

Echovirus 1:n endosytoosin karakterisointi

Pro gradu –tutkielma
Petri Rantamäki
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solubiologian osasto
Syksy 2009

ALKUSANAT

Tämä pro gradu –tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella, solubiologian osastolla. Se on valmistunut verkkaiseen tahtiin vaihtelevasta elämäntilanteestani johtuen vuosina 2004–2009. Haluan kiittää tutkielmani ohjaajia FT Dos. Varpu Marjomäkeä sekä FT Paula Uplaa käytännön opastuksesta sekä valaisevista keskusteluista. Kiitokset avusta kuuluvat myös lukuisille muille solubiologian osaston työntekijöille. Erityisesti olen kiitollisuudenvelassa läheisilleni, jotka jaksoivat rohkaista minua.

Jyväskylässä 23.8.2009

Petri Rantamäki

Tekijä: Petri Tapio Rantamäki
Tutkielman nimi: Echovirus 1:n endosytoosin karakterisointi
English title: Characterization of echovirus 1 endocytosis
Päivämäärä:

Sivumäärä: 74 + 2

Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t): Dosentti, akatemiantutkija Varpu Marjomäki
FT Paula Upla

Tiivistelmä:

Endosytoosilla tarkoitetaan aineiden kulkeutumista solun ulkopuolelta sen sisäpuolelle solukalvosta kuroutuvien rakkuloiden välityksellä. Endosytoosi voi olla epäspesifistä tai spesifistä. Spesifisessä endosytoosissa ligandi tarttuu tiettyyn reseptoriin, joka laukaisee reseptori-ligandikompleksin kulkeutumisen solun sisään. Pääasialliset endosytoosin muodot ovat klatriinivälitteinen ja kaveolivälitteinen endosytoosi sekä makropinosytoosi. Klatriinivälitteisessä endosytoosissa klatriiniproteiinilla päällystetty kuopake kuroutuu solun sisään rakkulaksi. Kaveolivälitteisessä endosytoosissa rakkulan ympärille ei muodostu proteiinvaippaa. Ratkaisevaa merkitys on kaveoliini-proteiinilla. Makropinosytoosissa syntyvät rakkulat ovat huomattavasti suurempia kuin klatriini- tai kaveolireittiin liittyvät muodostelmat. Solussa on myös muita endosytoottisia reittejä, jotka eivät ole klatriinista tai kaveoliinista riippuvaisia. Nämä reitit liittyvät usein tietyn lipidikoostumuksen omaaviin alueisiin, lipidilauttoihin solukalvolla. Monet taudinaiheuttajat käyttävät hyväkseen endosytoosia päästäkseen solun sisään.

Echovirus 1 (EV1) on pikornaviruksiin kuuluva ihmisen taudinaiheuttaja. Se on vaipaton virus, jolla on perimänään yksijuosteinen positiivinen RNA. EV1 tarttuu solukalvon $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin. Tämä saa aikaan $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin kertymisen yhteen ja viruksen kuroutumisen solun sisään yhdessä integroinin kanssa. Tunkeutuessaan solun sisään EV1 käyttää hyväkseen monia makropinosytoosiin liittyviä mekanismeja. Infektion myöhäisemmässä vaiheessa viruksen käyttämällä reitillä on myös yhteyksiä kaveoliinia sisältäviin solunsisäisiin rakenteisiin. Viruksen internalisaatio ei ole kuitenkaan riippuvainen kaveoliinista.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli karakterisoida EV1:n ja sen reseptorin $\alpha 2\beta 1$ -integroinin endosytoosiin liittyviä reittejä ja havainnoida tähän reittiin liittyvien rakkuloiden vuorovaikutusta keskenään. Tutkimuksessani tarkastelin erilaisten rakkulaliikennettä häiritsevien myrkkujen vaikutusta EV1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integroinin kulkeutumiseen solussa. Konfokaalimikroskooppikuvista selvitin erilaisille rakkularakenteille tyypillisten molekyylien kolokalisaatiota EV1:n ja sen reseptorin kanssa. Pyrin myös tutkimaan $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä kuljettavien rakkuloiden fuusioitumista. Tämän toteutin soluista erotetulla sytosolilla, joka sisälsi solunsisäisiä rakkuloita.

Tulokseni vahvistivat makropinosytoottisten mekanismien olevan keskeisiä EV1-infektion kannalta. Ne vahvistivat myös kaveoliini-1:tä sisältävien rakenteiden yhteyden EV1:n endosytoosiin. Lisäksi tulokset antavat viitteitä siitä, että reitille liittyvissä rakkuloissa tapahtuu jonkin verran fuusiota ja yhdistymistä infektion jälkeen.

Avainsanat: echovirus 1, $\alpha 2\beta 1$ -integroini, endosytoosi, endosytoottisten rakkuloiden fuusio

Author: Petri Tapio Rantamäki
Title of thesis: Characterization of echovirus 1 endocytosis
Finnish title: Echovirus 1:n endosytoosin karakterisointi
Date:
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Docent, Adjunct professor Varpu Marjomäki
PhD Paula Upla

Pages: 74 + 2

Abstract:

Endocytosis is a cellular mechanism which carries substances from outside of the cell to the cytoplasm. This transport occurs through endocytotic vesicles, which are budding inward from the plasma membrane. Endocytosis can be unspesific or spesific. In specific endocytosis the ligand binds its receptor and the receptor-ligand complex is then carried to cytoplasm. There are different mechanisms for endocytosis. In clathrin-mediated endocytosis clathrin-coated pit in the plasma membrane matures to a cytoplasmic vesicle. Another endocytotic route is caveolae-mediated endocytosis which does not need protein-coat to proceed. An important factor in the route is a protein called caveolin. In macropinocytosis vesicles are much bigger than in caveolae- or clathrin-mediated endocytosis. There are also other endocytotic routes in cell which are not dependent on clathrin or caveolin. Lipid rafts of the plasma membrane are important-for these mechanisms. Many pathogens use endocytotic mechanisms to enter inside the cytoplasm.

Echovirus 1 (EV1) belongs to the family *Picornaviridae*. It is a nonenveloped virus which has a positive single-stranded RNA genome. EV1 binds $\alpha 2\beta 1$ integrin on the plasma membrane. It elicits integrin clustering and internalization of the virus. During the first minutes of the entry, EV1 uses macropinocytotic mechanisms. Later, there is a connection to caveolin-containing structures in EV1 internalization.

The aim of this study was to characterize endocytotic routes of EV1 and its receptor $\alpha 2\beta 1$ integrin in cells and also make observations about interactions between cytoplasmic vesicles related to the infection. I studied the effects of specific toxins, which affect vesicle trafficking, as well as EV1 and $\alpha 2\beta 1$ integrin localization in cells. With confocal microscope I analyzed colocalization of different vesicle markers with EV1 or its receptor. I also studied fusion of $\alpha 2\beta 1$ integrin carrying vesicles. With separated cytosol, which contained cytoplasmic vesicles, I performed *in vitro* studies.

Results of this study confirmed that macropinocytotic mechanisms are important in EV1 infection. Results also showed that EV1 endocytosis has a connection to the caveolae-mediated route. In addition they indicated that fusion between vesicles related to EV1 entry route, takes place at least to some extent.

Keywords: echovirus 1, $\alpha 2\beta 1$ -integrin, endocytosis, endocytotic vesicle fusion

SISÄLLYSLUETTELO

Lyhenteet

1. JOHDANTO

1.1. Endosytoosi	7
1.1.1 Klatriinivälitteinen endosytoosi	8
1.1.1.1 Reitille osallistuvat molekyylit	8
1.1.1.2 Klatriinireitin merkitys	12
1.1.2 Kaveolivälitteinen endosytoosi	12
1.1.2.1 Kaveoliini	14
1.1.2.2 Muut kaveolivälitteiseen endosytoosiin osallistuvat molekyylit	16
1.1.2.3 Kaveolivälitteisen reitin merkitys	17
1.1.3 Makropinosytoosi	19
1.1.3.1 Fosfatidylyli-inositoli 3-kinaasi	21
1.1.3.2 Proteiinikinaasi B	22
1.1.3.3 Rho-perheen GTPaasit	22
1.1.3.4 Aktiini ja siihen vaikuttavat proteiinit	23
1.1.3.5 Ras-perhe	24
1.1.3.6 CtBP1/BARS	24
1.1.4. Klatriinista ja kaveoliinista riippumattomat reitit	25
1.1.5. Solunsisäisten rakkuloiden fuusio	25
1.2 Pikornavirukset	26
1.2.1 Echovirus 1	27
1.2.1.1 Patogeenit ja integriinit	28
1.2.1.2 Echovirus1 ja $\alpha 2\beta 1$ -integrini	29
1.2.1.3 Echovirus 1:n endosytoosi	30
1.2.1.4 Echovirus 1:n elinkierron myöhemmät vaiheet	32
1.2.1.5 Echovirus 1:n infektion vaikutukset isäntäsolun geenien ilmentymiseen	33
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	35

3	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	36
	3.1 Solut, virukset ja vasta-aineet	36
	3.2 Immunofluoresenssivärjäykset sekä fluoresenssi- ja konfokaalimikroskopia	37
	3.3 Integriinin kasautumiskoe	38
	3.4 SDS-PAGE ja immunoblottaus	38
	3.5 Solujen käsittely erilaisilla kemikaaleilla	38
	3.6 <i>In vitro</i> - fuusio	39
4	TULOKSET	41
	4.1 Echovirus 1:n internalisaatio	41
	4.2 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasautuminen johtaa endosytoosiin	42
	4.3 Echovirus 1:n kulkeutuminen solussa	45
	4.4 Rakkuloiden <i>in vitro</i> - fuusio	48
5	TULOSTEN TARKASTELU	55
	5.1 Echovirus 1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin internalisaatio sekä makropinosytoosi	55
	5.2 Echovirus 1:n yhteys kaveolivälitteiseen reittiin	56
	5.3 <i>In vitro</i> - fuusio	57
	LÄHTEET	59
	LIITTEET (1 kpl)	

Lyhenteet

Cav1	kaveoliini-1 (engl. caveolin 1)
CBV4	coxsackievirus B4
CCV	klatriinipäällysteinen rakkula (engl. clathrin coated vesicle)
Cdc42	(engl. cell division cycle protein 42)
CTxB	koleratoksiinin B-alayksikkö (engl. cholera toxin B)
EE	varhainen endosomi (engl. early endosome)
EEA1	varhaisen endosomin antigeeni 1 (engl. early endosomal antigen 1)
ER	solulimakalvosto (engl. endoplasmic reticulum)
EV1	echovirus 1
GAP	(engl. GTPase activating protein)
GDI	(engl. GDP-dissociation inhibitor)
G-proteiini	guaniiniin kiinnittyvä proteiini
LE	myöhäinen endosomi (engl. late endosome)
LBPA	lysobisfosfatidihappo (engl. lysobisphosphatidic acid)
PA	fosfatidihappo (phosphatidic acid)
PI3-K	fosfatidyyli-inositoli 3-kinaasi (engl. phosphoinositide 3-kinase)
PIP	fosfatidyyli-inositolifosfaatti (engl. phosphatidylinositol phosphate)
PKB	proteiinikinaasi B
PKC	proteiinikinaasi C
PV1	poliovirus 1
Rac1	(engl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate)
RE	kierrättävä endosomi (engl. recycling endosome)
sER	sileä solulimakalvosto (engl. smooth endoplasmic reticulum)
Src	(engl. sarcoma inducing protein)
SV40	simian virus 40
VLA2	$\alpha 2\beta 1$ -integriini
VP1	viraalinen proteiini 1

1. Johdanto

1.1. Endosytoosi

Endosytoosilla tarkoitetaan aineiden kulkeutumista solun sisään solukalvosta kuroutuvien rakkuloiden avulla (ks. yleiskatsaus Doherty & McMahon 2009). Mikäli kyseessä on suurempien kappaleiden, esimerkiksi pienempien solujen tai solun osien siirtyminen sytoplasmaan puhutaan fagosytoosista eli solusyömisestä. Fagosytoosissa solukalvo ympäröi sisään otettavan kappaleen. Muun muassa monet yksisoluiset alkueläimet ottavat ravintonsa tällä tavoin. Fagosytoosi voi olla spesifistä tai epäspesifistä. Pinosytoosissa eli solujuomisessa solu ottaa sisäänsä nesteitä ja siihen liuenneita aineita epäspesifisesti, ts. ilman, että tietty substraatti tarttuisi siihen sopivaan reseptoriin. Useimmiten pinosytoosissa syntyvät rakkulat ovat hyvin pieniä, mutta soluissa esiintyy myös ns. makropinosytoosia, jolloin rakkulat voivat olla jopa 10 µm:n suuruisia (ks. yleiskatsaus Mercer & Helenius 2009). Reseptorivälitteisessä eli spesifisessä endosytoosissa sisäänotettava ligandi tarttuu reseptoriin, jolloin koko ligandi-reseptori kompleksi kuroutuu solun sisään (ks. yleiskatsaus Sieczarski & Whittaker 2002). Tunnetuin spesifisen endosytoosin muoto on klatriinivälitteinen endosytoosi, joka tapahtuu klatriini-proteiinilla päällystettyjen rakkuloiden välityksellä. Reseptorivälitteinen sisäänotto voi tapahtua myös kaveolivälitteisesti, jolloin rakkulat ovat vaipattomia. Vain vähän tunnettu mekanismi on myös solukalvon lipidilautojen välityksellä tapahtuva endosytoosi.

Klatriinipäällysteiset vesikkelit, makropinosomit sekä eräät muut rakkulat, joiden muodostumiseen ei liity klatriinia eikä kaveoliinia sulautuvat sytoplasmassa varhaisiin endosomeihin (ks. yleiskatsaus Sieczarski & Whittaker 2002). Varhaisesta endosomista kuljetettavat aineet siirtyvät esim. Golgin laitteeseen tai myöhäiseen endosomiin. Ns. kierrättävät endosomit kuroutuvat varhaisesta endosomista ja fuusioituvat solukalvoon. Tällä tavoin solukalvon pinta-ala pysyy vakaana, jatkuvasta endosytoosista huolimatta. Reseptorivälitteisessä endosytoosissa reseptori irtoaa ligandistaan myöhäisen endosomin happamissa oloissa. Myöhäisestä endosomeista kuljetettavat molekyylit voivat siirtyä mm. Golgin laitteeseen tai lysosomeihin hajotettavaksi. Myös Golgin laitteesta voi siirtyä molekyylejä myöhäiseen endosomiin. Kaveolivälitteisellä reitillä kuljetettavat aineet puolestaan siirtyvät kaveosomeiksi kutsuttuihin rakkuloihin, jotka puolestaan ovat vuorovaikutuksessa ER:n Golgin laitteen sekä endosomien kanssa.

1.1.1. Klatriinivälitteinen endosytoosi

Yleisin endosytoosin muoto tapahtuu klatriinilla päällystettyjen kuopakkeiden kautta. Erityisesti soluissa (esim. maksasoluissa ja sidekudossoluissa), joissa endosytoosi on hyvin runsasta, esiintyy klatriinivälitteistä rakkulaliikennettä. Klatriinin lisäksi reitille liittyy monia muitakin proteiineja, kuten adaptoriproteiineja sekä GTP:hen tarttuva dynamiini.

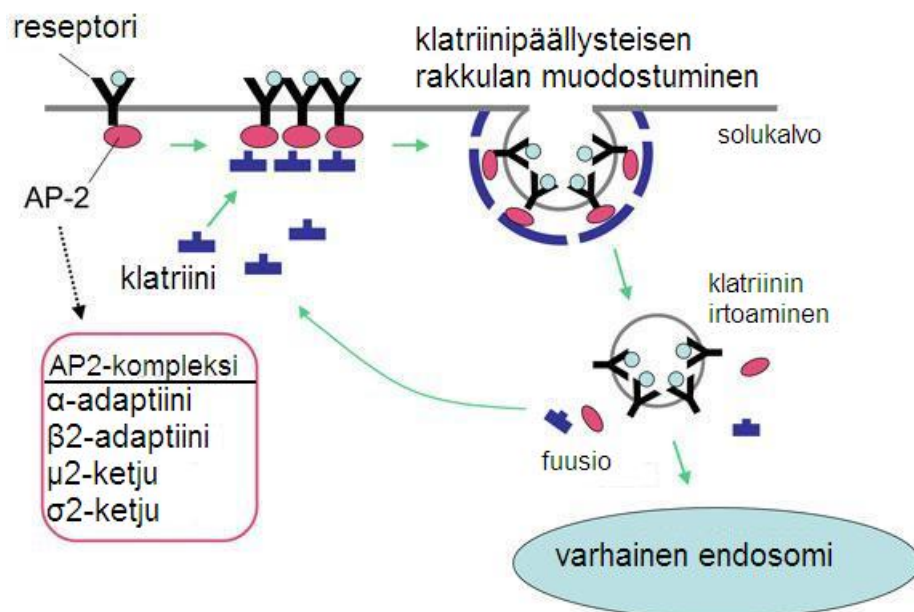
Klatriinilla päällystetyn rakkulan siirtyessä solun sisään sen klatriinivaippa hajoaa suhteellisen varhain (Schlossman ym. 1984). Tämän jälkeen rakkula sulautuu varhaiseen endosomiin, jonka matalassa pH:ssa (n. 6,2) sisään otettu reseptori irtoaa ligandistaan. Varhaisista endosomeista kuljetettavat molekyylit siirtyvät joko kierrättäviin rakkuloihin tai jatkavat edelleen monirakkulaisten rakenteiden kautta myöhäiseen endosomiin (Gruenberg 2001). Kierrättävistä rakkuloista molekyylit, esim. reseptorit, päätyvät takaisin solukalvolle. Myöhäisistä endosomeista puolestaan rakkuloiden sisältö kulkeutuu lysosomeihin hajotettavaksi. Kuljetettavien aineiden kohtalo riippuu osaltaan molekyylin kyvystä sitoutua rakkuloiden lipidikalvoon (Mayor ym. 1993). Mikäli molekyyli kiinnittyy kalvolle, se päätyy kierrättävien endosomien mukana solukalvolle. Jos molekyyli sitä vastoin on nestefaasissa, se kulkeutuu myöhäiseen endosomiin. Kuljetettavien aineiden kohdistumiseen vaikuttavat myös proteiinien aminohappoketjun lajittelusignaalit (Tanowitz & von Zastrow 2003) sekä rakkulan lipidikalvon koostumus (Mukherjee ym. 1999).

On arveltu, että kuljetettavien aineiden siirtyminen rakkulatyypistä toiseen tapahtuisi rakkuloiden kypsymisen kautta (ks. yleiskatsaus Woodman & Futter 2008). Tällöin esimerkiksi varhainen endosomi kypsyisi ensin monirakkulaiseksi rakenteeksi ja edelleen myöhäiseksi endosomiksi. Toisaalta siirtyminen rakkulasta toiseen saattaa tapahtua myös siirtävien rakkuloiden välityksellä (Griffiths & Gruenberg 1991). Mahdollisesti solu käyttää molempia edellä mainittuja tapoja (Rink ym. 2005).

1.1.1.1 Reitille osallistuvat molekyylit

Klatriinivälitteiseen endosytoosiin säätelyyn osallistuu monia molekyylejä. Reitille tunnusomaisimman piirteen muodostaa kuopakkeita reunustava ja rakkuloita ympäröivä klatriinista rakentunut proteiinivaippa (ks. kuva 1.1.). Klatriinimolekyyli muodostuu kolmesta taipuneesta haarasta. Kukin haara koostuu kevyestä ja raskaasta ketjusta (Greene ym. 2000). Klatriini on vuorovaikutuksessa lukuisten molekyyliden kanssa. Klatriinivaippa koostuu klatriinin muodostamista viisikulmioista ja kuusikulmioista (Heuser 1980). Vesikkelin ympärillä olevassa

umpinaisessa vaipassa on aina vähintään 12 viisikulmiota ja vaihteleva määrä kuusikulmioita. Kaarevien klatriinilla päällystettyjen kuopakkeiden lisäksi, solukalvolla on havaittu esiintyvän litteitä klatriinilevyjä. Ne koostuvat lähinnä kuusikulmioista. On mahdollista, että levyt toimivat klatriinin varastoina nopeaa vaipan muodostumista varten. Oletettavasti viisikulmiot vaikuttavat klatriinirakenteen kaarevuuteen ja kuusikulmiot puolestaan kokoon. Klatriinivaipan tehtävä on ilmeisesti pitää reitille osallistuvat molekyylit vakaina ja siten stabilisoida rakkulaa (ks. yleiskatsaus Mousavi ym. 2004).



Kuva 1.1. Solukalvon reseptoreihin tarttuvat ligandit saavat aikaan klatriinipäällysteisen rakkulan kuroutumisen solun sisään. Klatriinivaipan muodostumiseen vaikuttaa muun muassa 4:stä alayksiköstä muodostunut AP2-kompleksi. Sytoplasmassa klatriinivaippa hajoaa ja sen rakenneproteiinit kuljetetaan solukalvolle. Klatriinirakkulat voivat fuusioitua varhaisten endosomien kanssa (muokattu yleiskatsauksesta Grant & Sato 2006).

AP2 on suuri klatriinivälitteiseen kuljetukseen osallistuva proteiinikompleksi, joka koostuu neljästä osasta: α -, β 2-, μ 2- ja δ 2-alayksiköstä. Alayksikkö α kykenee tarttumaan AP-180:een, amfifysiiniin ja endosyyttisiin proteiineihin, jotka sisältävät DPF- tai DPW-motiivin (Owen ym. 2000). Se osallistuu myös AP2:n kuljetukseen solukalvolle. Alayksikkö β 2 on vuorovaikutuksessa klatriinin kanssa (Rapoport ym. 1998). Se osallistuu myös endosytoosin kautta kulkevien molekyylien valintaan. Alayksikkö μ 2:n merkitys on pääasiassa kuljetettavien proteiinien tunnistus ja lajittelu

(Rohde ym. 2002). Se kykenee tarttumaan fosfoinositideihin. Se osallistuu myös AP2-kompleksin kokoamiseen, sillä se vuorovaikuttaa β 2-alayksikön kanssa. Pienikokoinen δ 2-alayksikkö puolestaan säätelee α -alayksikköä (Page & Robinson 1995). Sen mahdollisia muita tehtäviä ei tunneta. AP2-kompleksi toimii ilmeisesti jonkinlaisena siltana solukalvon ja klatriinivaipan välillä. Eräät tutkimukset tukevat näkökantaa, jonka mukaan tietyt reseptorit aiheuttaisivat AP2:n kertymisen määrättyille solukalvon alueelle (ks. yleiskatsaus Mousavi ym. 2004). Tämä puolestaan saisi aikaan klatriinivaipan rakentumisen. Toisaalta monet tulokset viittaavat siihen, ettei reseptoreita välttämättä tarvita AP-2:n siirtymiseksi paikalle.

AP180/CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukaemia) on monomeerinen proteiini. Se sisältää tarttumiskohdat klatriinille sekä AP2:lle (Tebar ym. 1999). AP180/CALM voi myös tarttua PI(4,5)P2:sta (fosfatidyylinoosi-4,5-difosfaatti) sisältäviin kalvoihin (Ford ym. 2001). Proteiini osallistuu klatriinivaipan rakentumiseen. Se välittää klatriinimolekyylien kertymistä solukalvolle (Chen ym. 1998). AP180/CALM on, samoin kuin AP-2, päällystettyjen kuopakkeiden rakenteellinen komponentti ja näin ollen se on välttämätön koko rakkulan muodostuksen ajan.

Epsiini puolestaan osallistuu PI(4,5)P2:n (Itoh ym. 2001), AP-2:n (Owen ym. 1999), klatriinin (Drake ym. 2000) sekä Eps15-proteiinin (Chen ym. 1998) säätelyyn. Se sisältää myös ns. UIM-motiiveja (ubiquitin-interacting motifs), joiden avulla epsiini voi olla vuorovaikutuksessa ubikitiinin kanssa. Kuten AP180/CALM, epsiini osallistuu klatriinivaipan rakentamiseen. Toisin kuin AP180/CALM, se ei ole päällystettyjen kuopakkeiden rakenteellinen osa vaan vaikuttaa lähinnä rakkulan irtautuessa solukalvosta (Ford ym. 2002). Epsiini on tärkeä AP2:n toiminnalle. Tutkimusten perusteella se tarttuu ensin solukalvon PI(4,5)P2-molekyyleihin, jonka jälkeen AP-2 ja monet muut endosyyttiset proteiinit tarttuvat siihen. Epsiinin on havaittu lisäävän liposomien muuttumista putkimaisiksi rakenteiksi. Se pystyy siis vaikuttamaan solukalvon kaarevuuteen.

Eps15 kykenee tarttumaan EH-motiiviansa vaikutuksesta epsiiniin, AP180/CALM:iin, AP-2:een, Numb:iin ja Esc1:een (Cupers ym. 1997). Se voi muodostaa homo- tai heterooligomeerejä Eps15-reseptorin ja Esc1:n kanssa. Eps15 sisältää myös UIM-motiiveja. AP2 ja epsiini voivat tarttua toisiinsa joko Eps15:n välityksellä tai ilman sitä (ks. yleiskatsaus Takei & Haucke 2001).

Dab2 (Disabled protein 2) on molekyyli, joka kykenee tarttumaan PI(4,5)P2:een, AP-2:een ja klatriiniin. Se tarttuu myös proteiineihin, joissa on tyrosiinifosforyloimaton FXNPXY-motiivi, kuten esimerkiksi LDL-reseptoriin, apolipoproteiini E reseptori 2:een ja megaliiniin (Mishra ym. 2002, Morris & Cooper 2001). Dab2 osallistuu erilaisten internalisoitujen reseptorien lajitteluun (Morris ym. 2002a). Koska Dab2 voi tarttua myös myosiini VI:een, on todennäköistä,

että aktiinilla on jonkinlainen osa klatriinivälitteisessä endosytoosissa (Morris ym. 2002b). Sen arvellaan osallistuvan kuopakkeiden syvenemiseen jollain tapaa.

Muita päällystettyjen kuopakkeiden ns. aksessoriproteiineja ovat muun muassa HIP1 (huntingtin-interacting protein 1), hStn2 (human stonin 2), intersektiini/Ese sekä Numb (Metzler ym. 2001, Martina ym. 2001, Sengar ym. 1999, Santolini 1999). Myöhemmin klatriinireitillä vaikuttavia proteiineja ovat esimerkiksi dynamiini, amfifysiini ja endofiliini. Dynamiini on suuri GTPaasi-aktiivinen proteiini. Dynamiineja on kolmea eri tyyppiä (ks. yleiskatsaus Mousavi ym. 2004). Dynamiini I ilmenee pääosin aivoissa, dynamiini II kaikissa kudoksissa ja dynamiini III enimmäkseen kiveksissä. Dynamiini voi tarttua PI(4,5)P₂:een sekä proteiineihin, joissa on SH3-domeeni, esimerkiksi amfifysiiniin, endofiliiniin sekä proteiineihin, jotka kiinnittyvät aktiiniin (Schmid ym. 1998). Dynamiini kykenee myös muodostamaan homo-oligomeerejä. Dynamiini-molekyylit voivat muodostaa rengasmaisia rakenteita (Muhlberg ym. 1997). Tällainen rengas muodostuu solukalvosta irtikuroutuvan vesikkelin kaulaan. Dynamiiniin tarttuneen GTP:n hydrolyysi saa aikaan konformaation muutoksen molekyylissä, joka aiheuttaa renkaan kiristymisen (Takei ym. 1995). Tämä mekaaninen toiminta saa puolestaan aikaan vesikkelin ja solukalvon välisen kaulan kapenemisen ja lopulta katkeamisen kokonaan.

Amfifysiinejä on kahden tyyppisiä (ks. yleiskatsaus Wigge & McMahon 1998). Amfifysiini-1 esiintyy pääasiassa aivoissa. Useista vaihtoehtoisista silmukoitumistavoista johtuen amfifysiini-2 esiintyy erilaisina muunnelmina. Jotkut niistä esiintyvät kaikissa kudostyypeissä. Eri tyyppiset amfifysiinit voivat muodostaa keskenään heterodimeerejä. Amfifysiini kykenee tarttumaan klatriiniin, AP₂:een ja endofiliiniin (Zhang & Zelfhof 2002). Se osallistuu myös dynamiinin ja synaptotransferraasin välisen vuorovaikutuksen välittämiseen. Amfifysiini toimii myös dynamiinin ja klatriinin välisen vuorovaikutuksen välittäjänä (Takei ym. 1999).

Endofiliini on proteiini, jolla on asyyliitransferraasiaktiivisuus (Ringstad ym. 1999). Se voi olla vuorovaikutuksessa sekä dynamiinin, että amfifysiinin kanssa. Endofiliineja on kolmea eri tyyppiä, joilla on kullakin oma kudosspesifisyytensä. Koska endofiliini on asyyliitransferraasi, se voi muuntaa lysofosfatidihapon (LPA) rasva-asetyylikoentsyymi A:n avulla fosfatidihapoksi (PA). Tämän vaikutuksesta endofiliini saa aikaan negatiivisen kaareutumisen irtikuroutuvan rakkulan kaulassa (Schmidt ym. 1999). On arvioitu, että LPA:n muuttaminen PA:ksi saisi yksinkin aikaan rakkulan irtoamisen solukalvosta.

Myös kolesterolilla on vaikutusta klatriinivälitteiseen endosytoosiin. Se vaikuttaa kuopakkeiden syntyyn. Soluissa, joissa kolesterolia on vain vähän, litteät kaareutumattomat klatriinipäällysteiset alueet lisääntyvät (Subtil ym. 1999). Kolesteroli tasapainottaa solukalvoa ja vaikuttaa proteiinien kykyyn saada aikaan kaareutumista solukalvolla (Nossal 2001).

1.1.1.2. Klatriinireitin merkitys

Suurin osa endosytoosin avulla sisään otettavista molekyyleistä kuljetetaan klatriinireitin kautta. Tällä tavoin soluun pääsevät esimerkiksi kolesterolia kuljettava lipoproteiini LDL (low density lipoprotein), rautaa kuljettava transferrini, sokeriaineenvaihduntaa säätelevä hormoni insuliini sekä monet glykoproteiinit.

Monet virukset pääsevät solun sisään klatriinireitin kautta. Esim. adenovirukset 2 ja 5 tarttuvat hengityselimistön epiteelisolujen pinnalla oleviin CAR-molekyyleihin (coxsackievirus B and adenovirus receptor) (Roelvink ym. 1998). Tarttuminen aktivoi integriini-koreseptorit ja laukaisee endosytoosin (Ramaswamy & Hemler 1990), jolloin virukset internalisoituvat klatriinivälitteisesti. Lisäksi adenovirus indusoi myös makropinosytoosin käynnistymisen, vaikka se ei sinänsä kuljetakaan virusta sisään (Meier ym. 2002).

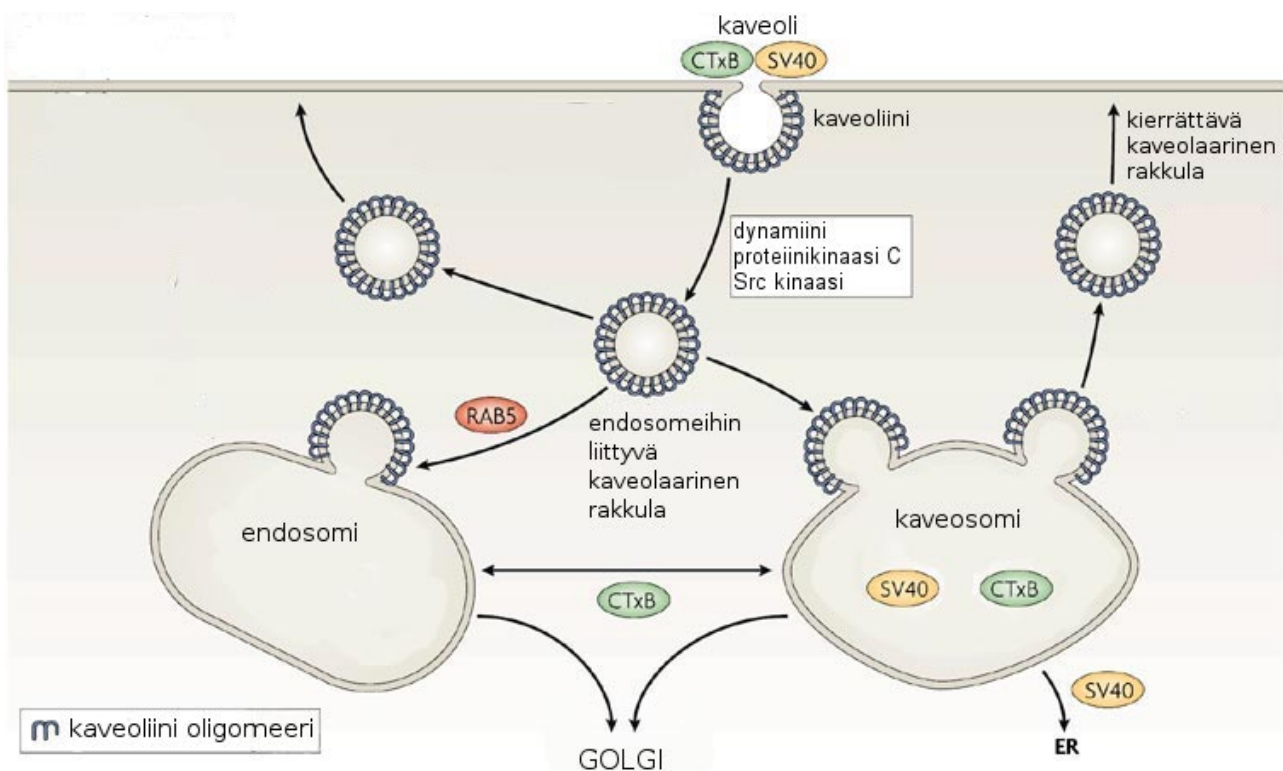
Klatriinivälitteistä endosytoosia käyttävät lisäksi hyväkseen muun muassa influenssavirus (Matlin ym. 1981), tyypin I parechovirus (Joki-Korpela ym. 2001), vesikulaarinen stomatiittivirus (Matlin ym. 1982), ihmisen rhinovirus (Bayer ym. 2001), Epstein-Barr virus kohdistuessaan B-lymfosyytteihin (Miller & Hutt-Fletcher 1992) sekä sytomegalovirus kohdistuessaan epiteelisoluihin (Bodaghi ym. 1999).

1.1.2. Kaveolivälitteinen endosytoosi

Kaveolivälitteinen endosytoosi on eräs mikropinosytoosin muoto. Siinä kaveoleiksi kutsutut solun ulkokalvolle muodostuneet taskut kuroutuvat solun sisään rakkuloiksi, jotka sulautuvat solulimassa oleviin kaveosomeihin. (ks. kuva 1.2.). Kaveolit ovat erikoistuneita mikrodomeeneja solukalvolla. Niitä on runsaasti esimerkiksi hiussuonten sisäseinän endoteelisoluissa. Toisaalta eräät lymfositit ja neuroblastomasolut eivät muodosta kaveoleita lainkaan solukalvolleen. Kaveolit ovat staattisia rakenteita solujen pinnalla, eikä kaveolivälitteinen endosytoosi näin ollen ole jatkuvaa, vaan se aktivoituu tarpeen vaatiessa, tietynlaisen signaalin vaikutuksesta (ks. yleiskatsaus Parton 1996). Kaveoleissa voi olla kasvutekijä- tai adheesioreseptoreita (Couet ym. 1997; Wei ym. 1999). Reitti voi aktivoitua esimerkiksi fosfataaseja inhiboivan okadaaiinihapon vaikutuksesta (Parton ym. 1994). Endoteelisoluissa albumiiniin tarttuvan gp60-proteiinin ja kaveoleissa yleisen proteiinin kaveoliini-1:n vuorovaikutus laukaisee kaveolin kuroutumisen solun sisään (Minshall ym. 2000). Kaveoliinit ovat solukalvon proteiineja, joilla on merkittävä osa kaveolien sisäänkuroutumisessa. Niitä on

runsaasti kaveoleissa ja kaveosomeissa mutta myös muualla solussa. Dynamiini-2, joka osallistuu myös klatriinivälitteiseen endosytoosiin, on välttämätön kaveolivälitteisessä endosytoosissa (Oh ym. 1998).

Kaveolien on havaittu osallistuvan kolesterolin ja pienten molekyylien kuljetukseen (Fielding & Fielding 1995). Kaveolit osallistuvat myös signaalointiin välittämällä tiettyjä molekyyliä solun sisään (Kurzchalia & Parton 1999). Potosytoosi on ilmiö, jossa kaveoli ei kokonaan kurodu sytoplasmaan, vaan on yhteydessä koko ajan solun ulkokalvoon. Potosytoosin avulla solu kykenee mm. kuljettamaan nukleotidien ja aminohappojen aineenvaihduntaan osallistuvaa koentsyymiä, folaattia, sytoplasmaan (Anderson 1993). Myös eräät taudinaiheuttajat hyödyntävät kaveolivälitteistä reittiä kuten simian virus 40 (SV40), hiiren polyoomavirus, filovirus sekä eräät bakteerit (Pelkmans & Helenius 2002; Richterová ym. 2001; Empig & Goldsmith 2002; Shin ym. 2000).



Kuva 1.2. Esimerkiksi SV40 ja koleratoksiini pääsevät solun sisään kaveolivälitteisesti. Kaveolin kuroutuminen solunsisäiseksi rakkulaksi on riippuvainen mm. dynamiinista, proteiinikinaasi C:stä sekä Src-kinaasista. Rakkulat voivat yhdistyä kaveosomeihin tai kulkeutua endosomeihin. Kaveosomit ja endosomit ovat vuorovaikutuksessa keskenään. Molemmista voi kurotua rakkuloita edelleen esimerkiksi Golgin laitteeseen (muokattu yleiskatsauksesta Parton & Simons 2007).

Kaveosomit ovat solulimassa olevia kalvorakkuloita, jotka liittyvät kaveolireittiin. Ne sisältävät tunnusomaisesti kaveoliini-1 -proteiinia (Pelkmans ym. 2001). Kaveosomit kuljettavat sisään ottamiaan tuotteita eri kohteisiin. Esimerkiksi kaveolivälitteisen endosytoosin kautta kulkeva koleratoksiini (CTX) kulkeutuu Golgin laitteeseen, kun taas solujen migraatioon vaikuttava kasvutekijä AMF (autocrine motility factor) kuljetetaan kaveosomien ER:ään (Le & Nabi 2003). Jotkut kaveosomeista näyttävät olevan paikallaan pysyviä, stationaarisia, mutta suurin osa niistä on dynaamisia rakenteita. Kaveosomeille ovat tyypillisiä lyhyet (3-6 μm) ja keskinkertaiset (9-14 μm), sattumanvaraiset liikkeet sekä hallitusti, tiettyyn suuntaan kulkevat pidemmät (20–38 μm) liikkeet (Pietiäinen ym. 2004).

Kaveoleitten syntyminen on yhteydessä solukalvon alueisiin, ns. lipidilauttoihin, joiden rasva-aineiden koostumus poikkeaa ympäröivästä solukalvosta. Tyypillisesti lipidilautoissa on runsaasti sfingomyeliinejä, glykosfingolipidejä, fosfolipidejä, joiden asyyliketjut ovat pitkiä ja tyydyttymättömiä, kolesterolia, GPI:hin (glykosyylifosfatidyyli-inositoli) liittyneitä proteiineja sekä jonkin verran kalvon läpäiseviä proteiineja (ks. yleiskatsaus Simons & Ikonen 1997). Tällaiset lipidilautat eivät liukene ionittomilla detergenteillä (esim. Triton X-100). Termejä DRM (detergent-resistant membrane) ja DIG (detergent-insoluble glycolipid-rich membrane) käytetään usein kuvaamaan lipidilauttoja. Erityisesti kolesterolilla on lipidilautoissa tärkeä osa. Mikäli kolesterolin määrää vähennetään solukalvolla kemiallisella käsittelyllä, kaveolivälitteinen endosytoosi häiriintyy ja monien molekyylien sisäänotto estyy (Edidin 2001).

1.1.2.1. Kaveoliini

Kaveoleille ja kaveosomeille on ominaista kaveoliini-proteiinin läsnäolo. Kaveoliini on kalvoproteiini, jonka molemmat päät ovat sytoplasmassa. Väliin jää 33 aminohapon mittainen solukalvon sisällä oleva hydrofobinen osa, joka on välttämätön kaveolivälitteiselle endosytoosille (Monier ym. 1995). Kaveoliinin karboksyylipää on usein palmityloitu (Dietzen ym. 1995).

Kaveoliinin kaltaiset proteiinit muodostavat geeniperheen. Niiden rakenne on samankaltainen, mutta ominaisuudet ja ilmeneminen eri kudoksissa poikkeavat toisistaan. Tärkeimmät geeniperheen jäsenet ovat kaveoliinit 1, 2 ja 3. Kaveoliini-1:n translaation aloituskohta vaihtelee siten, että sitä esiintyy kahtena erilaisena muotona, α - ja β -kaveoliinina (Scherer ym. 1995). Kaveoliinit vaikuttavat trimeerisiin G-proteiineihin eri tavoin. Kaveoliineista tutkituin, kaveoliini-1 eli VIP21 (vesicular integral membrane protein) esimerkiksi estää G-proteiinin α -alaysikön GTPaasi-aktiivisuuden (Li ym. 1995), kun taas kaveoliini-2 stimuloi sen GTPaasi-

aktiivisuutta (Scherer ym. 1996). Lihassoluissa spesifisesti ilmenevä kaveoliini-3 kykenee konsentraatiosta riippuen joko estämään tai aktivoimaan GTPaasi-aktiivisuutta (Tang ym. 1996). Koska kaveoliinit siis voivat toimia joko ns. GAP- (GTPase activating protein) tai GDI- (GDP-dissociation inhibitor) proteiineina, kaveosomit, joissa kaveoliinia on runsaasti, voivat muodostaa ainakin G-proteiineihin liittyville reseptoreille reaktiokeskuksia (Chun ym. 1994). Muun muassa endoteliinireseptoreiden, jotka liittyvät G-proteiineihin tiedetään sijoittuvan kaveoleihin (ks. yleiskatsaus Parton 1996).

Myös monet kalsium-signalointiin osallistuvat proteiinit ilmenevät kaveoleissa (Fujimoto 1993). Rasvasoluilla suoritetut tutkimukset taas osoittavat kaveolien osallistuvan insuliinisignalointiin. Insuliinikäsittely aiheuttaa rasvasoluissa kaveoliini-1:n tyrosiinifosforylaation (Mastick ym. 1995). Insuliinin tiedetään fosforyloivan lipidiin tarttuneita fosfo-oligosakkarideja (Parpal ym. 1995). Eroteltaessa solukalvon komponentteja liukoisuuden perusteella, kyseisiä fosfo-oligosakkarideja on havaittu detergenttiin liukenemattomassa matalan tiheyden fraktiossa, joissa esiintyy myös kaveolaarisia proteiineja. Tämä viittaa epäsuorasti oligosakkaridien sijaitsevan kaveoleissa. Samanlaisia todisteita on myös keramidista riippuvaiseen reittiin liittyvien molekyylien sijoittumisesta (Liu & Anderson 1995). Tämän kaltaiset tulokset eivät aukottomasti todista kaveolien osuutta signalointireittiin. Saattaa olla, että tutkittavan lipidin tai proteiinin ominaisuudet ovat sellaisia, että ne sijoittuvat kaveoleissa esiintyvien proteiinien fraktioon.

Kaveoliini kykenee tarttumaan kolesteroliin (Murata ym. 1995). Tämä vuorovaikutus säätelee osaltaan endosytoosia. Kokeet osoittavat, että solukalvon kolesteroliaineenvaihdunnan häiritseminen vähentää kaveoleitten kuroutumista sytoplasmaan (Pelkmans ym. 2001). Myös kaveoliinin kyvyllä vuorovaikuttaa lipidien kanssa on merkitystä kaveolaarisen endosytoosin toiminnalle. Lisäksi ainakin kaveoliini-1 kykenee muodostamaan oligomeerejä, jotka edesauttavat kaveoleitten synnyssä (Monier ym. 1995). Kaveoleissa tapahtuvan internalisaation toiminnalle tärkeää on kaveoliini-1:n tyrosiinitähteen fosforylaatio (Le & Nabi 2003). Kemikaalit, jotka inhiboivat fosforylaatiota yleisesti, kuten staurosporiini, tai erityisesti tyrosiinin fosforylaatiota, kuten genisteiini, estävät kaveolivälitteisen endosytoosin. Vastaavasti taas fosfataasi-inhibiittori, kuten okadaaiinihappo, stimuloi kaveolien kuroutumista sytoplasmaan (Parton ym. 1994).

Hiiritutkimuksissa, joissa eläimiltä on estetty kaveoliini-1:n ilmeneminen, on havaittu keuhkojen vajaatoimintaa, verisuonten epänormaalia laajentumista tai supistumista sekä ruokavaliolla aiheutetun ylipainon estymistä (Drab ym. 2001, Razani ym. 2001, Razani ym. 2002). Kaveoliini-2- mutanteilla ei tällaisia oireita havaittu. Kaveoliini-2 esiintyykin usein kaveoliini-1:n yhteydessä, jolloin kaveoliini-1 kenties kompensoi sen toimintaa (Scherer ym. 1997).

Vaikka kaveoliinia onkin aikaisemmin pidetty kaveolaarisen endosytoosin välttämättömänä tekijänä, uudemmat tutkimustulokset asettavat tämän näkemyksen kyseenalaiseksi. Kaveoliini nähdään pikemminkin kaveolivälitteistä endosytoosia estävänä tekijänä. Esimerkiksi kokeissa, joissa kaveoliini-1:n ilmeneminen on estetty, kaveosomien kautta internalisoituvien SV40:n ja CTxB:n on havaittu tästä huolimatta pääsevän solun sisään (ks. yleiskatsaus Parton & Richards 2003). Toisaalta kaveoliini-1:n yliekspression on todettu hidastavan albumiinin sisäänottoa, joka myös kulkee sytoplasmaan kaveolivälitteisesti (Le ym. 2002). Kaveoliini ei siis niinkään ole välttämätön kaveolivälitteiselle endosytoosille, vaan se sitä vastoin lisää solukalvon vakautta. Jotta kaveoliinin vakauttava vaikutus estyisi, se on fosforyloitava (Tirupathi ym. 1997) ja kaveolaariseen endosytoosiin osallistuva dynamiini on aktivoitava sekä tuotava tapahtuma-alueelle (Pelkmans ym. 2002).

Sen lisäksi, että kaveoliinia on solukalvon kaveoleissa, sitä on havaittu myös Golgin laitteessa (Luetterforst ym. 1999) ja varhaisissa endosomeissa (Wilson ym. 2000). Erityisesti kaveoliini-1 näyttää löytyvän myös kierrättävistä endosomeista (Gagescu ym. 2000). Kaveoliinin ilmeneminen organelleissa, jotka eivät suoranaisesti liity kaveolivälitteiseen endosytoosiin, viittaa reittien väliseen vuorovaikutukseen.

1.1.2.2. Muut kaveolivälitteiseen endosytoosiin osallistuvat molekyylit

Kaveoliinin lisäksi monet muutkin biomolekyylit ovat välttämättömiä kaveolivälitteisen endosytoosin säätelyssä. Dynamiini II:lla on tärkeä osa sekä klatriini-, että kaveolivälitteisissä endosytoosissa. Dynamiini II:n dominantin negatiivisen mutaation, K44A:n tiedetään estävän internalisaation molempia reittejä pitkin (ks. yleiskatsaus Parton & Richards 2003).

Src-kinaasi vaikuttaa dynamiini II:n aktivointiin. Ilman sen välittämää fosforylaatiota kaveoleista ei kuroudu rakkuloita sytoplasmaan (Ahn ym. 2002). Toinen kinaasi, proteiinikinaasi $C\alpha$ (PKC α), säätelee kaveosomaaliseen endosytoosiin sekä potosytoosiin osallistuvien molekyylien fosforylaatiota. PKC α -molekyylit kertyvät kaveolin alueelle, tarttumalla sen sytoplasmiselle puolella. Histamiinin tiedetään aiheuttavan kinaasin irtoamisen solukalvosta (Smart ym. 1995). PKC α :a inhiboivat kemikaalit kuten safingoli, genisteiini ja okadaaiinihappo estävät kaveolivälitteisen endosytoosin (Pietiäinen ym. 2004).

Pietiäisen ym. (2004) tutkimuksesta selviää kolesterolin tarpeellisuus echovirus 1:n (EV1) endosytoosille. Muun muassa kolesterolia solukalvolta poistava nystatiini sekä sen synteesiä häiritsevä progesteroni yhdessä estävät osittain EV1:n kaveolivälitteisen sisäänmenon soluun.

Lisäksi metyyli- β -syklodekstriini (MBCD), joka myös poistaa kolesterolin solukalvolla, hävittää kaveolit solukalvolta ja estää täydellisesti viruksen internalisaation.

Myös aktiini osallistuu kaveolivälitteiseen endosytoosiin. Esimerkiksi SV40:n sisäänmeno soluun estyy, kun solua käsitellään mm. aktiinin polymerisaatiota estävällä sytokalaniini D:llä (Pelkmans ym. 2002). Toisaalta aktiinitukirankaa häiritsevillä aineilla ei näytä olevan vaikutusta EV1:n internalisaation CV-1 -soluissa (Pietiäinen ym. 2004).

1.1.2.3. Kaveolivälitteisen reitin merkitys

Kaveolivälitteisen endosytoosin avulla solun sisään kulkeutuu monia pienikokoisia molekyyilejä, kuten kolesterolia (Fielding & Fielding 1995). Reitillä on myös merkitystä signaloinnissa (ks. esim. Mastick ym. 1995). Kaveoleitten välityksellä sytoplasmaan pääsee mm. kasvutekijöitä. Lisäksi eräät taudinaiheuttajat pääsevät tunkeutumaan soluun kaveolaarisen endosytoosin avulla (Parton 1996).

Vibrio cholerae on bakteeri, jonka taudinaiheuttamiskyky perustuu sen erittämään koleratoksiiniin (CTX). Koleratoksiini on heksameeri, jossa viisi B-alayksikköä ympäröi A-alayksikköä (Merritt & Hol 1995). A-alayksikkö on aktiivinen ja aiheuttaa siis tunnusomaiset oireet, kun taas B-alayksikkö (CTxB) kiinnittyy solukalvon lipidilautoissa olevaan glykosfingolipidin reseptoriin, GM1-gangliosidiin. CTxB voi siirtyä soluun kahta reittiä. Klatriinista riippuvaisella reitillä myrkkä siirtyy varhaiseen endosomiin, eikä aiheuta lainkaan oireita (Torgersen ym. 2001). Sitä vastoin klatriinista riippumattomalla, mahdollisesti kaveoliinista riippuvaisella reitillä, CTxB kulkeutuu ensin Golgin laitteeseen ja sieltä COP-I –proteiinin välityksellä ER:ään (Girod ym. 1999). Siellä A-alayksikkö vapautuu sytosoliin ja aiheuttaa cAMP-välitteisen Cl⁻-ionin vapautumisen soluista, josta koleran oireet johtuvat (Sharp ym. 1971). Mikäli koleratoksiinista luodaan keinotekoisesti kimeerinen proteiini, jossa B-alayksiköt on vaihdettu rakenteisiin, jotka eivät tartu lipidilautoissa oleviin reseptoreihin, CTX ei aiheuta lainkaan oireita (Wolf ym. 1998).

SV40 kuuluu papovaviruksiin. Se kiinnittyy solukalvolla olevaan MHC I:een (Major Histocompatibility Complex I) (Stang ym. 1997) ja pääsee solun sisälle kaveolivälitteisesti (Pelkmans ym. 2001). Viruksen sisääntuloreitti on samankaltainen kuin CTxB:llä, mutta toisin kuin CTxB, sen ei tiedetä siirtyvän Golgin laitteeseen. Kurouduttuaan solun sisään, SV40 siirtyy sER:ään, josta se vapautuu solulimaan (Kartenbeck ym. 1989). Tumaan päästyään virus replikoituu. Sekä CTxB, että SV40 vapautuvat ER:stä solulimaan, mikä todennäköisesti aktivoi niiden toiminnan.

TGF β (Transforming Growth Factor β) on kasvutekijä, jonka vaikutusten säätely liittyy kaveolivälitteiseen endosytoosiin. TGF β -reseptoreita on solukalvolla kahdenlaisia: tyypin I reseptori (T β RI) aktivoi fosforyloimalla tyypin II reseptorin (T β RII) (Wrana ym. 1994). Tämä puolestaan aktivoi edelleen fosforyloimalla R-Smad 2:n ja 3:n. Smadeihin kiinnittyvä SARA (Smad anchor for receptor activation) edesauttaa aktivointia. Fosforyloidut R-smadit kiinnittyvät Smad4:ään ja siirtyvät tumaan säätellemään transkriptiota (Miyazono ym. 2000). Di Guglielmon ym. (2003) tutkimuksessa todetaan, että TGF β ja sen reseptori internalisoituvat soluun kahta reittiä: klatriinivälitteisesti ja kaveolivälitteisesti. Signaalointi tapahtuu klatriinireitin välityksellä. Smadeja ankkuroiva proteiini SARA kykenee tarttumaan myös solukalvon TGF β -reseptoreihin ja varhaisiin endosomeihin, jotka ovat klatriinireitille tyypillisiä. Klatriinireitiltä reseptorit voivat palautua takaisin solukalvolle, kun taas kaveolireitin kautta TGF β -reseptorit päätyvät hajotettaviksi. Tällöin Smad7 tarttuu tyypin I TGF β -reseptoriin (Nakao ym. 1997) ja tuo paikalle E3-ligaasit, Smurf1:n ja 2:n (Kavsak ym. 2000). Tämä saa aikaan reseptorin ubiquitinaation, joka johtaa hajotukseen. Edelleen Di Guglielmon ym. (2003) tutkimuksessa käy ilmi reseptorien liikkuvuus solukalvolla. Mikäli kaveolivälitteisen reitin toiminta estetään häiritsemällä kolesteroliaineenvaihduntaa, TGF β -reseptorit siirtyvät lipidilautoista pois ja internalisoituvat klatriinivälitteisesti. Toisaalta klatriinireitille välttämättömän Eps15:n dominantti negatiivinen mutaatio siirtää reseptorit kaveolivälitteiselle reitille. TGF β :n vaikutus solussa on siis reseptorin internalisaatioreitistä riippuvainen: kaveolivälitteinen reitti johtaa reseptorin hajotukseen ja näin ollen vähentää kasvutekijän vaikutusta, kun taas klatriinivälitteinen reitti johtaa varsinaiselle signaalireitille.

Monissa muissakin tapauksissa eri sisääntuloreitit saavat aikaan toisistaan poikkeavan vasteen solussa. Esimerkiksi valkosolujen liikkumista ja kehitystä säätelevien kemokiinireseptoreiden, CCR5:n ja CXCR4:n sisäänotto klatriini- ja kaveolivälitteisesti johtaa erilaiseen vaikutukseen (Venkatesan ym. 2003). CXCR4:n internalisaatio tapahtuu klatriinilla päällystettyjen kuoppien kautta. Tällöin kemokiinin aiheuttama vaste on suhteellisen nopea. Sitä vastoin CCR5 internalisoituu kaveoleitten välityksellä, jolloin vaikutus on hidas. Kemokiinin vaikutuspotentiaalia voidaan siis säädellä internalisaation avulla.

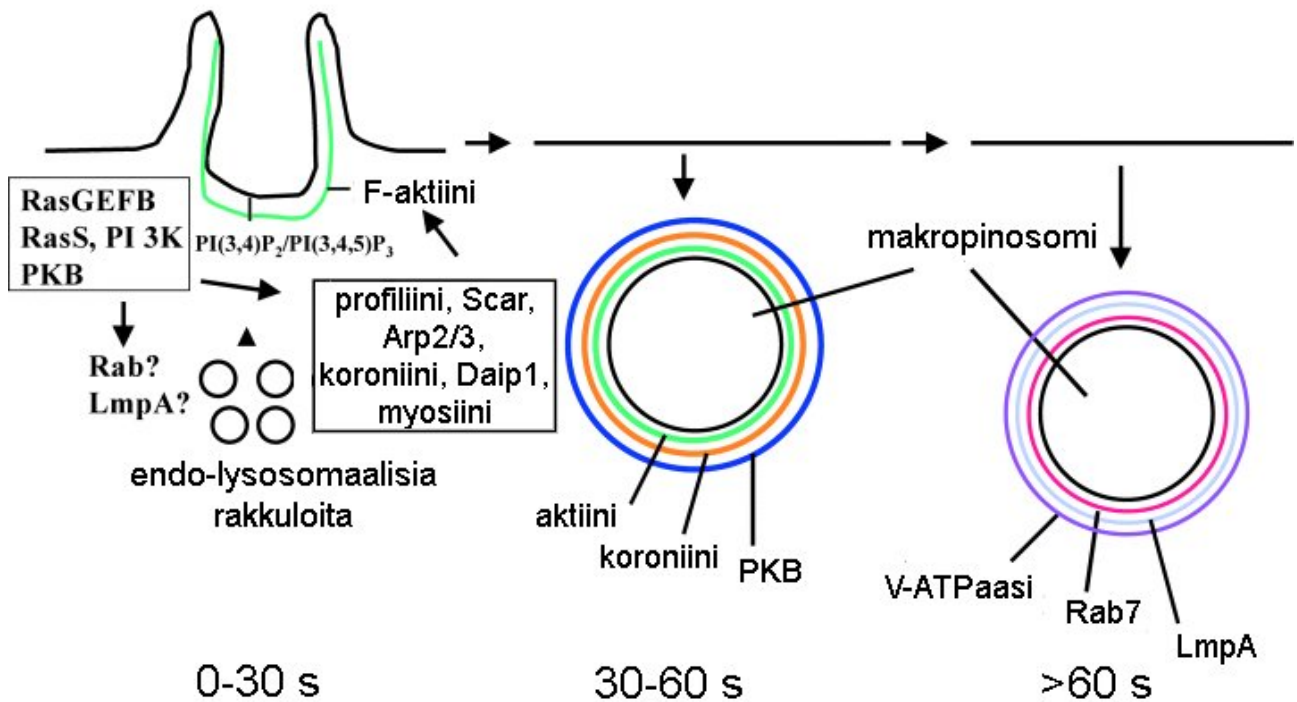
Kaveolivälitteisen reitin tunnusomaisiin rakenteisiin, kaveosomeihin, voidaan kuljettaa valikoivasti tiettyjä molekyyliä. Esimerkiksi glypikaani 1, joka osallistuu solun kasvun ja kehityksen säätelyyn, on solukalvolla oleva GPI:hin kiinnittynyt proteoglykaani. Glypikaani pääsee solun sisään kaveolivälitteisesti (Cheng ym. 2002). Kaveolireitillä se altistuu heparanaasille ja S-nitrosylaatiolle. Muokkaukseen vaadittavat valikoidut entsyymit kuljetetaan spesifisesti kaveosomeihin.

1.1.3. Makropinosytoosi

Solu kykenee ottamaan nesteitä sisäänsä ympäröivästä tilastaan. Tällöin puhutaan pinosytoosista. Mikropinosytoosissa solun sisään kuroutuvat rakkulat ovat suhteellisen pieniä ja ne voivat olla klatriinipäällysteisiä tai päällystämättömiä, kuten kaveosomit (Swanson & Watts 1995). Makropinosytoosissa sitä vastoin rakkulat eli niin kutsutut makropinosomit ovat huomattavasti laajempia kuin esimerkiksi kaveolivälitteisen reitin rakenteet. Makropinosomit voivat siirtää solulimaan suuriakin määriä nesteitä ja siihen liuenneita aineita. Makropinosomit ovat kooltaan muita rakkuloita vaihtelevampia ja niiden läpimitta on 0,5 µm:stä aina 10 µm:iin saakka (Mercer & Helenius 2009).

Molekyylitasolla makropinosytoosi eroaa esimerkiksi klatriinivälitteisestä endosytoosista siten, ettei vesikkeli vaadi ympärilleen klatriinivaippaa, eikä dynamiinia tarvita sen syntyyn. Keskeinen entsyymi aktiinin riippuvaisessa makropinosytoosissa on fosfatidyliinositoli 3-kinaasi (PI3-K) sekä proteiinikinaasi C (PKC), jotka ohjaavat aktiinin polymerisaatiota (Araki ym. 1996). Myös Rho-perheen GTPaasit Cdc42 ja Rac ovat merkittäviä aktiinitukirangan uudelleenjärjestymisessä (Garrett ym. 2000, West ym. 2000).

Makropinosomin muodostuessa syntyy solukalvoon ensin aktiinisäikeiden tukemia poimuja, jotka kasvaessaan muodostavat ns. makropinosytoottisen kupin (ks. kuva 1.3.). Lopulta kuppi kuroutuu solun sisään ja irtautuu sytoplasmiseksi rakkulaksi. Aktiinitukirangan säätely on välttämätöntä tällaisten poimujen ja ylipäänsä makropinosomien syntymiseen. Tästä johtuen aktiinin polymerisaatiota häiritsevät myrkyt, esim. sytokalasiini D, estävätkin tehokkaasti makropinosytoosia (Araki ym. 1996).



Kuva 1.3. Makropinosytoosin kulku. Makropinosomin sisäänkuroutuminen vaatii mm. aktiinia sekä fosfatidyylinositoleja. Makropinosomien muodostumiseen osallistuvat monet proteiinit, esimerkiksi koroniini ja proteiinikinaasi B (PKB) (muokattu yleiskatsauksesta Cardelli 2001).

Makropinosytoosilla on merkittävä osa muun muassa immuunivasteen synnissä. Erityisesti dendriittisolut ottavat ympäristöstään sisäänsä elimistöön päässeiden taudinaiheuttajien antigeenejä makropinosytoosin välityksellä. Solun sisällä palasia antigeeneistä liitetään MHC II (Major Histocompatibility Complex II) –molekyyleihin, jolloin vieras antigeeni voidaan tunnistaa ja immuunivaste käynnistää (Banchereau & Steinman 1998). Muissa kuin immuunijärjestelmään kuuluvissa soluissa kasvutekijät aktivoivat usein makropinosytoosin. Makropinosytoosi liittyy mm. solun liikkeisiin. Monet taudinaiheuttajat tunkeutuvat solun sisään makropinosytoosin kautta: esimerkiksi *Salmonella*, *Chlamydia*, *Shigella*, ja *Neisseria* –bakteerit (Francis ym. 1993, Alpuche-Aranda ym. 1994, Ojcius ym. 1998).

Dendriittisoluissa makropinosytoosi on jatkuva prosessi, eikä se tarvitse mitään ulkopuolista stimulointia tapahtuakseen. Kuitenkin monissa muissa soluissa kasvutekijät ja forboliesterit tarttuessaan solun reseptoreihin indusoivat makropinosytoosin (Swanson 1989, Racoosin & Swanson 1992). Esimerkiksi makrofaageille spesifinen kasvutekijä rM-CSF (recombinant human macrophage colony stimulating factor) saa aikaan makropinosytoosin.

Makropinosytoosia muistuttavassa fagosytoosissa solu ympäröi kalvollaan ulkopuolellaan olevan kappaleen. Fagosytoosissa vaikuttavat monet makropinosytoosistakin vastaavat entsyymit. Ilmeisesti prosessissa syntyvä niin sanottu valejalka (pseudopodi) vastaa makropinosytoosissa syntyviä poimuja. Molempien muodostuksessa aktiinitukiranka on tärkeä (Swanson & Baer 1995).

1.1.3.1. Fosfatidyyli-inositoli 3-kinaasi

Monet solun prosessit ovat riippuvaisia fosfatidyyli-inositoli 3-kinaasin (PI3-K) toiminnasta, esimerkiksi mitogeneesi ja lysosomaalinen entsyymien lajittelu (Cerboni ym. 1998). Myös makropinosytoosissa ja fagosytoosissa PI3-K on keskeinen vaikuttaja. Nimensä mukaisesti PI3-K fosforyloi fosfatidyyli-inositolin inositolirenkaan 3-hiilen. Se siis tuottaa fosfatidyyli-inositoli 3-fosfaattia (PI(3)P), fosfatidyyli-inositoli (3,4)-difosfaattia (PI(3,4)P₂) sekä fosfatidyyli-inositoli (3,4,5)-trifosfaattia (PI(3,4,5)P₃) (de Camilli ym. 1996). PI3-K koostuu kahdesta alayksiköstä: 85 kDa:n alayksikkö on entsyymiä säätelevä ja 110 kDa:n alayksikkö katalyyttinen osa. Ilmeisesti tyrosiinikinaasi fosforyloi säätelevän osan ja saa suuremman 110 kDa:n katalyyttisen alayksikön toimimaan (Cohen ym. 1990).

PI3-K:n tehtäviä solussa on tutkittu erilaisilla estävillä kemikaaleilla. Wortmanniini on epäspesifi ja LY294002 (2-(4-morfolinyyli)-8-fenyyli-4H-1-bentsopyraani-4-ooni) PI3-K:ta spesifisesti estävä kversetiinin johdannainen. Vaikka kversetiinin onkin havaittu estävän muitakin PI-kinaaseja, kuten PI4-K:ta (Nishioka ym. 1989), LY294002 tietyvästi estää vain PI3-K:n toiminnan. LY294002 inhiboi PI3-K:ta kompetitiivisesti. Toisin sanoen myrky tarttuu samaan kohtaan kuin PI3-K:n luonnollinen substraatti, fosfatidyyli-inositoli. LY294002 siis kilpailee luonnollisen substraatin kanssa (Vlahos ym. 1994).

PI3-K:n estämisen on havaittu estävän suurten molekyylien sisäänoton tehokkaammin kuin pienten, mikä viittaa makropinosytoosin estymiseen (Araki ym. 1996). Vaikka PI3-K vaikuttaakin aktiinitukirangan muutokseen, ei LY294002:n kuitenkaan ole havaittu häiritsevän aktiini- eikä mikrotubulustukirankaa. Näin ollen PI3-K:n inhibitiolla ei ole vaikutusta myöskään solukalvon poimuttumiseen. Reseptorivälitteiseen endosytoosiin LY294002:lla on vain vähäinen vaikutus. PI3-K ei siis merkittävästi osallistu reseptorivälitteisen endosytoosin signalointireittiin. PI3-K:n estämisellä ei näytä olevan vaikutusta myöskään lysosomien muotoon. Sitä vastoin fagosytoosiin kinaasin toiminnan estäminen vaikuttaa. Koska fagosytoosi on molekyylitasolla

makropinosytoosia muistuttava tapahtuma, PI3-K:n estäminen häiritsee myös fagosytoosia (Araki ym. 1996).

Yksisoluisella *Dictyostelium*-ameeballa tehdyt tutkimukset (Rupper ym. 2001) osoittavat PI3-K:n (PIK1 ja PIK2) tuottamien fosfoinositidien PI(3,4)P2:n ja PI(3,4,5)P3:n kertyvän muodostuneeseen makropinosomaaliseen kuppiin. Ilmeisesti nämä fosfoinositidit tuovat paikalle muita vaikuttajaproteiineja (mm. proteiinikinaasi B), jotka puolestaan osallistuvat aktiinitukirangan muokkaamiseen. PI3-K:ta ei kuitenkaan tarvita vielä poimuttumisvaiheessa, vaan se säätelee vasta makropinosytoosin loppuvaihetta. Poimuttuminen saattaa riippua muiden kuin PI3-K:n tuottamien fosfoinositidien, kuten PI(4,5)P2:n säätelystä (Rupper ym. 2001).

1.1.3.2. Proteiinikinaasi B

Proteiinikinaasi B (PKB) on entsyymi, joka säätelee muun muassa apoptoosia, proteiinisynteesiä, rakkulaliikennettä ja solujen liikumista kohti tai pois päin kemiallisesta ärsykkeestä. PKB on myös nisäkässoluissa (Coffer ym. 1998) sekä mm. *Dictyostelium*-ameebassa (Meili ym. 1999) makropinosytoosireitillä PI3-K:n alapuolella vaikuttava entsyymi. PKB kykenee tarttumaan mainittuihin fosfoinositideihin niin kutsutulla PH-domeenillaan (pleckstin homology). PKB pysyy kiinni muodostuvassa makropinosomissa ja irtoaa myöhemmässä vaiheessa. Koska PI3-K aktivoi PKB:n, PI3-K:ta estävät kemikaalit häiritsevät PKB:n kuljetusta muodostuvaan makropinosomiin (Rupper ym. 2001).

PKB:llä on lukuisia substraatteja. Makropinosytoosissa PKB ilmeisesti aktivoi jonkin niistä fosforyloimalla. Eräiden tutkimusten perusteella (Barbieri ym. 1998) PKB aktivoi Rab5 -proteiinin, joka puolestaan säätelee endosytoosia sekä varhaisten endosomien fuusiota.

1.1.3.3. Rho-perheen GTPaasit

Rac, Rho ja Cdc42 ovat Rho-perheeseen kuuluvia pieniä GTP:hen tarttuvia proteiineja. Niillä on merkittävä osa makropinosytoosin toiminnassa, sillä niiden tiedetään osallistuvan aktiinitukirangan muokkaukseen (Swanson 2008). Rac säätelee poimujen ja lamellipodien muodostumista, kun taas Cdc42 säätelee filopodeja (Nobes & Hall 1995). Kaikkia Rho-perheen jäseniä estävän toksini B:n on havaittu estävän makropinosytoosia (West ym. 2000, Garrett ym. 2000).

Dominanttisesti negatiivinen Rac1-mutantti kykenee estämään makropinosytoosin täysin kypsymättömissä dendriittisoluisissa. Mutanttiproteiinin on havaittu estävän

makropinosytoosia luuytimeistä peräisin olevissa kypsyeissä dendriittisolussa mutta ei pernan soluissa. Todennäköisesti soluilla on toisistaan poikkeavat signaalireitit (West ym. 2000). Vastaavia tuloksia on saatu myös Cdc42:ta koskevissa tutkimuksissa. Aktivoidun Cdc42:n vieminen sisälle soluun on havaittu stimuloivan makropinosytoosia. Samoin kuljetettaessa soluun *Salmonella*-bakteerin avulla Cdc42/Rac1-guaaniinukleotidivaihtajia makropinosytoosin on havaittu vahvistuvan (Garrett ym. 2000).

Cdc42:n ja Rac:in välillä on myös vuorovaikutusta. Molemmat entsyymit vaaditaan makropinosytoosin esteettömään toimintaan. Cdc42 kykenee indusoimaan Rac:n toiminnan. Aktivoitu Rac ei kuitenkaan vielä yksinään saa aikaan makropinosytoosia. Cdc42 nimittäin säätelee muitakin reittiin osallistuvia proteiineja. Luonteeltaan jatkuva makropinosytoosi, erotuksena stimuloituvasta prosessista, käyttää hyväkseen Rac:stä riippumatonta signaalireittiä (West ym. 2000).

Rho-perheen GTPaasien on havaittu säätelevän N- ja E-kadheriinien organisaatiota solussa (Braga 1999). Nämä proteiinit vastaavat filopodien fuusiosta solujen tarttuessa toisiinsa (Vasioukhin ym. 2000). Saattaa olla, että Cdc42 ja Rac vastaavatkin makropinosytoosin loppuvaiheessa solukalvon poimujen fuusioitumisesta solun pintaan.

1.1.3.4. Aktiini ja siihen vaikuttavat proteiinit

Solukalvon poimuttuminen ja näin ollen myös makropinosytoosi vaativat tapahtuakseen välttämättä aktiinisäikeiden osallisuutta. Sitä vastoin mikropinosytoosi, esimerkiksi klatriinivälitteine endosytoosi ei samassa mittakaavassa ole riippuvainen aktiiniverkoston muodostumisesta. On tosin viitteitä aktiinin merkityksestä kaveolivälitteisellä reitillä. Jotta makropinosytoosi voisi tapahtua tarkoituksenmukaisesti, on aktiinin polymerisaatiota säädeltävä sekä paikallisesti, että ajallisesti (Rupper ym. 2001). Rho-perheen GTP:aasien ja fosfoinositidien lisäksi myös aktiiniin kiinnittyvät proteiinit säätelevät aktiinisäikeitä. Näitä ovat mm. myosiini I, profiliini ja koroniini (esim. Temesvari ym. 2000). Pak1 (p21-activated kinase 1) on kinaasi, joka vaikuttaa aktiinitukirangan muutoksiin. Se aktivoi signaalintireitin johon osallistuvat mm. LIMK (LIM-domeenin sisältävä kinaasi) ja kofiliini (Edwards ym. 1999). Pak1 saa aikaan aktiinin polymerisaation ja näin ollen solukalvon poimuttumisen.

Sytokalasiini D on monista sienistä saatava myrky, joka sekä hajottaa olemassa olevia aktiinisäikeitä, että estää uusia muodostumasta. Se häiritsee tehokkaasti kalvon

poimuttumista ja tämän kautta myös makropinosytoosia ja samoihin mekanismeihin perustuvaa fagosytoosia (Araki ym. 1996).

1.1.3.5. Ras-perhe

Ras-perheen proteiinit ovat pieniä GTPaaseja, jotka osallistuvat moniin solun prosesseihin. Kuten Rho-perheen GTPaasitkin, ne tarttuvat guaniinukleotideihin korkealla affiniteetilla. GTP:hen tarttunut proteiini on aktiivinen mutta GDP:hen tarttunut muoto inaktiivinen. Ras-proteiini voidaan mutaatiolla lukita GTP:hen tarttuneeseen muotoon, jolloin se on jatkuvasti aktiivinen. Tämän on havaittu aiheuttavan muutoksia soluissa: kasvukontrollin vähenemistä, erilaistumisen estymistä, aktiininirangan uudelleen järjestymistä sekä endosytoosin stimuloitumista (Valencia ym. 1991).

Tutkimuksessa, jossa käytettiin *Dictyostelium discoideum* –ameebaa (Chubb ym. 2000) on havainnointu dominanttisesti negatiivisen RasS-proteiinin vaikutuksia soluun. Mutaation vaikutuksesta solujen kasvu hidastui merkittävästi ja FITC-dekstraanin sisäänotto pinosytoosin avulla hidastui. Sitä vastoin solujen liikkuminen kiinteällä alustalla nopeutui (Maniak ym. 1995). Edelleen mutaatiolla oli vaikutusta solujen muotoon. Solut olivat polarisoituneempia ja pidempiä kuin normaalit, villin tyyppin solut. Myös *Dictyostelium*-soluissa tavalliset kruunumaiset poimut vähenivät ja muuttuivat pienemmiksi. Dominanttisesti negatiivinen RasS vaikutti aktiinin järjestymiseen solussa. Polymerisoitunut aktiini eli F-aktiini näytti kertyvän yksittäiseen valejalkaan, joka on ominainen aktiivisesti liikkuvalla solulle, sekä pieniin piikkimäisiin rakenteisiin.

RasS-proteiinilla on merkittävä rooli aktiinista riippuvaisissa mekanismeissa kuten esimerkiksi makropinosytoosissa. Ras-proteiinien tiedetään aktivoivan MAP-kinaaseja (mitogen activated protein kinase), jotka puolestaan säätelevät useiden geenien transkriptiota (Marais ym. 1995). Myös PI3-K, joka osaltaan säätelee aktiinin uudelleenjärjestymistä makropinosytoosissa, vuorovaikuttaa Ras-proteiinien kanssa.

1.1.3.6. CtBP1/BARS

Merkittävä makropinosytoosiin osallistuva proteiini on myös CtBP1/BARS (C-terminal-binding protein 1/brefeldin A-ADP ribosylated substrate) (Liberali ym. 2008). Proteiini on välttämätön EGF:llä (epidermal growth factor) indusoidussa makropinosytoosissa. EGF saa aikaan CtBP1/BARS:in siirtymisen solukalvon aktiinipitoisiin poimuihin ja ns. makropinosytoottiseen

kuppiin. Proteiini osallistuu nimenomaan solukalvolle muodostuneen kupin irtikuroutumiseen solusisäiseksi rakkulaksi. Jotta CtBP1/BARS voisi toimia, se on fosforyloitava. Pak1 tarttuu proteiinin SBD-domeeniin ja fosforyloi CtBP1/BARS:in NBD-domeenin. Sen lisäksi, että CtBP1/BARS osallistuu makropinosytoosin säätelyyn, se myös ohjaa tiettyjen geenien ja transkriptiota (Vecchi ym. 2001).

1.1.4. Klatriinista ja kaveoliinista riippumattomat endosytoosireitit

Makropinosytoosin lisäksi soluissa on myös muita endosytoosireittejä, jotka ovat klatriinista ja kaveoliinista riippumattomia. Nämä reitit liittyvät usein solukalvolla esiintyviin runsaasti kolesterolia ja sfingolipideitä sisältäviin lipidilauttoihin. Näillä reiteillä dynamiinin ja pienten GTPaasien osallisuus vaihtelee. Monilla reiteillä on eroavaisuuksista huolimatta myös paljon yhteisiä tekijöitä. Esimerkiksi immuunipuolustuksessa keskeisen interleukiini-2 -reseptorin sisäänotto on dynamiinista riippuvainen (Lamaze ym. 2001). Reseptorin sisäänottoon osallistuu pienistä GTPaaseista ainakin RhoA. Glykosyyლისfingolipideihin liittyvien proteiinien (GPI-AP) internalisaatio puolestaan tapahtuu dynamiinista ja RhoA:sta riippumatta (Sabharanjak ym. 2002). Sen sijaan toinen GTPaasi, Cdc42, on välttämätön reitin säätelyssä. CTxB, jonka on perinteisesti ajateltu pääsevän soluun kaveoli- ja klatriinivälitteisesti, internalisoituu nykytiedon valossa myös dynamiinista riippumattoman reitin kautta (Torgersen ym. 2001). Myös SV40 käyttää hyödykseen kaveolivälitteisen reitin lisäksi kaveoleista riippumatonta reittiä (Damm ym. 2005). Monet kaveoleista riippumattoman reitin rakkulat ovat kaveosomien kaltaisia, mutta niiden säätelyyn ei liity dynamiini eikä ARF6. Kaveoliriippumaton internalisaatio ilmenee rinnakkain kaveolivälitteisen reitin kanssa.

1.1.5. Solunsisäisten rakkuloiden fuusio

Endosytoosissa molekyylit kulkeutuvat usein yhdestä rakkulatyypistä toiseen. Tällöin tapahtuu solunsisäisten rakkuloiden sulautumista yhteen eli fuusiota. Fuusiossa kahden eri rakkulan kalvot tulevat lähelle toisiaan ja syrjäyttävät väliin jäävän nesteen, jolloin kalvot pääsevät yhdistymään. Mikäli rakkulat ovat proteiinipäällysteisiä, kuten klatriinireitillä, vaippa on ennen fuusiota purettava. Endosytoosissa, jossa molekyylejä kuljetetaan tiettyyn tarkasti määriteltyyn kohteeseen, on myös fuusion tapahduttava juuri tietyn tyyppisen rakkulan kanssa. Tällainen spesifinen fuusio

vaatii proteiineja, jotka kohdistavat rakkulan juuri tiettyyn kohteeseen. Lisäksi vaaditaan proteiineja, jotka säätelevät itse fuusiotapahtumaa (ks. yleiskatsaus Martens & McMahon).

Spesifiselle rakkulafuusiolle välttämättömiä säätelijöitä ovat SNARE-perheen (SNAP-reseptori) proteiinit (Söllner ym. 1993). Niiden ansiosta rakkulat tai muut kalvorakenteet tunnistavat toisensa (McNew ym. 2000). Ne osallistuvat liposomien tai kokonaisten solujen fuusioon. Ne ovat myös olennaisia ekso- ja endosytoosissa. Rakkulan solukalvolla on ns. v-SNARE (vesicle-SNARE), kun taas kohteen, johon rakkula fuusioituu, solukalvolla on ns. t-SNARE (target-SNARE). Kohdatessaan toisensa SNARE:t yhdistyvät neljän heliksin avulla, joista yksi tulee v-SNARElta ja kolme t-SNARElta (Sutton ym. 1998). Tällöin solukalvot yhdistyvät. v/t-SNARE-kompleksiin kiinnittyvät puolestaan SNAP (soluble NSF attachment protein) sekä NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor). Tämä saa aikaan v/t-SNARE-kompleksin hajoamisen, jolloin SNARE:t pääsevät jälleen vaikuttamaan uusilla alueilla (Söllner ym. 1993).

Solussa monien rakkularakenteiden ja reittien välillä ilmenee vuorovaikutusta fuusion välityksellä. Esimerkiksi kaveolireitillä kaveosomien on havaittu olevan yhteydessä fuusioituvien rakkuloiden avulla mm. Golgin laitteeseen ja solukalvoon (ks. yleiskatsaus Parton & Simons 2007). Edelleen EV1:ta kuljettavien rakkuloiden on havaittu olevan yhteydessä kaveosomeihin (Karjalainen ym. 2008).

1.2. Pikornavirukset

Pikornaviruksiin (*Picornaviridae*) kuuluuvat entero-, rhino-, hepato-, parecho-, cardio-, aphtho-, erbo-, kobu- sekä techovirukset (Stanway 1990). Yleisiä pikornaviruksia ovat mm. enteroviruksiin kuuluva poliovirus, maksatulehduksen aiheuttava hepatiitti A, joka kuuluu hepatoviruksiin sekä suu- ja sorkkatauti aiheuttava aphthoviruksiin kuuluva FMDV (foot-and-mouth disease virus).

Pikornavirukset ovat pienimpiä tunnettuja RNA-viruksia. Muodoltaan ne ovat vaipattomia säännöllisiä 20-tahokkaita eli ikosaedreja, läpimitaltaan noin 30 nm (Rossman ym. 1985). Virusten proteiinikuori, kapsidi, on muodoltaan ikosaedri (kaksikymmentahokas) ja se koostuu kuudestakymmenestä protomeeristä. Jokainen protomeeri koostuu neljästä viraalisesta proteiinista, VP1:stä, 2:sta, 3:sta ja 4:sta (Filman ym. 1998). Pikornavirusten pinnalla olevia syvennyksiä kutsutaan kanjoneiksi. Kanjoneita on kapsidissa jokaisen ns. viisinkertaisen symmetria-akselin ympärillä (Rossmann ym. 2002).

Pikornavirusten perimä on yksijuosteinen positiivinen RNA, pituudeltaan 7200-8500 emäsparia. RNA:n 5' päähän kiinnittyy pieni emäksinen proteiini VPg (Virion Protein genome linked). 3'-päässä puolestaan on poly(A)-häntä. Molemmissa päissä on sekvenssi, ns. NTR (nontranslated region), jota ei käännetä proteiiniksi. Perimän keskelle jää proteiiniksi käännettävä osa eli ORF (open reading frame). Syntyvä proteiinijuoste sisältää kaikki viruksen tarvitsemat proteiinit. Virusproteasit pilkkovat polyproteiinin yksittäisiksi proteiineiksi (ks. yleiskatsaus Bedard & Semler 2004). Toisin kuin eukaryoottisolulla, viruksen perimän kääntäminen ei vaadi modifioitua 5'-päätä (ns. 5' cap), vaan tapahtuu IRES-sekvenssin (internal ribosome entry site) avustuksella (Pelletier & Sonenberg 1989). Replikaatiossa alkuperäisestä perimästä transkriptoitu negatiivinen RNA-juoste käännetään positiiviseksi juosteeksi, josta kopiointi tapahtuu viraalisen RNA-polymeraasin 3D^{pol}:n avulla. RNA:n monistaminen tapahtuu replikaatiokomplekseissa, jotka ovat kiinnittyneinä solulimaan liittyvien rakkuloiden kalvoon. Uusien pikornavirusten kapsidi rakentuu ensin pentameeriseksi välimuodoksi ja sen kautta tyhjäksi kapsidiksi (Hogle 2002). Uudet RNA-juosteet pakataan kapsideihin.

Pikornavirukset kykenevät tarttumaan tiettyyn reseptoriin kohdesolussa. Tällöin kohdesolussa oleva viruksen reseptori määrittelee taudinaiheuttajan kudosspesifisyyden ja aiheutuvan taudin tunnusomaiset oireet. Joidenkin pikornaviruslajien (esim. poliovirus) muoto muuttuu niiden tarttuessa reseptoriinsa (Fricks & Hogle 1990). Monilla pikornavirusten reseptoreilla on rakenteellisia yhtäläisyyksiä. Suuri osa niistä on tyypin I transmembraanisia glykoproteiineja, joilla on 2-5 immunoglobuliinidomeenia solun ulkopuolella.

1.2.1. Echovirus 1

Echovirukset (ECHO on lyhenne sanoista Enteric Cytopathogenic Human Orphan) ovat ihmisen taudinaiheuttajia, jotka voivat aiheuttaa halvauksia, aivokuumetta, aivokalvontulehdusta, sydänlihastulehdusta, hengityselinten tulehduksia, ihottumaa ja ripulia. Ne ovat pikornaviruksiin kuuluvia enterovirusia. Enterovirukset voidaan jakaa polio-, coxsackie A-, coxsackie B-, echo- sekä enterovirusiin 68–71, jotka muodostavat oman ryhmänsä (Huttunen ym. 1996). Echovirusista voidaan erottaa immunologisesti pinta-antigeenien perusteella 31 serotyyppiä. EV1:n rakenne ja perimä ovat tyypillisiä pikornaviruksille (ks. edellinen kappale)

Echovirus 1 tunnistaa solun pinnalta $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin ja pääsee soluun endosytoosin avulla (Bergelson ym. 1994). Solun sisällä EV1 vaikuttaa isäntäsolun geenien ilmentymiseen.

Tiettyjen geenien luentaa se tehostaa ja tiettyjen taas vähentää, muokatakseen solusta ihanteellisen ympäristön omalle replikoitumiselleen (Pietiäinen ym. 2000).

1.2.1.1. Patogeenit ja integriinit

Jotta virus voisi tunkeutua solun sisälle, sen täytyy tunnistaa solukalvolta tietty molekyyli ja tarttua siihen. Monet virukset, esimerkiksi adeno-, hanta- ja pikornavirukset, kykenevät tarttumaan integriineihin (ks yleiskatsaus Hynes 2002). Integriinit ovat rakenteeltaan heterodimeerejä, jotka koostuvat α - ja β -alaysiköistä (Xiong ym. 2001). Erilaisia α -alaysiköitä on 18 ja β -alaysiköitä 8. Näitä yhdistelemällä syntyy lukuisia eri integriinejä. Tämä mahdollistaa integriinien tarttumisen moniin ligandeihin. Soluväliaineen (ECM) molekyyleistä integriinit tarttuvat muun muassa fibronektiineihin, laminiineihin sekä kollageeneihin. Solun ja ECM:n välinen signalointi välittyy mm. integriinien kautta. Tässä vuorovaikutuksessa merkittävä rakenne on solukalvolle muodostuva monista proteiineista koostuva kiinnittymiskohta, fokaaliadheesio, jossa integriinit ovat merkittävässä osassa (Miyamoto ym. 1995). Aktiinisäikeet kiinnittyvät adapteriproteiinien avulla integriineihin. Lisäksi integriini organisoii fokaaliadheesioon liittyvien molekyylien järjestymistä. Integriinien endosytoosi on niiden aktiivisuuden säätelyn kannalta merkittävässä roolissa. Endosytoosilla on vaikutusta solujen liikkeisiin ja adheesioon. Integriinit osallistuvat myös solujen adheesioon ja signalointiin.

Jotkin virukset kykenevät tarttumaan esimerkiksi α V-integriiniin. Monet, joskaan eivät kaikki adenoviruksen serotyypit tarvitsevat immunoglobuliinien superperheeseen kuuluvaa CAR-molekyyliä (Coxsackievirus and Ad Receptor) sekä α V-integriiniä infektoidakseen solun (Roelvink ym. 1998). Adenovirukset pystyvät kylläkin tarttumaan solukalvolle CAR:n välityksellä, mutta ilman α V β 3- tai α V β 5-integriiniä ne eivät internalisoidu sytoplasmaan (Wang & Bergelson 1999, Wickham ym. 1993). Toinen esimerkki α V-integriiniä hyödyntävästä patogeenistä on pikornaviruksiin kuuluva parechovirus 1 (HPEV1) (Joki-Korpela ym. 2001). α V-integriini ja siihen tarttuva ligandi, taudinaiheuttaja tai ns. luonnollinen ligandi internalisoituvat soluun yhdessä klatrinireittiä pitkin, ensin varhaiseen endosomiin ja siitä edelleen myöhäiseen endosomiin. α V-integriinin on havaittu siirtyvän rakkuloihin, jotka eivät sisällä kaveoliini-1:tä, mutta kylläkin varhaisille endosomeille tyypillistä EEA1-proteiinia sekä internalisoitunutta transferriniä (Upla ym. 2004). HPEV-1:n kapsidiproteiinien on havaittu kulkeutuvan edelleen ER:ään sekä Golgin laitteen cis-puolelle (Joki-Korpela ym. 2001). α V-integriini kykenee sitoutumaan proteiineihin, joissa on RGD-aminohapposekvenssi (arginiini-glysiini-aspartaatti). Sillä on lukuisia luonnollisia ligandeja

mm. vitronektiini, fibronektiini, trombospondiini, fibrinogeeni ja osteopontiini (Felding-Habermann & Cheresch 1993, Martin & Sanes 1997). α V-integriini esiintyy monissa solutyypeissä. Näin ollen sillä on myös suuri määrä spesifisiä tehtäviä. Sillä on havaittu olevan merkitystä esimerkiksi verisuonten kasvun (Freidlander ym. 1995) ja läpäisevyyden (Eliceiri ym. 2002) säätelyssä, kudosten tulehdusreaktioissa (Huang ym. 1996), arpeutumisessa (Munger ym. 1999) sekä monissa keuhkotaudeissa (Huang ym. 1998).

1.2.1.2. Echovirus 1 ja α 2 β 1-integriini

Echovirus 1:n tiedetään kiinnittyvän α 2 β 1-integriiniin eli VLA-2:een (Bergelson ym. 1992). α 2 β 1-integriinin luonnollinen fysiologinen ligandi, kollageeni, tarttuu α 2-alayksikössä olevaan I-domeeniin (King ym. 1995). Myös EV1:n tiedetään tarttuvan samaan kohtaan. Kuitenkin tärkeimmät tarttumiseen osallistuvat aminohappotähteet ovat EV1:n osalta eri paikoissa. Lisäksi tarttuminen EV1:een on riippumaton Mg^{2+} -ionin läsnäolosta, toisin kuin vuorovaikutus kollageenin kanssa (Bergelson ym. 1993).

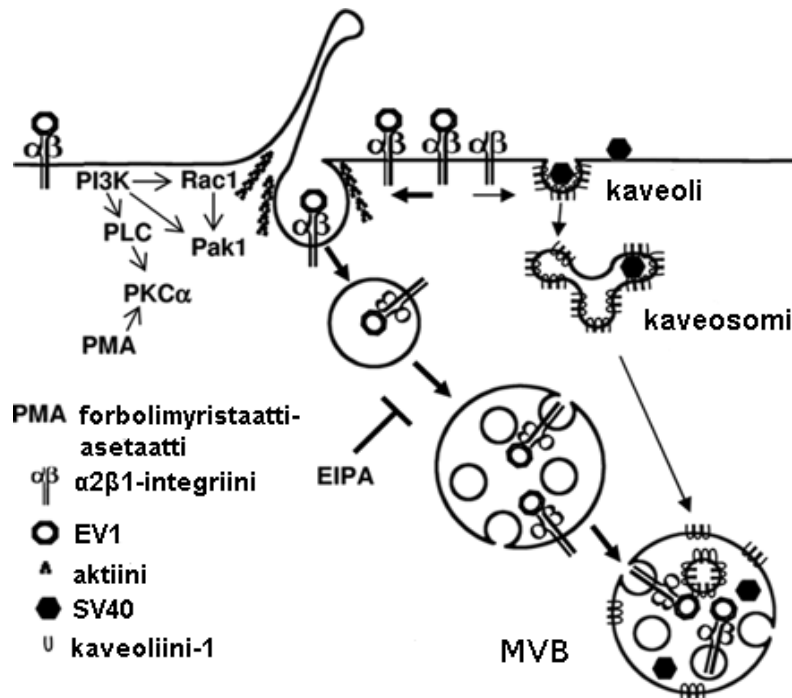
Echovirus 1 tarttuu integriinin α 2I-domeeniin jo aikaisemmin mainitun kanjonin ympäristössä olevilla aminohappotähteillä (Xing ym. 2004). Näitä kanjoneita on viruksen pinnalla 12. Kryoelektronimikroskopiolla on saatu selville tarttuvien α 2I-domeenien väliksi 180 Å, joka on sama kuin kapsidissa olevien viraalisten proteiinien (VP) väli. Vahvin kontakti α 2I-domeenilla on kanjonin ulkoseinään, kun taas sisäseinään se ei ole läheisessä vuorovaikutuksessa. Domeenin C- ja N-päät osoittavat pois päin kapsidista, sitä ympäröivään tilaan (Xing ym. 2004). Ollessaan luonnollisessa tilassaan, osana α 2 β 1-integriiniä, N- ja C-päät ovat β -alayksikköön tunkeutuneina. Niin kutsuttu α 2I-domeenin MIDAS-motiivi (metal ion-dependent adhesion site) kiinnittyy tavallisesti kollageeniin (Emsley ym. 2000) ja vaatii toimiakseen Mg^{2+} -ionin. Kun α 2I-domeeni tarttuu EV1:een, MIDAS-motiivi osoittaa kohti kanjonin pohjaa, mutta ei ole kosketuksissa sen kanssa. Tämä selittää vuorovaikutuksen riippumattomuuden divalenttisesta Mg^{2+} -kationista. Kiinnittymiskohdan rajapinnassa α 2I-domeenin kolme varautunutta aminohappotähdettä sitovat sen elektrostaattisesti viruksen kapsidiin (Xing ym. 2004). Koska α 2I-domeenin fysiologisen ligandin, kollageenin, kolmoiskierre peittää alleen alueet, jotka vuorovaikuttavat myös EV1:n kanssa, virus ja kollageeni eivät voi sitoutua samanaikaisesti. Kollageenilla on suhteellisen pieni affiniteetti α 2I-domeeniin ja EV1 tarttuukin α 2I-domeeniin kymmenen kertaa tehokkaammin.

Normaalisti α 2 β 1-integriini sijaitsee solukalvon lipidilautoissa. α 2 β 1-integriini ei useinkaan sijaitse samassa paikassa kuin kaveolivälitteiseen endosytoosiin osallistuva kaveoliini-1.

EV1:n tarttuminen $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin saa aikaan integriinien kasautumisen. Saman ilmiön saa aikaan integriinien peräkkäinen käsittely anti- $\alpha 2$ -vasta-aineella sekä sekundäärivasta-aineella. Integriinit liittyvät ensin pienemmiksi kertymiksi. Nämä kertymät alkavat liikkua solukalvolla aktiinisäikeitä pitkin ja yhdistyvät lopulta suuremmiksi muodostelmiksi. Lopulta nämä kertymät kulkeutuvat rakenteisiin, joissa on myös kaveoliini-1:ta (Upla ym. 2004). Sytokalasiini D:n, joka hajottaa aktiinisäikeitä ja estää niiden polymerisaation, on havaittu häiritsevän integriinien kertymistä (Upla ym. 2004).

1.2.1.3. Echovirus 1:n endosytoosi

Uusimpien tutkimusten mukaan EV1:n sisääntulon varhaiset vaiheet eivät ole riippuvaisia kaveolivälitteiselle reitille liittyvistä proteiineista, kaveoliinista (ks. kuva 1.4.) tai dynamiinista (Karjalainen ym. 2008). Kuitenkin CV-1 -soluilla suoritetuissa kokeissa on havaittu dynamiini II:n dominantisti negatiivisen mutaation estävän EV1:n pääsyn solulimaan (Pietiäinen ym. 2004). $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasautuminen, esimerkiksi vasta-ainekäsittelyn vaikutuksesta, jo itsessään johtaa integriinin kuroutumiseen solun sisään (Upla ym. 2004). Mikäli esimerkiksi EV1 on tarttuneena integriiniin, se pääsee tällä tavoin internalisoitumaan sytoplasmaan yhdessä reseptorinsa kanssa. EV1:tä on havaittu kaveoliini-1:tä sisältävissä rakkuloissa vasta 15 min kuluttua infektiosta (Karjalainen ym. 2008). Ilmeisesti virusta sisältävät varhaiset rakenteet yhdistyvät kaveosomeihin infektion alkuvaiheiden jälkeen. Aluksi EV1 internalisoituu $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa tubulovesikulaarisiin rakenteisiin. Nämä rakenteet alkavat kypsyä n. 15 min kuluttua internalisaatiosta monirakkulaisiksi muodostumiksi (MVB). Suuri osa EV1:n sisääntuloa säätelevistä proteiineista liittyy makropinosytoosireittiin. Klatriinireitille EV1:llä ei nähtävästi ole minkäänlaista yhteyttä. Klatriinireitille välttämättömän Eps15-proteiinin toiminnan estäminen ei vaikuta EV1:n eikä $\alpha 2\beta 1$ -integriinin internalisaatioon (Upla ym. 2004).



Kuva 1.4. EV1:n ja SV40:n tunkeutuminen soluun. EV1:n internalisaatio $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa tapahtuu pääasiassa makropinosytoosissa vaikuttavien mekanismien avulla. Sisäänottoon vaikuttavia molekyylejä ovat mm. aktiini, PI3-K, Rac1, Pak1, fosfolipaasi C sekä PKC α . EIPA mahdollisesti estää EV1:stä siirtymästä MVB:hen. SV40 puolestaan siirtyy pääasiassa kaveolivalitteisen reitin kautta soluun (muokattu artikkelista Karjalainen ym. 2008).

Kollageenireseptorien, jollainen $\alpha 2\beta 1$ -integriinikin on, tiedetään säätelevän MAP-kinaaseja (Ravanti ym. 1999). Solun ulkopuolisten signaalien säätelemä kinaasi ERK (extracellular signal regulated kinase) aktivoituu n. 15 min kuluttua infektion alkamisesta EV1:n jo siirryttyä solun sisälle (Upla ym. 2004). Kuitenkaan ERK:n toiminnan estäminen ei merkittävästi häiritse viruksen infektiota. Aiemmin signaalireitillä olevan Ras-proteiinin toiminnan estämisellä on niin ikään vain vähän vaikutusta internalisaatioon. Proteiinkinaasi C α :n (PKC α) estäminen sitä vastoin pysäyttää tehokkaasti EV1:n pääsyn soluun. PKC α vaikuttaa endosytoosin ensi minuuteilla ja sen fosforylaation on havaittu lisääntyvän EV1:n vaikutuksesta. PKC α :n toiminnan estäminen ei kuitenkaan häiritse EV1:n tarttumista $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin, eikä integriinien kertymistä yhteen (Upla ym. 2004).

Kolesterolin vähentäminen solukalvolta progesteronilla ja nystatiinilla on havaittu häiritsevän EV1-infektiota (Pietiäinen ym. 2004). Pietiäisen ym. (2004) tutkimuksessa on havaittu myös kaveoliini-3:n toiminnan estämisen, vähentävän lipidien kuljetusta solukalvolle ja aiheuttavan lipidilauttojen katoamisen Tämä puolestaan häiritsee EV1:n infektiota. Myös tyrosiinifosforylaation estäminen genisteiinillä vaikuttaa viruksen internalisaation, myrkyntä pitoisuudesta riippuen. Vaikka

fosfataasien inhiboiminen okadaaiinihapolla on todettu estävän kaveolivilitteistä endosytoosia (Parton ym. 1994), EV1-infektioon se ei näytä vaikuttavan. Toisaalta natriumortovanadaatti (NaOV), joka inhiboi spesifisesti tyrosiinifosfataaseja, estää infektion tehokkaasti. CV-soluissa latrunkuliini A, jasplakinolidi ja sytokalasiini D, jotka vaikuttavat aktiinisäikeisiin, eivät ainakaan merkittävästi häiritse infektiota. Vaikka brefeldiini A (BFA) estää kaveoliviliteistä endosytoosia ja häiritsee Golgin laitteen toimintaa hajottamalla sitä, se ei estä viruksen internalisaatiota. BFA saa kuitenkin aikaan EV1:n kertymisen suuriin klustereihin solun sisälle (Pietiäinen ym. 2004).

EV1:n on havaittu kolokalisoituvan osittain CTxB:n kanssa. CV-soluissa CTxB ja EV1 kolokalisoituvat 30–60 min kuluttua infektiosta pienissä pistemäisissä rakenteissa (Pietiäinen ym. 2004). EV1 ei kuitenkaan kulkeudu infektion myöhemmissä vaiheissa trans-Golgiin, lysosomeihin, tai karkeaan ja sileään ER:ään, kuten CTxB (Pietiäinen ym. 2004). Myös SV40, joka kulkeutuu kaveolivilitteisen reitin kautta sileään solulimakalvostoon (sER) (Pelkmans ym. 2001), kolokalisoituu kaveosomien kaltaisissa rakenteissa EV1:n kanssa, mutta ei enää myöhemmin (ks kuva 1.5). Mikrotubuluksia hajottava nokodatsoli, joka ehkäisee SV40:n siirtymisen sER:ään, lisää EV1:n ja SV40:n kolokalisaatiota, koska molemmat virukset pysyvät tällöin kaveosomeissa. Virukset käyttävät erilaisia mekanismeja solun infektoimiseen. Tähän viittaa sekin, että fluoresoivalla proteiinilla leimattu dominantisti negatiivinen kaveoliini-1 (GFP-cav-1) häiritsee SV40-infektiota, mutta ei EV1-infektiota (Pietiäinen ym. 2004).

1.2.1.4. Echovirus 1:n elinkierron myöhemmät vaiheet

Pietiäisen ym. (2004) tutkimuksessa seurattiin ns. FISH (Fluorescence in situ hybridization) -menetelmällä EV1:n RNA:n liikkeitä solussa. Jo 15 minuutin kuluttua infektion alkamisesta RNA kertyi solunsisäisiin klustereihin. Tunnin kuluttua sitä löytyi solun perinukleaariselta alueelta, tuman ympäriltä. Kahden tunnin kuluttua RNA:ta esiintyi solun reuna-alueilla. Neljässä tunnissa RNA:n määrä lisääntyi moninkertaisesti, mikä viittaa replikaation alkamiseen. Pietiäisen ym. (2004) tutkimuksessa viruksen RNA:n kolokalisaatio kapsidin proteiinien kanssa oli aluksi 30-60 min infektiosta melko suuri, mutta väheni 2 h:n kuluttua infektion alkamisesta. RNA ilmeisesti vapautui kapsidista. Muissa tutkimuksissa genomien on havaittu vapautuvan kapsidista n. 30 min kuluttua infektion alkamisesta (Marjomäki ym. 2002) ja alkavan replikoitua vasta 2-3 h:n kuluttua (Upla ym. 2008).

EV:n tunkeuduttua soluun sen RNA vapautuu kapsidista ja alkaa kopioitua. Ei tiedetä, millä tavoin RNA:n vapautuminen tapahtuu. Monille pikornaviruksille on luonteenomaista

kapsidien konformaation muutos reseptoriin tarttumisen tai soluun tunkeutumisen vaikutuksesta (ks. yleiskatsaus Hogle 2002). Tämä johtaa viruksen kapsidin hajoamiseen ja genomin vapautumiseen, jolloin translaatio ja replikaatio voivat tapahtua. Jotkut pikornaviruksista ovat herkkiä pH:n vaihteluille. Tällaisten virusten kapsidi puretaan endosomien happamissa oloissa (Schober ym. 1998). EV1 ei ole pH:n muutoksille herkkä, eikä se kulkeudu endosomeihin. Mahdollisesti virus on genominsa vapautumiseen saakka kaveosomin sisällä, josta RNA sitten vapautuu solulimaan (Pietiäinen ym. 2004).

RNA:n replikaatio vaatii kalpaiini-proteaasien toimintaa (Upla ym. 2008). Kalpaiinit ovat Ca^{2+} -riippuvaisia kysteini-proteaaseja. Niillä on monia tehtäviä ja kohdeproteiineja. Ne osallistuvat mm. solun tukirangan ja soluliman proteiinien pilkkomiseen (Goll ym. 2003). Kalpaiini-inhibiittorit estävät EV1:n lisäksi muidenkin pikornavirusten infektiota, ainakin parechovirus 1:n ja coxsackievirus B3:n (Upla ym. 2008). EV1:n on havaittu kulkeutuvan samoihin vesikkeleihin kuin kalpaiini 1 ja 2. EV1-infektio lisää kalpaiinin aktiivisuutta solussa.

1.2.1.5. Echovirus 1:n infektiota vaikuttavat isäntäsolun geenien ilmentymiseen

Pikornavirusten, kuten monien muidenkin virusten, toiminta perustuu osaltaan niiden kykyyn vaikuttaa infektoimansa solun geenien ilmenemiseen. Ne voivat joko vähentää (Devaney ym. 1988) tai vastaavasti lisätä (Huttunen ym. 1997) tiettyjen proteiinien synteesiä. Pikornavirukset voivat muun muassa vaikuttaa signaalinsiirrossa ja transkription säätelyssä vaikuttaviin geneihin (Huttunen ym. 1998).

Pietiäisen ym. (2000) tutkimuksessa selvitetään EV1-infektioita vaikuttaviksi isäntäsolun geenien ilmentymiseen. Verrattuna samaan sukuun (enterovirukset) kuuluviin coxsackievirus B4:ään (CBV4) ja poliovirus 1:een (PV1), EV1 aiheutti huomattavasti vähemmän geenien ilmenemisen vähenemistä. EV1-infektiossa tutkituista 1176 geenistä suurimman osan transkriptiotaso pysyi ennallaan. Ainoastaan 2 % geneista aktivoitui merkittävästi (vähintään kaksinkertaisesti) ja 0,5 % inaktivoitui. Aktivoituvia geneja olivat tietyt IE-geenit (immediate early) sekä jotkin solusyklin säätelyyn, signaalinsiirtoon, transkription, solujen väliseen adheesioon ja kommunikaatioon liittyvät geenit. Transkriptio väheni eniten kasvuun liittyvillä c-myc-herkillä (RCL) sekä adenosiniin A1-reseptorin geneilla. Tutkimuksessa käytetyillä HOS pa2AW-soluilla ensimmäiset infektiota liittyvät transkription muutokset näkyivät kuuden tunnin kuluttua infektiosta, jolloin Fra-1:n (Fos-proteiiniin liittyvä antigeeni 1), Egr-1:n (kasvusignaalille

herkkä proteiini) sekä SQM1:n (NADH-ubikinonioksidoreduktaasi B18:n alayksikkö) määrä lisääntyi kohtalaisesti.

2. Tutkimuksen tarkoitus

Aiempien tutkimustulosten perusteella EV1:n sisäänmenon ajateltiin tapahtuvan kaveolivälitteisesti (Marjomäki ym. 2002). Uusimpien tulosten mukaan kuitenkin viruksen internalisaation varhaisvaiheet olisivat riippumattomia kaveolivälitteisen reitin proteiineista, kaveoliinista ja dynamiinista (Karjalainen ym. 2008). Sen sijaan monet makropinosytoosissa vaikuttavat molekyylit ovat välttämättömiä myös EV1:n internalisaatiossa. Päästyään solun sisään EV1:n reseptori $\alpha 2\beta 1$ -integroini ja siihen kiinnittynyt virus siirtyvät tubulovesikulaarisiin rakenteisiin, jotka myöhemmin kypsyvät monirakkulaisiksi rakenteiksi. Myöhäisemmässä vaiheessaan EV1-infektio liittyy myös kaveolia sisältäviin solunsisäisiin rakenteisiin. EV1:tä kuljettavat rakkulat sulautuvat mahdollisesti kaveosomeihin.

Tämän tutkimuksen tarkoitus oli tarkastella EV1-infektioon liittyvää rakkulaliikennettä ja sen säätelyä. Erityisesti makropinosytoosiin liittyvien mekanismien merkitystä EV1:n infektiossa tutkittiin käsittelemällä soluja erilaisilla makropinosytoosiin vaikuttavilla kemikaaleilla. Myös rakkulaliikenteeseen liittyvien proteiinien, kaveoliini-1:n sekä myöhäisille endosomeille tyypillisen lysobisfosfatidihapon (LBPA) kolokalisaatiota EV1:n tai $\alpha 2\beta 1$ -integroinin kanssa havainnoitiin. Tarkoitus oli myös selvittää, miten solunsisäiset $\alpha 2\beta 1$ -integroini-positiiviset rakkulat kykenevät fuusioitumaan keskenään. Tätä tarkoitusta varten tutkittiin rakkuloiden yhdistymistä *in vitro* -menetelmällä.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. Solut, virukset ja vasta-aineet

Kaikissa kokeissa käytettiin SAOS-solulinjaa (human osteosarcoma cells, American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA). Soluihin oli transfektoitu pysyvästi $\alpha 2$ -integriiniä ilmentävä geeni (SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut, Ivaska ym. 1999). Soluissa oli myös neomysiiniä koodaava geeni, joka teki solut resistenteiksi genetsiini-antibioottia (G-418) vastaan. Näin ollen haluttuja soluja voitiin valikoida lisäämällä elatusaineeseen genetsiiniä.

Solujen elatusaineena käytettiin 10 % naudan sikiön seerumia (Fetal Calf Serum eli FCS, Gibco, Grand Island, USA) sisältävää DMEM:iä (Gibco), jossa oli 2 mM L-glutamiinia (Gibco) sekä 100 IU/ml penisilliiniä, 100 μ g/ml streptomysiiniä, sekä 5 μ l/ml genetsiiniä (Gibco, Grand Island, USA). Kokeita varten soluja siirrostettiin aina edellisenä päivänä maljoille kasvamaan, jolloin elatusaineessa ei käytetty genetsiiniä.

EV1 (Farouk-kanta, ATCC) oli tuotettu GMK-soluissa (viherapinan munuaissolulinja, engl. green monkey kidney cells; saatu Timo Hyypiältä) ja puhdistettu sakkaroosigradienttiajolla (Marjomäki ym. 2002). Lisäksi käytettiin värjättyä AF-EV1:tä (Pietiäinen ym. 2004).

Vasta-aineina kokeissa käytettiin CVB3:n 3D RNA-polymeraasin konservoituneen peptidisekvenssin tunnistavaa antiseerumia, joka tunnistaa myös EV1:n 3D-proteiinin (Auvinen *ym.* 1993, Upla ym. 2008, Karjalainen 2008), EV1:n antiseerumia (Marjomäki ym. 2002), myöhäisten endosomien tunnistamiseksi 6C4:aa, joka on LBPA-vasta-aine, kaveoliini-1 -vasta-ainetta (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), $\alpha 2$ -integriini-vasta-aineita HAS6 (Fiona, M., Watt, D. Phil. Cancer Research, Englanti) ja A211E10 (Dr. Fedor Berditchevski, Institute of Cancer studies, Birmingham, Iso-Britannia) sekä αV -integriini-vasta-ainetta L230 (ATCC). Saponiinkäsittelyssä (ks. seuraava luku) vasta-aine laimennettiin 0,05 % saponiinia sisältävään PBS:ään. 3D RNA-polymeraasin antiseerumi laimennettiin 1 % maito-TBS:ään. Muut vasta-aineet laimennettiin 3 % BSA:ta (Boehring, Marburg, Saksa) sisältävään PBS:ään.

3.2. Immunofluoresenssivärjäykset sekä fluoresenssi- ja konfokaalimikroskopia

Immunofluoresenssivärjäys tehtiin peitinlaseille kasvatetuille soluille. Solut infektoitiin tartuttamalla EV1 ensin solukalvon $\alpha 2\beta 1$ -integriineihin. Virus laimennettiin 1% FCS:ää sisältävään DMEM:iin. Viruksen annettiin tarttua solujen pinnalle jäähauteella tunnin ajan, jonka jälkeen solut pestiin kolmesti PBS:llä, johon oli lisätty 0,5 % BSA:ta epäspesifin sitoutumisen vähentämiseksi. Tämän jälkeen soluja inkuboitiin haluttu aika 37 °C:ssa, jolloin EV1 pääsi internalisoitumaan solun sisään. Solut fiksoitiin inkuboimalla näytteitä 20 min 3 tai 4 % paraformaldehydissä (Merck, Darmstadt, Saksa).

Näytteet fiksoitiin 4 % paraformaldehydillä. Tämän jälkeen solut käsiteltiin 0,2 % Triton X 100:lla (Sigma, St. Louis, MO, USA), 5 min, jolloin solukalvot muuttuivat läpäiseviksi. Seuraavaksi kullekin peitinlasille lisättiin 3 % BSA:han laimennettua primaarista vasta-ainetta. Tämän jälkeen näytteet pestiin (3 X PBS) ja peitinlaseille pipetoitiin sekundaarista vasta-ainetta laimennosta. Sekundaarisina vasta-aineina kokeissa käytettiin Alexa 488:aa tai Alexa 555:aa (Molecular Probes Inc.).

Vaihtoehtoisesti käytettiin läpäisyyn saponiinia, jolloin solut fiksattiin 3 % paraformaldehydillä. Aluksi näytteitä inkuboitiin 10 minuuttia PBS:ään laimennetulla 50 mM NH_4Cl :lla. Tämän jälkeen solut pestiin (3 X PBS). Sitten soluja inkuboitiin 20 minuuttia PBS:llä, johon oli lisätty 0,1 % BSA:ta. Jälleen solut pestiin (3 X PBS). Seuraavaksi peitinlaseille lisättiin 0,05 %:een saponiiniin (laimennos PBS:ään) sekoitettua primaarista vasta-ainetta. Solut pestiin PBS:llä. Sitten 0,05 %:een saponiiniin sekoitettua sekundaarista vasta-ainetta lisättiin peitinlaseille. Sekä Triton X-100:aa että saponiinia käytettäessä näytteet pestiin sekundäärisen vasta-aineen tarttumisen jälkeen (3 X PBS) ja pedattiin Mowiol-Dabcolla (Dabco, Sigma) objektilaseille konfokaali- tai fluoresenssimikroskopointia varten.

Solujen infektioprosentti määritettiin immunofluoresenssimikroskoopilla (Leitz DMRBE, Leica Nilomark Oy, Espoo). Laskemiseen käytettiin U Plan FI 20X/0,5 Ph1-objektiivia. Muita immunofluoresenssiväreillä käsiteltyjä soluja tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla (Carl Zeiss LSM 510). Havainnoimisessa käytettiin Plan Neofluar- (63 X 1,25, öljy) objektiivia. Kanavien vuotamisesta johtuva väärä kolokalisaatio vältettiin skannaamalla eri eksitaatioaallonpituuksilta tulevat fluoresenssit erikseen.

Näytteiden kolokalisaatio laskettiin BioImageXD-ohjelmalla (Kankaanpää ym. 2006). Kolokalisaation minimikynnysarvo säädettiin manuaalisesti siten, että vältyttiin taustan ja diffundoituneen värin fluoresenssilta. Kolokalisaatio laskettiin valitun kanavan vokseleiden

prosentuaalisena kolokalisaationa toisen kanavan vokseleiden kanssa. Solunäytteissä laskettiin $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin tai EV1:een käytetyn värin kolokalisaatio toisen värin (esim. cav-1:een käytetyn värin) kanssa. *In vitro* -fuusionäytteissä puolestaan laskettiin vihreän kanavan kolokalisaatio punaisen kanavan kanssa. Tilastollinen merkittävyys laskettiin Costes'n algoritmillä (Costes ym. 2004). Kaikissa näytteissä Costes'n algoritmi oli 1 eli kolokalisaatio oli merkitsevä.

3.3. Integriinin kasautumiskoe

Solut siirrostettiin kasvamaan maljoille, joissa oli peitinlaseja. Ennen vasta-aineen lisäystä solut pestiin kerran PBS:llä. Soluja inkuboitiin jäähauteella primaarissa anti- $\alpha 2$ -vasta-aineessa (HAS6) laimennettuna 1 % DMEM:iin. Seuraavaksi solut pestiin jäähauteella (3 x 5 min 0,5 % BSA-PBS). Soluja inkuboitiin sekundaarisella vasta-aineella (anti-hiiri Alexa 488, 1:750). Tämän jälkeen solut pestiin jäähauteella pimeässä (3 x 5 min 0,5 % BSA-PBS). Soluja inkuboitiin 2 h, 37 °C, jonka aikana $\alpha 2\beta 1$ -integriinin oli tarkoitus siirtyä solun sisään.

3.4. SDS-PAGE ja immunoblottaus

Näytteet eroteltiin 10 % SDS-polyakryyliamidigeelissä (Biorad) ja elektroblotattiin polyvinyylidifluoridikalvolle (Millipore). Kalvo käsiteltiin 5 % maitojauheella epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi. Primaaria 3D RNA-polymeraasin vasta-ainetta sekä HRP-konjugoituja (BioRad) sekundaarivasta-ainetta käytettiin kalvon värjäykseen. Signaalit erotettiin kemiluminisenssilla (Pierce).

3.5. Solujen käsittely erilaisilla kemikaaleilla

PI3-K:n estämisen vaikutuksia tutkittaessa LY294002:ta (2-(2-morfolinyyli)-8-fenyyli-4H-1-bentsopyra-4-noni, Calbiochem, San Diego, CA, 50 μ M 1 % DMEM:ssä) lisättiin soluille ennen EV1:n infektiota. Infektioiden annettiin edetä 15 min, 2 h tai 6 h. Tämän jälkeen näytteistä leimattiin immunologisesti LBPA ja EV1 sekä tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla. LY294002:ta (30 μ M 1 % DMEM:ssä) lisättiin soluille myös EV1-infektion eri vaiheissa: 0 h, 15 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h ja 5 h infektion aloituksesta.

Na^+/H^+ -pumpun estämisen vaikutusten tutkimiseksi näytteitä käsiteltiin samaan tapaan kuin edellä myös toisella myrkyllä, EIPA:lla (100 μM 1 % DMEM:ssä). Myrkyä lisättiin ennen EV1:n infektiota. Infektion annettiin edetä joko 15 min tai 2 h ja se suoritettiin värillisillä viruksilla (AF-EV1), jotka oli laimennettu 1 % DMEM:iin.

Kolesteroliaineenvaihdunnan merkityksen tutkimiseksi soluille lisättiin U18666A (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) kahtena eri pitoisuutena: 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ja 3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Soluja inkuboitiin yön yli (n. 17 h) 10 % DMEM:iin tehdyissä myrkkylaimennoksissa. Tämän jälkeen ne infektoitiin normaaliin tapaan EV1:llä siten, että DMEM:iin laimennettu myrky oli koko infektion ajan mukana.

Kaikkien käsittelyjen jälkeen tehtiin immunofluoresenssivärjäykset, kuten aiemmin on kerrottu. Näytteet valmistettiin tarkasteltaviksi konfokaali ja fluoresenssimikroskoopissa.

3.6. *In vitro* -fuusio

$\alpha 2\beta 1$ -integriniin internalisaatio soluissa indusoidiin vasta-aineilla, kuten edellä on kuvailtu. Primaarisena vasta-aineena käytettiin $\alpha 2$ -integriniin tarttuvaa A211E10 10 % DMEM:ssä. Sekundaarisena vasta-aineena käytettiin anti-hiiri Alexa 488:a tai anti-hiiri Alexa 555:ta. Molemmat laimennettiin 10 % DMEM:iin (1:750). Soluja inkuboitiin 37 °C:ssa 15 min tai 3 h.

Solut pestiin kahdesti PBS:llä, jonka jälkeen ne raaputettiin maljoista irti PBS:ssä. Solut sentrifugoitiin 5 min/1000 rpm/4 °C, jonka jälkeen ne suspensoitiin homogointipuskuriin (3 mM imidatsoli, 0,25 M sakkaroosi, 1 mM EDTA). Seuraavaksi solut sentrifugoitiin 5 min/2000 rpm/4°C ja suspensoitiin uudelleen homogointipuskuriin. Solut homogointiin ruiskuttamalla niitä 23 G:n neulan läpi 10 kertaa, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin vielä 10 min/2000 rpm/4° C. Supernatantti otettiin talteen ja sen proteiinipitoisuus määriteltiin Bradfordin menetelmällä.

Solunsisäisten rakkuloiden fuusioreaktiota varten valmistettiin ATP:tä ylläpitävä seos, jossa oli 33 mM ATP:tä (Promega, Madison, WI, USA), 267 mM kreatiinifosfaattia sekä 1,3 mg/ml kreatiinifosfokinaasia. Lisäksi valmistettiin liuos, joka estää ATP:n toiminnan. Sen valmistamiseksi heksokinaasia sentrifugoitiin eppendorf-putkessa 5 min. Supernatantti otettiin pois ja pelletti liuotettiin 30 μl :aan 0,25 M D-glukoosia. Näytteiden annettiin fuusioitua joko ATP:tä ylläpitävässä tai sitä hävittävässä systeemissä. Valmiissa ATP-systeemissä oli 4 μl Hepes/Mg-asetatti/DTT:tä, 78 μM K-asetattia, 13,5 μl ATP:tä ylläpitävää liuosta sekä 50 μl näytteitä, joissa $\alpha 2\beta 1$ -integrini oli leimattu Alexa 488:lla ja Alexa 555:lla. ATP:tä hävittävä systeemi oli muuten samanlainen, mutta ATP:tä ylläpitävän liuoksen tilalle lisättiin ATP:tä hävittävää liuosta 11 μl .

$\alpha 2\beta 1$ -integriiniä sisältävien rakkuloiden fuusion annettiin edetä pimeässä jäähauhteella 1 h välillä naputellen putkia. Tämän jälkeen fuusioreaktioiden tuotos pipetoitiin poly-L-lysiinillä päällystetyille peitinlaseille, 50 μ l/lasi. Lasit oli päällystetty inkuboimalla niitä yön yli maljalla, jossa oli PBS:ää sekä poly-L-lysiiniä (Sigma, 1:100). Lisäksi puhtaita fuusioimattomia Alexa 488:lla tai 555:lla värjättyjä sytosolinäytteitä pipetoitiin kontrolleiksi omille peitinlaseilleen 10 μ l. Näytteiden annettiin kiinnittyä peitinlaseille 1 h, jonka jälkeen ne kiinnitettiin objektilaseille mowiolilla ja tarkasteltiin myöhemmin konfokaalimikroskoopilla.

Fuusiokokeita tehtiin myös 15 min EV1-näytteillä. Sytosolin valmistuksessa homogenointipuskuria lisättiin 220 μ l ennen näytteen homogenointia neulalla. Fuusioreaktion pituus oli 1 h tai 3 h ja siinä käytettiin ATP:tä ylläpitävää tai hajottavaa liuosta. Kontrollina oli fuusioimaton puhdas sytosoli.

Kontrollina toimi *in vitro* -fuusio, jossa sytosoli oli saatu αV - (L230 vasta-aine) ja $\alpha 2$ -integriinien (A211E10 vasta-aine) vasta-aineilla käsitellyistä soluista. Sekundäärisenä vasta-aineena anti- αV -leimatuissa soluissa toimi anti-hiiri Alexa 555 ja anti- $\alpha 2$ -leimatuissa anti-hiiri Alexa 488. Varsinaiselle tutkittavalle näytteelle tehtiin edelläkuvatulla tavalla fuusio. Internalisaatioaika oli 15 min 37°C:ssa. Sytosolin valmistuksessa näytteet liuotettiin 170 μ l:aan homogenointipuskuria ennen homogenointia neulalla. Fuusioreaktion annettiin tapahtua 3 h. Kutakin fuusionäytettä pipetoitiin 60 μ l ja puhdasta sytosolia 15 μ l peitinlasia kohden.

In vitro -fuusiota tehtiin myös hyödyntämällä soluista aiemmin erotettua sytosolia. Sytosolin valmistusta varten solut irrotettiin trypsinoimalla. Ne sentrifugoitiin (Heraeus) 10 % DMEM:ssä 5 min/1000 rpm/4 °C ja suspensoitiin 3 ml:iin homogenointipuskuria. Sitten solut sentrifugoitiin 10 min/2500 rpm/4 °C ja suspensoitiin 2,5 ml:iin homogenointipuskuria. Vaihtoehtoisesti lisättiin homogenointipuskuria vain 0,5 ml proteiinikonsentraation lisäämiseksi. Tämän jälkeen solut homogenoitiin ruiskuttamalla niitä 23 G:n neulan läpi 10 x ja sentrifugoitiin 15 min/2500 rpm/4°C. Supernatantti otettiin talteen ja siihen lisättiin CLAP:ia (1:1000). Tässäkin kokeessa oli kontrollina αV - ja $\alpha 2$ -integriiniä sisältävien rakkuloiden fuusio. Integriinien internalisaatioaika oli 15 min tai 3 h. Ennen solujen homogenointia neulalla homogenointipuskuria lisättiin kuhunkin näytteeseen 200 μ l. Fuusioreaktioiden annettiin edetä 3 h. Reaktioputkissa joko pidettiin yllä ATP:tä tai sen toiminta estettiin. Molempiin reaktioihin käytettiin liuosta, joka sisälsi 4 μ l HEPES/Mg-asetaatia/DTT:tä, 60 μ M K-asetaatia, 13,5 μ l ATP-systeemiä (ohje edellä), 60 μ l puhdasta sytosolia sekä 40 μ l molempia värjättyjä sytosoleja. Fuusioreaktiosta saatua näytettä pipetoitiin peitinlasille 120 μ l ja puhdasta sytosolia n. 80 μ l.

4. Tulokset

4.1. Echovirus 1:n internalisaatio

EV1:n riippuvuutta eri endosytoosireiteistä tutkittiin infektoimalla soluja EV1:llä, rakkulaliikenteeseen vaikuttavien myrkkujen läsnä ollessa. Soluista värjättiin immunologisesti EV1. Myrkkynä käytettiin LY294002:ta (50 μ M), jonka tiedetään inhiboivan fosfatidyli-inositoli 3-kinaasia (PI3-K). PI3-K:lla on puolestaan ratkaiseva merkitys makropinosytoosissa. Infektion annettiin edetä kuusi tuntia, jonka jälkeen laskettiin infektioprosentit myrkyllä käsitellyistä ja käsittelemättömistä näytteistä. Fluoresenssimikroskoopin kuvista saatiin kontrollisolujen infektioprosentiksi 52,25 % (solujen kokonaismäärä oli 999) ja LY294002:lla käsiteltyjen solujen osalta 0,553 % (solujen kokonaismäärä oli 904).

LY294002:n vaikutusta tutkittiin myös infektion eri vaiheissa (ks. taulukko I). Solut infektoitiin EV1:llä ja LY294002:ta lisättiin eri aikoina: 0 h, 15 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h ja 5 h infektion alkamisen jälkeen. Infektoituneiden solujen osuus laskettiin fluoresenssimikroskoopilla.

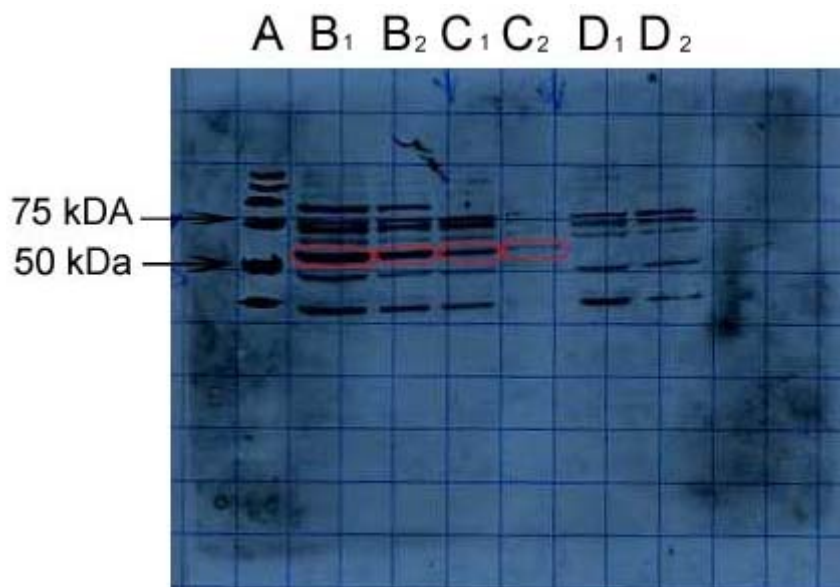
Taulukko I. Solujen infektioprosentti näytteissä, jotka oli käsitelty LY294002:lla infektion eri vaiheissa.

aika (min)	infektioprosentti	soluja yhteensä kentässä
0	33,1	256
15	32,9	222
60	47,3	218
120	43,4	129
180	31,0	258
240	54,0	346
kontrolli	55,0	372

Kolesterolin kuljetuksen merkitystä EV1-infektioon tarkasteltiin käsittelemällä soluja U18666A:lla. U18666A on kemikaali, joka häiritsee LDL:n kolesterolin kuljetusta lysosomeista ja solukalvolta ER:ään sekä lysosomeista solukalvolle (Sparrow ym. 1999). Se saa aikaan kolesterolin kertymisen myöhäisiin endosomeihin ja ns. MLB:hen (multilamellar bodies), jotka ovat kerroksellisia kalvorakenteita sisältäviä lysosomaalisia rakkuloita. Lisäksi kemikaali aiheuttaa lipidilauttojen hajoamista. Solut käsiteltiin kahdella eri U18666A-pitoisuudella: 1,5 μ g/ml ja 3,0

$\mu\text{g/ml}$. EV1-infektion annettiin edetä 6 tuntia, jonka jälkeen EV1 värjättiin ja soluista laskettiin infektioprosentti. Kontrollisoluissa infektoituneita oli 68,8 % (soluja yhteensä 263), 1,5 $\mu\text{g/ml}$:n pitoisuudella käsitellyissä soluissa 65,5 % (soluja yhteensä 255) sekä 3,0 $\mu\text{g/ml}$:n pitoisuudella käsitellyissä soluissa 56,8 % (soluja yhteensä 380).

Viruksen infektiokykyä eri myrkyillä käsitellyissä soluissa tutkittiin myös havainnoimalla viruksen perimän kopioitumisessa oleellisen 3D RNA-polymeraasin ilmenemistä. Soluja käsiteltiin LY294002:lla (50 μM) tai brefeldiini A:lla (0,4 $\mu\text{g/ml}$). Näytteistä ajettiin SDS-PAGE, joka blotattiin ja värjättiin immunologisesti viruksen RNA-polymeraasin havaitsemiseksi. Immunodetektion perusteella (ks. kuva 4.1) voidaan todeta, että 6 h:n EV1-infektion jälkeen viruksen RNA-polymeraasi ilmeni LY294002-käsitellyissä soluissa. Toinen käytetty aine, brefeldiini A, häiritsee Golgin laitteen toimintaa ja saa sen muuttumaan putkimaisiksi rakenteiksi (Rambourg ym. 1995). Blotissa BFA:lla käsitellyissä soluissa ei ilmennyt viruksen RNA-polymeraasia.



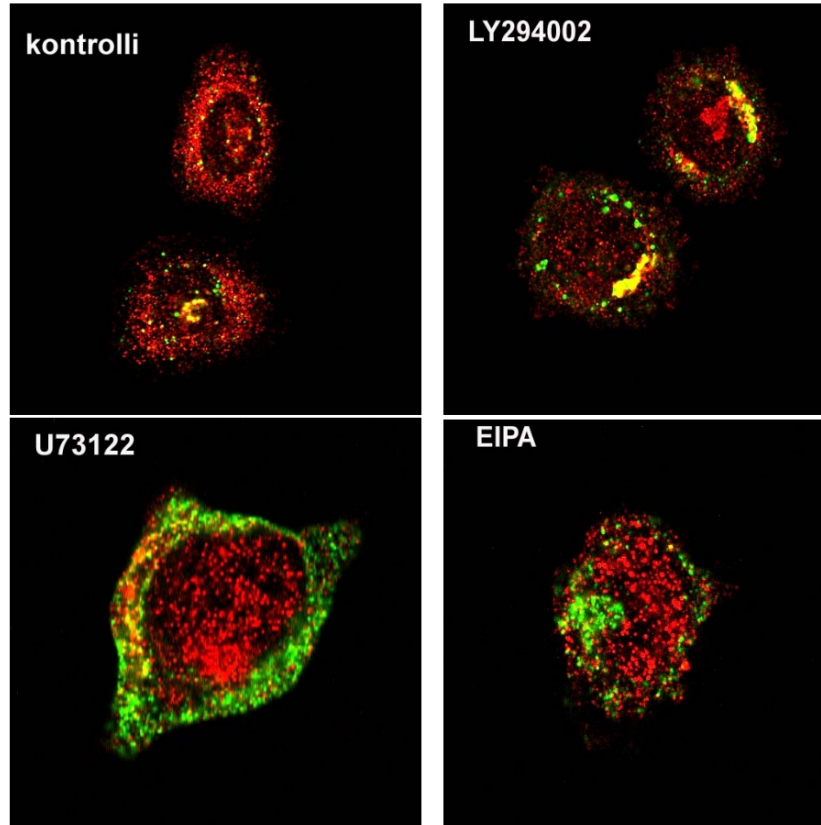
Kuva 4.1. Sarakkeessa A on markkeri. Sarakkeissa B1 ja B2 ovat kontrollit, sarakkeissa C1 ja C2 LY294002:lla käsitellyt näytteet ja sarakkeissa D1 ja D2 BFA:lla käsitellyt näytteet. Viruksen 3D RNA-polymeraasi on ympäröity punaisella. LY294002-näytteessä polymeraasi ilmeni mutta BFA-näytteessä ei.

4.2. $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasautuminen johtaa endosytoosiin

EV1 tarttuu solun pinnalla olevaan $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin ja internalisoituu yhdessä sen kanssa soluun. Integriinin internalisaatio saadaan aikaan myös aiheuttamalla sen kasautuminen vasta-aineilla.

Integriinin reittiä solussa tutkittiin immunofluoresenssivärjäyksen ja erilaisten myrkkyjen avulla. Integriinin siirtyminen solun sisään indusoitiin $\alpha 2\beta 1$ -integriinin tunnistavalla primäärillä sekä sekundäärillä vasta-aineella. Soluihin lisättiin ennen integriinin internalisaatiota joko 50 μM LY294002, 100 μM EIPA tai 10 μM U73122. Internalisaation annettiin tapahtua 2 h 37°C:ssa. LY294002 inhiboi PI3-K:n toimintaa ja häiritsee siten makropinosytoosin mekanismeja. EIPA estää amiloridille herkän Na^+/H^+ -vaihtajan toiminnan. Tämä puolestaan häiritsee sytoplasmassa esiintyvien tubulovesikulaaristen rakenteiden kypsymisen ns. monirakkulaisiksi rakenteiksi (MVB, multivesicular bodies). Koska $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja EV1 kulkeutuvat solussa juuri MVB:hen, EIPA vaikuttaa niiden kulkuun (Karjalainen ym. 2008). U73122 vaikuttaa fosfatidyli-inositolispesifiseen fosfolipaasi C:n toimintaan ehkäisevästi, mikä häiritsee makropinosytoosin toimintaa (Amyere ym. 2000).

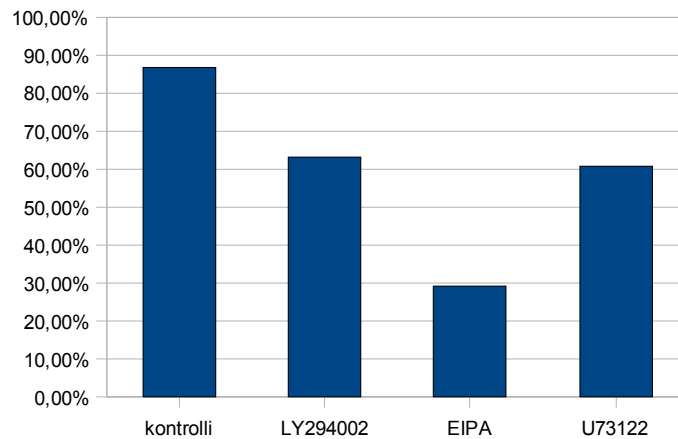
Solut kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (ks. kuva 4.2.). Kontrollinäytteessä kaveoliini-1 näyttää kolokaloituneen jonkin verran $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa. EIPA-käsitellyissä näytteissä sitä vastoin kolokaloitumista ei havaita. EIPA häiritsee integriinin normaalia kuljetusta, kuvien perusteella $\alpha 2\beta 1$ -integriini näyttää kuitenkin pääsevän solun sisään. LY294002-käsitellyissä soluissa kaveoliini-1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kolokaloitumista on selkeästi havaittava. U73122-käsittely kuten EIPA-käsittelykin estää kaveoliini-1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kolokaloitumista. Myrkyillä käsitellyissä soluissa integriini jäi solun reuna-alueille, kun taas kontrollinäytteessä se pääsi myös solun syvempiin osiin.



Kuva 4.2. Kuvissa $\alpha 2\beta 1$ -integriini näkyy vihreänä ja kaveoliini-1 punaisena. Kolokalisaatio näkyy keltaisena. Myrkyillä käsitellyissä näytteissä integriini vaikutti olevan lähinnä solun reuna-alueilla, kun taas kontrollisoluisissa integriini pääsi myös solun sisäosiin.

Kaveoliini-1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kolokalisaatio laskettiin BioImageXD-ohjelmalla (ks. kuvaaja 4.1.)

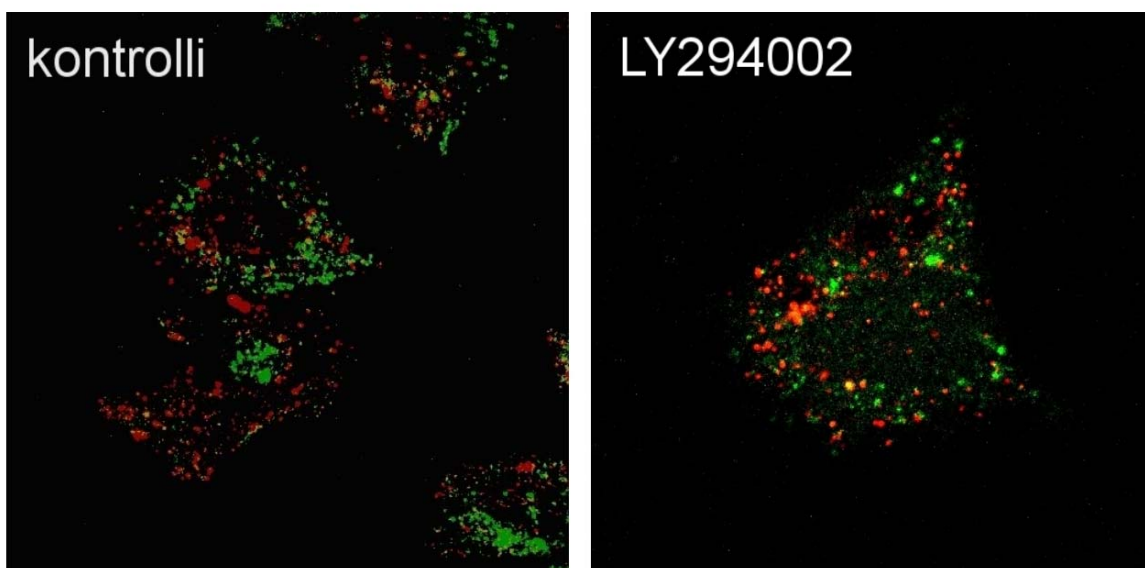
$\alpha 2\beta 1$ -integriinin kolokalisaatio cav-1:n kanssa



Kuvaaja 4.1. Kuvaajasta ilmenee vihreän kanavan (integriini) prosentuaalinen kolokalisaatio punaisen kanavan (kaveoliini-1) kanssa. Kontrollisoluissa kolokalisaatio on 86,76 %, LY294002:llä käsitellyissä soluissa 63,04 %, EIPA:lla käsitellyissä soluissa 28,97 % ja U73122:lla käsitellyissä soluissa 60,64 %. Costen algoritmi kaikille kolokalisaatiolle on 1. Kolokalisaatio on siis tilastollisesti merkitsevä.

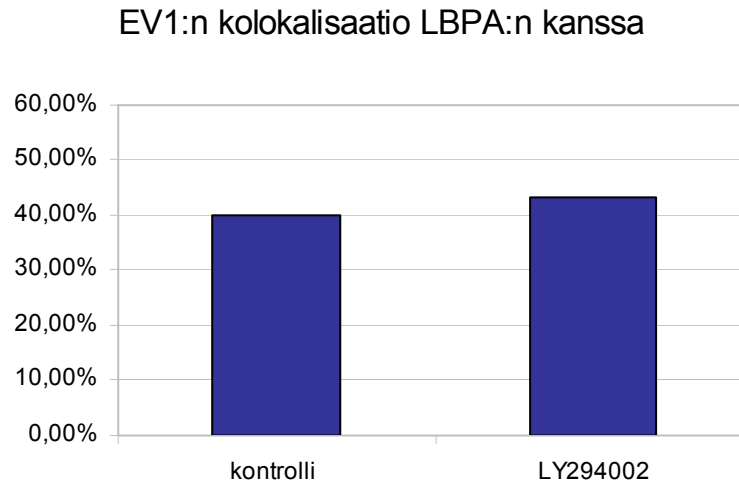
4.3. Echovirus 1:n kulkeutuminen solussa

EV1:n reitin tutkimiseksi infektioituja soluja käsiteltiin erilaisilla myrkyillä ja tarkasteltiin viruksen kolokalisaatioita tietyille rakkularakenteille tyypillisten molekyylien kanssa. Myöhäisessä endosomeissa esiintyvän LBPA:n ja EV1:n kolokalisaation tutkimiseksi soluja käsiteltiin LY294002:lla (50 μ M). Soluja infektioitiin 2 h ja värjättiin LBPA sekä EV1. Solut kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (ks. kuva 4.3.).



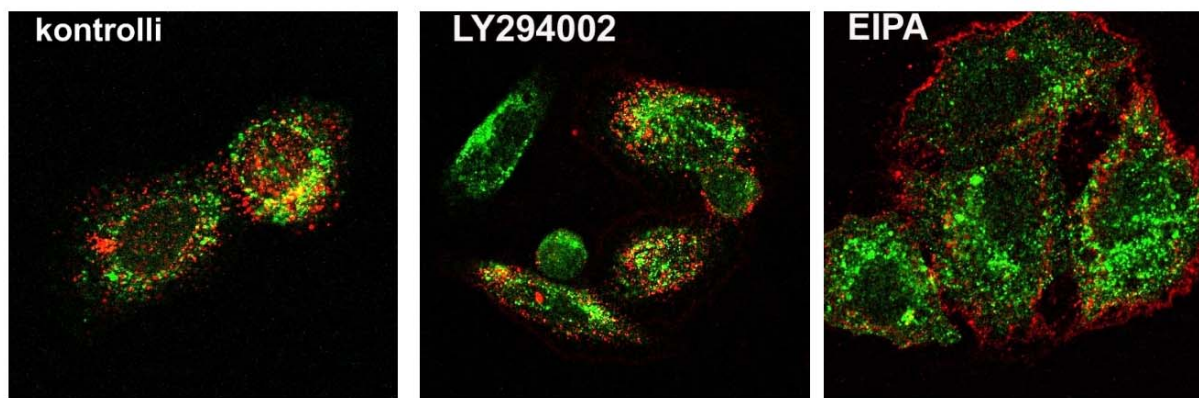
Kuva 4.3. LBPA:n ja EV1:n kolokalisaatio. Infektioaika on 2h. LBPA näkyy kuvissa vihreänä ja EV1 punaisella. Kuvissa näkyy jonkin verran LBPA:n ja EV1:n kolokalisaatiota.

LBPA:n prosentuaalinen kolokalisaatio EV1:n kanssa laskettiin BioImageXD-ohjelmalla (ks. kuvaaja 4.2).



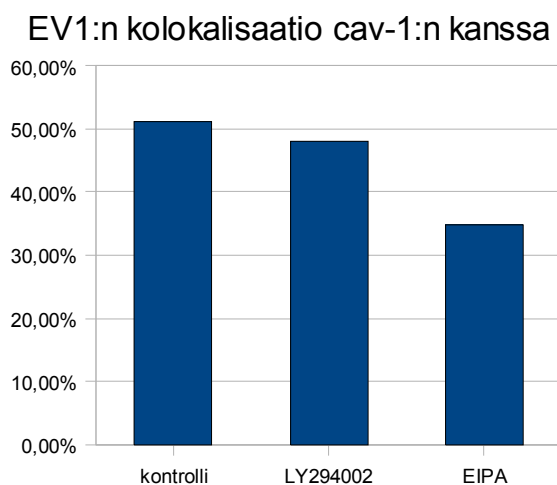
Kuvaaja 4.2 Kuvaajassa näkyy punaisen kanavan (EV1) prosentuaalinen kolokalisaatio vihreän kanavan (LBPA) kanssa. Kolokalisaatiot ovat kontrollisoluissa 39,93 % ja LY294002:lla käsitellyissä soluissa 43,29 %. Costen algoritmi on kaikille näytteille 1. Kolokalisaatiot ovat tilastollisesti merkitseviä.

Virusen kulkeutumista kaveoliini-1:tä sisältäviin rakkuloihin tutkittiin edelleen myrkyillä. Soluja käsiteltiin LY294002:lla (50 μ M) ja EIPA:lla (100 μ M). Ne infektoitiin värillisellä viruksella (AF-EV1) 2 h. Soluista värjättiin kaveoliini-1 ja kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (kuva 4.4.). Kontrollisoluissa nähdään EV1:n ja kaveoliini-1:n kolokalisoituneen jonkin verran. Solun ulkopinnalla näkyy vielä runsaasti virusta. LY294002-käsittely, jonka tiedetään häiritsevän ainakin makropinosytoosireittiä, näyttäisi estävän kaveoliini-1:n ja EV1:n kolokalisaatiota. Virus ei ole päässyt solun sisälle yhtä tehokkaasti kuin kontrollinäytteessä. EIPA, joka estää Na^+/H^+ -pumpun toiminnan ja sen kautta häiritsee makropinosytoosin toimintaa, vaikuttaisi estävän myös kolokalisaation.



Kuva 4.4. Kuvassa punaisella värillä näkyy EV1 ja vihreällä kaveoliini-1. Kontrollisoluissa näkyy jonkin verran kaveoliini-1:n ja EV1:n kolokalisaatiota, kun taas EIPA-, ja LY294002-käsitellyissä soluissa kolokalisaatiota on vaikeampi havaita. Myrkyillä käsitellyissä soluissa EV1 on jäänyt selvästi solun reuna-alueille. Kaikissa kuvissa infektiotaika on 2 h.

Kaveoliini-1:n prosentuaalinen kolokalisaatio EV1:n kanssa laskettiin BioImageXD-ohjelmalla 2 h näytteistä (ks. kuvaaja 4.3).

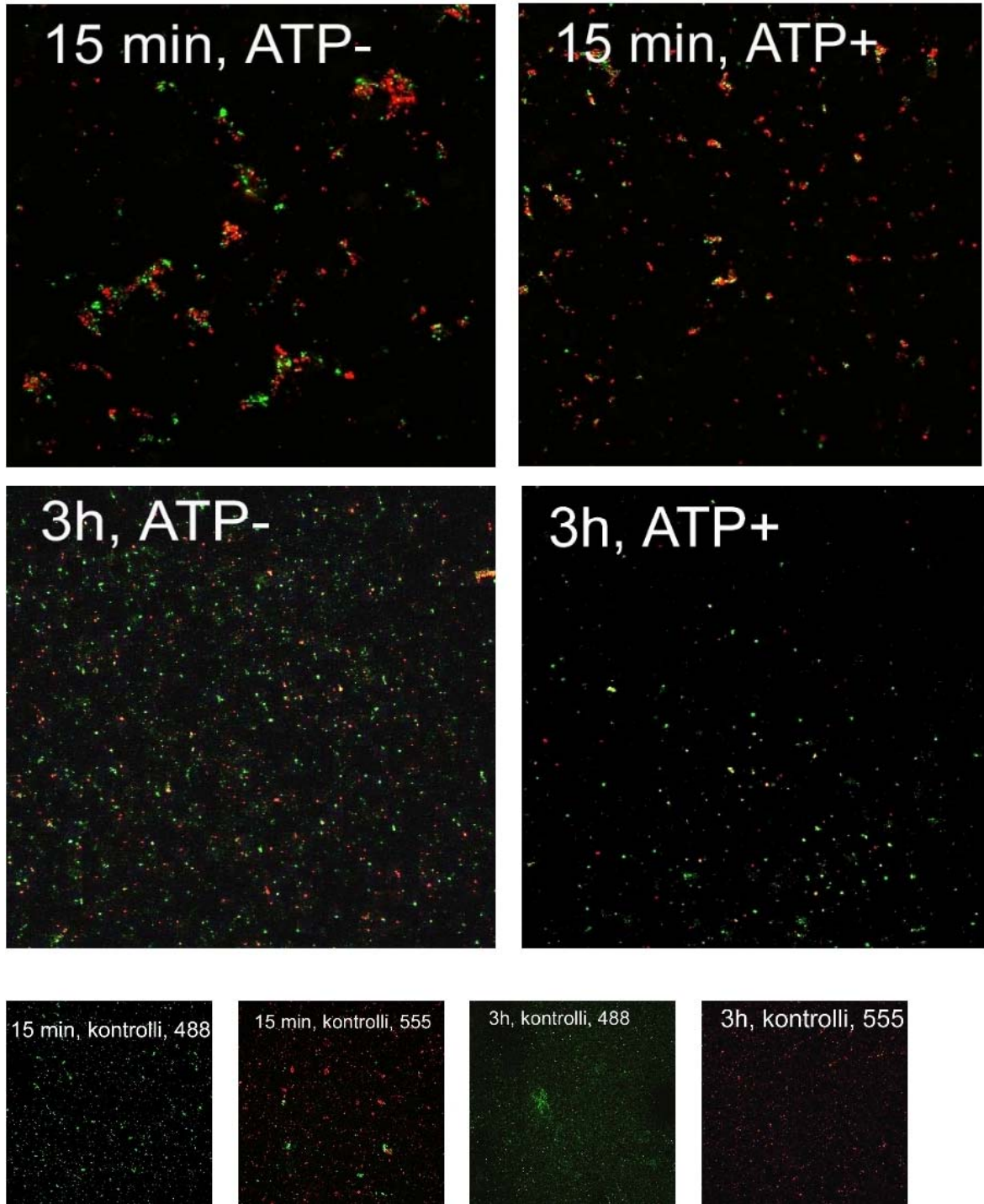


Kuvaaja 4.3. Kuvaajassa on punaisen kanavan (EV1) prosentuaalinen kolokalisaatio vihreän kanavan (cav-1) kanssa. Kontrollisoluissa kolokalisaatio on 51,20 %, LY294002:lla käsitellyissä soluissa 48,07 % ja EIPA:lla käsitellyissä soluissa 34,91 %. Costen algoritmi kaikille näytteille on 1. Kolokalisaatiot ovat tilastollisesti merkittäviä.

4.4. Rakkuloiden *in vitro*-fuusio

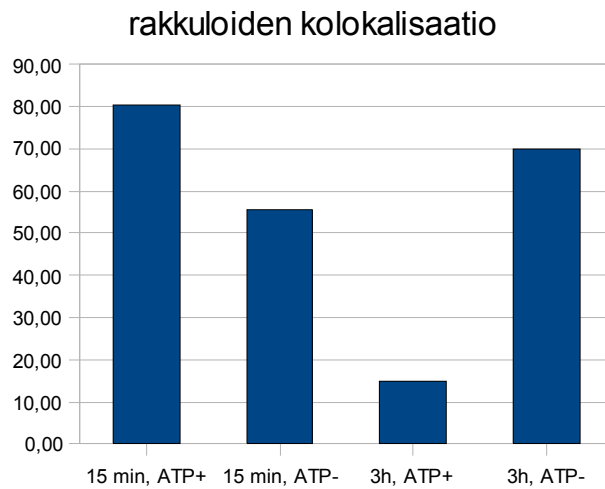
In vitro –fuusion avulla tutkittiin tarkemmin $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EV1:n käyttämää reittiä. Tarkoitus oli selvittää soluista eristetyn sytosolin avulla, onko rakkuloilla, joihin $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja EV1 kulkeutuvat, vuorovaikusta keskenään ja fuusioituvatko ne mahdollisesti yhteen. Integriinin internalisaatio saatiin aikaan vasta-ainekäsittelyllä. Soluista värjättiin $\alpha 2\beta 1$ -integriini käyttäen sekundääriväriä Alexa 488:aa tai 555:aa. Integriinin annettiin internalisoitua 37°C:ssa 1 h tai 3 h. Tämän jälkeen soluista eristettiin sytosoli. Eri väreillä käsitellyistä näytteistä valmistettujen sytosolien annettiin reagoida keskenään 1h tai 3h jäähauteella, ATP:tä ylläpitävässä tai hävittävässä liuoksessa.

Ensimmäisessä kokeessa integriinin annettiin internalisoitua soluihin joko 3 h tai 15 min (ks. kuva 4.5.). Soluista valmistettujen eri väreillä värjättyjen sytosolien annettiin reagoida kaikissa fuusioissa 1 h (ks. kuva 4.5.).



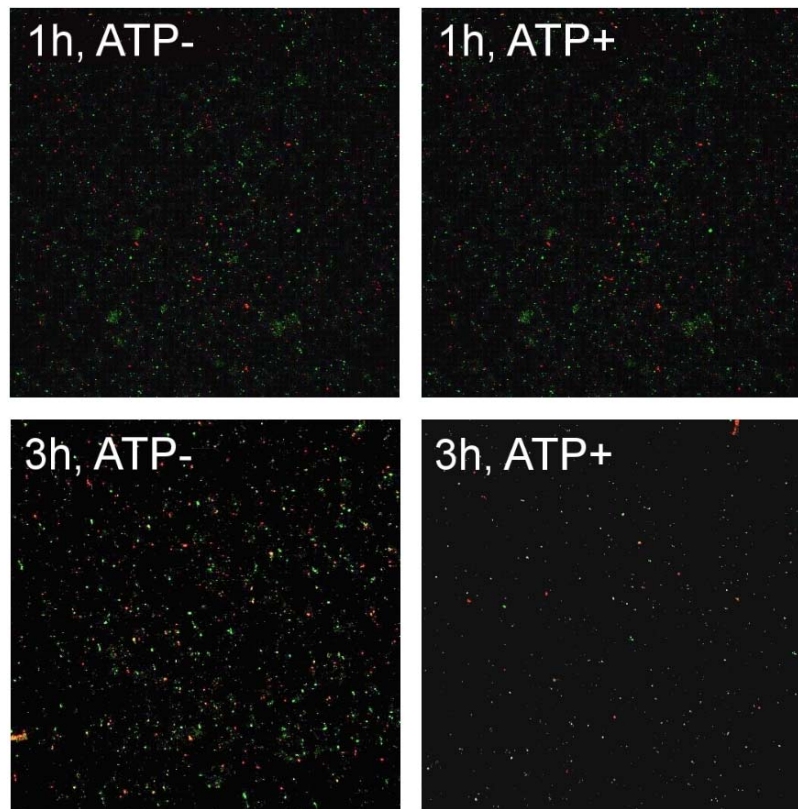
Kuva 4.5. $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä sisältävien rakkuloiden kolokalisaatio. $\alpha 2\beta 1$ -integroinin internalisaation annettiin edetä joko 15 min tai 3 h. Näytteissä käytettiin ATP:tä ylläpitävää tai sitä estävää systeemiä. Kontrolleina olivat pelkästään yhdellä värillä joko 555:lla tai 488:lla, värjättyt näytteet.

Eri väreillä värjättyjen $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä sisältävien rakkuloiden prosentuaalinen kolokalisaatio laskettiin BioImageXD-ohjelmalla (ks. kuvaaja 4.4.).



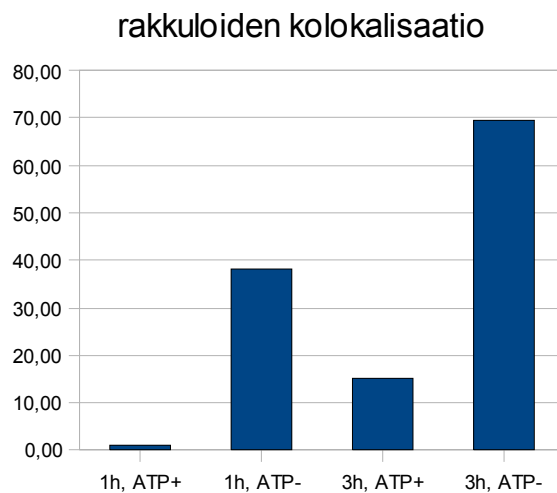
Kuvaaja 4.4 $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä sisältävien rakkuloiden prosentuaalinen kolokalisaatio määriteltiin vihreän kanavan prosentuaalisena kolokalisaationa punaisen kanavan kanssa. 15 min internalisoituneessa ATP+ näytteessä kolokalisaatio oli 80,33 %, 15 min ATP-:ssa 55,60 %, 3 h, ATP+:ssa 15,02 % ja 3h, ATP-:ssa 70,01 %. Costen algoritmi oli kaikissa näytteissä 1.

Toisessa kokeessa sytosolin pitoisuudeksi saatiin Alexa 488 -värjätystä näytteestä n. 210 $\mu\text{g/ml}$ ja Alexa 555:lla -värjätystä näytteestä 65 $\mu\text{g/ml}$. Tässä kokeessa kaikissa näytteissä integriinin annettiin internalisoitua 15 min. Fuusioreaktion annettiin edetä joko 1 h tai 3 h. Näytteitä tarkasteltiin tarkemmin konfokaalimikroskoopilla (ks. kuva 4.6.).



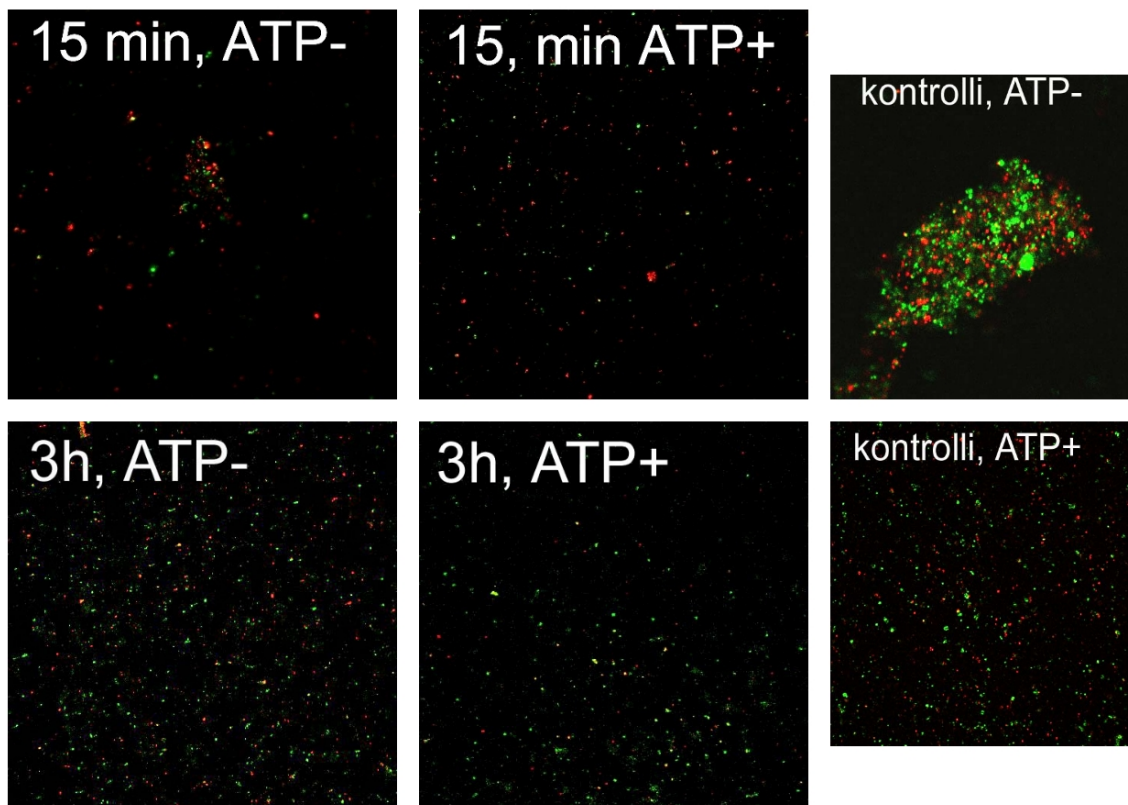
Kuva 4.6. $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä sisältävien rakkuloiden kolokalisaatio. Kaikissa näytteissä integriinin annettiin internalisoitua 15 min. Fuusioreaktio oli joko 1 h tai 3 h. Näytteissä käytettiin joko ATP:ta ylläpitävää tai sitä estävää systeemiä.

Eri väreillä värjättyjen $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä sisältävien rakkuloiden prosentuaalinen kolokalisaatio laskettiin BioImageXD-ohjelmalla (ks. kuvaaja 4.5.)



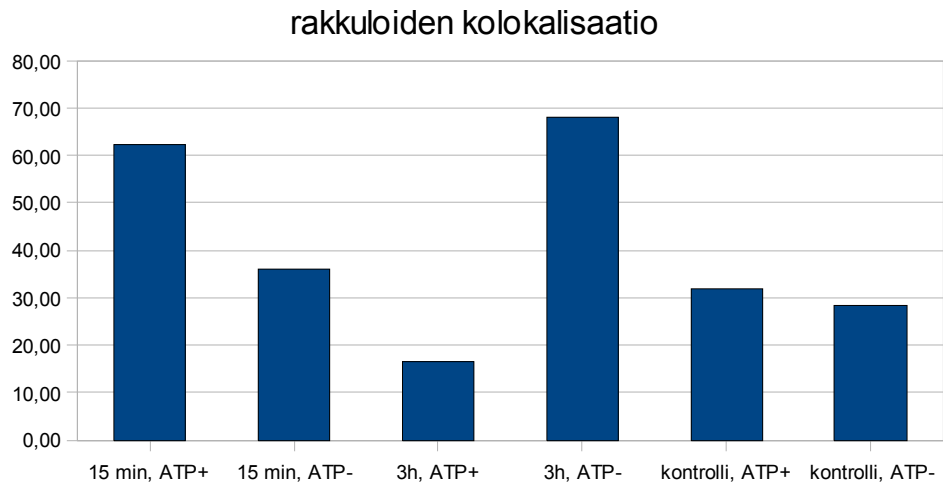
Kuvaaja 4.5. $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä sisältävien rakkuloiden prosentuaalinen kolokalisaatio määriteltiin vihreän kanavan prosentuaalisena kolokalisaationa punaisen kanavan kanssa. 1 h, ATP+ näytteessä kolokalisaatio on 1,15 %, 1 h, ATP-:ssa 38,05 %, 3 h ATP+:ssa 15,23 % ja 3 h, ATP-:ssa 69,59 %. Costen algoritmi on kaikissa näytteissä 1. Kolokalisaatio oli tilastollisesti merkitsevä.

Edelleen tehtiin koe, jossa kontrollina käytettiin αV - ja $\alpha 2$ -integriiniä sisältävien vesikkeleiden fuusiota. αV -integriini internalisoituu soluun klatriinivälitteisesti toisin kuin $\alpha 2$ -integriini (Upla ym. 2004). Näin ollen kontrollinäytteestä voitiin tarkastella klatriinireitin ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin käyttämän reitin vuorovaikutusta. αV -integriinin klusterointi saatiin aikaan L230 vasta-aineella ja siihen tarttuvalla sekundäärisellä vasta-aineella. Kokeessa käytettiin tarkoitusta varten eristettyä sytosolia fuusioreaktiossa tarvittavien proteiinien määrän lisäämiseksi. Bradfordin menetelmällä lisäproteiininin lähteeksi tarkoitettun sytosolin proteiinipitoisuudeksi saatiin 658 $\mu\text{g/ml}$. Näytteitä tarkasteltiin konfokaalimikroskoopilla (ks. kuva 4.7).



Kuva 4.7. $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä sisältävien rakkuloiden kolokalisaatio, jossa kontrollina toimi $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä sisältävien rakkuloiden ja αV -integroiniä sisältävien rakkuloiden fuusio. $\alpha 2\beta 1$ -integroinin αV -integroinin internalisaatioaika oli 15 min tai 3 h. Kaikissa näytteissä fuusioitumisen annettiin edetä 3 h. Kontrollinäytteissä $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä sisältävät rakkulat näkyvät vihreinä sekä αV -integroiniä sisältävät rakkulat punaisena.

Eri väreillä värjättyjen $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä sisältävien rakkuloiden prosentuaalinen kolokalisaatio laskettiin BioImageXD-ohjelmalla (ks. kuvaaja 4.6.).



Kuvaaja 4.6. Vihreän kanavan prosentuaalinen kolokalisaatio punaisesta kanavasta. 15 min ATP+ näytteessä kolokalisaatio on 62,40 %, 15 min ATP-:ssa 36,07 %. 3 h ATP+:ssa 16,41 %, 3 h, ATP-:ssa 67,98 %, kontrolli ATP+:ssa 31,97 % ja kontrolli ATP-:ssa 28,53 %. Costen algoritmi kaikissa näytteissä on 1. Kolokalisaatio oli tilastollisesti merkitsevä.

5. Tulosten tarkastelu

5.1. Echovirus 1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin internalisaatio sekä makropinosytoosi

Karjalaisen ym. (2008) tutkimuksen mukaan EV1:n internalisaatio liittyy alkuvaiheessaan makropinosytoosia sääteleviin mekanismeihin. Tämä tutkimus vahvistaa saman asian. LY294002, joka PI3-kinaasia inhiboimalla häiritsee makropinosytoosia, vähensi huomattavasti EV1-infektiota. PI3-K kykenee fosforyloimaan fosfatidyylinositolin ja tuottamaan näin signaloinnissa tarvittavia fosfoinositideja (de Camilli ym. 1996). Nämä molekyylit ilmeisesti kertyvät muodostuvan makropinosomaalisen kupin alueelle ja saavat aikaan erilaisten aktiinitukirankaan vaikuttavien molekyylien saapumisen alueelle (Rupper ym. 2001). PI3-K vaikuttaa enimmäkseen makropinosytoosin loppuvaiheessa, ei niinkään solukalvolle muodostuvien poimujen synnyssä.

Mitä aikaisemmassa EV1-infektion vaiheessa PI3-K:ta estävää myrkyä, LY294002:ta lisättiin, sitä vähäisempi osuus soluista infektoitui. Kuvassa (ks. taulukko I) infektioprosentti laskee äkisti 180 minuutin kohdalla. Lisäksi 60 minuutin kohdalla infektioprosentti nousi melko jyrkästi. Luultavasti nämä poikkeamat aiheutuvat jonkinlaisesta virheestä kokeen aikana. Karjalaisen ym. (2008) tutkimuksen mukaan 30 min ennen infektiota lisätty LY294002 esti infektion 70 %:sti. Tämä käy hyvin yksiin saamieni tulosten kanssa, joiden mukaan verrattuna kontrollisoluihin (infektioprosentti 55,0 %) infektion alkamisen yhteydessä annettu myrky vähensi solujen infektioprosenttia (33,1 %) voimakkaasti. Ilmeisesti PI3-K, jonka toimintaa myrky estää, vaikuttaa lähinnä EV1:n sisääntunkeutumisen alkuvaiheissa.

Tutkittaessa LY294002:n vaikutusta EV1:n 3D RNA-polymeraasin ilmenemiseen, havaittiin, ettei myrky estänyt sitä (kuva 4.1.). 3D RNA-polymeraasin ilmeneminen solussa on merkinä viruksen perimän replikaation alkamisesta. LY294002 ei siis niinkään vaikuta replikaatioon, vaan viruksen endosytoosiin. LY294002:n vaikutuksesta EV1 nimittäin jäi enimmäkseen solun reuna-alueille (ks. kuva 4.2.).

Makropinosytoosiin osallistuvien mekanismien tärkeään rooliin EV1:n internalisaatiossa viittaa myös U73122-myrkyn vaikutus. Myrky vaikuttaa fosfatidyylinositolispesifiseen fosfolipaasi C:n toimintaan ehkäisevästi, mikä häiritsee makropinosytoosin toimintaa (Amyere ym. 2000). Karjalaisen ym. (2008) tutkimuksen perusteella U73122 on tehokas vain infektion alkuvaiheessa, jolloin EV1 tunkeutuu solun sisään. Karjalaisen ym. (2008) mukaan myrky saa viruksen kertymään solun reuna-alueille. Tämä tutkimus vahvistavaa asian, sillä $\alpha 2\beta 1$ -

integriini, joka kulkeutuu soluun samaa reittiä kuin EV1, jäi myrkyä vaikutuksesta solujen reunalle (kuva 4.2.).

5.2. Echovirus 1:n yhteys kaveoliini-1:tä sisältäviin ja muihin rakkularakenteisiin

On havaittu, että EV1:n internalisaatio ei ole riippuvainen kaveoliinista eikä dynamiinista (Karjalainen ym. 2008). Samaa reittiä käyttävän $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusteroituminen saa aikaan integriinin kulkeutumisen monirakkulaisiin rakenteisiin, MVB:hen. $\alpha 2\beta 1$ -integriinin on havaittu myös siirtyvän kaveoliini-1:tä sisältäviin solunsisäisiin rakenteisiin, mahdollisesti kaveosomeihin. Internalisaation ensimmäisinä minuutteina kolokalisaatiota kaveoliini-1:n kanssa ei kuitenkaan havaita. $\alpha 2\beta 1$ -integriini sekä EV1 kulkeutuvat vasta myöhemmin n. 15 min infektion alkamisesta kaveoliini-1:tä sisältäviin rakenteisiin. Tämän tutkimuksen perusteella $\alpha 2\beta 1$ -integriini kolokalisoi 2 h:n infektion jälkeen jonkin verran kaveoliini-1:n kanssa. LY294002 ei näyttänyt estävän kolokalisaatiota. Koska LY294002 ei estänyt myöskään 3D RNA-polymeraasin ilmenemistä, on luultavaa, että myrky vaikuttaa vain infektion alkuvaiheissa, eikä vaikuta reitin myöhempisiin vaiheisiin. Mahdollisesti $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EV1:n internalisaatio voi tapahtua osittain myös sellaista reittiä, joka ei ole riippuvainen PI3-kinaasista. EIPA, joka on Na^+/H^+ -pumpun inhibiittori sekä U73122 olivat tehokkaita estäjiä kaveoliini-1:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kolokalisaatiolle. U73122:n vaikutus viittaa makropinosytoosin merkittävään rooliin myös integriinin sisään ottamisessa, sillä U73122 estää makropinosytoosissa tärkeän fosfatidyli-inositolispesifisen fosfolipaasi C:n toiminnan.

EIPA häiritsee sytoplasmassa olevien putkimaisten rakkularakenteiden kypsymistä monirakkulaisiksi rakenteiksi ns. MVB:ksi (Karjalainen ym. 2008). EV1:n on havaittu siirtyvän juuri tällaisiin rakenteisiin. Tässä tutkimuksessa havaittiin, että EIPA sai viruksen (kuva 4.4.) ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin (kuva 4.2.) jäämään solun ulkoreunalle ja esti sitä tunkeutumasta syvemmälle soluun. EIPA myös esti $\alpha 2\beta 1$ -integriinin (kuvaaja 4.1) ja EV1:n (kuvaaja 4.3.) kolokalisaatiota kaveoliini-1:n kanssa.

Jonkin verran virus kolokalisoi myöhäisille endosomeille tyypillisen LBPA:n kanssa (kuvaaja 4.2.), vaikka viruksen ei tiedetäkään menevän varhaisiin endosomeihin. 2 h infektion jälkeen kolokalisaatio oli huomattavasti suurempi kuin 15 min infektiossa. Viruksen päätyminen LBPA:ta sisältäviin rakenteisiin kestää todennäköisesti kauemmin kuin 15 min.

Ilmeisesti EV1 ei tarvitse PI3-K:ta päästäkseen LBPA:ta sisältäviin rakenteisiin, sillä LY294002:lla ei kokeessa ollut vaikutusta kolokalisaatioon.

Ratkaiseva merkitys vaikutti olevan myös solun ER:stä Golgiin ja edelleen endosomeihin johtavan erityisreitit sekä solukalvon uudelleenjärjestymisen säätelyllä. Brefeldiini A, joka estää tällä reitillä ja solukalvolla toimivien Arf-GTPaasien GEF:ien (guanine nucleotide exchange factor) toiminnan (Belov ym. 2008), esti tässä tutkimuksessa EV1:n 3D RNA-polymeraasin ilmenemisen.

Pietiäisen ym. (2004) tutkimuksen mukaan kolesterolia solukalvolta poistava nystatiini ja sen synteesiä häiritsevä progesteroni estivät EV1:n internalisaation CV-soluissa. Lisäksi MBCD, joka poistaa kolesterolin solukalvolta hävittää kaveolit ja estää EV1:n internalisaation (Marjomäki ym. 2002). Oman tutkimukseni mukaan U18666A, joka myös vaikuttaa kolesterolin määrään solukalvolla (Sparrow ym. 1999), ei juurikaan vaikuttanut solun infektoitumiseen EV1:llä. U18666A on kemikaali, joka häiritsee LDL:n kolesterolin kuljetusta lysosomeista ja solukalvolta ER:ään sekä lysosomeista solukalvolle (Sparrow ym. 1999). Mahdollisesti käytetty myrkkypitoisuus, jätti solukalvolle kolesterolia sen verran, että EV1 pääsi solun sisään. Suurempi myrkkypitoisuus olisi saattanut tuoda esiin selvimmän vaikutuksen.

5.3. *In vitro*-fuusio

Soluissa toimivien endosytoosireittien monimuotoisuus on suuri. On todennäköistä, että tällä hetkellä niistä tunnetaan vain osa. Tutkituimpien reittien, klatriinireitin, kaveolivälitteisen reitin, makropinosytoosin ja fagosytoosin lisäksi, on löydetty myös monia muitakin reittejä. Näitä ovat mm. CLIC/GEEC-reitti, IL2R β -reitti flotilliinista riippuvainen reitti sekä Arf6:sta riippuvainen reitti (ks. yleiskatsaus Doherty & McMahon 2009). Monet endosytoosin avulla soluun pääsevät taudinaiheuttajat tai solua hyödyttävät molekyylit käyttävät useampaa kuin yhtä reittiä. Esimerkiksi CTxB pääsee sytoplasmaan ainakin kaveolivälitteisesti, flotilliinivälitteisesti sekä CLIC/GEEC-reittiä pitkin.

Merkittävänä tekijänä solun kalvoliikenteessä on solunsisäisten rakkuloiden välinen fuusio. On luultavaa, että eri endosytoosireitteillä esiintyvät rakkulat voivat joissain tapauksissa fuusioitua keskenään. Tämän seikan tarkempi selvittäminen vaatii tulevaisuudessa vielä lisää tutkimustyötä. Rakkuloiden fuusio on tarkkaan säädelty ja siihen osallistuu monia proteiineja, kuten luvussa 1.1.5 todettiin (ks. esim. Söllner ym. 1993). Tässä tutkimuksessa haluttiin selvittää ovatko $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ja EV1:tä kuljettavat rakkulat vuorovaikutuksessa keskenään. Sen vuoksi soluista,

jotka olivat ottaneet sisäänsä $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä, eristettiin rakkuloita sisältävä sytosoli. Eri väreillä käsiteltyjen sytosolien annettiin sitten reagoida keskenään mahdollisen fuusion seuraamiseksi.

Mikroskooppikuvissa havaittiin rakkuloita joihin $\alpha 2\beta 1$ -integriini oli kulkeutunut. Osa rakkuloista sulautui toisiinsa. Rakkuloiden fuusion annettiin tapahtua joko 1 h tai 3 h. 3 h fuusioituneissa näytteissä kolokalisaatio vaikutti olevan jonkin verran suurempi kuin 1 h fuusioituneissa näytteissä (kuvaaja 4.5.). Ilmeisesti 1 h:n aikana fuusio ei ollut ehtinyt vielä tapahtua täydessä mitassaan.

Vaihtelu ATP:tä ylläpitävän ja sitä hajottavan systeemin välillä vaikutti olevan sattumanvaraista. Näiden kokeiden perusteella ei siis voinut päätellä, vaatiiko fuusioituminen ATP:tä. SNARE-proteiinien välittämä kalvorakenteiden fuusio (ks. tarkemmin kappale 1.1.5.) vaatii ATP:tä (Zhao ym. 2007). SNARE-kompleksiin tarttuvalla NSF:llä on ATPaasi aktiivisuus. ATP:n hydrolyysi saa aikaan kompleksin hajoamisen ja mahdollistaa SNARE-proteiinien kierrätyksen. Tässä tutkimuksessa vaihtelu ATP:tä ylläpitävän ja sitä hajottavan systeemin välillä vaikutti olevan sattumanvaraista. Näiden kokeiden perusteella ei siis voinut päätellä, vaatiiko fuusioituminen ATP:tä.

Klatrinireitin ja $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä kuljettavan reitin yhteyttä tutkittiin yrittämällä fuusioida αV -integriiniä sisältäviä rakkuloita $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä sisältävien rakkuloiden kanssa. Tiedetään, että αV -integriini pääsee solun sisään klatrinivälitteisesti (Joki-Korpela ym. 2001). Näissä kontrolleina käyttämissäni näytteissä havaittiinkin vain vähän kolokalisaatiota verrattuna suurimpaan osaan muita näytteitä (ks. kuvaaja 4.6.). Näin ollen klatrinireitti ei ainakaan ole merkittävässä määrin yhteydessä $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä tai EV1:ta kuljettavaan reittiin.

Yleisesti ottaen lasketut kolokalisaatiot vaikuttavat kuitenkin hyvin sattumanvaraisilta. On siis vaikea vetää kokeiden perusteella johtopäätöksiä rakkuloiden fuusiosta. Lisäksi *in vitro*-kokeet eivät välttämättä vastaa elävien solujen oloja.

LÄHTEET

- Ahn, S., Kim, J., Lucaveche, C.L., Reedy, M.C., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. & Daaka, Y. 2002. Src-dependent tyrosine phosphorylation regulates dynamin self-assembly and ligand-induced endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 26642-26651.
- Alpuche-Aranda, C. M., Racoosin, E. L., Swanson, J. A. & Miller, S. I. 1994. Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J.Exp.Med.* 179:601-608.
- Amyere, M., Payraastre, B., Krause, U., Van Der Smissen, P., Veithen, A. & Courtoy, P. J. 2000. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol. Biol. Cell* 11, 3453–3467.
- Anderson, R.G. 1993. Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. *Trends Cell Biol.* 3, 69-72.
- Araki, N., Johnson, M.T. & Swanson, J.A. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J.Cell Biol.* 135:1249-1260.
- Auvinen, P., Mäkelä, M.J., Roivainen, M., Kallajoki, M., Vainionpää, R. & Hyypiä, T. 1993. Mapping of antigenic sites of coxsackievirus B3 by synthetic peptides. *APMIS* 101:517-28.
- Barbieri, M.A., Kohn, A.D., Roth, R.A. & Stahl, P.D. 1998. Protein kinase B/akt and rab5 mediate Ras activation of endocytosis. *J.Biol.Chem.* 273:19367-19370.
- Bayer, N., Schober, D., Huttinger, M., Blaas, D. & Fuchs, R. 2001. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. *J. Biol. Chem.* 276, 3952-3962.
- Bedard, K.M. & Semler, B.L. 2004. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect.* 6:702-713.
- Belov, G.A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C.L. & Ehrenfeld, E. 2008. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog.* 2008 4:e1000216.

- Bergelson, J.M., Chan, B.M., Finberg, R.W. & Hemler, M.E. 1993. 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.F., Kawaguchi, S., Pasqualini, R., Berdichevsky, F., Hemler M.E. & Finberg R.W. 1994. The I domain is essential for echovirus 1 interaction with VLA-2. *Cell Adhes.Commun.* 2:455-464.
- Bodaghi, B., Slobbe-van Drunen, M.E., Topilko, A., Perret, E., Vossen, R.C., van Dam-Mieras, M.C., Zipeto, D., Virelizier, J.L., LeHoang, P., Bruggeman, C.A. & Michelson, S. 1999. Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2598-2607.
- Braga, V.M. 1999. Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol.Pathol.* 52:197-202.
- Cardelli, J. 2001. Phagocytosis and macropinocytosis in Dictyostelium: phosphoinositide-based processes, biochemically distinct. *Traffic.* 2:311-320.
- Cerboni, C., Gismondi, A., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L & Santoni, A. 1998. CD16-mediated activation of phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) in human NK cells involves tyrosine phosphorylation of Cbl and its association with Grb2, Shc, pp36 and p85 PI-3K subunit. *Eur.J.Immunol.* 28:1005-1015.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V.I., Capua, M.R., Takei, K., Butler, M.H., Di Fiore, P.P. & De Camilli, P. 1998. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394, 793-797.
- Cheng, F., Mani, K., van den Born, J., Ding, K., Belting, M. & Fransson, L.A. 2002. Nitric oxide-dependent processing of heparan sulfate in recycling S-nitrosylated glypican-1 takes place in caveolin-1-containing endosomes. *J. Biol. Chem.* 277, 44431-44439.
- Chubb, J.R., Wilkins, A., Thomas, G.M. & Insall, R.H. 2000. The Dictyostelium RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J.Cell Sci.* 113:709-719.
- Chun, M., Liyanage, U.K., Lisanti, M.P. & Lodish, H.F. 1994. Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11728-11732.
- Coffer, P.J., Jin, J. & Woodgett, J.R. 1998. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem.J.* 335:1-13.
- Cohen, B., Yoakim, M., Piwnica-Worms, H., Roberts, T.M. & Schaffhausen, B.S. 1990. Tyrosine phosphorylation is a signal for the trafficking of pp85, an 85-kDa phosphorylated

- polypeptide associated with phosphatidylinositol kinase activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 87:4458-4462.
- Corvera, S., D'Arrigo, A. & Stenmark, H. 1999.: Phosphoinositides in membrane traffic. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:460-465.
- Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G. & Lockett S. 2004. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys. J.* 86:3993–4003.
- Couet ,J., Sargiacomo, M. & Lisanti, M.P. 1997. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J.Biol.Chem.* 272: 30429-30438.
- Cupers, P., ter Haar, E., Boll, W. & Kirchhausen, T. 1997. Parallel dimers and anti-parallel tetramers formed by epidermal growth factor receptor pathway substrate clone 15. *J. Biol. Chem.* 272, 33430-33434.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T. & Helenius, A. 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J. Cell Biol.* 168, 477-488.
- De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. & Novick, P. 1996. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science.* 271:1533-1539.
- Devaney, M.A., Vakharia, V.N., Lloyd, R.E., Ehrenfeld, E. & Grubman, M.J. 1988. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* 62:4407-4409.
- Dietzen, D.J., Hastings, W.R. & Lublin, D.M. 1995. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 270, 6838-6842.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. & Wrana, J.L. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat.Cell Biol.* 5:410-421.
- Doherty, G.J. & McMahon, H.T. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 78:857-902.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C. *et al.* 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-2452.

- Drake, M.T., Downs, M.A. & Traub, L.M. 2000. Epsin binds to clathrin by associating directly with the clathrin-terminal domain. Evidence for cooperative binding through two discrete sites. *J. Biol. Chem.* 275, 6479-6489.
- Edidin, M. 2001. Membrane cholesterol, protein phosphorylation, and lipid rafts. *Sci. STKE* 2001, PE1.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. & Gill, G.N. 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1:253-259.
- Eliceiri, B.P., Puente, X.S., Hood, J.D., Stupack, D.G., Schlaepfer, D.D., Huang, X.Z., Sheppard, D. & Cheresch, D.A. 2002. Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Cell Biol.* 157, 149-160.
- Empig, C.J. & Goldsmith, M.A. 2002. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J. Virol.* 76:5266-5270.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J. & Liddington, R.C. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 101:47-56.
- Felding-Habermann, B. & Cheresch, D.A. 1993. Vitronectin and its receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 864-868.
- Fielding, P.E. & Fielding, C.J. 1995. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 34, 14288-14292.
- Filman, D.J., Wien, M.W., Cunningham, J.A., Bergelson, J.M. & Hogle, J.M. 1998. Structure determination of echovirus 1. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54:1261-1272.
- Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. & McMahon, H.T. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419, 361-366.
- Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R. & McMahon, H.T. 2001. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291, 1051-1055.
- Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J. & Falkow, S. 1993. Ruffles induced by Salmonella and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature.* 364:639-642.
- Fricks, C.E. & Hogle, J.M. 1990. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64, 1934-1945.

- Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A. & Cheresch, D.A. 1995. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270, 1500-1502.
- Fujimoto, T. 1993. Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell Biol.* 120, 1147-1157.
- Gagescu, R., Demaurex, N., Parton, R.G., Hunziker, W., Huber, L.A. & Gruenberg, J. 2000. The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. *Mol. Biol. Cell* 11, 2775-2791.
- Garrett, W.S., Chen, L.M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galán, J.E. & Mellman I. 2000. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell.* 102:325-334.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T. & Pepperkok, R. 1999. Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 1, 423-430.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiol.Rev.* 83:731-801.
- Grant, B.D. & Sato, M. (2006): Intracellular trafficking. Elektroninen aineisto (27.1.2009): http://www.wormbook.org/chapters/www_intracellulartrafficking/intracellulartrafficking.html
- Greene, B., Liu, S.H., Wilde, A. & Brodsky, F.M. 2000. Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombinant protein fragments: adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic* 1, 69-75.
- Griffiths, G. & Gruenberg, J. 1991. The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol.* 1, 5-9.
- Grist, N.R., Bell, E.J. & Assaad, F. 1978. Enteroviruses in human disease. *Prog.Med.Virol.* 24:114-157.
- Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 721-730.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-514.
- Heuser, J. 1980. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 84, 560-583.
- Hogle, J.M. 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu.Rev.Microbiol.* 56:677-702.

- Huang, X.Z., Wu, J.F., Cass, D., Erle, D.J., Corry, D., Young, S.G., Farese, R.V., Jr & Sheppard, D. 1996. Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *J. Cell Biol.* 133, 921-928.
- Huttunen, P., Heino, J & Hyypiä, T. 1997. Echovirus 1 replication, not only virus binding to its receptor, VLA-2, is required for the induction of cellular immediate-early genes. *J.Virol.* 71:4176-4180.
- Huttunen, P., Hyypiä, T., Vihinen, P., Nissinen, L. & Heino, J. 1998. Echovirus 1 infection induces both stress- and growth-activated mitogen-activated protein kinase pathways and regulates the transcription of cellular immediate-early genes. *Virology.* 250:85-93.
- Huttunen, P., Santti, J., Pulli, T. & Hyypiä, T. 1996. The major echovirus group is genetically coherent and related to coxsackie B viruses. *J.Gen.Virol.* 77:715-725.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S. & Takenawa, T. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291, 1047-1051.
- Joki-Korpela, P., Marjomäki, V., Krogerus, C., Heino, J. & Hyypiä, T. 2001. Entry of human parechovirus 1. *J.Virol.* 75:1958-1967.
- Kankaanpää, P., Pahajoki, K., Marjomäki, V., Heino, J. & White, D. 2006. BioImage X. D. BioImageXD—free open source software for analysis and visualization of multidimensional biomedical images. <http://www.bioimagexd.net>.
- Karjalainen, M, Kakkonen, E., Upla, P., Paloranta, H., Kankaanpää, P., Liberali, P., Renkema, G.H., Hyypiä, T., Heino, J. & Marjomäki, V. 2008. A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in alpha2beta1 integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol.Biol.Cell.* 19:2857-2869.
- Kartenbeck, J., Stukenbrok, H. & Helenius, A. 1989. Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 109, 2721-2729.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H. & Wrana, J.L. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol.Cell.* 6:1365-1375.
- Kurzchalia, T. V. & Parton, R.G. 1999. Membrane microdomains and caveolae. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11:424-431.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A. & Dautry-Varsat, A. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* 7, 661-671.

- Le, P.U., Guay, G., Altschuler, Y. & Nabi, I.R. 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 277, 3371-3379.
- Le, P.U. & Nabi, I.R. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 116:1059-1071.
- Li, S., Okamoto, T., Chun, M., Sargiacomo, M., Casanova, J.E., Hansen, S.H., Nishimoto, I. & Lisanti, M.P. 1995. Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270, 15693-15701.
- Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., Böckmann, R.A., Corda, D., Colanzi, A., Marjomaki, V. & Luini, A. 2008. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J.* 27:970-981.
- Liu, P. & Anderson, R.G. 1995. Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 270, 27179-27185.
- Luetterforst, R., Stang, E., Zorzi, N., Carozzi, A., Way, M. & Parton, R.G. 1999. Molecular characterization of caveolin association with the Golgi complex: identification of a cis-Golgi targeting domain in the caveolin molecule. *J. Cell Biol.* 145, 1443-1459.
- Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J. & Gerisch, G. 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell.* 83:915-924.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. 1995. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 14:3136-3145.
- Marjomäki, V., Pietiäinen, V., Matilainen, H., Upla, P., Ivaska, J., Nissinen, L., Reunanen, H., Huttunen, P., Hyypiä, T. & Heino, J. 2002. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* 76: 1856-1865.
- Martens S. & McMahon H.T. 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 543-556.
- Martin, P.T. & Sanes, J.R. 1997. Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Development* 124, 3909-3917.
- Martina, J.A., Bonangelino, C.J., Aguilar, R.C. & Bonifacino, J.S. 2001. Stonin 2: an adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery. *J. Cell Biol.* 153, 1111-1120.
- Mastick, C.C., Brady, M.J. & Saltiel, A.R. 1995. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J. Cell Biol.* 129, 1523-1531.

- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. 1982. Pathway of vesicular stomatitis virus entry leading to infection. *J. Mol. Biol.* 156, 609-631.
- Matlin, K.S., Reggio, H., Helenius, A. & Simons, K. 1981. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J. Cell Biol.* 91, 601-613.
- Mayor, S., Presley, J.F. & Maxfield, F.R. 1993. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* 121, 1257-1269.
- McNew J.A., Parlati F., Fukuda R., Johnston R.J., Paz K., Paumet F., Söllner T.H. & Rothman J.E. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407, 153-159.
- Meier, O. & Greber, U.F. 2004. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* 6:152-163.
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S.V., Keller, S., Stidwill, R.P., Hemmi, S. & Greber, U.F. 2002. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J. Cell Biol.* 158, 1119-1131.
- Meili, R., Ellsworth, C., Lee, S., Reddy, T.B., Ma, H. & Firtel, R.A. 1999. Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium. *EMBO J.* 18:2092-2105.
- Mercer, J. & Helenius, A. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* 11:510-520.
- Merritt, E.A. & Hol, W.G. 1995. AB5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 165-171.
- Metzler, M., Legendre-Guillemain, V., Gan, L., Chopra, V., Kwok, A., McPherson, P.S. & Hayden, M.R. 2001. HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *J. Biol. Chem.* 276, 39271-39276.
- Minshall, R.D., Tirupathi, C., Vogel, S.M., Niles, W.D., Gilchrist, A., Hamm, H.E. & Malik, A.B. 2000. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J. Cell Biol.* 150:1057-1070.
- Mishra, S.K., Keyel, P.A., Hawryluk, M.J., Agostinelli, N.R., Watkins, S.C. & Traub, L.M. 2002. Disabled-2 exhibits the properties of a cargo-selective endocytic clathrin adaptor. *EMBO J.* 21, 4915-4926.
- Misra, S., Miller, G.J. & Hurley, J.H. 2001. Recognizing phosphatidylinositol 3-phosphate. *Cell* 107, 559-562.
- Miyamoto S., Akiyama S.K. & Yamada K.M. 1995. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science.* 267:883-885.
- Miyazono, K., ten Dijke, P. & Heldin, C.H. 2000. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* 75:115-157.

- Monier, S., Parton, R.G., Vogel, F., Behlke, J., Henske, A. & Kurzchalia, T.V. 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 6, 911-927.
- Morris, S.M., Arden, S.D., Roberts, R.C., Kendrick-Jones, J., Cooper, J.A., Luzio, J.P. & Buss, F. 2002. Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic* 3, 331-341.
- Morris, S.M. & Cooper, J.A. 2001. Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic* 2, 111-123.
- Morris, S.M., Tallquist, M.D., Rock, C.O. & Cooper, J.A. 2002. Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport. *EMBO J.* 21, 1555-1564.
- Mousavi, S.A., Malerød, L., Berg, T. & Kjekken, R. 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem.J.* 377:1-16.
- Muhlberg, A.B., Warnock, D.E. & Schmid, S.L. 1997. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* 16, 6676-6683.
- Mukherjee, S., Soe, T.T. & Maxfield, F.R. 1999. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J. Cell Biol.* 144, 1271-1284.
- Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., Rifkin, D.B. & Sheppard, D. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96, 319-328.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V. & Simons, K. 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10339-10343.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. & ten Dijke, P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 389:631-635.
- Nichols, B. 2003. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* 116:4707-4714.
- Nichols, B.J., and Lippincott-Schwartz, J. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol.* 11, 406-412.
- Nishioka, H., Imoto, M., Sawa, T., Hamada, M., Naganawa, H., Takeuchi, T. & Umezawa, K. 1989. Screening of phosphatidylinositol kinase inhibitors from Streptomyces. *J. Antibiot.* 42:823-825.

- Nobes, C.D. & Hall, A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.
- Nobes, C & Marsh, M. 2000. Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake?. *Curr.Biol.* 10:739-741.
- Nossal, R. 2001. Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic* 2, 138-147.
- Oh, P., McIntosh, D.P. & Schnitzer, J.E. 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 141, 101-114.
- Ojcius, D.M., Bravo de Alba, Y., Kanellopoulos, J.M., Hawkins, R.A., Kelly, K.A., Rank, R.G. & Dautry-Varsat, A. 1998. Internalization of Chlamydia by dendritic cells and stimulation of Chlamydia-specific T cells. *J.Immunol.* 160:1297-1303.
- Owen, D.J., Vallis, Y., Noble, M.E., Hunter, J.B., Dafforn, T.R., Evans, P.R. & McMahon, H.T. 1999. A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* 97, 805-815.
- Owen, D.J., Vallis, Y., Pearse, B.M., McMahon, H.T. & Evans, P.R. 2000. The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.* 19, 4216-4227.
- Page, L.J. & Robinson, M.S. 1995. Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J. Cell Biol.* 131, 619-630.
- Parpal, S., Gustavsson, J. & Stralfors, P. 1995. Isolation of phosphooligosaccharide/phosphoinositol glycan from caveolae and cytosol of insulin-stimulated cells. *J. Cell Biol.* 131, 125-135.
- Parton, R.G. 1996. Caveolae and caveolins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8:542-548.
- Parton, R.G., Joggerst, B. & Simons, K. 1994. Regulated internalization of caveolae. *J.Cell Biol.* 127:1199-1215.
- Parton, R.G & Richards, A.A. 2003. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4:724-738.
- Parton, R.G & Simons, K. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:185-194.
- Pelkmans, L. & Helenius, A. 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic.* 3:311-320.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & 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.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. 1989. Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J. Virol.* 63, 441-444.

- Pietiäinen, V., Huttunen, P. & Hyypiä, T. 2000. Effects of echovirus 1 infection on cellular gene expression. *Virology*. 276:243-50.
- Pietiäinen, V., Marjomäki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A. & Hyypiä, T. 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol.Biol.Cell*. 15:4911-4925.
- Racoosin, E.L. & Swanson, J.A. 1992. M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J.Cell Sci*. 102:867-80.
- Rambourg A., Clermont Y., Jackson C.L. & Képès F. 1995. Effects of brefeldin A on the three-dimensional structure of the Golgi apparatus in a sensitive strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Anat. Rec.* 241, 1-9.
- Rapoport, I., Chen, Y.C., Cupers, P., Shoelson, S.E. & Kirchhausen, T. 1998. Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* 17, 2148-2155.
- Ravanti, L., Heino, J., López-Otín, C. & Kähäri, V.M. 1999. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 274:2446-2455.
- Razani, B., Combs, T.P., Wang, X.B., Frank, P.G., Park, D.S., Russell, R.G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L.A., Scherer, P.E. & Lisanti, M.P. 2002. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277, 8635-8647.
- Razani, B., Engelman, J.A., Wang, X.B., Schubert, W., Zhang, X.L., Marks, C.B., Macaluso, F., Russell, R.G., Li, M., Pestell, R.G. *et al.* 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 38121-38138.
- Richterová, Z., Liebl, D., Horák, M., Palková, Z., Stokrová, J., Hozák, P., Korb, J. & Forstová, J. 2001. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J. Virol.* 75:10880-10891.
- Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. & De Camilli, P. 1999. Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 24, 143-154.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122, 735-749.

- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I. & Wickham, T.J. 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 72, 7909-7915.
- Rohde, G., Wenzel, D. & Haucke, V. 2002. A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 158, 209-214.
- Rossmann, M.G., Arnold, E., Erickson, J.W., Frankenberger, E.A., Griffith, J.P., Hecht, H.J., Johnson, J.E., Kamer, G., Luo, M. & Mosser, A.G. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* 317, 145-153.
- Rossmann, M.G., He, Y. & Kuhn, R.J. 2002. Picornavirus-receptor interactions. *Trends.Microbiol.* 10:324-331.
- Rupper, A., Lee, K., Knecht, D. & Cardelli, J. 2001. Sequential activities of phosphoinositide 3-kinase, PKB/Akt, and Rab7 during macropinosome formation in Dictyostelium. *Mol.Biol.Cell.* 12:2813-2824.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G. & Mayor, S. 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev. Cell.* 2, 411-423.
- Salonen, A., Ahola, T. & Kääriäinen, L. 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 285:139-173.
- Santolini, E., Salcini, A.E., Kay, B.K., Yamabhai, M. & Di Fiore, P.P. 1999. The EH network. *Exp. Cell Res.* 253, 186-209.
- Schober, D., Kronenberger, P., Prchla, E., Blaas, D. & Fuchs, R. 1998. Major and minor receptor group human rhinoviruses penetrate from endosomes by different mechanisms. *J.Virol.* 72:1354-1364.
- Scherer, P.E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H.F. & Lisanti, M.P. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 131-135.
- Scherer, P.E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H.F. & Lisanti, M.P. 1995. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J. Biol. Chem.* 270, 16395-16401.

- Schlossman, D.M., Schmid, S.L., Braell, W.A. & Rothman, J.E. 1984. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* 99, 723-733.
- Schmid, S.L., McNiven, M.A. & De Camilli, P. 1998. Dynamin and its partners: a progress report. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 504-512.
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A.V., Witke, W., Huttner, W.B. & Soling, H.D. 1999. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401, 133-141.
- Sengar, A.S., Wang, W., Bishay, J., Cohen, S. & Egan, S.E. 1999. The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *EMBO J.* 18, 1159-1171.
- Sharp, G.W., Hynie, S., Lipson, L.C. & Parkinson, D.K. 1971. Action of cholera toxin to stimulate adenyl cyclase. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 84, 200-211.
- Shin, J.S., Gao, Z. & Abraham, S.N. 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science*. 289:785-788.
- Sieczkarski, S.B. & Whittaker, G.R. 2002 Dissecting virus entry via endocytosis. *J.Gen.Virol.* 83:1535-1545.
- Simons, K. & Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Smart, E.J., Ying, Y.S. & Anderson, R.G. 1995. Hormonal regulation of caveolae internalization. *J. Cell Biol.* 131, 929-938.
- Sparrow S.M., Carter J.M., Ridgway N.D., Cook H.W. & Byers D.M. 1999. U18666A inhibits intracellular cholesterol transport and neurotransmitter release in human neuroblastoma cells. *Neurochem Res.* 24, 69-77.
- Stang, E., Kartenbeck, J., & Parton, R.G. 1997. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell* 8, 47-57.
- Stanway, G. 1990. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71 (Pt 11), 2483-2501.
- Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M.A., Keen, J.H. & McGraw, T.E. 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6775-6780.
- Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R. & Brunger A.T. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Swanson, J.A. 2008. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:639-649.

- Swanson, J.A. 1989. Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J.Cell.Sci.* 94:135-142.
- Swanson, J.A. & Baer, S.C. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends.Cell Biol.* 5: 89-93.
- Swanson, J.A. & Watts, C. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424-428.
- Söllner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P. & Rothman J.E. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.
- Takei, K. & Haucke, V. 2001. Clathrin-mediated endocytosis: membrane factors pull the trigger. *Trends Cell Biol.* 11, 385-391.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L. & De Camilli, P. 1995. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* 374, 186-190.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V. & De Camilli, P. 1999. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 1, 33-39.
- Tang, Z., Scherer, P.E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D.S., Nishimoto, I., Lodish, H.F. & Lisanti, M.P. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 2255-2261.
- Tanowitz, M. & von Zastrow, M. 2003. A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. *J. Biol. Chem.* 278, 45978-45986.
- Tebar, F., Bohlander, S.K. & Sorkin, A. 1999. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol. Biol. Cell* 10, 2687-2702.
- Temesvari, L., Zhang, L., Fodera, B., Janssen, K.P., Schleicher, M. & Cardelli, J.A. 2000. Inactivation of ImpA, encoding a LIMPII-related endosomal protein, suppresses the internalization and endosomal trafficking defects in profilin-null mutants. *Mol.Biol.Cell.* 11: 2019-2031.
- Tiruppathi, C., Song, W., Bergenfeldt, M., Sass, P. & Malik, A.B. 1997. Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 25968-25975.
- Torgersen, M.L., Skretting, G., van Deurs, B. & Sandvig, K. 2001. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell. Sci.* 114, 3737-3747.

- Upla, P., Marjomäki, V., Kankaanpää, P., Ivaska, J., Hyypiä, T., Van Der Goot, F.G. & 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. & Heino, J. 2008. Calpain 1 and 2 are required for RNA replication of echovirus 1. *J.Virol.* 82:1581-1590.
- Valencia, A., Kjeldgaard, M., Pai, E.F. & Sander, C. 1991. GTPase domains of ras p21 oncogene protein and elongation factor Tu: analysis of three-dimensional structures, sequence families, and functional sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 88:5443-5447.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. & Fuchs, E. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell.* 100:209-219.
- Vecchi, M., Polo, S., Poupon, V., van de Loo, J.W., Benmerah, A. & Di Fiore, P.P. 2001. Nucleocytoplasmic shuttling of endocytic proteins. *J.Cell Biol.* 153:1511-1517.
- Venkatesan, S., Rose, J.J., Lodge, R., Murphy, P.M. & Foley, J.F. 2003. Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Mol. Biol. Cell* 14, 3305-3324.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. & Brown, R.F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J.Biol.Chem.* 269:5241-5248.
- Wang, X. & Bergelson, J.M. 1999. Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.* 73, 2559-2562.
- Wei, Y., Yang, X., Liu, Q., Wilkins, J.A. & Chapman, H.A. 1999. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J.Cell Biol.*144:1285-1294.
- West, M.A., Prescott, A.R., Eskelinen, E.L., Ridley, A.J. & Watts, C. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr.Biol.* 10:839-848.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A. & Nemerow, G.R. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309-319.
- Wigge, P. & McMahon, H.T. 1998. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* 21, 339-344.

- Wilson, J.M., de Hoop, M., Zorzi, N., Toh, B.H., Dotti, C.G. & Parton, R.G. 2000. EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 11, 2657-2671.
- Wolf, A.A., Jobling, M.G., Wimer-Mackin, S., Ferguson-Maltzman, M., Madara, J.L., Holmes, R.K. & Lencer, W.I. 1998. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J. Cell Biol.* 141, 917-927.
- Woodman, P.G., and Futter, C.E. 2008. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 408-414.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massagué, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 370: 341-347.
- Xing, L., Huhtala, M., Pietiäinen, V., Käpylä, J., Vuorinen, K., Marjomäki, V., Heino, J., Johnson, M.S., Hyypiä, T. & Cheng, R.H. 2004. Structural and functional analysis of integrin alpha2I domain interaction with echovirus 1. *J.Biol.Chem.* 279:11632-11638.
- Xiong J.P., Stehle T., Diefenbach B., Zhang R., Dunker R., Scott D.L., Joachimiak A., Goodman S.L. & Arnaout M.A. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science.* 294:339-345.
- Zhang, B. & Zehlf, A.C. 2002. Amphiphysins: raising the BAR for synaptic vesicle recycling and membrane dynamics. Bin-Amphiphysin-Rvsp. *Traffic* 3:452-460.
- Zhao, C, Slevin, J.T. & Whiteheart, S.W. 2007. Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett.* 581:2140-2149.

LIITE 1. JCB: STANDARD ABBREVIATIONS

2D, two-dimensional	EM, electron microscopy	mol, mole(s)
3D, three-dimensional	ER, endoplasmic reticulum	mol wt, molecular weight
A, ampere	EST, expressed sequence tag	MOPS, morpholino propane sulfonic acid
μA, microampere(s)	°F, degree Fahrenheit	<i>Mr</i> , relative molecular mass
mA, milliampere(s)	FACS, BD fluorescence-activated cell sorter	N, normal (concentration of ionizable groups)
Å, angstrom (10-10m)	F-actin, filamentous actin	<i>n</i> , number in a study or group
aa, amino acid(s)	FAK, focal adhesion kinase	NA, numerical aperture
ACTH, adrenocorticotropin	FBS, fetal bovine serum	NAD ⁺ , nicotinamide adenine dinucleotide
ADP, adenosine diphosphate	FCS, fetal calf serum	NADH, NAD ⁺ reduced
AMP, adenosine monophosphate	FGF, fibroblast growth factor	NADP, NAD ⁺ phosphate
cAMP, cyclic AMP	FISH, fluorescent in situ hybridization	NADPH, NADP reduced
AP, alkaline phosphatase	FITC, fluorescein isothiocyanate	NBD, nitrobenzoxadiazole
ATP, adenosine triphosphate	FRAP, fluorescence recovery after photobleaching	ND, not determined
ATPase, adenosine triphosphatase	g, gram	NEPHGE, nonequilibrium pH gradient electrophoresis
BHK, baby hamster kidney	g, unit of gravity	NGF, nerve growth factor
bp, base pair	GDP, guanosine diphosphate	NLS, nuclear localization signal
BrdU, bromodeoxyuridine	GFP, green fluorescent protein	No., number
BSA, bovine serum albumin	GST, glutathione S-transferase	NP-40, Nonidet P-40
°C, degree Celsius	GTP, guanosine triphosphate	NS, not significant
CaM, calmodulin	GTPase, guanosine triphosphatase	NSF, <i>N</i> -ethyl-maleimide sensitive fusion protein
Cdk, cyclin-dependent kinase	h, hour	nt, nucleotide
CFP, cyan fluorescent protein	HA, hemagglutinin	OD, optical density
CHAPS, 3-(3-cholamidopropyl)-diethylammonio-1 propanesulfonate	HBSS, Hanks' balanced salt solution	ORF, open reading frame
CHO, Chinese hamster ovary	Hepes, <i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethane sulfonic acid	osM, osmolar
Ci, curie(s)	HPLC, high performance liquid chromatography	PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis
μCi, microcurie(s)	HRP, horseradish peroxidase	PBS, phosphate-buffered saline
mCi, millicurie(s)	IEF, isoelectric focusing	PCA, perchloric acid
Con A, concanavalin A	IFN, interferon	PCR, polymerase chain reaction
cpm, counts per minute	Ig, immunoglobulin	PDGF, platelet-derived growth factor
cps, counts per second	i.l., intraluminal(ly)	PFA, paraformaldehyde
CTP, cytidine triphosphate	i.m., intramuscular(ly)	Pi, inorganic arthophosphate
cycle/min, cycle(s) per minute	i.p., intraperitoneal(ly)	Pipes, [1,4-piperazinebis(ethane sulfo nic acid)]
cycle/s, cycle(s) per second	IPTG, isopropyl-β-d-thiogalactoside	PKC, protein kinase C
D, dalton	IU, international unit(s)	PLC, phospholipase C
d, day	i.v., intravenous(ly)	PMA, phorbol myristate acetate
<i>d</i> , density	JNK, c-Jun NH2-terminal kinase	PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride
DAB, diaminobenzidine	kb, kilobase(s)	r, correlation coefficient
DAG, diacylglycerol	kbp, kilobase pair(s)	RBC, red blood cell
DAPI, 6'-diamidino-2-phenylindole	kD, kilodalton(s)	RER, rough endoplasmic reticulum
DEAE, diethylaminoethyl	liter(s), liter(s)	1/2
diam, diameter	μl, microliter(s)	RIA, radioimmunoassay
DME, Dulbecco's modified Eagle's medium	ml, milliliter(s)	RNA, ribonucleic acid
DMSO, dimethyl sulfoxide	m, meter	mRNA, messenger RNA
DNA, deoxyribonucleic acid	μm, micrometer(s)	siRNA, small interfering RNA
cDNA, complementary DNA	M, molar	tRNA, transfer RNA
DNase, deoxyribonuclease	mAb, monoclonal antibody	RNAi, RNA interference
DNP, dinitrophenyl	MAPK, mitogen-activated protein kinase	RNAase, ribonuclease
dpm, disintegrations per minute	MDCK, Madin-Darby canine kidney	RNP, ribonucleoprotein
dps, disintegrations per second	MEM, Eagle's minimum essential medium	rpm, revolutions per minute
DTT, dithiothreitol	MES, 2-(<i>N</i> -morpholino)ethane sulfonic acid	RT, room temperature
ECL, enhanced chemiluminescence	acid	RT-PCR, reverse transcription PCR
ECM, extracellular matrix	min, minute	s, seconds(s)
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid	mo, month	s, sedimentation coefficient
EGF, epidermal growth factor	MOI, multiplicity of infection	S, Svedberg unit of sedimentation
EGFP, enhanced GFP		
EGTA, ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)- <i>N,N'</i> -tetraacetic acid		
ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay		

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 test, Student's t test
t_{1/2}, half-life, half-time
TBS, Tris-buffered saline
TCA, trichloroacetic acid
TdR, thymidine deoxyribose
TGF, transforming growth factor
TGN, trans-Golgi network
TLC, thin layer chromatography
TNF, tumor necrosis factor
TRITC, tetramethylrhodamine
isothiocyanate
Tris,
tris(hydroxymethyl)aminomethane
t-SNARE, target membrane SNARE
TUNEL, Tdt-mediated dUTP-biotin
nick end labeling
U, unit
UDP, uridine diphosphate
UTP, uridine triphosphate
UV, ultraviolet
V, volt
VEGF, vascular endothelial growth
factor
vol, volume
v-SNARE, vesicle membrane
SNARE
W, watt
WGA, wheat germ agglutinin
wk, week
wt, weight
YFP, yellow fluorescent protein
yr, year