

**Endosomin sisäisen ioniympäristön vaikutukset
Echovirus 1-infektioon**

Pro gradu -tutkielma

Katri Kallio

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solubiologian osasto

Lokakuu 2009

ALKUSANAT

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella, solubiologian osastolla syksyn 2008 ja syksyn 2009 välisenä aikana.

Tutkielmani ohjaajana toimi FT Dos. Varpu Marjomäki, jota haluan kiittää erittäin mielenkiintoisesta tutkimusaiheesta sekä inspiroivasta ja motivoivasta ohjauksesta. Iso kiitos myös koko tutkimusryhmälle, jonka kaikki jäsenet auttoivat ja neuvoivat parhaan kykynsä mukaan niin laboratoriossa kuin tulosten analysointivaiheessa. Kiitokset Arja Mansikkaviitalle käytännön neuvoista liittyen laboratoriotyöhän, Raija Vassiselle elektronimikroskooppinäytteiden valmistamisesta sekä Johanna Peltolalle gradun oikoluvusta. Suurin kiitos kotijoukoille kärsivällisyydestä, tuesta ja kannustuksesta.

Jyväskylässä

9.10.2009

Katri Kallio

Tekijä: Katri Kallio
Tutkielman nimi: Endosomin sisäisen ioniympäristön vaikutukset Echovirus 1-infektioon
English title: Investigating the role of internal ion environment of endosomes on Echovirus 1 infection
Päivämäärä: 9.10.2009 **Sivumäärä:** 62 + 2
Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t): FT Varpu Marjomäki

Tiivistelmä:

Endosytoosi on jatkuvasti soluissa tapahtuvaa molekyylien ja yhdisteiden kuljetusta solun sisään. Endosytoosi jaetaan karkeasti kahteen luokkaan: fagosytoosiin, jossa solu ottaa sisäänsä suuria partikkeleita sekä pinosytoosiin, jossa solu ottaa sisäänsä nestettä ja siihen liuenneita yhdisteitä. Monet virukset ovat oppineet hyödyntämään solun endosytoosireittejä infektoidessaan soluja, minkä vuoksi niitä käytetäänkin paljon endosytoosireittien tutkimiseen. Endosytoottiset vesikkelit usein happamoituvat kypsyessään ja niiden sisäinen pH on soluliman pH:ta alhaisempi. Solunsisäisten rakenteiden ja soluliman väliset pH-erot ovat välttämättömiä solun normaalille toiminnalle. Endosomien hapan pH osallistuu soluissa mm. lysosomaaliseen hajotukseen, ligandien irrotukseen reseptoreista sekä proteiinien muokkaukseen.

Echovirus 1 (EV1) on pieni, vaipaton, pikornaviruksiin kuuluva RNA-virus, joka käyttää reseptorinaan solukalvon $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä. $\alpha 2\beta 1$ -integriineillä on soluissa monia luonnollisia ligandeja, kuten kollageeni, joiden kanssa EV1 joutuu kilpailemaan sitoutumispaikoista. Sitoutuessaan integriiniin EV1 saa aikaan niiden kasautumisen yhteen solukalvolla, mitä seuraa virus-reseptori-kompleksin kulkeutuminen solun sisään makropinosytoosia muistuttavan reitin kautta. Solulimassa viruksen sisältävään rakenteeseen muodostuu sisävesikkeleitä, minkä jälkeen syntynyt monivesikkelinen rakenne ilmeisesti yhdistyy soluliman kaveosomien kanssa.

Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää EV1 aikaansaamien $\alpha 2$ -monivesikkelisten rakenteiden sisäinen pH ja siinä tapahtuvat muutokset infektion edetessä. EV1:n lisäksi selvitimme myös EIPA:n ja monensiinin vaikutukset monivesikkelisten rakenteen sisäiseen happamuuteen. Tämän lisäksi testasimme monensiinin vaikutusta viruksen infektiokykyyn. EV1:n, EIPA:n ja monensiinin vaikutusta rakenteen happamuuteen tutkittiin liittämällä $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin sekä pH-vakaa että pH-herkkä fluoresoiva sekundaarivasta-aine ja tarkastelemalla vasta-aineiden intensiteettien suhdetta ja suhteiden muutoksia konfokaalimikroskoopin avulla.

Tulokset osoittivat $\alpha 2$ -monivesikkelisten rakenteen pH:n pysyttelevän lähellä neutraalia rakenteen kypsymisen aikana. EV1 aiheutti rakenteen hetkellisen happamoitumisen infektion alkuvaiheessa, mutta myös viruksen läsnä ollessa rakenteen pH pysyi lähellä neutraalia. EIPA sekä monensiini aiheuttivat molemmat $\alpha 2$ -monivesikkelisten rakenteen lievän alkaloitumisen. Monensiinin havaittiin alentavan EV1-infektiota, varsinkin infektion varhaisissa vaiheissa, mutta sen ei havaittu vaikuttavan itse rakenteen morfologiaan.

Avainsanat: pH, echovirus 1, $\alpha 2\beta 1$ -integriini

Author: Katri Kallio
Title of thesis: Investigating the role of internal ion environment of endosomes on Echovirus 1 infection
Finnish title: Endosomin sisäisen ioniympäristön vaikutukset Echovirus 1 infekioon
Date: 9.10.2009 **Pages:** 62 + 2

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): PhD Varpu Marjomäki

Abstract:

Endocytosis is continuous uptake of molecules and compounds into the cell. Endocytosis can be divided into two distinct categories: phagocytosis used by cell to internalize large particles and pinocytosis which is used to intake liquids and soluble substances. A great variety of viruses has learned to utilize endocytotic routes infecting cells and therefore those viruses are used as a tool for studying endocytosis. Endocytic vesicles usually acidify during maturation achieving much lower pH than ambient cytoplasm. pH differences between cells internal structures and cytoplasm are essential for cells normal functions. Acid interior of endosomes is involved with lysosomal degradation of molecules, dissociation of ligands from receptors and modification of proteins.

Echovirus 1 (EV1) is small non-enveloped RNA virus which belongs to the *Picornaviridae* family. EV1 uses $\alpha 2\beta 1$ -integrin as its receptor on the cell surface and competes in binding with $\alpha 2\beta 1$ -integrin's natural ligands like collagen. EV1 binding causes clustering of integrins which is followed by EV1 and integrin uptake into the cells via macropinocytosis-like route. EV1 containing structures mature into multivesicular bodies and presumably fuse with pre-existing caveosomes in cytoplasm.

The purpose of this research was to measure the pH values of $\alpha 2$ -multivesicular bodies during EV1 internalization and to found out if there are some changes in pH during infection. In addition to EV1 we also observed the impact of EIPA and monensin on the pH values of the $\alpha 2$ -multivesicular bodies. We also tested the impacts of monensin on infectivity of EV1. pH measurements were performed attaching similar amounts of pH-sensitive conjugate together with pH-insensitive conjugate on $\alpha 2\beta 1$ -integrins to give us ratio of intensities to measure along internalization. Live cells were observed with confocal microscopy.

The results show that pH values of $\alpha 2$ -multivesicular bodies stay near neutral during structure maturation. EV1 causes short acidification in early stages of infection but overall structures pH stays close to neutral. Both EIPA and monensin raised the pH values of $\alpha 2$ -multivesicular bodies. Monensin caused partial inhibition of infection especially in early stages of infection but it did not cause any changes in morphology of $\alpha 2$ -multivesicular bodies.

Keywords: pH, echovirus 1, $\alpha 2\beta 1$ -integrin

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	8
1.1	Endosytoosi.....	8
1.1.1	Klatriinivälitteinen endosytoosi.....	10
1.1.2	Klatriinista riippumattomat endosytoosireitit.....	11
1.1.2.1	Kaveolivälitteinen endosytoosi.....	13
1.1.2.2	Fagosytoosi.....	14
1.1.2.3	Makropinosytoosi.....	16
1.2	Endosomaalinen pH-gradientti.....	18
1.2.1	pH:n säätely ja ylläpitäminen.....	19
1.2.1.1	V-typin H ⁺ -ATPaasit.....	19
1.2.1.2	V-ATPaasit ja sähkökemiallinen potentiaali.....	21
1.2.1.3	Kloridien kuljetus.....	22
1.2.1.4	Na ⁺ /K ⁺ -ATPaasit.....	24
1.2.1.5	Na ⁺ /H ⁺ -vaihtajat.....	25
1.2.2	Endosomien sisäisen happamuuden mittaaminen.....	25
1.2.3	Happamuuden vaikutus vaipattomien virusten avautumiseen.....	27
1.3	Echovirus 1.....	28
1.3.1	Pikornavirukset.....	28
1.3.2	Echovirus käyttää α2β1-integriniä reseptorinaan.....	29
1.3.3	Echovirus 1:n kulkeutuminen soluun.....	30
1.3.4	EV1:n käyttämä endosytoosireitti on vielä osittain tuntematon.....	32
1.3.5	Kalpaiinit ovat välttämättömiä EV1:n replikaatiolle.....	33
2	TUTKIMUKSEN TARKOITUS	35
3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	36
3.1	Solut, virukset ja vasta-aineet.....	36
3.2	pH-mittaus: α2-MVB.....	37
3.3	pH-mittaus: klatriinivälitteisen reitin endosomit.....	38
3.4	EV1-infektio-mittaus.....	39
3.5	Elektronimikroskopia.....	40

3.6	Tilastollinen analysointi.....	41
4	TULOKSET	42
4.1	α 2-MVB-rakenteiden pH-arvon mittaaminen.....	42
4.2	EIPA:n ja monensiinin vaikutus α 2-MVB-rakenteiden pH-arvoon	44
4.3	Klatriinireitin endosomien happamuuden mittaaminen.....	46
4.4	Monensiinin vaikutus EV1-infektiotehokkuuteen	47
4.5	Elektronimikroskopia.....	49
5	TULOSTEN TARKASTELU	51
5.1	pH-arvon mittaamiseen käytettävän menetelmän kehittäminen.....	51
5.2	Monensiini heikentää EV1-infektiotehokkuutta.....	55
	LÄHTEET	57
	LIITE (1 KPL)	

Lyhenteet

AP180	Adaptoriproteiini 180
Arf6	ADP-ribosylaatiotekijä 6 (engl. ADP-ribosylation factor 6)
CALM	(engl. clathrin-assembly lymphoid myeloid leukaemia protein)
CLIC	Klatriinista riippumattomat vesikkelit (engl. clathrin-independent carrier)
CtBP/BARS	(engl. C-terminal-binding protein/brefeldin A-ADP ribosylated substrate)
DAMP	(engl. 3[2,4-dinitroanilino]-3'-amino-N-methyl dipropylamine)
EIPA	5-[N-etyyli-N-isopropyli]amiloridi
EV1	Echovirus 1
GPI	Glykosyylifosfatidyli-inositoli (engl. glycosylphosphatidylinositol)
GPI-AP	GPI-ankkuroituja proteiineja (engl. GPI-anchored proteins)
GEEC	GPI-rikkaat endosomaaliset rakenteet (engl. GPI enriched endosomal compartments)
GMK	Viherapinan munuaissolulinja (engl. green monkey kidney cells)
LAMP-1	(engl. lysosomal-associated membrane protein 1)
MIDAS	Metalli-ionista riippuvainen ligandin sitoutumskohta (engl. metal ion-dependent adhesion site)
MVB	Monivesikkelinen rakenne (engl. multivesicular body)
NHE	Na ⁺ /H ⁺ - vaihtaja (engl. sodium-proton exchanger)
PAK	p21-aktivoituneet kinaasit (engl. p21-activated kinases)
PI3K	Fosfoinositidi 3-kinaasi (engl. phosphoinositide 3-kinase)
RAVE	(engl. regulator of the (H ⁺)-ATPase of the vacuolar and endosomal membranes)
SAOS	ihmisen luusyöpäsolulinja (engl. human osteosarcoma cells)
V-ATPaasi	V-tyyppin H ⁺ -ATPaasi (engl. vacuolar type H ⁺ -ATPase; V-ATPase)
VLA-2	(engl. very late antigen complex-2)
VSV	Vesicular stomatitis virus

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

1 JOHDANTO

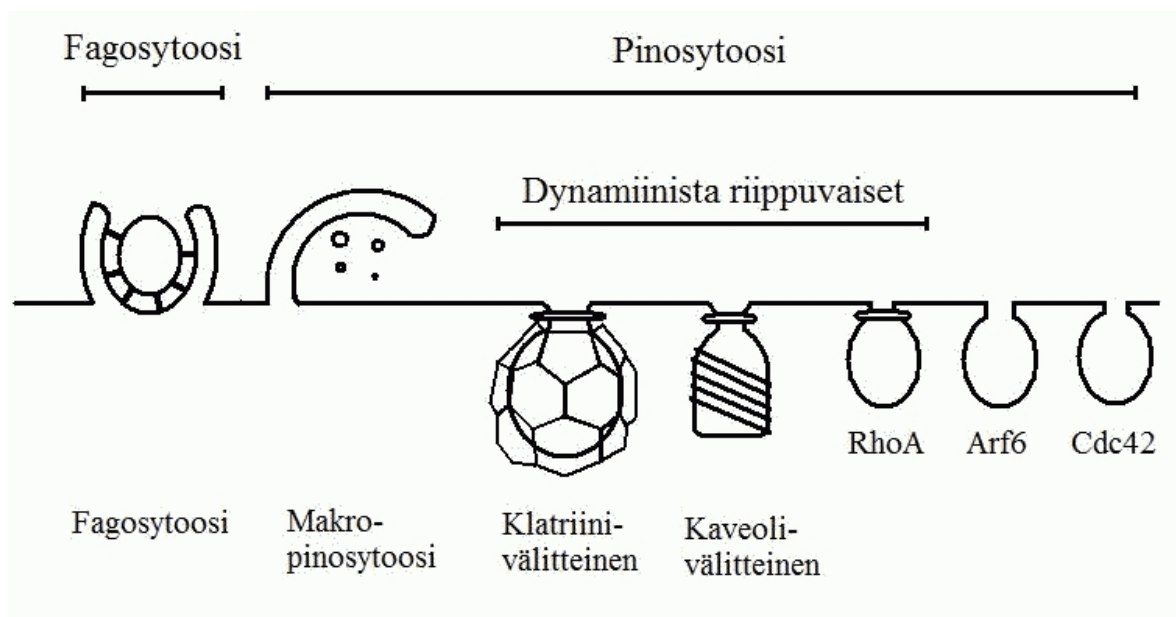
1.1 Endosytoosi

Solut ovat solukalvon rajaamia toiminnallisia yksiköitä, jotka jatkuvasti kuljettavat yhdisteitä solun sisään ja solusta ulos. Jatkuva yhdisteiden kuljetus lipideistä ja proteiineista koostuvan dynaamisen kaksoiskalvon läpi on edellytys solun elämälle. Valikoivasti läpäisevän kaksoiskalvon ansiosta solut erottuvat ympäristöstään ja kykenevät ylläpitämään yksilöllistä yhdisteiden, makromolekyylien ja soluelinten kokoelmaa sisällään. Solukalvon lipidien muodostama hydrofobinen kerros estää lähes täysin polaaristen yhdisteiden ja epäorgaanisten ionien kulkeutumisen kalvon läpi, mutta sallii pienten varauksettomien molekyylien liikkua vapaasti kalvon läpi. Solukalvon avulla solut pystyvät tehokkaasti kontrolloimaan aineiden kuljetusta solun ja sen ympäristön välillä.

Solut ovat kehittäneet monia tapoja välttämättömien yhdisteiden kuten ravinteiden kuljettamiseen ympäristöstä solun sisään. Pienet molekyylit ja ionit kuljetetaan erilaisia kanavia pitkin tai kuljettajaproteiinien avustamina. Suurten makromolekyylien ja partikkeleiden sisäänottoon käytetään solukalvosta muodostettavia kuljetusvesikkeleitä. Kuljetusvesikkeleiden avulla tapahtuvaa aineiden kuljettamista soluun kutsutaan endosytoosiksi (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Soluista on tunnistettu useita erilaisia endosytoosireittejä ja ne jaetaan usein kahteen ryhmään, fagosytoosiin ja pinosytoosiin (ks. yleiskatsaukset Conner ja Schmid, 2003; Mayor ja Pagano, 2007). Fagosytoosi on reseptorivälitteinen reaktio, jossa solu ottaa sisäänsä suuria partikkeleita kuten bakteereita, mutta siihen pystyvät useimmiten vain erikoistuneet nisäkässolut. Fagosytoosista poiketen pinosytoosiin kykenevät kaikki solutyypit. Pinosytoosi on solua ympäröivän nesteen ja siihen liuenneiden yhdisteiden sisään ottamista (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Pinosytoosireitit voivat olla reseptorivälitteisiä tai vähemmän valikoivia, tasaisesti jatkuvia tapahtumia (ks. yleiskatsaus Mayor ja Pagano, 2007). Pinosytoosireittejä ovat mm. parhaiten tunnettu klatriinivälitteinen endosytoosi sekä klatriinista riippumattomat endosytoosireitit kuten kaveolivälitteinen endosytoosi ja makropinosytoosi (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Fagosytoosi ja pinosytoosi johtavat soluissa usein sisään otettujen yhdisteiden kuljetukseen happamiin lysosomeihin,

joissa yhdisteet hajotetaan solun tarvitsemiksi ravinteiksi ja rakennusaineiksi (ks. yleiskatsaus Mellman ja Warren, 2000) (Kuva 1).

Endosytoosi ei kuitenkaan aina toimi solun edun mukaisesti, sillä monet infektiiviset virukset ovat evoluution myötä oppineet hyödyntämään tätä hienostunutta koneistoa infektoidessaan soluja. Viruksen kannalta endosytoosi on tehokas ja turvallinen tapa tunkeutua soluun suojassa solun luonnollisilta immuunipuolustusreaktioilta. Tarttuessaan solun pinnan spesifiseen reseptoriin virus usein käynnistää solussa vasteen, jonka seurauksena virus pääsee solun muodostaman endosytoottisen vesikkelin sisään. Vesikkelin suojassa virus kulkeutuu turvallisesti solun sisäosiin ja tulee usein altistetuksi optimaalisille olosuhteille avautumisensa sekä monistumisensa kannalta vesikkeleiden luonnollisen kypsymisen myötä. Tästä virusten ilmiömaisesta kyvystä johtuen viruksia on hyödynnetty paljon endosytoottisten reittien tutkimisessa (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2003).



Kuva 1. Solujen yleisimmät endosytoosireitit. Fagotsytoosia ja makropinosytoosia käytetään suurien partikkeleiden sisäänottoon kun taas liukoisten yhdisteiden sisäänottoon käytetään klatriini- tai kaveolivälitteistä endosytoosireittiä tai RhoA, Arf6 tai Cdc42 säädeltyjä reittejä (Mukaiilu artikkelista (Conner ja Schmid, 2003))

1.1.1 Klatriinivälitteinen endosytoosi

Klatriinivälitteinen endosytoosi on soluissa jatkuvasti tapahtuvaa yhdisteiden kuljettamista soluun. Klatriinivälitteinen endosytoosi osallistuu soluissa mm. solujen väliseen kommunikointiin kudosten ja elinten kehityksen aikana, signaalireittien säätelyyn, homeostasian ylläpitämiseen sekä hermosolujen signalointiin (ks. yleiskatsaus De Camilli ja Takei, 1996; Di Fiore ja De Camilli, 2001; McMahon, 1999; Seto ym., 2002). Klatriinivälitteinen endosytoosi on merkittävin mekanismi, jota solut käyttävät solukalvon reseptoreiden valikoivaan kuljetukseen solun sisään (ks. yleiskatsaukset Conner ja Schmid, 2003; Ungewickell ja Hinrichsen, 2007). Klatriinivälitteisen endosytoosin avulla solut voivat myös säädellä erilaisten pumppujen ja kanavien määriä solukalvolla ottamalla niitä tarvittaessa solun sisään (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Monet virukset, kuten ihmisen hepatiitti C virus, ovat oppineet hyödyntämään klatriinivälitteistä endosytoosia infektoidessaan soluja (Blanchard ym., 2006).

Klatriinivuoraus rakentuu monista proteiini-komponenteista, joista merkittävimmät ovat klatriini ja adaptoriproteiini-2. Klatriini on kolmihaarainen kolmesta raskaasta (190 kDa) ja kolmesta kevyestä (27 kDa) polypeptidiketjusta muodostunut proteiini, jolla on useita toiminnallisesti eriytyneitä alueita (ks. yleiskatsaukset Edeling ym., 2006; Mousavi ym., 2004). Klatriinivuorauksen muodostuessa klatriinimolekyylit ovat vuorovaikutuksessa sekä toisten klatriinimolekyyliden että adapteri- ja avustajaproteiinien kanssa. Adapteriproteiini-2 on suuri, neljästä alayksiköstä (α , β_2 , μ_2 ja δ_2) muodostunut kokonaisuus, joka on vuorovaikutuksessa solukalvon, avustajaproteiinien, klatriinin sekä solukalvon reseptoreiden kanssa (McMahon, 1999; ks. yleiskatsaus Mousavi ym., 2004). Klatriinin ja adapteriproteiini-2:n lisäksi klatriinivuoratun vesikkelin syntyyn osallistuvat monet muut avustajaproteiinit, kuten monomeeriset adapteriproteiinit ARH, Dab2, numb, epsin, Eps15 ja AP180/CALM (ks. yleiskatsaukset Ungewickell ja Hinrichsen, 2007; Mousavi ym., 2004). Adapteriproteiinit toimivat mm. yhdistävinä molekyyleinä klatriinin, dynamiinin ja solukalvon välillä sekä klatriinia solukalvolle kasaavina molekyyleinä (ks. yleiskatsaus Mousavi ym., 2004; Takei ym., 1999).

Klatriinivesikkelin muodostuminen alkaa adapteriproteiinien kerääntymisestä solukalvolle, minkä jälkeen klatriinimolekyylit polymerisoituvat ja muodostavat solukalvon solulimanpuoleiselle lehdelle polygonaalisen klatriinivuorauksen (ks. yleiskatsaukset Conner ja Schmid, 2003; Ungewickell ja Hinrichsen, 2007; Mousavi ym., 2004). Klatriiniheksagoneista ja -pentagoneista muodostuva proteiiniuoraus kaareutuu yhtäaikaaisesti solukalvon kanssa, jolloin solukalvolla reseptoreihinsa sitoutuneet ligandit konsentroituvat muodostuneisiin klatriinikuoppiin (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Kuoppa jatkaa kaareutumista ja kasvamista kunnes vesikkeli on valmis irtoamaan solukalvolta (Brodsky, 1985; ks. yleiskatsaukset McMahon, 1999; Ungewickell ja Hinrichsen, 2007). Klatriinivesikkelin irrotukseen solukalvolta osallistuu monia auttajaproteiineja kuten myosiini, aktiini ja dynamiini (ks. yleiskatsaus Ungewickell ja Hinrichsen, 2007; Brodsky, 1985; Sever ym., 2000). Klatriinivesikkelin irrottua solukalvolta, adaptoriproteiinit sekä klatriini irtoavat vesikkelistä ja palaavat takaisin solukalvolle uudelleen käytettäväksi (ks. yleiskatsaus Ungewickell ja Hinrichsen, 2007).

1.1.2 Klatriinista riippumattomat endosytoosireitit

Endosytoosireiteistä parhaiten tunnetun klatriinivälitteisen endosytoosin lisäksi soluilla on useita muita endosytoosireittejä, joita ne käyttävät suurien partikkeleiden, makromolekyylien sekä pienten liukoisten yhdisteiden sisäänottoon. Ravinteiden, reseptoreiden sekä muiden yhdisteiden sisäänoton lisäksi endosytoosi on tehokas tapa kierrättää solukalvoa (Naslavsky ym., 2004; ks. yleiskatsaus Nichols ja Lippincott-Schwartz, 2001). Klatriinista riippumattomiin endosytoosireitteihin luetaan kaveolivälitteinen endosytoosi, fagosytoosi, makropinosytoosi sekä muut ei-klatriinivälitteiset reitit (ks. yleiskatsaus Mayor ja Pagano, 2007; Naslavsky ym., 2004). Klatriinista riippumaton endosytoosi liitetään yleensä solukalvon lipidilauttoihin, jotka sisältävät paljon sfingolipidejä, glukosfingolipidejä, glykosyylifosfatidyli-inositoli ankkuroituja proteiineja (GPI-AP) sekä kolesterolia, jolla on havaittu olevan merkittävä rooli klatriinista riippumattomassa endosytoosissa (ks. yleiskatsaus Nichols ja Lippincott-Schwartz, 2001). Pienet GTPaasit kuten Cdc42 (engl. cell division cycle 42 homolog), Arf6 (engl. ADP ribosylation factor 6) sekä RhoA (engl. ras homolog gene family, member A) säätelevät usein klatriinista riippumattomia endosytoosireittejä (ks. yleiskatsaus Mayor ja Pagano, 2007; Naslavsky ym., 2004). Osa klatriinista riippumattomista reiteistä on myös

dynamiinista riippumattomia, kuten endosytoosireitit, joita säätelevät Rho-perheen Cdc42 tai Arf-perheen Arf6 (ks. yleiskatsaukset Mayor ja Pagano, 2007; Nichols ja Lippincott-Schwartz, 2001; Kirchhausen, 2000). Dynamiinista riippuvaisia, mutta klatriinista riippumattomia endosytoosireittejä ovat mm. kaveolivälitteinen endosytoosi sekä GTPaasi RhoA:n säätelemä reitti (ks. yleiskatsaus Mayor ja Pagano, 2007). (Kuva 1)

Klatriinista riippumattomien endosytoosireittien yhteydessä on tutkittu paljon GPI-AP:en soluun sisään kulkeutumista. GPI-AP:t ovat tyypillisiä lipidilauttojen proteiineja ja niiden tiedetään kulkeutuvan soluun ilman klatriinia tai dynamiinia (ks. yleiskatsaus Kirchhausen, 2000). Soluun kulkeutumisen jälkeen GPI-AP:t kulkeutuvat putkimaisiin rakenteisiin (engl. GPI enriched endosomal compartments; GEEC). GPI-AP:en käyttämää reittiä säätelee Rho-perheen GTPaasi Cdc42. GPI-AP:t näyttäisivät käyttävän soluissa myös toista samantyyppistä, klatriinista riippumatonta reittiä, jonka säätelijänä toimii Arf6 (ks. yleiskatsaukset Mayor ja Pagano, 2007; Kirchhausen, 2000). Arf6 osallistuu soluissa aktiinitukirangan dynamiikan säätelyyn ja stimuloi fosfatidyli-inositoli(4,5)bisfosfaatin muodostumista aktivoimalla tarvittavia paikallisia proteiinikinaaseja. Arf6 osallistuu luultavasti myös endosomien dynamiikkaan sekä kalvokomponenttien kierrätykseen takaisin solukalvolle (ks. yleiskatsaukset Mayor ja Pagano, 2007; Naslavsky ym., 2004; Kirchhausen, 2000). Muita klatriinista riippumattomien reittien tunnetuimpia merkkiaineita ovat interleukiini 2, (Lamaze ym., 2001), koleratoksiini B (ks. yleiskatsaus Kirchhausen, 2000) sekä EGF-reseptorit (ks. yleiskatsaus Mayor ja Pagano, 2007). Koleratoksiini kulkeutuu soluissa GPI-AP:sta poiketen pieniin pyöreisiin tai putkimaisiin klatriinista ja dynamiinista riippumattomiin vesikkeleihin (engl. clathrin-independent carrier; CLIC). Vaikka soluun on monia kulkeutumistapoja, kaikki klatriinista riippumattomat reitit näyttäisivät lopulta yhdistyvän varhaisissa endosomeissa, joista lastimolekyylit jaotellaan eteenpäin (ks. yleiskatsaukset Mayor ja Pagano, 2007; Kirchhausen, 2000).

Klatriinista riippumattomien endosytoosireittien lastimolekyylien valinnasta tiedetään melko vähän. Luultavasti kalvoproteiinien ubiquitinylaatio stimuloi proteiinien sisään kuljetusta. Ubiquitinylaation on havaittu lisäävän ainakin EGF-reseptoreiden kulkeutumista soluun (Sigismund ym., 2005). Myös kalvoproteiinien tietyillä signaalisekvensseillä ja

sijoittumisella solukalvon tiettyihin mikrodomeeneihin näyttäisi olevan vaikutus proteiinien sisäänottoon (ks. yleiskatsaus Mayor ja Pagano, 2007; Naslavsky ym., 2004).

1.1.2.1 Kaveolivälitteinen endosytoosi

Kaveolit ovat solukalvolla sijaitsevia, lipidilautoiksi määriteltyjä domeeneja (Stan, 2005). Kaveolit ovat muodoltaan pyöreitä, pullon muotoisia, solukalvossa esiintyviä kuoppia, joiden läpimitta on noin 50 – 80 nm ja niitä esiintyy lähes kaikissa solutyypeissä epiteelisoluista adiposyytteihin. Solutyypistä riippuen kaveolit esiintyvät solukalvolla yksittäin, ryhmissä tai riveissä. Myös kaveolien esiintymistiheys riippuu solutyypistä (ks. yleiskatsaukset Stan, 2005, Pelkmans ja Helenius, 2002). Kaveolit osallistuvat soluissa mm. endosytoosiin, signaalien välitykseen, transsytoosiin ja kolesterolin kuljetukseen (Barnett-Norris ym., 2005; Moffett ym., 2000). Kaveolit sisältävät paljon lipidilautoille tunnusomaisia lipidejä ja proteiineja kuten kolesterolia ja sfingolipidejä, GPI-ankkuroituja proteiineja sekä kaveoliini-1-proteiineja (ks. yleiskatsaukset Stan, 2005 ja Pelkmans ja Helenius, 2002; Barnett-Norris ym., 2005; Pelkmans ym., 2004).

Kaveoliini-1-proteiinit ovat kalvoproteiineja (21 kDa), jotka kykenevät muodostamaan dimeerejä sekä monimutkaisempia oligomeerejä (Stan, 2005; Pelkmans ja Helenius, 2002; Sargiacomo ym., 1995). Kaveoliinit sekä solukalvon kolesterolia ovat välttämättömiä kaveolirakenteiden synnylle ja ne määrittelevät rakenteiden koon ja muodon (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002; Pelkmans ym., 2004; Fernandez ym., 2002). Kaveoliineja on useita tyyppisiä (kaveoliini-1, -2 ja -3), jotka kuuluvat kaikki samaan geeniperheeseen. Kaveoliini-1:tä ja kaveoliini-2:ta esiintyy useimmissa solutyypeissä, kun taas kaveoliini-3:ta (M-kaveoliini) esiintyy vain lihassoluissa (Scherer ym., 1997; Way ja Parton, 1996).

Kaveolien proteiiniuori koostuu noin 10 nm paksuisesta kaveoliinisäikeestä, joka muodostuu 4 - 6 kaveoliini-1-molekyylistä (Fernandez ym., 2002; Rothberg ym., 1992). Kaveoliinin lisäksi kaveolit sisältävät GTPaasi dynamiinia, joka sijaitsee pullomaisen kaveolirakenteen kaulaosassa ja luultavasti osallistuu vesikkelin kuroutumiseen solukalvolta (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002). Kaveolit sisältävät myös kalvofissiolle ja -fuusiolle välttämättömän molekyylikoneiston (Schnitzer ym., 1995).

Kaveolit ovat yhteydessä solutukirankaan ja ainakin aktiini on välttämätön vesikkelin muodostumiselle ja irtautumiselle solukalvolta (ks. yleiskatsaukset Stan, 2005; Pelkmans ja Helenius, 2002).

Solukalvon kaveolit ovat hyvin vakaita rakenteita (Thomsen ym., 2002). Kaveolien soluun kulkeutumisen käynnistää joko ligandin sitoutuminen solukalvon reseptoriin tai paikallinen fosforylaatiotapahtumasarja (ks. yleiskatsaukset Conner ja Schmid, 2003; Pelkmans ja Helenius, 2002). Solun ulkoiset ligandit käynnistävät kaveolivälitteisen reitin ilmeisesti sitomalla samanaikaisesti useita reseptoreita tai GPI-ankkuroituja proteiineja, mikä saa aikaan tarvittavan signaalin vesikkelin muodostumiselle ja kulkeutumiselle soluun (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002; Thomsen ym., 2002). Kaveolivälitteisen endosytoosireitin tunnetuimpia ligandeja ovat SV40, koleratoksiini sekä seerumin albumiini (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002; Pelkmans ym., 2004; Pelkmans ym., 2001). Kaveolit yhdistyvät soluissa kaveosomeiksi kutsuttuihin endosomeihin, jotka ovat kaveoliini-1-proteiinia sisältäviä, lipidikalvon rajaamia rakenteita (Pelkmans ym., 2001). Kaveolit fuusioituvat kaveosomien lisäksi myös varhaisten endosomien kanssa. GTPaasi Rab5 on varhaisten endosomien kalvoilla toimiva proteiini, joka vahvistaa voimakkaasti kaveolien fuusioitumista varhaisiin endosomeihin (Pelkmans ym., 2004). Kaveosomeista soluun kulkeutuneet yhdisteet ohjataan eri endosomaalisiin rakenteisiin, solulimakalvostoon tai golgin laitteeseen (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002; Pelkmans ym., 2004). Kaveosomien ligandeja lajittelevan luonteen vuoksi kaveolilipidilauttoja on löydettävissä kaikista solun sisäisistä rakenteista, joihin kaveosomeista kuljetetaan yhdisteitä (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2002).

1.1.2.2 Fagosytoosi

Fagosytoosi on endosytoosin muoto, jota solut käyttävät suurten (>0,5 µm) partikkeleiden, kuten bakteerien tai apoptoottisten solujen jäänteiden sisäänottoon (ks. yleiskatsaus Aderem ja Underhill, 1999; Niedergang ym., 2003). Fagosytoosiin pystyvät vain monet erikoistuneet solutyypit, kuten immuunipuolustusjärjestelmän neutrofiilit ja makrofaagit (ks. yleiskatsaus Aderem ja Underhill, 1999). Fagosytoosilla onkin merkittävä rooli immuunipuolustusreaktioiden nopeassa aloituksessa ja infektioiden torjunnassa (ks. yleiskatsaus Mellman ja Warren, 2000; Fang ym., 2007). Solun puolustusreaktioiden

ohella fagosytoosi osallistuu yksilönkehitykseen sekä kudosten homeostasian säätelyyn (Fang ym., 2007). Monet bakteerit kuten salmonella, yersinia ja listeria käyttävät fagosytoosia reittinään soluun ja viruksista ainakin herpes simplex virus 1 pystyy infektoimaan soluja fagosytoosia muistuttavan reitin kautta (Clement ym., 2006; Mellman, 1996).

Fagosytoosi on signaalivälitteinen endosytoosireitti ja sen käynnistää ligandin sitoutuminen solukalvon spesifiseen reseptoriin (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003; Niedergang ym., 2003). Fagosytoosin reseptoreina toimivat ainakin tietyt integriinit ja lektiinit. Yksi tunnetuimmista fagosytoottisista reseptoreista on immunoglobuliini G:n (IgG) tunnistava Fc γ -perheen reseptori (Scott ym., 2005). Ligandin sitoutuminen reseptoriin käynnistää signaalireitin, jonka seurauksena ligandi otetaan solun sisään. Ligandin sitoutuminen reseptoriin saa solussa aikaan signaalikaskadin, mikä saa aikaan solukalvon sekä paikallisen aktiinitukirangan uudelleen muotoutumisen (Fang ym., 2007). Aktiinien polymerisoituminen mahdollistaa solukalvon kurottautumisen reseptoriin sitoutuneen partikkelin ympärille, kunnes solukalvo ympäröi partikkelin kokonaan ja sulkee sen fagosomiksi kutsuttuun rakenteeseen (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003; Hall ja Nobes, 2000). Fagosytoosiin vaadittavan aktiinitukirangan uudelleen järjestäytymisen säätelyyn osallistuvat fagosytoosissa mm. Rho-perheen GTPaasit Rac1 (engl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) ja Cdc42 sekä Ras-perheen GTP:tä sitova Arf6 (Mellman, 1996; Niedergang ym., 2003; Scott ym., 2005). Solulimassa fagosomit fuusioituvat varhaisten ja myöhäisten endosomien kanssa ja lopulta lysosomien kanssa. Lysosomeissa fagosomien sisältö hajotetaan hydrolyyttisten entsyymien avulla (Fang ym., 2007).

Fagosytoosin varhaiset vaiheet tunnetaan huomattavasti paremmin kuin myöhäiset vaiheet, mutta ainakin lysosomien ja myöhäisten endosomien kalvoilla sijaitsevilla VSK3 tyrosiinikinaaseilla näyttäisi olevan merkittävä rooli fagosomien kypsymisessä. VSK3 osallistuu tapahtumiin, jotka liittyvät fagosomin fuusioitumiseen myöhäisten endosomien tai lysosomien kanssa. Kypsymisen aikana fagosomien on havaittu olevan yhteydessä myös monien klassisten endosomien fuusioitumista säätelevien molekyylien, kuten Rab5 ja Rab7 GTPaasien sekä LAMP-1:sen (engl. Lysosomal-associated membrane protein 1)

kanssa. Rab GTPaasien tiedetään osallistuvan ainakin vesikkeleiden muodostumiseen, fuusioitumiseen sekä kiinnittymiseen solutukirankaan. Rab5 yhdistetään soluissa varhaisiin endosomeihin, Rab7 myöhäisiin endosomeihin ja lysosomeihin ja LAMP-1 lysosomeihin (Fang ym., 2007).

1.1.2.3 Makropinosytoosi

Makropinosytoosi on seurausta solukalvon poimuttumisesta, mitä tapahtuu eniten solujen laitamilla. Makropinosytoosi on tehokas, mutta ei-valikoiva menetelmä solun ulkoisen nesteen ja siihen liuenneiden makromolekyylien sisäänottoon. Makropinosomien koko vaihtelee ja ne voivat olla halkaisijaltaan yli 5 μm , eikä niillä ole havaittu olevan klatriini- tai kaveolivesikkeleille tyypillistä proteiinivuorausta. Makropinosomien lipidikoostumus ei ole täysin tiedossa, mutta luultavasti niiden lipidikoostumus muistuttaa hyvin paljon solukalvon lipidikoostumusta. Makropinosytoosilla on tärkeä rooli solun immuunipuolustuksessa, missä se osallistuu mm. T-solujen aktivoimiseen. Huolimatta makropinosytoosin merkityksestä immuunipuolustuksessa, tietyt bakteerit (esim. legionella ja salmonella) ovat oppineet hyödyntämään makropinosytoosia päästäkseen soluun. Bakteerien lisäksi myös vaccinia virukset joidenkin adenovirusten kanssa osaavat kiihdyttää makropinosytoosia infektoidessaan soluja (ks. yleiskatsaus Swanson ja Watts, 1995).

Makropinosytoosissa tapahtuva solukalvon poimuttuminen on fagosytoosin kaltainen mekanismi, mutta sitä säätelevät eri tekijät (ks. yleiskatsaus Swanson ja Watts, 1995). Makropinosomi ei myöskään tarvitse muodostuakseen reseptoriin sitoutunutta ligandia, kuten fagosomi (ks. yleiskatsaus Swanson, 2008). Makropinosomi syntyy aktiinin suoraviivaisen polymerisaation seurauksena, kun aktiinin solusta pois päin työntämä solukalvon lieve fuusioituu takaisin solukalvoon (ks. yleiskatsaus Kerr ja Teasdale, 2009). Ilman stimulaatiota solukalvon poimuttuminen harvoin johtaa makropinosytoosiin, kun taas stimuloituissa soluissa poimuttuminen on laaja-alaisempaa ja johtaa useammin makropinosytoosiin (ks. yleiskatsaus Swanson ja Watts, 1995). Koska makropinosytoosi on aktiinista riippuvainen prosessi, monet aktiinin säätelytekijät vaikuttavat myös makropinosytoosiin (ks. yleiskatsaus Kerr ja Teasdale, 2009).

Makropinosytoosi ei ole suoraan riippuvainen reseptori-ligandi-vuorovaikutuksista tai tiettyjen säätelijöiden toiminnasta vaikka em. vuorovaikutukset voivat käynnistää solussa signaalikaskadin, minkä seurauksena makropinosytoosi lisääntyy. Reseptorivälitteinen makropinosytoosin lisääntyminen on usein seurausta aktiinin polymerisaation lisääntymisestä ja siitä johtuvasta solukalvon poimuttumisen lisääntymisestä (ks. yleiskatsaus Kerr ja Teasdale, 2009).

Makropinosytoosin säätelyyn osallistuvat mm. pienet GTPaasit kuten Rac1, Cdc42, Arf6 sekä Rab5, joista Rac1 yhdessä Pak1:en (engl. p21-activated kinase 1) kanssa yhdistetään yleisesti solukalvon poimuttumisen säätelyyn (ks. yleiskatsaukset Swanson ja Watts, 1995; Kerr ja Teasdale, 2009). Pak1 fosforyloi CtBP1/BARS-proteiinin (engl. C-terminal-binding protein-1/ Brefeldin A-ADP-ribosylated substrate), joka on tärkeä tekijä makropinosomien irrottamisessa solukalvolta (ks. yleiskatsaus Kerr ja Teasdale, 2009). Solukalvon kolesterolilla on myös tärkeä rooli makropinosytoosissa. Kolesterolin tiedetään vaikuttavan mm. aktiivisen Rac1:n sijoittumiseen solukalvolla sekä aktiinin dynamiikkaan. Kolesterolin poistaminen solukalvolta estää makropinosytoosin lähes täydellisesti. Kolesterolin lisäksi fosfatidyli-inositoli(3,4)bisfosfaatin on havaittu kerääntyvän solukalvolle ennen poimuttumisen alkamista (Grimmer ym., 2002). Muita tärkeitä makropinosytoosin säätelijöitä ovat mm. PKC ja fosfoinositidi 3-kinaasi (PI3K). (ks. yleiskatsaukset Swanson ja Watts, 1995; Kerr ja Teasdale, 2009).

Amiloridin ja sen johdannain, jotka toimivat Na^+/H^+ -vaihtajien toiminnan estäjinä, on havaittu estävän makropinosytoosin joissain solutyypeissä. Vaihtajan inaktivointi ilmeisesti laskee soluliman pH:ta, mikä heikentää solukalvon poimuttumista, mutta mekanismin tarkempaa toimintaa ei vielä tunneta. Soluliman pH:n korottaminen soluissa vastaavasti voimistaa poimuttumista (ks. yleiskatsaus Swanson ja Watts, 1995).

Makropinosomien kohtalo vaihtelee solutyypeittäin. Useimmiten makropinosomit kypsyvät solulimassa ensin varhaisten ja sitten myöhäisten endosomien kaltaisiksi rakenteiksi, minkä jälkeen ne lopulta fuusioituvat lysosomeihin. Makropinosomit saattavat myös jäädä erilliseksi populaatioksi, josta ne vähitellen palaavat takaisin solukalvolle ilman normaalia kypsymisprosessia. Kypsymisen aikana makropinosomit ovat yhteydessä

muiden makropinosomien sekä endosomaalisten rakenteiden kanssa. Kypsymisprosessia säätelevät soluissa monet GTP:tä sitovat proteiinit kuten Rab4, Rab5 ja Rab7, joka ovat myös tunnettuja varhaisten ja myöhäisten endosomien merkkiaineita. Rab4, Rab5 ja Rab7 proteiinien esiintyminen makropinosomeissa kypsymisen aikana viittaa endosomien ja makropinosomien väliseen proteiinien vaihtoon. Transferriniireseptoreiden siirtyminen makrofaagien makropinosomeista varhaisiin endosomeihin viittaa myös rakenteiden keskinäiseen vuorovaikutukseen (ks. yleiskatsaus Swanson ja Watts, 1995).

1.2 Endosomaalinen pH-gradientti

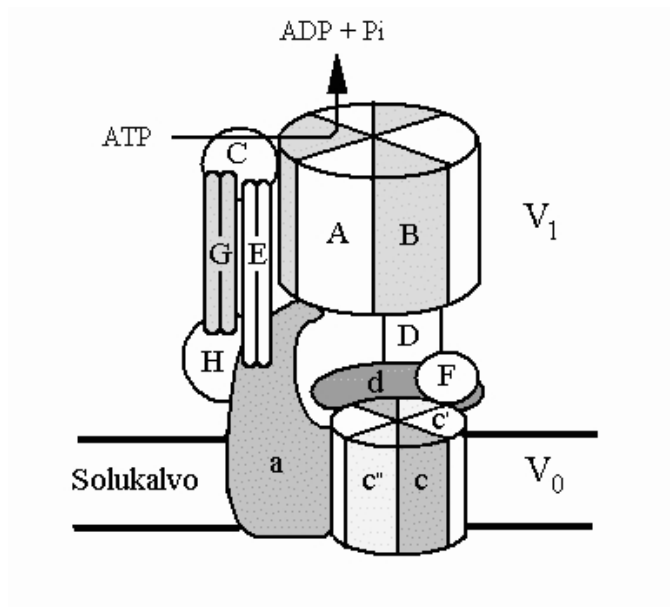
Solut sisältävät paljon erilaisia kalvojen ympäröimiä organelleja, jotka osallistuvat solun vesikkeliliikenteeseen, signaalien välitykseen, proteiinien lajitteluun sekä moniin muihin soluille välttämättömiin prosesseihin. Näitä organelleja ovat mm. endosomit, lysosomit ja synaptiset vesikkelit. Useimpien solunsisäisten rakenteiden sisäinen pH on soluliman pH:ta alhaisempi. Vesikkeleiden ja soluliman väliset pH-erot luovat soluun elektrokemiallisia protonigradienteja, joita solu käyttää moniin tärkeisiin prosesseihin, kuten ionien kuljetukseen (Mellman, 1992, Yamashiro ym., 1983).

Klatriiniireitin endosytoottiset vesikkelit alkavat happamoitua välittömästi solukalvolta kuroutumisen jälkeen. Endosomien ja vesikkeleiden pH vaihtelee välillä 4,5 – 6,5 ja sitä ylläpidetään pääasiassa aktiivisella protonien pumppauksella (V-ATPaasit). Aktiivisen protonipumppauksen lisäksi endosomien pH-säätelyyn osallistuvat monet ionikanavat ja -vaihtajat. Endosomaaliset rakenteet luovat soluihin pH-gradientin, joka alkaa lievästi happamista varhaisista endosomeista ja etenee kohti happamia lysosomeja (Yamashiro ym., 1983). Varhaisten endosomien pH vaihtelee soluissa usein välillä 5,5 – 6,3. Myöhäisten endosomien pH on noin 5,5, kun lysosomien pH voi laskea jopa 4.6:een. Endosomien pH:n muutos rakenteesta toiseen vaihtelee yleensä noin 0,3 pH-yksiköstä 1,0 pH-yksikköön (Mellman, 1992). pH-gradientti sekä erilaiset happamat rakenteet ovat välttämättömiä solun toiminnalle. Monet solun prosessit ovat riippuvaisia alhaisesta pH:sta tai pH:n muutoksesta. Alhaista pH:ta tarvitaan soluissa mm. makromolekyylien lysosomaaliseen hajotukseen, ligandien irrotukseen reseptoreistaan sekä proteiinien muokkaukseen (Yamashiro ym., 1983; Futai ym., 2000).

1.2.1 pH:n säätely ja ylläpitäminen

1.2.1.1 V-tyypin H^+ -ATPaasit

V-tyypin H^+ -ATPaasit eli V-ATPaasit (engl. Vacuolar type H^+ -ATPase; V-ATPase) ovat entsyymeitä, jotka muuttavat ATP:n hydrolyysistä saatavan energian elektrokemialliseksi protoni gradientiksi (engl. proton-motive force; pmf). V-ATPaasit muodostuvat 14:sta erilaisesta proteiinalayksiköstä, jotka muodostavat kaksi proteiinikompleksia. Soluliman puoleinen V_1 -kompleksi (600 – 650 kDa) muodostuu kahdeksasta erilaisesta proteiinalayksiköstä (A₃, B₃, C, D, E, F, G₂, H₂) ja vastaa ATP:n hydrolyysistä (ks. yleiskatsaus Beyenbach ja Wieczorek, 2006; Inoue ym., 2005). Integraalinen V_0 -kompleksi (260 kDa) muodostuu kuudesta erilaisesta proteiinalayksiköstä (a, c₄, c', c'', d, e) ja toimii protonien siirtäjänä. V_1 - ja V_0 -kompleksit ovat yhteydessä toisiinsa keskussauvan ja perifeeraalisen proteiinisauvan välityksellä (Inoue ym., 2005). V-ATPaasien toiminta perustuu proteiinikompleksien alayksikköjen välillä tapahtuvaan kiertoliikkeeseen. Pyörivään osaan luetaan alayksiköt D ja F sekä c-alayksikköjen muodostama rengasmaisen rakenne, loput osat luetaan paikallaan pysyvään osaan (Kuva 2).



Kuva 2. V-ATPaasi on yksi merkittävimmistä endosomien pH:n säätelyyn ja ylläpitoon osallistuvista entsyymeistä. V-ATPaasit muodostuvat kahdesta proteiinikompleksista (V_1 ja V_0), jotka muodostuvat 14 erilaisesta proteiinalayksiköstä (A, B, C, D, E, F, G, H, a, c, c', c'', d ja e). V-ATPaasin toimintaa säädellään mm. V_1 - ja V_0 -kompleksien irrottamisella toisistaan (Mukailtu artikkelista (yleiskatsaus Marshansky ja Futai, 2008))

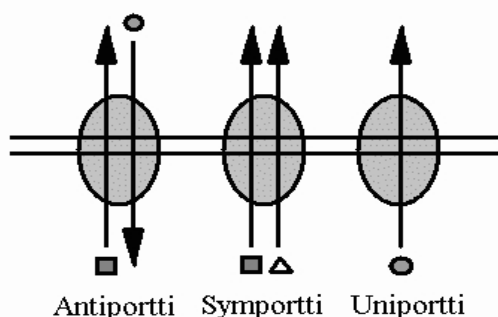
V-ATPaasien uskotaan pumppaavan protoneita suhteessa $2H^+/1$ ATP (ks. yleiskatsaukset Beyenbach ja Wiczorek, 2006; Marshansky ja Futai, 2008). Soluissa ATP:tä tuottava F-tyypin ATPaasi sekä protoneita pumppaava V-ATPaasi muistuttavat rakenteeltaan ja toiminnaltaan toisiaan ja teoriassa molemmat niistä voisivat toimia ”kumpaankin suuntaan”, joko protoneita pumppaavina tai ATP:tä tuottavina entsyymeinä, mutta tästä huolimatta V-ATPaasit toimivat biologisissa järjestelmissä vain yhteen suuntaan (Nelson, 1992). Yksinkertaistettuna F-ATPaasi tuottaa ATP:ta, jota V-ATPaasi kuluttaa (ks. yleiskatsaus Beyenbach ja Wiczorek, 2006; Nelson, 1992). Nisäkkäillä on olemassa monia alayksiköiltään eroavia V-ATPaaseja. Eri isoformien esiintyminen on kudosisoluspesifistä. Ihmiseltä on löydetty a-alayksikön suhteen neljä erilaista V-ATPaasia ja ne sijoittuvat eri soluissa eri kalvorakenteisiin (ks. yleiskatsaus Marshansky ja Futai, 2008).

V-ATPaasit ovat merkittävimpiä protonihomöostasiaan osallistuvia protonipumppuja eukaryoottisolussa. V-ATPaasit luovat solujen biologisten kalvojen ympärille kalvopotentiaaleja, pH-gradientteja sekä happamoittavat monien endosomien ja soluelinten sisustan. Ne ovat myös merkittävimpiä endosomien happamuuden ylläpitäjiä. Soluelinten ja endosomien happamoituminen on eräs tärkeimmistä tekijöistä ekso- ja endosytoosissa (ks. yleiskatsaus Marshansky ja Futai, 2008).

V-ATPaasien merkittävän roolin vuoksi niiden toimintaa säädellään monella tasolla. Solut säätelevät V-ATPaasien toimintaa V_1 ja V_0 alayksiköiden reversiibelillä irrottamisella ja yhteen liittämällä sekä muuttamalla entsyymin protonien pumppauksen ja ATP:n hydrolyysin suhdetta. Alayksiköiden irrotus ja yhteen liittäminen ovat itsenäisiä prosesseja, joista irrotus tapahtuu mikrotubulusten avustamana ja kasaus RAVE (engl. regulator of the (H^+) -ATPase of the vacuolar and endosomal membranes) kompleksin avustamana. Tärkein V-ATPaasien säätelymenetelmä on niiden kuljetus tiettyihin solunsisäisiin rakenteisiin ja niiden esiintymistiheyden säätely endosomaalisissa rakenteissa (Inoue ym., 2005; ks. yleiskatsaus Marshansky ja Futai, 2008).

1.2.1.2 V-ATPaasit ja sähkökemiallinen potentiaali

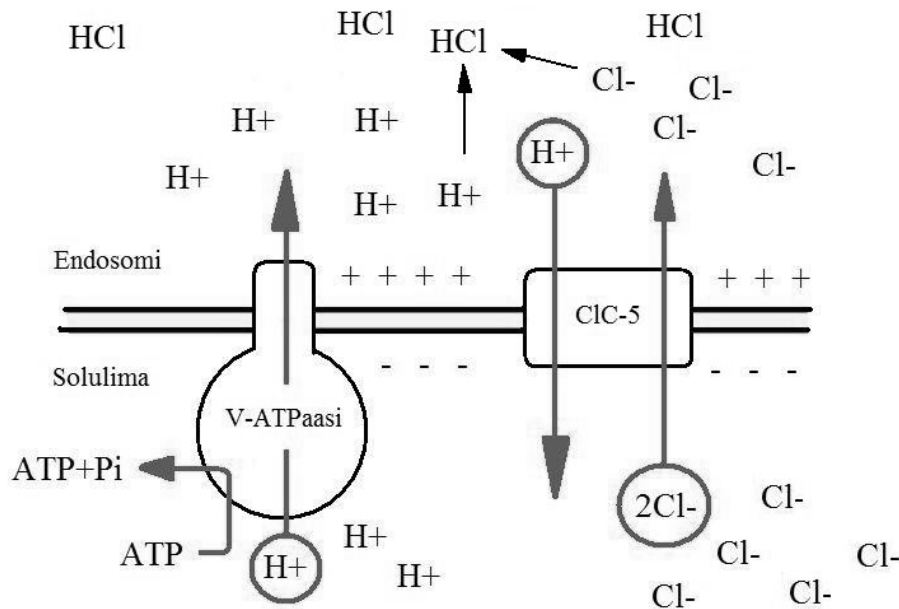
V-ATPaasien luoma protonien sähkökemiallinen potentiaali muodostuu sähkövarauksen erosta kalvon eri puolien välillä. Sähkökemiallinen potentiaali muodostuu kahdesta osatekijästä, kalvopotentialista ja kalvojen eripuolisten liuosten välisestä pH-erosta eli protonigradientista (ks. yleiskatsaus Harvey, 2009). Protonien sähkökemiallinen potentiaali on yksi biologisten järjestelmien tärkeimmistä korkeaenergisistä välituotteista, jota käytetään soluissa monien sekundaarisesti aktiivisten kuljetusjärjestelmien pyörittämiseen (Nelson, 1992). Protonien sähkökemiallinen potentiaali on monien anti- ja symporttien sekä vaihtajien, energian lähde (Kuva 3). V-ATPaasin toiminnan perusta on protonien erottaminen anioneista ja niiden siirtäminen biologisten kalvojen läpi, esimerkiksi solulimasta endosomeihin. Kalvon läpi pumpatut protonit muodostavat kalvon sisäpuolelle positiivisen varauksen. Positiivinen varaus syntyy kun endosomeihin pumpatut protonit jäävät kalvon sisäpinnalle, solulimaan jääneiden anionien negatiivisen varauksen puoleensa vetäminä. Protonien tilalle kalvopotentialiin voidaan vaihtaa endosomista muitakin kationeja, kuten natrium-ioneja (Na^+), jolloin protoneita pääsee vapautumaan endosomin sisäiseen liuokseen.



Kuva 3. Proteiinikanavien kautta tapahtuva aineiden kuljetus ei vaadi ulkopuolista energiaa. Antiportissa kaksi ainetta kulkee kuljetustapahtumassa vastakkaisiin suuntiin ja symportissa samaan suuntaan. Uniportti kuljettaa vain yhtä ainetta kerrallaan.

Biologisissa järjestelmissä pH:n muutos ja kalvopotentiali ovat riippuvaisia V-ATPaasin lisäksi monien kanavien, kuljettajien ja pumppujen toiminnasta. Yksi tunnetuimmista V-ATPaasin aikaansaamista reaktioista on anionien virtaus erilaisten kanavien kautta positiivisen varauksen sisältävään liuokseen. Esim. kloridikanavien kautta tapahtuva kloridi-ionien (Cl^-) virtaus endosomeihin lisää huomattavasti happamuutta, kun kloridi-ionit sitoutuvat endosomiin pumpattuihin protoneihin (H^+). Kloridin sitoessa protoneita

liuokseen muodostuu väkevää suolahappoa (HCl), mikä alentaa endosomin pH-arvoa (Kuva 4). Protonien puoleensavetämä anionivirta vähentää kalvopotentiaalia pienentämällä positiivisen sisäpuolen ja negatiivisen ulkopuolen varauseroa. Kalvopotentiaalin aleneminen myös vähentää positiivista varausta kalvon sisäpuolella, mitä vastaan V-ATPaasi joutuu työskentelemään. Happamoitumiseen vaikuttaa myös itse endosomin sisäisen liuoksen yhdisteet, kuten esim. kaliumkloridi (KCl), jonka positiivinen kaliumioni voi korvata kalvopotentiaalin positiivisen protonin, jolloin vetyionit pääsevät reagoimaan kloridi-ionien kanssa. Happamoituminen on biologisessa järjestelmässä aina monen eri tekijän vaikutuksen summa (ks. yleiskatsaus Harvey, 2009; Harvey, 1992).



Kuva 4. V-ATPaasit pumppaavat ATP:n hydrolyysistä saatavan energian avulla protoneita endosomeihin. Yksi V-ATPaasien luoman protonien sähkökemiallisen potentiaalin käyttäjistä on kloridi-ioneja endosomeihin kuljettava ClC-5-kloridikanava. Kloridikanavan toiminta on elektrogeenistä ($H^+ / 2Cl^-$), mikä vähentää endosomin sisäistä positiivista varausta ja auttaa V-ATPaasia toimimaan. Kloridi-ionit ja protonit saattavat muodostaa endosomeissa voimakkaasti happamoittavaa suolahappoa (HCl) reagoidessaan keskenään (Mukailtu artikkelista (ks. yleiskatsaus Harvey, 2009)).

1.2.1.3 Kloridien kuljetus

Kloridikanavilla ja -vaihtajilla on havaittu olevan merkittävä rooli endosomien happamoitumisessa endosytoottisella reitillä. Nisäkkäiden CLC geeniperheestä on tunnistettu yhdeksän jäsentä, jotka jaetaan tyypillisesti kolmeen haaraan. ClC-1, -2, -Ka ja -Kb ovat solukalvolla sijaitsevia Cl^- kanavia. ClC-3, -4 ja -5 sijaitsevat endosomaalisissa rakenteissa, joista ClC-4 ja ClC-5 toimivat Cl^- / H^+ -vaihtajina. ClC-6 ja ClC-7 toimivat Cl^-

kanavina endosomaalisissa rakenteissa (ks. yleiskatsaus Jentsch, 2007). Aktiivisessa muodossaan sekä kanavat että vaihtajat ovat homodimeerisessä muodossa ja kumpikin proteiinialayksikkö muodostaa yhden kanavan ionien kuljetusta varten (ks. yleiskatsaus Jentsch, 2007; Mohammad-Panah ym., 2003). Viallisesti toimivien kloridikanavien on havaittu olevan osallisina monissa synnynnäisissä sairauksissa kuten lihasjäykkyydessä (myotonia), epilepsiassa, luunkovettumissauraudessa (osteopetroosi) sekä monissa munuaisten toimintahäiriöihin liittyvissä sairauksissa, mikä viittaa kanavien merkittävään rooliin solujen normaalissa toiminnassa (Mohammad-Panah ym., 2003; ks. yleiskatsaus al-Awqati, 1995; Schmidt-Rose ja Jentsch, 1997).

ClC-perheen kanavia ja kuljettajia sijaitsee paljon V-ATPaasien happamoittamissa endosomeissa. Elektrogeeniset V-ATPaasit aiheuttavat positiivisesti varautuneiden protonien kerääntymisen endosomien sisälle, mikä lopulta voisi estää protoni-pumppujen toiminnan ilman neutraloivaa vastavaikuttajaa. Kloridikanavien ja -vaihtajien uskotaankin neutraloivan V-ATPaasien aiheuttamaa positiivista jännitettä (ks. yleiskatsaus Jentsch, 2007). Kloridi-ionien siirtyminen endosomeihin vähentää niiden sisäistä positiivista jännitettä ja vähentää samalla positiivisesta jännitteestä aiheutuvaa vastusta, jota vastaan V-ATPaasit joutuvat työskentelemään. Kloridi-ionit edesauttavat endosomien happamoitumista sekä V-ATPaasien toiminnan tehostamisen kautta, että protoneihin sitoutumisen kautta (Kuva 4) (Mohammad-Panah ym., 2003).

Osa kloridikanavista toimii jänniteohjattuina antiporteina ja siirtävät kloridi-ioneja kalvojen läpi protonigradientin avulla. Kanavien avautumista endosomeissa stimuloi negatiivisesti varautuneiden kalvoproteiinien joutuminen endosomien kalvoille (Donnanin potentiaali). Kun solukalvo muuttuu endosomin kalvoksi, sen jännitegradientti muuttuu päinvastaiseksi kanaviin nähden. Kloridikanavat aistivat endosytoosia seuraavan jännitteen muutoksen ja pitävät tätä stimuluksena avautumiselle. Kloridi-ionit vapautuvat endosomeista noin 60 sekunnissa endosytoosin jälkeen, minkä on havaittu kontrolloivan mm. endosomien fuusioitumista sekä kypsymistä. V-ATPaasien ja kloridikanavien yhteistoiminta kerryttää kloridi-ioneja takaisin endosomeihin aktiivisen happamoitumisen ja endosomin kypsymisen aikana, kun negatiivisesti varautuneet kloridi-ionit siirtyvät positiivisesti varautuneeseen endosomiin (H^+ -gradientti). Kloridivaihtajat ylläpitävät ja

säätävät kloridi-ionien konsentraatiota vaihtamalla endosomin protoneita soluliman kloridi-ioneihin (Cl^-/H^+), niin kauan kuin pH-gradienttia ylläpidetään endosomissa (Saito ym., 2007).

1.2.1.4 Na^+/K^+ -ATPaasit

Na^+/K^+ -ATPaasit ovat integraalisia kalvoproteiineja, jotka vastaavat natrium- ja kaliumionien kuljetuksesta biologisten kalvojen läpi. Kuljetus tapahtuu ATP:n hydrolyysistä saatavan energian avulla suhteessa $3 \text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$. Na^+/K^+ -ATPaasit kuuluvat P-tyypin ATPaaseihin ja ne muodostuvat kahdesta alayksiköstä, α -alayksiköstä (113 kDa) ja β -alayksiköstä (55 kDa). Kummallakin alayksiköllä on olemassa kolme isoformia, joiden sijainti on ainakin osittain kudosspesifistä. Dimeerin β -alayksikkö vastaa entsyymin ohjaamisesta kohdekalvolle, kun α -alayksikkö toimii entsyymin katalyyttisenä osana, joka vastaa mm. ATP:n hydrolyysistä (ks. yleiskatsaus Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). Na^+/K^+ -ATPaasit kulkeutuvat endosomeihin solukalvolta kuroutuviissa pinosytoottisissa vesikkeleissä sisään otettavien reseptoreiden kanssa. Varhaisissa endosomeissa Na^+/K^+ -ATPaasit pitävät endosomin sisäisen pH:n noin kuudessa, mikä on riittävä happamuus ligandien irtoamiselle osalle reseptoreista. Endosomien kypsyessä Na^+/K^+ -ATPaasit ilmeisesti palaavat solukalvolle kiertävien endosomien mukana, joissa myös ligandeistaan irrotetut reseptorit palaavat solukalvolle uudelleen käytettäväksi (Cain ym., 1989).

$3 \text{Na}^+ / 2 \text{K}^+$ kuljetus synnyttää kalvojen ympärille sähkökemiallisen gradientin (Lingrel ja Kuntzweiler, 1994; Fuchs ym., 1989). Na^+/K^+ -ATPaasit lisäävät endosomien sisäpuolista positiivista varausta, mikä vastustaa V-ATPaasien protonien pumppausta. Ilmeisesti Na^+/K^+ -ATPaasit toimivat myös vastakkaisena säätelyjärjestelmänä V-tyypin H^+ -ATPaaseille. Väitettä tukee myös havainto Na^+/K^+ -ATPaasien esiintymisestä vain varhaisissa endosomeissa, jotka ovat endosomaalisista rakenteista vähiten happamia. (Fuchs ym., 1989). Solut hyödyntävät endosomien kasvavaa natrium-konsentraatiota monien muiden kuljetusjärjestelmien ylläpitoon ja toimintaan (ks. yleiskatsaus Lingrel ja Kuntzweiler, 1994). Na^+/K^+ -ATPaaseilla on havaittu olevan soluissa muitakin tehtäviä kuin pelkkä ionien kuljetus. Niiden on havaittu osallistuvan mm. signaalien välitykseen (Liang ym., 2007) sekä kaveoliini-1-proteiinin kuljetukseen (Cai ym., 2008).

1.2.1.5 Na⁺/H⁺ -vaihtajat

Kationi/protoni-vaihtajat siirtävät ioneja biologisten kalvojen läpi niiden konsentraatiogradienttien suuntaisesti (antiportti), joten kuljetus ei vaadi ylimääräistä energiaa. Kationi/ protoni -vaihtajia kutsutaan yleensä Na⁺/H⁺ -vaihtajiksi (NHE), vaikka ne siirtävät natriumionien lisäksi myös litium- ja kaliumioneja. NHE:t ovat integraalisia kalvoproteiineja, joilla on 12 kalvon läpäisevää domeenia. NHE:t toimivat luultavasti homodimeereinä. Nisäkkäiden NHE-perhe koostuu yhdeksästä jäsenestä (NHE1-NHE9), joista NHE:t 1-5 sijaitsevat pääasiassa solukalvolla ja NHE:t 6-9 solun sisäisissä kalvorakenteissa kuten golgin laitteessa ja endosytoottisissa vesikkeleissä. NHE:t 3 ja 5 esiintyvät myös kiertävien endosomien kalvoilla. NHE:ien suorittama ionien siirto on elektroneutraali, jossa yhtä protonia vastaan siirretään yksi kationi (ks. yleiskatsaus Orlowski ja Grinstein, 2007). Kationi/protoni-vaihtajia ei tiettävästi esiinny myöhäisten endosomien tai lysosomien kalvoilla (Nakamura ym., 2005). Alustavat tutkimukset ovat osoittaneet että NHE6 näyttäisi esiintyvän EV1:sen aikaansaamien monivesikkelisten rakenteiden kalvoilla (Marjomäki, ei julkaistu).

1.2.2 Endosomien sisäisen happamuuden mittaaminen

Endosomaalisten organellien sisäisen pH:n mittaamiseen on vuosien varrella kehitetty monia mittausmenetelmiä. Solubiologian ja molekyylibiologian kehityksen johdosta uusia endosomaalisia reittejä ja rakenteita löydetään jatkuvasti. pH-mittausten herkkyys on lisääntynyt mm. menetelmien, reagenssien ja mittauslaitteiden kehittymisen myötä. Nykyaikaiset menetelmät perustuvat suurelta osin fluoresoivien konjugaattien käyttöön sekä konfokaalimikroskopiaan, mutta jo ennen näiden menetelmien kehittymistä tehtiin paljon tutkimuksia liittyen endosomien, etenkin lysosomien happamuuteen. Suurin osa varhaisimmista menetelmistä antoi vain viitteitä rakenteen sisäisestä happamuudesta, mutta niiden avulla ei pystytty mittaamaan rakenteen tarkkaa pH-arvoa.

Yksi varhaisista menetelmistä endosomin sisäisen pH mittaamiseen lienee 1970-luvulla kehitelty menetelmä, jossa eristettyjen lysosomien pH määritettiin kohtalaisen tarkasti radioaktiivisesti leimatun metyyliamiinin ja klorokiniinin avulla. Klorokiniinia käytettiin lääkkeenä malariaa vastaan ja sen teho perustui klorokiniinin kykyyn nostaa malariaa aiheuttavan parasiitin lysosomien pH:ta, jolloin hydrolyyttisten entsyymien toiminta estyi

ja parasiitin elinkierto pysähtyi. Metyyliamiinin käyttö perustui havaintoon heikosti emäksisten yhdisteiden spontaanista kerääntymisestä lysosomeihin. Lysosomien pH:n määrittämiseksi Reijngoud ja Tager (1976) mittasivat rasvaliukoisen, heikosti emäksisen ¹⁴C-leimatun metyyliamiinin jakautumista lysosomin ja sen ympäristön välillä ja käyttivät klorokiiniinia tarvittaessa lysosomaalisen pH:n säätämiseen (Reijngoud ja Tager, 1976).

pH-mittaukset kehittyivät fluoresoivien merkkiaineiden myötä. Useimmiten tutkimuksiin käytettiin fluoresoivilla molekyyleillä vuorattuja dekstran-merkkiaineita, joita syötettiin soluihin. Dextraanien avulla kehittyi uusi ns. kaksois-fluoresenssi-leimausmenetelmä. Mittauksissa käytettiin kahta eriväristä leimaa, joista toisen intensiteetti oli riippuvainen ympäröivän liuoksen pH:sta (pH-herkkä) ja toisen ei (pH-vakaa). Leimattujen solujen kuvaamiseen käytettiin konfokaalimikroskopiaa ja pH määritettiin fluoresoivien leimojen intensiteettien suhteen perusteella. Fluoresoivien leimojen käyttö mahdollisti elävien solujen endosomien tutkimisen ja konfokaalimikroskopia yksittäisten endosomien pH:n määrittämisen (Drecktrah ym., 2006; Ichimura ym., 1997; Ohkuma ja Poole, 1978).

Elektronimikroskopiaa käytettiin myös pH-mittauksiin, mutta sen käyttö jäi fluoresoivien merkkiaineiden varjoon menetelmän suurpiirteisyyden vuoksi. Immuno-kulta leimauksiin käytettiin rasvaliukoista leimaa (engl. 3[2,4-dinitroanilino]-3'-amino-N-methyl dipropylamine; DAMP), jonka toiminta perustui yhdisteen protonoitumiseen happamassa ympäristössä. Protonoituminen esti tehokkaasti yhdisteen vapaan liikkumisen kalvojen läpi, jolloin yhdisteet kerääntyivät happamiin rakenteisiin. pH määritettiin laskemalla rakenteisiin joutuneiden kultapartikkeleiden määriä (Futai ym., 2000; Yoshimori ym., 1991). DAMP-leimaus muistutti toimintaperiaatteeltaan hieman nykyaikaista LysoTracker-merkkiainetta, joka hakeutuu soluissa happamiin rakenteisiin, mutta on DAMP:sta poiketen fluoresoiva molekyyli.

Virtaussytometriä sovellettiin elektronimikroskopian ja immunofluoresenssi leimausten ohella pH-mittauksiin. Virtaussytometrian ehdottomina etuina on suurten solumäärien tutkiminen erittäin lyhyessä ajassa. Koska yhtä solua valotetaan kokeen aikana vain kerran, valon myrkyllisyys tai valon aiheuttama fluoresenssin heikkeneminen ei aiheuta ongelmia kokeen aikana. Virtaussytometri mahdollistaa hyvin tarkkojen aikapisteiden mittaamisen,

mutta samalla menetetään mahdollisuus solujen avaruudelliseen tutkimiseen. Jokainen solu antaa yksittäisen tuloksen, eikä tuloksissa päästä varsinaisesti ”endosomitasolle” (Murphy ym., 1984).

Biologisten rakenteiden pH:n mittaamiseen on kehitelty myös geneettisesti koodattuja fluoresoivia proteiineja (E¹GFP). Fuusioproteiinit mahdollistavat sen ettei soluun tarvitse syöttää tai liittää erillisiä leimoja ennen kuvaamista, vaan solut voidaan pitää mahdollisimman koskemattomina. Fuusioproteiinit ovat hyvin spesifisiä ja ne voidaan ohjata solussa haluttuihin rakenteisiin liittämällä fluoresoiva proteiini osaksi solun omaa proteiinia. Fluoresoivat fuusioproteiinit eivät ole soluille myrkyllisiä, niin kuin monet fluoresoivat leimat, eivätkä ne pääse vuotamaan rakenteista. Vaikka menetelmä edustaakin erittäin kehittyntä solubiologista tutkimusta se perustuu edelleen kaksois-fluoresenssi leimaukseen ja pH-herkän ja pH-vakaan leiman intensiteettien suhteiden määrittämiseen (Serresi ym., 2009).

Fluoresoivilla dextraaneilla kehitetty kaksois-leimaus-menetelmä toimii edelleen monien pH-mittausmenetelmien perustana. Menetelmää on saatu hiottua spesifisemmäksi ja herkemmäksi käyttämällä spesifisiä vasta-aineita, joihin on liitetty fluoresoiva molekyyli tai sitomalla fluoresoiva dextraani spesifiseen reseptoriin. Tällä tavalla fluoresoivat molekyylit saadaan ohjattua soluissa haluttuihin rakenteisiin. Kaksois-fluoresenssi leimaukseen perustuvia pH-mittauksia on tehty liittämällä dextraani-merkkiaineet folaattireseptoriin sekä liittämällä fluoresoiva vasta-aine integriiniin (Lee ym., 1996; Marjomäki, ei julkaistu).

1.2.3 Happamuuden vaikutus vaipattomien virusten avautumiseen

Happamuuden ja ionien vaikutuksista vaipattomien virusten avautumiseen tai viruksen perintöaineksen vapautumiseen tiedetään melko vähän. Suuri osa vaipattomista viruksista kulkeutuu soluihin reseptorivälitteisesti varhaisten endosomien kautta myöhäisiin endosomeihin. Yhtenä merkittävimmistä eroista endosomaalisten rakenteiden välillä pidetään endosomien jatkuvasti alenevaa pH-arvoa kypsymisen aikana. Endosomien pH:n muutos tuntuisi luonnolliselta selitykseltä viruskapsidin avautumisen perusteluksi, mutta luultavasti itse pH:n merkitys on ainakin pikornaviruksilla vähäinen. Pikornaviruksista

mm. enterovirusten, kuten poliovirusten ja echovirusten tiedetään olevan hyvin pH-vakaita, koska ne kestävät ruoansulatuskanavan hapanta ympäristöä infektoidessaan isäntiään (Marjomäki ym., 2002; Bergelson ym., 1993b). Endosomien solulimaa tai soluväliainetta happamampi ympäristö näyttäisi stimuloivan joidenkin virusten, kuten papilloomavirusten kapsidien avautumista tai kapsidissa tapahtuvia konformaatiomuutoksia (Smith ym., 2008). Rinovirusilla tehtyjen uusimpien tutkimusten mukaan suurempi merkitys saattaakin olla nimenomaan endosomien kalvopotentialilla eikä niinkään pH:lla. Rinovirusten RNA:n vapautuminen endosomista ja sitä seuraava viruksen monistuminen ei kokeiden mukaan ole riippuvainen solun sisäisistä pH-gradienteista vaan endosomien negatiivisesta kalvopotentialista (Berka ym., 2009).

1.3 Echovirus 1

1.3.1 Pikornavirukset

EV1 on pieni pikornaviruksiin kuuluva vaipaton virus, jonka perintöaines on positiivijusteinen RNA. EV1:n yksijuosteinen RNA koodaa yhtä polyproteiinia, mikä sisältää kaikki viruksen tarvitsemat rakenteelliset ja ei-rakenteelliset proteiinit. Pikornavirusten proteiinikapsidi muodostuu neljästä kapsidiproteiinista (VP1, VP2, VP3 ja VP4), joista kolme merkittävintä proteiinia (VP1, VP2 ja VP3) muodostavat kapsidin proteiiniuoren, kun taas pienin neljästä kapsidiproteiinista (VP4) sijaitsee varsinaisen proteiiniuoren sisäpuolella. Pikornavirusten proteiinikapsidi on ikosahedraalinen, halkaisijaltaan noin 30 nanometriä ja muodostuu 60 alayksiköstä. Jokainen alayksikkö sisältää yhden jokaista kapsidiproteiinia (VP1-VP4) (Filman ym., 1998).

Pikornavirukset kuuluvat enterovirusiin, joiden tiedetään kestävän hyvin ympäristön pH:n vaihteluita. Tämän ominaisuuden johdosta enterovirukset pystyvät infektoimaan isäntäeläimiään hengityselinten lisäksi myös happaman ruoansulatuskanavan kautta (Filman ym., 1998). Pikornavirukset ovat merkittäviä ihmisten ja eläinten taudinaiheuttajia. Echovirusten lisäksi pikornavirusperheeseen kuuluvat mm. poliovirukset, rinovirukset, hepatiitti A virus sekä suu- ja sorkkatautivirus (DeTulleo ja Kirchhausen, 1998; Joki-Korpela ym., 2001). Ihmisellä EV1 aiheuttaa mm. aivokalvontulehdusta, aivokuumetta, ihottumaa sekä hengityselininfektioita. Aikuisilla ihmisillä EV1 tartunta on

yleensä oireeton, mutta infektiota saattaa olla imeväisikäisillä hengenvaarallinen (Filman ym., 1998).

1.3.2 Echovirus käyttää $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä reseptorinaan

Monet kliinisesti merkittävät virukset, kuten pikornavirukset, hantavirukset ja adenovirukset käyttävät integriini-proteiiniperheen jäseniä reseptoreinaan. Integriinit ovat merkittävimpiä solujen käyttämiä adheesioreseptoreita, joiden avulla solut kiinnittyvät mm. toisiin soluihin ja soluväliaineeseen (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Integriiniperhe muodostuu 14 erilaisesta α -alaysiköstä sekä kahdeksasta erilaisesta β -alaysiköstä, jotka muodostavat yhdessä 20 erilaista integriini-heterodimeeriä. Integriineilla on erilaisia ligandin sitomisominaisuuksia ja solun ympäristöön kiinnittämisen lisäksi ne toimivat soluissa myös signaalien välittäjinä (Hynes, 1987). Integriinit osallistuvat soluissa mm. yksilönkehitykseen sekä immuunipuolustusreaktioihin (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Integriinien luonnollisia ligandeja ovat monet soluväliaineen proteiinit kuten fibronektiini ja vitronektiini, kollageeni, immunoglobuliiniperheen jäsenet (Bergelson ym., 1993a) sekä tyvikalvon laminiinit. (Hynes, 1987).

Integriinejä, joilla on samanlainen $\beta 1$ alaysikkö, kutsutaan VLA-proteiineiksi (Bergelson ym., 1993a). VLA-2 on 150-kDa:n $\alpha 2$ -alaysiköstä sekä kaikille VLA-proteiineille tyypillisestä 130-kDa:n $\beta 1$ -alaysiköstä muodostunut heterodimeeri, joka toimii soluissa usein adheesioreseptorina ja kiinnittää solun soluväliaineen kollageeniin (Hemler, 1990; Bergelson ym., 1993a). EV1 käyttää reseptorinaan solukalvon $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä (VLA-2) (Bergelson ym., 1993a). Virus sitoutuu $\alpha 2\beta 1$ -integriinin $\alpha 2$ -alaysikön I-domeeniin ($\alpha 2I$), jota myös integriinin luonnollinen ligandi kollageeni käyttää sitoutumiseen. Kollageenin ja viruksen sitoutumiskohdat eivät tästä huolimatta ole täysin identtiset (Kamata ym., 1994).

Integriinin $\alpha 2I$ -domeeni sitoutuu EV1:n pinnan kanjoniin. $\alpha 2I$ -domeeni asettuu virukseen sitoutuessaan kahden viruskapsidin alaysikön väliin niin, että se on samanaikaisesti yhteydessä kumpaankin alaysikköön toisen alaysikön VP2 ja toisen VP3 proteiinin kautta. Tällaisessa konformaatioissa $\alpha 2I$ -domeenin metalli-ionista riippuvainen adheesiopaikka (engl. metal ion-dependent adhesion site; MIDAS) osoittaa suoraan kanjonin pohjaa kohti olematta kosketuksissa viruksen pintaan (Xing ym., 2004). $\alpha 2I$ -

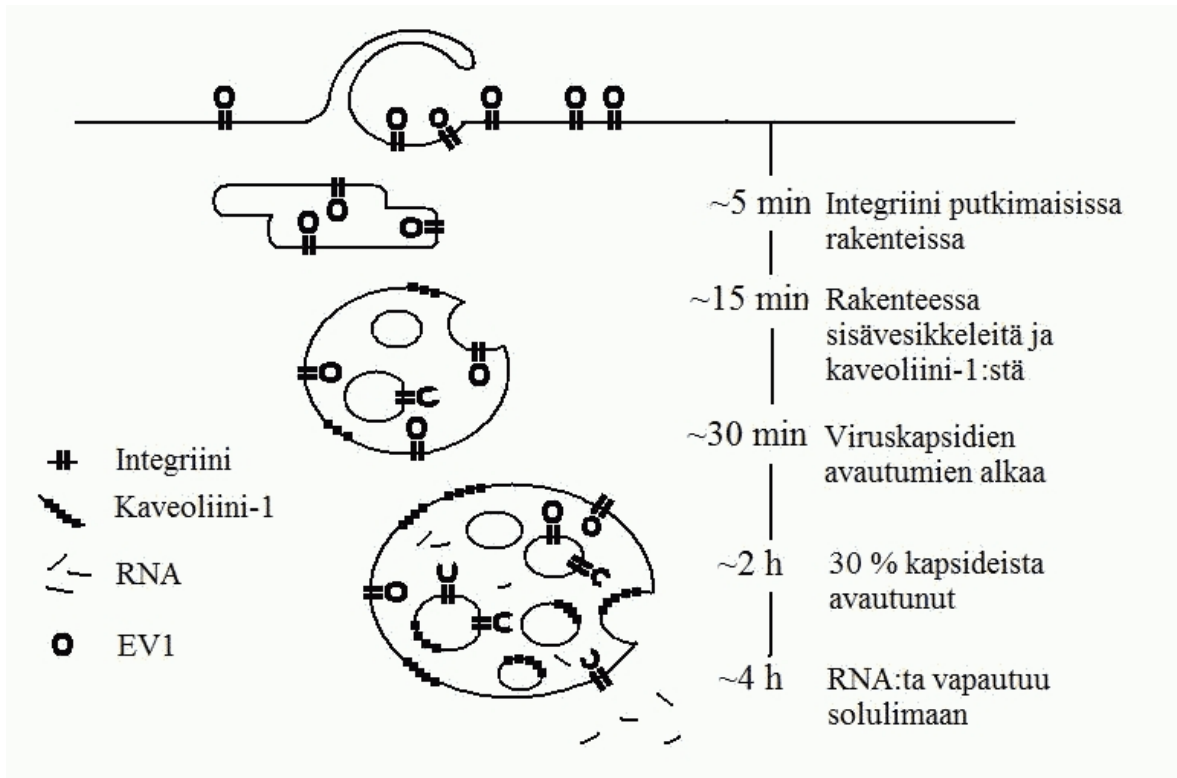
domeenin MIDAS motiivi toimii normaalisti kollageenin sitoutumispaikkana, mutta koska EV1- α 2I-kompleksissa MIDAS hautautuu viruskapsidin kanjoniin, kollageeni ei voi sitoutua α 2 β 1-integriiniin yhtäaikaista viruksen kanssa (Emsley ym., 2000). EV1 joutuu kilpailemaan vapaista reseptoreista integriinin luonnollisten ligandien kanssa, mutta toisaalta omaa noin kymmenkertaisen affiniteetin α 2I-domeeniin kollageeniin verrattuna. Kiderakennemallin perusteella viruksen pentameerin kaikki viisi sitoutumiskohtaa voivat samanaikaisesti sitoa yhden α 2 β 1-integriinin. Sitomalla yhtäaikaista useita α 2 β 1-integriinejä virus luultavasti stimuloi integriinien kautta tapahtuvaa signaalointia sekä edesauttaa kulkeutumistaan solun sisään. Integriiniin sitoutumisen on myös havaittu lisäävän viruskapsidin kestävyttä, mikä luultavasti auttaa viruskapsidia pysymään ehjänä viruksen infektoitessa soluja, jolloin RNA:n ennenaikaisen vapautumisen riski pienenee (Xing ym., 2004). α 2 β 1-integriini sijaitsee solukalvolla kolesteroli- ja sfingolipidirikkaissa domeeneissa eli lipidilautoissa (Brown ja London, 1998; Upla ym., 2004). Erityisesti lipidilautojen kolesteroli on tärkeässä roolissa virusinfektiossa (Simons ja Toomre, 2000).

1.3.3 Echovirus 1:n kulkeutuminen soluun

EV1:n sitoutuminen α 2 β 1-integriiniin saa aikaan viruksen ja reseptorin lateraalisen liikkeen solukalvolla ja virus-reseptori-kompleksien kerääntymisen yhteen. Viruksen ja integriinin on havaittu kulkeutuvan soluun yhtenäisenä kompleksina, integriinin pysyessä heterodimeerisessä muodossa (Marjomäki ym., 2002; Pietiäinen ym., 2004). Virusinfektion edetessä virus ja reseptori ohjataan soluissa kaveosomeiksi kutsuttuihin rakenteisiin, jotka sisältävät runsaasti kaveoliini-1-proteiinia (Karjalainen ym., 2008). Viruksen ja kaveoliinin välillä ei tästä huolimatta ole havaittu yhteyttä solukalvolla, eikä integriiniä tai virusta ole löydetty solukalvon kaveoleista (Pietiäinen ym., 2004; Karjalainen ym., 2008). Vaikka viruksen ja kaveoliini-1-proteiinin esiintyminen samoissa rakenteissa kasvaa infektion edetessä, EV1 ei käytä kaveoleja soluun kulkeutumiseen. SV40:n tiedetään käyttävän kaveosomeja infektoitessaan soluja, mutta kulkeutuu niistä infektion edetessä solulimakalvostoon, kun taas EV1 jää kaveosomeihin (Karjalainen ym., 2008). SV40:n eteneminen kaveosomeista Golgin laitteeseen pystytään estämään mikrotubuluksia hajottavalla nocodazolella, minkä seurauksena SV40 kerääntyy kaveosomeihin. Nokodatsoli-käsittelyllä ja SV40:n avulla on varmistettu että EV1 kerääntyy nimenomaan kaveosomeihin (Pietiäinen ym., 2004).

EV1-infektion kaltainen prosessi pystytään käynnistämään soluissa käsittelemällä $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä spesifisillä primaari- ja sekundaarivasta-aineilla. Vasta-ainekäsittelyn seurauksena integriinit kasautuvat solun pinnalla pieniksi rykelmiksi (engl. cluster), jotka liikkuvat pitkin solun pintaa ja yhdistyvät keskenään muodostaen suurempia rykelmiä. Integriinit näyttäisivät liikkuvan solukalvossa kortikaalisia aktiinisäikeitä pitkin (Upla ym., 2004). EV1:n tavoin vasta-aineilla yhteen kasattu integriini kulkeutuu soluissa ensin putkimaisiin rakenteisiin, jotka sitten solulimassa kypsyvät monivesikkelisiksi rakenteiksi (Karjalainen ym., 2008).

Vasta-ainekäsittelyn integriinin ottaminen solun sisään tapahtuu nopeasti ja jo viiden minuutin jälkeen integriiniä esiintyy sileäpintaisissa putkimaisissa rakenteissa lähellä solukalvoa. Integriini-positiiviset rakenteet ovat kooltaan kaveoleja suurempia eikä niissä ole klatriinivesikkeleille tyypillistä proteiiniakuorta. Viidentoista minuutin jälkeen putkimaiset rakenteet alkavat osoittaa monimutkaisempaa morfologiaa, jolloin niiden koko kasvaa ja niihin alkaa muodostua sisävesikkeleitä ($\alpha 2$ -multivesicular bodies; $\alpha 2$ -MVB) (Karjalainen ym., 2008). Integriinin on havaittu sijaitsevan $\alpha 2$ -MVB-rakenteen rajaavan kalvon kuopakkeissa tai sisävesikkeleiden kalvoilla. Endosomien kypsyessä niihin alkaa kerääntyä myös kaveoliini-1-proteiinia, mikä on luultavasti seurausta monivesikkelisten rakenteiden ja kaveolien fuusioitumisesta solulimassa. Kaveoliini-1-proteiinin kerääntyminen endosomeihin alkaa jo viidentoista minuutin päästä integriinin sisäänoton jälkeen. Endosomien kaveoliini-1-proteiinin ja integriinin määrä kasvaa rakenteissa useiden tuntien ajan (Upla ym., 2004; Karjalainen ym., 2008). EV1 kulkeutuu soluissa samantyyppisiin kaveoliini-1- ja integriini-positiivisiin rakenteisiin kuin vasta-aineilla käsitelty integriini (Karjalainen ym., 2008) (Kuva 5).



Kuva 5. EV1:n endosytoosireitiksi ehdotettu malli. Nykyisen tiedon mukaan virus kulkeutuu ensin putkimaisiin rakenteisiin, joka kypsyvät solulimassa monivesikkelisiksi rakenteiksi ($\alpha 2$ -MVB). Kypsymisen aikana rakenteeseen alkaa muodostua sisävesikkeleitä sekä kerääntyä kaveoliini-1-proteiinia. Ilmeisesti $\alpha 2$ -MVB-rakenteet yhdistyvät kaveosomien tai kaveoleiden kanssa kypsymisen aikana. (Mukaiilu artikkelista (Karjalainen ym., 2008))

1.3.4 EV1:n käyttämä endosytoosireitti on vielä osittain tuntematon

EV1 näyttää käyttävään solujen infektoimiseen aikaisemmin tuntematonta endosytoosireittiä. EV1 kulkeutuu soluissa kaveosomeiksi kutsuttuihin rakenteisiin klatriinista ja kaveoliinista riippumatonta endosytoosireittiä pitkin (Pelkmans ym., 2001; Marjomäki ym., 2002; Pietiäinen ym., 2004). EV1:n ei ole havaittu olevan yhteydessä golgin laitteen, solulimakalvoston tai klassisten endosomaalisten rakenteiden (varhaiset ja myöhäiset endosomit, lysosomit) kanssa. EV1 ilmeisesti pysyy kaveosomeissa perintöaineksensa vapautumiseen saakka, eikä sitä ohjata normaalille hajottavalle endosytoosireitille lysosomeihin (Marjomäki ym., 2002; Pietiäinen ym., 2004; Karjalainen ym., 2008).

Kaveoliinilla näyttäisi olevan suuri merkitys EV1-infektioon, vaikka virus ei kulkeudu soluihin kaveolivesikkeleissä. Klatriini- ja kaveolivälitteisessä endosytoosissa toimivan

GTPaasi dynamiini II:n rooli on vielä osittain epäselvä ja sen vaikutukset EV1-infektioon vaihtelevat solutyypeittäin (Pietiäinen ym., 2004; Karjalainen ym., 2008). Aktiinitukirangan toiminta on myös tärkeää virus infektiolle ainakin SAOS-soluissa (ihmisen luusyöpäsolulinja), kun taas mikrotubuluksilla ei näyttäisi olevan vaikutusta infektiin tai vaikutus on erittäin pieni (Upla ym., 2004; Pietiäinen ym., 2004; Karjalainen ym., 2008).

Yksi tunnetuista EV1-infektion säätelijöistä on seriini/treoniinikinaasi Pak1, jonka tiedetään osallistuvan soluissa mm. aktiinien dynamiikan säätelyyn. EV1-infektiossa Pak1:n aktivoijana toimii Rho GTPaasi Rac1. Pak1:n aktivoitumisen lisäksi myös proteiini kinaasi C:n (PKC), PI3K:n ja fosfolipaasi C:n (PLC) toiminta on välttämätöntä EV1-infektiolle (Karjalainen ym., 2008; Upla ym., 2008). Monet EV1-infektioon vaikuttavista yhdisteistä kuten PLC, PI3K, Rac1 ja Pak1 yhdistetään myös makropinosytoosin. Vaikuttaa siltä, että ainakin osa EV1-infektion säätelijöistä on yhteisiä makropinosytoosin kanssa (Karjalainen ym., 2008).

Na^+/H^+ -vaihtajalla näyttäisi myös olevan tärkeä rooli EV1-infektiossa ja endosomien kypsymisessä. Na^+/H^+ -vaihtajan inhibointi 5-[N-etyyli-N-isopropyyli]amiloridilla (EIPA) ennen viruksen lisäämistä estää infektiin kokonaan ja lisätynä infektiin jälkeen amiloridi estää endosomien kypsymisen solulimassa, jolloin rakenteet jäävät putkimaisiksi ja sijaitsevat solukalvon tuntumassa. EIPA myös estää kaveoliini-1 kerääntymisen virusta sisältäviin rakenteisiin (Karjalainen ym., 2008).

1.3.5 Kalpaiinit ovat välttämättömiä EV1:n replikaatiolle

Kalpaiinit ovat proteaaseja ja kuuluvat ihmisellä 14-jäseniseen kalpain-perheeseen. Vaikka osa kalpaiineista on kudosspesifisiä, niitä on löydetty kaikista solutyypeistä. Kalpaiinit liitetään usein solutukirangan ja solukalvon välisiin vuorovaikutuksiin ja suuri osa niiden kohdeproteiineista onkin aktiiniin tai solutukirankaan liittyviä proteiineja, kuten talin, α -fodrin ja vinkulin (Goll ym., 2003). Kalpaiinit pystyvät hajottamaan $\alpha 2\beta 1$ -integriinien soluliman puoleisia domeeneita sekä muita integriinivälitteiseen signaalointiin liittyviä proteiineja kuten PKC:tä tai RhoA:ta, mikä viittaa siihen, että kalpaiinit pystyvät säätelämään integriinien kautta tapahtuvaa signaalointia. Kalpaiinien aktivoituminen on

usein seurausta kalsiumkonsentraation muutoksista, mutta kalsiumin lisäksi kalpaiineja aktivoivat myös muut tekijät. Kalpaiinien toiminta on tärkeää EV1-infektioille varsinkin replikaation myöhäisissä vaiheissa, perintöaineksen vapautumisen jälkeen. EV1:n on myös havaittu lisäävän kalpaiinien aktiivisuutta infektoimissaan soluissa. Ilman kalpainaktiivisuutta virus ei kykene syntetisoimaan replikaatiolle välttämätöntä 3D-polymeraasia (Upla ym., 2008).

2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tutkimuksen perustana ovat aiemmat havainnot ionigradienttien ja pH-gradienttien mahdollisista vaikutuksista EV1-infektioon SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa. Aiemmissä tutkimuksissa on nähty viitteitä siitä, että EV1-infektion seurauksena syntyvät monivesikkeliset rakenteet olisivat pH-arvoltaan lähes neutraaleja. On myös havaittu että Na^+/H^+ -vaihtajan toiminnan estäminen pysäyttää $\alpha 2$ -integroini-positiivisten rakenteiden kehittymisen ja estää EV1-infektion täydellisesti (Karjalainen ym., 2008).

Tutkimuksessa haluttiin selvittää mikä monivesikkelisten rakenteiden sisäinen pH todellisuudessa on ja tapahtuuko siinä muutoksia rakenteen kypsymisen aikana. Halusimme myös nähdä, onko rakenteiden pH-arvoissa eroja EV1-infektion seurauksena syntyneiden tai vasta-ainekäsittelyllä aikaansaatuisten rakenteiden välillä. Pyrimme myös selvittämään onko solun sisäisillä ionigradien-teilla vaikutusta EV1-infektioon.

Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään

1. Mikä on $\alpha 2$ -monivesikkelisten rakenteiden sisäinen pH
2. Muuttuuko monivesikkelisten rakenteiden pH kypsymisen aikana ja mitä vaikutuksia EV1:llä on tähän tapahtumaan
3. Onko Na^+/H^+ -gradienttiin vaikuttavilla tekijöillä vaikutusta EV1-infektioon

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Solut, virukset ja vasta-aineet

Kokeissa käytettiin SAOS-soluja (ihmisen luusyöpäsoluminija, engl. human osteosarcoma cells; American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA) ja BHK-soluja (hamsterin munuaissoluminija, engl. baby hamster kidney cells). Pääosa kokeista suoritettiin SAOS-soluilla, joihin oli stabiilisti transfektoitu $\alpha 2$ -integriini (SAOS- $\alpha 2\beta 1$ – solut, Ivaska ym., 1999). Tutkimuksissa käytettävät solut kuuluivat SAOS- $\alpha 245$ – soluklooniiin. SAOS-soluja viljeltiin 10 prosenttia FBS-seerumia (Gibco, Gran Island, USA) sisältävässä DMEM:ssä (Gibco), johon oli lisätty 2 mM L-glutamiini (Gibco), 100 IU/ml penisilliiniä (Gibco) sekä 100 mg/ml streptomysiiniä (Gibco) ja BHK-soluja viljeltiin 5 prosenttia FBS-seerumia (Gibco) sisältävässä G-MEM:ssä, johon oli lisätty 10 prosenttinen tryptose phosphate broth. Echovirus 1 (Farouk-kanta, ATCC) oli tuotettu GMK-soluissa (viherapinan munuaissoluminija, engl. green monkey kidney cells; saatu Timo Hyypiältä, Virologian osasto, Turun yliopisto) ja puhdistettu sakkaroosigradienttiajolla (Marjomäki ym., 2002). Vesicular stomatitis virus (VSV) oli tuotettu BHK-soluissa (Gruenberg ja Howell, 1985). Kokeissa käytettiin seuraavia vasta-aineita: $\alpha 2$ -integriinit tunnistavaa A211E10 (Fedor Berditchevskilta, Institute of Cancer Studies, Birmingham, Englanti), vesicular stomatitis viruksen G-proteiinin tunnistavaa anti-VSV-G (271/3) (Sigma, Missouri, USA) ja EV1:sen kapsidiproteiinin tunnistavaa kanin anti-EV1 vasta-ainetta (529 α EV1). pH-mittauksissa sekundaarivasta-aineina käytettiin vuohessa tuotettuja monoklonaalisia hiiren vasta-aineita sekä vuohessa tuotettuja polyklonaalisia kanin vasta-aineita; fluoreskeiini IgG sekä Alexa Fluor® 555 IgG (Invitrogen, CA, USA). Infektiomittauksissa käytettiin vuohessa tuotettua kanin vasta-ainetta ja elektronimikroskopiatutkimuksessa kanissa tuotettua hiiren vasta-ainetta. Elektronimikroskopiassa käytettyyn vasta-aineeseen liitettiin proteiini A:n välityksellä halkaisijaltaan 10 nm kokoisia kultapartikkeleita (G. Posthuma, University Medical Center, Utrecht, Alankomaat).

3.2 pH-mittaus: $\alpha 2$ -MVB

pH-mittauksiin käytettiin Drecktrah'n tutkimusryhmän (2007) artikkelissa kuvattua menetelmää, josta kehittelimme omaan tutkimukseemme soveltuvan menetelmän. pH-mittauksissa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ solujen $\alpha 2$ -integroinien yhteen kasautuminen saatiin aikaan Uplan ym. (2004) artikkelissa kuvatulla menetelmällä. Primaarivasta-aineena käytettiin $\alpha 2$ -integroinin tunnistavaa A211E10-vasta-ainetta ja sekundaarivasta-aineina käytettiin vuohessa tuotettuja hiiren vasta-aineita, pH-herkkää fluoreskeiini-konjugaattia (virittymis aallonpituus 488 nm) sekä pH-vakaata Alexa 555-konjugaattia (virittymis aallonpituus 555 nm) (Invitrogen). Sekundaarivasta-aineiden (laimennettu 1 prosenttia FBS-seerumia sisältävään DMEM:iin) annettiin sitoutua yksi tunti jäällä, minkä jälkeen soluja pestiin kylmällä BSA:ta (5 mg/ ml) sisältävällä PBS:llä (3 x 5 min). Tämän jälkeen soluille lisättiin CO₂-riippumaton kasvatusliuos (Gibco, Gran Island, USA), johon oli lisätty 1 prosenttinen FBS-seerumi (Gibco) sekä 2 mM L-glutamiini (Gibco).

Tutkimuksissa, joissa mitattiin $\alpha 2$ -MVB-rakenteen sisäistä happamuutta EV1:sen kanssa ja ilman, integriinin annettiin kulkeutua soluun + 37 °C:een lämmitetyllä objektiivitasolla ja soluja kuvattiin sisään menon edetessä aikapisteissä 5 minuuttia, 15 minuuttia, 30 minuuttia, 1 tunti, 2 tuntia ja 3 tuntia.

Mittauksissa, joissa mukana oli myös EV1 (MOI ~ 100, proteiinipitoisuus 0,5 – 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), virus tartutettiin soluihin jäällä samanaikaisesti primaarivasta-aineen kanssa tunnin ajan 1 prosenttia FBS-seerumia sisältävässä DMEM:ssä. Integriineihin sitoutumattomat virukset sekä vasta-aineet pestiin kylmällä BSA-PBS:llä (sisältää naudan seerumin albumiinia 5 mg/ml, 3 x 5 min). Myös sekundaarivasta-aine käsittely suoritettiin edellä kuvatulla tavalla.

Tutkimuksissa, joissa tarkasteltiin EIPA:n ja monensiinin vaikutusta rakenteen sisäiseen happamuuteen, EIPA (100 μM) tai monensiini (10 μM) lisättiin soluille vasta-aine liuoksissa sekä CO₂-riippumattomassa kasvatusliuoksessa. Integroinien kasautumisen annettiin edetä + 37 °C:ssa kaksi tuntia, minkä jälkeen soluja kuvattiin konfokaalimikroskoopilla + 37 °C:een lämmitetyllä objektiivitasolla.

Standardisuoria varten, vasta-ainekäsiteltyjä soluja käsiteltiin eri pH-arvoisilla (5,5 – 7,0) puskuriliuoksilla (150 mM KCl, 5 mM glukoosi, sekä 15 mM Tris pH-arvossa 7,0 tai 15 mM MES pH-arvoissa 5,5, 6,0 ja 6,5) yhdessä ionofori nigerisiinin (Calbiochem, Darmstadt, Saksa; 20mM) kanssa. Standardisuora saatiin laskemalla sekundaarivasta-aineiden intensiteettien suhde (fluoreskeiini-488/Alexa-555) eri puskuriliuoksissa. pH-liuokset ja nigerisiini lisättiin soluille vähintään viisi minuuttia ennen kuvausta. Sekundaarivasta-aineiden intensiteettien suhde laskettiin BioImage XD ohjelman segmentointi ja analysointi työkalujen avulla.

Näytteitä tarkasteltiin Axiovert 100 M SP epifluoresenssimikroskoopilla, joka on varustettu konfokaalijärjestelmällä (LSM510, Carl Zeiss, Saksa). Kuvat otettiin Plan Neofluar 63 x/ 1,25 öljyobjektiivilla. Kaikissa kokeissa soluista otettiin 10 kuvaa/ aikapiste tai 10 kuvaa/ käsittely ja jokainen koe suoritettiin samanlaisena kolme kertaa. Jokaisessa erillisessä kokeessa mikroskoopin säädöt pidettiin muuttumattomina koko kuvauksen ajan.

3.3 pH-mittaus: klatriinivälitteisen reitin endosomit

pH-mittausmenetelmän toimivuus haluttiin varmistaa käyttämällä sitä klatriinivälitteisen endosytoosireitin endosomien happamuuden mittaamiseen. Solut pestiin ensin PBS:llä, johon oli lisätty 1 mM CaCl₂ ja 1 mM MgCl₂ (PBS²⁺), minkä jälkeen niitä käsiteltiin puolen tunnin ajan jäällä 0,1 mg/ml WGA:lla (Sigma) CO₂-riippumattomassa DMEM:ssä. Ylimääräinen WGA pestiin PBS²⁺:lla (2 x 5 min). VSV:n annettiin sitoutua tunnin ajan jäällä CO₂-riippumattomassa DMEM:ssä, pH 7.4. Sitoutumattomat virukset pestiin pois PBS:llä (5 min). Soluja käsiteltiin happamalla DMEM:llä (20 mM sukkiinaatti, pH 4.9) 30 sekunnin ajan + 37 °C:ssa, minkä jälkeen solut siirrettiin jäähauteelle ja niitä pestiin PBS²⁺:lla (2 x 5 min). Soluja käsiteltiin GlcNAc:lla (60 mM, jossa 5 mg/ ml BSA CO₂-riippumattomassa DMEM:ssä) 30 minuutin ajan jäällä, minkä jälkeen soluja pestiin PBS²⁺:lla (2 x 5 min). Primaarivasta-aineena käytettiin kanissa tuotettua anti-VSV-G (271/3), jonka annettiin sitoutua 40 minuuttia jäällä CO₂-riippumattomassa DMEM:ssä. Sitoutumaton vasta-aine pestiin 0,5 prosenttisella BSA-PBS:llä (3 x 5 min). Sekundaarivasta-aineina käytettiin vuohessa tuotettuja kanin vasta-aineita, pH-herkkää fluoreskeiini-konjugaattia (488 nm) sekä pH-vakaata Alexa 555-konjugaattia (555 nm) (Invitrogen), joiden annettiin tarttua primaarivasta-aineeseen 30 minuuttia jäällä.

Sitoutumattomat vasta-aineet pestiin kylmällä 0,5 prosenttisella BSA-PBS:llä (3 x 5 min). Infektion annettiin edetä kaksi tuntia konfokaalimikroskoopin + 37 °C:een lämmitetyllä objektiivitasolla. Kuvauksen ajan soluilla oli CO₂-riippumaton DMEM, jossa 5 mM glukoosia. Soluja kuvattiin aikapisteissä 1 tuntia ja 2 tuntia. Standardisuuraa varten solut käsiteltiin samalla tavalla kuin α 2-MVB-rakenteen happamuuden mittauksissa. Näytteitä tarkasteltiin ja kuvattiin konfokaalifluoresenssimikroskoopilla kappaleessa 3.2 kuvatulla tavalla.

3.4 EV1-infektiomittaus

Ionofori monensiinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; 10mM) vaikutusta EV1-infektioon tutkittiin infektoimalla SAOS- α 2 β 1 soluja EV1:llä ja käsittelemällä soluja monensiinilla eri aikapisteissä. Solulle lisättiin EV1 DMEM:ssä, jossa 1 prosenttinen FBS-seerumi ja annettiin sitoutua integriiniin tunnin ajan jäällä. Ylimääräiset virukset pestiin pois kylmällä 0,5 prosenttisella BSA-PBS:llä (3 x 5 min). Tämän jälkeen virusinfektion annettiin edetä kuusi tuntia +37 °C:ssa 10 prosenttisessa DMEM:ssä. Ionofori monensiini (10 μ M) lisättiin näytteille aikapisteissä 15 min, 30 min, 1h ja 2h (infektion aloituksen jälkeen). Yksi näytteistä käsiteltiin monensiinilla (10 μ M, 1 prosenttinen DMEM) 30 minuuttia ennen vasta-ainekäsittelyn aloittamista. Solja kiinnitettiin 30 minuutin ajan huoneenlämmössä 4 prosenttisella PFA:lla, joka oli laimennettu PBS:ään (Merk, Darmstad, Saksa).

Infektiomittausta varten soluille tehtiin immunofluoresenssivärjäys. Soluja käsiteltiin ensin viisi minuuttia 0,2 prosenttisella Triton X-100 liuoksella, jonka jälkeen solut huuhdeltiin PBS:llä ja käsiteltiin nopeasti 50 mM NH₄Cl:llä. Primaarivasta-aineena käytettiin EV1:sen kapsidiproteiinin tunnistavaa vasta-ainetta 529 α EV1, joka oli laimennettu 3 prosenttiseen BSA-PBS:n. Ylimääräinen vasta-aine huuhdeltiin PBS:llä (3 x 5 min). Sekundaarivasta-aineena käytettiin vuohessa tuotettua kanin vasta-ainetta, joka oli laimennettu 3 prosenttiseen BSA-PBS:n. Ylimääräiset vasta-aineet pestiin PBS:llä (3 x 5 min). Solujen kokonaismäärän laskemista varten solujen tumat värjättiin joko lisäämällä toiseen PBS pesuun Hoechst tumaväri tai käyttämällä DAPI-tumaväriä sisältävää petausainetta. Soluja kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla ja jokaisesta aikapisteestä otettiin yhteensä kymmenen kuvaa. Nämä kymmenen kuvaa edustivat kuvapareja jotka otettiin identtisistä paikoista. Kuvaparin toisessa kuvassa näkyivät infektoituneet solut (EV1:n liitetty vasta-

aine) ja toisessa värjäytyneet tumat eli kaikki solut (myös infektoitumattomat). Kuvista laskettiin kaikkien solujen määrä sekä infektoituneiden solujen määrä ja näistä luvuista laskettiin EV1-infektioprosentti.

3.5 Elektronimikroskopia

Ionofori monensiinin vaikutusta $\alpha 2$ -positiivisten endosomien rakenteeseen tutkittiin myös elektronimikroskopian avulla. SAOS- $\alpha 2\beta 1$ solulle lisättiin primaarivasta-aine A211E10 sekä EV1 1 prosenttisessa DMEM:ssä ja annettiin sitoutua integriiniin tunnin ajan jäällä. Ylimääräiset virukset sekä vasta-aineet pestiin kylmällä 0,5 prosenttisella BSA-PBS:llä (3 x 5 min). Sekundaarivasta-aineena käytettiin kanissa tuotettua hiiren vasta-ainetta (Sigma), jonka annettiin sitoutua 45 minuuttia jäällä. Ylimääräinen vasta-aine pestiin 0,5 prosenttisella BSA-PBS:llä (3 x 5 min). Sekundaarivasta-aineeseen sidottiin proteiini A, johon on kiinnitetty halkaisijaltaan 10 nm kokoisia kultapartikkeleita. Proteiini A:n annettiin sitoutua sekundaarivasta-aineeseen 45 minuutin ajan jäällä. Tämän jälkeen virusinfektion annettiin edetä kuusi tuntia +37 °C:ssa. Ionofori monensiini (10 μ M) lisättiin näytteille aikapisteissä 15 min, 30 min, 1h ja 2h (infektion aloituksen jälkeen). Yksi näytteistä käsiteltiin monensiinilla (10 μ M, 1 % DMEM) 30 minuuttia ennen vasta-ainekäsittelyn aloittamista. Solut kiinnitettiin 2,5 prosenttisella glutaraldehydillä, joka oli laimennettu 0,1 M fosfaattipuskuriin.

Näytteitä pestiin 0,1 M fosfaattipuskurilla (2 x 10 min), minkä jälkeen ne kiinnitettiin tunnin ajan huoneenlämmössä 1 prosenttisella osmiumtetroksidilla (OsO_4), joka oli laimennettu 0,1 M fosfaattipuskuriin. Näytteitä pestiin 0,1 M fosfaattipuskurilla (3 x 10 min), minkä jälkeen niistä poistettiin vesi ensin 70 prosenttisella etanolilla (3 x 5 min) ja sitten 96 prosenttisella etanolilla (3 x 5 min). Näytteet värjättiin 2 prosenttisella uranyyliasetaatilla absoluuttisessa etanolissa 30 min huoneenlämmössä, jonka jälkeen niistä poistettiin vettä vielä absoluuttisella etanolilla (3 x 5 min). Etanolikäsittelyn jälkeen näytteille lisättiin eponia ja näytteiden päälle asetettiin eponilla täytetyt gelatiinikapselit. Eponia polymerisoitiin ensin 24 tuntia + 45 °C:ssa, jonka jälkeen 24 tuntia + 60 °C:ssa. Näytteiden leikkauksen ja hilojen värjäyksen suoritti erikoislaboratoriomestari Raija Vassinen.

Näytteitä tarkasteltiin JEOL 1200EX transmissioelektronimikroskoopilla, joka on varustettu digitaalisella VELETA kameralla (Olympus, USA). Kuvat käsiteltiin ITEM (Soft Imaging System) kuvankäsittelyohjelmalla.

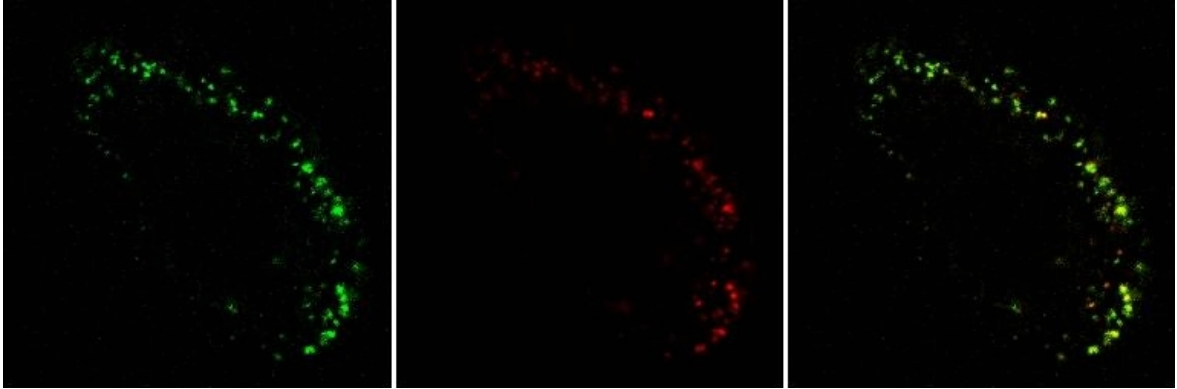
3.6 Tilastollinen analysointi

α 2-integriinien vasta-aineilla yhteen kasuttamisen seurauksena syntyneiden monivesikkelisten rakenteiden ja viruksen synnyttämien rakenteiden pH-arvojen ero varmistettiin tilastollisella analyysillä. pH-mittausten aikapisteiden 30 min ja 60 min arvoille tehtiin kaksisuuntainen varianssianalyysi Excel (Microsoft Office) taulukkolaskentaohjelmalla.

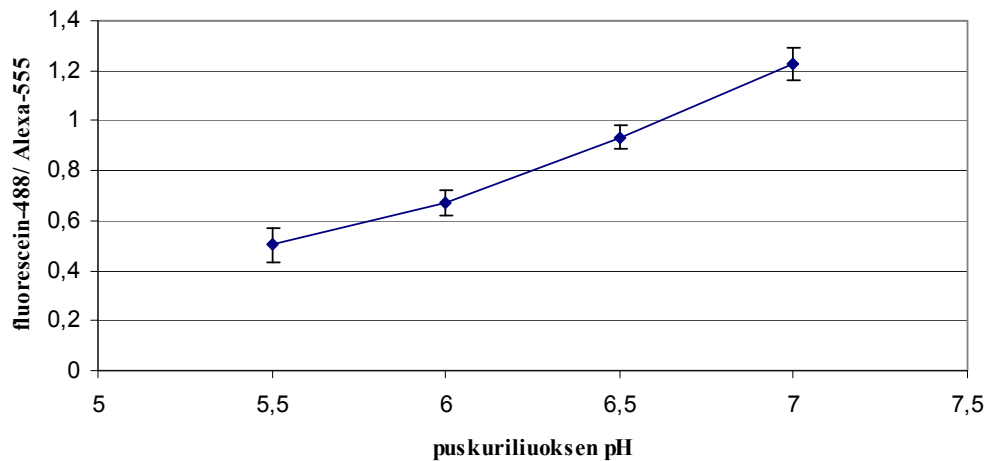
4 TULOKSET

4.1 α 2-MVB-rakenteiden pH-arvon mittaaminen

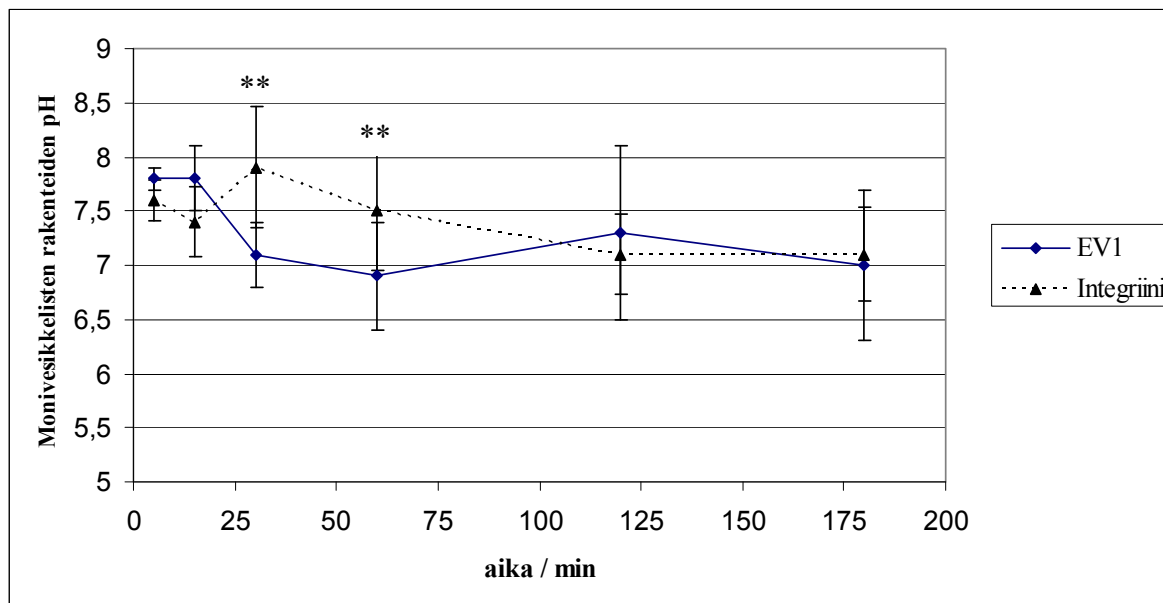
Tutkimuksessa oli tarkoitus selvittää α 2-monivesikkelisten rakenteiden sisäinen pH ja nähdä tapahtuuko siinä muutoksia rakenteen kypsymisen aikana. Koe suoritettiin kasauttamalla integriinit yhteen pelkillä vasta-aineilla (ei virusta) sekä EV1:n kanssa, jolloin nähtiin aiheuttaako virus muutoksia rakenteen pH-arvoon verrattuna vasta-ainekäsittelyllä aikaansaatuihin rakenteisiin. Rakenteiden kypsymistä seurattiin jokaisessa kokeessa kolme tuntia ja soluja kuvattiin aikapisteissä 5 min, 30 min, 60 min, 120 min ja 180 min (Kuva 6). Viitteitä rakenteen neutraalista pH:sta antoi jo pH-herkän fluoreskeiini-488 vasta-aineen pysyminen melko kirkkaana koko kuvauksen ajan. pH-standardisuoran kuvauksessa pH-herkän fluoreskeiini-488:n intensiteetti taas oli pH-arvossa 5.5 jo silminnähten himmeämpi kuin pH-arvossa 7.0 (Kuva 7). Suurimmat erot vasta-aineilla aikaansaattujen ja viruksen synnyttämien rakenteiden pH-arvoissa on havaittavissa aikavälillä 15 min – 60 min, jolloin virus näyttää alentavan rakenteen sisäistä pH:ta suurimmillaan noin yhden pH-yksikön verran. Merkittävin muutos rakenteiden pH:n muutoksessa tapahtuu aikavälillä 15 min – 30 min, jolloin EV1:sen infektoimissa soluissa rakenteen pH laskee jyrkästi, kun taas vasta-aineilla käsitellyissä soluissa pH vastaavasti nousee. Suurimmat erot rakenteiden sisäisissä pH-arvoissa on aikapisteissä 30 min ja 60 min, joissa rakenteiden pH-arvojen ero on tilastollisesti merkitsevä (**). Tuloksista voidaan kuitenkin havaita, että huolimatta havaituista pH:n muutoksista, rakenteen pH pysyy kohtalaisen neutraalina aina kolmeen tuntiin asti (Kuva 8).



Kuva 6. Kuva elävillä soluilla tehdystä pH-mittauksesta, jossa oli mukana myös virus. Tulokset on laskettu fluoreskeiini-488:n (vasemmalla) ja Alexa-555:n intensiteettien suhteesta (keskellä). Kumpikin sekundaarivasta-aine liitettiin mittauksissa $\alpha 2$ -integriiniin, jolloin kumpikin leima kulkeutui soluissa samoihin rakenteisiin (oikealla). Kuvassa integriiniin kasautuminen on edennyt 15 min.



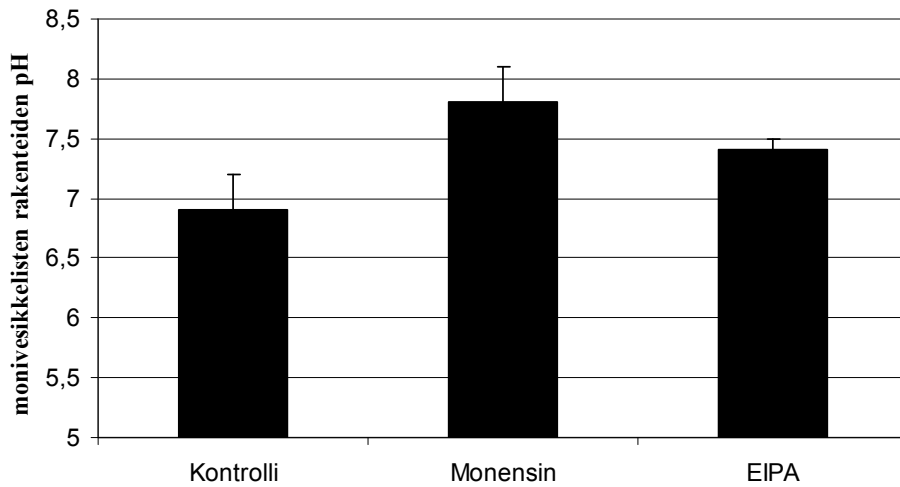
Kuva 7. pH-mittauksen yhteydessä tehty standardisuora. Soluja käsiteltiin eri pH-arvoisilla liuksilla (5,5, 6,0, 6,5 ja 7,0) ja standardisuoraa varten vasta-aineiden intensiteettien suhdetta verrattiin kyseiseen pH arvoon. $\alpha 2$ -MVB-rakenteiden pH-arvo saatiin sijoittamalla kokeesta saatu fluoreskeiini-488/ Alexa-555 suhde standardisuorasta saatuun y-lausekkeeseen (trendisuoran korrelaatiokerroin (R^2) = 0,9867)



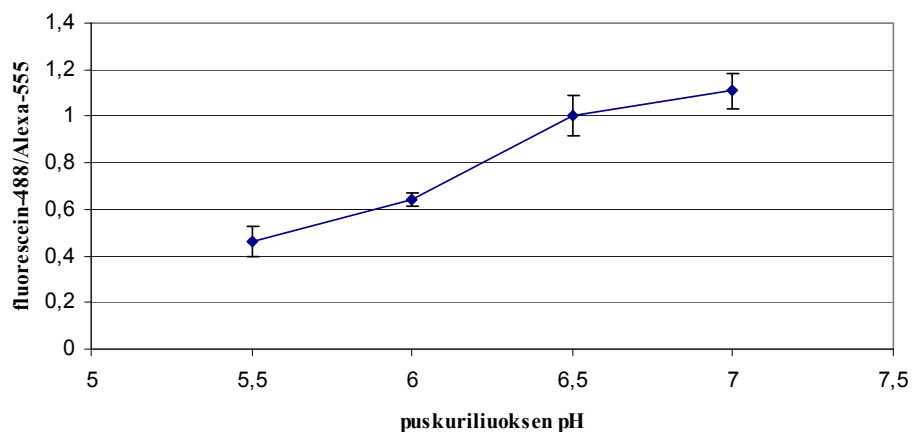
Kuva 8. α 2-MVB-rakenteiden pH:n vaihtelu aikavälillä 5 min – 180 min. Integriinin yhteen kasautuminen suoritettiin vasta-aineilla (integriini) tai siten että mittauksissa oli vasta-aineiden lisäksi mukana myös virus (EV1). Tulokset ovat keskiarvoja kolmesta rinnakkaisesta kokeesta ja jokaista aikapistettä varten on analysoitu 30 solun α 2-integriini-positiiviset rakenteet. pH-arvot on laskettu fluoreskeiini-488:n ja Alexa-555:n fluoresenssien intensiteettien suhteesta (\pm SE). Tuloksista lasketun binomisen T-testin mukaan aikapisteissä 30 min ja 60 min virusta sisältävän rakenteen ja vasta-aineilla yhteen kasautetun rakenteen pH-arvojen ero on merkitsevä. Molemmissa aikapisteissä $p < 0,05$ (**)

4.2 EIPA:n ja monensiinin vaikutus α 2-MVB-rakenteiden pH-arvoon

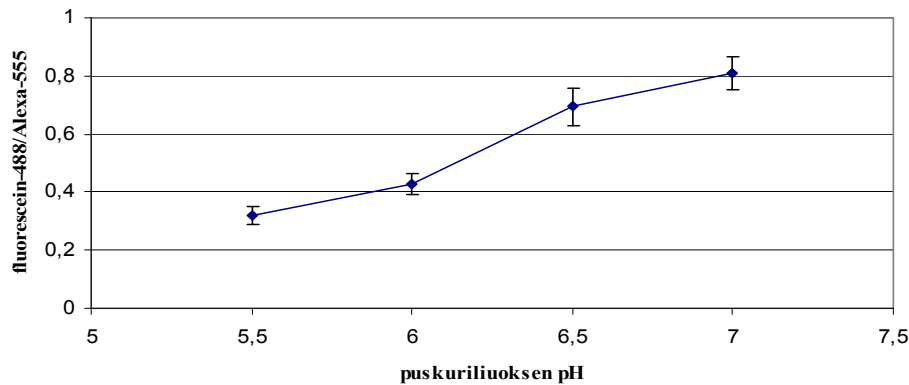
EIPA:n ja monensiinin vaikutusta α 2-MVB-rakenteiden pH-arvoon tutkittiin liittämällä integriiniin pH-vakaa ja pH-herkkä vasta aine ja käsittelemällä soluja samanaikaisesti joko monensiinilla tai EIPA:lla. Integriinin annettiin kulkeutua soluihin kahden tunnin ajan. Tuloksista on nähtävissä, että suoritettavat käsittelyt vaikuttivat jonkin verran tutkittavan rakenteen sisäiseen happamuuteen. EIPA nosti α 2-MVB-rakenteiden pH-arvoa 0,5 pH-yksikköä ja monensiini n. 1,0 pH-yksikköä. Kontrollisoluisissa rakenteiden pH oli 6,9 (SE = 0,3), monensiinilla käsitellyissä soluissa 7,8 (SE = 0,3) ja EIPA:lla käsitellyissä soluissa 7,4 (SE = 0,1) (Kuva 9). Rakenteiden lievästä alkaloitumisesta huolimatta rakenteiden pH pysyy lähellä neutraalia. Kokeet toistettiin samanlaisena kolme kertaa ja jokaisen kokeen päätteeksi mitattiin myös pH-standardisuora sekä EIPA:n (Kuva 10) että monensiinin läsnä ollessa (Kuva 11).



Kuva 9. Elävien solujen pH-mittaus monensiinin tai EIPA:n läsnä ollessa. EIPA:lla ja monensiinilla on kummallakin alkaloiva vaikutus $\alpha 2$ -MVB-rakenteen pH-arvoon verrattuna kontrollimittaukseen. pH-arvot on laskettu fluoresceiini-488:n ja Alexa-555:n fluoresenssien intensiteettien suhteesta ja tulokset ovat keskiarvoja kolmesta rinnakkaisesta tuloksesta (+SE).



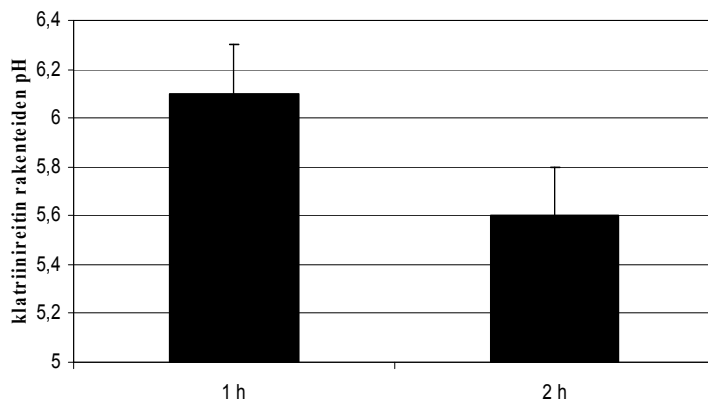
Kuva 10. EIPA-käsiteltyjen solujen pH-mittauksen yhteydessä tehty standardisuora. Soluja käsiteltiin eri pH-arvoisilla liuksilla ja standardisuoraa varten vasta-aineiden intensiteettien suhdetta verrattiin kyseiseen pH-arvoon. Standardisuoraa varten analysoitiin kymmenen solua / pH-arvo. Tulokset ovat laskettu intensiteettien keskiarvoista \pm SE. EIPA:lla käsiteltyjen $\alpha 2$ -MVB-rakenteiden pH-arvo saatiin sijoittamalla kokeesta saatu fluoresceiini-488/ Alexa-555 suhde standardisuorasta saatuaan y-lausekkeeseen ($R^2 = 0,9613$)



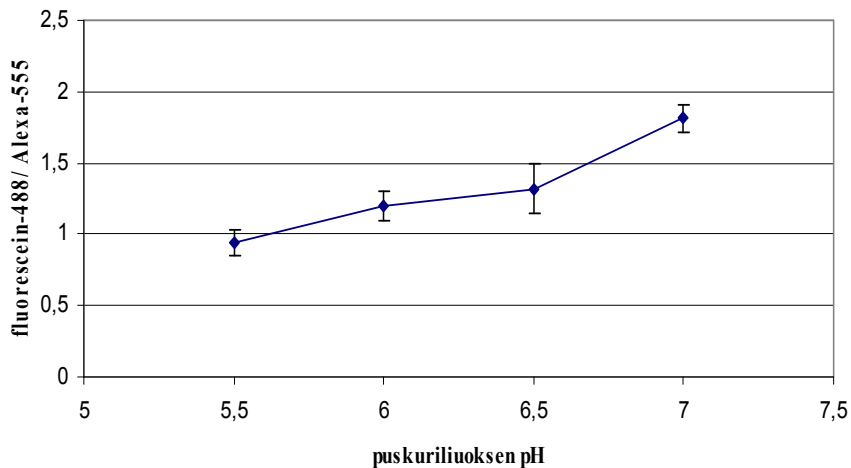
Kuva 11. Monensiinilla käsiteltyjen solujen pH-mittauksen yhteydessä tehty standardisuora. Soluja käsiteltiin eri pH-arvoisilla liuoksilla ja standardisuoraa varten vasta-aineiden intensiteettien suhdetta verrattiin kyseiseen pH-arvoon. Standardisuoraa varten analysoitiin n. 6 solua / pH-arvo. Tulokset ovat intensiteettien keskiarvoja \pm SE Monensiinilla käsiteltyjen α 2-MVB-rakenteiden pH-arvo laskettiin standardisuoran y-lausekkeen avulla ($R^2 = 0,9698$)

4.3 Klatriinireitin endosomien happamuuden mittaaminen

Kokeen tarkoitus oli osoittaa kehitemmäme menetelmän toimivuus testaamalla sitä tunnettuun endosytoottiseen reittiin. pH-vakaalla ja pH-herkällä vasta-aineella leimattu VSV-G-proteiini kulkeutui klatriinivälitteistä endosytoosireittinä pitkin solun sisäisiin vesikkeleihin. VSV-G-proteiinin annettiin kulkeutua soluihin kahden tunnin ajan. Konfokaalimikroskoopilla otetuissa kuvissa pH-herkkä fluoreskeini-488 oli solun sisäisissä rakenteissa selvästi himmeämpi kuin solujen reunoilla. Tuloksista on nähtävissä miten klatriinireitin endosomit happanevat ajan kuluessa. Tunnin inkubaation jälkeen sisäinen pH on noin 6.1 ja kahden tunnin jälkeen pH on noin 5.6 (Kuva 12). Kokeen päätteeksi soluilla tehtiin standardisuora pH-määrittystä varten (Kuva 13)



Kuva 12. Klatriinivälitteisen endosytoosireitin endosomien happamuuden muutos. Tulokset ovat keskiarvoja yhdestä kokeesta (+SE) ja ne on laskettu fluoreskeiini-488:n ja Alexa-555:n fluoresenssien intensiteettien suhteesta. Kummassakin aikapisteessä on analysoitu n. 7 solun integriini-positiiviset rakenteet.

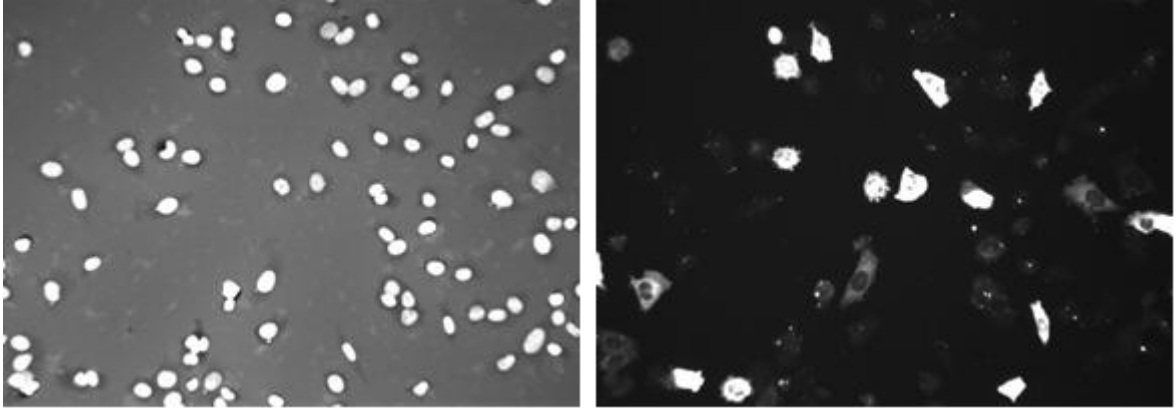


Kuva 13. Klatriinireitin endosomien pH-mittauksia varten mitattu pH-standardisuora. pH-standardisuora on muodostettu fluoreskeiini-488:n ja Alexa-555:n fluoresenssien intensiteettien suhteesta verrattuna käytetyn puskuriliuoksen pH-arvoon +SE. Tulokset ovat intensiteettien keskiarvoja ja jokaista pH-arvoa varten analysoitiin kymmenen solua ($R^2 = 0.9353$).

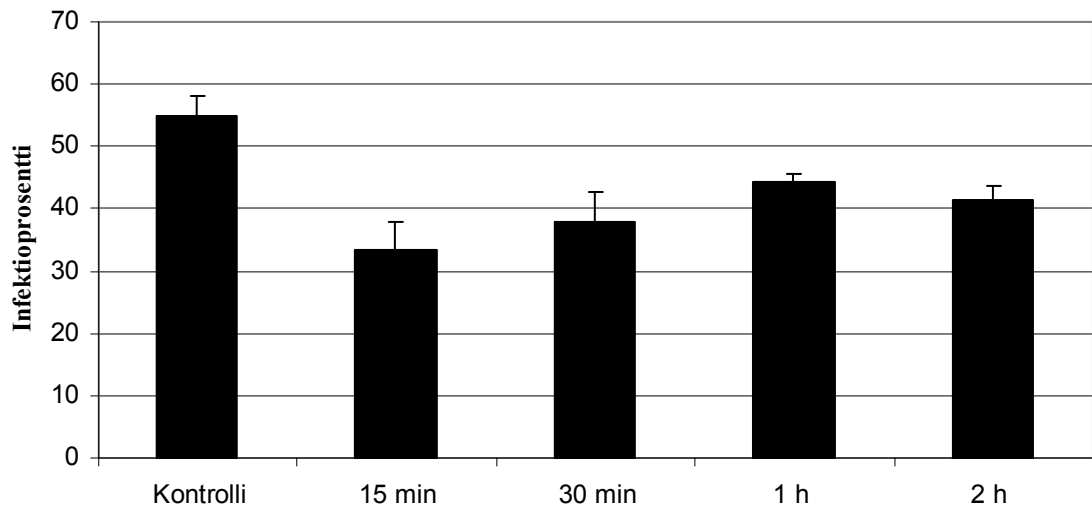
4.4 Monensiinin vaikutus EV1-infektiotehokkuuteen

Monensiinin vaikutusta EV1-infektioon tutkittiin kahdella erillisellä kokeella. Toisessa kokeessa monensiini (10 μ M) lisättiin soluille 30 min ennen virusinfektiota ja toisessa kokeessa infektion jälkeen aikapisteissä 15 min, 30 min, 60 min tai 120 min. Kummassakin kokeessa EV1-infektion annettiin edetä kuusi tuntia. Fluoresenssimikroskoopilla otetuista kuvista laskettiin infektioprosentti vertaamalla infektoituneiden solujen suhdetta kaikkiin soluihin (Kuva 14). Monensiini alensi infektiota 42 prosentilla lisättynä soluille 15

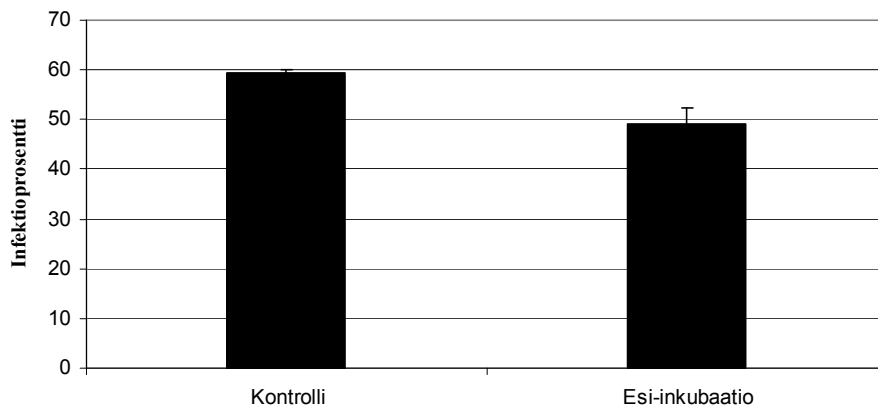
minuuttia infektion jälkeen ja 35 prosentilla lisättyä soluille 30 minuuttia infektion jälkeen. Tunnin inkubaation jälkeen monensiini ei huomattavasti muuttanut infektioprosenttia (Kuva 15). Monensiinin lisääminen soluille ennen viruksen lisäämistä alensi infektiota noin 17 prosentilla verrattuna käsittelemättömiin soluihin (Kuva 16).



Kuva 14. SAOS-soluilla tehdyt infektiomittaukset viruksen ja monensiinin läsnä ollessa. Vasemmalla DAPI-tumavärillä värjätyt tumat, joista laskettiin solujen kokonaislukumäärä. Oikealla infektoituneet solut, jotka värjättiin viruksen kapsidiproteiiniin liitettävällä fluoresoivalla vasta-aineella.



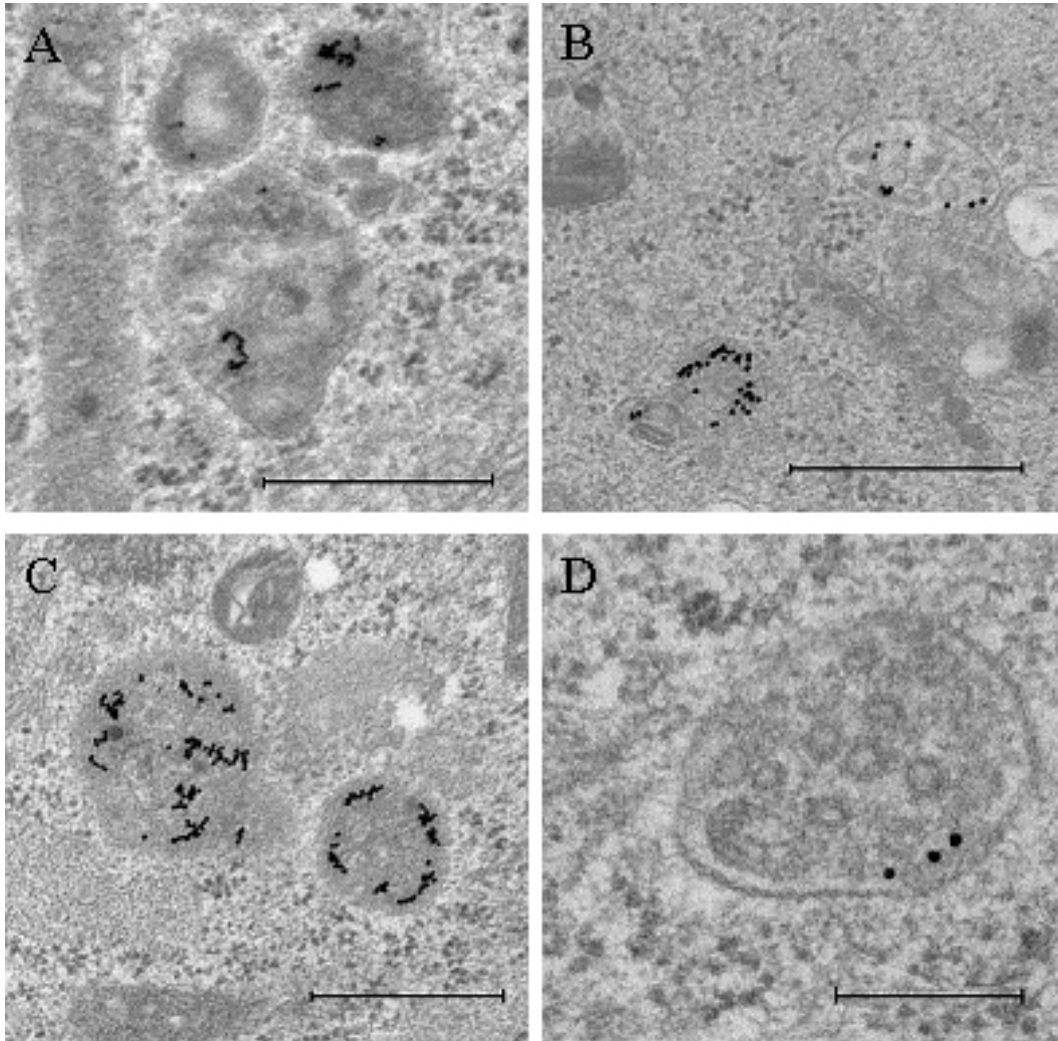
Kuva 15. Monensiinin vaikutus EV1-infektioon SAOS- α 2 β 1-soluissa. Monensiini on lisätty soluille eri aikapisteissä infektion jälkeen. Tulokset on laskettu kahden rinnakkaisen kokeen keskiarvoista (+SE). Jokaista aikapistettä kohden analysoitiin kokeesta riippuen n. 3400 – 5900 solua.



Kuva 16. Monensiinin vaikutus EV1-infektioon SAOS- α 2 β 1-soluissa. Kokeessa monensiini on lisätty soluille 30 minuuttia ennen infektiota. Tulokset ovat laskettu kahden rinnakkaisen kokeen keskiarvoista (+SE). Kontrollia varten analysoitiin kokeesta riippuen n. 2400 – 3800 solua ja esi-inkubaatiota varten n. 1700 – 3100 solua.

4.5 Elektronimikroskopia

Elektronimikroskopiolla tutkittiin monensiinin mahdollisia vaikutuksia α 2-monivesikkelisten rakenteiden muodostumiseen tai morfologiaan. Kokeeseen käytettyjä soluja käsiteltiin monensiinilla (10 μ M) 30 min ennen infektiota ja infektion jälkeen aikapisteissä 15 min, 30 min, 60 min ja 120 min. EV1-infektion annettiin edetä kuusi tuntia. Elektronimikroskoopilla tarkasteltiin solujen proteiini A-kulta-positiivisia rakenteita (Kuva 17). Silmämääräisesti tarkasteltuna monensiini ei aiheuttanut merkittäviä muutoksia rakenteen morfologiaan, joten koetta ei uusittu eikä rakenteita analysoitu tarkemmin.



Kuva 17. Monensiinin vaikutusten elektronimikroskooppinen tarkastelu. Integriini on kokeessa kasautettu yhteen vasta-ainekäsittelyllä sekä viruksella. Primaari- ja sekundaarivasta-aine kompleksiin on liitetty proteiini A-kultapartikkeleita. Kaikissa kuvissa (A-D) on kuvattu proteiini A-kultaa sisältäviä rakenteita, jotka monensiinikäsittelystä huolimatta kehittyivät soluissa normaalisti. Erityisesti kuvassa D on selvästi nähtävissä $\alpha 2$ -MVB-rakenteelle tunnusomaisia sisävesikkeleitä. (A) Kontrolli, mittajana 500 nm. (B) Monensiini on lisätty aikapisteessä 30 min, mittajana 500 nm. (C) Monensiini on lisätty aikapisteessä 60 min, mittajana 200 nm. (D) monensiini on lisätty aikapisteessä 120 min, mittajana 300 nm.

5 TULOSTEN TARKASTELU

5.1 pH-arvon mittaamiseen käytettävän menetelmän kehittäminen

Tutkimuksen päätavoitteena oli kehittää toimiva mittaamenetelmä $\alpha 2$ -monivesikkelisen rakenteen sisäisen pH:n määrittämiseksi. Menetelmää lähetettiin kehittelemään Olivia Steele-Mortimer'n ryhmän (Drecktrah ym., 2006) kuvaamasta menetelmästä, jossa pH:n mittaamiseen käytettiin erivärisillä fluoresoivilla molekyyleillä vuorattuja dekstraani-merkkiaineita. Merkkiaineista toinen oli pH-vakaa ja toinen pH-herkkä ja pH-arvo määritettiin näiden kahden merkkiaineen intensiteettien suhteen perusteella. pH:n määrittämistä varten tehtiin myös pH-standardisuora, jonka trendiviivan avulla pH-arvot määritettiin.

Aloitimme omat tutkimukset käyttämällä pH:n mittaamiseen dekstraani-merkkiaineita, jotka syötettiin soluihin yhtäaikaaisesti integriinien yhteen kasauttamisen kanssa. $\alpha 2$ -MVB-rakenteen tunnistamiseen käytettiin EV1:seen liitettävää fluoresoivaa leimaa. Aiemmat tulokset osoittivat, että yhtä aikaa integriiniin kasauttamisen kanssa soluille syötetyt dekstraani-merkkiaineet kulkeutuvat hyvällä tehokkuudella integriini-positiivisiin rakenteisiin (Karjalainen ym., 2008). Dekstraani-merkkiaineet aiheuttivat kuitenkin solujen taustaleimautumista, mikä aiheutti ongelmia fluoresoivien leimojen intensiteettien mittauksissa. Aiempien tutkimusten perusteella tiesimme, että $\alpha 2\beta 1$ -integriinien sitominen yhteen primaari- ja sekundaarivasta-aineilla saa soluissa aikaan samanlaisen, makropinosytoosin kaltaisen reitin kuin EV1 (Upla ym., 2004), joten siirryimme käyttämään dekstraani-merkkiaineiden sijaan $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin sitoutuvia fluoresoivia sekundaarivasta-aineita. Dekstraani-merkkiaineista poiketen fluoresoivat sekundaarivasta-aineet pystyttiin kiinnittämään spesifisesti $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin, eikä rakenteiden tunnistamiseen tarvinnut käyttää muita menetelmiä. Alun perin tutkimuksissa käytettiin PFA:lla kiinnitettyjä soluja, mutta myös solujen kiinnittämisestä luovuttiin, koska solut kiinnittävä PFA-käsittely saattaa aiheuttaa solukalvoon huokosia, jolloin neutraalit pesuliokset ja petausaineet olisivat saattaneet vaikuttaa pH-herkän vasta-aineen intensiteettiin ja siten vasta-aineiden intensiteettien väliseen suhteeseen. Mittausmenetelmä kehitettiin sen vuoksi soveltuvaksi elävillä soluilla tehtävään konfokaalimikroskopiaan.

Tutkimuksen alkuvaiheessa pH-määrittystä varten tehtiin erillisiä pH-standardeja joiden perusteella endosomien pH oli tarkoitus määrittää. Määrittystä varten varsinaisten kokeiden yhteydessä soluja kuvattiin myös puskuriliuoksessa, jonka pH oli säädetty tiettyyn arvoon ja jonka avulla oli tarkoitus verrata saatuja intensiteettien suhteita mitattuihin standardiarvoihin. Erillisistä pH-standardisuorista ja kokeessa käytettävästä yhdestä kontrolli pH-pisteestä kumminkin luovuttiin erillisten pH-standardisuorien välisten intensiteettien suhteiden vaihtelun vuoksi. Lopulta päädyimme tekemään jokaiselle kokeelle oman pH-standardin kuvauksen päätteeksi. Tällä menettelyllä kokeen ja standardin välinen vaihtelu saatiin mahdollisimman pieneksi, kun sekä kokeessa että pH-standardisuorassa käytettiin samoja soluja, samoja välineitä ja samoja mikroskoopin säätöjä.

Elävillä soluilla tehdyt kuvaukset osoittautuivat ongelmallisiksi erityisesti kahdesta syystä. $\alpha 2$ -MVB-rakenteiden fuusioituminen yhteen infektion edetessä nosti usein fluoresoivien vasta-aineiden intensiteetit yli fluoresenssimikroskoopin havaintoalueen, jolloin vasta-aineiden suhdetta ei pystytty määrittämään ja toiseksi 8-kuoppalevyjen optiset ominaisuudet vaihtelivat melkoisesti, minkä vuoksi kaikki yksittäiset kokeet suoritettiin aina yhdellä 8-kuoppalevyllä. Intensiteettiarvojen kasvu fuusioitumisesta johtuen ei muuten olisi ollut ongelmallista, mutta koska tarkoituksena oli saada kuvattua soluja kolmen tunnin ajan, ei mikroskoopin säätöjä voinut muuttaa kesken kuvauksen. Myös pH-standardisuoraa varten soluja kuvattiin samoilla mikroskoopin säädöillä.

Menetelmän kehittelystä huolimatta kokeiden tuloksissa ilmeni vaihtelua, mikä on luultavasti seurausta mm. objektiivilasien optisten ominaisuuksien vaihteluista rinnakkaisten kokeiden välillä sekä mikroskoopin lasereiden intensiteettien vähäisestä vaihtelusta kokeen aikana. Analysointimenetelmä sekä solujen yksilölliset erot aiheuttivat luultavasti myös vaihtelua tuloksiin. Kuvausten aikana piti tehdä valinta resoluution ja ajan suhteen. Kuvattaessa suurella resoluutiolla, kuvaamiseen menee enemmän aikaa kuin kuvattaessa pienemmällä resoluutiolla. Päädyimme tutkimuksessamme kuvaamaan soluja suurella resoluutiolla, jolloin jouduimme tekemään kompromissin ajan suhteen.

pH-mittaukset osoittivat, että $\alpha 2$ -MVB-rakenne pysyy lähes neutraalina ainakin kolmen tunnin ajan. Mittaukset osoittivat myös, että EV1 pystyy selvästi happamoittamaan $\alpha 2$ -MVB-rakennetta infektion alkuvaiheessa. Tapa, jolla EV1 manipuloi rakenteen pH-arvoa, on vielä tuntematon. Ehkä EV1 kykenee stimuloimaan tiettyjen pumppujen ja kanavien toimintaa tai estämään niiden toiminnan, mikä vaikuttaa rakenteen sisäiseen pH-arvoon. Tulos on merkittävä, koska EV1:n aiheuttamat muutokset $\alpha 2$ -MVB-rakenteen sisäiseen pH-arvoon ovat tilastollisesti merkitseviä ja itse mittausten menetelmän toimivuus on testattu käyttämällä sitä klatrinivälitteisen endosytoosireitin endosomien pH-arvojen mittaamiseen. Saatu tulos vastaa aiempaa havaintoa klatrinireitin endosomien happamoitumisesta kypsymisen aikana (Futai ym., 2000).

Toimivan pH-mittausmenetelmän avulla halusimme myös selvittää onko EIPA:lla tai monensiinilla vaikutusta $\alpha 2$ -MVB-rakenteen sisäiseen happamuuteen. Aiemmissa tutkimuksissa oli havaittu Na^+/H^+ -vaihtajan estäjällä, EIPA:lla olevan suuri vaikutus EV1-infektioon (Karjalainen ym., 2008). EIPA-käsitellyissä soluissa EV1 pääsi kulkeutumaan solujen sisään, mutta jäi putkimaisiin rakenteisiin solun laitamille eikä pystynyt infektoimaan soluja. EIPA esti infektion alkuvaiheessa muodostuvien putkimaisten rakenteiden kypsymisen monivesikkelisiksi rakenteiksi ja kaveoliini-1:n kerääntymisen rakenteeseen. Tutkimuksessa halusimme selvittää vaikuttaako Na^+/H^+ -vaihtajan toiminnan estäminen paitsi putkimaisten rakenteiden syntyyn, myös rakenteen sisäiseen happamuuteen (Karjalainen ym., 2008).

Aiemmissa tutkimuksissa EIPA:lla on havaittu olevan endosomeja alkaloiva vaikutus ja tämä vaikutus oli nähtävissä myös omissa tuloksissamme (Gekle ym., 1999). EIPA nosti $\alpha 2$ -MVB-rakenteiden pH-arvoa 0,5-yksikköä verrattuna käsittelemättömiin soluihin. Aiemmissa tutkimuksissa oli nähty viitteitä siitä, että $\alpha 2$ -MVB-rakenteissa esiintyisi Na^+/H^+ -vaihtajia (NHE6), mikä tukee havaintoamme EIPA:n alkaloivasta vaikutuksesta (Marjomäki, ei julkaistu). Ilman endosomaalista Na^+/H^+ -vaihtajaa EIPA ei luultavasti vaikuttaisi rakenteen sisäiseen happamuuteen.

Mekanismia, mihin EIPA:n alkaloiva vaikutus perustuu, ei vielä tunneta. Endosomin natrium-ionikonsentraatio on noin kymmenkertainen verrattuna soluliman natrium-

ionikonsentraatioon, mikä teoriassa voimakkaasti ohjaa Na^+/H^+ -vaihtajaa siirtämään protoneita solulimasta endosomiin ja natriumia endosomista solulimaan (Fuchs ym., 1989). Natrium-ionien ja protonien vaihdon pysäyttäminen teoriassa pysäyttää protonien kuljetuksen $\alpha 2$ -MVB-rakenteen sisään, mikä jo itsessään toimii luultavasti alkaloivana reaktiona. Kuljetuksen estäminen saattaa myös lisätä endosomin natrium-ionien reagoitua endosomin vetykarbonaatin (H_2CO_2) kanssa, jolloin endosomeihin saattaa muodostua voimakkaasti alkaloivia yhdisteitä kuten natriumkarbonaattia ($\text{Na}_2^+\text{CO}_3^{2-}$) (ks. yleiskatsaus Harvey, 2009). EIPA tiettävästi estää Na^+/H^+ -vaihtajan toiminnan myös solukalvolla sekä kaikilla muilla kalvoilla, missä vaihtajia esiintyy. Na^+/H^+ -vaihtajat ovat lähes kaikissa soluissa esiintyviä ja soluissa melkein kaikilla kalvoilla esiintyviä entsyymeitä (ks. yleiskatsaus Marshansky ja Futai, 2008), joten todennäköisesti EIPA:n vaikutukset kohdistuvat kokonaisvaltaisesti koko solun toimintaan ja endosomien alkaloituminen on vain yksi seuraus Na^+/H^+ -vaihtajien toiminnan estämisestä.

EIPA:n vaikutukset saattavat osaltaan perustua myös kalvopotentiaalien muutoksiin, mikä saattaa vaikuttaa endosomien kalvoliikenteeseen ja kypsymiseen (ks. yleiskatsaus Harvey, 2009). Kalvopotentiaalın muutokset eivät näy suoraan pH:n muutoksina, mikä tietenkin vaikeuttaa niiden havaitsemista (ks. yleiskatsaus Harvey, 2009). Kalvopotentiaali ja sen muutokset ovat välttämättömiä solujen toiminnalle ja äärimmäinen esimerkki kalvopotentiaalın tärkeydestä on kalvopotentiaalın tärkeys hermosolujen toiminnalle (ks. yleiskatsaus Harvey, 1992). Na^+/H^+ -vaihtajien lisäksi soluissa toimii jatkuvasti suuri määrä erilaisia pumppuja, kuljettajia ja kanavia, jotka vaikuttavat solun kalvopotentiaaliin ja pH-arvoihin (ks. yleiskatsaukset Marshansky ja Futai, 2008 ja Orłowski ja Grinstein, 2007; Mohammad-Panah ym., 2003; Cain ym., 1989).

Tarkastelimme myös monensiinin vaikutuksen $\alpha 2$ -MVB-rakenteen happamuuteen. Monensiini siirtää Na^+/H^+ -vaihtajan tavoin kationeja solukalvon läpi konsentraatiogradienttien suuntaisesti ja myös monensiinilla on aiemmin havaittu olevan endosomien pH-arvoa nostava vaikutus (Maxfield, 1982). Monensiini nosti rakenteiden pH:n noin 7.8:ksi, mikä viittaa siihen, että käsittely tasoitti solun sisäiset natrium-ioni- ja protonigradientit odotusten mukaisesti.

5.2 Monensiini heikentää EV1-infektiotehokkuutta

Koska EIPA:lla on voimakkaasti infektiota estävä vaikutus (Karjalainen ym., 2008), tutkimme myös monensiinin vaikutusta EV1:n infektiotehokkuuteen. Tuloksista nähdään, ettei monensiinin vaikutus infektiin ole yhtä voimakas kuin EIPA:n, joka lähes täydellisesti estää infektion, mutta vaikutus on kuitenkin havaittava. Monensiinin vaikutus on suurimmillaan kun se lisätään soluille infektion varhaisissa vaiheissa, noin 15 – 30 minuuttia infektion jälkeen. Solujen käsittely monensiinilla ennen infektiota alensi myös infektiota. Tulokset viittaavat siihen, että infektion etenemisen kannalta on tärkeää, että etenkin infektion varhaisissa vaiheissa solujen ionikonsentraatiot ovat normaalit. Myös pH:lla näyttää olevan merkitystä infektion tehokkaalle etenemiselle. α 2-MVB-rakenteiden sisävesikkeleiden muodostuminen alkaa soluissa noin 15 min infektion jälkeen (Karjalainen ym., 2008), joten varhaiset aikapisteet ovat merkittäviä mm. rakenteen kehittymisen kannalta. Mielenkiintoista on se, että sekä EIPA että monensiini aiheuttavat kumpikin rakenteiden lievän alkaloitumisen ja heikentävät infektiota, etenkin lisätynä soluille infektion varhaisessa vaiheessa. Tulokset viittaavat siihen, että rakenteen lievästi hapan pH on tärkeä rakenteen kypsymiselle varsinkin infektion alkuvaiheessa. Na^+/H^+ -ionigradientilla näyttäisi myös olevan tärkeä rooli infektion normaalissa etenemisessä. Na^+/H^+ -ionigradientteihin vaikuttavat aineet kuten EIPA ja monensiini vaikuttivat suoraan myös infektiin. EIPA:n vaikutus soluihin oli erittäin voimakas ja vaikutti myös rakenteen morfologiaan. Monensiini ei vaikuttanut itse rakenteeseen, mutta vaikutti silti infektiotehokkuuteen.

Koska monensiini alensi EV1:n infektiotehokkuutta, halusimme nähdä aiheuttaako se EIPA:n tavoin muutoksia α 2-MVB-rakenteiden morfologiaan. EIPA:lla käsitellyissä soluissa, infektion varhaisessa vaiheessa muodostuvat putkimaiset rakenteet eivät jatkaneet kypsymistään soluissa, eikä niihin muodostunut sisävesikkeleitä (Karjalainen ym., 2008). Monensiini käsittely ei havaittavissa määrin vaikuttanut α 2-MVB-rakenteiden morfologiaan ja monensiinista huolimatta niiden kypsyminen vaikutti etenevän soluissa normaalisti. Kokeen luonteen vuoksi tarkastelluista soluista ei voi varmuudella sanoa ovatko ne infektoituneita, koska proteiini A-kulta on liitetty integriiniin viruksen sijaan. Kaikissa tarkastelluissa α 2 β 1-integriini-positiivisissa rakenteissa oli kumminkin selvästi nähtävissä sisävesikkeleitä ja rakenteet muistuttivat toisiaan monensiinikäsittelystä

huolimatta. Tulokset viittaavat siihen, että rakenteen sisäisellä pH:lla ei ole huomattavaa vaikutusta rakenteen biogeneesiin. Täten EIPA:n voimakas rakenteen biogeneesiä inhiboiva vaikutus välittyy todennäköisesti muiden tekijöiden, kuin suoranaisen pH:n vaikutuksen kautta.

LÄHTEET

- Aderem, A. ja Underhill, D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17:593-623.
- al-Awqati, Q. 1995. Chloride channels of intracellular organelles. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7:504-508.
- Barnett-Norris, J., Lynch, D. ja Reggio, P.H. 2005. Lipids, lipid rafts and caveolae: their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system. *Life Sci.* 77:1625-1639.
- Bergelson, J.M., Chan, B.M., Finberg, R.W. ja Hemler, M.E. 1993a. The integrin VLA-2 binds echovirus 1 and extracellular matrix ligands by different mechanisms. *J.Clin.Invest.* 92:232-239.
- Bergelson, J.M., St John, N., Kawaguchi, S., Chan, M., Stubdal, H., Modlin, J. ja Finberg, R.W. 1993b. Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the alpha 2 subunit of human VLA-2. *J.Virol.* 67:6847-6852.
- Berka, U., Khan, A., Blaas, D. ja Fuchs, R. 2009. Human rhinovirus type 2 uncoating at the plasma membrane is not affected by a pH gradient but is affected by the membrane potential. *J.Virol.* 83:3778-3787.
- Beyenbach, K.W. ja Wiczorek, H. 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J.Exp.Biol.* 209:577-589.
- Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C. ja Rouille, Y. 2006. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J.Virol.* 80:6964-6972.
- Brodsky, F.M. 1985. Clathrin structure characterized with monoclonal antibodies. I. Analysis of multiple antigenic sites. *J.Cell Biol.* 101:2047-2054.
- Brown, D.A. ja London, E. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 14:111-136.
- Cai, T., Wang, H., Chen, Y., Liu, L., Gunning, W.T., Quintas, L.E. ja Xie, Z.J. 2008. Regulation of caveolin-1 membrane trafficking by the Na/K-ATPase. *J.Cell Biol.* 182:1153-1169.
- Cain, C.C., Sipe, D.M. ja Murphy, R.F. 1989. Regulation of endocytic pH by the Na⁺,K⁺-ATPase in living cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:544-548.
- Clement, C., Tiwari, V., Scanlan, P.M., Valyi-Nagy, T., Yue, B.Y. ja Shukla, D. 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J.Cell Biol.* 174:1009-1021.
- Conner, S.D. ja Schmid, S.L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- De Camilli, P. ja Takei, K. 1996. Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron.* 16:481-486.
- DeTulleo, L. ja Kirchhausen, T. 1998. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* 17:4585-4593.
- Di Fiore, P.P. ja De Camilli, P. 2001. Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell.* 106:1-4.
- Drecktrah, D., Knodler, L.A., Howe, D., ja Steele-Mortimer, O. 2007. Salmonella trafficking is defined by continuous dynamic interactions with the endolysosomal system. *Traffic.* 8:212-225.

- Drecktrah, D., Knodler, L.A., Ireland, R. ja Steele-Mortimer, O. 2006. The mechanism of Salmonella entry determines the vacuolar environment and intracellular gene expression. *Traffic*. 7:39-51.
- Edeling, M.A., Smith, C. ja Owen, D. 2006. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7:32-44.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J. ja Liddington, R.C. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell*. 101:47-56.
- Fang, J., Brzostowski, J.A., Ou, S., Isik, N., Nair, V. ja Jin, T. 2007. A vesicle surface tyrosine kinase regulates phagosome maturation. *J.Cell Biol.* 178:411-423.
- Fernandez, I., Ying, Y., Albanesi, J. ja Anderson, R.G. 2002. Mechanism of caveolin filament assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:11193-11198.
- Filman, D.J., Wien, M.W., Cunningham, J.A., Bergelson, J.M. ja Hogle, J.M. 1998. Structure determination of echovirus 1. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 54:1261-1272.
- Fuchs, R., Schmid, S. ja Mellman, I. 1989. A possible role for Na⁺,K⁺-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:539-543.
- Futai, M., Oka, T., Sun-Wada, G., Moriyama, Y., Kanazawa, H. ja Wada, Y. 2000. Luminal acidification of diverse organelles by V-ATPase in animal cells. *J.Exp.Biol.* 203:107-116.
- Gekle, M., Drumm, K., Mildenerger, S., Freudinger, R., Gassner, B. ja Silbermagl, S. 1999. Inhibition of Na⁺-H⁺ exchange impairs receptor-mediated albumin endocytosis in renal proximal tubule-derived epithelial cells from opossum. *J.Physiol.* 520 Pt 3:709-721.
- Gruenberg J ja Howell K.E. 1985. Immuno-isolation of vesicles using antigenic sites either located on the cytoplasmic or the exoplasmic domain of an implanted viral protein. A quantitative analysis. *Eur.J.Cell.Biol.* 38(2):312-21
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. ja Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiol.Rev.* 83:731-801.
- Grimmer, S., van Deurs, B. ja Sandvig, K. 2002. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J.Cell.Sci.* 115:2953-2962.
- Hall, A. ja Nobes, C.D. 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 355:965-970.
- Harvey, W.R. 2009. Voltage coupling of primary H⁺ V-ATPases to secondary Na⁺- or K⁺-dependent transporters. *J.Exp.Biol.* 212:1620-1629.
- Harvey, W.R. 1992. Physiology of V-ATPases. *J.Exp.Biol.* 172:1-17.
- Hemler, M.E. 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu.Rev.Immunol.* 8:365-400.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110:673-687.
- Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 48:549-554.
- Ichimura, T., Hatae, T. ja Ishida, T. 1997. Direct measurement of endosomal pH in living cells of the rat yolk sac epithelium by laser confocal microscopy. *Eur.J.Cell Biol.* 74:41-48.
- Inoue, T., Wang, Y., Jefferies, K., Qi, J., Hinton, A. ja Forgac, M. 2005. Structure and regulation of the V-ATPases. *J.Bioenerg.Biomembr.* 37:393-398.

- Ivaska, J., Reunanen, H., Westermarck, J., Koivisto, L., Kahari, V.M., ja Heino, J. 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.
- Jentsch, T.J. 2007. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J.Physiol.* 578:633-640.
- Joki-Korpela, P., Marjomäki, V., Krogerus, C., Heino, J. ja Hyypiä, T. 2001. Entry of human parechovirus 1. *J.Virol.* 75:1958-1967.
- Kamata, T., Puzon, W. ja Takada, Y. 1994. Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29). *J.Biol.Chem.* 269:9659-9663.
- Karjalainen, M., Kakkonen, E., Upla, P., Paloranta, H., Kankaanpää, P., Liberali, P., Renkema, G.H., Hyypiä, T., Heino, J. ja Marjomäki, V. 2008. A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in alpha2beta1 integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol.Biol.Cell.* 19:2857-2869.
- Kerr, M.C. ja Teasdale, R.D. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 10:364-371.
- Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1:187-198.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A. ja Dautry-Varsat, A. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol.Cell.* 7:661-671.
- Lee, R.J., Wang, S. ja Low, P.S. 1996. Measurement of endosome pH following folate receptor-mediated endocytosis. *Biochim.Biophys.Acta.* 1312:237-242.
- Liang, M., Tian, J., Liu, L., Pierre, S., Liu, J., Shapiro, J. ja Xie, Z.J. 2007. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *J.Biol.Chem.* 282:10585-10593.
- Lingrel, J.B. ja Kuntzweiler, T. 1994. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. *J.Biol.Chem.* 269:19659-19662.
- Marjomäki, V., Pietiäinen, V., Matilainen, H., Upla, P., Ivaska, J., Nissinen, L., Reunanen, H., Huttunen, P., Hyypiä, T. ja Heino, J. 2002. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J.Virol.* 76:1856-1865.
- Marshansky, V. ja Futai, M. 2008. The V-type H⁽⁺⁾-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr.Opin.Cell Biol.*
- Maxfield, F.R. 1982. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J.Cell Biol.* 95:676-681.
- Mayor, S. ja Pagano, R.E. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:603-612.
- McMahon, H.T. 1999. Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr.Biol.* 9:R332-5.
- Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 12:575-625.
- Mellman, I. 1992. The importance of being acid: the role of acidification in intracellular membrane traffic. *J.Exp.Biol.* 172:39-45.
- Mellman, I. ja Warren, G. 2000. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell.* 100:99-112.
- Moffett, S., Brown, D.A. ja Linder, M.E. 2000. Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J.Biol.Chem.* 275:2191-2198.

- Mohammad-Panah, R., Harrison, R., Dhani, S., Ackerley, C., Huan, L.J., Wang, Y. ja Bear, C.E. 2003. The chloride channel ClC-4 contributes to endosomal acidification and trafficking. *J.Biol.Chem.* 278:29267-29277.
- Mousavi, S.A., Malerod, L., Berg, T. ja Kjekken, R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem.J.* 377:1-16.
- Murphy, R.F., Powers, S. ja Cantor, C.R. 1984. Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6. *J.Cell Biol.* 98:1757-1762.
- Nakamura, N., Tanaka, S., Teko, Y., Mitsui, K. ja Kanazawa, H. 2005. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J.Biol.Chem.* 280:1561-1572.
- Naslavsky, N., Weigert, R. ja Donaldson, J.G. 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol.Biol.Cell.* 15:3542-3552.
- Nelson, N. 1992. The vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase--one of the most fundamental ion pumps in nature. *J.Exp.Biol.* 172:19-27.
- Nichols, B.J. ja Lippincott-Schwartz, J. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 11:406-412.
- Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G. ja Chavrier, P. 2003. ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *J.Cell Biol.* 161:1143-1150.
- Ohkuma, S. ja Poole, B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75:3327-3331.
- Orlowski, J. ja Grinstein, S. 2007. Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 19:483-492.
- Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M. ja Helenius, A. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell.* 118:767-780.
- Pelkmans, L. ja Helenius, A. 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:414-422.
- Pelkmans, L. ja Helenius, A. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3:311-320.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. ja Helenius, A. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat.Cell Biol.* 3:473-483.
- Pietiäinen, V., Marjomäki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A. ja Hyypiä, T. 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol.Biol.Cell.* 15:4911-4925.
- Reijngoud, D.J. ja Tager, J.M. 1976. Chloroquine accumulation in isolated rat liver lysosomes. *FEBS Lett.* 64:231-235.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. ja Anderson, R.G. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68:673-682.
- Saito, M., Hanson, P.I. ja Schlesinger, P. 2007. Luminal chloride-dependent activation of endosome calcium channels: patch clamp study of enlarged endosomes. *J.Biol.Chem.* 282:27327-27333.

- Sargiacomo, M., Scherer, P.E., Tang, Z., Kubler, E., Song, K.S., Sanders, M.C. ja Lisanti, M.P. 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:9407-9411.
- Scherer, P.E., Lewis, R.Y., Volonte, D., Engelman, J.A., Galbiati, F., Couet, J., Kohtz, D.S., van Donselaar, E., Peters, P. ja Lisanti, M.P. 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J.Biol.Chem.* 272:29337-29346.
- Schmidt-Rose, T. ja Jentsch, T.J. 1997. Reconstitution of functional voltage-gated chloride channels from complementary fragments of CLC-1. *J.Biol.Chem.* 272:20515-20521.
- Schnitzer, J.E., Liu, J. ja Oh, P. 1995. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J.Biol.Chem.* 270:14399-14404.
- Scott, C.C., Dobson, W., Botelho, R.J., Coady-Osberg, N., Chavrier, P., Knecht, D.A., Heath, C., Stahl, P. ja Grinstein, S. 2005. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J.Cell Biol.* 169:139-149.
- Serresi, M., Bizzarri, R., Cardarelli, F. ja Beltram, F. 2009. Real-time measurement of endosomal acidification by a novel genetically encoded biosensor. *Anal.Bioanal Chem.* 393:1123-1133.
- Seto, E.S., Bellen, H.J. ja Lloyd, T.E. 2002. When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes Dev.* 16:1314-1336.
- Sever, S., Damke, H. ja Schmid, S.L. 2000. Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J.Cell Biol.* 150:1137-1148.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P. ja Polo, S. 2005. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:2760-2765.
- Simons, K. ja Toomre, D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1:31-39.
- Smith, J.L., Campos, S.K., Wandinger-Ness, A. ja Ozbun, M.A. 2008. Caveolin-1-dependent infectious entry of human papillomavirus type 31 in human keratinocytes proceeds to the endosomal pathway for pH-dependent uncoating. *J.Virol.* 82:9505-9512.
- Stan, R.V. 2005. Structure of caveolae. *Biochim.Biophys.Acta.* 1746:334-348.
- Swanson, J.A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9:639-649.
- Swanson, J.A. ja Watts, C. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424-428.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V. ja De Camilli, P. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat.Cell Biol.* 1:33-39.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M. ja van Deurs, B. 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol.Biol.Cell.* 13:238-250.
- Ungewickell, E.J. ja Hinrichsen, L. 2007. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr.Opin.Cell Biol.* 19:417-425.
- Upla, P., Marjomäki, V., Kankaanpää, P., Ivaska, J., Hyypiä, T., Van Der Goot, F.G. ja Heino, J. 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.

- Upla, P., Marjomäki, V., Nissinen, L., Nylund, C., Waris, M., Hyypiä, T. ja Heino, J. 2008. Calpain 1 and 2 are required for RNA replication of echovirus 1. *J.Virol.* 82:1581-1590.
- Way, M. ja Parton, R.G. 1996. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett.* 378:108-112.
- Xing, L., Huhtala, M., Pietiäinen, V., Käpylä, J., Vuorinen, K., Marjomäki, V., Heino, J., Johnson, M.S., Hyypiä, T. ja Cheng, R.H. 2004. Structural and functional analysis of integrin alpha2I domain interaction with echovirus 1. *J.Biol.Chem.* 279:11632-11638.
- Yamashiro, D.J., Fluss, S.R. ja Maxfield, F.R. 1983. Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump. *J.Cell Biol.* 97:929-934.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. ja Tashiro, Y. 1991. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J.Biol.Chem.* 266:17707-17712.

LIITE 1.

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

A

A, ampere
 μ A, microampere(s)
mA, milliamper(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

$^{\circ}\text{C}$, degree Celsius
CaM, calmodulin
Cdk, cyclin-dependent kinase
CFP, cyan fluorescent protein
CHAPS, 3-(3-cholamidopropyl)diethylamm onio-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

JCB: STANDARD ABBREVIATIONS

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

E

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

F

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

G

g, gram
 g , unit of gravity
GDP, guanosine diphosphate

GFP, green fluorescent protein
GST, glutathione S-transferase
GTP, guanosine triphosphate
GTPase, guanosine triphosphatase

H

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

I

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

J

JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase

K

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

L

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

M

m, meter
 μm , micrometer(s)
M, molar
mAb, monoclonal antibody
MAPK, mitogen-activated protein kinase

MDCK, Madin–Darby canine kidney

MEM, Eagle's minimum essential medium

MES, 2-(*N*-morpholino)ethane sulfonic acid

min, minute

mo, month

MOI, multiplicity of infection

mol, mole(s)

mol wt, molecular weight

MOPS, morpholino propane sulfonic acid

M, relative molecular mass

N

N, normal (concentration of ionizable groups)

n, number in a study or group

NA, numerical aperture

NAD, nicotinamide adenine dinucleotide

NADH, NAD-reduced

NADP, NAD-phosphate

NADPH, NADP reduced

NBD, nitrobenzoxadiazole

ND, not determined

NEPHGE, nonequilibrium pH gradient

electrophoresis

NGF, nerve growth factor

NLS, nuclear localization signal

No., number

NP-40, Nonidet P-40

NS, not significant

NSF, *N*-ethyl-maleimide sensitive fusion protein

nt, nucleotide

O

OD, optical density

ORF, open reading frame

osM, osmolar

P

PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

PBS, phosphate-buffered saline

PCA, perchloric acid

PCR, polymerase chain reaction

PDGF, platelet-derived growth factor

PFA, paraformaldehyde

Pi, inorganic orthophosphate

Pipes, [1,4-piperazinebis(ethane sulfonic acid)]

PKC, protein kinase C

PLC, phospholipase C

PMA, phorbol myristate

acetate

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride

R

r, correlation coefficient

RBC, red blood cell

RER, rough endoplasmic reticulum

RIA, radioimmunoassay

RNA, ribonucleic acid

mRNA, messenger RNA

siRNA, small interfering RNA

tRNA, transfer RNA

RNAi, RNA interference

RNAase, ribonuclease

RNP, ribonucleoprotein

rpm, revolutions per minute

RT, room temperature

RT-PCR, reverse transcription PCR

S

s, 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)aminomet

hane

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