 ja Snf7:n tapaan. Vps24/Vps2-alakompleksi ei kuitenkaan sitoudu lainkaan lipidikalvoon, vaan se sitoutuu Vps20/Snf7-alakompleksiin. Vps24 ja Vps2 eivät myöskään pysty yksinään sitoutumaan, vaan ne tarvitsevat toisensa. Tämän alakompleksin hyvin tärkeä tehtävä on värvätä Vps4 ESCRT-III-kompleksiin ja näin irrottaa koko kompleksi lipidikalvolta, samalla kun vesikkeli kuroutuu irti (Babst ym., 2002a). Babst ym. (2002a) osoittivat myös, ettei ESCRT-III-kompleksi koostu vain yhdestä kappaleesta jokaista proteiinia, vaan että jokaisesta alakompleksista on useita kopioita. Kopioiden tarkkaa lukumäärää ei kuitenkaan pystytty selvittämään, mutta ilmeisesti Vps20:n, Snf7:n, Vps24:n ja Vps2:n määrät ovat kuitenkin lukumääräisesti samat.

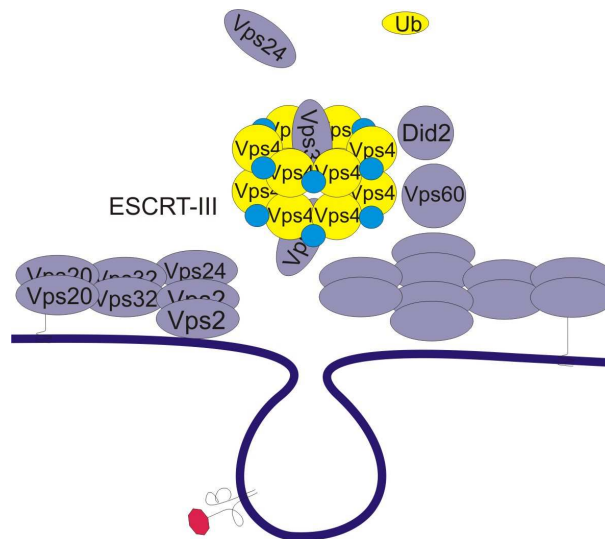
1.2.5. Vps4



Kuva 1.6. Vps4- ja Vta1-proteiinit muodostavat kuusikulmisen kompleksin, jonka keskellä on proteiinien mentävä aukko. Kompleksi kiinnittyy suoraan ESCRT-III-kompleksiin, mutta myös esimerkiksi Did2:een ja Vps60:een, jotka puolestaan kiinnittyvät ESCRT-III-kompleksiin.

Vps4, kuten useimmat muutkin ESCRT-kompleksien proteiinit, on evolutiivisesti hyvin samanlaisena säilynyt proteiini. Hiivan Vps4 on rakenteeltaan 60 prosenttisesti sama kuin ihmisen Vps4, mutta toiminnaltaan proteiinit ovat niin samanlaisia, että ihmisen Vps4B voi korvata hiivan Vps4p:n (Scheuring ym., 2001; Scott ym., 2005). Ihmisellä on kaksi versiota Vps4:sta, Vps4A ja Vps4B. Koska Vps4:n eri lajien välillä ei tunneta toiminnallisia eroja, käytetään tässäkin kappaleessa yleisesti Vps4 nimitystä (Scott ym., 2005). Vps4 kuuluu erittäin suureen AAA (engl. ATPases associated with diverse cellular activities) NTPaasien superperheeseen, jotka ovat kuusikulmisen rengasrakenteen muodostavia, ja Vps4:n tapauksessa, ATP:tä käyttäviä proteiindirakenteita (Frickey ja Lupas, 2004) (kuva 1.6.). Yksi toiminnallinen Vps4-kompleksi koostuu siis Scott ym. (2005) esittämän mallin mukaan kahdestatoista kuusikulmion muotoon ja kahteen kerrokseen asettuvasta proteiinista. Yhden proteiinin rakenne puolestaan pitää sisällään ison ja pienen AAA ATPaasin, beeta-domeenin, C-terminaalisen heliksin ja N-terminaalisen MIT-domeenin (engl. microtubule interacting and transport). Beeta-domeeni koostuu kolmesta antiparalleelista beetalevystä, jollaisia ei muilla AAA superperheen NTPaaseilla ole (Scott ym., 2005). Kyseistä domeenia tarvitaan

välillisesti ESCRT-III-kompleksiin kiinnittymisessä Vta1-proteiinin (engl. Vps twenty associated 1) kautta (Yeo ym., 2003). Vta1 ei kuulu ESCRT-III-kompleksiin, mutta se kiinnittyy Vps20/Snf7-alakompleksiin, Vps60:een sekä Vps46:een (Did2). Vps60:n kanssa Vta1 muodostaa todennäköisesti oman kompleksinsa, joka on samanlainen Vps4:n positiivinen säätelypari kuin Ist1/Did2-proteiinipari, joka kiinnittyy Vps2/Vps24-alakompleksiin (Rue ym., 2008). Vps4:n C-terminaalisen heliksin tarkoitusta ei vielä täysin varmasti tunneta, mutta toisessa päässä oleva N-terminaalinen MIT-domeeni puolestaan on hyvin tunnettu. Sen tarkoituksena on kiinnittää Vps4-proteiinit suoraan ESCRT-III-kompleksin proteiineihin Vps2, Vps24 ja Vps46 (Stuchell-Brereton ym., 2007). Ehkä kaikkein mielenkiintoisimmat domeenit Vps4:ssä ovat sen iso sekä pieni AAA ATPaasi-domeeni, joiden toiminta ja rakenne ovat hyvin tunnettuja. Ne muodostavat ATPaasi-kasetiksi nimetyn alueen, joka sitoo ATP:n ja hydrolysoi sen ADP:ksi ja P_i:ksi. Tällä ATP:stä saatavalla energialla saadaan Vps4-proteiinissa sen toiminnan kannalta oleellinen konformaation muutos (yleiskatsaus Ogura ja Wilkinson, 2001). Vps4:n tärkein tehtävä on ESCRT-III-kompleksin purkaminen ja samalla kuroutuvan rakkulan vapauttaminen irti ulkokalvosta. Scott ym. (2005) mallin mukaan Vps4 on solulimassa monomeerin ja dimeerin tasapainotilassa, ja Vps2/Vps24:n tarttuessa MIT-domeeniin muodostuu kuudesta Vps4-dimeeristä kaksitoista Vps4-proteiinia sisältävä rengasrakenne. Tämän rengasrakenteen keskelle jää ESCRT-III-kompleksin proteiinien, eli Vps20, Snf7, Vps2 ja Vps24:n mentävä aukko, josta ATP:n energialla kyseiset proteiinit vedetään yksi kerrallaan läpi (kuva 1.7.).



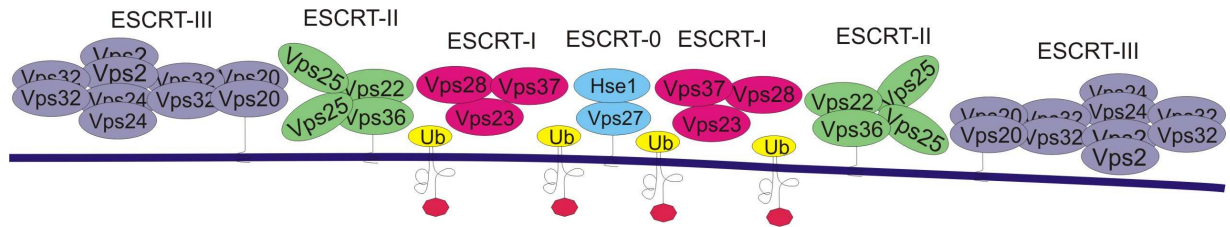
Kuva 1.7. Vps4-kompleksi “vetää” ESCRT-III-kompleksin proteiinit irti kalvosta hajottaen näin koko ESCRT-koneiston. (Mukailtu yleiskatsauksesta Nickerson ym., 2007.)

Se miten tämä mekanismi toimii, on vielä melko suuri kysymysmerkki. Ilmeisesti ESCRT-III-kompleksin proteiinien konformaatio muuttuu irrotettaessa niiden inaktiiviseen muotoon. Myös se, miten ESCRT-I- ja ESCRT-II-kompleksit irtautuvat kalvosta, on vielä avoin kysymys. On kuitenkin arveltu, että ESCRT-III-kompleksin hajotus heikentäisi koko rakennetta niin, että myös ESCRT-I- ja ESCRT-II-kompleksit irtautuisivat kalvosta. Myöskään rakkulan irtautumisen mekanismi ei ole vielä selvillä, mutta se vaikuttaisi myös liittyvän Vps4:n kompleksien irrotukseen (Scott ym., 2005).

1.2.6. ESCRT-kompleksien lineaarinen- vs. ympyrämalli

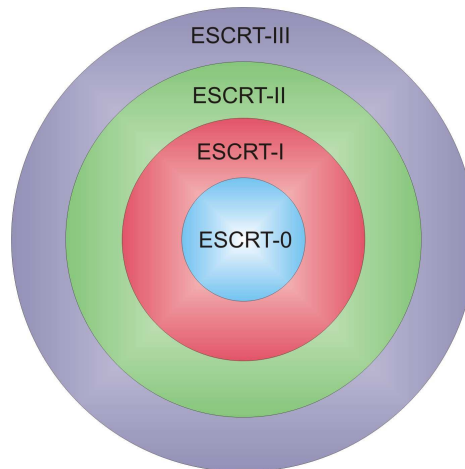
Edellisissä kappaleissa ESCRT-kompleksien toimintaa ja järjestystä on tarkasteltu lineaarisesti, jolloin ESCRT-kompleksit toimivat lukunsa osoittamassa järjestyksessä, värväten aina seuraavan ESCRT-kompleksin paikalle. Tämä malli tunnetaan myös ns. liukuhihnamallina (engl. conveyor belt model) (yleiskatsaus Hurley ja Emr, 2006). Nykyiset mallit ovat pitkälti pohjautuneet Babstin ym. (2002b) esittämään suoraviivaiseen askeleelta toiselle etenevään malliin, eikä tämän mallin kritiikkiin ole löytynyt kovin suurta innostusta. Daniel Nickerson, Matthew Russel ja Greg Odorizzi ovat kuitenkin poikkeus tähän linjaan, ja he ovatkin esittäneet, etteivät ESCRT-kompleksit muodostaisikaan liukuhihnamaista suoraa

ketjua, vaan eräänlaisen ympyrämallin (yleiskatsaus Nickerson ym., 2007). Havainnollisuuden vuoksi on kuva 1.8. ympyrämallista piirretty mukailien kyseisen artikkelin kuvia.



Kuva 1.8. ESCRT-kompleksien järjestys monivesikkelisen rakenteen ulkokalvolla ympyrämallin mukaan. Kuroutuva kalvo syntyy kohtaan, jossa ESCRT-0-kompleksi sijaitsee. (Mukaiutu yleiskatsauksesta Nickerson ym., 2007.)

Ympyrämalli perustuu lähinnä lineaarisen mallin kritiikkiin, ja seuraavassa onkin joitain lineaarisen mallin ongelmia. Ensimmäisenä on ESCRT-III-kappaleessakin esiin nousseet tutkimustulokset siitä, että myös ESCRT-III- ja ESCRT-I-kompleksin välillä on sidoksia (Pineda-Molina ym., 2006). Tämän lisäksi Bowers ym. (2006) esittivät, ettei ESCRT-II-kompleksi ole kaikissa tilanteissa aivan välttämätön, vaan sisärakkula voi muodostua myös ilman tätä. Näissä tutkimuksissa saatiin epidermaalinen kasvutekijä ja MHC-I (engl. major histocompatibility complex class-I) menemään HeLa-solujen (ihmisen kohdunkaulan syöpäsoluminija, engl. human cervical adenocarcinoma cells) sisärakkuloihin normaalisti, vaikka ESCRT-II-kompleksin toiminta oli estetty siRNA:lla (engl. small interfering RNA). Jos kompleksien toimintajärjestys olisi lineaarinen, voisi yhden kompleksin poisjäänti olla kohtalokasta. Kun mallina käytetään ympyrämallia, ei yhden lenkin katkeaminen katkaise koko ketjua, vaan malli pystyy joustamaan paremmin muuttuneisiin olosuhteisiin (yleiskatsaus Nickerson ym., 2007). Kauan vallalla olleelle liukuhihnamallille saattaa siis siltäkin olla vaihtoehtoja. Ympyrämallin perusidea on se, että ESCRT-0-, ESCRT-I- ja ESCRT-II-kompleksit muodostavat eräänlaisen superkompleksin, jossa ESCRT-0 sijaitsee keskellä, ESCRT-I kehänä tämän ympärillä ja ESCRT-II vielä ESCRT-I:n kehän ympärillä (kuva 1.9.).



Kuva 1.9. ESCRT-kompleksien sijoittuminen toisiinsa nähden ympyrämallin mukaan. Kuva on kuvattu kalvoon nähden ylhäältäpäin, jolloin kuroutuva rakkula sijaitisi ESCRT-0-kompleksin alla. (Mukailtu yleiskatsauksesta Nickerson ym., 2007.)

ESCRT-III muodostaa uloimman kehän, ja onkin liukuhihnamallista poiketen kaikkein kauimpana muodostuvasta rakkulasta. Ympyrämallin ESCRT-kompleksit ovat muodostuvaan rakkulaan nähden täysin päinvastaisessa järjestyksessä kuin liukuhihnamallissa, mutta silti niiden toimintajärjestys ei poikkea paljoa lineaarisesta järjestyksestä. Lisäksi ESCRT-III-kompleksin kauimmaisena olo selittäisi hyvin sen, miksi ESCRT-III-kompleksilla ei ole lainkaan lastin ubikitiiniin tarttuvia motiiveja (yleiskatsaus Nickerson ym., 2007).

1.3. Monivesikkelinen organelli

Monivesikkeliseksi rakenteeksi (MVB, engl. multivesicular body) voidaan lukuisista nimeämistavoista johtuen käsittää – lähteestä riippuen – esimerkiksi vain myöhäiset endosomit, mutta tässä tutkielmassa kyseinen termi käsittää kaikki monivesikkeliset rakenteet varhaisista endosomeista myöhäisiin endosomeihin sekä näiden lisäksi kaveosomit. Tässä tutkielmassa käytettynä termin laajuus johtuu siitä, että tällä hetkellä yleisesti hyväksytyin sisävesikkelien kuroutumistapa on samanlainen kaikissa näissä rakenteissa (yleiskatsaus Williams ja Urbe, 2007).

1.3.1. Monivesikkeliset rakenteet endosomireitillä

Eniten tutkittu ja siten myös parhaiten tunnettu monivesikkelinen rakenne on monivesikkelinen endosomi, jonka Grünberg ym. löysivät jo 1980-luvun loppupuolella (Grünberg ym., 1989). Termi kattaa rakenteet varhaisista endosomeista kuljetusrakkuloiden kautta myöhäisiin endosomeihin. Nämä endosomit löytyvät klatriinireitin varrelta, ja niiden matka päättyy usein joko lysosomeihin, Golgin laitteeseen tai kierrätysendosomin kautta takaisin solukalvolle. Tästä johtuen klatriinireitin endosomeilla on monia säätelytehtäviä, joista ehkä eniten tutkittu on epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR, engl. epidermal growth factor receptor) säätely joko hajottamalla kyseinen reseptori lysosomissa tai lähettämällä se takaisin solukalvolle. Jos kyseinen reseptori on tarkoitus hajottaa, pitää se saada jotenkin kokonaan lysosomin sisälle. Tässä ongelmassa piilee ainakin yksi monivesikkelisten rakenteiden tarkoitus, sillä MVB:n ulkokalvon sulautuessa lysosomin kalvoon, sisärakkulat proteiineineen vapautuvat kokonaan lysosomin sisään. Näin kalvoproteiinitkaan eivät jää puoliksi ulkopuolelle, kuten kävisi, jos ne olisivat kiinni kalvossa, joka sulautuu lysosomin kanssa yhdeksi kalvoksi. Näin siis saadaan hajotettua kalvoproteiineja sekä kalvoissa olevia rasva-aineita. Erityisen tärkeää on, että oikeat molekyylit lajitellaan oikeaan paikkaan, jolloin hajotetuksi tulevat vain hajotukseen tarkoitetut, usein ubikitinillä merkityt molekyylit (yleiskatsaus Raiborg ym., 2003). Monivesikkelisen endosomin toimintahäiriöistä johtuvia sairauksia tunnetaan useita. Esimerkiksi etuohimolohkon dementia, joka on toiseksi yleisin dementia heti Alzheimerin taudin jälkeen, kuljetukseen tarvittavan ESCRT-III-kompleksin CHMP2-proteiinin mutaatio aiheuttaa ubikitinoitujen proteiinien kertymiä hermosoluihin (Filimonenko ym., 2007).

1.3.2. Monivesikkelinen kaveosomi

Kaveosomi on monivesikkelisistä rakenteista viimeisin löydös, ja sen roolista solussa on useita eri selityksiä. Ulkonäöltään kaveosomi on melko samanlainen kuin esimerkiksi myöhäiset endosomit, mutta siitä puuttuvat myöhäisille endosomeille tyypilliset merkkiaineet, kuten lysobisfosfaattihappo (LBPA, engl. lysobisphosphatidic acid) ja CD63. Kaveosomit ovatkin pysyviä rakenteita, joiden pH on neutraali ja joiden kalvo sisältää runsaasti kolesterolia,

glykosfingolipidejä ja kaveoliini-1:tä (Pelkmans ym., 2001; yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002; Botos ym., 2007). Kaveosomeja syntyykin kaveoliinireitillä, johon myös makropinosytoosin kaltainen reitti näyttäisi yhtyvän (Karjalainen ym., 2008, painossa).

1.4. Echovirus 1

Echovirus 1 kuuluu pikornavirusten heimoon ja enterovirusten sukuun. Kuten jo heimon nimestäkin voi päätellä, on echovirus 1 hyvin pieni ja vaipaton RNA-virus. Sen kapsidi koostuu 60 yksiköstä, jotka kukin sisältävät neljä erilaista proteiinia. Echovirus 1:n genomi on plus-merkkinen yksijuosteinen RNA, joka transloidaan polyproteiiniksi ja pilkotaan tämän jälkeen proteolyttisesti echoviruksen virusproteiineiksi. Kaikki pikornavirukset lisääntyvät solulimassa ja kuuluvat seitsemään eri sukuun, joista enterovirukset ovat yksi (yleiskatsaus Bedard ja Semler, 2004). Ihmisellä echovirukset aiheuttavat esimerkiksi hengitystieinfektioita, aivokalvontulehdusta ja sydänlihastulehduksia (yleiskatsaus Grist ym., 1978).

1.4.1. Reseptorit ja reitit

Reseptorinaan solun pinnalla echovirus 1 käyttää integriineihin kuuluvaa $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä, joka muodostuu $\alpha 2$ - ja $\beta 1$ -proteiineista. Integriinit kuuluvat suureen geeniperheeseen proteiineja, jotka välittävät solu–solu- ja solu–soluväliaiNELIITOKSIA. Kuten $\alpha 2\beta 1$ -integriini, myös muut integriinit muodostuvat alfa- ja beeta-alayksiköistä (yleiskatsaus Hynes, 1992). Tarkemmin ottaen echoviruksen sitoutumiskohtana toimii $\alpha 2$ -alayksikön I-domeeni (engl. inserted domain), joka sijaitsee $\alpha 2$ -proteiinin aminoterminaalisisessa päässä eli soluvälitilassa (Bergelson ym., 1992). Echovirus 1 kilpailee reseptoristaan eli $\alpha 2\beta 1$ -integriinin I-domeenista pääasiassa kollageeni-I:n kanssa (Kamata ym., 1999). Vaikka kollageeni-I ja echovirus 1 kiinnittyvätkin eri kohtiin I-domeenissa, eivät ne silti pysty steeristen esteiden takia sitoutumaan I-domeeniin samanaikaisesti. Tässä ongelmassa echoviruksen apuna on kuitenkin se, että echovirus 1 sitoo reseptoriaan 10-kertaisella voimakkuudella kollageeniin verrattuna. Echovirus 1 pystyy sitoutumaan yhtäaikaaisesti viiteen $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin, mikä aiheuttaa integriinien kasautumisen (engl. clustering) (Xing ym., 2004). Kasautuminen puolestaan aiheuttaa integriinien lateraalista liikkumista solukalvolla ja kasaumien kertymistä yhä

suuremmiksi kasaumiksi. Tämä johtaa signaalinsiirtoketjun aktivoitumiseen ja integriinien siirtymiseen solun sisään (Upla ym., 2004). Echovirus 1 käyttää vähäisessä määrin kaveolivälitteistä endosytoosia ja pääasiassa makropinosytoosin kaltaista reittiä (Karjalainen ym., 2008, painossa). Kummankin reitin kautta echovirus 1 kuitenkin päätyy kaveosomiin, josta eteenpäin echovirus 1:n reittiä perinukleaaritilaan ei vielä tunneta (Marjomäki ym., 2002).

2. TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Kaveosomin monivesikkelinen rakenne havaitaan selvästi EV1-infektoiduissa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa (Upla ym., 2004). Tällainen monivesikkelinen kaveosomi muistuttaa hyvin paljon klatriinireitin myöhäisiä endosomeja sekä endosomaalisia kuljetusrakkuloita (Grünberg ym., 1989). Tutkimuksen tarkoituksena olikin selvittää, toimiiko monivesikkelisen kaveosomin muodostuksessa samat ESCRT-kompleksit, jotka muodostavat klatriinireitin monivesikkeliset rakenteet (yleiskatsaus Grünberg ja Stenmark, 2004; Marjomäki ja Schaible, 2005; yleiskatsaus Slagsvold ym., 2006). Lisäksi, koska EV1 päätyy solun sisälle päästyään nopeasti kaveosomeihin (Karjalainen ym., 2008, painossa), oli tutkimuksessa tarkoitus selvittää kaveosomeissa mahdollisesti toimivien ESCRT-kompleksien merkitystä EV1-infektiossa.

Tutkimuksessa pyrittiin siis selvittämään

1. Toimivatko monivesikkelisen endosomin muodostavat ESCRT-kompleksit myös monivesikkelisen kaveosomin muodostuksessa
2. Mikä merkitys ESCRT-komplekseilla on echovirus 1 infektiossa

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1. Solut, bakteerit, virukset ja vasta-aineet

Kokeissa käytettiin SAOS-soluja (ihmisen luusyöpäsoluminija, engl. human osteosarcoma cells; American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA) ja HeLa-soluja (ihmisen kohdunkaulan syöpäsoluminija, engl. human cervical adenocarcinoma cells; Ohio-kanta, joka saatu Timo Hyypiältä, Virologian osasto, Turun yliopisto). Pääosa kokeista suoritettiin SAOS-soluilla (SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut), joihin on pysyvästi transfektoitu $\alpha 2$ -integriini (Ivaska ym., 1999) ja solut kuuluivat SAOS- $\alpha 247$ -soluklooniiin. Kaikki solut viljeltiin Gibcon DMEM:ssä, joka sisälsi 10 % FBS-seerumia (Gibco, Gran Island, USA), 2 mM L-glutamiinia (Gibco), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomysiiniä (Gibco) ja 100 IU/ml penisilliiniä (Gibco). *Escherichia colia* (JM109-kanta) käytettiin kokeissa tarvittavan pEGFP-hVPS4 E235Q -konstruktiin (tekstissä lyhennetty DN Vps4-GFP) tuottoon. Konstruktiin oli lahjoittanut Harald Stenmark (Dept. Of Biochemistry, The Norwegian Radium Hospital, Montebello, Oslo, Norja). Kokeissa käytettiin echovirus 1:tä (Farouk-kanta, ATCC), joka oli tuotettu GMK-soluissa (viherapinan munuaissoluminija, engl. green monkey kidney cells; saatu Timo Hyypiältä), sekä puhdistettu sakkaroosigradienttiajolla (Marjomäki ym., 2002). Kokeissa käytetyt vasta-aineet olivat seuraavat: anti-EV1-vasta-aine (Marjomäki ym., 2002; laimennos 1:150), kaveoliini-1 (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA; laimennos 1:150), Has6, joka tunnistaa $\alpha 2$ -integriinin (Fiona M., Watt D. Phil., Cancer Research, Englanti; laimennos 1:100), L230, joka tunnistaa αV -integriinin (ATCC; laimennos 1:50), Rab11 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA; laimennos 1:150), CI-MPR, joka tunnistaa myöhäiset endosomit (Marjomäki ym., 1990; laimennos 1:100), Tsg101 (GeneTex Inc., 14785 Omicron Dr., Suite101, San Antonio, TX, 78245, USA; laimennos 1:75). Kaikkien vasta-aineiden laimennokset tehtiin 3 % BSA:ta (Boehring, Marburg, Saksa) sisältävään PBS:ään.

3.2. siRNA-transfektio

siRNA-transfektioissa käytettiin HeLa-soluja, joihin transfektoitiin Tsg101 (5'-CGAUGGCAGUCCAGGGAAAdTdT-3'; saatu Harald Stenmarkilta), Vps24 (5'-

AGCAUGGACGAUCAGGAAGTT-3’; saatu Harald Stenmarkilta), HCRPI (5’-CAACAAGUCAUACCACAGCTT-3’; saatu Harald Stenmarkilta) tai kontrollina käytettävää kalpaiini-siRNA:ta (5’-CCGGACCATCCGCAAATGGAA-3’; Qiagen, Valencia, CA, USA). Toisena kontrollina toimi pelkkä seerumiton DMEM-medium. Transfektoinnit suoritettiin oligofektamiinilla (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Bishop ym. (2002) artikkelin ohjeen mukaan seitsemän tunnin EV1 infektiolla. Transfektion onnistuminen varmennettiin SDS-PAGE-geelielektroforeesilla (Mini Protean II Electrophoresis Cell; Bio-Rad, Richmond, CA, USA) ja immunoblottauksella (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad). Geelielektroforeesiajoissa käytettiin 12 %:sta SDS-polyakryyliamidigeeliä ja immunoblottaus tehtiin polyvinyylidifluoridikalvolle (Millipore, Bedford, MA, USA). Tämän jälkeen kalvolta estettiin epäspesifinen sitoutuminen inkuboimalla kalvoa 5 % maitojauhetta ja 1 % BSA:ta sisältävässä TBS-TWEEN-liuoksessa (150 mM NaCl, 50mM TRIS pH 7.5, 0.05 % TWEEN), vaihtoehtoisesti tunnin huoneenlämmössä tai 12 tuntia +4 °C:ssa. Vasta-ainevärjäyksissä käytettiin primäärivasta-aineena HCRPI ja Vps24 vasta-aineita (molemmat saatu Harald Stenmarkilta), joista HCRPI laimennettiin 1:2000:een ja Vps24 1:5000:een, 1 % BSA:ta sisältävään TBS-TWEEN:iin. Blotteja värjättiin huoneenlämmössä kaksi tuntia ja tämän jälkeen sekundaarivasta-aineena käytettiin anti-kani-HRP-konjugaattia (Bio-Rad), jonka laimennus oli 1:3000 5 % maitojauhetta sisältävässä TBS-TWEEN:ssä. Signaalien detektointi tapahtui kemiluminesenssilla (Pierce, Rockford, IL, USA).

3.3. Transfektiot

SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut transfektoitiin FuGENE 6 -reagenssilla valmistajan ohjeen mukaan (Roche, Basel, Sveitsi) 48 tuntia. Transfektiossa käytetyt konstruktit olivat DN Vps4-GFP, sekä kontrolleina GFP, Cdc42 wt ja N1-YFP (kaikki saatu Lucas Pelkmansilta, Institute of Molecular Systems Biology, Zürich, Sveitsi).

3.4. Immunofluoresensivärjäykset ja konfokaalimikroskopia

Transfektioituihin tai tranfektoimattomiin, lähes konfluentteihin SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluihin tartutettiin EV1:tä (MOI noin 100 ja proteiinipitoisuus 0,5 – 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) tunnin ajan +4 °C:ssa, 1

% FBS-seerumia sisältävässä DMEM:ssä. Ylimääräiset virukset pestiin pois kylmällä PBS:llä, joka sisälsi 0,5 % BSA:ta. Infektion annettiin edetä 15 minuuttia, 2 tuntia tai 7 tuntia, +37 °C:ssa 10 % seerumia sisältävässä DMEM:ssä. Tämän jälkeen solut kiinnitettiin 30 minuutin ajan huoneenlämmössä PBS:ään laimennetulla 4 % PFA:lla (Merck, Darmstadt, Saksa) ja permeabilisoitiin 5 minuutin ajan PBS:ään laimennetulla 0,2 % Triton-X-100:lla (Sigma, St. Louis, MO, USA). Sekundaarivasta-aineina toimivat vuohessa tuotetut kanin ja hiiren vasta-aineet Alexa 488 nm, Alexa 555 nm ja Alexa 633 nm (Molecular Probes, Inc.; laimennos 1:200). α V-integriinin, α 2-integriinin ja DN Vps4-GFP:n kolokalisaatiokokeet suoritettiin seuraavasti: Joko Has6 vasta-ainetta (α 2-integriini), tai L230 vasta-ainetta (α V-integriini), lisättiin SAOS- α 2 β 1-soluihin, jotka oli transfektoitu dominanttinegatiivisella Vps4-GFP:llä. Vasta-aineita tartutettiin 1h jäällä 1 % DMEM:ssä ja tämän jälkeen pestiin PBS:llä, joka sisälsi 0,5 % BSA:ta. α 2- ja α V-integriinien kasautumiskokeiden sekundaarivasta-aineena toimi vuohessa tuotettu hiiren vasta-aine Alexa 555 nm (Molecular Probes, Inc.; laimennos 1:750), jota tartutettiin tunnin jäällä 1 %:ssa DMEM:ssä. Sitoutumattomat vasta-aineet pestiin pois 0,5 % BSA-PBS:llä (3 \times 5 min). Tämän jälkeen kasautumisen annettiin edetä +37 °C:ssa joko 15 minuuttia tai kaksi tuntia. Halutun ajan jälkeen solut kiinnitettiin 30 minuuttia 4 % PFA-PBS:llä ja permeabilisoitiin 5 minuuttia PBS:ään laimennetulla 0,2 % Triton-X-100:lla. Primäärivasta-aineina käytettiin 15 minuutin aikapisteissä kaveoliini-1:tä ja 2 tunnin aikapisteissä CI-MPR:ää. Sekundaarivasta-aineena käytettiin vuohessa tuotettua kanin vasta-ainetta, Alexa 633:a. Näytteet kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (Olympus IX81, Fluoview-1000-ohjelma) ja resoluutiona käytettiin 800 \times 800 pikseliä, objektiivin ollessa UPLAPO 60x, 1.35, öljyobjektiivi. Eri eksitaatioaallonpituudet skannattiin erikseen epätodellisen kolokalisaation ja kanavalta toiselle vuotamisen estämiseksi. Tilastolliseen testaukseen käytettiin binomista t-testiä ja näytteiden kolokalisaatiot havainnollistettiin BioImageXD-ohjelman kolokalisaatio toiminnolla.

3.5. Elektronimikroskopia

Transfektoidut SAOS- α 2 β 1-solut käsiteltiin hiiren anti- α 2 vasta-aineella (laimennos 1:100). Vasta-ainetta tartutettiin yhden tunnin ajan jäällä 1 % DMEM:ssä, jonka jälkeen tehtiin

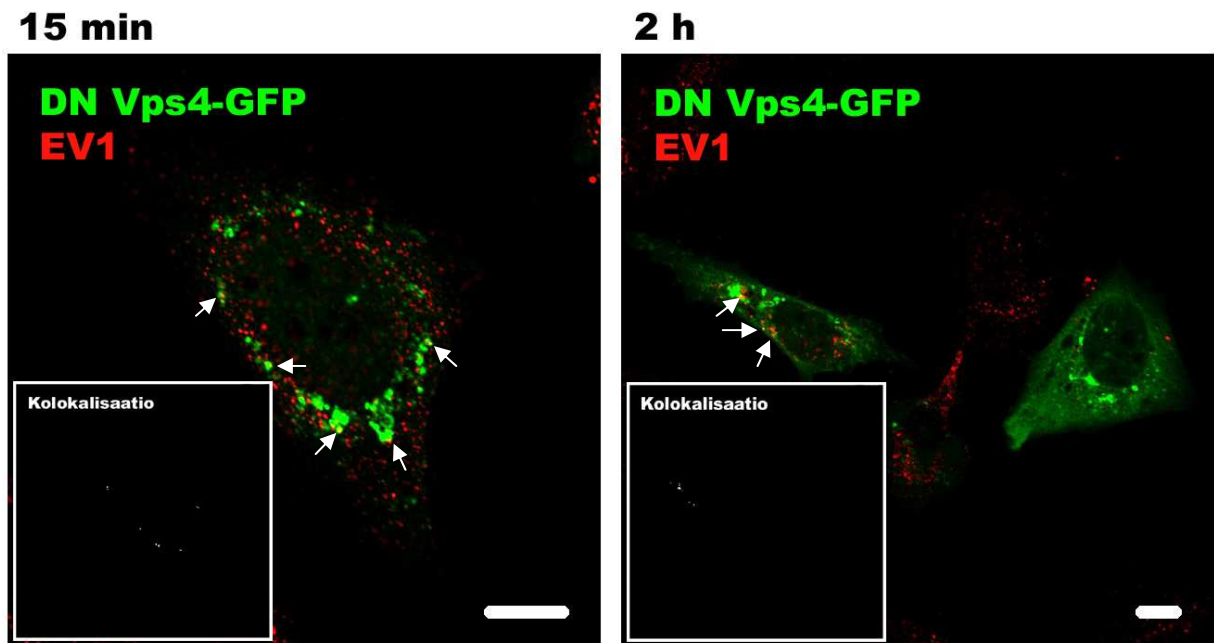
vastaava tunnin käsittely kanin anti-hiiri IgG vasta-aineella (Sigma; laimennos 1:750). Tällä sekundaarivasta-aineella saatiin $\alpha 2$ -integroinit kasautettua ja näin kulkeutumaan solun sisään. Viimeisenä näytteet käsiteltiin sekundäärivasta-aineeseen sitoutuvalla proteiini A -kullalla (10nm, G. Posthuma ja J. Slot, Utrecht, The Netherlands) tunnin jäällä, 1 % DMEM:ssä. Tämän jälkeen solut pidettiin kaksi tuntia +37 °C:ssa, 10 % DMEM:ssä. Solujen kiinnitys tehtiin 2,5 % glutaraldehydillä (0,1 M:ssa natriumfosfaattipuskurissa, pH 7.4). Fiksaus suoritettiin +4 °C:ssa yhden tunnin ajan. Jälkifiksaus tehtiin 1 %:lla osmiumtetroksidilla samoin kuin edellinenkin fiksaus ja samassa puskurissa. Näytteet kuivattiin etanolilla, värjättiin uranyyliasetatilla ja valettiin LX-112:n. Valetut näytteet leikattiin ultramikrotomilla Raija Vassisen toimesta. Elektronimikroskooppinäytteet kuvattiin JEOL JEM-1200ex elektronimikroskoopilla ja näytteiden tilastollinen testaus tehtiin binomisella t-testillä.

4. TULOKSET

4.1. Dominanttinegatiivisen Vps4-GFP:n vaikutus EV1-infektioon

4.1.1. Virusten seuraaminen 15 minuutin, 2 tunnin ja 7 tunnin aikapisteissä

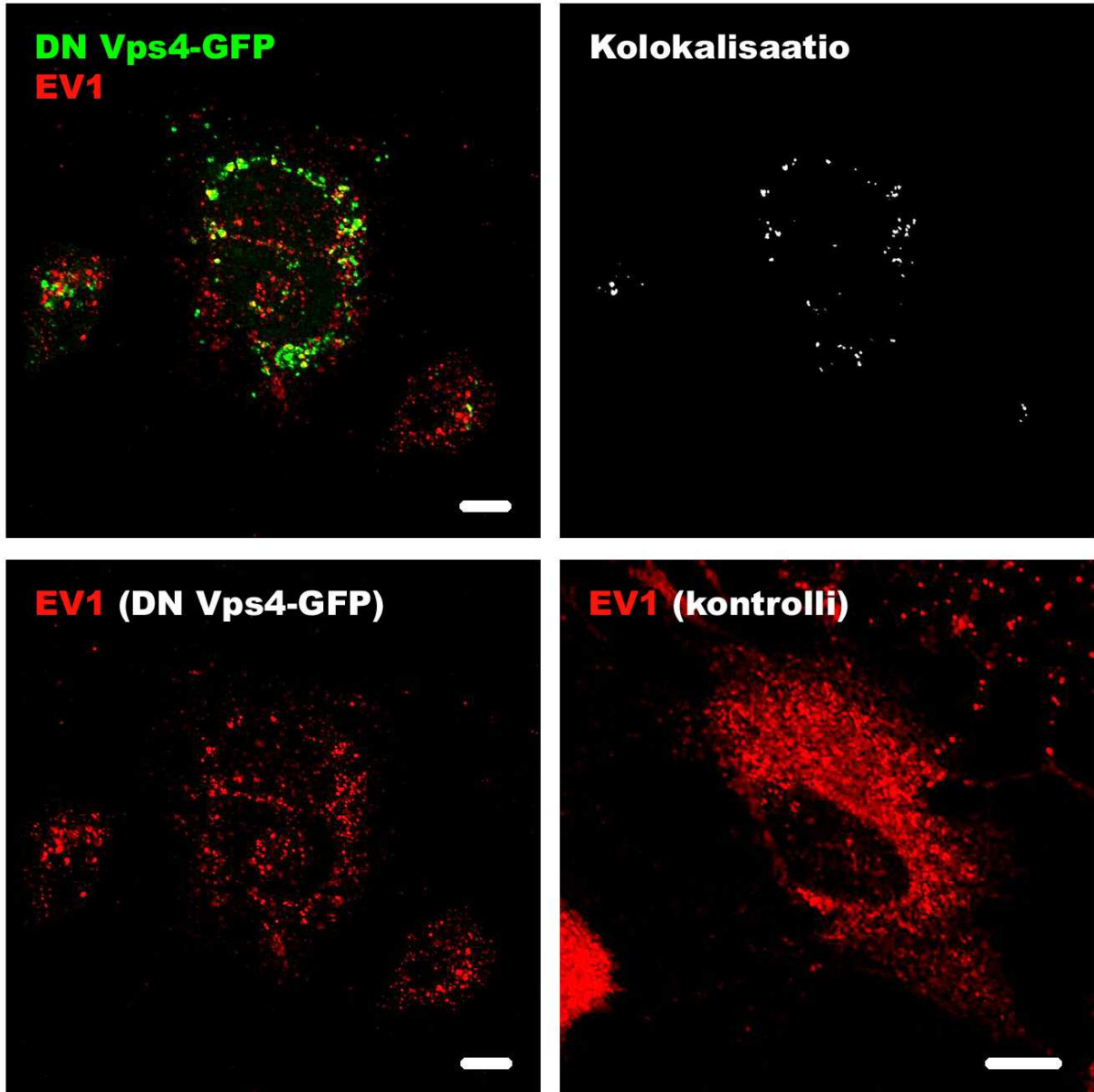
Havaitaksemme dominanttinegatiivisen Vps4-GFP:n vaikutukset EV1-infektioon, seurasimme EV1-infektion etenemistä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa, joihin oli transfektoitu joko DN Vps4-GFP tai kontrollina toimiva GFP. Kaikissa kokeissa EV1 värjättiin punaisella. Aikapisteissä 15 minuuttia ja 2 tuntia ei vielä havaittu merkittävää kolokalisoitumista EV1:n ja DN Vps4-GFP:n välillä. Kummassakin aikapisteessä voi kuitenkin havaita EV1:n kertymistä lähelle Vps4-GFP:llä leimautuvia rakenteita (kuva 4.1.).



Kuva 4.1. Vasemmalla 15 minuutin ja oikealla 2 tunnin aikapiste DN Vps4-GFP-transfektoiduista soluista, joissa EV1 on värjätty punaisella ja DN Vps4-GFP näkyy vihreällä. Nuolet osoittavat keltaisena näkyviä kohtia, joissa EV1 ja DN Vps4-GFP kolokalisoituvat. Kuvien alakulmissa on kolokalisaatiokuvat, joissa näkyy valkoisella vain kolokalisoituneet pikselit. Kuvat ovat yksittäisiä leikkeitä ja mittajana 10 μm .

Seitsemän tunnin aikapisteessä näkyy kuitenkin jo jonkun verran EV1:n kasautumista DN Vps4-GFP:n kanssa samalle alueelle (kolokalisoitumista). Tämän lisäksi kontrollisolujen EV1-infektio on edennyt selvästi pidemmälle kuin dominanttinegatiivisen Vps4-GFP:n sisältävien

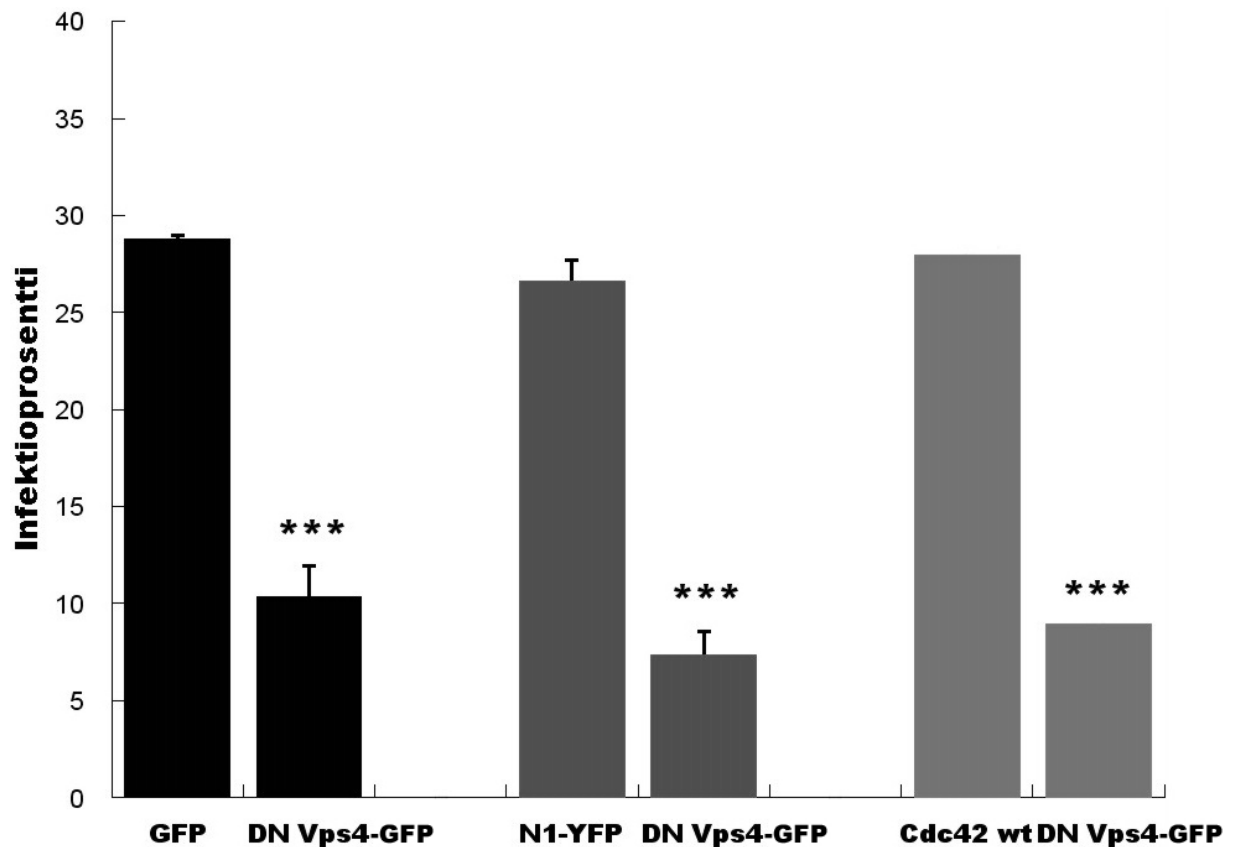
solujen infektiio. Kontrollisoluissa EV1 onkin levittäytynyt paljon tasaisemmin ja laajemmalle solulimaan, eli infektiio on edennyt pidemmälle (kuva 4.2.).



Kuva 4.2. Kaikki kuvat ovat 7 tunnin aikapisteistä. Kuvissa EV1 on värjätty punaisella ja vasemman yläkulman kuvassa DN Vps4-GFP näkyy vihreällä sekä näiden kahden kolokaloituminen keltaisella. Pelkät kolokaloituneet pikselit näkyvät oikeanpuoleisessa yläkuvassa valkoisena. Vasemmanpuoleiset kuvat ovat DN Vps4-GFP-transfektoidusta solusta ja oikealla alhaalla oleva GFP-transfektoidusta solusta. Kuvat ovat yksittäisiä leikkeitä ja mittajana 10 μm .

4.1.2. Infektioitrus

Näissä kokeissa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluihin transfektoitiin dominanttinegatiivisen Vps4-GFP:n lisäksi kolme eri kontrollia (GFP, Cdc42 wt ja N1-YFP). Alun perin kontrollina piti toimia vain GFP, mutta GFP:n alhaisen transfektiotehokkuuden takia kokeet toistettiin myös Cdc42 wt- ja N1-YFP-konstrukteilla. Kokeissa EV1-infektion aika oli seitsemän tuntia. Näistä kokeista laskettiin konfokaalimikroskoopilla otetuista kuvista infektiotehokkuus, eli transfektoituneiden ja infektoituneiden solujen suhde vain transfektoituneisiin soluihin (kuva 4.3.).



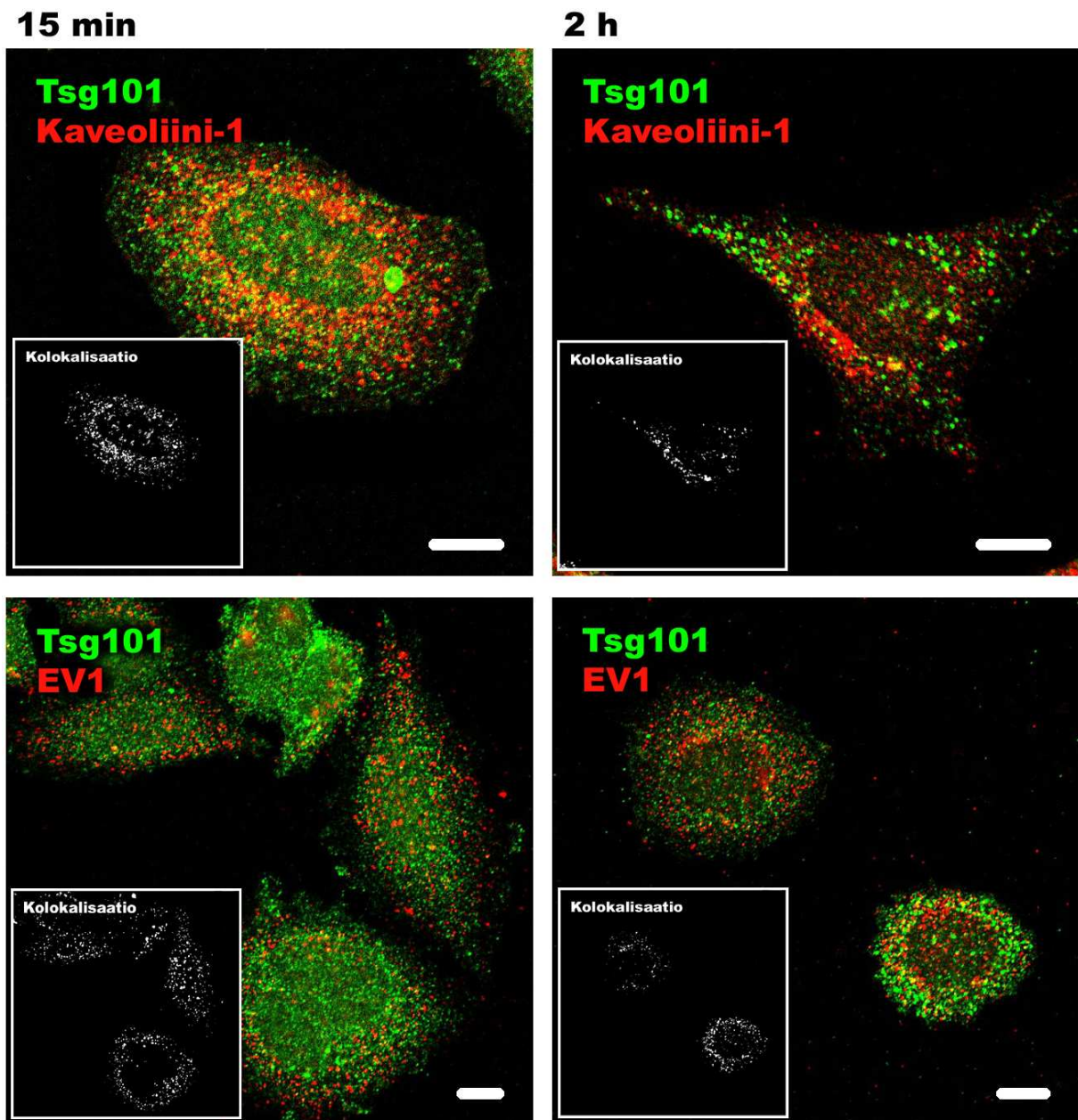
Kuva 4.3. Kuvaajaan on yhdistetty kolmen eri kokeen tulokset. Kokeet, joissa kontrolleina käytettiin GFP:tä tai N1-YFP:tä, toistettiin kolme kertaa. Kuvaajan infektioprosentti laskettiin transfektoituneiden ja infektoituneiden solujen suhteena transfektoituneisiin soluihin. Tuloksille laskettiin binominen t-testi, jolloin kaikkien kokeiden DN Vps4-GFP:lle saatiin arvoksi $p < 0,001$ (***).

Taulukko 4.1. Kokeet, joissa kontrolleina käytettiin GFP- tai N1-YFP-transfektioita, toistettiin kolme kertaa. Taulukkoon on laskettu yhteen näiden toistojen transfektoituneet ja infektoituneet solut sekä näistä infektioprosentit. SD = keskihajonta (engl. standard deviation).

| | Transfekoituneet | Infektoituneet | Infektioprosentti | SD |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------|
| GFP (kontrolli) | 6641 | 1911 | 28,8 | 0,20 |
| DN Vps4-GFP | 1381 | 145 | 10,5 | 1,63 |
| N1-YFP (kontrolli) | 1429 | 382 | 26,7 | 1,04 |
| DN Vps4-GFP | 574 | 43 | 7,5 | 1,19 |
| Cdc42 wt (kontrolli) | 422 | 118 | 28,0 | - |
| DN Vps4-GFP | 179 | 16 | 8,9 | - |

4.2. Transfekoimattomien solujen ESCRT-I-kompleksin vasta-ainevärjäykset

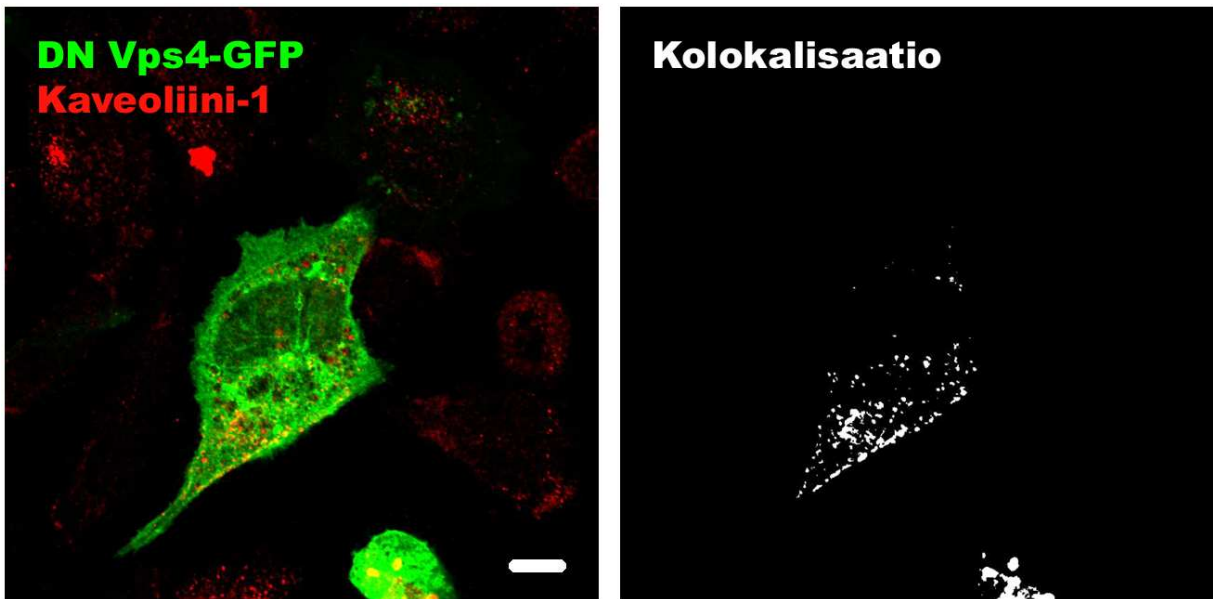
Koska Tsg101 on hyvin tärkeä proteiini ESCRT-I-kompleksissa, halusimme tutkia sen kolokalisoitumista kaveoliini-1:n ja EV1:n kanssa. Kokeissa soluihin tartutettiin EV1, ja 15 minuutin tai 2 tunnin aikapisteiden jälkeen solut kiinnitettiin. Osassa kokeista värjäsimme EV1:n ja Tsg101:n, ja osassa kaveoliini-1:n ja Tsg101:n. Kummatkin, kaveoliini-1 ja EV1, kolokalisoituivat Tsg101:n kanssa sekä 15 minuutin että kahden tunnin aikapisteissä (kuva 4.4.).



Kuva 4.4. Vasemmalla ovat 15 minuutin ja oikealla 2 tunnin aikapisteet. Ylimmissä kuvissa kaveoliini-1 ja alemmissä EV1 on värjätty punaisella. Kaikissa kuvissa Tsg101 on värjätty vihreällä ja punaisen ja vihreän kolokalisaatio näkyy keltaisella. Lisäksi joka kuvassa on pienennettynä pelkästään kolokalisaation valkoisella osoittava kuva. Kuvat ovat yksittäisiä leikkeitä ja mittajana 10 μm .

4.3. $\alpha 2$ -integriinin ja kaveoliini-1:n kolokalisoituminen DN Vps4-GFP:n kanssa

Osa infektoiduista soluista värjättiin $\alpha 2$ -integriini- ja kaveoliini-1-vasta-aineilla. Kaveoliini-1-värjättyissä kokeissa ainoa infektion aikapiste oli 15 minuuttia ja kolokalisaatio DN Vps4-GFP:n kanssa oli selvästi havaittavissa (kuva 4.5.). Kokeet, joissa $\alpha 2$ -integriini värjättiin, eivät onnistuneet. Tämä johtui pääasiassa huonoista värjäystuloksista, eikä näitä värjäyksiä kuvattu lainkaan.

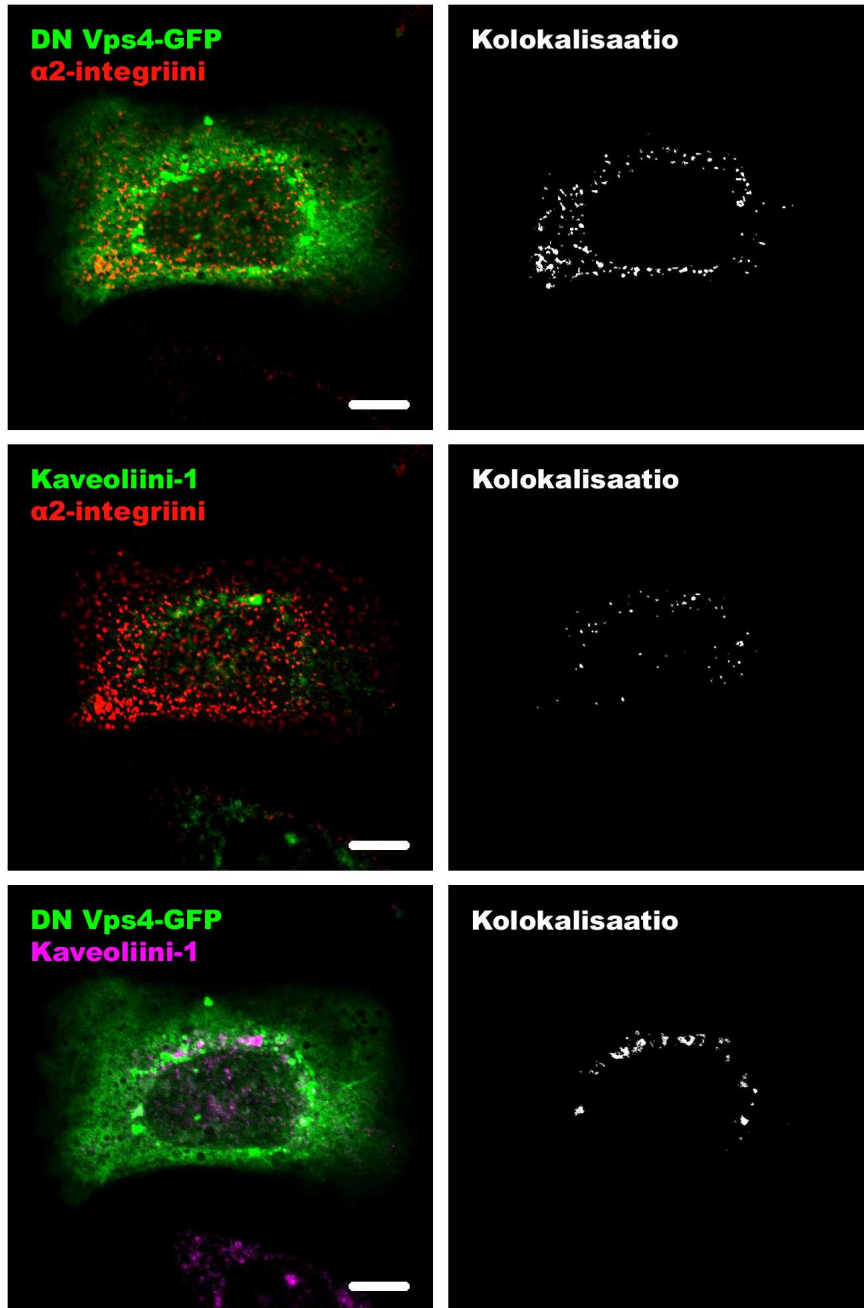


Kuva 4.5. EV1-infektion aikapiste on 15 minuuttia. Soluun on transfektoitu DN Vps4-GFP, joka näkyy vasemmalla olevassa kuvassa vihreällä. Vasemmassa kuvassa on värjätty punaisella kaveoliini-1, ja DN Vps4-GFP:n ja kaveoliini-1:n kolokalisaatio näkyy keltaisella. Oikeanpuoleinen kuva näyttää vain vasemmanpuoleisessa kuvassa kolokalisoituvat pikselit. Kuva on yksittäinen leike ja mittajana 10 μm .

4.4. Kasautettujen $\alpha 2$ - ja αV -integriinien kolokalisoituminen DN Vps4-GFP:n kanssa

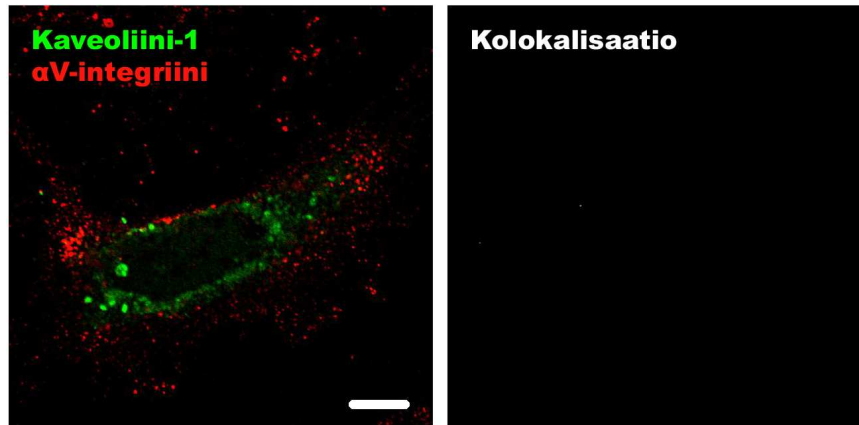
Kasautettuina eli vasta-aineella yhteen kytkettyinä $\alpha 2$ - ja αV -integriinit kasautuvat solukalvolla yhteen ja siirtyvät kullekin ominaista reittiä solun sisään. $\alpha 2$ -integriini kulkee pääasiassa makropinosytoosin kaltaista reittiä ja αV -integriini, joka toimii kontrollina, klatriinivälitteistä reittiä. Kokeissa suoritettiin sekä 15 minuutin että kahden tunnin kasauttaminen. Kummassakin aikapisteessä näkyi selvästi samansuuntaisia tuloksia kuin EV1

infektiokokeissa, eli $\alpha 2$ -integriinin kolokalisoitumista DN Vps4-GFP:n ja kaveoliini-1:n kanssa (kuva 4.6.).



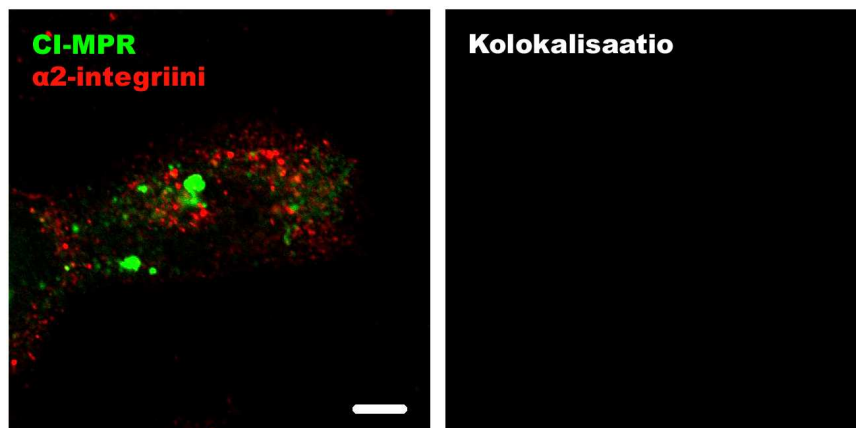
Kuva 4.6. Kaikki kuvat ovat samasta solusta ja aikapisteenä on 15 minuuttia. Vasemmassa yläkuvassa on DN Vps4-GFP värjätty vihreällä ja $\alpha 2$ -integriini punaisella, keskellä vasemmalla kaveoliini-1 on värjätty vihreällä ja $\alpha 2$ -integriini punaisella. Alhaalla vasemmalla on DN Vps4-GFP värjätty vihreällä ja kaveoliini-1 violetilla. Kaikissa vasemmanpuoleisissa kuvissa kolokalisaatio näkyy keltaisella ja oikeanpuoleisissa kuvissa vastaavan kuvan kolokalisaatio näkyy valkoisella. Kuvat ovat yksittäisiä leikkeitä ja mittajana 10 μm .

Kontrollina toimineen αV -integriinin kasautuskokeissa ei juurikaan havaittu kolokalisoitumista klatriinireittiä käyttävän αV -integriinin ja kaveolireittiä käyttävän kaveoliini-1:n välillä (kuva 4.7.).



Kuva 4.7. Kuvan DN Vps4-GFP-transfektioitua solua on kasautettu 15 minuuttia αV -integriinin vasta-aineella. αV -integriini on värjätty vasemmanpuoleisessa kuvassa punaisella ja kaveoliini-1 vihreällä. Oikealla olevasta kolokalisaatiokuvasta nähdään, etteivät nämä kolokalisoidu keskenään. Kuvat ovat yksittäisiä leikkeitä ja mittajana 10 μm .

Myöskään $\alpha 2$ -integriinien kasautuskokeissa ei löytynyt kolokalisaatiota pääasiassa makropinosytoosin kaltaista reittiä käyttävän $\alpha 2$ -integriinin ja myöhäisten endosomien merkkiaineen CI-MPR:n välillä (kuva 4.8.).



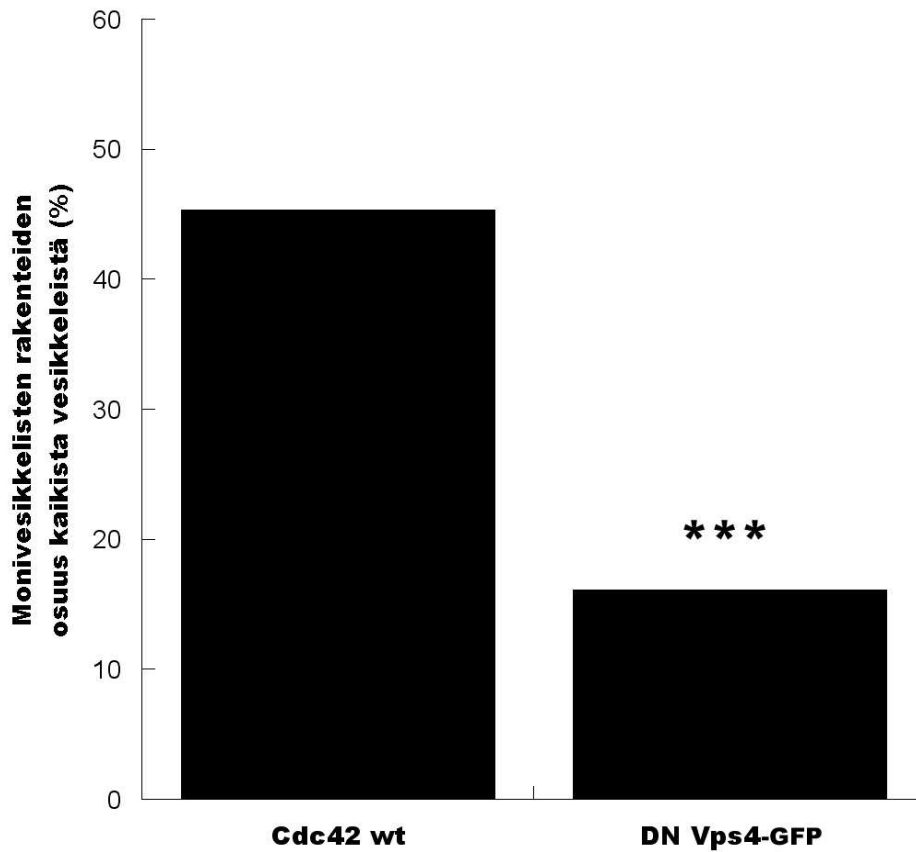
Kuva 4.8. Kuvan DN Vps4-GFP-transfektioitua solua on kasautettu 2 tuntia $\alpha 2$ -integriinin vasta-aineella. $\alpha 2$ -integriini on värjätty vasemmanpuoleisessa kuvassa punaisella ja CI-MPR vihreällä. Oikealla olevasta kolokalisaatiokuvasta nähdään, etteivät nämä kolokalisoidu keskenään. Kuvat ovat yksittäisiä leikkeitä ja mittajana 10 μm .

4.5. siRNA-transfektiot

siRNA-kokeiden avulla halusimme tutkia tilannetta, jossa solujen ESCRT-I- tai ESCRT-III-kompleksin toiminta olisi estynyt. siRNA:n avulla ESCRT-I-kompleksissa estettäviä proteiineja olivat Tsg101 (vastaa hiivan Vps23:sta) ja HCRPI (vastaa hiivan Vps37:ää), sekä ESCRT-III-kompleksissa Vps24. HeLa-soluissa EV1:n infektiotehokkuus jäi kuitenkin liian alhaiseksi, ja näin kokeista ei saatu luotettavia tuloksia. Myöskään kokeiden tulosten varmentamiseksi tehdyt SDS-PAGE-geelielektroforeesi ja immunoblottaus eivät onnistuneet. Tämä puolestaan johtui siitä, ettei näytteisiin saatu tarpeeksi suuria proteiinipitoisuuksia, koska transfektoitujen HeLa-solujen kasvu oli liian hidasta ja näin solumäärä jäi liian pieneksi riittävän proteiinimäärän eristämistä varten.

4.6. Elektronimikroskopia

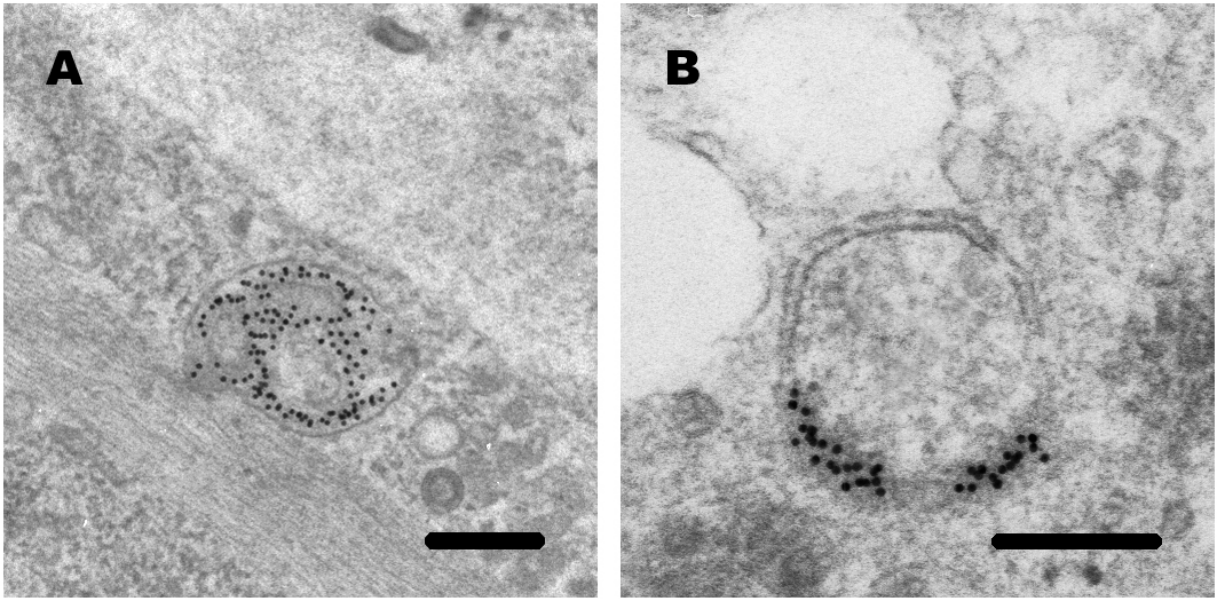
Elektronimikroskoopilla tutkittiin dominanttinegatiivisen Vps4-GFP:n sisältävien ESCRT-kompleksien vaikutusta monivesikkelisen kaveosomin muodostumiseen eli siihen, pystyykö monivesikkelinen kaveosomi muodostumaan. Tämä suoritettiin laskemalla proteiini A -kullalla värjätyt, $\alpha 2$ -integroiniä sisältävät vesikkelit SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluista, jotka oli transfektoitu joko dominanttinegatiivisella Vps4-GFP:llä tai kontrollina toimivalla Cdc42 wt:lla (kuva 4.9.). Kokeesta, johon oli transfektoitu dominanttinegatiivinen Vps4-GFP, laskettiin 193 vesikkeliä ja Cdc42 wt -transfektoiduista 139 vesikkeliä, joista esimerkkikuvat kuvassa 4.10. Silmämääräisesti tarkasteltuna dominanttinegatiivisella Vps4-GFP:llä transfektoiduista soluista löytyi vähemmän monivesikkelisiä rakenteita kuin mitä soluissa vaikutti keskimäärin olevan. Tämän tueksi on kuvassa 4.9. ja taulukossa 4.2. laskettu proteiini A -kullalla värjäytyneiden monivesikkelisten rakenteiden prosentuaalinen osuus kaikista proteiini A -kullalla värjäytyneistä vesikkeleistä.



Kuva 4.9. DN Vps4-GFP aiheutti huomattavan monivesikkelisten rakenteiden lukumäärän vähenemisen suhteessa Cdc42 wt:hen. Tuloksille laskettiin binominen t-testi, jolloin kokeen DN Vps4-GFP:lle saatiin arvoksi $p < 0,001$ (***)

Taulukko 4.2. Sarakkeiden otsikot kertovat kokeessa transfektoidun konstruktin. Taulukosta selviää elektronimikroskooppikokeissa laskettujen vesikkeleiden lukumäärät ja monivesikkelisten rakenteiden osuus kaikista vesikkeleistä.

| | DN Vps4-GFP | Cdc42 wt |
|------------------------------|-------------|----------|
| Laskettuja soluja | 20 | 20 |
| Kaikki vesikkelit | 193 | 139 |
| MVB:t | 31 | 63 |
| MVB-% kaikista vesikkeleistä | 16 % | 45 % |



Kuva 4.10. Kuvassa A on normaali monivesikkelinen rakenne ja kuvassa B vesikkeli, jonka sisään ei ole päässyt kuroutumaan sisävesikkeleitä. A kuva on kokeesta, jossa solut transfektoitiin GFP:llä ja B kuva kokeesta, jossa transfektioon käytettiin DN Vps4-GFP:tä. Kummassakin kuvassa $\alpha 2$ -integriini on värjätty proteiini A -kullalla. Mittajana on 200 nm.

5. TULOSTEN TARKASTELU

Tutkimuksessa selvitettiin, vaikuttaako ESCRT-kompleksien toiminnan estäminen monivesikkelisen kaveosomin muodostumiseen sekä EV1:n infektiin. Nämä kaksi tavoitetta liittyvät läheisesti toisiinsa, koska EV1:n on todettu pääasiassa käyttävän makropinosytoosin kaltaista reittiä soluun sisäänpääsyssään päätyen näin kaveosomiin (Karjalainen ym., 2008, painossa). Kaveosomeissa EV1:n pitää päästä sisävesikkelien pinnalla kaveosomin sisään, jotta infektio voisi edetä. Näin ollen kaveosomin monivesikkelisen rakenteen muodostumisen estäminen selvittäisi kummatkin kysymykset: toimivatko ESCRT-kompleksit kaveosomeissa sekä vaikuttavatko ESCRT-kompleksit EV1:n infektiin.

Ensimmäisenä teimme infektiokokeita, joissa transfektoimattomista soluista värjättiin Tsg101 ja EV1. Näissä kokeissa näimme sen, että normaalitilanteessa EV1 todellakin kolokalisoituu ESCRT-I-kompleksien kanssa. EV1 käyttää pääasiassa makropinosytoosin kaltaista reittiä eikä klatrinireittiä. Siksi näiden kokeiden perusteella tulisi ESCRT-kompleksien sijaita endosomireitin lisäksi EV1:n käyttämällä reitillä, johon myös kaveosomi kuuluu. Lisäksi samoissa transfektoimattomilla soluilla tehdyissä kokeissa värjättiin kaveoliini-1. Tämän kolokalisaatio Tsg101:n kanssa vahvistaa edellisiä tuloksia, sillä EV1:n makropinosytoosin kaltainen reitti ja kaveoliini-1:n kaveolireitti risteävät kaveosomissa.

Kun solut transfektoitiin DN Vps4-GFP:llä, havaittiin selvää kolokalisoitumista EV1:n ja DN Vps4-GFP:n välillä. Tämä ilmeni kunnolla kuitenkin vasta seitsemän tunnin aikapisteissä ja 15 minuutin ja kahden tunnin aikapisteet olivatkin liian lyhyitä varsinaisen havaittavan vaikutuksen syntymiselle. Tämä saattoi osittain johtua esimerkiksi siitä, että DN Vps4-proteiinit toimivat ESCRT-”koneiston” viimeisenä kompleksina. Tällöin kuljetettava lasti eli tässä tapauksessa EV1 saattaa päästä jopa muodostuvaan sisärakkulaan asti, mutta rakkula ei pysty irtautumaan ulkokalvolta. Seitsemän tunnin aikapisteessä havaittiin kuitenkin jo selvästi infektion estymistä, joka näkyi virusten kertymisestä DN Vps4-GFP-kompleksien kanssa samalle alueelle eräänlaisiin kertymiin. Myös kontrollisolujen infektio oli edennyt huomattavasti pidemmälle. Kontrollisoluissa infektio oli levinnyt tasaisemmin koko soluun ja virusta oli selvästi enemmän, eivätkä virukset olleet muodostaneet vastaavia kertymiä kuin

DN Vps4-GFP:n sisältävissä soluissa. Näistä kokeista osa värjättiin $\alpha 2$ -integroini- ja kaveoliini-1-vasta-aineilla, joista kuitenkin vain kaveoliini-1 kokeet onnistuivat. Näissä kaveoliini-1 kuitenkin kolokalisoitui selvästi DN Vps4-GFP:n kanssa samoin kuin transfektoimattomille soluille tehdyissä vastaavissa Tsg101-värjäyksissä. Tämäkin siis omalta osaltaan vahvistaa ESCRT-kompleksien sijaintia kaveosomeissa.

Myös infektioititruukset tukivat vahvasti EV1-infektion estymiseen viittaavia tuloksia, sillä titrauksissa, joissa käytettiin kontrollina N1-YFP-konstruktia, DN Vps4-GFP:n sisältävien solujen EV1-infektiotehokkuus laski jopa 72 %. Myös GFP- ja Cdc42 wt -kontrolleja käytettäessä infektioititruukset antoivat samansuuntaiset tulokset, prosenttilukujen ollessa 64 % ja 68 %, edellämainitussa järjestyksessä. Ottaen huomioon, että toisin kuin siRNA-kokeissa, dominanttinegatiivisen proteiinin transfektio soluun ei estä solua tuottamasta myös toimivaa proteiinia (tässä tapauksessa Vps4:ta), on likimäärin 70 % infektiotehokkuuden lasku huomattava.

Elektronimikroskooppikokeessa, joissa solut oli transfektoitu dominanttinegatiivisella Vps4-GFP:llä ja joissa $\alpha 2$ -integroini oli kasautettu, oli $\alpha 2$ -integroiniä sisältäviä monivesikkelisiä rakenteita selvästi vähemmän kuin kontrollina toimineissa Cdc42 wt -soluissa. DN Vps4-GFP-transfektoiduissa soluissa olikin noin 65 % vähemmän monivesikkelisiä rakenteita kontrollisoluihin verrattuna. Tämä tarkoittaa hyvin suurta monivesikkelisten rakenteiden vähenemistä, koska sen lisäksi, että DN Vps4-GFP-soluissa on myös toimivia Vps4-proteiineja, ei kokeissa osoitettu mitenkään sitä, mitkä solut olivat transfektoituneita. Tästä syystä kokeissa tuli varmasti laskettua myös soluja, jotka eivät olleet transfektoituneet. Tämä tietenkin kasvattaa monivesikkelisten rakenteiden osuutta, kun myös DN Vps4-GFP-transfektoiduissa kokeissa on laskettu tuntematon määrä transfektoimattomia soluja, joissa on normaali Vps4-proteiinikompleksi. Näin ollen monivesikkelisten rakenteiden prosentuaalinen lasku antaa vain suuntaa siitä mitä todellisuus on, mutta näin suuri lasku yhdistettynä edellisiin infektioituloksiin varmistaa ainakin tulosten oikean suunnan. Elektronimikroskoopilla visuaalisesti tarkasteltuna DN Vps4-GFP-kokeissa oli kontrollisoluihin verrattuna enemmän sellaisia soluja, joissa $\alpha 2$ -integroini oli jäänyt kaveosomin ulkokalvolle eikä ollut päässyt kaveosomin sisään. DN Vps4-GFP-kokeen

soluista löytyi myös suuria kaveosomeja, joissa oli paljon $\alpha 2$ -integriiniä pakkautuneena ulkokalvolle ja jollaiset kontrollisoluissa olivat myös sisältä täynnä $\alpha 2$ -integriiniä. Tämä viittaakin samanlaiseen ESCRT-kompleksien toimimattomuudesta johtuvaan partikkelien kertymiseen DN Vps4-GFP:n kanssa samalle alueelle, kuin mitä seitsemän tunnin EV1-infektiokokeissakin nähtiin.

Vaikkakin osa kokeista epäonnistui – usein alhaisen infektion, transfektion tai toimimattomien reagenssien takia – saatiin lukuisten toistojen ja uusien reagenssien ansiosta kasaan kuitenkin melko kattavat vastaukset tämän tutkimuksen kysymyksiin. DN Vps4-GFP-proteiinikompleksilla oli selvä infektiotehokkuutta alentava vaikutus. ESCRT-komplekseilla onkin siis suuri merkitys echovirus 1 -infektiossa, eikä EV1-infektio etene soluissa kunnolla ilman ESCRT-komplekseja. Tämä johtuu siitä, ettei EV1 pääse kuroutumaan kaveosomin sisään ilman tätä koneistoa. Vastaavia kokeita eri monivesikkelisissä rakenteissa on tehty esimerkiksi B-hepatiittiviruksen kanssa, joissa tulokset olivat viruksen lisääntymistä estäviä (Lambert ym., 2007).

ESCRT-kompleksit toimivat siis myös kaveosomeissa jo kauan tunnetun klatriinivälitteisen endosytoosireitin lisäksi. Tästä saatiin lisätodisteita $\alpha 2$ -integriinikokeissa, joissa kasautettiin $\alpha 2$ -integriiniä vasta-aineilla ja se saatiin näin kulkeutumaan solun sisään. $\alpha 2$ -integriini käyttää osittain kaveolivälitteistä reittiä sekä suurimmaksi osaksi makropinosytoosin kaltaista reittiä (Karjalainen ym., 2008, painossa), jotka kummatkin päätyvät kaveosomiin. Koska $\alpha 2$ -integriini ja DN Vps4-GFP kolokalisoiutuivat kyseisissä kokeissa, sijaitsee Vps4 $\alpha 2$ -integriinin reitillä eli kaveosomissa. $\alpha 2$ -integriinin kasautumiskokeissa värjättiin myös kaveoliini-1, jota löytyy vain kaveolireitiltä (eli myös kaveosomista). Tämän kolokalisoituminen ei ollut yhtä suurta DN Vps4-GFP:n kanssa kuin $\alpha 2$ -integriinin. Kolokalisoitumista kuitenkin oli, joka sekin todistaa ESCRT-kompleksien sijaitsevan kaveosomeissa.

Tässä tutkimuksessa ei ajallisista syistä kvantitoitu konfokaalimikroskoopilla havaittuja kolokalisaatioita, mutta ne havainnollistettiin BioImageXD-ohjelman kolokalisaatiotoiminnolla. Tästä johtuen kaikki tulokset ovat suuntaa antavia, eivät absoluuttisia. Näin vahvasti yhdensuuntaiset tulokset antavat kuitenkin hyvän syyn

jatkotutkimusten tekemiselle ja tulosten kvantitoimiselle. Vaikkakin elektronimikroskooppikokeiden tulokset ovat hyvin samansuuntaiset kuin muidenkin kokeiden, vaatii kokeiden suppeahko määrä lisää toistoja tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi. Lisäksi tulevaisuudessa olisi hyvä kehittää menetelmä, jolla elektronimikroskooppinäytteistä pystyttäisiin tunnistamaan vain transfektoidut solut, jottei transfektoimattomia soluja tulisi laskettua transfektoiduiksi soluiksi.

LÄHTEET

- Aderem, A. ja D.M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17:593-623.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo ja S.D. Emr. 2002a. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev.Cell.* 3:271-282.
- Babst, M., D.J. Katzmann, W.B. Snyder, B. Wendland ja S.D. Emr. 2002b. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev.Cell.* 3:283-289.
- Barnett-Norris, J., D. Lynch ja P.H. Reggio. 2005. Lipids, lipid rafts and caveolae: their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system. *Life Sci.* 77:1625-1639.
- Bedard, K.M. ja B.L. Semler. 2004. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect.* 6:702-713.
- Bergelson, J.M., M.P. Shepley, B.M. Chan, M.E. Hemler ja R.W. Finberg. 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science.* 255:1718-1720.
- Bilodeau, P.S., J.L. Urbanowski, S.C. Winistorfer ja R.C. Piper. 2002. The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat.Cell Biol.* 4:534-539.
- Bilodeau, P.S., S.C. Winistorfer, W.R. Kearney, A.D. Robertson ja R.C. Piper. 2003. Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J.Cell Biol.* 163:237-243.
- Bishop, N., A. Horman ja P. Woodman. 2002. Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates. *J.Cell Biol.* 157:91-101.
- Blanchard, E., S. Belouzard, L. Goueslain, T. Wakita, J. Dubuisson, C. Wychowski ja Y. Rouille. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J.Virol.* 80:6964-6972.
- Botos, E., A. Turi, N. Mullner, I. Kovalszky, P. Tatrai ja A.L. Kiss. 2007. Regulatory role of kinases and phosphatases on the internalisation of caveolae in HepG2 cells. *Micron.* 38:313-320.
- Bowers, K., J. Lottridge, S.B. Helliwell, L.M. Goldthwaite, J.P. Luzio ja T.H. Stevens. 2004. Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic.* 5:194-210.
- Bowers, K., S.C. Piper, M.A. Edeling, S.R. Gray, D.J. Owen, P.J. Lehner ja J.P. Luzio. 2006. Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII. *J.Biol.Chem.* 281:5094-5105.
- Chu, T., J. Sun, S. Saksena ja S.D. Emr. 2006. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J.Cell Biol.* 175:815-823.
- Conner, S.D. ja S.L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- Cooper, A. ja Y. Shaul. 2006. Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. *J.Biol.Chem.* 281:16563-16569.

- Dai, S., Y. Zhang, T. Weimbs, M.B. Yaffe ja D. Zhou. 2007. Bacteria-generated PtdIns(3)P recruits VAMP8 to facilitate phagocytosis. *Traffic*. 8:1365-1374.
- Filimonenko, M., S. Stuffers, C. Raiborg, A. Yamamoto, L. Malerod, E.M. Fisher, A. Isaacs, A. Brech, H. Stenmark ja A. Simonsen. 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J.Cell Biol.* 179:485-500.
- Fisher, R.D., B. Wang, S.L. Alam, D.S. Higginson, H. Robinson, W.I. Sundquist ja C.P. Hill. 2003. Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J.Biol.Chem.* 278:28976-28984.
- Frickey, T. ja A.N. Lupas. 2004. Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J.Struct.Biol.* 146:2-10.
- Goila-Gaur, R., D.G. Demirov, J.M. Orenstein, A. Ono ja E.O. Freed. 2003. Defects in human immunodeficiency virus budding and endosomal sorting induced by TSG101 overexpression. *J.Virol.* 77:6507-6519.
- Grist, N.R., E.J. Bell ja F. Assaad. 1978. Enteroviruses in human disease. *Prog.Med.Virol.* 24:114-157.
- Grünberg, J., G. Griffiths ja K.E. Howell. 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J.Cell Biol.* 108:1301-1316.
- Grünberg, J. ja H. Stenmark. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5:317-323.
- Hart, S.P., I. Dransfield ja A.G. Rossi. 2008. Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods.* 44:280-285.
- Hayward, R.D., E.J. McGhie ja V. Koronakis. 2000. Membrane fusion activity of purified SipB, a Salmonella surface protein essential for mammalian cell invasion. *Mol.Microbiol.* 37:727-739.
- Hierro, A., J. Sun, A.S. Rusnak, J. Kim, G. Prag, S.D. Emr ja J.H. Hurley. 2004. Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature.* 431:221-225.
- Hummeler, K., N. Tomassini ja F. Sokol. 1970. Morphological aspects of the uptake of simian virus 40 by permissive cells. *J.Virol.* 6:87-93.
- Hurley, J.H. ja S.D. Emr. 2006. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 35:277-298.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Ivaska, J., H. Reunanen, J. Westermarck, L. Koivisto, V.M. Kahari ja J. Heino. 1999. Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. *J.Cell Biol.* 147:401-416.
- Kamata, T., R.C. Liddington ja Y. Takada. 1999. Interaction between collagen and the alpha(2) I-domain of integrin alpha(2)beta(1). Critical role of conserved residues in the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) region. *J.Biol.Chem.* 274:32108-32111.
- Karjalainen, M., Kakkonen, E., Upla, P., Paloranta, H., Kankaanpää, P., Liberali, P., Renkema, G.H., Hyypiä, T., Heino, J. ja Marjomäki, V. 2008. A raft-derived, Pak1-regulated entry participates in $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol.Biol.Cell.* Painossa.

- Kato, M., K. Miyazawa ja N. Kitamura. 2000. A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *J.Biol.Chem.* 275:37481-37487.
- Kirchhausen, T. ja S.C. Harrison. 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell.* 23:755-761.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah ja A. Dautry-Varsat. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol.Cell.* 7:661-671.
- Lambert, C., T. Doring ja R. Prange. 2007. Hepatitis B virus maturation is sensitive to functional inhibition of ESCRT-III, Vps4, and gamma 2-adaptin. *J.Virol.* 81:9050-9060.
- Lin, Y., L.A. Kimpler, T.V. Naismith, J.M. Lauer ja P.I. Hanson. 2005. Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J.Biol.Chem.* 280:12799-12809.
- Luhtala, N. ja G. Odorizzi. 2004. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J.Cell Biol.* 166:717-729.
- Mao, Y., A. Nickitenko, X. Duan, T.E. Lloyd, M.N. Wu, H. Bellen ja F.A. Quioco. 2000. Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell.* 100:447-456.
- Marjomäki, V.S., A.P. Huovila, M.A. Surkka, I. Jokinen ja A. Salminen. 1990. Lysosomal trafficking in rat cardiac myocytes. *J.Histochem.Cytochem.* 38:1155-1164.
- Marjomäki, V., V. Pietiäinen, H. Matilainen, P. Upla, J. Ivaska, L. Nissinen, H. Reunanen, P. Huttunen, T. Hyypiä ja J. Heino. 2002. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J.Virol.* 76:1856-1865.
- Marjomäki, V. ja U.E. Schaible. 2005. Microbial strategies to exploit host cells. Meeting on spatial and temporal dynamics of the endomembrane system. *EMBO Rep.* 6:408-412.
- Misra, S. ja J.H. Hurley. 1999. Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell.* 97:657-666.
- Nichols, B.J. ja J. Lippincott-Schwartz. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 11:406-412.
- Nickerson, D.P., M.R. Russell ja G. Odorizzi. 2007. A concentric circle model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO Rep.* 8:644-650.
- Ogura, T. ja A.J. Wilkinson. 2001. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells.* 6:575-597.
- Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial ja A. Helenius. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell.* 118:767-780.
- Pelkmans, L. ja A. Helenius. 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:414-422.
- Pelkmans, L. ja A. Helenius. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3:311-320.

- Pelkmans, L., J. Kartenbeck ja A. Helenius. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat.Cell Biol.* 3:473-483.
- Pineda-Molina, E., H. Belrhali, A.J. Piefer, I. Akula, P. Bates ja W. Weissenhorn. 2006. The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic.* 7:1007-1016.
- Racoosin, E.L. ja J.A. Swanson. 1993. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J.Cell Biol.* 121:1011-1020.
- Raiborg, C., T.E. Rusten ja H. Stenmark. 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:446-455.
- Robinson, M.S. ja J.S. Bonifacino. 2001. Adaptor-related proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13:444-453.
- Rothberg, K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney ja R.G. Anderson. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68:673-682.
- Rue, S.M., S. Mattei, S. Saksena ja S.D. Emr. 2008. Novel ist1-did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting. *Mol.Biol.Cell.* 19:475-484.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli ja A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182:389-400.
- Sargiacomo, M., P.E. Scherer, Z. Tang, E. Kubler, K.S. Song, M.C. Sanders ja M.P. Lisanti. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:9407-9411.
- Scherer, P.E., R.Y. Lewis, D. Volonte, J.A. Engelman, F. Galbiati, J. Couet, D.S. Kohtz, E. van Donselaar, P. Peters ja M.P. Lisanti. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 colocalize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J.Biol.Chem.* 272:29337-29346.
- Scheuring, S., R.A. Rohricht, B. Schoning-Burkhardt, A. Beyer, S. Muller, H.F. Abts ja K. Kohrer. 2001. Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking. *J.Mol.Biol.* 312:469-480.
- Scott, A., H.Y. Chung, M. Gonciarz-Swiatek, G.C. Hill, F.G. Whitby, J. Gaspar, J.M. Holton, R. Viswanathan, S. Ghaffarian, C.P. Hill ja W.I. Sundquist. 2005. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J.* 24:3658-3669.
- Sieczkarski, S.B. ja G.R. Whittaker. 2002a. Dissecting virus entry via endocytosis. *J.Gen.Virol.* 83:1535-1545.
- Sieczkarski, S.B. ja G.R. Whittaker. 2002b. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J.Virol.* 76:10455-10464.
- Slagsvold, T., K. Pattni, L. Malerod ja H. Stenmark. 2006. Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* 16:317-326.
- Stan, R.V. 2005. Structure of caveolae. *Biochim.Biophys.Acta.* 1746:334-348.
- Stuchell-Breterton, M.D., J.J. Skalicky, C. Kieffer, M.A. Karren, S. Ghaffarian ja W.I. Sundquist. 2007. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature.* 449:740-744.

- Swanson, J.A. ja C. Watts. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424-428.
- Swanson, K.A., R.S. Kang, S.D. Stamenova, L. Hicke ja I. Radhakrishnan. 2003. Solution structure of Vps27 UIM-ubiquitin complex important for endosomal sorting and receptor downregulation. *EMBO J.* 22:4597-4606.
- Takei, K., V.I. Slepnev, V. Haucke ja P. De Camilli. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 1:33-39.
- Teo, H., D.J. Gill, J. Sun, O. Perisic, D.B. Veprintsev, Y. Vallis, S.D. Emr ja R.L. Williams. 2006. ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell.* 125:99-111.
- Teo, H., O. Perisic, B. Gonzalez ja R.L. Williams. 2004. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev. Cell.* 7:559-569.
- Upla, P., V. Marjomäki, P. Kankaanpää, J. Ivaska, T. Hyypiä, F.G. Van Der Goot ja J. Heino. 2004. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol. Biol. Cell.* 15:625-636.
- Way, M. ja R.G. Parton. 1996. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* 378:108-112.
- Williams, R.L. ja S. Urbe. 2007. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:355-368.
- Winter, V. ja M.T. Hauser. 2006. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci.* 11:115-123.
- Xing, L., M. Huhtala, V. Pietiäinen, J. Käpylä, K. Vuorinen, V. Marjomäki, J. Heino, M.S. Johnson, T. Hyypiä ja R.H. Cheng. 2004. Structural and functional analysis of integrin alpha2I domain interaction with echovirus 1. *J. Biol. Chem.* 279:11632-11638.
- Yeo, S.C., L. Xu, J. Ren, V.J. Boulton, M.D. Wagle, C. Liu, G. Ren, P. Wong, R. Zahn, P. Sasajala, H. Yang, R.C. Piper ja A.L. Munn. 2003. Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* 116:3957-3970.

Liite 1.**JCB: STANDARD ABBREVIATIONS**

2D, two-dimensional
3D, three-dimensional

A

A, ampere
 μA, microampere(s)
 mA, milliamper(s)
Å, angstrom (10⁻¹⁰m)
aa, amino acid(s)
ACTH, adrenocorticotropin
ADP, adenosine diphosphate
AMP, adenosine monophosphate
 cAMP, cyclic AMP
AP, alkaline phosphatase
ATP, adenosine triphosphate
ATPase, adenosine triphosphatase

B

BHK, baby hamster kidney
bp, base pair
BrdU, bromodeoxyuridine
BSA, bovine serum albumin

C

°C, degree Celsius
CaM, calmodulin
Cdk, cyclin-dependent kinase
CFP, cyan fluorescent protein
CHAPS, 3-(3-cholamidopropyl)-diethylammonio-1-propanesulfonate
CHO, Chinese hamster ovary
Ci, curie(s)
 μCi, microcurie(s)
 mCi, millicurie(s)
Con A, concanavalin A
cpm, counts per minute
cps, counts per second
CTP, cytidine triphosphate
cycle/min, cycle(s) per minute
cycle/s, cycle(s) per second

D

D, dalton
d, day
d, density
DAB, diaminobenzidine

DAG, diacylglycerol
DAPI, 6'-diamidino-2-phenylindole
DEAE, diethylaminoethyl
diam, diameter
DME, Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO, dimethyl sulfoxide
DNA, deoxyribonucleic acid
 cDNA, complementary DNA
DNase, deoxyribonuclease
DNP, dinitrophenyl
dpm, disintegrations per minute
dps, disintegrations per second
DTT, dithiothreitol

E

ECL, enhanced chemiluminescence
ECM, extracellular matrix
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid
EGF, epidermal growth factor
EGFP, enhanced GFP
EGTA, ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N,N'*-tetraacetic acid
ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay
EM, electron microscopy
ER, endoplasmic reticulum
EST, expressed sequence tag

F

°F, degree Fahrenheit
FACS, BD fluorescence-activated cell sorter
F-actin, filamentous actin
FAK, focal adhesion kinase
FBS, fetal bovine serum
FCS, fetal calf serum
FGF, fibroblast growth factor
FISH, fluorescent in situ hybridization
FITC, fluorescein isothiocyanate
FRAP, fluorescence recovery after photobleaching

G

g, gram
g, unit of gravity
GDP, guanosine diphosphate
GFP, green fluorescent protein
GST, glutathione *S*-transferase
GTP, guanosine triphosphate
GTPase, guanosine triphosphatase

H

h, hour
HA, hemagglutinin
HBSS, Hanks' balanced salt solution
Hepes, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid
HPLC, high performance liquid chromatography
HRP, horseradish peroxidase

I

IEF, isoelectric focusing
IFN, interferon
Ig, immunoglobulin
i.l., intraluminal(ly)
i.m., intramuscular(ly)
i.p., intraperitoneal(ly)
IPTG, isopropyl-β-d-thiogalactoside
IU, international unit(s)
i.v., intravenous(ly)

J

JNK, c-Jun NH2-terminal kinase

K

kb, kilobase(s)
kbp, kilobase pair(s)
kD, kilodalton(s)

L

liter(s), liter(s)
 μl, microliter(s)
 ml, milliliter(s)

M

m, meter

μm , micrometer(s)
 M, molar
 mAb, monoclonal antibody
 MAPK, mitogen-activated protein kinase
 MDCK, Madin–Darby canine kidney
 MEM, Eagle’s minimum essential medium
 MES, 2-(*N*-morpholino)ethane sulfonic acid
 min, minute
 mo, month
 MOI, multiplicity of infection
 mol, mole(s)
 mol wt, molecular weight
 MOPS, morpholino propane sulfonic acid
M_r, relative molecular mass

N

N, normal (concentration of ionizable groups)
n, number in a study or group
 NA, numerical aperture
 NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide
 NADH, NAD⁺ reduced
 NADP, NAD⁺ phosphate
 NADPH, NADP reduced
 NBD, nitrobenzoxadiazole
 ND, not determined
 NEPHGE, nonequilibrium pH gradient electrophoresis
 NGF, nerve growth factor
 NLS, nuclear localization signal
 No., number
 NP-40, Nonidet P-40
 NS, not significant
 NSF, *N*-ethyl-maleimide sensitive fusion protein
 nt, nucleotide

O

OD, optical density
 ORF, open reading frame
 osM, osmolar

P

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis
 PBS, phosphate-buffered saline
 PCA, perchloric acid

PCR, polymerase chain reaction
 PDGF, platelet-derived growth factor
 PFA, paraformaldehyde
 Pi, inorganic orthophosphate
 Pipes, [1,4-piperazinebis(ethane sulfonic acid)]
 PKC, protein kinase C
 PLC, phospholipase C
 PMA, phorbol myristate acetate
 PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride

R

r, correlation coefficient
 RBC, red blood cell
 RER, rough endoplasmic reticulum
 RIA, radioimmunoassay
 RNA, ribonucleic acid
 mRNA, messenger RNA
 siRNA, small interfering RNA
 tRNA, transfer RNA
 RNAi, RNA interference
 RNAase, ribonuclease
 RNP, ribonucleoprotein
 rpm, revolutions per minute
 RT, room temperature
 RT-PCR, reverse transcription PCR

S

s, second(s)
 s, sedimentation coefficient
 S, Svedberg unit of sedimentation coefficient
 SD, standard deviation
 SDS, sodium dodecyl sulfate
 SEM, standard error of the mean
 SNAP, soluble NSF attachment protein
 SNARE, SNAP receptor
 sp act, specific activity
 SSC, standard saline citrate
 SV40, simian virus 40

T

t test, Student's t test
 t_{1/2}, half-life, half-time
 TBS, Tris-buffered saline

TCA, trichloroacetic acid
 TdR, thymidine deoxyribose
 TGF, transforming growth factor
 TGN, trans-Golgi network
 TLC, thin layer chromatography
 TNF, tumor necrosis factor
 TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate
 Tris, tris(hydroxymethyl)-aminomethane
 t-SNARE, target membrane SNARE
 TUNEL, Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling

U

U, unit
 UDP, uridine diphosphate
 UTP, uridine triphosphate
 UV, ultraviolet

V

V, volt
 VEGF, vascular endothelial growth factor
 vol, volume
 v-SNARE, vesicle membrane SNARE

W

W, watt
 WGA, wheat germ agglutinin
 wk, week
 wt, weight

Y

YFP, yellow fluorescent protein
 yr, year