

Pro Gradu -tutkielma

**$\alpha 2\beta 1$ -integroini ei-virusvälitteisen lääkekohdennuksen
reseptorina**

Sanna Seuna



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solubiologia

Huhtikuu 2008

ALKUSANAT

Tämä Pro Gradu –tutkielma on toteutettu Jyväskylän yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen solubiologian osastolla FT Dos. Varpu Marjomäen tutkimusryhmässä syksyjen 2006 ja 2007 välisenä aikana yhteistyössä Kuopion yliopiston A.I.V instituutin ja Ark Therapeutics:n kanssa.

Suuri kiitos innostavasta ja kannustavasta ohjauksesta kuuluu Varpu Marjomäelle. Kiitokset myös Seppo Ylä-Herttualalle, Kari Airenteelle ja Arto Urtille reagenssilahjoituksista. Lisäksi haluan kiittää Paulaa ja Elinaa henkisestä tuesta, Mikkoa ja Lassia teknisestä tuesta sekä Arja Mansikkaviitaa avusta yleisissä ongelmissa.

Lämmin erityiskiitos kuuluu Ilkalle myötäelämisestä sekä vanhemmilleni koko opiskeluaikanani mittaisesta tuesta.

Jyväskylässä 29.4.2008

Sanna Seuna

Tekijä:	Sanna Seuna	
Tutkielman nimi:	$\alpha 2\beta 1$ -integroini ei-virusvälitteisen lääkekohdennuksen reseptorina	
English title:	$\alpha 2\beta 1$ Integrin as a Receptor for Nonviral Drug Targeting	
Päivämäärä:	29.4.2008	Sivumäärä: 62 + 2
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Solubiologia	
Ohjaaja:	Varpu Marjomäki	

Tiivistelmä:

Geeni- ja lääkekohdennuksen tärkein tavoite on kehittää turvallisia, tehokkaita ja spesifisiä vektoreita, jotka kykenevät kuljettamaan vierasta geneettistä materiaalia tai muita terapeuttisia yhdisteitä sekä aikaansaamaan halutun vasteen kohdesolussa, -kudoksessa tai -elimessä. Vektorit ovat joko virus- tai ei-virusvälitteisiä ja molemmilla on omat etunsa ja haittansa. Ei-virusvälitteiset vektorit ovat virusvektoreihin verrattuna turvallisempia, mutta niiden haittana on huomattavasti huonompi tehokkuus ja vaikutuksen tilapäisyys. Ei-virusvälitteiset vektorit ovat useimmiten lipidi-, polymeeri- tai peptidipohjaisia.

Kollageeneja sitova $\alpha 2\beta 1$ -integroini siirtyy vasta-aineilla aikaansaadun kasautuman jälkeen makropinosytoosin ja kaveolien välityksellä kaveosomeihin. Kaveosomit muodostavat tärkeän lajittelukeskuksen solun sytoplasmassa mutta niiden käytettävyyttä yhdessä integriinireseptorien kanssa on lääkekohdennuksen kannalta tutkittu hyvin vähän. Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää vasta-aineiden, biotiini-streptavidinitekniikan sekä ei-virusvälitteisen vektorin ja siihen pakatun lääkeaineen avulla aikaansaadun $\alpha 2\beta 1$ -integroinin sisään menon ja kaveosomeihin johtavan edosytoosireitin käytettävyyttä ei-virusvälitteisessä lääkekohdennuksessa. Tutkimuksessa käytetyt solulinjat olivat ihmisperäinen $\alpha 2$ -integroiniä stabiilisti ekspressoiva osteosarkoomasolulinja (SAOS), ihmisen aortan sileälihassolulinja (HASMC), ihmisen kohdunkaulan syöpäsolulinja (HeLa MZ) ja ihmisen napanuoran laskimon endoteelisolulinja (HUVEC).

Tutkimustulokset osoittivat, että $\alpha 2\beta 1$ -integroinikasautuma häviää solusta kaikilla tutkituilla solulinjoilla kolmen vuorokauden kuluessa ja että liposomivälitteisesti $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin kohdennettu doksorubisiini edistää solukuolemaa solumäärän muutosten ja apoptoosin kautta tarkasteltuna. Liposomaalisesti soluille annetun solumyrkytysvaikutukset olivat liukoista solumyrkyä pienempiä eikä kohdennettuna ja kohdentamattomana syöttötavan välillä havaittu solumäärän muutoksissa ja apoptoosissa merkittävää eroa.

Author: Sanna Seuna
Title of thesis: $\alpha 2\beta 1$ Integrin as a Receptor for Non-viral Drug Targeting
Finnish title: $\alpha 2\beta 1$ -integroini ei-virusvälitteisen lääkekohdennuksen reseptorina
Date: 29.4.2008 **Pages:** 62 + 2

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor: Varpu Marjomäki

Abstract:

The most important goal of gene and drug therapy is to develop safe, effective and specific vectors that are able to deliver foreign genetic material or other therapeutic compounds and to achieve a required response in a desired cell, tissue or organ. The vectors are either viral or non-viral and they both have their own advantages and disadvantages. Compared to viral vectors, non-viral vectors are safer but are at the same time less effective and have a temporary effect. Non-viral vectors are commonly based on lipids, polymers or peptides.

Collagen binding $\alpha 2\beta 1$ integrin is internalized after antibody induced clustering. The internalization occurs via macropinocytosis or caveolae-mediated endocytosis and the receptor is then delivered to caveosomes. Caveosomes are an important cytoplasmic sorting compartment but their potential in drug delivery together with integrin receptors has not been studied. The purpose of this thesis is to illuminate the usage of $\alpha 2\beta 1$ integrins and caveosomes in non-viral drug targeting by using antibodies, biotin-streptavidin technology and a cytotoxic drug carried by a non-viral vector. The studied cell lines were human osteosarcoma cells stably expressing $\alpha 2$ integrin (SAOS), human aortic smooth muscle cells (HASMC), human cervical cancer cells (HeLa MZ) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

The results showed that $\alpha 2\beta 1$ -integrin clusters disappears from the cells within three days in all studied cell lines. It was also found that liposomally delivered doxorubicin enhances cell death when measured with the changes in cell number or with the occurrence of apoptosis. The effects of liposomally delivered cytotoxic drug were milder when compared to naked drug. When considering cell count or apoptosis, there were no significant differences between targeted and non-targeted methods.

Keywords: Gene therapy, targeting, non-viral, liposome, $\alpha 2\beta 1$ integrin, endocytosis

SISÄLLYS

LYHENTEET

1 JOHDANTO	8
1.1 Geeni- ja lääkekohdennus	8
1.2 Ei-virusvälitteisen geeni- ja lääkekohdennuksen työkalut	10
1.2.1 Terapeuttiset molekyylit ja yhdisteet	10
1.2.1.1 Solutoksiset yhdisteet	10
1.2.1.2 Proteiini- ja peptidilääkkeet	12
1.2.1.3 DNA ja RNA	13
1.2.2 Ei-virusvektorit	14
1.2.2.1 Lipidit	14
1.2.2.2 Polymeerit	16
1.2.2.3 Peptidit	16
1.2.3 Ilman vektoria tapahtuva geeninsiirto	17
1.3 Ei-virusvälitteinen geeni- ja lääkekohdennus solutasolla	19
1.3.1 Vektorin sitoutuminen solun pintaan	19
1.3.1.1 Reseptorivälitteinen geeni- ja lääkekohdennus	19
1.3.1.2 $\alpha 2\beta 1$ -integroini geeni- ja lääkekohdennuksen reseptorina	21
1.3.2 Endosytoosi	22
1.3.2.1 Makropinosytoosi	22
1.3.2.2 Klatriinivälitteinen endosytoosi	23
1.3.2.3 Kaveolivälitteinen endosytoosi	24
1.3.3 Endosomaalinen kulkeutuminen	25
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	29
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
3.1 Solulinjat	30
3.2 Mikroskooppiset immunofluoresenssikokeet	31
3.2.1 Vasta-aineet ja konjugoidut reagenssit	31

3.2.2 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasautumiskokeet	32
3.2.3 Konfokaalikuvantaminen, kuvien analysointi ja tilastolliset testit	32
3.3 Biokemialliset kokeet	33
3.3.1 $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuman seuraaminen HRP määrittämisen avulla	33
3.3.2 Doksorubisiinin vaikutusten seuraaminen solumäärän muutosten ja apoptoosin avulla	34
4 TULOKSET	36
4.1 Integriinikasauma häviää solusta kolmen vuorokauden kuluessa	36
4.1.1 Rakenteiden lukumäärä, tilavuus ja fluoresenssin intensiteetti	36
4.1.2 $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuman seuraaminen HRP-määrittämisen avulla	39
4.2 Liposomivälitteisesti kohdennettu doksorubisiini edistää solukuolemaa	42
4.2.1 Solumäärän muutokset	42
4.2.2 Apoptoosi	44
5 TULOSTEN TARKASTELU	47
LÄHTEET	51
LIITTEET (1 kpl)	

LYHENTEET

DABCO	1,4-diazabisyklo[2.2.2]oktaani
DOPE	Diolelylifosfatidylietanolamiini
DOPE-PEG	Diolelylifosfatidylietanolamiini-polyetyleeniglykoli
DSPE	Distearoylifosfatidylietanolamiini
DSPE-PEG	Distearoylifosfatidylietanolamiini-polyetyleeniglykoli
HASMC	Ihmisen aortan sileälihassolulinja (engl. human aortic smooth muscle cells)
HeLa MZ	Ihmisen kohdunkaulan syöpäsolulinja, klooni MZ
HUVEC	Ihmisen napanuoran laskimon endoteelisolulinja (engl. human umbilical vein endothelial cells)
HSPC	Hydrogenoitu soijan fosfatidylikoliini (engl. hydrogenated soybean phosphatidylcholine)
PEG	Polyetyleeniglykoli
PEI	Polyetyleeni-imiini
RPMI-1960	Roswell Park Memorial Institute -soluviljelymedium
SAOS α 2/45	Ihmisperäinen α 2-integriiniä stabiilisti ekspressoiva osteosarkoomasolulinja, klooni nro 45
SAOS α 2/47	Ihmisperäinen α 2-integriiniä stabiilisti ekspressoiva osteosarkoomasolulinja, klooni nro 47

Muut tässä tutkielmassa esiintyvät lyhenteet löytyvät liitteenä olevasta The Journal of Cell Biology –lehden standardilyhenneluettelosta

1 JOHDANTO

1.1 Geeni- ja lääkekohdennus

Geeni- ja lääkekohdennuksen tärkein tavoite on kehittää turvallisia, tehokkaita ja spesifisiä vektoreita, jotka kykenevät kuljettamaan vierasta geneettistä materiaalia tai muita terapeuttisia yhdisteitä sekä aikaansaamaan halutun vasteen kohdesolussa, -kudoksessa tai -elimessä (ks. yleiskatsaus El-Aneed, 2004). Terapeuttinen lääke kuten solutoksinen yhdiste, proteiini- tai peptidilääke, DNA tai RNA voidaan antaa vektorin välityksellä systeemisesti tai paikallisesti. Systeeminen on tehokkaampi ja kattavampi tapa, mutta vaatii suuremman annostuksen. Kohdentamattomana vaikutus ulottuu myös ei-toivottuihin soluihin ja kudoksiin, ja voi siten johtaa vakavan immuunivasteen syntyyn. Paikallisesti annettuna vaikutus koskee rajattua aluetta, jolloin myös annostus voidaan pitää pienempänä ja turvallisempänä (Laitinen ym., 2005).

Vektorit ovat joko virus- tai ei-virusvälitteisiä ja molemmilla on omat etunsa ja haittansa (taulukko 1). Viruksilla on luontainen kyky siirtää geneettistä materiaalia tehokkaasti kohdesoluun, mikä tekee niistä suosittuja kohteita geeniterapiavektoreiksi. Yleisimmät virusvektorit on kehitetty gamma-retroviruksista, lentiviruksista, adenoviruksista, adenoassosioiduista viruksista tai herpesviruksista (ks. yleiskatsaus Flotte, 2007). Virusvektorit ovat muokattuja kantoja, mutta ongelmana on kuitenkin niiden korkea immunogeenisyys, hankala tuotettavuus ja geeninsiirtokapasiteetin rajallisuus (ks. yleiskatsaus Cusack ja Tanabe, 2002).

Ei-virusvälitteiset vektorit ovat virusvektoreihin verrattuna turvallisempia, mutta niiden haittana on huomattavasti huonompi tehokkuus ja vaikutuksen tilapäisyys (ks. yleiskatsaus Cusack ja Tanabe, 2002). Alhaisen immunogeenisyyden lisäksi niiden etuihin voidaan lukea hyvä tuotettavuus ja suuri kapasiteetti. Ei-virusvälitteiset vektorit ovat useimmiten lipidi-, polymeeri- tai peptidipohjaisia (ks. yleiskatsaus Niidome ja Huang, 2002).

TAULUKKO 1. Yleisimpien vektoriryhmien edut ja haitat (Mukailtu artikkelista Flotte, 2007).

Vektori	Edut	Haitat
Gamma-retrovirus	Hyvä integraatiotehokkuus Stabiili geeninsiirto	Mutageneesiriski Tehoaa vain jakautuviin soluihin
Lentivirus	Jakautumattomat solut Stabiili geeninsiirto	Mutageneesiriski Muuntumisriski monistumiskykyiseksi HIV:ksi
Adenovirus	Jakautumattomat solut Hyvä tehokkuus	Synnynnäinen immuniteetti Vaikutuksen tilapäisyys
Adeno-assosiotu virus	Jakautumattomat solut Vähäinen immuunivaste Stabiili geeninsiirto	Pieni kapasiteetti Hankittu immuunivaste viruksen kuorelle
Herpesvirus	Jakautumattomat solut Hyvä tehokkuus	Potentiaalinen hankittu ja synnynnäinen immuunivaste
Ei-virusvektorit	Jakautumattomat solut Suuri kapasiteetti Vähäinen immuunivaste	Huono tehokkuus Vaikutuksen tilapäisyys

Ei-virusvektoreiden avulla pyritään jatkuvasti löytämään sopivia hoitomuotoja useisiin eri tauteihin, joista esimerkkinä ovat mm. syövän geeni- tai lääkehoito (Boado, 2005, Flaherty ym., 2004), anemia (Sebestyen ym., 2007), diabetes (Prud'homme ja Chang, 1999), kystinen fibroosi (Alton ym., 1999), pallolaajennuksen jälkeisen trauman hoito (Meng ym., 2006), hemofilia (Roth ym., 2001) ja Alzheimerin tauti (Okura ym., 2006).

Kliinisiin kokeisiin asti päässeet vektorit ovat useimmiten olleet hyvän tehokkuutensa vuoksi viruspohjaisia, mutta viimeaikoina kokeita on vähennetty turvallisuuskysymysten vuoksi. Ensimmäinen adenoviruksella tehty kliininen koe johti potilaan kuolemaan vuonna 1999 ja retrovirusvektori aiheutti vuonna 2002–2003 potilaalle kliinisten kokeiden seurauksena lymfoproliferatiivisia häiriöitä. Näistä syistä huomio on siirtynyt huomattavasti vähemmän immunogeenisiin ei-virusvektoreihin. Niiden käyttö kliinisissä kokeissa on vuosien 2004–2007 välisenä aikana noussut 23 %:sta 27 %:iin, kun virusvektoreiden käyttö on vähentynyt 70 %:sta 67 %:iin (ks. yleiskatsaukset Edelstein ym., 2004; Edelstein ym., 2007).

1.2 Ei-virusvälitteisen geeni- ja lääkekohdennuksen työkalut

1.2.1 Terapeuttiset molekyylit ja yhdisteet

1.2.1.1 Solutoksiset yhdisteet

Solutoksisia yhdisteitä eli sytostaatteja käytetään hyväksi erilaisten tautien, kuten pahanlaatuisten kasvainten hoidossa. Erilaisia yhdisteitä on liuta, mutta yleisimmät lääkeryhmät ja niiden vaikutusmekanismit on esitelty taulukossa 2. Useimpien sytostaattien toiminta perustuu solun jakautumisen tai tiettyjen biokemiallisten reaktioiden estämiseen, jolloin ne tuhoavat faasispesifisesti esimerkiksi S-vaiheessa tai mitoosissa olevia soluja. Ei-faasispesifiset sytostaatit vaikuttavat jakautumiskierron eri vaiheissa. Yleisiä sytostaattien vaikutuskohteita ovat RNA ja DNA, topoisomeraasit sekä muut entsyymit tai proteiinit (Elonen, 2001).

TAULUKKO 2. Yleisimmät kasvainten kemoterapiaan käytetyt sytostaatit (Elonen, 2001).

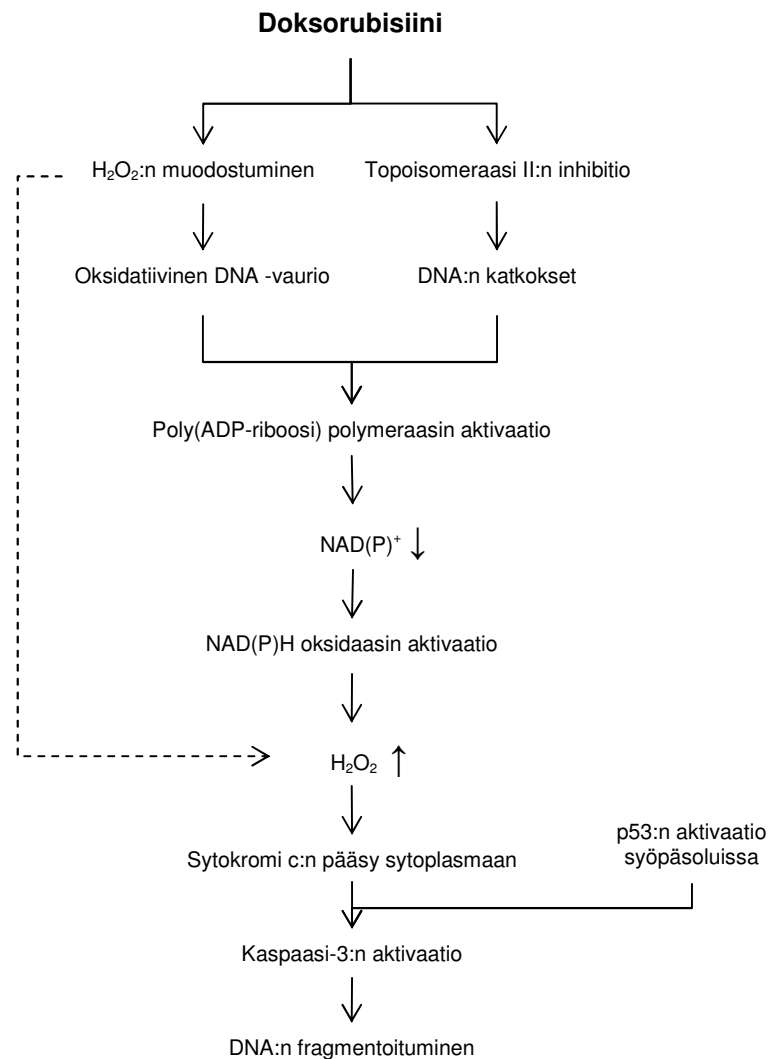
Lääkeryhmä	Vaikutusmekanismi	Lääkeaineita
Antimetaboliitit	DNA ja RNA synteessin esto estämällä puriinien tai pyrimidiinien synteesiä tai inhiboimalla nukleiinihapposynteessin kannalta keskeistä entsyymiä	Merkaptopuriini, sytarabiini, fluorourasiili, gemitabiini, metotrekosaatti
Mitoosin estäjät Vinka-alkaloidit	Mitoosin pysäyttäminen metafaasiin sitoutumalla tubuliiniproteiiniin ja estämällä sukkularihmaston muodostumista	Vinblastiini, vinkristiini, vinorelbiini
Taksoidit	Mikrotubulusten rakenteen stabiloiminen ja niiden purkautumisen ja normaalin toiminnan esto mitoosin aikana	Paklitakseli, dosetakseli
Topoisomeraasi I:n Inhibiittorit	Topoisomeraasi I:n toiminnan häirintä estämällä DNA:n päiden liittämistä takaisin yhteen solusyklin S ja G ₂ vaiheessa, seurauksena DNA:n katkoksia ja solun apoptoosi	Topotekaani, irinotekaani
Antrasykliinit	DNA:n kopioimisen estäminen sitoutumalla DNA:n ketujen väliin ja kiinnittyminen DNA:n ja topoisomeraasi II:n muodostamaan kompleksiin jolloin entsyymin toiminta estyy ja sen muodostamat DNA:n katkokset jäävät pysyviksi.	Doksorubisiini, epirubisiini, daunorubisiini, idarubisiini
Alkyloivat aineet	Solusyklin vaiheesta riippumaton DNA:n alkyloiminen muodostamalla kovalenttisia sidoksia kahden DNA ketjun välille tai DNA:n ja proteiinimolekyylin välille.	Syklofosfamidi, melfalaani, ifosfamidi, busulfaani

Dokсорubisiini

Dokсорubisiini (andramysiini; 14-hydroksidaunomysiini; Arcamone ym., 1969) on antra-sykliineihin kuuluva laajalti käytetty solumyrkky, joka tehoaa moniin eri kasvaintyyppiin. Dokсорubisiinia on käytetty yhdistelmä- tai yksittäishoitona mm. rinta- ja ruokatorven syövän, osteosarkooman, Kaposin sarkooman, pehmytkudossarkooman sekä Hodginin ja non-Hodginin lymfoomien hoitoon (ks. yleiskatsaus Singal ja Iliskovic, 1998). Dokсорubisiinilla on kuitenkin vakavia sivuvaikutuksia ja sen systeeminen käyttö voi aiheuttaa sydänlihassappeumaa, mikä voi puolestaan johtaa sydäninfarktiin ja edelleen kuolemaan (Lefrak ym., 1973).

Dokсорubisiinilla on topoisomeraasi II:n inhibition (taulukko 2) kautta tapahtuvan DNA:n kopioitumisen estämisen ja siitä syntyvän DNA-vaurion ohella myös muita vaikutusmekanismeja (kuvio 1). Dokсорubisiini aiheuttaa apoptoosia vapaiden radikaalien kuten vetyperoksidin (H_2O_2) muodostumisen kautta. Vetyperoksidi aiheuttaa solussa oksidatiivisia DNA-vaurioita, mikä aktivoi DNA:n korjausentsyymiä poly(ADP-riboosi) -polymeraasia. Korjausentsyymien aktivaatio johtaa solussa $NADP^+$:n vajeeseen, mikä puolestaan aktivoi NAD(P)H -oksidaasin muuttamaan NADPH:ta $NADP^+$:ksi. Tuloksena soluun syntyy vetyperoksidia, mikä johtaa mitokondrioiden kalvopotentialin muutokseen, sytokromi c:n pääsyyn sytoplasmaan, kaspasi-3:n aktivaatioon, DNA:n fragmentoitumiseen ja lopulta apoptoosiin (Mizutani ym., 2005).

Dokсорubisiini vaikuttaa vapaiden happiradikaalien ohella myös tuumorisupressori p53:n aktivaation kautta (kuvio 1). On havaittu, että vaikutusmekanismilla on eroa riippuen siitä, onko kyseessä normaali- vai syöpäsolu. Syöpäsoluissa dokсорubisiini aiheuttaa mutatoituneen p53:n varhaisen aktivaation, jota seuraa kaspasi-3:n aktivaatio ja DNA:n fragmentoituminen. Normaaleissa soluissa p53:n mukaantulo tapahtuu myöhemmin, vasta kaspasi-3:n aktivaation jälkeen, mistä on päätelty, että dokсорubisiinin aiheuttama p53:n aktivaatio toimii syöpäsoluissa apoptoosia edistävänä tekijänä (Wang ym., 2004).



KUVIO 1. Doksorubisiinin vaikutusmekanismi (Mukaiiltu artikkelista Mizutani ym., 2005).

1.2.1.2 Proteiini- ja peptidilääkkeet

Terapeuttiset proteiinit ja peptidit ovat lupaava uusi lääkekuoto, joita on kehitetty mm. syövän, diabeteksen, sydän- ja verisuonitautien, sekä anemian hoitoon. Proteiini- ja peptidilääkkeiden käyttöä on kuitenkin vaikeuttanut niiden huono biologinen käytettävyys mm. niiden suuren koon ja lyhyen biologisen puoliintumisajan vuoksi. Yleisin proteiini- ja peptidilääkkeiden antotapa on parenteraalinen, sillä ruuansulatuskanavan kautta annettaessa haittana on lääkkeen proteolyttinen ja hydrolyyttinen hajoaminen ja suurikokoisen molekyylin huono imeytyminen (ks. yleiskatsaus Pinto Reis ym., 2006).

Proteiini- ja peptidilääkkeiden käytettävyyden parantamiseksi on kehitetty uusia menetelmiä, joissa lääkkeet pakataan esimerkiksi nanopartikkeliin (Venkatesan ym., 2005) tai liposomiin (Liguori ym., 2007). Vektori suojaa lääkettä mm. ruuansulatuskanavan entsyymeiltä sekä mahdollistaa lääkkeen spesifisen kohdennuksen ja pienemmän annostuksen (Venkatesan ym., 2005).

1.2.1.3 DNA ja RNA

Geeniterapiassa yleisimmin käytetty terapeuttinen molekyyli on joko DNA tai RNA -molekyyli. Geenimutaatiot aiheuttavat monia erilaisia sairauksia ja häiriöitä, joita on opittu hoitamaan soluihin vietävällä DNA:lla tai RNA:lla. Antisense-oligonukleotidi tai siRNA -välitteisellä terapialla voidaan mRNA:n kautta tilapäisesti estää tietyn geenin toiminta, kun taas DNA:n avulla tehtävällä geeniterapialla voidaan mm. korvata vanha toimimaton tai väärin toimiva geeni siirtämällä soluun rekombinattista plasmidi-DNA:ta. Yleisimmin DNA tai RNA on nähty virusvälitteisen geeniterapian työkaluna, mutta myös ei-virusvälitteiset vektorit ovat osoittautuneet käyttökelpoisiksi (ks. yleiskatsaus Merdan ym., 2002).

Antisense-oligonukleotidit ovat kemiallisesti muokattuja noin 18–20 nukleotidia pitkiä DNA-juosteita, jotka hybridisoituvat kohde mRNA:han Watsonin ja Crickin emäspariutumissäännön mukaisesti. Sitoutuminen estää translaatiota estämällä mRNA:n sitoutumisen ribosomiin. Prosessiin tulee mukaan myös RNAasi H, joka pilkkoo DNA-RNA -heterodimeerin (Donis-Keller, 1979; Zamecnik, ja Stephenson, 1978). RNA-häirinnällä tarkoitetaan RNA:n avulla tapahtuvaa geenin toiminnan estämistä. Menetelmässä soluun tuodaan valmis kaksijuosteinen RNA-molekyyli tai siirretään DNA:ta, josta syntetoidaan hiuspinnimuotoinen RNA-molekyyli. Kaksijuosteinen RNA pilkotaan entsyymaattisesti lyhyeksi, 21–23 nukleotidia pitkäksi, siRNA-molekyyliksi (Bernstein ym., 2001; Elbashir ym., 2001), minkä jälkeen siRNA:n antisense-juoste liittyy RNA-indusoituun silencing kompleksiin, jolloin siRNA:n kaksoisjuoste aukeaa ja sense-juoste hävitetään entsyymaattisesti. Kompleksimuotoinen siRNA sitoutuu kohde-mRNA:han, pilkkoo sen ja estää näin mRNA:n luennan ja proteiinisynteesin (Hammond, S.M. ym., 2000; Martinez ja Tuschl, 2004).

1.2.2 Ei-virusvektorit

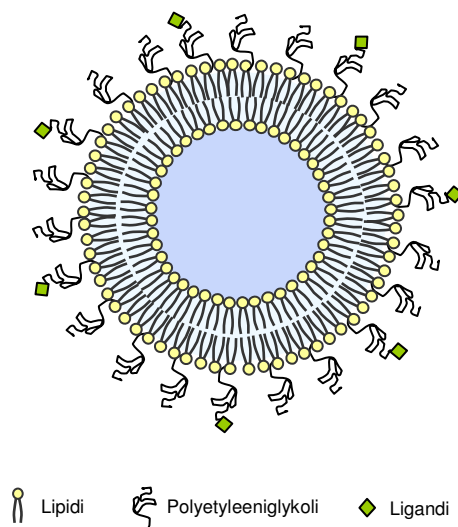
1.2.2.1 Lipidit

Geeni- ja lääkekohdennuksen vektoreista kationiset lipidit ovat olleet viimeaikoina runsaan tutkimuksen kohteena. Kationisilla liposomeilla on virusvektoreihin verrattuna useita fysiikaalisia ominaisuuksia, mitkä tekevät niistä kiinnostavan vaihtoehdon geeni- ja lääkekohdennuksen vektoreiksi ja ne ovatkin osoittautuneet toimiviksi *in vivo* ja *in vitro* (Serikawa ym., 2000; Yagi ym., 1993) Ei-virusvektoreina liposomeille asetettuja tavoitteita ovat mm. suuri lääkeaineen, peptidin, tai nukleiinihapon siirtokapasiteetti, kemiallinen ja fysikaalinen stabiliteetti sekä oikeakestoinen pysyminen elimistössä, kohteen tavoittamisen ja siihen sitoutumisen varmistamiseksi (Nallamothu ym., 2006). Tärkein kationisten liposomien käyttöä rajoittava tekijä on niiden alhainen transgeenin ekspressiotehokkuus ja toksisuus (Zhou ja Huang, 1994) sekä transfektiotehokkuuden huononeminen seerumin vaikutuksesta (Zhang ym., 1997).

Kationiset lipidit ovat amfifilisiä, eli ne muodostuvat vesihakuisesta ja vesipakoisesta alueesta. Kaikissa kationisissa lipideissä on positiivisesti varautunut amiinipääryhmä, välikappale, linkkimolekyylit sekä hydrofobinen ankkuriosa. Vesiliuoksessa kationiset lipidit muodostavat spontaanisti kaksoiskalvon ja edelleen liposomin (kuvio 2). Kun kationisista lipideista muodostunut liposomi pääsee kosketuksiin negatiivisesti varautuneiden yhdisteiden, kuten nukleiinihappojen kanssa, muodostuu elektrostaattisten voimien vuorovaikutuksesta kationinen liposomi-nukleiinihappokompleksi (Hsu ym., 2005; Zuhorn ym., 2007a).

Liposomien lipidikoostumuksesta on lukuisia variaatioita, mutta kaksoiskalvon päälipidinä voidaan käyttää esimerkiksi hydrogenoitua soijan fosfatidyylikoliinia (HSPC; Nallamothu ym., 2006). Rakenteeseen liitetään usein myös kolesterolia ja polyetyleeniglykoli (PEG) -konjugoituja lipidejä kuten esimerkiksi dioleyylifosfatidyylietanolamiineja (DOPE; Igarashi ym., 2006) tai distearoyylifosfatidyylietanolamiineja (DSPE; Rathore ja Ghosh, 2008). Nämä fosfatidyylietanolamiinit ovat liposomien rakennetta parantavia lipidejä, jotka lisäävät kalvon juoksevuutta ja helpottavat siten liposomin ja solukalvon fuusiota (Maitani ym., 2007).

HSPC on vakaa tyydyttynyt lipidi ja se minimoi liposomiin pakatun molekyylin ennenaikaista vuotamista säilytyksen aikana tai matkalla kohdekudokseen *in vivo*. Tyydyttyneistä lipideistä koostuvien liposomien kaksoiskalvot kestävät tyydyttymättömistä lipideistä koostuvia kalvoja paremmin vuotamattomina, sillä tyydyttyneillä lipideillä on korkeampi sulamispiste. Näin ollen tyydyttyneet lipidit pitävät rakenteensa ruumiinlämpötilassa, kun taas tyydyttymättömät lipidit muuttuvat juokseviksi (Nallamothu ym., 2006). Kolesterolin lisääminen kaksoiskalvoon lisää rakenteen jäykkyyttä, parantaa aineiden pysymistä liposomin sisällä ja vähentää liposomin pintaan sitoutuneiden seerumin proteiinien aiheuttamaa rakenteen epätasapainoa (Kirby ym., 1980; Semple ym., 1996).



KUVIO 2. Yksinkertaistettu kaavakuva liposomin rakenteesta. Kaksoiskalvoon on liitetty polyethylenglykolikonjugoituja lipidejä sekä ligandi reseptorivälitteistä kohdennusta varten (Mukailtu artikkelista Nallamothu ym., 2006).

Polyethylenglykoli-konjugointi pidentää liposomin puoliintumisaikaa verenkierrossa estämällä fagosytoosia ja opsonisaatiota (Allen ym., 1995; Torchilin ym., 1994). Polyethylenglykolia voidaan käyttää apuna myös reseptorivälitteisessä kohdennuksessa liittämällä ligandi PEG:n distaaliseen päähän (kuvio 2), jolloin PEG ei häiritse ligandi-reseptori vuo-

rovaikutusta (Hansen ym., 1995). Liposomien puoliintumisaikaan vaikuttaa myös niiden koko. Puoliintumisaika lyhenee liposomin koon kasvaessa ja Kawaharan ym. mukaan liposomin optimikoko puoliintumisajan suhteen on noin 114 nm (Kawahara ym., 2003).

1.2.2.2 Polymeerit

Kationisten lipidien tavoin myös kationiset polymeerit voivat toimia geeniterapiavektoreina. Kationiset polymeerit muodostavat negatiivisesti varautuneen DNA:n kanssa kondensoituneen kompleksin, jolla on positiivinen nettovaraus. Polymeerit ovat synteettisiä, joten niiden kokoa tai rakennetta voidaan helposti muokata. Ne voivat olla rakenteeltaan lineaarisia tai haaroittuneita ja niiden pintaan voidaan liittää erilaisia ligandeja tai muita niiden ominaisuuksia parantavia molekyyliä. Esimerkkejä geeniterapiassa käytetyistä kationisista polymeereistä ovat mm. polyetyyleeni-imiini (PEI; Boussif ym., 1995), poly-l-lysiini (Wu ja Wu, 1987), polyamidoamiini dendrimeerit (Rudolph ym., 2000) ja polypropyyliamiini dendrimeerit (Schatzlein ym., 2005).

PEI on yleisin geeniterapiassa käytetty ja tutkittu polymeeri ja se voi esiintyä joko lineaarisena tai haaroittuneena. Lineaariset PEI-DNA-kompleksit ovat haaroittuneihin verrattuna vähemmän kondensoituneita ja DNA irtoaa niistä helpommin. Muun muassa poly-l-lysiiniin verrattuna PEI:n etuihin voidaan lukea sen ominaisuus destabiloida endosomaalisia kalvoja ja vältyä näin happaman pH:n hajottavalta vaikutukselta, sekä samalla turvata DNA:n pääsy sytoplasmaan (Kichler ym., 2001; Klemm ym., 1998).

1.2.2.3 Peptidit

Peptidit voivat toimia ei-virusvälitteisinä vektoreina usealla eri tavalla. Kationiset, runsaasti lysiniä tai arginiinia sisältävät peptidit pystyvät tehokkaasti muodostamaan DNA:n kanssa lipidien ja polymeerien tavoin kondensoituneita partikkeleita (Wadhwa ym., 1997). Peptidi voidaan myös liittää polymeeri-DNA kompleksiin, jolloin kompleksit pystytään kohdentamaan spesifisesti tiettyyn reseptoriin tai solutyypin (Moffatt ym., 2005).

Proteiinien transduktiodomeeneista peräisin olevat peptidit pystyvät läpäisemään solukalvon ja viemään niihin kovalenttisesti liitetyn proteiinin, yhdisteen tai nukleinihapon solu-

kalvon läpi. Tehokkaimmiksi transduktiovektoreiksi osoittautuneita peptideitä ovat mm. ihmisen immuunikatovirus 1:stä eristetty Tat (Frankel ja Pabo, 1988), ja herpes simplex virus 1:n transkriptiofaktori VP22 (Elliott ja O'Hare, 1997).

Tat-peptidi on 86 aminohappoa pitkän Tat-proteiinin 37.–72. aminohaposta koostuva transduktiodomeeni, joka vastaa proteiinin menosta solun sisään (Dingwall ym., 1989; Ferrari ym., 2003; Vives ym., 1997). Peptidillä on kyky kaveolien välityksellä läpäistä solukalvo, minkä jälkeen se lokalisoituu tumaan (Ferrari ym., 2003; Frankel ja Pabo, 1988). Konjugoimalla peptidiin muita molekyyliä, pystytään soluun viemään sellaisia proteiineja, jotka eivät yksin pysty läpäisemään solukalvoa (Fawell ym., 1994).

Herpes simplex virus 1:n transkriptiofaktori VP22 on peptidi, jolla on epätavallisen tehokas kyky läpäistä solukalvo. Sytoplasmaan pääsyn jälkeen VP22 ohjautuu tumaan, jossa se sitoutuu kromatiiniin ja periytyy tätä kautta tytärsoluille. Näiden ominaisuuksien vuoksi VP22 on potentiaalinen vektori fuusioproteiinien viemiseksi soluun (Elliott ja O'Hare, 1997).

1.2.3 Ilman vektoria tapahtuva geeninsiirto

Ilman vektoria tapahtuvalla geeninsiirrolla tarkoitetaan paikallisia fysikaalisia menetelmiä, joissa solukalvoon aiheutetaan ohimenevä mekaaninen tai esimerkiksi sähköinen vamma, jotta DNA tai muu terapeuttinen molekyyli pääsisi solun sisään.

Pelkällä plasmidi-DNA:lla tehtävä suora geeninsiirto on yksinkertaisin ei-virusvälitteisistä geeninsiirtomenetelmistä. Menetelmän keksimisen jälkeen (Wolff ym., 1990) siitä on kehitetty DNA-rokote -sovelluksia, joissa esimerkiksi taudinaiheuttajaviruksen tai syöpäkasvaimen vastainen immuunivaste saadaan aikaan injektoimalla kudokseen plasmidiin liitettyä virus-DNA:ta (Danko ja Wolff, 1994), sytokiinejä tai kasvaimen kasvua hillitseviä geenejä (He ym., 1998).

Geenipyssyllä tarkoitetaan geeninsiirtomenetelmää, jolla voidaan ns. ampumalla siirtää rajatulle alueelle geneettistä materiaalia tai terapeuttisia proteiineja tai peptidejä (Yang ym., 1990). Menetelmä kehitettiin alun perin kasvisoluille, mutta se laajennettiin myöhemmin myös nisäkässoluihin tehtävään geeninsiirtoon (Klein ym., 1992). Geenipyssyllä tehtävään geeninsiirtoon sopivia kudoksia ovat iho, limakalvo tai kirurgisen toimenpiteen yhteydessä paljastettu muu kudos (Yang ym., 1990). Geenipyssy-menetelmässä käytetään hyväksi kultapartikkeleita, jotka päällystetään esimerkiksi siirrettävällä DNA:lla ja ammutaan korkealla kiihtyvyydellä soluihin tai kudokseen. Kultapartikkelit penetroituvat muutamien millimetrin syvyydelle kudokseen ja niiden pintaan kiinnittynyt DNA vapautuu solujen sisään (O'Brien ja Lummis, 2002).

Elektroporaatio on menetelmä, jossa solukalvo tehdään sähköä avulla läpäiseväksi (Coster, 1965). Solujen altistaminen voimakkaaseen sähkömagneettiseen kenttään aikaansaa niissä kalvopotentialin muutoksen, mikä tekee solukalvon läpäiseväksi molekyyleille, jotka eivät normaalisti sitä läpäise (Neumann ym., 1982). Elektroporaatiota käytetään runsaasti *in vitro*, mutta solukalvon läpäisy voidaan tehdä myös paikallisesti *in vivo*. Eräs sovellus on elektrokemoterapia, jossa elektroporaatiota käytetään helpottamaan hydrofiilisten sytotoksisien lääkeaineiden, kuten bleomysiinin pääsyä soluun (Rols ym., 2000).

1.3 Ei-virusvälitteinen geeni- ja lääkekohdennus solutasolla

1.3.1 Vektorin sitoutuminen solun pintaan

Ei-virusvälitteiset vektorit päätyvät solun sisälle endosytoosin välityksellä ja ne voivat sitoutua solun pintaan joko epäspesifisesti tai reseptorivälitteisesti kohdennettuna. Vektorin epäspesifinen sisäänotto *in vivo* vaatii kohdennettuun tapaan verrattuna huomattavasti suuremman ja siten myös potentiaalisesti myrkyllisen annostuksen. Tästä syystä yksi geeni- ja lääkehoitoon suurimmista haasteista on vektorin spesifinen kohdentaminen kohdesoluun, -kudokseen tai -elimeen. Eräs tie terapeuttisten molekyylien spesifiseen kohdentamiseen kulkee solun pinnan reseptoreiden kautta. Ei-virusvektoreihin, kuten liposomeihin, voidaan liittää reseptorispesifisiä ligandeja, joiden avulla kuljetettava molekyyli pääsee haluttuihin soluihin tai ainakin rajalliseen määrään erilaisia soluja. Kohdennuksessa pyritään käyttämään hyväksi reseptoreja, jotka ovat mahdollisimman solutyypispesifisiä, vaikka tietyn reseptorin rajoittuminen vain yhteen solutyypiin onkin harvinaista (ks. yleiskatsaukset Molas ym., 2003; Varga ym., 2000).

1.3.1.1 Reseptorivälitteinen geeni- ja lääkekohdennus

Reseptorivälitteisen kohdennuksen ensimmäinen vaihe on vektorin kulkeutuminen kohdesolun luo ja ligandin sitoutuminen reseptoriin solun pinnalla. Sitoutumisen tulee olla spesifistä ja tapahtua korkealla affiniteetilla. Käytettävän reseptorin tulee olla sellainen, että ligandin sitoutuminen käynnistää siinä reseptori-ligandi-vektori -kompleksin endosytoosin (ks. yleiskatsaukset Molas ym., 2003; Varga ym., 2000). Taulukossa 3 on listattuna tavallisimpia ei-virusvälitteisessä geeni- ja lääkekohdennuksessa esiintyviä reseptori-ligandi -pareja. Esimerkkejä soluspesifisistä reseptoreista ovat maksan hepatosyyteissä esiintyvä asialoglykoproteiinireseptori (Dizhe ym., 2001) ja makrofagien pinnan mannoosireseptorit (Kawakami ym., 2004). Jotkut syöpäsolut yliekspressoivat tiettyjä reseptoreja kuten transferrini-, folaatti- tai insuliinireseptoria. Näiden reseptorien yliekspressio erottaa syöpäsolut normaaleista soluista ja reseptoreita voidaan siksi käyttää hyväksi geeni- ja lääkehoitoissa (Cho ym., 2005; Kakudo ym., 2004; Sobolev ym., 1998). Myös tiettyjä

soluspesifisiä reseptoreita vastaan tuotettuja monoklonaalisia vasta-aineita on käytetty hyväksi kohdennuksessa, esimerkkinä T-lymfosyyttien pintamarkkeri CD3 (O'Neill ym., 2001). Eräät solun pinnan integriinireseptorit ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ ja $\alpha5\beta1$) sitovat spesifisesti soluväliaineen molekyylejä arginiini-glysiini-asparagiini (RGD)-peptidin välityksellä, mitä voidaan käyttää hyväksi kohdennettaessa mm. kasvaimen verisuonen muodostumista (ks. yleiskatsaus Temming ym., 2005) tai kystistä fibroosia vastaan (Cunningham ym., 2002).

TAULUKKO 3. Tavallisimpia ei-virusvälitteisessä geeni- ja lääkekohdennuksessa käytettyjä reseptoreita (Mukailtu artikkeleista Kichler, 2004; Molas ym., 2003; Varga ym., 2000).

Reseptori	Ligandi	Kohde	Referenssit
Asialoglykoproteiini	galaktoosi	Maksan hepatosyytit	(Dizhe ym., 2001)
CD3	anti-CD3	T-lymfosyytit	(O'Neill ym., 2001)
Epidermaalinen kasvutekijä (EGF) -reseptori	EGF	Tuumorisolut (keuhko, levyepiteeli)	(Schaffer ym., 2000)
Folaattireseptori	Folaatti	Tuumorisolut	(Cho ym., 2005)
Insuliinireseptori	Insuliini	Tuumorisolut	(Sobolev ym., 1998)
Integriinit	RGD-peptidit	Epiteelisolut	(Cunningham ym., 2002)
Mannoosireseptori	Mannoosi-6-P	Makrofagit, dendriittiset solut	(Kawakami ym., 2004)
Transferrinireseptori	Transferriniini	Tuumorisolut	(Kakudo ym., 2004)

Spesifinen kohdennus on haaste, johon yritetään jatkuvasti löytää parempia ratkaisuja. Yksi lähestymistapa on biotiini/(strept)avidini –tekniikka, jonka avulla pystytään joko pelkääntään tai esimerkiksi vasta-aineen avulla aikaansaamaan spesifinen kohdennus käyttämällä hyväksi avidiinin tehokasta kykyä sitoa biotiinia korkealla affiniteetilla. Biotinyloidun monoklonaalisen vasta-aineen avulla kondennus pystytään suuntaamaan spesifisesti tiettyyn antigeeniin, jolloin vasta-aineen biotiiniin sidotaan (strept)avidini ja tähän edelleen biotinyloitu vektori. Menetelmän potentiaalinen haittapuoli on avidiinin immunogeenisyys, mikä tulee vastaan useimpien ulkoisten ligandien yhteydessä (Zavaleta ym., 2007).

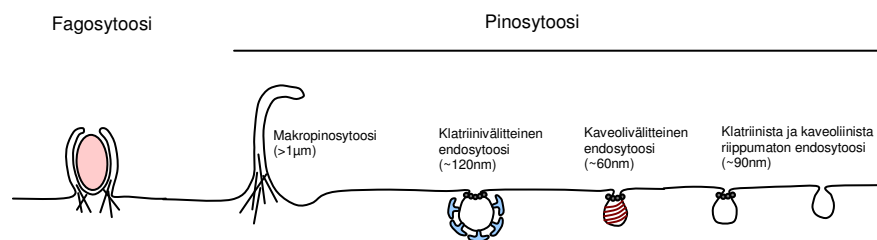
1.3.1.2 $\alpha 2\beta 1$ -integriini geeni- ja lääkekohdennuksen reseptorina

Integriinit ovat heterodimeerisiä solukalvon glykoproteiineja, jotka koostuvat yhdestä α -alayksiköstä ja yhdestä β -alayksiköstä (ks. yleiskatsaus Hynes, 1992). Integriinit välittävät solu-solu ja solu-soluväliaine -interaktioita ja niiden on osoitettu olevan tärkeitä mm. yksilön kehityksessä, haavan paranemisessa, tromboosissa, tulehdustiloissa ja metastaaseissa (ks. yleiskatsaukset Albelda, 1993; Hynes ja Lander, 1992; Plow ja Ginsberg, 1989). Integriinit välittävät signaaleita solun ulkopuolelta solun sisään ja päinvastoin. Solun integriinien ekspressio muuttuu alkionkehityksen, solun erilaistumisen ja solun aktivaation myötä (ks. yleiskatsaus Hynes, 1992). Muun muassa sytokiinit ja kasvutekijät voivat vaikuttaa integriinien ekspressiotasoon (Janat ym., 1992; Santala ja Heino, 1991) ja muuttaa sitä esimerkiksi malingnin muutoksen seurauksena (ks. yleiskatsaus Albelda, 1993).

$\alpha 2\beta 1$ -integriini toimii solun pinnalla kollageenia tai laminiinia sitovana reseptorina ja sitä tavataan mm. verihiutaleissa, epiteelisoluissa, endoteelisoluissa, fibroblasteissa ja sileissä lihassoluissa (Elices ja Hemler, 1989; Skinner ym., 1994). Luonnollisten ligandien ohella myös patogeenit, kuten mm. pikornaviruksiin kuuluva Echovirus 1 käyttää $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä reseptorinaan sitoutuen samanaikaisesti useisiin reseptoreihin ja aiheuttaen siten niiden kasautumisen ja edelleen endosytoosin (Pietiäinen ym., 2004; Upla ym., 2004). $\alpha 2\beta 1$ -integriinin käyttöä geeni- ja lääkekohdennuksen reseptorina on toistaiseksi tutkittu hyvin vähän. Endoteelisolujen $\alpha 2\beta 1$ -integriinillä on tärkeä merkitys mm. kasvainten verisuonten muodostumisessa. Laskimoiden endoteelisolujen kasvutekijä VEGF (engl. vascular endothelial growth factor) on sytokiini, joka säätelee angiogeneesiä stimuloimalla mm. $\alpha 2\beta 1$ ja $\alpha 1\beta 1$ -integriinien ekspressiota endoteelisoluissa, endoteelisolujen kasvua, pienten laskimoiden läpäisevyyttä sekä endoteelisolujen adheesiota ja liikkumista (Senger ym., 2002). $\alpha 2\beta 1$ -integriini välittää lisäksi verisuonivauriossa verihiutaleiden adheesiota verisuonen seinämän kollageeniin, sillä verihiutaleiden $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja kollageenin vuorovaikutus on välttämätön hemostaasin kannalta (He ym., 2003). Edellä kuvattujen syiden vuoksi $\alpha 2\beta 1$ -integriini on lupaava reseptori mm. kasvainten angiogeneesin estoon sekä sydän ja verisuonitautien komplikaatioiden hoitoon kohdennetun geeni- ja lääketerapian välityksellä.

1.3.2 Endosytoosi

Nisäkässoluilla tavataan useita toisistaan eroavia endosytoosireittejä, jotka voidaan jakaa kahteen pääryhmään, fagosytoosiin ja pinosytoosiin (kuvio 3). Fagosytoosi eli suurten partikkelien sisäänotto, solusyöinti, rajoittuu erikoistuneisiin fagosytoiviin soluihin, kun taas pinosytoosia eli nesteen ja liukoisten molekyylien sisäänottoa tapahtuu kaikilla soluilla. Tunnetuimmat pinosytoosireitit ovat makropinosytoosi, klatriinivälitteinen endosytoosi ja kaveolivälitteinen endosytoosi sekä jossain määrin myös klatriinista ja kaveoliinista riippumaton endosytoosi (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Tässä kappaleessa esitellään ei-virusvälitteisessä lääkekohdennuksessa tavallisimmin hyödynnetyt endosytoosireitit eli makropinosytoosi sekä klatriini- ja kaveolivälitteinen endosytoosi.



KUVIO 3. Nisäkässolujen endosytoosireitit (Mukailtu artikkelista Conner ja Schmid, 2003)

1.3.2.1 Makropinosytoosi

Makropinosytoosi on aktiinista riippuvainen endosytoosin muoto, joka eroaa huomattavasti muista tunnetuista endosytoosimuodoista. Makropinosytoosia tapahtuu solun laitamilla aktiinin polymerisaatiosta johtuvan solukalvon poimuttumisen seurauksena. Poimuttunut solukalvo sulkee sisäänsä solun ulkopuolista nestettä, minkä seurauksena solun sisään muodostuu suuria, 0,2-5 μm :n kokoisia epäsäännöllisen muotoisia vesikkeleitä eli makropinosomeja. Makropinosytoosilla solu pystyy tehokkaasti ottamaan epäspesifisesti sisäänsä mm. suuria liukoisia makromolekyyliä ja kuljettamaan niitä solun ulkopuolelta sytoplasmaan (ks. yleiskatsaukset Conner ja Schmid, 2003; Swanson ja Watts, 1995).

Makrofageilla ja dendriittisillä soluilla makropinosytoosi on jatkuva prosessi (Norbury ym., 1997; Racoosin ja Swanson, 1993), mutta mm. fibroblasteilla (Veithen ym., 1996) ja epiteelisoluilla makropinosytoosin käynnistyminen vaatii kasvutekijöiden kuten EGF:n (Haigler ym., 1979) ja PDGF:n (Davies ja Ross, 1978) sekä PMA:n (Swanson, 1989) aikaansaaman stimulaation. On myös todettu, että useilla eri solutyypeillä onkogeenisien tyrosiinkininaasi src:n aktivaatio edistää makropinosytoosia ja sen kinaasiaktiivisuus johtaa makropinosytoosiin ilman kasvutekijä-välitteistä solun stimulaatiota (Mettlen ym., 2006; Veithen ym., 1996).

Rho geeniperheen GTPaasit kuten Rac1, RhoA ja Cdc42 ovat aktiinitukirangan tärkeimpiä säätelyproteiineja joista Rac1 ja Cdc42 osallistuvat solukalvonalaisten aktiinifilamenttien uudelleenjärjestäytymiseen (Anton ym., 2003; West ym., 2000). Cdc42:n aktivoima Rac1 sijoittuu solukalvolle, jossa se stimuloi kolesterolin ja PKC:n myötävaikutuksesta aktiinifilamenttien polymerisaatiota ja solukalvon poimuttumista (Grimmer ym., 2002; Nobes ja Hall, 1995; Ridley ym., 1992). Muita makropinosytoosia sääteleviä tekijöitä ovat mm. fosfatidyli-inositoli 3-kinaasi, joka myötävaikuttaa makropinosomin sulkeutumiseen ja sen erkanemiseen solukalvosta (Araki ym., 1996) sekä ADP-ribosylaatiotekijä 6, joka stimuloi makropinosytoosia edistämällä aktiinin polymerisaatiota sekä säätelee kalvoliikennettä kiertämällä solukalvon ja endosomaalisten vesikkelien välillä GTP:tä sitovassa ja hydrolysoivassa muodossa (D'Souza-Schorey ym., 1998; Peters ym., 1995; Schafer ym., 2000).

1.3.2.2 Klatriinivälitteinen endosytoosi

Klatriinivälitteinen endosytoosi on parhaiten tunnettu endosytoosin muoto. Se on prosessi, minkä avulla nisäkässolut ottavat sisäänsä mm. solukalvon reseptoreita ja niihin sitoutuneita ligandeja kuten erilaisia ravinteita, antigeeneja, kasvutekijöitä ja patogeenejä (ks. yleiskatsaukset Benmerah ja Lamaze, 2007; Takei ja Haucke, 2001)

Klatriinivälitteisen endosytoosin ensimmäinen vaihe on ligandin sitoutuminen solukalvon reseptoriin. Sitoutuminen käynnistää kuoriproteiinien kerääntymisen solukalvon sytoplasmiselle puolelle ja solukalvon taipumisen kuopalle (Higgins ja McMahon, 2002). Adaptori-proteiinikompleksi 2 on kahdesta suuresta (α ja $\beta 2$) ja kahdesta pienestä ($\mu 2$ ja $\sigma 2$) alayk-

siköstä muodostuva heterodimeeri, jonka tehtävänä on olla linkkimolekyylinä klatriinin ja solukalvon välillä. Kompleksi sitoutuu solukalvoon α -alaysikön välityksellä (Goodman ja Keen, 1995) ja ohjaa kuoren muodostumista sitoutumalla μ 2-alaysikön avulla klatriiniin (Boll ym., 2002). Tärkein kuoriproteiini eli klatriini on 180 kDa kokoinen (Pearse, 1975) raskaista ja kevyistä ketjuista muodostunut kolmisakarainen trimeeri, triskelioni (Kirchhausen ja Harrison, 1981; Ungewickell ja Branton, 1981). Triskelionit muodostavat kuopakkeen ympärille viisi- ja kuusikulmioista rakentuvan häkin, joka kuroutuu solukalvon mukana muodostaen klatriinipäällysteisen, noin 100–150 nm:n kokoisen vesikkelin (Kanaseki ja Kadota, 1969). Hermosoluissa klatriiniin sitoutuu lisäksi monomeerinen AP180 - proteiini, jonka tehtävänä on edistää klatriinikuoren muodostumista ja muokata klatriinihäkin kokoa (Zhang ym., 1998). Vesikkelin kuroutuminen solukalvosta tapahtuu GTPaasi dynamiinin avulla, jota kerääntyy muodostuvan vesikkelin suulle rengaspinoiksi. Konformaatiomuutosten seuraksena dynamiini sulkee vesikkelin ja irrottaa sen solukalvosta (Hinshaw ja Schmid, 1995).

1.3.2.3 Kaveolivälitteinen endosytoosi

Kaveolit ovat pieniä, 50–80 nm:n kokoisia, solukalvon painaumuksia. Niiden ajatellaan yleisesti muistuttavan morfologialtaan pullon muotoa, mutta ne voivat solutyypistä riippuen esiintyä myös litteinä, putkimaisina tai irrallisina vesikkeleinä. Kaveoleja tavataan ainakin jollain asteella lähes kaikilla erikoistuneilla soluilla, mutta erityisen yleisiä ne ovat mm. endoteelisoluissa, adiposyyteissä, fibroblasteissa, tyypin I pneumosyyteissä sekä lihassoluissa. Endosytoosin ohella kaveolien tehtävänä on toimia transsyytoosissa ja signaalinvälityksessä sekä pitää yllä kolesteroliaineenvaihdunnan homeostasiaa (ks. yleiskatsaus Cohen ym., 2004). Kaveolivälitteinen endosytoosi on monimuotoinen, valikoiva ja tarkkaan säädeltä tapahtuma, minkä välityksellä solu ottaa sisäänsä mm. lipideitä, proteiineja, lipidiankkuroituneita proteiineja sekä patogeeneja. On kuitenkin huomattava, että tietyille sisään otettavalle molekyylille voidaan solutyypistä riippuen käyttää eri endosytoosireittiä tai vaihtaa sitä solussa olosuhteiden mukaan (ks. yleiskatsaus Mayor ja Pagano, 2007).

Kaveolit muodostuvat kolesterolia ja sfingolipideitä sisältäville solukalvon alueille. Kaveolien pääproteiini on kolesterolia sitova kaveoliiniproteiini, jota esiintyy selkärankaisilla

kolmea rakenteellisesti samankaltaista tyyppiä. Kaveoliini-1, kaveoliini-2 ja kaveoliini-3 ovat 21 kDa:n kokoisia integraalisia palmityloituvia kalvoproteiineja, joista kaveoliini-1 on kaveolivälitteisen endosytoosin tärkein proteiini. Kaveoliini-2 ilmenee yhdessä kaveoliini-1:n kanssa ja kaveoliini-3 esiintyy ainoastaan poikkijuovaisissa lihassoluissa (Dupree ym., 1993). Kaveoliinit uppoutuvat solukalvoon polypeptidiketjunsä keskivaiheilla olevan hydrofobisen jakson ansiosta ja muodostavat hiuspinnää muistuttavan rakenteen siten, että karboksi- ja aminoterminaaliset päät sijoittuvat solukalvon sytoplasmiselle puolelle (Monier ym., 1995).

Kaveolivälitteinen endosytoosi on hidas, tarkoin säädelty ligandin sitoutumisen stimuloima tapahtuma, jonka avulla solu pystyy ottamaan sisäänsä vain vähän solunulkopuolista materiaalia (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002). Eräs kaveolivälitteiselle reitille ohjattu reseptori on folaattireseptori. Sen ligandina toimiva foolihappo sitoutuu reseptoriinsa ja kompleksi ohjautuu solun sisään kaveolivälitteisesti (ks. yleiskatsaus Anderson ym., 1992). Ligandin sitoutuminen aikaansaa reseptorin kulkeutumisen kaveoleihin ja käynnistää signaalinvälityskaskadin, jossa fosforylaatiolla on tärkeä rooli. Tyrosiinikinaasi src fosforyloi kaveoliini-1:n tyrosiinitähteitä (Li ym., 1996), mikä käynnistää kaveolien kuroutumisen (Shajahan ym., 2004). Kuroutuminen etenee solukalvonalaisen aktiinitukirangan depolymerisaatiolla. Muodostuneet aktiinimonomeerit ohjataan kuroutuvan kaveolin ympärille, aktiini polymerisoituu ja vesikkeli irtoaa dynamiinin myötävaikutuksesta solukalvosta sytoplasmaan (ks. yleiskatsaus Pelkmans ym., 2002).

1.3.3 Endosomaalinen kulkeutuminen

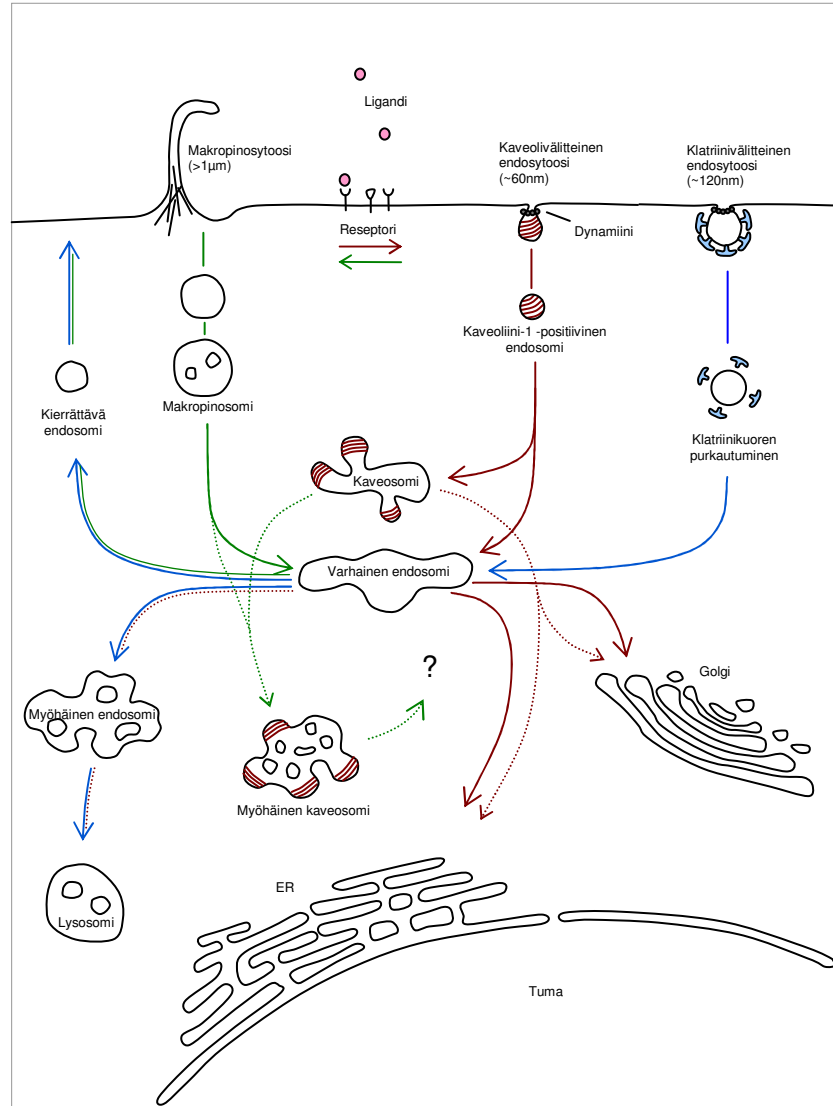
Klatriini- ja kaveolivälitteisen endosytoosin sekä makropinosytoosin välityksellä muodostuneet endosomit kulkeutuvat solun sytoplasmassa toisistaan poikkeavalla tavalla.

Klatriinikuopakkeesta kuroutuneen vesikkelin klatriinikuori hajotetaan sytoplasmassa auk-silliini -proteiinin vaikutuksesta, mikä mahdollistaa vesikkelin fuusioitumisen muiden endosomien kanssa (Gall ym., 2000). Irrotettu klatriini kiertää takaisin solukalvolle käytettä-

väksi uudelleen klatriinivälitteisessä endosytoosissa (Rothman ja Schmid, 1986). Kuoreton vesikkeli fuusioituu sytoplasmassa nopeasti varhaisten endosomien kanssa. Varhaiset endosomit ovat lievästi happamia rakenteita, joiden välityksellä sisään otettu materiaali kuljetetaan joko lysosomeihin hajotettavaksi tai kierrätetään takaisin solun pinnalle (kuvio 4, sininen reitti). Lysosomaaliseen hajotukseen kuljettavat varhaiset endosomit happamoituvat ja kypsyvät myöhäisiksi endosomeiksi (pH 5,0–6,0). Myöhäinen endosomi fuusioituu lysosomin kanssa (pH 5,0–5,5) ja sen kuljettama materiaali hajotetaan lysosomaalisten entsyymien toimesta (ks. yleiskatsakset Gluck, 1993; Van Dyke, 1996).

Transferriniireseptori kuljettaa soluun transferriniä klatriinivälitteisen endosytoosin kautta. Reseptori kierrätetään varhaisista endosomeista joko nopeiden tai hitaiden kierrättävien, lievästi happamien endosomien välityksellä takaisin solun pintaan (Sheff ym., 1999). Ei-virusvälitteisiin vektoreihin on kehitetty keinoja, joilla ne pystyvät vapautumaan endosomeista. Yksi keino on liittää ei-virusvektoriin osa, jonka avulla se läpäisee endosomin kalvon jouduttuaan happamaan ympäristöön (ks. yleiskatsaus Wagner, 1999).

Kaveolivälitteinen endosytoosi on klatriinivälitteisestä endosytoosista poiketen pH:ltaan neutraali reitti (Ferrari ym., 2003). Solukalvolta kuroutuneet kaveoliini-1 -positiiviset endosomit fuusioituvat kaveosomeiksi kutsuttujen organellien kanssa (kuvio 4, punainen reitti). Kaveosomit ovat neutraaleja, verrattain suuria, morfologialtaan monimuotoisia kaveoliini-1 positiivisia endosomeja joista puuttuu klatriinireitille sekä erityisreitille tyypilliset markerit (Marjomäki ym., 2002; Pelkmans ym., 2001; Pietiäinen ym., 2004). Kaveosomit kuvattiin ensimmäistä kertaa SV40-viruksen välietappina matkalla solun pinnasta ER:ään (Pelkmans ym., 2001), mutta niiden osallistumisesta endosytoosireitteihin tiedetään toistaiseksi vain vähän. Monet kaveolivälitteistä endosytoosireittä hyödyntävät patogeenit päätyvät lysosomaalisen hajotuksen sijasta suoraan Golgiin ja/tai ER:ään (Norkin ja Kuksin, 2005; Pelkmans ym., 2001). Hajotukselta välttyminen on etu geeni- ja lääkekehityksen kannalta mutta kaveoliinipositiiviset endosomit voivat fuusioitua kaveosomien lisäksi myös varhaisten endosomien kanssa (kuvio 4) ja yhtyä siten lysosomaaliseen hajotukseen johtavan klatriinivälitteisen endosytoosireitin kanssa (Botos ym., 2007).



KUVIO 4. Makropinosytoosin sekä kaveoli- ja klatriinivälitteisen endosytoosin välityksellä kuroutuneiden vesikkelien sytoplasmiset liikkeet (Mukaiiltu artikkeleista Conner, ja Schmid, 2003; Marsh ja Helenius, 2006; Mayor ja Pagano, 2007; Karjalainen ym., 2008 *painossa*).

Kaveoliinivälitteistä endosytoosia on käytetty geeniterapian kohteena mm. endoteelisoluissa (McIntosh ym., 2002), joissa kaveolit kattavat 10–20 % solun pinnasta (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Endoteelisolut toimivat fysiologisena esteenä systeemisesti kohdennetulle geeni- ja lääketerapialle *in vivo*, mutta kaveolispesifisen vasta-aineen avulla kohdennettuna on voitu endoteelisolujen transsytoosin välityksellä saavuttaa muita kohdekudoksia (McIntosh ym., 2002).

Makropinosytoosilla muodostuneiden vesikkelien, makropinosomien, oletetaan fuusioituvan ainakin varhaisten endosomien kanssa, josta ne lajitellaan eri puolelle solua, mutta niiden sytoplasmiset liikkeet vaihtelevat solutyypistä riippuen (ks. yleiskatsaukset Kirkham ja Parton, 2005; Mayor ja Pagano, 2007). Makrofageilla, joilla makropinosytoosi on jatkuva prosessi, makropinosomit kulkeutuvat varhaisista endosomeista solun keskustaa kohti, jolloin niiden pH laskee ja ne fuusioituvat lysosomaaliseen hajotukseen johtavan reitin kanssa (Meier ja Greber, 2004). Muilla solutyypeillä, kuten esimerkiksi A431 karsinomasoluilla, makropinosomien pH laskee mutta ne eivät päädy hajotukseen vaan kuljettavat kasvutekijöiden stimuloimana sisältönsä takaisin solun pinnalle (West ym., 1989).

Makropinosomien on varhaisten endosomien lisäksi ehdotettu fuusioituvan myös kaveosomien kanssa (kuvio 4, vihreä reitti; ks. yleiskatsaus Marsh ja Helenius, 2006). Makropinosomit voivat kypsyä multivesikulaaarisiksi rakenteiksi, jotka fuusioituvat kaveoliini-1-positiivisten kaveosomien kanssa muodostaen myöhäisiksi kaveosomeiksi kutsuttuja rakenteita. Nämä rakenteet eivät liity klatriinivälitteiseen reittiin, sillä ne eivät happamoidu eikä niistä löydy varhaisille tai kierrättäville endosomeille eikä myöskään myöhäisille endosomeille/lysosomeille tyypillisiä markkereita (Karjalainen ym., 2008 *painossa*). Kaveosomien kanssa fuusioituva makropinosytoosista lähtevä reitti on spesifinen ja tarkoin säädelty reseptorivälitteinen reitti (Karjalainen ym., 2008 *painossa*), mutta sen tarkkaa merkitystä solunsisäisessä kalvoliikenteessä ei vielä tiedetä.

Makropinosomien on huomattu olevan muihin endosomeihin verrattuna ns. huokoisia rakenteita (Wadia ym., 2004), joista esimerkiksi ei-virusvektorit pääsisivät mahdollisesti vuotamaan ulos. Vuotaminen saattaa liittyä virusinfektioon (Meier ym., 2002) tai ei-virusvektoriin liitetyn peptidin toimintaan (Khalil ym., 2007) vuotamisen edistäjänä. Tämä ominaisuus tekee makropinosytoosista houkuttelevan kohteen geeni- ja lääketerapialle, sillä muiden endosytoosireittien kohdalla haasteena on vektorin pääsy sytoplasmaan sekä välttyminen lysosomaaliselta hajotukselta. Makropinosytoosilla on lisäksi kaveolivälitteiseen endosytoosiin verrattuna suurempi sisäänottokapasiteetti, mikä voidaan lukea kyseisen reitin etuihin geeni- ja lääkekohdennuksessa (ks. yleiskatsaukset Gruenberg ja van der Goot, 2006; Khalil ym., 2006; Mayor ja Pagano, 2007).

2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tutkimusten mukaan kollageeneja sitova $\alpha 2\beta 1$ -integriini siirtyy vasta-aineilla aikaansaadun kasautuman jälkeen makropinosytoosin ja kaveolien välityksellä kaveosomeihin (Pietiäinen ym., 2004; Upla ym., 2004; Xing ym., 2004). Lisäksi on havaittu, että $\alpha 2\beta 1$ -integriinia reseptorinaan käyttävä Echovirus 1 päätyy makropinosytoosin ja osin kaveolien kautta kaveosomeihin ja vapautuu sieltä sytoplasmaan jo muutaman tunnin kuluttua soluun tunkeutumisesta (Pietiäinen ym., 2004; Karjalainen ym., 2008 *painossa*). Nämä ominaisuudet tekevät $\alpha 2\beta 1$ -integriinistä lupaavan reseptorin lääkehoidolle. Kaveosomit muodostavat tärkeän lajittelukeskuksen solun sytoplasmassa ja niiden käytettävyyttä yhdessä integriinireseptorien kanssa on lääkekohdennuksen kannalta tutkittu hyvin vähän.

Tässä tutkimuksessa on tarkoitus selvittää vasta-aineiden, biotiini-streptavidiinitekniikan sekä ei-virusvälitteisen vektorin avulla aikaansaadun $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisään menon ja kaveosomeihin johtavan edosytoosireitin käytettävyyttä ei-virusvälitteisessä lääkekohdennuksessa.

Tutkimustehtävänä oli selvittää:

1. Mitä integriinikasautumalle tapahtuu endosytoosin jälkeen pitkällä aikavälillä ja onko eri solulinjojen välillä eroa?
2. Minkälainen vaikutus liposomiin pakatulla integriinivälitteisesti kohdennetulla doksorubisiinilla on eri solulinjojen soluille?

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Solulinjat

Kokeissa käytettävät solulinjat olivat $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä pysyvästi ilmentävä osteosarkoomasolulinja (SAOS $\alpha 2$ kloonit 45 ja 47; Ivaska ym., 1999), kohdunkaulan syöpäsolulinja (HeLa MZ; Urs Greber, Eläintieteen instituutti, Zürichin yliopisto), aortan sileälihassolulinja (HASMC; Kari Airene, A.I. Virtanen -Instituutti, Kuopion yliopisto) ja napanuoran laskimon endoteelisolulinja (HUVEC; Merja Roivainen, Kansanterveyslaitos, Helsinki). Kaikki käytetyt solulinjat olivat ihmisperäisiä.

SAOS $\alpha 2$ - ja HeLa MZ-soluja kasvatettiin DMEM:ssä (Gibco, Grand Island, USA), johon oli lisätty 0,45 % glukoosi ja 10 mM Hepes, pH 7.4. Ennen käyttöä kasvatusmediumiin lisättiin inaktivoitua FBS:a 10 %:ksi, 2 mM L-glutamiini, 100 IU/ml penisilliini ja 100 μ g/ml streptomysiini (Gibco, Grand Island, USA). Lisäksi HeLa MZ-soluille lisättiin eivälttämättömiä aminohappoja (L-alaniini 8,9 mg/l, L-asparagiini 15 mg/l, L-aspartaatti 13,3 mg/l, L-glutamaatti 14,7 mg/l, glysiini 7,5 mg/l, L-proliini 11,5 mg/l, L-seriini 10,5 mg/l; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). SAOS $\alpha 2$ -solujen viljelyssä käytettiin selektioreagenssina Geneticiniä 0,25 mg/ml (G-418; Gibco, Grand Island, USA).

HASMC-solujen kasvatukseen käytettiin Hepes- ja bikarbonaattipuskuroitua M231 mediumia (Cascade Biologics, Mansfield, UK) johon lisättiin sileälihassoluille tarkoitettua seerumia, kasvutekijöitä ja insuliinia sisältävää SMGS liuosta 20 %:ksi (Cascade Biologics, Mansfield, UK), 2 mM L-glutamiinia, 100 IU/ml penisilliiniä sekä 100 μ g/ml streptomysiiniä.

HUVEC-solujen kasvatukseen käytettiin Roswell Park Memorial Institute 1960 mediumia (RPMI-1960; Gibco, Grand Island, USA), johon lisättiin inaktivoitua FBS:a 10 %:ksi, 2mM L-glutamiinia, 100 IU/ml penisilliinia ja 100 μ g/ml streptomysiiniä. Kaikkia soluja viljeltiin +37 °C lämpökaapissa 5 %:ssa CO₂ pitoisuudessa.

3.2 Mikroskooppiset immunofluoresenssikokeet

3.2.1 Vasta-aineet ja konjugoidut reagenssit

Immunofluoresenssikokeissa käytetyt primaari- ja sekundaarivasta-aineet sekä muut vasta-aineiden tapaan käytetyt konjugoidut reagenssit on lueteltu taulukossa 4. Primaarivasta-aineiden pitkäaikainen säilytys tapahtuu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ja käyttöönoton jälkeen $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Ennen käyttöönottoa kaupallisiin Alexa Fluor-konjugoituihin sekundaarivasta-aineisiin on lisätty 99,5 % glyserolia 1:2 ja muut sekundaarivasta-aineet on jaettu pieniin eriin sellaiseen. Kaikkia sekundaarivasta-aineita säilytetään $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Texas Red-konjugoitu streptavidini on liuotettu steriiliin veteen ja lisätty 99,5 % glyserolia 1:2. Reagenssia säilytetään $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa valolta suojattuna.

TAULUKKO 4. Käytetyt vasta-aineet ja konjugoidut reagenssit.

Vasta-aine tai reagenssi	Laimennos	Lähde / Valmistaja
Primaarivasta-aineet		
Hiiren anti-humaani integriini $\alpha 2$ IgG (A2IIE10, mAb)*	1:200 ^{ab} tai 1:400 ^{ab}	Oma tuotto
Biotiinikonjugoitu hiiren anti-humaani integriini $\alpha 2$ IgG (A2IIE10, mAb)*	1:200 ^{ab} tai 1:400 ^{ab}	Oma tuotto ja konjugointi
Sekundaarivasta-aineet		
Vuohen anti-hiiri IgG, AF555 Highly cross absorbed	1:200 ^a , 1:750 ^b	Molecular Probes, Carlsbad USA
Vuohen anti-hiiri IgG, HRP	1:750 ^b	Bio-Rad Laboratories, Hercules USA
Muut konjugoidut reagenssit		
Streptavidini, Texas Red	1:400 ^b	Vector Laboratories, Burlingame USA

* Eri solulinjoille käytetty eri laimennosta

^a Immunofluoresenssivärijäyksissä käytetty laimennos

^b Kokeissa käytetty laimennos

3.2.2 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasautumiskokeet

SAOS $\alpha 2$ -, HeLa MZ-, HASMC- ja HUVEC-solut siirrostettiin koetta edeltävänä päivänä peitinlaseille 8,8cm²:n maljoille. $\alpha 2\beta 1$ -integriinin soluun sisäänmeno indusoitiin sitomalla solun pinnan $\alpha 2\beta 1$ -integriineihin ensin 1h jäällä keinutuksessa hiiren anti-integriini $\alpha 2$ vasta-aine (A2IIE10, taulukko 4) laimennettuna 750 μ l:aan DMEM:iä (1 % FBS) ja sen jälkeen 1 h jäällä keinutuksessa vuohen anti-hiiri sekundaarivasta-aine (taulukko 4) laimennettuna 1:750 750 μ l:aan DMEM:iä (1 % FBS). Inkubaatioiden välillä solut pestiin kolmesti PBS-puskurilla (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O) johon oli lisätty 0,5 % BSA. Integriini-vasta-ainekasauman sisäänmeno saatiin aikaan lisäämällä maljoille 2 ml esilämmitettyä täydellistä mediumia (10 % FBS) ja siirtämällä maljat +37 °C lämpökaappiin. Integriinin kulkeutumista soluissa seurattiin 2 h, 6 h, 24 h, 48 h ja 72 h aikapisteiden ajan. Aikapisteen kuluttua solut fiksoitiin 4 % paraformaldehydillä 30 minuuttia huoneenlämmössä ja säilytettiin PBS:ssä +4 °C:ssa jatkokäsittelyjä varten.

3.2.3 Konfokaalikuvantaminen, kuvien analysointi ja tilastolliset testit

Näytteet kuvattiin Olympus IX81 -konfokaalimikroskoopilla käyttämällä hyväksi Olympus FLUOVIEW FV1000 -ohjelmaa. Kuvat otettiin 512 x 512 resoluutiolla ULPSAPO 60x objektiivilla (na 1.35). Z suunnassa kuvattaessa leikkeiden paksuus oli 0,30 μ m. Jokainen leike skannattiin kaksi kertaa ja niistä tulleen informaation keskiarvosta muodostui lopullinen optinen leike. Eri kanavilta tulevan informaation sekoittuminen estettiin skannaamalla eri aallonpituudet eri aikaan ”sequential” -toiminnon avulla. Kasautumiskokeissa jokaisesta näytteestä otettiin 15 z-pinoa.

Konfokaalikuvat analysoitiin BioImage XD -ohjelman segmentaatiotoiminnon avulla (Kankaanpää ym., 2006). Ohjelman avulla soluista laskettiin vesikkelien määrä, kokonais-tilavuus ja kokonaisintensiteetti. Segmentaatiotulokset vietiin MS Office Excel -ohjelmaan, jossa laskettiin rakenteiden keskimääräinen lukumäärä, rakenteiden keskimääräinen tilavuus, rakenteiden keskimääräinen kokonaisintensiteetti sekä kunkin em. parametrin keski-

virhe. Näytteille tehtiin kahden riippumattoman otoksen t-testi, jossa eri aikapisteiden tuloksia verrattiin 2 h tuloksiin (HASMC, HeLa MZ ja HUVEC) tai 6 h näytteen tuloksiin (SAOS α 2/45 ja 47). Nollahypoteesina (H_0) oli, että keskiarvoilla ei ole eroa ja vastahypoteesina (H_1), että keskiarvo laskee ajan suhteen. Kustakin testistä saatiin tulokseksi p-arvo, eli todennäköisyys sille, että tehdään virhe kun hylätään H_0 .

3.3 Biokemialliset kokeet

3.3.1 α 2 β 1-integriinikasautuman seuraaminen HRP määrittämisen avulla

SAOS α 2/45 ja 47, HeLa MZ, HASMC ja HUVEC -solut siirrostettiin koetta edeltävänä päivänä soluviljelymaljoille. Osalle näytteistä tehtiin yön yli kestävä esikäsittely, jossa lysosomaalinen hajotus estettiin syöttämällä soluille 50 μ g/ml proteaasi-inhibiittori leupeptiiniä (liuotettu DMSO:iin; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ja kontrollimaljoille samassa suhteessa DMSO:a. Integriinin kasautumiskoe tehtiin kappaleessa 3.2.2. kuvatulla tavalla käyttämällä monoklonaalista hiiren anti-integriini α 2 vasta-ainetta ja sekundaarivasta-aineena piparjuuriperoksidaasilla (HRP, horseradish peroxidase) konjugoitua vuohen anti-hiiri vasta-ainetta (taulukko 4). Negatiivisena kontrollina oli näyte, johon oli sidottu primaarivasta-aine, mutta ei sekundaarivasta-ainetta. Maljoille laitettiin täydellinen medium ja integriini-vasta-ainekasaumaa seurattiin leupeptiinikokeessa 0 h, 2 h ja 6 h ajan ja muuten 0 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48 h ja 72 h ajan. Kaikki muut paitsi negatiivinen kontrolli ja 0 h näyte laitettiin +37 °C:een lämpökaappiin. Jokaisen aikapisteen kuluttua kyseiset solut otettiin jäälle ja hajotettiin jäällä puskurissa (150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ ja 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) johon oli lisätty 100 mM octyl β -D-glucopyranosidi (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Näytteistä määritettiin HRP:n pitoisuus sekä kokonaisproteiinipitoisuus. HRP:n pitoisuus määritettiin reaktioliuoksen (0,05 M NaPO₄, 0,003 % H₂O₂, 0,1 % Triton X-100, 10 mg o-dianisidiini, pH 5.0) aikaansaaman värireaktion avulla. HRP-standardien (1-20 ng/ml) sekä näytteiden absorbanssit mitattiin samanaikaisesti 455 nm:ssa reaktioseosta vastaan. Endo-

geenisen peroksidaasiaktiivisuuden vaikutus huomioitiin vähentämällä tuloksista negatiivisen kontrollin antama HRP-arvo. Kokonaisproteiinipitoisuus määritettiin Bradfordin menetelmällä (Bradford, 1976) Protein Assay värireagenssin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) avulla. BSA-standardien (5-50 µg/ml) sekä näytteiden absorbanssit mitattiin 595 nm:ssä 5 min seisoituksen jälkeen PBS -puskuria vastaan. Tulosten avulla saatiin laskettua HRP:n määrä suhteutettuna näytteen kokonaisproteiinipitoisuuteen.

3.3.2 Doksorubisiinin vaikutusten seuraaminen solumäärän muutosten ja apoptoosin avulla

SAOS α 2 (kloonit 45 ja 47), HeLa MZ, HASMC ja HUVEC -solut siirrostettiin apoptoosikoetta varten 96-kuoppamaljalle (Nalge Nunc International, Rochester, USA). Doksorubisiini vietiin soluihin biotiiniliposomeissa (Arto Urtili, Drug Discovery and Development Technology Center, Helsingin yliopisto) α 2 β 1-integriinikasauman avulla kappaleessa 3.2.2 kuvatulla tavalla biotinyloidun hiiren anti-integriini α 2 vasta-aineen (kloni A2IIE10/biot) ja Texas Red -konjugoidun streptavidiinin avulla (taulukko 4). Biotinyloidut liposomit sidottiin streptavidiniin jäällä keinutuksessa 1 h ajan. Lisäksi doksorubisiini vietiin soluihin biotiiniliposomeissa tai liukoisena (15 µg/ml) suoraan soluviljelymediumiin ilman integriinikohdennusta. Negatiivisena kontrollina olivat pelkät käsittelemättömät solut ja α 2-integriinikasauman avulla sisään viedyllä tyhjillä biotiiniliposomeilla käsitellyt solut.

Liposomit koostuvat HSPC:sta, kolesterolista, distearoyylifosfatidyylietanolamiini-polyetyleeniglykoli₂₀₀₀:sta (DSPE-PEG₂₀₀₀) ja biotinyloidusta distearoyylifosfatidyylietanolamiini-polyetyleeniglykoli₂₀₀₀:sta (DSPE-PEG₂₀₀₀-biotini) moolisuhteissa 2 : 1 : 0,08 : 0,02. Tyhjät biotiiniliposomit ovat kooltaan 110 nm, biotiini-doksorubisiiniliposomit 120 nm ja niiden doksorubisiinipitoisuus on 0,607 mg/ml. Biotiini-doksorubisiiniliposomeilla soluihin viety doksorubisiinipitoisuus oli 15,2 µg/ml.

Doksorubisiinin vaikutuksia seurattiin 2-72 h ajan, minkä jälkeen apoptoosi mitattiin Caspase-Glo® 3/7 (Promega Corporation, Madison, USA) reagenssin avulla luminometrisesti

tai tarkasteltiin solumäärän muutoksia värjäämällä solut kristallivioletilla 30 min +37 °C. Värjätyt 96-kuoppalevyt skannattiin ja näytekuopista sekä tyhjiä kuopista määritettiin keski-intensiteetti ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) -ohjelman avulla. Luminometrisista mittaustuloksista vähennettiin reagenssitaustan määrä. Kristalliviolettikokeessa rinnakkaisista (n=2) mittaustuloksista laskettiin keskiarvot, joista vähennettiin tyhjiä kuopista (n=30) laskettu taustan keski-intensiteetti.

4 TULOKSET

4.1 Integriinikasauma häviää solusta kolmen vuorokauden kuluessa

4.1.1 Rakenteiden lukumäärä, tilavuus ja fluoresenssin intensiteetti

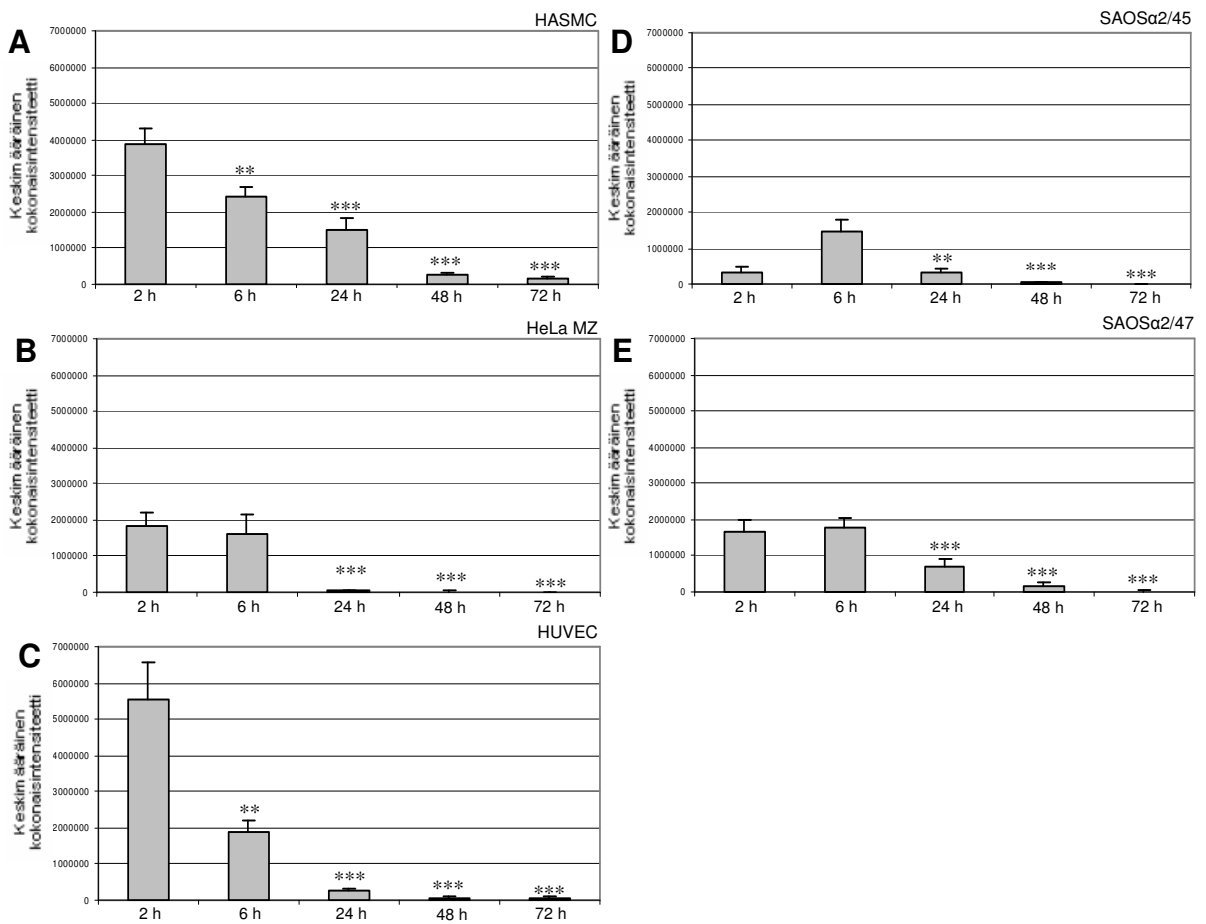
$\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuman intensiteetin muutosta solussa tutkittiin eripituisten aikapisteiden ja konfokaalimikroskopian avulla. Konfokaalimikroskoopilla otetuissa kuvasarjoissa havaitut rakenteet segmentoitiin BioImage XD –ohjelmalla ja tulokseksi saatiin tietoa rakenteiden lukumäärästä, tilavuudesta ja intensiteetistä.

Segmentaatiokokeet tehtiin viidelle solulinjalle. Mukana olivat syöpäsolulinjat kuten osteosarkoomasolut (SAOS $\alpha 2$ kloonit 45 ja 47) ja kohdunkaulan syöpäsolulinja (HeLa MZ). Lisäksi mukana oli aortan sileälihassolulinja (HASMC) ja napanuoran laskimon endoteelisolulinja (HUVEC).

Kokeen tulokset osoittavat, että rakenteiden lukumäärä, kokonaistilavuus ja kokonaisintensiteetti muuttuvat ajan suhteen. Kuviossa 5 on esitetty keskimääräisen kokonaisintensiteetin muutos ja keskivirhe eri soluissa sekä muutoksen tilastollinen merkitsevyys. HASMC, HeLa MZ ja HUVEC –solulinjoissa kokonaisintensiteetti laskee 2 h aikapisteeseen verrattuna (kuvio 5A-C). Kuuden tunnin näytteen ero 2 h näytteeseen on tilastollisesti merkitsevä HASMC ($p=0.007$) ja HUVEC ($p=0.002$) -soluilla. HeLa MZ-soluilla merkitsevä ero nähdään vasta 24 h kohdalla, jolloin ero 2 h aikapisteeseen on tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p=0.00002$).

SAOS $\alpha 2$ (kloonit 45 ja 47) -soluissa integriinikasautuman häviäminen lähtee käyntiin vasta 6 h aikapisteen jälkeen, sillä näissä soluissa kokonaisintensiteetti nousee 2 h aikapisteen jälkeen 6 h aikapisteeseen asti. Nousu on voimakkaampaa kloonissa 45, mutta myös kloonissa 47 nähdään sama ilmiö (kuvio 5D-E). Alkuvaiheen noususta johtuen t-testissä myö-

hempää aikapisteitä verrattiin 2 h aikapisteen sijaan 6 h aikapisteeseen. SAOS α 2/45-soluissa havaittiin tilastollisesti merkitsevä ero 24 h ja 6 h aikapisteen välillä ($p=0.001$). SAOS α 2/47-soluissa ero oli tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p=0.000006$).



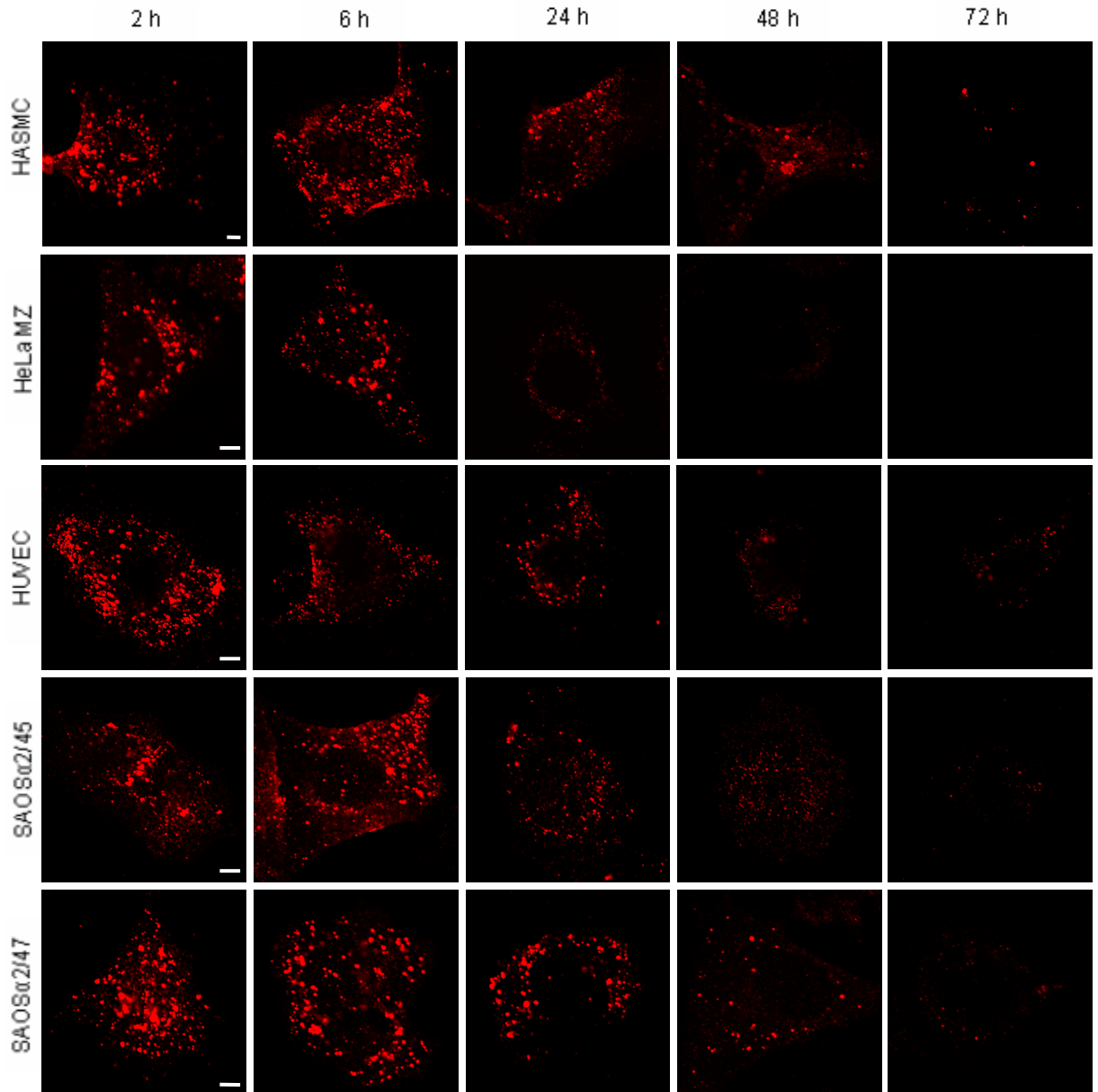
KUVIO 5. Vasta-aineella indusoitujen α 2-integrinikasautumien keskimääräisen kokonaisintensiteetin muutos ajan suhteen viidellä eri solulinjalla. Ero on tilastollisesti merkitsevä kun $p < 0,01$ (**) ja tilastollisesti erittäin merkitsevä kun $p < 0,001$ (***).

Rakenteiden lukumäärää ja tilavuutta tarkastellaan lukumäärien keskiarvon ja kokonaistilavuuksien keskiarvon kautta. Rakenteiden keskimääräinen lukumäärä ja kokonaistilavuus noudattavat samaa suuntausta kokonaisintensiteettitulosten kanssa (taulukko 5). Solulinjojen välillä on eroa rakenteiden määrän ja tilavuuden suhteen, mutta suuntaus on kaikilla solulinjoilla kuitenkin sama, eli rakenteet häviävät ajan myötä.

TAULUKKO 5. Rakenteiden lukumäärän ja kokonaistilavuuden (μm^3) muutos ajan suhteen sekä muutoksen tilastollinen merkitsevyys

	Rakenteiden lukumäärä				Rakenteiden kokonaistilavuus		
	keski-arvo	keski- virhe	p-arvo		keski-arvo	keski- virhe	p-arvo
HASMC							
2h	554.4	94.9			276.0	46.2	
6h	445.6	49.3	0.159		196.2	26.7	0.073
24h	373.4	70.2	0.069		163.6	36.1	0.033 *
48h	72.9	19.9	0.000	***	41.6	19.2	0.000 ***
72h	49.8	18.2	0.000	***	20.3	6.6	0.000 ***
HeLa MZ							
2h	375.3	53.0			46.6	8.4	
6h	231.8	45.1	0.025	*	25.8	6.7	0.033 *
24h	10.7	3.0	0.000	***	1.0	0.4	0.000 ***
48h	2.4	1.9	0.000	***	0.6	0.5	0.000 ***
72h	0.0	0.0	0.000	***	0.0	0.0	0.000 ***
HUVEC							
2h	768.1	92.6			165.0	29.5	
6h	691.5	103.5	0.293		145.6	27.9	0.318
24h	156.6	27.4	0.000	***	32.8	5.8	0.000 ***
48h	30.5	7.2	0.000	***	5.4	1.4	0.000 ***
72h	22.0	3.7	0.000	***	3.2	0.7	0.000 ***
SAOSα2/45							
2h	30.6	7.2			4.8	1.4	
6h	198.9	47.6			26.2	8.5	
24h	61.5	15.0	0.005	**	5.4	1.7	0.011 *
48h	22.5	3.8	0.000	***	1.8	0.4	0.004 **
72h	3.4	0.8	0.000	***	0.4	0.1	0.003 **
SAOSα2/47							
2h	235.8	30.8			45.6	8.6	
6h	246.2	27.0			53.5	10.2	
24h	82.9	14.7	0.000	***	14.2	2.5	0.000 ***
48h	32.3	9.3	0.000	***	6.6	2.6	0.000 ***
72h	5.3	2.0	0.000	***	0.9	0.4	0.000 ***
Tilastollisesti melkein merkitsevä			(0.01 < p < 0.05)	*			
Tilastollisesti merkitsevä			(0.001 < p < 0.01)	**			
Tilastollisesti erittäin merkitsevä			(p < 0.001)	***			

Kuviossa 6 nähdään esimerkkikuvat aikasarjana kunkin solulinjan integriinikasautumista ja niitä ympäröivistä vesikkeleistä. Kuvista nähdään, miten rakenteiden intensiteetti laskee ja itse rakenteet häviävät ajan kuluessa. Solulinjat eroavat toisistaan mm. rakenteiden lukumäärän ja koon osalta, ja mikroskooppikuvista nähtävä suuntaus tukee hyvin kuviossa 5 ja taulukossa 5 esitettyjä tuloksia. Esimerkkinä voidaan todeta, että SAOS α 2/45 ja 47-soluissa rakenteita on aluksi suhteellisen vähän ja niiden koko pienenee merkittävästi ajan suhteen. Rakenteiden häviäminen tapahtuu ensimmäisenä HeLa MZ-soluissa, mutta HUVEC ja HASMC -soluissa rakenteita on alkuvaiheessa niin paljon, ettei kolme vuorokautta todennäköisesti näissä soluissa riitä rakenteiden täydelliseen häviämiseen. Mielenkiintoista on kuitenkin havaita, että rakenteet häviävät täysin tai ainakin lähes täysin syöpäsolulinjoista, kun taas normaalisolulinjoissa häviämä jää keskeneräiseksi (taulukko 5 ja kuvio 6).



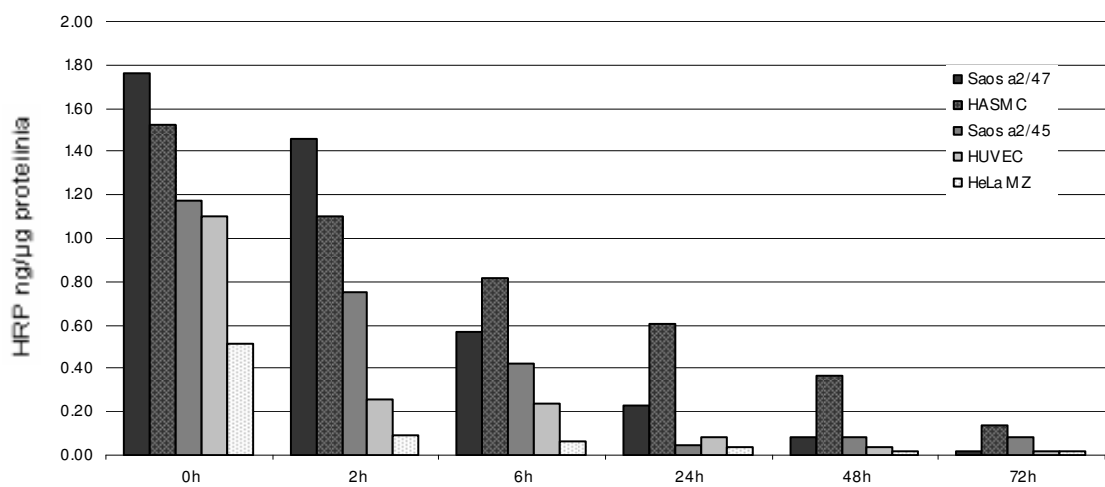
KUVIO 6 Konfokaalimikroskooppikuvasarja α 2 β 1-integriinikasautumista viidellä eri solulinjalla ajan suhteen. Kasautumien häviäminen havaitaan punaisen fluoresenssin heikkenemisenä. Mittajana 5 μ m.

4.1.2 α 2 β 1-integriinikasautuman seuraaminen HRP-määrittysten avulla

α 2 β 1-integriinikasautuman kohtaloa solussa seurattiin segmentaatiokokeiden lisäksi myös biokemiallisesti käyttämällä kasautumiskokeissa hyväksi HRP-konjugoitua vasta-ainetta. Ensimmäinen 0 h aikapiste kuvaa lähtötilannetta, jolloin solun pinnan α 2-integriineihin on sitoutunut HRP-konjugoitu vasta-aine, mutta kasauma ei ole vielä päässyt solun sisään.

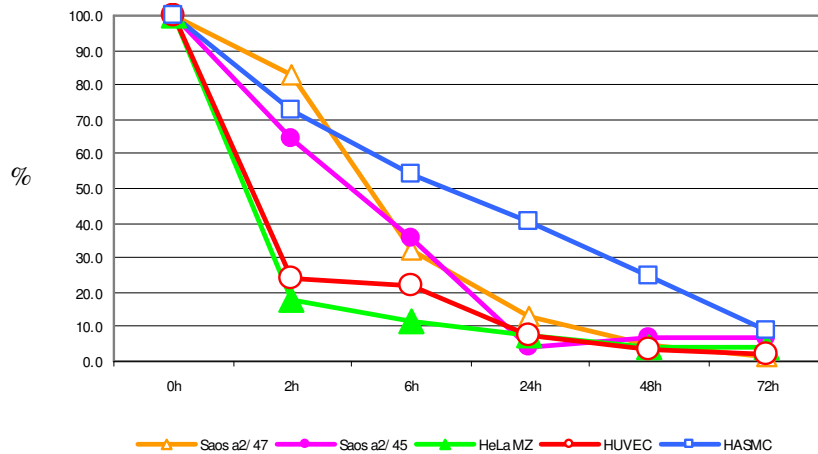
Lisäksi mukana oli negatiivinen kontrolli jonka avulla pystytään näkemään endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden määrä.

Mittaustulosten perusteella voidaan todeta, että kaikilla solulinjoilla HRP:n määrä vähenee kolmessa vuorokaudessa hyvin alhaiselle tasolle. Lisäksi huomataan, että eri solulinjoilla on hyvin erilaiset määrät $\alpha 2\beta 1$ -integriniä. Korkein integriinitaso on integriini $\alpha 2$:a stabiilisti ekspressoivilla SAOS $\alpha 2/47$ -soluilla ja matalin HeLa MZ-soluilla (kuvio 7).



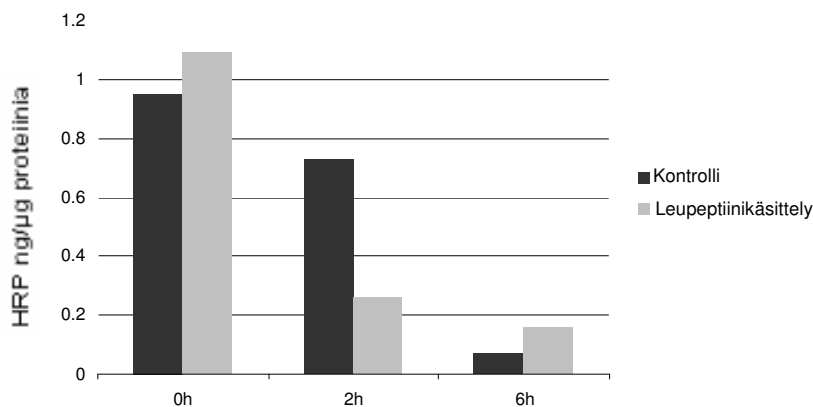
KUVIO 7. HRP:n määrän (ng) muutos proteiinipitoisuutta kohden viidellä eri solulinjalla. Solun pinnan integriini $\alpha 2\beta 1$:n kasautumaa on seurattu HRP konjugoidun vasta-aineen avulla 0-72 h ajan. Mittaukset on tehty kahtena rinnakkaisena, joista on otettu keskiarvo. HRP:n määrä on suhteutettu solun kokonaisproteiinipitoisuuteen, jotta eri aikapisteitä voidaan verrata toisiinsa. Endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden merkitys on huomioitu vähentämällä mittaustuloksista negatiivisen kontrollin antama tausta.

$\alpha 2\beta 1$ -integrinikasautuman prosentuaalinen häviäminen on esitetty kuviossa 8. HeLa MZ ja HUVEC -soluissa integriinin häviämä tapahtuu aikaisemmassa vaiheessa kuin muissa solulinjoissa. HeLa MZ-soluissa 0 h ja 2 h aikapisteiden välinen häviämä on 82 % ja HUVEC-soluissa 76 %. SAOS $\alpha 2/47$ -soluissa suurin prosentuaalinen häviämä tapahtuu 2 h ja 6 h aikapisteiden välillä (51 %) mutta SAOS $\alpha 2/45$ ja HASMC -soluissa häviämä näyttäisi olevan suhteellisen lineaarista. SAOS $\alpha 2-45$ -soluissa integriinitaso saavuttaa pohjalukeman jo 24 h aikapisteen kohdalla.



KUVIO 8. Integriinikasautuman määrän lasku prosentuaalisesti. 0 h aikapisteen tulos on oletettu 100 %:ksi, mistä on laskettu muiden aikapisteen prosentuaalinen jäljellä olevan integriinin määrä.

Integriinikasautuman häviämismekanismeja haluttiin tutkia käsittelemällä SAOS α 2/45-soluja proteaasi-inhibiittori leupeptiinillä ja käyttämällä kasautumiskokeissa HRP-konjugoitua vasta-ainetta. Leupeptiini inhiboi lysosomaalista hajotusta ja jos kasautuma hajotettaisiin lysosomeissa, rikastuisi integriinikasautuma leupeptiinin vaikutuksesta endosomeihin. Tämä nähtäisiin kontrollin kanssa samantasoisena mittaustuloksena. HRP-mittausten perusteella voidaan kuitenkin todeta, ettei inhibiittorilla ole vaikutusta integriinikasautuman häviämiseen (kuvio 9), sillä tuloksista nähdään selvä hajoamisen eteneminen 0-6 h aikana, eikä kyse siten ole lysosomaalisesta hajotuksesta. Tämän kokeen tulokset ovat suuntaa-antavia, sillä koe tehtiin kokeilumielessä vain kerran. Tuloksen varmistaminen vaatii vielä toistoja ja lisäkokeita useammilla proteaasi-inhibiittoreilla.

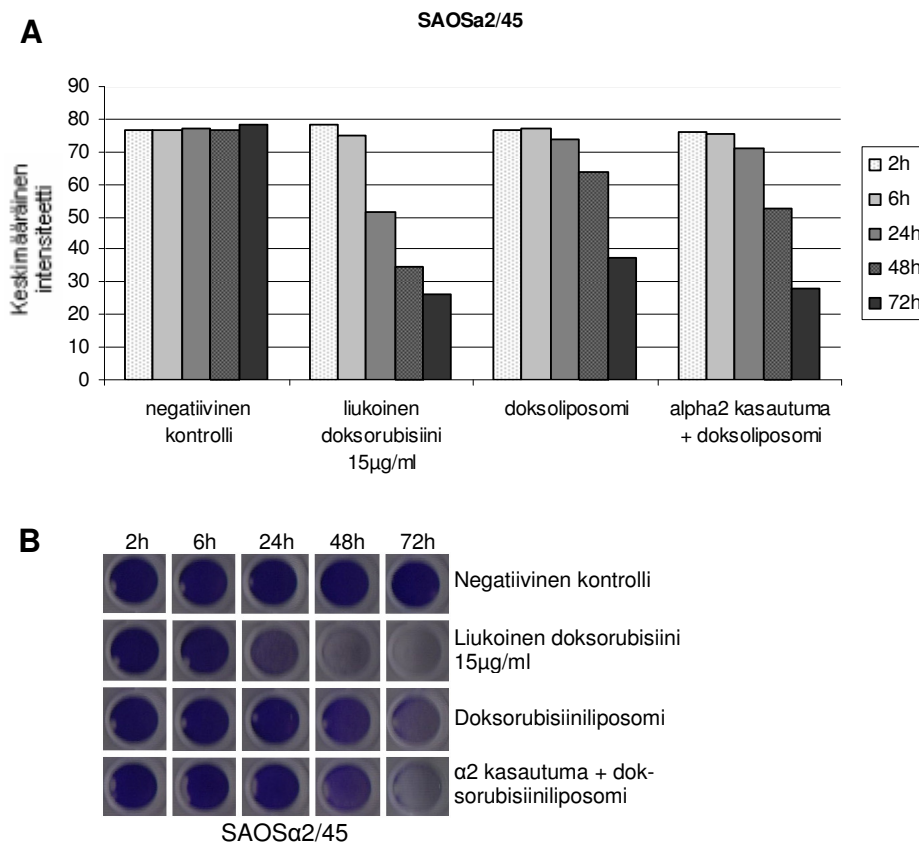


KUVIO 9. Leupeptiinisittelyn vaikutus integriini α 2 kasautuman häviämiseen SAOS α 2/45 soluissa. HRP:n määrä (ng) on suhteutettu kokonaisproteiinipitoisuuteen.

4.2 Liposomivälitteisesti kohdennettu doksorubisiini edistää solukuolemaa

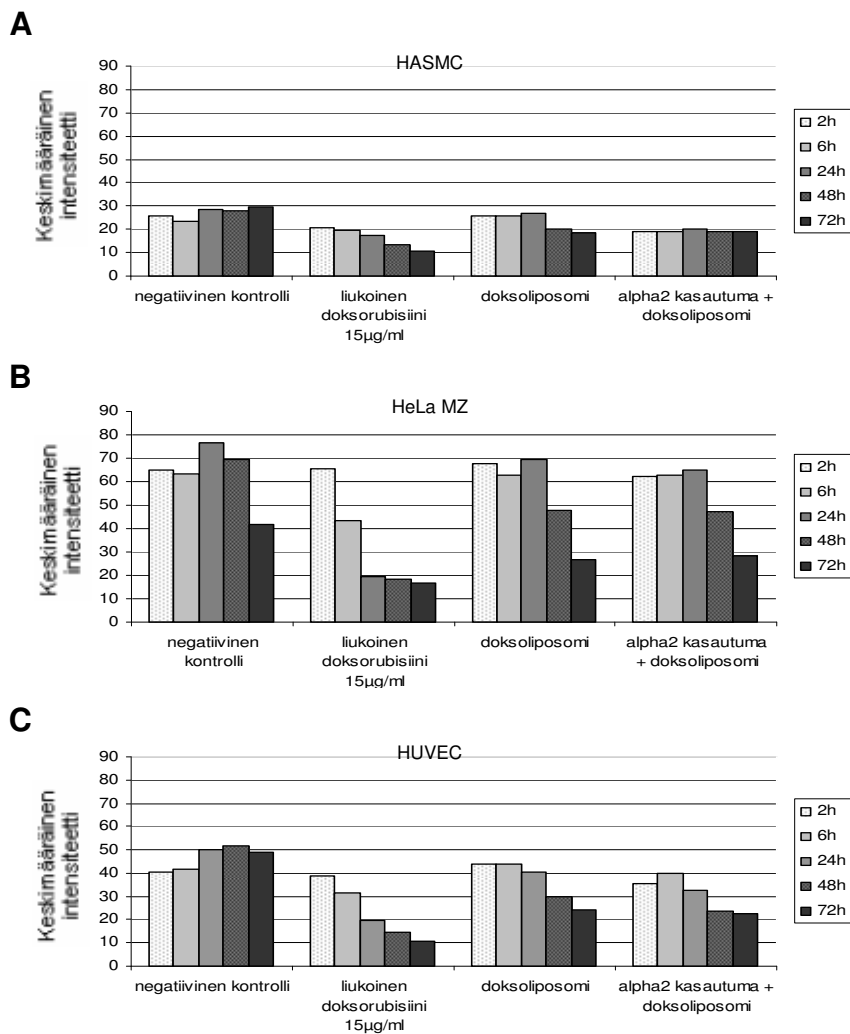
4.2.1 Solumäärän muutokset

Dokсорubisiinin aiheuttamaa solukuolemaa tutkittiin kristalliviolettikokeella, jossa dokсорubisiinia syötettiin soluille biotiinilla päällystetyissä liposomeissa kohdentamattomasti tai kohdennetusti $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuman kautta. Negatiivisena kontrollina näyte, jolle ei tehty dokсорubisiinikäsittelyä.



KUVIO 10. Solumäärän muutokset SAOSa2/45-soluissa 2-72 h aikana. A) Rinnakkaisten (n=2) näytteiden intensiteettien keskiarvot pylväsiagrammina. Keskiarvoista on vähennetty tyhjästä kuopista (n=30) laskettu keskimääräinen taustaintensiteetti. B) Kristalliviolettilla värjätyt solut 96-kuoppamaljan pohjalla. Solumäärän väheneminen näkyy negatiiviseen kontrolliin verrattuna vaaleampana värinä, sillä kuollessaan solut irtoavat kuopan pohjasta.

Liukoisen doksorubisiinin pitoisuus vastaa biotiiniliposomeina annettua doksorubisiinipitoisuutta, mutta tulokset osoittavat, että liukoisen doksorubisiinin vaikutus on kaikilla tutkituilla solulinjoilla liposomaalisen myrkyä vaikutusta nopeampi ja tehokkaampi (kuviot 10 ja 11). Doksorubisiiniliposomien välityksellä tapahtuva solumäärän väheneminen on liukoisen doksorubisiinin vaikutusta maltillisempaa, sillä esimerkiksi SAOS α 2/45-soluissa merkittävä solumäärän väheneminen nähdään vasta 48 h aikapisteen kohdalla, jolloin kohdenneetuista soluista on 2 h aikapisteeseen verrattuna kuollut 31 % ja kohdentamattomista 16 %. Liukoisen doksorubisiinin vaikutus nähdään SAOS α 2/45-soluissa jo 24 h aikapisteen kohdalla, jolloin soluista on kuollut 34 %. Kolmen vuorokauden kohdalla kohdenneetuista soluista on kuollut 63 %, kohdentamattomista 51 % ja liukoiselle doksorubisiinille altistetuista 73 % (kuvio 10A).



KUVIO 11. Solumäärän muutokset A) HASMC C) HeLa MZ ja C) HUVEC -soluissa 2-72 h aikana keskimääräisen intensiteetin suhteen. Tulokset kuuluvat samaan kokeeseen kuviossa 10 esitettyjen tulosten kanssa.

Myös HUVEC -soluissa ilman $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasautumista tehty doksorubisiinin syöttö vaikuttaa vähemmän kuin kasautuman kautta tehty kohdennettu syöttö, jossa solumäärän väheneminen havaitaan aikaisemmin ja kolmen vuorokauden kuluttua soluja on vähemmän jäljellä (kuvio 11C). HASMC-solulinjan solut (kuvio 11A) reagoivat doksorubisiiniin kokeessa mukana olleista solulinjoista heikoimmin. HASMC-linjan solut kasvavat hyvin hitaasti, millä saattaa olla vaikutusta myös myrkyin vaikutuksiin. HeLa MZ-soluissa ei ollut eroa, syötetäänkö doksorubisiiniliposomit suoraan vai kohdennetusti integriinikasautuman kautta. Sen sijaan HeLa MZ-solut olivat mukana olleista solulinjoista herkimpää liukoiselle doksorubisiinille. HeLa MZ-solut jakautuvat nopeasti ja negatiivisesta kontrollista nähdään, että kuoppa on todennäköisesti kasvanut 24 h kohdalla täyteen ja osa soluista on sen jälkeen alkanut kuolla ja irrota kuopasta (kuvio 11B).

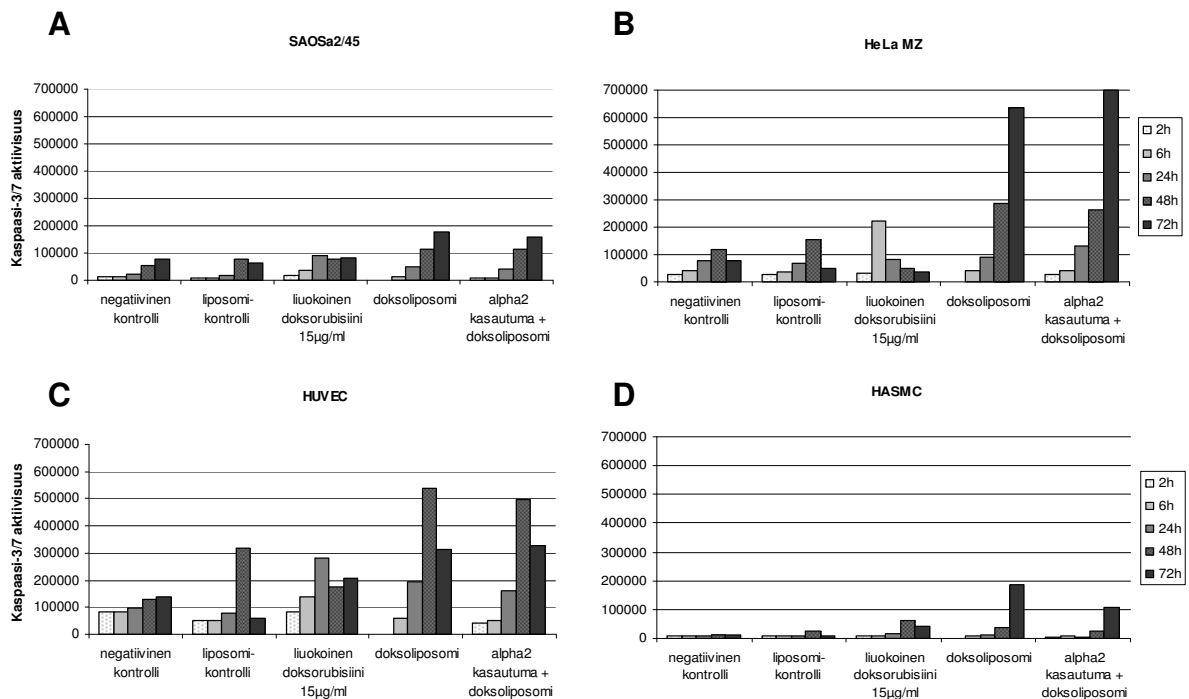
4.2.2 Apoptoosi

Apoptoosia tutkittiin SAOS $\alpha 2/45$, HeLa MZ, HUVEC ja HASMC -soluista mittaamalla kaspasi-3:n ja -7:n aktiivisuutta luminometrisesti. Kokeessa soluille syötettiin kristalliviolettikokeen tavoin doksorubisiinia liukoisena, liposomissa suoraan soluille tai liposomissa $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuman kautta kohdennettuna. Negatiivisena kontrollina olivat käsittelemättömät solut ja liposomikontrollina $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasautuman kautta kohdennetut tyhjät liposomit. Negatiivisesta kontrollista nähdään apoptoottisten merkkiaineiden lähtötaso ja liposomikontrollista liposomisyötön vaikutus apoptoosiin. Kokeen tulokset ovat suuntaa-antavia, sillä koe tehtiin ainoastaan kerran, eikä mukana ollut reagenssin rajallisuuden vuoksi rinnakkaisia näytteitä.

Tuloksista nähdään, että liposomisyötöllä ei ole SAOS $\alpha 2/45$, HeLa MZ ja HASMC -soluissa vaikutusta apoptoosiin, sillä liposomikontrollin taso noudattaa näissä soluissa negatiivisen kontrollin tasoa. HUVEC-solulinjassa liposomisyöttö antaa 48 h kohdalla korkean piikin, mikä saattaa johtua mittausepävarmuudesta, sillä muiden aikapisteiden osalta taso noudattaa negatiivisen kontrollin tasoa (kuvio 12C). Liukoinen doksorubisiini aiheuttaa apoptoosia ja apoptoosimerkkiaineiden taso on korkeimmillaan 6 h (HeLa MZ), 24 h

(SAOS α 2/45, HUVEC) tai 48 h (HASMC) kohdalla, mikä kuvastaa mahdollisesti eri solulinjojen herkkyyttä käytetyille solumyrkylle tai eroavaisuuksia jakautumisnopeudessa.

SAOS α 2/45-soluissa ei näytä olevan eroa, syötetäänkö dokсорubisiini suoraan liposomissa vai integriinikohdennuksen kautta. Molemmissa tapauksissa apoptoosimerkkiaineiden määrä nousee samansuuntaisesti 72 h asti, mutta eroaa silti myöhäisissä aikapisteissä selvästi negatiivisen kontrollin tasosta (kuvio 12A). HUVEC-soluissa näiden kahden menetelmän välillä ei myöskään ole merkittävää eroa. Kahden vuorokauden aikapisteen kohdalla havaitaan epäspesifinen korkea piikki (kuvio 12C), mikä johtuu mittaasepävarmuudesta, sillä liukoinen dokсорubisiini ei aiheuta samankaltaista vastetta.



KUVIO 12. Apoptoosi ajan suhteen A) SAOS α 2/45 B) HeLa MZ C) HUVEC ja D) HASMC –soluissa. Apoptoosin määrä on esitetty kaspasaasi-3:n ja -7:n aktiivisuuden suhteen.

HeLa MZ-soluissa apoptoosin taso nousee SAOS α 2/45-solujen tavoin ja on korkeimmillaan 72 h aikapisteen kohdalla. Erona muihin soluihin nähden voidaan todeta, että HeLa MZ-soluissa kohdennetusti viety dokсорubisiiniliposomi aiheuttaa hieman suuremman

apoptoosivasteen kuin kohdentamaton doksorubisiiniliposomi, vaikka molemmat tavat tuottavatkin näissä soluissa korkean vasteen (kuvio 12B). HASMC-solulinjalla kohdentamaton doksorubisiiniliposomi tuottaa myös hieman korkeamman vasteen kuin integriinikohdennettu liposomi (kuvio 12D). Nämä solut näyttävät reagoivan solumyrkkyyntä suhteellisen myöhään, eli vasta noin kahden vuorokauden jälkeen kun muilla tutkituilla solulinjoilla vaste nähdään jo vuorokautta aikaisemmin.

5 TULOSTEN TARKASTELU

Tutkimustuloksista nousee esille kaksi $\alpha 2\beta 1$ -integriinin käyttöä lääkekohdennuksen reseptorina koskevaa tärkeää näkökohtaa. Tulosten perusteella havaittiin, että vasta-aineiden avulla aikaansaatu $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuma häviää solusta kolmen vuorokauden kuluessa ja että tällä menetelmällä liposomaalisesti kohdennettu doksorubisiini edistää solukuolemaa solumäärän muutosten ja apoptoosin kautta tarkasteltuna.

$\alpha 2\beta 1$ -integriinin häviämää tarkasteltiin mikroskooppisten ja biokemiallisten kokeiden valossa. Mikroskooppisten analyysien mukaan $\alpha 2\beta 1$ -kasautuman sisältävät endosomaaliset rakenteet muuttuvat ajan suhteen niin koon, tilavuuden kuin fluoresenssin kokonaisintensiteetinkin osalta. Koska nämä kolme parametria noudattavat samaa linjaa, voidaan todeta, että rakenteiden lukumäärä, koko ja intensiteetti ovat HASMC, HeLa MZ ja HUVEC -soluissa korkeimmillaan kahden tunnin kohdalla, pian kasautuman endosytoosin jälkeen. SAOS-soluissa sen sijaan rakenteiden koon, lukumäärän ja intensiteetin huippu tavoitetaan vasta kuuden tunnin kohdalla, mikä kuvastaa sitä, että nämä solut ovat mahdollisesti herkempiä solusierroituksen aiheuttamalle stressille mutta myös sitä, että näissä soluissa $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuman endosytoosi on kenties muita soluja hitaampi prosessi.

Solulinjojen välillä havaittiin eroa myös endosomaalisten vesikkelien kokoonpanoissa. Eri-laisiin tehtäviin erikoistuneilla tai syöpäsoluiksi muuntuneilla soluilla on luonnollisesti myös erilainen endosomaalisten vesikkelien morfologia. Eri solulinjojen vesikkelikokoonpanot eroavat toisistaan mm. rakenteiden lukumäärän, koon ja muodon osalta. SAOS-soluissa vesikkeleitä on muihin solulinjoihin verrattuna vähän, kun taas sileillä lihassoluilla (HASMC) ja endoteelisoluilla (HUVEC) vesikkelien muoto on aikaisissa aikapisteissä hyvinkin monimuotoinen. HASMC ja HUVEC -soluilla $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautuman häviäminen jää lisäksi keskeneräiseksi, eikä kolme vuorokautta riitä integriinin edes lähes täydelliseen häviämiseen. Tämä johtuu todennäköisesti siitä tosiasiasta, että näillä soluilla rakenteita on alkuvaiheessa niin paljon, ettei niiden muihin linjoihin verrattavissa oleva häviäminen ole kolmen vuorokauden aikana fysiologisesti mahdollista. HASMC-soluilla häviämisen hitaus voi lisäksi johtua siitä, että tällä solulinjalla on muita soluja hitaampi solu-

sykli ja/tai proteiinien hajoituskoneisto. Muilla solulinjoilla (HeLa MZ ja SAOS) integriinikasautumat häviävät kolmen vuorokauden aikana käytännössä täysin ja HeLa MZ-soluilla integriini häviää olemattomiin jo kahden vuorokauden jälkeen. Muihin linjoihin verrattuna HeLa MZ-soluilla on erittäin nopea solusykli ja tämä solulinja saavuttanee siksi integriinin täydellisen häviämisen nopeimmin.

Solulinjojen erot endosomaalisten rakenteiden maksimimäärässä juontavat juurensa solujen eroihin integriinin ilmentymisessä. HRP-mittausten avulla nähtiin eri solujen integriinitaso lähtötilanteessa (0 h) ja endosytoosin jälkeen aina kolmeen vuorokauteen asti (kuvio 7), sillä mittaustulokset on suhteutettu kokonaisproteiinipitoisuuteen. Biokemiallisesti mitattu integriinikasautuman väheneminen ja lopulta häviäminen tukee mikroskooppisia tuloksia. Lisäksi saatiin selville, että endosytoosin jälkeen suurimmat $\alpha 2\beta 1$ -integriinitasot löytyvät SAOS $\alpha 2/47$, SAOS $\alpha 2/45$ ja HASMC –soluista ja alhaisimmat HUVEC ja HeLa MZ –soluista.

Lysosomaalisen hajotuksen mahdollisuus integriinikasautuman häviämisessä poissuljettiin alustavasti proteaasi-inhibiittorikäsittelyn avulla. Tulokset osoittavat, ettei integriinikasautuma kerääntynyt endosomeihin, eikä tällä inhibiittorilla näin ole vaikutusta $\alpha 2\beta 1$ -integriinin häviämisprosessissa. Lysosomaalisen hajotuksen poissulkeva koe jättää häviämismekanismien vaihtoehdoksi mm. reseptorin kierrätyksen takaisin solukalvolle tai reseptorin hajottamisen jollain muulla mekanismilla, kuten esimerkiksi kalpaiini-proteaseilla, joiden tiedetään voivan hajottaa integriinien sytoplasmisia domeeneja (Pfaff ym., 1999) ja säätelevän mm. integriinivälitteistä signalointia (Bialkowska ym., 2000). Näiden alustavien havaintojen varmistaminen vaatii jatkossa lisätutkimuksia useammilla proteaasi-inhibiittoreilla.

$\alpha 2\beta 1$ -integriinin käyttöä lääkekohdennuksessa tarkasteltiin solumäärän muutosten ja apoptoosimittausten avulla. Liposomiin pakattavaksi lääkeaineeksi valittiin solumyrkky, koska sen aiheuttama vaste, eli solukuolema, pystytään havaitsemaan niin visuaalisesti kuin apoptoosinkin kautta. Käytetty solumyrkky, doksorubisiini, on suoraan soluille annettuna myrkyllinen ja se voi pahimmillaan aiheuttaa potilaan kuoleman (Lefrak ym., 1973). Tästä syystä on aiheellista etsiä uusia menetelmiä lääkeaineen turvallisen käytön takaamiseksi.

Liposomiin pakatun doksorubisiinin vaikutuksia soluille tarkasteltiin kohdentamalla liposomi $\alpha 2\beta 1$ -integroinikasautuman välityksellä tai syöttämällä liposomit soluille kohdentamattomana. Kohdentamattomana liposomien voidaan olettaa päätyvän solussa lysosomaaliseen hajotukseen johtavalle reitille ja kohdennettuna integroinispesifiselle, kaveosomeihin johtavalle neutraalille reitille (Karjalainen ym., 2008 *painossa*) Liposomiin pakattu doksorubisiini aiheutti kaikilla tutkituilla solulinjoilla solumäärän vähenemistä, mutta se oli liukoisien doksorubisiinin vaikutusta hillitympää. $\alpha 2\beta 1$ -integroinikasautuman kautta kohdennetun ja kohdentamattoman liposomisyötön välillä ei nähty missään solulinjassa mullistavaa eroa, mutta voidaan kuitenkin todeta, että SAOS $\alpha 2/45$ ja HUVEC –soluilla $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin kohdennettu doksorubisiiniliposomi aiheutti kohdentamattomaan verrattuna hieman enemmän solukuolemaa.

Apoptosimittaukset tukevat suurelta osin kristalliviolettikokeen tuloksia, eli suurta eroa kohdennetun ja kohdentamattoman syöttötavan välillä ei havaittu mutta kaikilla solulinjoilla nähtiin kontroleihin verrattuna selvä apoptoosin nousu. Kristalliviolettikokeen tuloksissa on mukana myös nekroosin osuus ja lisäksi on otettava huomioon, että apoptosimittaukset suoritettiin ainoastaan kerran, mikä lisää mittausepävarmuutta, eikä mittaustulosten pienille eroille voida siitä syystä antaa kovin suurta painoarvoa. Solulinjojen välisten vain pienten erojen vuoksi on todettava, että doksorubisiiniliposomit kulkeutuvat soluun yhtä hyvin $\alpha 2\beta 1$ -integroinin välityksellä kohdennettuna kuin kohdentamattomanakin. Klatrinivälitteinen endosytoosi on nopea prosessi (Parker ja Parrish, 2000), mikä voi osaltaan selittää kohdentamattoman reitin tehokkuutta. Toisaalta tuloksista voidaan päätellä, että koska doksorubisiiniliposomit aiheuttavat solukuolemaa ja apoptoosia myös kohdentamattomana, liposomin sisältämä myrkky vapautuu mitä todennäköisimmin sytoplasmaan ennen lysosomiin päätymistä, mahdollisesti eri reittien yhtymisen kautta.

Koska integroinireitti näyttää poikkeavan lysosomaalisesta reitistä, lääkkeiden ohjautuminen ei-lysosomaaliselle ja neutraalimmalle reitille voi antaa lisäarvoa eri sovellutuksissa. Zuhorn ym. (2007) ovat tutkineet adheesioreseptoreiden käyttöä geeniterapiareseptoreina. Tutkimusten mukaan $\beta 1$ -integroini voi toimia liposomien ns. luonnollisena reseptorina ja välittää siten vektorin sisäänottoa (Zuhorn ym., 2007b). $\beta 1$ -integroini esiintyy $\alpha 2$ -integroinin ohella heterodimeerinä $\alpha 1$ -, $\alpha 6$ -, $\alpha 3$ -, αv - ja $\alpha 5$ -integroinien kanssa (Hodivala-

Dilke ym., 2003). Kohdentamaton doksorubisiiniliposomi saattaa päätyä solun sisään käyttäen reseptorinaan $\beta 1$ -integriiniä, mutta mikään ei myöskään poissulje sitä mahdollisuutta, ettei $\alpha 2\beta 1$ -integriinikasautumaan kohdennettujen liposomien lisäksi soluun kulkeutuisi liposomeja myös $\beta 1$ -integriinin välityksellä jolloin ne päätyisivät kasautuman ansiosta kaeosomeihin johtavalle neutraalille reitille.

HeLa MZ-solujen apoptoosituloksesta (kuvio 12B) voidaan arvella, että hitaampien reittien tehokkuus saattaisi tulla hitaammin jakautuvilla soluilla paremmin näkyviin vasta kolmen vuorokauden jälkeen. HeLa MZ-solut jakautuvat muita soluja nopeammin, ja niissä $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin kohdennettu liposomisyöttö tuottaa muihin soluihin verrattuna selkeämmän apoptoosivasteen jo kolmessa vuorokaudessa. Koska muut tulokset noudattavat solulinjojen välillä samaa suuntausta, voitaisiin olettaa, että myös tässä tapauksessa solumyrkyn vaikutus tulisi paremmin näkyviin pidemmän ajan kuluttua.

Tämän tutkimuksen tulokset osoittavat $\alpha 2\beta 1$ -integriinin olevan käyttökelpoinen lääkehoidon reseptori. Kohdennetuilla vektoreilla aikaansaatiiin positiivinen vaste, jossa liposomiin pakattu solumyrkky aiheutti solumäärän vähenemistä. Tutkimustuloksista nousi myös uusia tutkimustarpeita. Pitkällä aikavälillä tarkasteltuna huomattiin, että $\alpha 2\beta 1$ -integriini häviää solulinjasta riippuen noin kolmessa vuorokaudessa. Häviämistä selvitettiin inhibiittorikokeilla, joiden perusteella voitiin alustavasti poissulkea lysosomaalinen hajotus, mutta varsinainen mekanismi jäi edelleen selvittämättä. Tämä havainto on mielenkiintoinen mm. solubiologisen perustutkimuksen kannalta ja integriinikasautuman vaiheiden tutkiminen tulee jatkossa valaisemaan myös $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kautta tehtävää lääkekohdennusta sekä antamaan lisätietoa reittiin liittyvistä rakenteista.

LÄHTEET

- Albelda, S.M. 1993. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab.Invest.* 68:4-17.
- Allen, T.M., E. Brandeis, C.B. Hansen, G.Y. Kao ja S. Zalipsky. 1995. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 1237:99-108.
- Alton, E.W., M. Stern, R. Farley, A. Jaffe, S.L. Chadwick, J. Phillips, J. Davies, S.N. Smith, J. Browning, M.G. Davies, M.E. Hodson, S.R. Durham, D. Li, P.K. Jeffery, M. Scallan, R. Balfour, S.J. Eastman, S.H. Cheng, A.E. Smith, D. Meeker ja D.M. Geddes. 1999. Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet.* 353:947-954.
- Anderson, R.G., B.A. Kamen, K.G. Rothberg ja S.W. Lacey. 1992. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science.* 255:410-411.
- Anton, I.M., S.P. Saville, M.J. Byrne, C. Curcio, N. Ramesh, J.H. Hartwig ja R.S. Geha. 2003. WIP participates in actin reorganization and ruffle formation induced by PDGF. *J.Cell.Sci.* 116:2443-2451.
- Araki, N., M.T. Johnson ja J.A. Swanson. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J.Cell Biol.* 135:1249-1260.
- Arcamone, F., G. Franceschi, S. Penco ja A. Selva. 1969. Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. *Tetrahedron Lett.* 13:1007-1010.
- Benmerah, A. ja C. Lamaze. 2007. Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic.* 8:970-982.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond ja G.J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-366.
- Bialkowska, K., S. Kulkarni, X. Du, D.E. Goll, T.C. Saido ja J.E. Fox. 2000. Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active. *J.Cell Biol.* 151:685-696.
- Boado, R.J. 2005. RNA interference and nonviral targeted gene therapy of experimental brain cancer. *NeuroRx.* 2:139-150.
- Boll, W., I. Rapoport, C. Brunner, Y. Modis, S. Prehn ja T. Kirchhausen. 2002. The mu2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 binds to FDNPVY and YppO sorting signals at distinct sites. *Traffic.* 3:590-600.

- Botos, E., J. Klumperman, V. Oorschot, B. Igyarto, A. Magyar, M. Olah ja A.L. Kiss. 2007. Caveolin-1 is transported to multivesicular bodies after albumin-induced endocytosis of caveolae in HepG2 cells. *J.Cell.Mol.Med.*
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix ja J.P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:7297-7301.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.
- Cho, K.C., S.H. Kim, J.H. Jeong ja T.G. Park. 2005. Folate receptor-mediated gene delivery using folate-poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) conjugate. *Macromol.Biosci.* 5:512-519.
- Cohen, A.W., R. Hnasko, W. Schubert ja M.P. Lisanti. 2004. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol.Rev.* 84:1341-1379.
- Conner, S.D. ja S.L. Schmid. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- Coster, H.G. 1965. A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through". *Biophys.J.* 5:669-686.
- Cunningham, S., Q.H. Meng, N. Klein, R.J. McAnulty ja S.L. Hart. 2002. Evaluation of a porcine model for pulmonary gene transfer using a novel synthetic vector. *J.Gene Med.* 4:438-446.
- Cusack, J.C.,Jr ja K.K. Tanabe. 2002. Introduction to cancer gene therapy. *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* 11:497-519, v.
- Danko, I. ja J.A. Wolff. 1994. Direct gene transfer into muscle. *Vaccine.* 12:1499-1502.
- Davies, P.F. ja R. Ross. 1978. Mediation of pinocytosis in cultured arterial smooth muscle and endothelial cells by platelet-derived growth factor. *J.Cell Biol.* 79:663-671.
- Dingwall, C., I. Ernberg, M.J. Gait, S.M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A.D. Lowe, M. Singh, M.A. Skinner ja R. Valerio. 1989. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:6925-6929.
- Dizhe, E.B., B.N. Akifiev, B.V. Missul, S.V. Orlov, O.V. Kidgotko, V.E. Sukonina, A.D. Denisenko ja A.P. Perevozchikov. 2001. Receptor-mediated transfer of DNA--galactosylated poly-L-lysine complexes into mammalian cells in vitro and in vivo. *Biochemistry (Mosc).* 66:55-61.
- Donis-Keller, H. 1979. Site specific enzymatic cleavage of RNA. *Nucleic Acids Res.* 7:179-192.

- D'Souza-Schorey, C., E. van Donselaar, V.W. Hsu, C. Yang, P.D. Stahl ja P.J. Peters. 1998. ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *J.Cell Biol.* 140:603-616.
- Dupree, P., R.G. Parton, G. Raposo, T.V. Kurzchalia ja K. Simons. 1993. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J.* 12:1597-1605.
- Edelstein, M.L., M.R. Abedi ja J. Wixon. 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J.Gene Med.* 9:833-842.
- Edelstein, M.L., M.R. Abedi, J. Wixon ja R.M. Edelstein. 2004. Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J.Gene Med.* 6:597-602.
- El-Aneed, A. 2004. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J.Control.Release.* 94:1-14.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel ja T. Tuschl. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
- Elices, M.J. ja M.E. Hemler. 1989. The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:9906-9910.
- Elliott, G. ja P. O'Hare. 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell.* 88:223-233.
- Elonen, E. 2001. Kasvainten kemoterapia. In Farmakologia ja toksikologia. Koulu, M. Tuomisto, J., editor. Medicina, Kuopio.
- Fawell, S., J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky ja J. Barsoum. 1994. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:664-668.
- Ferrari, A., V. Pellegrini, C. Arcangeli, A. Fittipaldi, M. Giacca ja F. Beltram. 2003. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol.Ther.* 8:284-294.
- Flaherty, K.T., S.B. Malkowicz ja D.J. Vaughn. 2004. Phase I study of weekly liposome-encapsulated doxorubicin in patients with advanced, androgen-independent prostate cancer. *Am.J.Clin.Oncol.* 27:136-139.
- Flotte, T.R. 2007. Gene therapy: the first two decades and the current state-of-the-art. *J.Cell.Physiol.* 213:301-305.
- Frankel, A.D. ja C.O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 55:1189-1193.
- Gall, W.E., M.A. Higginbotham, C. Chen, M.F. Ingram, D.M. Cyr ja T.R. Graham. 2000. The auxilin-like phosphoprotein Swa2p is required for clathrin function in yeast. *Curr.Biol.* 10:1349-1358.

- Gluck, S.L. 1993. The vacuolar H(+)-ATPases: versatile proton pumps participating in constitutive and specialized functions of eukaryotic cells. *Int.Rev.Cytol.* 137C:105-137.
- Goodman, O.B., Jr ja J.H. Keen. 1995. The alpha chain of the AP-2 adaptor is a clathrin binding subunit. *J.Biol.Chem.* 270:23768-23773.
- Grimmer, S., B. van Deurs ja K. Sandvig. 2002. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J.Cell.Sci.* 115:2953-2962.
- Gruenberg, J. ja F.G. van der Goot. 2006. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7:495-504.
- Haigler, H.T., J.A. McKanna ja S. Cohen. 1979. Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *J.Cell Biol.* 83:82-90.
- Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach ja G.J. Hannon. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404:293-296.
- Hansen, C.B., G.Y. Kao, E.H. Moase, S. Zalipsky ja T.M. Allen. 1995. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochim.Biophys.Acta.* 1239:133-144.
- He, L., L.K. Pappan, D.G. Grenache, Z. Li, D.M. Tollefsen, S.A. Santoro ja M.M. Zutter. 2003. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood.* 102:3652-3657.
- He, Y.K., V.W. Lui, J. Baar, L. Wang, M. Shurin, C. Almonte, S.C. Watkins ja L. Huang. 1998. Potentiation of E7 antisense RNA-induced antitumor immunity by co-delivery of IL-12 gene in HPV16 DNA-positive mouse tumor. *Gene Ther.* 5:1462-1471.
- Higgins, M.K. ja H.T. McMahon. 2002. Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem.Sci.* 27:257-263.
- Hinshaw, J.E. ja S.L. Schmid. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* 374:190-192.
- Hodivala-Dilke, K.M., A.R. Reynolds ja L.E. Reynolds. 2003. Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell Tissue Res.* 314:131-144.
- Hsu, W.L., H.L. Chen, W. Liou, H.K. Lin ja W.L. Liu. 2005. Mesomorphic complexes of DNA with the mixtures of a cationic surfactant and a neutral lipid. *Langmuir.* 21:9426-9431.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Hynes, R.O. ja A.D. Lander. 1992. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell.* 68:303-322.

- Igarashi, S., Y. Hattori ja Y. Maitani. 2006. Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome. *J.Control.Release.* 112:362-368.
- 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.
- Janat, M.F., W.S. Argraves ja G. Liau. 1992. Regulation of vascular smooth muscle cell integrin expression by transforming growth factor beta1 and by platelet-derived growth factor-BB. *J.Cell.Physiol.* 151:588-595.
- Kakudo, T., S. Chaki, S. Futaki, I. Nakase, K. Akaji, T. Kawakami, K. Maruyama, H. Kamiya ja H. Harashima. 2004. Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry.* 43:5618-5628.
- Kanaseki, T. ja K. Kadota. 1969. The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J.Cell Biol.* 42:202-220.
- Kankaanpää, P., K. Pahajoki, V. Marjomäki, J. Heino ja D. White. 2006. BioImageXD - free open source software for analysis, processing and 3D rendering of multi dimensional microscopy images. Versio: beta-r1269.
- Karjalainen, M., Kakkonen, E., Upla, P., Paloranta, H., Kankaanpää, P., Liberali, P., Renkema, 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. *Molecular Biology of the Cell. Painossa.*
- Kawahara, K., A. Sekiguchi, E. Kiyoki, T. Ueda, K. Shimamura, Y. Kurosaki, S. Miyaoka, H. Okabe, M. Miyajima ja J. Kimura. 2003. Effect of TRX-liposomes size on their prolonged circulation in rats. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo).* 51:336-338.
- Kawakami, S., Y. Hattori, Y. Lu, Y. Higuchi, F. Yamashita ja M. Hashida. 2004. Effect of cationic charge on receptor-mediated transfection using mannosylated cationic liposome/plasmid DNA complexes following the intravenous administration in mice. *Pharmazie.* 59:405-408.
- Khalil, I.A., K. Kogure, H. Akita ja H. Harashima. 2006. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol.Rev.* 58:32-45.
- Khalil, I.A., K. Kogure, S. Futaki ja H. Harashima. 2007. Octaarginine-modified liposomes: Enhanced cellular uptake and controlled intracellular trafficking. *Int.J.Pharm.*
- Kichler, A. 2004. Gene transfer with modified polyethylenimines. *J.Gene Med.* 6 Suppl 1:S3-10.
- Kichler, A., C. Leborgne, E. Coeytaux ja O. Danos. 2001. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J.Gene Med.* 3:135-144.

- Kirby, C., J. Clarke ja G. Gregoriadis. 1980. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem.J.* 186:591-598.
- Kirchhausen, T. ja S.C. Harrison. 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell.* 23:755-761.
- Kirkham, M. ja R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim.Biophys.Acta.* 1745:273-286.
- Klein, T.M., R. Arentzen, P.A. Lewis ja S. Fitzpatrick-McElligott. 1992. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology (N.Y).* 10:286-291.
- Klemm, A.R., D. Young ja J.B. Lloyd. 1998. Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem.Pharmacol.* 56:41-46.
- Laitinen, O.H., K.J. Airene, J.K. Raty, T. Wirth ja S. Yla-Herttuala. 2005. Avidin Fusion Protein Strategies in Targeted Drug and Gene Delivery. *Letters in Drug Design & Discovery.* 2:124.
- Lefrak, E.A., J. Pitha, S. Rosenheim ja J.A. Gottlieb. 1973. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer.* 32:302-314.
- Li, S., R. Seitz ja M.P. Lisanti. 1996. Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J.Biol.Chem.* 271:3863-3868.
- Liguori, L., B. Marques, A. Villegas-Mendez, R. Rothe ja J.L. Lenormand. 2007. Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. *J.Control.Release.*
- Maitani, Y., S. Igarashi, M. Sato ja Y. Hattori. 2007. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression. *Int.J.Pharm.* 342:33-39.
- 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.
- Marsh, M. ja A. Helenius. 2006. Virus entry: open sesame. *Cell.* 124:729-740.
- Martinez, J. ja T. Tuschl. 2004. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* 18:975-980.
- Mayor, S. ja R.E. Pagano. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:603-612.
- McIntosh, D.P., X.Y. Tan, P. Oh ja J.E. Schnitzer. 2002. Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis in vivo: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:1996-2001.

Meier, O., K. Boucke, S.V. Hammer, S. Keller, R.P. Stidwill, S. Hemmi ja U.F. Greber. 2002. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J.Cell Biol.* 158:1119-1131.

Meier, O. ja U.F. Greber. 2004. Adenovirus endocytosis. *J.Gene Med.* 6 Suppl 1:S152-63.

Meng, Q.H., W. Jamal, S.L. Hart ja J.R. McEwan. 2006. Application to vascular adventitia of a nonviral vector for TIMP-1 gene therapy to prevent intimal hyperplasia. *Hum.Gene Ther.* 17:717-727.

Merdan, T., J. Kopecek ja T. Kissel. 2002. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 54:715-758.

Mettlen, M., A. Platek, P. Van Der Smissen, S. Carpentier, M. Amyere, L. Lanzetti, P. de Diesbach, D. Tyteca ja P.J. Courtoy. 2006. Src triggers circular ruffling and macropinocytosis at the apical surface of polarized MDCK cells. *Traffic.* 7:589-603.

Mizutani, H., S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, M. Kojima ja S. Kawanishi. 2005. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 76:1439-1453.

Moffatt, S., S. Wiehle ja R.J. Cristiano. 2005. Tumor-specific gene delivery mediated by a novel peptide-polyethylenimine-DNA polyplex targeting aminopeptidase N/CD13. *Hum.Gene Ther.* 16:57-67.

Molas, M., A.G. Gomez-Valades, A. Vidal-Alabro, M. Miguel-Turu, J. Bermudez, R. Bartrons ja J.C. Perales. 2003. Receptor-mediated gene transfer vectors: progress towards genetic pharmaceuticals. *Curr.Gene Ther.* 3:468-485.

Monier, S., R.G. Parton, F. Vogel, J. Behlke, A. Henske ja T.V. Kurzchalia. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol.Biol.Cell.* 6:911-927.

Nallamothe, R., G.C. Wood, C.B. Pattillo, R.C. Scott, M.F. Kiani, B.M. Moore ja L.A. Thoma. 2006. A tumor vasculature targeted liposome delivery system for combretastatin A4: design, characterization ja in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech.* 7:E32.

Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang ja P.H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841-845.

Niidome, T. ja L. Huang. 2002. Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* 9:1647-1652.

Nobes, C.D. ja A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.

Norbury, C.C., B.J. Chambers, A.R. Prescott, H.G. Ljunggren ja C. Watts. 1997. Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I

presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 27:280-288.

Norkin, L.C. ja D. Kuksin. 2005. The caveolae-mediated sv40 entry pathway bypasses the golgi complex en route to the endoplasmic reticulum. *Viol.J.* 2:38.

O'Brien, J. ja S.C. Lummis. 2002. An improved method of preparing microcarriers for biolistic transfection. *Brain Res.Brain Res.Protoc.* 10:12-15.

Okura, Y., A. Miyakoshi, K. Kohyama, I.K. Park, M. Staufenbiel ja Y. Matsumoto. 2006. Nonviral Abeta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: long-term effects and safety. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103:9619-9624.

O'Neill, M.M., C.A. Kennedy, R.W. Barton ja R.J. Tatake. 2001. Receptor-mediated gene delivery to human peripheral blood mononuclear cells using anti-CD3 antibody coupled to polyethylenimine. *Gene Ther.* 8:362-368.

Parker, J.S. ja C.R. Parrish. 2000. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J.Virol.* 74:1919-1930.

Pearse, B.M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J.Mol.Biol.* 97:93-98.

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.

Pelkmans, L., D. Puntener ja A. Helenius. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 296:535-539.

Peters, P.J., V.W. Hsu, C.E. Ooi, D. Finazzi, S.B. Teal, V. Oorschot, J.G. Donaldson ja R.D. Klausner. 1995. Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J.Cell Biol.* 128:1003-1017.

Pfaff, M., X. Du ja M.H. Ginsberg. 1999. Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *FEBS Lett.* 460:17-22.

Pietiäinen, V., V. Marjomäki, P. Upla, L. Pelkmans, A. Helenius ja T. Hyypiä. 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II ja signaling events. *Mol.Biol.Cell.* 15:4911-4925.

Pinto Reis, C., R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro ja F. Veiga. 2006. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2:53.

Plow, E.F. ja M.H. Ginsberg. 1989. Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog.Hemost.Thromb.* 9:117-156.

- Prud'homme, G.J. ja Y. Chang. 1999. Prevention of autoimmune diabetes by intramuscular gene therapy with a nonviral vector encoding an interferon-gamma receptor/IgG1 fusion protein. *Gene Ther.* 6:771-777.
- Racoosin, E.L. ja J.A. Swanson. 1993. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J.Cell Biol.* 121:1011-1020.
- Rathore, S.S. ja P.C. Ghosh. 2008. Effect of surface charge and density of distearylphosphatidylethanolamine-mPEG-2000 (DSPE-mPEG-2000) on the cytotoxicity of liposome-entrapped ricin: Effect of lysosomotropic agents. *Int.J.Pharm.* 350:79-94.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann ja A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-410.
- Rols, M.P., J.M. Bachaud, P. Giraud, C. Chevreau, H. Roche ja J. Teissie. 2000. Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 10:468-474.
- Roth, D.A., N.E. Tawa Jr, J.M. O'Brien, D.A. Treco, R.F. Selden ja Factor VIII Transkaryotic Therapy Study Group. 2001. Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A. *N.Engl.J.Med.* 344:1735-1742.
- Rothman, J.E. ja S.L. Schmid. 1986. Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell.* 46:5-9.
- Rudolph, C., J. Lausier, S. Naundorf, R.H. Muller ja J. Rosenecker. 2000. In vivo gene delivery to the lung using polyethylenimine and fractured polyamidoamine dendrimers. *J.Gene Med.* 2:269-278.
- Santala, P. ja J. Heino. 1991. Regulation of integrin-type cell adhesion receptors by cytokines. *J.Biol.Chem.* 266:23505-23509.
- Schafer, D.A., C. D'Souza-Schorey ja J.A. Cooper. 2000. Actin assembly at membranes controlled by ARF6. *Traffic.* 1:892-903.
- Schaffer, D.V., N.A. Fidelman, N. Dan ja D.A. Lauffenburger. 2000. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol.Bioeng.* 67:598-606.
- Schatzlein, A.G., B.H. Zinselmeyer, A. Elouzi, C. Dufes, Y.T. Chim, C.J. Roberts, M.C. Davies, A. Munro, A.I. Gray ja I.F. Uchegbu. 2005. Preferential liver gene expression with polypropylenimine dendrimers. *J.Control.Release.* 101:247-258.
- Sebestyen, M.G., J.O. Hegge, M.A. Noble, D.L. Lewis, H. Herweijer ja J.A. Wolff. 2007. Progress toward a nonviral gene therapy protocol for the treatment of anemia. *Hum.Gene Ther.* 18:269-285.
- Semple, S.C., A. Chonn ja P.R. Cullis. 1996. Influence of cholesterol on the association of plasma proteins with liposomes. *Biochemistry.* 35:2521-2525.

- Senger, D.R., C.A. Perruzzi, M. Streit, V.E. Kotliansky, A.R. de Fougerolles ja M. Detmar. 2002. The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am.J.Pathol.* 160:195-204.
- Serikawa, T., N. Suzuki, H. Kikuchi, K. Tanaka ja T. Kitagawa. 2000. A new cationic liposome for efficient gene delivery with serum into cultured human cells: a quantitative analysis using two independent fluorescent probes. *Biochim.Biophys.Acta.* 1467:419-430.
- Shajahan, A.N., B.K. Timblin, R. Sandoval, C. Tirupathi, A.B. Malik ja R.D. Minshall. 2004. Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 279:20392-20400.
- Sheff, D.R., E.A. Daro, M. Hull ja I. Mellman. 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J.Cell Biol.* 145:123-139.
- Singal, P.K. ja N. Iliskovic. 1998. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N.Engl.J.Med.* 339:900-905.
- Skinner, M.P., E.W. Raines ja R. Ross. 1994. Dynamic expression of alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin receptors by human vascular smooth muscle cells. Alpha 2 beta 1 integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am.J.Pathol.* 145:1070-1081.
- Sobolev, A.S., A.A. Rosenkranz, O.A. Smirnova, V.A. Nikitin, G.L. Neugodova, B.S. Naroditsky, I.N. Shilov, I.N. Shatski ja L.K. Ernst. 1998. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. *J.Biol.Chem.* 273:7928-7933.
- Swanson, J.A. 1989. Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J.Cell.Sci.* 94 (Pt 1):135-142.
- Swanson, J.A. ja C. Watts. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424-428.
- Takei, K. ja V. Haucke. 2001. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* 11:385-391.
- Temming, K., R.M. Schiffelers, G. Molema ja R.J. Kok. 2005. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat.* 8:381-402.
- Torchilin, V.P., V.G. Omelyanenko, M.I. Papisov, A.A. Bogdanov Jr, V.S. Trubetskoy, J.N. Herron ja C.A. Gentry. 1994. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim.Biophys.Acta.* 1195:11-20.
- Ungewickell, E. ja D. Branton. 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature.* 289:420-422.
- 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.

Van Dyke, R.W. 1996. Acidification of lysosomes and endosomes. *Subcell.Biochem.* 27:331-360.

Varga, C.M., T.J. Wickham ja D.A. Lauffenburger. 2000. Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: insights from molecular mechanisms for improved vehicle design. *Biotechnol.Bioeng.* 70:593-605.

Veithen, A., P. Cupers, P. Baudhuin ja P.J. Courtoy. 1996. v-Src induces constitutive macropinocytosis in rat fibroblasts. *J.Cell.Sci.* 109 (Pt 8):2005-2012.

Venkatesan, N., J. Yoshimitsu, Y. Ito, N. Shibata ja K. Takada. 2005. Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials.* 26:7154-7163.

Vives, E., P. Brodin ja B. Lebleu. 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J.Biol.Chem.* 272:16010-16017.

Wadhwa, M.S., W.T. Collard, R.C. Adami, D.L. McKenzie ja K.G. Rice. 1997. Peptide-mediated gene delivery: influence of peptide structure on gene expression. *Bioconjug.Chem.* 8:81-88.

Wadia, J.S., R.V. Stan ja S.F. Dowdy. 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat.Med.* 10:310-315.

Wagner, E. 1999. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 38:279-289.

Wang, S., E.A. Konorev, S. Kotamraju, J. Joseph, S. Kalivendi ja B. Kalyanaraman. 2004. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. intermediacy of H(2)O(2)- and p53-dependent pathways. *J.Biol.Chem.* 279:25535-25543.

West, M.A., M.S. Bretscher ja C. Watts. 1989. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J.Cell Biol.* 109:2731-2739.

West, M.A., A.R. Prescott, E.L. Eskelinen, A.J. Ridley ja C. Watts. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr.Biol.* 10:839-848.

Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani ja P.L. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247:1465-1468.

Wu, G.Y. ja C.H. Wu. 1987. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J.Biol.Chem.* 262:4429-4432.

- Xing, L., M. Huhtala, V. Pietiäinen, J. Kapyła, 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.
- Yagi, K., H. Noda, M. Kurono ja N. Ohishi. 1993. Efficient gene transfer with less cytotoxicity by means of cationic multilamellar liposomes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 196:1042-1048.
- Yang, N.S., J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell ja D. McCabe. 1990. In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:9568-9572.
- Zamecnik, P.C. ja M.L. Stephenson. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75:280-284.
- Zavaleta, C.L., W.T. Phillips, A. Soundararajan ja B.A. Goins. 2007. Use of avidin/biotin-liposome system for enhanced peritoneal drug delivery in an ovarian cancer model. *Int.J.Pharm.* 337:316-328.
- Zhang, B., Y.H. Koh, R.B. Beckstead, V. Budnik, B. Ganetzky ja H.J. Bellen. 1998. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron.* 21:1465-1475.
- Zhang, G., V. Gurtu, T.H. Smith, P. Nelson ja S.R. Kain. 1997. A cationic lipid for rapid and efficient delivery of plasmid DNA into mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 236:126-129.
- Zhou, X. ja L. Huang. 1994. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim.Biophys.Acta.* 1189:195-203.
- Zuhorn, I.S., J.B. Engberts ja D. Hoekstra. 2007a. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur.Biophys.J.* 36:349-362.
- Zuhorn, I.S., D. Kalicharan, G.T. Robillard ja D. Hoekstra. 2007b. Adhesion receptors mediate efficient non-viral gene delivery. *Mol.Ther.* 15:946-953.
- .

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

A

A, ampere
μA, microampere(s)
mA, milliampere(s)
Å, angstrom (10⁻¹⁰ m)
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
DMEM, 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 (beta-aminoethylether)-*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
FAK, focal adhesion kinase F-actin, filamentous actin
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
 RNase, ribonuclease
 RNP, ribonucleoprotein
 rpm, revolutions per minute
 RT, room temperature
 RT-PCR, reverse transcription PCR

S

s, seconds(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