

Kasvutekijöiden merkitys $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja echovirus 1:n endosytoosissa

Pro gradu -tutkielma

Moona Lehkonen

Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologian osasto

Tammikuu 2011

Alkusanat

Tämä pro gradu -tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella, solu- ja molekyylibiologian osastolla kevään 2009 ja syksyn 2010 välisenä aikana.

Se alkoi mielenkiintoisesta aiheesta. Sen aikana saatiin uusia ystäviä, käytiin jännittävässä paikoissa ja tehtiin mieleenpainuvia tekoja. Loppujen lopuksi se myös valmistui. Kaiken tämän jälkeen voi vain kiittää ja kumartaa.

Erityisen suuret kiitokset Varpu Marjomäelle siipiensä suojaan ottamisesta ja eteenpäin ohjaamisesta. Syvä kumarrus Mikko Karjalaiselle: loistavat kuuntelutaitosi ja ystävälliset sanasi tekevät minuun suuren vaikutuksen kerta toisensa jälkeen. Kiitos Nina Rintaselle ja Paula Uplalle kärsivällisyydestä ja ihanista juttelutuokioista. Suuri tunnustus myös Lassi Paavolaiselle, joka on paikalla valmiina kuuntelemaan ja auttamaan aina tarvittaessa. Kiitokset Arja Mansikkaviitalle käytännön neuvoista ja opeista, ja Hilikka Reunaselle henkisestä tuesta, sitä todella tarvittiin. Kiitokset kuuluvat myös kaikille niille, jotka eivät työn edetessä luovuttaneet, vaan jatkoivat kyselemistä ja kannustamista. Kiitos Anssille vierellä kulkemisesta ja vanhemmille vahvasta taustatuesta.

Jyväskylässä

10.1.2011

Moona Lehkonen

Tekijä: Moona Lehkonen
Tutkielman nimi: Kasvutekijöiden merkitys $\alpha 2\beta 1$ -integroinin ja echovirus 1:n endosytoosissa
English title: Investigating the Role of Growth Factors on $\alpha 2\beta 1$ Integrin and Echovirus 1 Endocytosis
Päivämäärä: 10.01.2011 **Sivumäärä:** 47
Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Solubiologia
Tutkielman ohjaaja(t): Varpu Marjomäki (FT) ja Mikko Karjalainen (FM)

Tiivistelmä:

Solu ottaa sisäänsä materiaalia endosytoosin avulla. Koska soluun kuljetettavien molekyylien kirjo on laaja, soluun on kehittynyt erilaisia endosytoosireittejä. Fagosytoosin avulla soluun kuljetetaan suuria kiinteitä partikkeleita. Pinosytoosireittejä on useita, ja niiden avulla solu ottaa sisäänsä solukalvoa ja solun ulkopuolista nestettä sekä siihen liuenneita molekyyliä.

Kasvutekijäreseptorit ovat solukalvon lävistäviä reseptorityrosiinikinaaseja. Kasvutekijän sitoutuminen reseptoriinsa saa aikaan reseptorien kasaantumisen, signaalintekompleksien muodostumisen sekä reseptorin endosytoitumisen. Muodostuneet signaalintekompleksit aloittavat soluissa viestiketjuja, jotka lopulta johtavat muutoksiin solujen jakaantumisessa, kasvussa, erilaistumisessa ja liikkumisessa.

Integriinit ovat solukalvon tärkeimpiä adheesioreseptoreita, ja ne kiinnittävät solut viereisiin soluihin ja soluväliaineen proteiineihin. Integriinien kautta tapahtuva signaali vaikuttaa muun muassa solujen muotoon, kiinnittymiseen ja erilaistumiseen. Integriinit voivat lisäksi toimia patogeenekseptoreina. Integriinien ja kasvutekijäreseptoreiden välillä on havaittu yhteistyötä.

Echovirus 1 on ihmisen patogeeni, jonka reseptorina solukalvolla toimii $\alpha 2\beta 1$ -integroini. Viruksen sitoutuminen kasauttaa $\alpha 2\beta 1$ -integroinit solukalvolla, minkä jälkeen virus-reseptori -kompleksi endosytoidaan soluun.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, vaikuttavatko seerumin kasvutekijät $\alpha 2\beta 1$ -integroinin endosytoosiin ja echovirus 1:n infektiotehokkuuteen. Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integroinin endosytoositehokkuus selvitettiin kvantitatiivisen konfokaalimikroskopian avulla. Echovirus 1:n infektiivisyyttä eri seerumi- ja kasvutekijästimulaatioissa tutkittiin fluoresenssimikroskoopilla. Biokemiallisin menetelmin kartoitettiin $\alpha 2$ -integroinin, echovirus 1:n ja kasvutekijäreseptoreiden määriä soluissa eri seerumi- ja kasvutekijästimulaatioissa.

Tulosten mukaan kasvutekijät edistivät sekä $\alpha 2\beta 1$ -integroinin endosytoosia että echovirus 1 -infektiota ihmisen luusyöpäsoluissa, jotka ilmentävät runsaasti $\alpha 2\beta 1$ -integroiniä. Näiden solujen seeruminäлкиinnyttäminen lisäsi joidenkin kasvutekijäreseptoreiden ilmentymistä, muttei vaikuttanut $\alpha 2\beta 1$ -integroinin määrään. Myös toisessa solulinjassa, ihmisen aortan sileissä lihassoluissa, seeruminäлкиinnyttäminen aiheutti joidenkin kasvutekijäreseptoreiden määrän lisääntymistä. Toisin kuin luusyöpäsoluissa, sileissä lihassoluissa seeruminäлкиinnyttäminen kuitenkin tehosti echovirus 1 -infektiota.

Avainsanat: endosytoosi, kasvutekijäreseptori, $\alpha 2\beta 1$ -integroini, echovirus 1

Author: Moona Lehkonen
Title of thesis: Investigating the Role of Growth Factors on $\alpha 2\beta 1$ Integrin and Echovirus 1 Endocytosis
Finnish title: Kasvutekijöiden merkitys $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja echovirus 1:n endosytoosissa
Date: 10.01.2011 **Pages:** 47
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Varpu Marjomäki (PhD.) ja Mikko Karjalainen (M.Sc.)

Abstract:

Endocytosis is the process by which cells absorb molecules by engulfing them. Endocytotic pathways can be subdivided into two categories. Phagocytosis is the cellular process of engulfing solid particles by the cell membrane. In pinocytosis small particles, liquid and cell membrane are brought into the cell.

Growth factor receptors are hydrophobic transmembrane receptor tyrosine kinases. After ligand binding the receptors cluster and signaling complexes can form in the cytoplasm. At this point the receptor-ligand complexes are also endocytosed into the cell. The signaling complexes link growth factor receptor activation to downstream signal transduction pathways, leading to changes in cell division, growth, differentiation and movements.

Integrins are adhesion receptors that mediate attachment between a cell and the environment surrounding it, which may be other cells or the extracellular matrix. They also play a role in cell signaling and define cellular shape, attachment and differentiation. Integrins have also been documented to serve as receptors for pathogens. Crosstalk between integrins and growth factor receptors has also been studied.

Echovirus 1 is a human pathogen, which binds to $\alpha 2\beta 1$ integrin at a cell surface. Virus binding causes integrin clustering and virus-receptor complex internalization.

The purpose of this research was to find out if growth factors play a role in $\alpha 2\beta 1$ integrin internalization or echovirus 1 infection. The quantitative confocal microscopy was used to determine the internalization rate for clustered $\alpha 2\beta 1$ -integrins. The echovirus 1 infectivity was measured with fluorescence microscopy. The amounts of $\alpha 2$ integrins, echovirus 1 and growth factor receptors were estimated using biochemical methods.

The results showed that growth factors do enhance both $\alpha 2\beta 1$ integrin internalization and echovirus 1 infection in $\alpha 2\beta 1$ integrin expressing human osteosarcoma cell line. Starvation of the cells increased the amount of some growth factor receptors but did not affect $\alpha 2$ integrin levels. In human aortic smooth muscle cells, starvation also increased the amount of $\alpha 2$ integrin. Contrary to osteosarcoma cells, in these cells serum starvation enhanced the echovirus 1 infectivity.

Keywords: endocytosis, growth factor receptor, $\alpha 2\beta 1$ integrin, echovirus 1

Sisällysluettelo

1. Johdanto	7
1.1. Endosytoosi	7
1.1.1. Fagosytoosi	10
1.1.2. Makropinosytoosi	11
1.1.3. Mikropinosytoosi	13
1.2. Kasvutekijäreseptorit	16
1.2.1. EGF-, PDGF- ja VEGF -reseptorit	17
1.2.2. Kasvutekijäreseptoreiden endosytoosi	18
1.3. Integriinit	19
1.3.1. Integriinien endosytoosi	20
1.3.2. Integriinit ja kasvutekijäreseptorit	21
1.4. Echovirus 1 (EV1)	22
1.4.1. EV1:n endosytoosi	22
2. Tutkimuksen tarkoitus	24
3. Materiaalit ja menetelmät	25
3.1. Työssä käytetyt solulinjat, virukset ja reagenssit	25
3.2. Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmeno- sekä virusinfektiokokeet	26
3.3. Immunofluoresenssi ja mikroskopointi	27
3.4. Mikroskooppiaineiston analysointi	29
3.5. SDS-PAGE ja immunoblottaus	29
4. Tulokset	30
4.1. Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosi PDGF-stimuloituissa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa	30
4.2. EV1-infektio kasvutekijästimuloituissa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa	32
4.3. EV1-infektio kasvutekijästimuloituissa HASMC-soluissa	34
4.4. Integriinien kasautumisen ja EV1:n sitoutumisen vaikutukset $\alpha 2\beta 1$ -integriineihin sekä kasvutekijäreseptoreihin	35
5. Tulosten tarkastelu	37
5.1. Kasvutekijät edistävät $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenoa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa	37
5.2. Kasvutekijät tehostavat EV1-infektiota SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa	39
5.3. HASMC-solujen nälkiennyttäminen tehostaa EV1-infektiota	41
5.4. Yhteenveto	42
6. Lähdeluettelo	43

Lyhenteet

γcr	γ -sytokiinireseptori (engl. γ -cytokine reseptor)
Arf1/6	ADP-ribosylaatiotekijä 1/6 (engl. ADP Ribosylation Factor)
Cdc42	Solujakaantumista kontrolloiva proteiini, homologi 42 (engl. Cell Division Control protein 42 homolog)
CLIC-D/DI	Klatriinista ja kaveoliinista riippumaton endosytoosireitti, joka tarvitsee/ei tarvitse dynamiinia (engl. Clathrin Independent Carrier-Dynamin dependent/ Dynamin Independent)
CTB	<i>Vibrio cholerae</i> -bakteerin tuottama proteiinikompleksi (engl. Cholera Toxin B subunit)
CtBP/BARS	C-terminaaliin sitoutuva proteiini 1/brefeldinA-ADP -ribosyloitu substraatti (engl. C-terminal-Binding Protein/Brefeldin A-ADP Ribosylated Substrate)
DRM	Detergentiresistenssi solukalvoalue (engl. Detergent Resistent Membrane)
EGFr	EGF-reseptori
EV1	Echovirus 1
GPI-AP	Glykosyylifosfatidylini-inositoli -ankkuroitu proteiini (engl. Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein)
HASMC	Ihmisen aortan sileä lihassolu (engl. Human Aortic Smooth Muscle Cell)
IL2r	Interleukiini 2 -reseptori (engl. Interleukin 2 receptor)
Pak1/2	p21-aktivoitu kinaasi 1/2 (engl. p21-activated kinase 1/2)
PDGFα/β	PDGF-reseptori α/β
PI3K	Fosfoinositidi 3 -kinaasi (engl. Phosphoinositide 3-Kinase)
PI3P	Fosfatidyli-inositoli 3 -fosfaatti (engl. Phosphatidylinositol 3-phosphate)
PVDF	Polyvinyylideenifluoridi (engl. Polyvinylidene Fluoride)
Rac1	Ras-liittyvä C3 botulinum toksiini -substraatti 1 (engl. Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
RTK	Reseptorityrosiinikinaasi (engl. Reseptor Tyrosine Kinase)
SAOS-α2β1	Ihmisen luusyöpäsolulinja, joka ilmentää α 2 β 1-integriniä (engl. human osteosarcoma cells expressing α 2 β 1 integrin)
VEGFr-1/2/3	VEGF-reseptori 1/2/3

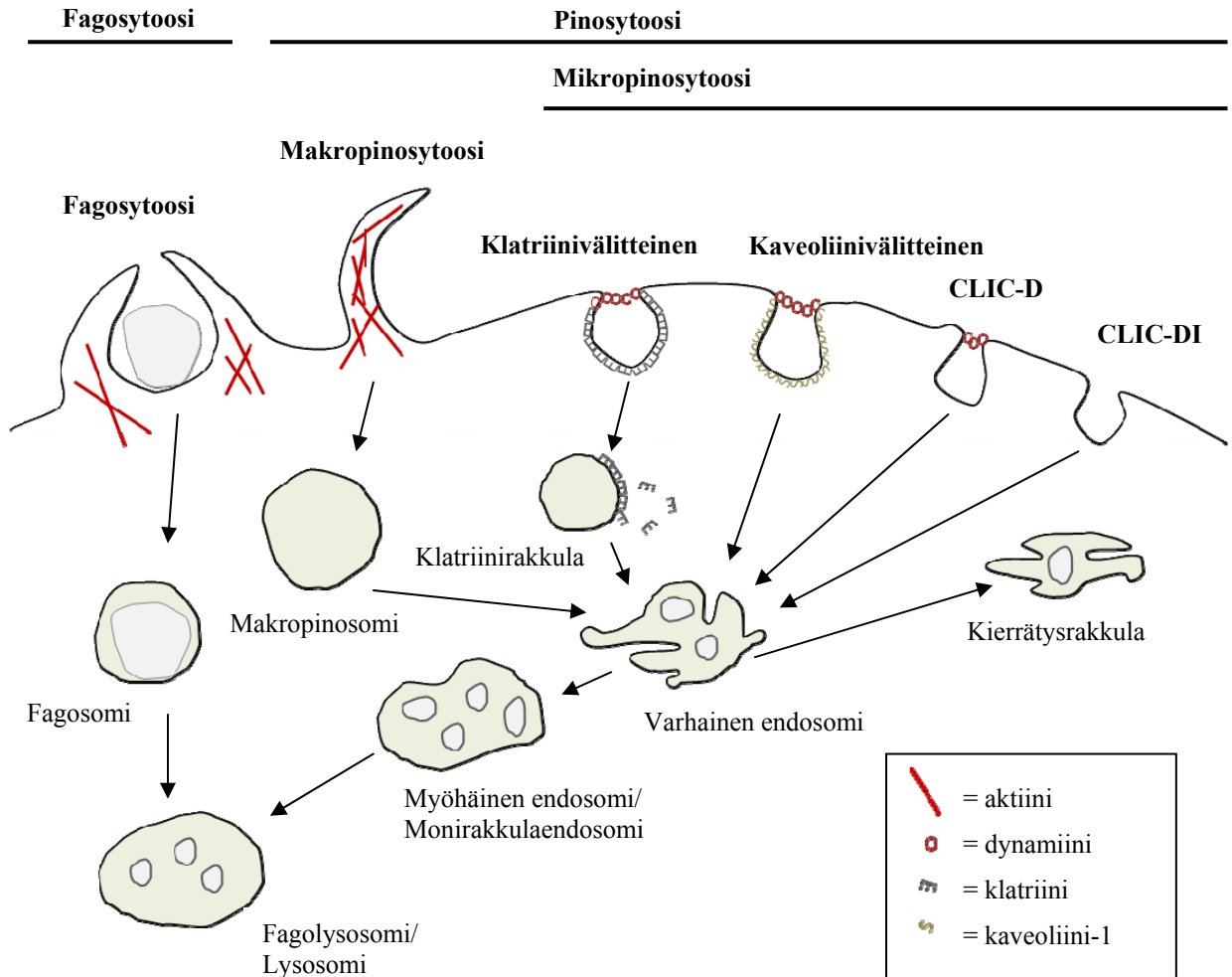
1. Johdanto

Solu kommunikoi ympäristönsä kanssa lipideistä ja proteiineista koostuvan solukalvon välityksellä. Solukalvon proteiinit kiinnittävät solun ympäristöönsä, osallistuvat solun sisään otettavien ja sieltä pois kuljetettavien molekyylien valikointiin sekä välittävät viestimolekyylien signaaleja solulimaan. Osa solukalvon proteiineista voi lisäksi toimia reseptoreina erilaisille patogeeneille.

1.1. Endosytoosi

Solukalvon koostumus on tarkkaan säädelty ja sen kautta molekyylit kulkevat sekä solun sisään (endosytoosi) että sieltä ulos (eksosytoosi). Solun endosytoima materiaali on yleensä nestettä ja siihen liuenneita molekyyliä, kuten ravinteita ja viestimolekyyliä. Osa immuunipuolustuksen soluista voi ottaa sisäänsä myös suurempia kiinteitä partikkeleita, kuten bakteereja. Ravinteiden ja viestimolekyylien sisäänoton lisäksi endosytoosi on mukana solukalvon lipidi- ja proteiinikoostumuksen säätelyssä, mitoosissa, antigeenien esittelyssä, solujen vaelluksessa sekä erilaisten signaalireittien aloituksessa. Myös useat patogeenit valjastavat käyttöönsä solujen endosytoosireittejä.

Soluun kuljetettavien molekyylien kirjo on laaja, ja soluun onkin kehittynyt erilaisia endosytoosireittejä (Kuva 1). Vaikka reitit eroavat toisistaan esimerkiksi mukana olevien säätelymolekyylien suhteen, reittien perusidea on sama. Ensimmäisessä vaiheessa sisään otettavat molekyylit tunnistetaan solukalvolla esimerkiksi solukalv reseptoreiden avulla. Tunnistettujen molekyylien ympärillä solukalvo poimuttuu tai painuu kuopalle ja lopulta kaksi solukalvoaluetta yhtyy toisiinsa. Solukalvolta irronneet rakkulat yhtyvät solulimasta löytyviin erilaisiin lipidikalvoilla ympäröityihin endosomaalisiin rakenteisiin (Kuva 1). Rakenteet mahdollistavat solun kemian erikoistumisen, mikä näkyy muun muassa proteiinien ja lipidien rikastumisena tietyillä kalvoalueilla sekä diffuusioesteiden muodostumisina soluliman ja rakenteiden sisäpuolien välille. Kalvojen proteiini- ja lipidikoostumuksien muutokset ja rakkuloiden sisältö säätelee monia soluliman tapahtumia.



Kuva 1. Endosytoosireittien jaottelu sekä yleisimmät endosomaaliset rakenteet.

Endosytoosi jaetaan fago- ja pinosytoosiin (Kuva 1). Fagosytoosia tapahtuu vain tietyissä solutyypeissä ja sen avulla soluun kuljetetaan kookkaita, kiinteitä partikkeleita, kuten bakteereja. Pinosytoosia tapahtuu kaikissa solutyypeissä ja sen avulla solu ottaa sisäänsä nestettä ja siihen liuenneita molekyylejä. Pinosytoosi voidaan jakaa edelleen makro- ja mikropinosytoosiksi (Kuva 1). Makropinosytoosin seurauksena solun sisälle muodostuu suuria rakkuloita, makropinosomeja. Mikropinosyyttiset rakkulat ovat pienempiä kuin makropinosomit ja niissä soluihin kulkeutuu nesteen sijaan lähinnä molekyylejä. Osa mikropinosytoosin avulla muodostuvista rakkuloista vuorataan solukalvolla kuoriproteiineilla, kuten klatriinilla tai kaveoliinilla. Lisäksi on olemassa näistä proteiineista riippumattomia mikropinosytoosireittejä (Kuva 1). Osa endosytoosireiteistä muodostaa rakkuloita jatkuvasti,

osa tarvitsee lastimolekyylin signaalin aktivoituakseen. On myös olemassa molekyylejä, jotka pääsevät soluun useita endosytoosireittejä pitkin riippuen ympäristökiteistä tai solutyypistä.

Yksi endosytoosin tärkeimmistä vaiheista on solukalvoalueiden yhtyminen ja endosyyttisen rakkulan irtoaminen solulimaan. Tutkituin solukalvojen yhdistymisessä toimiva proteiini on suuri GTPaasi, dynamiini (van der Blik ym., 1993). Makropinosytoosi ja osa mikropinosytoosireiteistä toimivat ilman tätä proteiinia, ja näillä reiteillä kalvojen yhtymisestä vastaavat muut molekyylit. Muun muassa makropinosytoosissa solukalvojen yhdistämisessä on mukana C-terminaaliin sitoutuva proteiini 1/brefeldinA-ADP -ribosyloitu substraatti (CtBP/BARS; Liberali ym., 2008). Endosytoosin monimuotoisuudesta huolimatta reittien säätelijöinä toimivat usein samat proteiiniperheet, kuten Rho-perheen pienet GTPaasit ja erilaiset ADP-ribosylaatiotekijät (Arf). Muita reiteille tärkeitä säätelytekijöitä voivat olla esimerkiksi aktiinitukiranka sekä solukalvon lipidi- ja proteiinikoostumus.

Solun lipidikalvot eivät ole tasakoosteisia. Sfingolipidit ja steroleista erityisesti kolesteroli järjestäytyvät yhteen tiukoiksi lautoiksi, erilleen ympäröivästä normaalista solukalvosta ja sen fosfolipideistä (ks. yleiskatsaus Rajendran ja Simons, 2005). Solukalvolla ajatellaan olevan useita erilaisia lipidilauttojen alatyyppejä. Esimerkiksi voimakas detergenttikäsittely ei liuota kaikkia kalvoalueita, jolloin ehjiksi jääneet alueet (DRM) voidaan eristää. Lipidilautat ovat dynaamisia rakenteita, ja niihin rikastuneet proteiinit ja lipidit voivat liikkua suhteellisen vapaasti lauttojen alueella ja niiden ulkopuolella (ks. yleiskatsaus Rajendran ja Simons, 2005). Lipidilauttojen on lisäksi ajateltu toimivan signaloivien molekyylien kokoontumis- ja aktivoitumispaikkoina (ks. yleiskatsaukset Simons ja Toomre, 2000; Rajendran ja Simons, 2005). Erilaiset endosyyttiset rakkulat voivat irrota solulimaan sekä lipidilautoilta että niiden ulkopuolelta.

Irrottuaan solukalvolta rakkulat jatkavat matkaansa solulimassa (Kuva 1). Lähes kaikilta endosytoosireiteiltä rakkulat ohjautuvat suoraan tai epäsuoraan varhaisiin endosomeihin, joissa lastimolekyylien lajittelu alkaa. Varhaisissa endosomeissa alhainen pH auttaa irrottamaan lastimolekyylit reseptoreistaan. Tämän jälkeen reseptorit voidaan kierrättää takaisin solukalvolle kierrätysendosomeissa, joissa on korkeampi pH kuin varhaisissa endosomeissa. Osa reseptoreista kuljetetaan jatkolajitteluun monirakkula- ja myöhäisiin endosomeihin (ks. yleiskatsaukset Gruenberg 2001; Gruenberg ja van der Goot, 2006).

Monirakkulaendosomien sisärakkuloiden muodostuminen alkaa jo varhaisissa endosomeissa, ja niiden muodostumista säätelevät sekä soluliman että endosomien omat proteiinit (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). Monirakkulaendosomit kypsyvät usein myöhäisiksi endosomeiksi. Myöhäisten endosomien sisärakkulat eivät ole keskenään samanlaisia, eikä sisärakkuloiden lasteja ohjata myöhäisistä endosomeista samaan paikkaan. Osa proteiini- ja lipidilastista ohjataan takaisin solukalvolle, kun taas osa kuljetetaan lysosomeihin hajotettavaksi (ks. yleiskatsaukset Gruenberg ja van der Goot, 2006; Doherty ja McMahon, 2009). Lysosomeissa molekyylien hajotuksesta vastaavat alhainen pH sekä lysosomaaliset entsyymit. Eri endosomaaliset osastot eivät eroa ainoastaan tehtäviltään vaan myös lipidi- ja proteiinikoostumuksiltaan. Varhaisista endosomeista löytyy pieni GTPaasi, Rab5 ja myöhäisistä endosomeista Rab7. Monirakkulaendosomeista on löydetty molempia (Rink ym., 2005). Kuten solukalvolta, myös varhaisista ja myöhäisistä endosomeista löytyy erilaisia kalvoalueita (ks. yleiskatsaus Gruenberg, 2001). Seuraavaksi käydään tarkemmin läpi solun erilaisia endosytoosireittejä.

1.1.1. Fagosytoosi

Tietyt immuunipuolustuksen solut osaavat endosytoida ja hajottaa mikrobeja sekä solujätettä fagosytoosin avulla. Monisoluisissa eliöissä fagosytoosi aktivoi puolustusmekanismeja ja on mukana sikiön kehityksessä sekä kudosten uudelleen järjestäytymisessä (ks. yleiskatsaus Aderem ja Underhill, 1999). Yksi harvoista fagosytoosin avulla soluihin tunkeutuvista viruksista on herpes simplex virus (Clement ym., 2006).

Solun pinnalla fagosyyttiset reseptorit sitoutuvat patogeeniin, ja aktiinin toiminnan seurauksena partikkelin ympärille muodostuu solukalvokuppi (Kuva 1). Solulimaan irronnut fagosomi ei pysty hajottamaan sisällään olevaa partikkelia, vaan sen täytyy kypsyä fagolysosomiksi. Kypsymisen aikana fagosomi vaihtaa molekyylijä soluliman ja eri endosomaalisten rakenteiden kanssa (ks. yleiskatsaus Aderem ja Underhill, 1999). Fagolysosomi kykenee hajottamaan sisällään olevan partikkelin matalan pH:n, aktiivisen NADPH-oksidaasikompleksin sekä lysosomaalisten entsyymien avulla (ks. yleiskatsaus Watts, 2006).

Fagosyyttisen reseptorin sisäänotto aktivoi solussa erilaisia kinaaseja, ja aiheuttaa muutoksia solun fosfolipidimetaboliassa. Yksi aktivaation kohteista on PLC. PLC hydrolysoi solukalvon fosfolipidejä, mikä puolestaan aktivoi aktiinisäikeiden muodostuksessa vaikuttavaa PKC:tä (ks. yleiskatsaus Allen ja Aderem, 1995). Mukana fagosytoosin säätelyssä on myös fosfoinositidi 3 -kinaasi (PI3K) ja useita myosiinimoottoreita, joiden avulla fagosomi liikkuu solulimassa. Aktiinin uudelleen järjestäytyminen on välttämätöntä fagosytoosin onnistumiselle, mutta säätelijäproteiinit vaihtelevat riippuen sisään otettavasta lastimolekyylisestä. Tyypin I fagosytoosissa säätelijöinä toimivat Rho-GTPaasi -perheeseen kuuluvat Ras-liittyvä C3 botulinum toksini -substraatti 1 (Rac1) ja solujakaantumista kontrolloivan proteiinin homologi 42 (Cdc42) sekä Arf6 (Caron ja Hall, 1998; Zhang ym., 1998). Tyypin II fagosytoosissa Rho-aktivaatio on tärkeä (Caron ja Hall, 1998). Fagosomin yhtymisessä varhaisten ja myöhäisten endosomien sekä lysosomien kanssa auttavat muun muassa Rab-proteiiniperheen jäsenet (ks. yleiskatsaus Allen ja Aderem 1995) sekä fosfatidyli-inositoli 3 -fosfaatti (PI3P; Vieira ym., 2001).

1.1.2. Makropinosytoosi

Toisin kuin fagosytoosi, makropinosytoosi ei välttämättä tarvitse toimiakseen solukalvon reseptoreita eikä ympäröivää partikkelia. Soluun muodostuvat makropinosomit (Kuva 1) ovat suuria, halkaisijaltaan noin 0,2-10 µm kokoisia rakkuloita, joiden avulla solu ottaa sisäänsä solukalvoa sekä nestettä ja siihen liuenneita molekyylejä. Tämän lisäksi makropinosytoosi vaikuttaa myös solujen liikkuvuuteen ja on mukana aktivoitujen signaalimolekyylien vaimennussäätelyssä (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Immuunipuolustuksen soluissa antigeenejä lajitellaan makropinosytoosin avulla (ks. yleiskatsaus Norbury, 2006). Makropinosytoosia tai sen kaltaisia endosytoosireittejä käyttäviä viruksia ovat muun muassa vaccinia virus, adenovirus 3 sekä echovirus 1 (EV1; Karjalainen ym., 2008; yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009).

Makropinosytoosin aikana aktiini muodostaa solukalvolle poimuja, jotka voivat joko palautua takaisin tai muodostaa solun sisälle irtoavan rakkulan (Kuva 1). Makropinosytoosi ei ole sattumanvarainen tapahtuma, vaan solu pystyy valikoimaan makropinosomeihin lastattavia proteiineja (Mercanti ym., 2006). Antigeenejä esittelevissä soluissa makropinosytoosia

tapahtuu jatkuvasti, kun taas toisissa solutyypeissä makropinosytoosin saa alulle vain kasvutekijä- tai jokin muu ärsyke (Araki ym., 2007). Solussa makropinosomeilla on monia kulkeutumisvaihtoehtoja solutyypistä ja solun kulloisestakin vaiheesta riippuen. Makropinosomit voivat fuusioitua keskenään tai toisten endosomaalisten rakkuloiden kanssa, ja makropinosomeja kulkeutuu myös lysosomaaliselle reitille tai palautuu takaisin solukalvolle (Hewlett ym., 1994; Araki ym., 2007). Makropinosomien takaisinkierto palauttaa solukalvolle myös kalvomateriaalia (Hewlett ym., 1994).

Vaikka makropinosytoosi ei välttämättä tarvitse toimiakseen solukalvolla aktivoituvia reseptoreita, on esimerkiksi EGF-reseptorin (EGFr) havaittu lisäävän makropinosytoosia. Aktivaation syntyyn ei aina tarvita edes reseptoriin sitoutuvaa kasvutekijää (Donepudi ja Resh, 2008). Aktivoitunut reseptori fosforyloituu, mikä houkuttelee paikalle kinaaseja ja adaptoriproteiineja. Alkanut signaaliketju johtaa kalvolipidien ja proteiinien fosforyloitumiseen, solukalvon poimuttumiseen ja lopulta makropinosomien muodostumiseen (ks. yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009).

Makropinosytoosin säätelijöinä toimivat muun muassa useat pienet GTPaasit, jotka ovat mukana solukalvon poimuttumisessa ja makropinosomien muodostumisessa. Rho-proteiiniperheeseen kuuluvan Rac1:n aktivoituminen solun pinnalla lisää makropinosytoosin lisäksi fagosytoosia (Hewlett ym., 1994). Rac1 sitoutuu aktiiniin ja on mukana sen uudelleen järjestäytymisessä makropinosytoosin aikana (ks. yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009). Jatkuvasti makropinosytoivissa soluissa säätelijäproteiinina toimii Cdc42 (ks. yleiskatsaus Norbury, 2006). Sekä Rac1 että Cdc42 aktivoivat puolestaan p21-aktivoitua kinaasi 1:tä (Pak1; ks. yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009). Muita makropinosytoosin säätelyssä toimivia molekyyliä ovat muun muassa PI3K ja PLC (Araki ym., 2007). Makropinosytoosi on dynamiinista riippumaton endosytoosireitti, ja solukalvojen yhdistymisestä vastuussa olevaksi molekyyliksi on ehdotettu CtBP1/BARS -proteiinia. Aktivoiduttuaan CtBP1/BARS siirtyy poimuttuneelle kalvoalueelle ja kerääntyy muodostuvan makropinosyyttisen kupin kaulan alueelle (Liberali ym., 2008).

1.1.3. Mikropinosytoosi

Mikropinosomeissa soluun kuljetetaan molekyylejä ja pieniä määriä nestettä. Klatriinivälitteisellä reitillä muodostuvat rakkulat on päällystetty klatriiniproteiinilla. Kaveoliinivälitteisessä mikropinosytoosissa solukalvolle muodostuu kuopakkeita, jotka on päällystetty kaveoliiniproteiinilla. Klatriini- ja kaveoliinivälitteisen endosytoosin lisäksi on olemassa useita näistä riippumattomia endosytoosireittejä (Kuva 1). Sekä kaveoliini- että klatriinivälitteiset reitit ovat riippuvaisia solukalvoja yhdistävästä dynamiinista. Klatriinista ja kaveoliinista riippumattomat reitit voivat olla joko dynamiinista riippuvia tai riippumattomia.

Klatriinivälitteinen endosytoosi

Useat kalvoproteiinit pääsevät solun sisään klatriinivälitteisellä endosytoosilla. Tähän ryhmään kuuluvat muun muassa ravinteiden sisäänottoa säätelevät reseptorit, kuten lipoproteiini- ja transferriinireseptorit (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Myös useat signaloivat proteiinit, kuten kasvutekijäreseptorit ja G-proteiinin liitetyt reseptorit endosytoituvat klatriinireitin avulla (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). Klatriinivälitteinen endosytoosi on tärkeä solun homeostasian ylläpitäjä, ja se kontrolloi solujen välistä kommunikaatiota kudosis- ja elinkehityksen aikana (ks. yleiskatsaus Conner ja Schmid, 2003). Klatriinivälitteisen endosytoosin avulla soluihin tunkeutuvia viruksia ovat muun muassa semliki forest -virus sekä adenovirus 2 (ks. yleiskatsaus Pelkmans ja Helenius, 2003).

Reitin aktivoituessa klatriiniproteiini värvätään solukalvolle, jossa se muodostaa klatriinilla päällystettyjä, solun sisään painuvia kuopakkeita. Reaktiossa avustavat proteiinit muun muassa ohjaavat, kasauttavat ja kiinnittävät klatriinin solukalvolle (ks. yleiskatsaus Benmerah ja Lamaze, 2007). Kortaktiini on yksi reaktiossa mukana olevista proteiineista. Se sitoutuu sekä aktiiniin että dynamiiniin edistäen aktiinin polymerisaatiota (Schafer ym., 2002). Aktiinin ja dynamiinin toiminnan seurauksena solulimaan irtoaa klatriinilla päällystetty rakkula, jonka proteiinivuoraus puretaan nopeasti kalvolta irtoamisen jälkeen erityisten ATPaasien avulla (ks. yleiskatsaus Benmerah ja Lamaze, 2007). Klatriinireitin rakkuloiden matka solun sisällä etenee varhaisten, monirakkula- ja myöhäisten endosomien kautta lysosomeihin (Kuva 1). Hajotusreitin lisäksi osa lastista ohjataan kierrätysreiteille (Kuva 1; ks.

yleiskatsaus Zwang ja Yarden, 2009). Erityiset SNARE-proteiinit ovat solukalvoproteiineja, jotka säätelevät rakkuloiden yhdistymis- ja lastien kohdentamisreaktioita (ks. yleiskatsaus Gruenberg, 2001). Klatriinireitillä SNARE-proteiinit toimivat myöhäisten endosomien yhdistämisreaktioissa (Luzio ym., 2009). Klatriinireitin säätelijöinä toimivat lisäksi erilaiset Rab-proteiinit. Varhaisissa endosomeissa vaikuttaa Rab5, ja myöhäisissä endosomeissa sekä monirakkulaendosomeissa säätelijänä toimii Rab7. Kierrätysendosomien Rab-proteiineina toimivat Rab4 ja Rab11 (ks. yleiskatsaus Zwang ja Yarden, 2009).

Kaveoliinivälitteinen endosytoosi

Toinen dynamiinista ja aktiinista riippuvainen mikropinosytoosireitti on kaveoliinivälitteinen endosytoosi. Reitillä avulla soluihin kulkeutuvat muun muassa glykosyylifosfatidylkoliini-inositoli-ankkuroidut proteiinit (GPI-AP:t), *Vibrio cholerae* -bakteerin tuottama proteiinikompleksi (CTB) sekä SV40 (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). Kaveoliinireitti on yhdistetty muun muassa transsytoosiin (ks. yleiskatsaus Hansen ja Nichols, 2009) sekä kalsiumin sisäänmenoon ja signaalointiin (Daniel ym., 2006). Kaveoliinivälitteisellä endosytoosireitillä on myös havaittu olevan rooli useiden molekyylien vaimennussäätelyssä (ks. yleiskatsaus Kumari ja Mayor, 2010)

Solukalvolle muodostuviin kuopakkeisiin (Kuva 1), kaveoleihin, kertyy kolesterolia ja sfingolipidejä, ja kaveola-alueita voidaankin pitää yhtenä lipidilautojen alatyypinä. Pääkomponenttina kaveolarakenteissa on kolesterolia sitova kaveoliini-1 -proteiini. Solukalvoreseptorin aktivoituessa solukalvon aktiini järjestäytyy uudelleen ja dynamiinin toiminta irrottaa kaveoliinivuoratun rakkulan solulimaan. Kaveoliini-1 -positiivisia rakkuloita on aiemmin kutsuttu kaveosomeiksi, mutta uusimmissa tutkimuksissa niiden olemassaolo on kyseenalaistettu (Hayer ym., 2010). Kaveoliini-1 -positiivisten rakkuloiden pH on neutraali, ja ne kuljettavat lastinsa muihin endosomaalisiin rakenteisiin (Hayer ym., 2010).

Klatriinista ja kaveoliinista riippumaton endosytoosi

Klatriinista ja kaveoliinista riippumattomat endosytoosireitit voidaan jakaa sekä dynamiinista riippuvaisiin (CLIC-D) että riippumattomiin reitteihin (CLIC-DI; Kuva 1). CLIC-D -reitillä kulkevista molekyyleistä tutkituimpia ovat interleukiini 2 -reseptori (IL2r) sekä γ -

sytokiinireseptori (γ cr; ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). CLIC-DI -reitillä kulkevia molekyyilejä ovat muun muassa CTB sekä GPI-AP:t (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). CLIC-reittien lisäksi on olemassa muitakin klatriinista ja kaveoliinista riippumattomia mikropinosytoosireittejä, vaikka tässä tutkielmassa keskitytään ainoastaan CLIC-reitteihin.

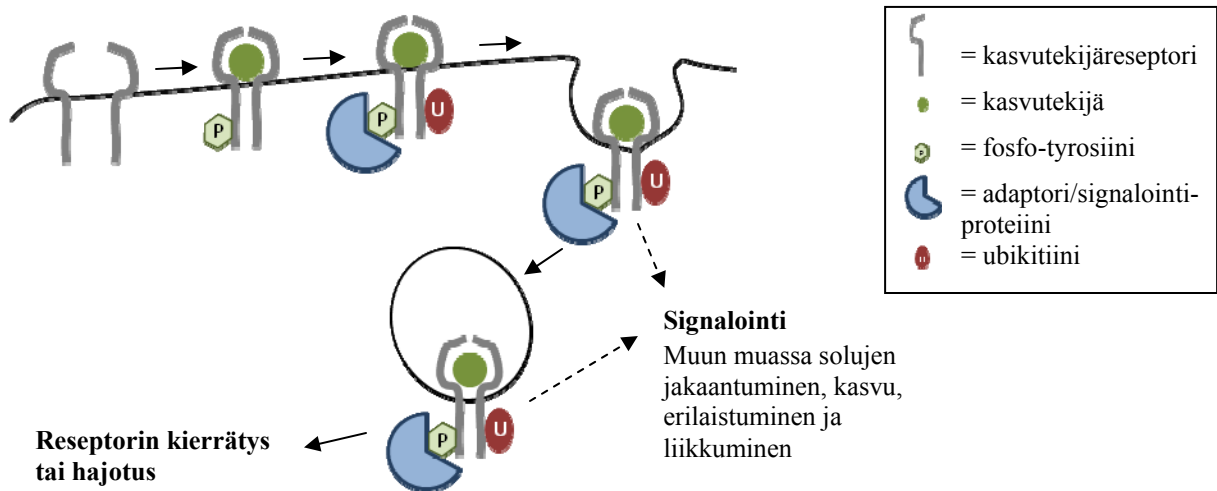
CLIC-D -reitillä kulkevat IL2r ja γ cr ovat kertyneet solukalvon DRM-alueille, ja ne endosytoidaan nopeasti lastien sitoutumisen jälkeen (Lamaze ym., 2001; Sauvonnnet ym., 2005). IL2r:t pääsevät soluihin DRM-alueisiin liittyneinä ja ovat liittyneinä näihin reitin varhaisissa vaiheissa (Lamaze ym., 2001). Lopulta sekä IL2r että γ cr kulkeutuvat varhaisten, monirakkula- ja myöhäisten endosomien kautta lysosomeihin hajotettavaksi (Kuva 1; Gesbert ym., 2004). Rho-GTPaaseista Rac1 ja RhoA toimivat CLIC-D -reitin säätelijöinä (Lamaze ym., 2001). Alavirtaan Rac1:stä toimivat kinaasit, Pak1 ja Pak2, jotka säätelävät aktiinitukirangan toimintaa ja fosforyloivat edelleen muita molekyyilejä (Vidal ym., 2002). Yksi fosforyloitavista proteiineista on kortaktiini, joka voi sitoutua sekä aktiiniin että dynamiiniin ja edistää aktiinin polymerisaatiota (Schafer ym., 2002; Sauvonnnet ym., 2005).

CTB:n ja GPI-AP:en endosytoosireitit voivat vaihdella solutyypistä ja ympäristökijöistä riippuen, mutta suurin osa niiden endosytoosista ohjautuu CLIC-DI -reitille (Sabharanjak ym., 2002; Kirkham ym., 2005). Kuten aiemmin mainitut CLIC-D -reitillä kulkevat IL2r ja γ cr, myös CTB ja GPI-AP:t rikastuvat solukalvon DRM-alueilla (Sabharanjak ym., 2002). Solukalvolta irrottuaan CLIC-DI -rakkulat yhtyvät toisiinsa ja muodostavat pitkänomaisia tai rengasmaisia rakenteita. Rakenteiden on todettu olevan riippuvaisia kolesterolista, mutta niistä ei ole löydetty klatriinia tai kaveoliinia (Sabharanjak ym., 2002; Kirkham ym., 2005). Rho-GTPaaseista säätelijänä tällä reitillä toimii Cdc42, joka liittää reitin aktiinin polymerisaatiokoneistoon (Sabharanjak ym., 2002). Arf1:llä on myös tärkeä rooli CLIC-DI -reitillä, eikä muiden Arf-perheenjäsenten mukana oloa voida sulkea pois varsinkaan reitin myöhäisemmissä vaiheissa (Kumari ja Mayor, 2008). Esimerkiksi Arf6:n tiedetään olevan mukana joissain muissa klatriinista ja kaveoliinista riippumattomissa reiteissä (Naslavsky ym., 2004), vaikka CLIC-DI -reitillä sillä ei näyttäisi olevan vaikutusta (Kirkham ym., 2005).

Klatriinista ja kaveoliinista riippumattomilla endosytoosireiteillä kulkee useita viruksia. Esimerkiksi hiiren norovirus-1:n ja coxsackievirus A9:n on ehdotettu tunkeutuvan soluihin klatriinista ja kaveoliinista riippumattomalla, mutta dynamiinista riippuvalla tavalla (Gerondopoulos ym., 2010; Heikkilä ym., 2010). Ihmisen papillomavirus 16 pääsee soluihin riippumatta klatriinista, kaveoliinista ja dynamiinista (Spoden ym., 2008). Osa viruksista osaa valjastaa käyttöönsä useita solun endosytoosireittejä. Esimerkiksi SV40:n on todettu pääsevän soluihin sekä kaveoliinivälitteisellä että klatriinista ja kaveoliinista riippumattomalla endosytoosilla (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009).

1.2. Kasvutekijäreseptorit

Kasvutekijäreseptorit ovat solukalvon läpäiseviä reseptorityrosiinikinaaseja (RTK). Solukalvolla kasvutekijän tai muun lastimolekyylin sitoutuminen kasauttaa kasvutekijäreseptorit yhteen (Kuva 2). Kasautumisen seurauksena reseptorin konformaatio muuttuu ja sen kinaasientsyymi aktivoituu. Kinaasientsyymi fosforyloi kasvutekijäreseptoreiden tyrosiinitähteitä, mikä luo reseptorin solun sisäisiin osiin kiinnittymispaikkoja muun muassa adaptor- ja signaalintiproteiineille (Kuva 2; ks. yleiskatsaus Abella ja Park, 2009). Kinaasientsyymien toiminnan lisäksi ubikitinaatio on tärkeä lisä kasvutekijäreseptoreiden signaloinnissa. Ubikitinaatiossa kasvutekijäreseptoreiden solunsisäisiin osiin kiinnitetään entsyymaattisesti ubikitinimolekyylejä (Kuva 2). Kovalenttisen sidoksen muodostuttua kohdeproteiinin stabiilius, entsyymaattiset ominaisuudet ja/tai lokalisaatio solun sisällä muuttuvat, mikä mahdollistaa proteiinin uudenlaisen signaloinnin. Joissain tapauksissa myös ubikitinaation purkaminen on tärkeä vaihe reseptorin signaloinnissa (ks. yleiskatsaus Acconcia ym., 2009). Fosforylaation ja ubikitinaation seurauksena muodostuneet suuret signaalintikompleksit aloittavat soluissa viestiketjuja, jotka lopulta johtavat muutoksiin geenien transkriptiossa sekä muihin ei-transkriptionaalisiin tapahtumiin (Kuva 2). Kasvutekijäreseptorien signaali liittyy usein solujen jakaantumiseen, kasvuun, erilaistumiseen sekä liikkumiseen (ks. yleiskatsaus Abella ja Park, 2009).



Kuva 2. Yleiskuva kasvutekijäreseptoreiden aktivoitumisesta. Kasvutekijän tai muun signalointiproteiinin sitoutuminen pariuttaa kasvutekijäreseptorin solukalvolla. Reseptorin oma kinaasientsyymi fosforyloi tyrosiinitähteitä, mikä luo kiinnittymispaikkoja adaptor- ja signalointiproteiineille. Osa kompleksiin kiinnittyneistä proteiineista voi ubikitinoida reseptorin, mikä mahdollistaa reseptorin uudenlaisen signaloinnin. Aktivoituneet kasvutekijäreseptorit endosytoidaan nopeasti soluihin, jossa ne ohjautuvat kierrätys- tai hajotusreitille. Aktiivisten kasvutekijäreseptoreiden on raportoitu signaloivan myös endosomeista.

1.2.1. EGF-, PDGF- ja VEGF -reseptorit

EGF vaikuttaa muun muassa solujen kasvuun, jakaantumiseen sekä erilaistumiseen (Orth ja McNiven, 2006). EGF:n lisäksi samaan proteiiniperheeseen kuuluu muitakin proteiineja, joilla on samankaltaisia rakenteellisia ja toiminnallisia ominaisuuksia (ks. yleiskatsaus Dreux ym., 2006). Solukalvolla EGF sitoutuu 170 kDa:n suuruiseen EGFr:iin. ErbB-perheeseen kuuluva EGFr sitoo EGF:n lisäksi muitakin EGF-proteiiniperheen jäseniä, kuten transformoivaa kasvutekijä α :aa. EGFr:n yliekspressiota on havaittu useissa syöpäsolutyypeissä (ks. yleiskatsaus Herbst, 2003).

PDGF-molekyyli koostuu kahdesta proteiiniketjusta, jotka voivat pariutua kolmeksi erilaiseksi yhdistelmäksi (AA, BB, AB). Soluissa on kahdenlaisia PDGFr:ja, ja niiden ilmentyminen eri solutyypeissä vaihtelee huomattavasti (ks. yleiskatsaus Heldin ja Westermark, 1999). PDGFr α (170 kDa) sitoutuu kaikkiin PDGF-tyyppeihin, kun taas PDGFr β (180 kDa) sitoutuu tehokkaasti vain PDGF:n BB- ja AB -muotoihin. Sitoutuessaan PDGF pariuttaa reseptorinsa. Erilaiset PDGFr-parit saavat aikaan soluissa yhdenmukaisia, mutteivät identtisiä signalointireittejä. Reseptoriparien aktivoituminen muun muassa poimuttaa

solukalvoja ja hajottaa aktiinisäikeitä, nostaa solun sisäistä kalsiumkonsentraatiota sekä estää solujen apoptoitumista (ks. yleiskatsaus Heldin ja Westermark, 1999).

Kehomme tuottaa viittä erilaista VEGF-tyyppiä (VEGF-A, -B, -C, -D sekä PlGF), jotka sitoutuvat kolmeen rakenteellisesti samankaltaiseen VEGFr:iin (VEGFr-1, -2 ja -3). VEGFr:t ovat mukana muun muassa hematopoeettisten solujen (VEGFr-1) sekä verisuonten (VEGFr-2) että imusuonten endoteelien (VEGFr-3) kehityksessä (ks. yleiskatsaus Holmes ym., 2007). VEGFr-2 (230 kDa) on tutkituin ja se sitoo kaikkia VEGF-muotoja. VEGFr-2:n aktivoituminen verisuonten endoteelissä tehostaa solujen jakaantumista, liikkumista sekä läpäisevyyttä, mikä lopulta johtaa uusien verisuonien muodostumiseen (ks. yleiskatsaus Holmes ym., 2007).

1.2.2. Kasvutekijäreseptoreiden endosytoosi

RTK-perheeseen kuuluvat kasvutekijäreseptorit sijaitsevat solukalvon lipidilautoilla (ks. yleiskatsaus Mukherjee ym., 2006). Reseptorit aktivoituvat kasvutekijöiden tai muiden signaalointiproteiinien kiinnittyessä niihin (Kuva 2). Sitoutuminen pariuuttaa tai kasauttaa reseptorit, ja niiden tyrosiinitähteet fosforyloituvat. Aktivaation jälkeen reseptorit ja niihin kiinnittyneet molekyylit endosytoidaan nopeasti (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Stressitilanteessa EGFr:n on kuitenkin todettu pääsevän solun sisään riippumatta EGFr:n tyrosiiniaktiivisuudesta (ks. yleiskatsaus Madhus ja Stang, 2009).

Tutkituin aktivoitujen kasvutekijäreseptoreiden sisäänmenoreitti on klatriinivälitteinen endosytoosi. Sekä EGFr:n, PDGFr:n että VEGFr-2:n on raportoitu pääsevän soluihin tämän reitin avulla (Orth ja McNiven, 2006; yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Joissain solutyypeissä korkea EGF-stimulaatiopitoisuus saa aikaan solukalvon poimuttumista sekä makro- ja mikropinosyttisten rakkuloiden muodostumista. Tällöin EGFr voidaan ottaa soluihin klatriinista riippumattomia reittejä pitkin. Reitti on kuitenkin riippuvainen EGFr-kinaasin, PI3K:n ja dynamiinin toiminnasta (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). EGFr:n endosytoosin on raportoitu tapahtuvan myös kolesteroli- ja lipidilauttareittejä pitkin, mutta tulokset ovat osittain ristiriitaisia ja usein riippuvaisia solutyyppistä (Orth ja McNiven, 2006; yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Kaveoliinivälitteisellä reitillä kulkevien

kasvutekijäreseptoreiden on usein havaittu olevan inaktiivisessa muodossa (Orth ja Mc Niven, 2006).

Klatriinivälitteinen endosytoosireitti alkaa lipidilauttojen ulkopuolelta, joten kasvutekijäreseptoreiden on poistuttava lautoilta ennen klatriinireitille siirtymistä. Lipidilauttojen ja viereisten klatriinikuopakkeiden välillä onkin havaittu yhteistyötä (ks. yleiskatsaus Mukherjee ym., 2006). EGF:llä stimuloitaessa klatriini ja EGFr:n solulimassa oleva häntä liitetään toisiinsa, ja reseptori kerääntyy klatriinipeitteisiin kuopakkeisiin (Orth ja McNiven, 2006). EGF:n yhä ollessa kiinni reseptorissaan, klatriinipäällysteiset rakkulat purkavat kuorensa nopeasti ja yhtyvät Rab5-säädelyjen varhaisten endosomien kanssa (ks. yleiskatsaus Abella ja Park, 2009). Lysosomaalisen hajotuksen lisäksi osa EGFr:sta kierrätetään varhaisista endosomeista takaisin solukalvolle Rab11-säädelyssä rakkuloissa tai ne voivat jäädä aktiivisiksi endosytoosireitin endosomeihin. Myös reseptoreiden tumakuljetus on mahdollista (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Kasvutekijäreseptoreiden endosytoosireittiin ja hajotusnopeuteen vaikuttavat reseptoriin sitoutuva lasti, lastin konsentraatio sekä reseptorien mahdollinen heterodimerisoituminen (ks. yleiskatsaus Mukherjee ym., 2006). Aktivoitunut EGFr rekrytoi solukalvolla klatriinin lisäksi myös muita molekyyliä, joiden toiminnan ansiosta reseptori ubiquitinoidaan (ks. yleiskatsaus Abella ja Park, 2009). Reseptorin ubiquitinaatio voi vaikuttaa muun muassa siihen, ohjataanko se hajotukseen, kierrätykseen vai tumaan (ks. yleiskatsaus Mukherjee ym., 2006).

1.3. Integriinit

Integriinit ovat solukalvon tärkeimpiä adheesioreseptoreita, jotka sitoutuvat muun muassa soluväliaineen proteiineihin (Kuva 3). Solukalvon läpäisevät, heterodimeeriset integriinit muodostuvat α - ja β -ketjuista. Erilaisia integriiniheterodimeerejä tunnetaan ainakin 24 kappaletta, ja ne muodostuvat 18:sta α -ketjusta ja 8:sta β -ketjusta. Integriinit signaloivat solukalvolla molempiin suuntiin erilaisten adaptoriproteiinien välityksellä (Kuva 3; ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Integriinien kautta tapahtuva signaali vaikuttaa muun muassa solujen apoptoitumiseen ja jakaantumiseen sekä solujen muotoon, polaarisuuteen, kiinnittymiseen, liikkuvuuteen ja erilaistumiseen (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Solukalvolta

lähtevän signaloinnin lisäksi integriinit voivat signaloida myös endosytoosin jälkeen endosomeista käsin (ks. yleiskatsaus Sadowski ym., 2009).

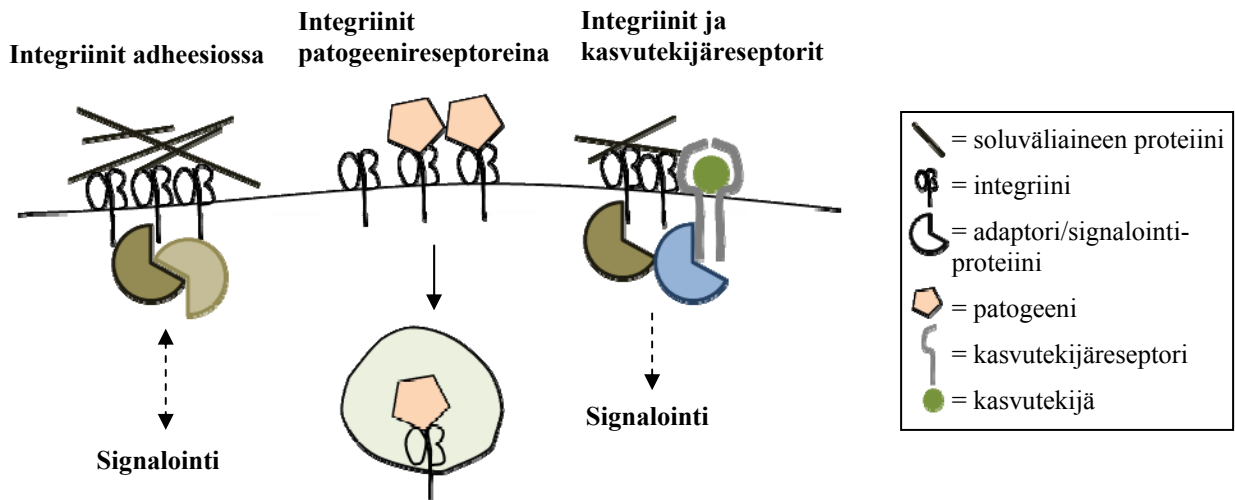
1.3.1. Integriinien endosytoosi

Integriinien endo- ja eksosytoosilla on tärkeät roolit solujen kiinnittymisessä ja liikkuvuudessa. Soluvaelluksessa solun etenevässä päässä integriinejä eksosytoidaan kalvolle, jotta solulla olisi tuoreita tarttumiskykyisiä reseptoreja pinnallaan. Solujen vetäytyvässä osassa integriinejä vastaavasti endosytoidaan. Sisäänoton tarkoituksena on enemmänkin kierrättää reseptoria kuin hajottaa sitä (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010). Myös soluväliainetta kierrätetään ja hajotetaan integriinien endosytoosin avulla (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2000). Integriinien on raportoitu pääsevän soluihin klatriini-, kaveoli- ja lipidilauttalähtöisiä reittejä pitkin (Rappoport ja Simon, 2003; Ning ym., 2007). Klatriinireitin avulla integriinejä endosytoidaan solujen etupuolelta kierrätysreitille (Rappoport ja Simon, 2003).

Integriiniketjujen soluliman puoleiset hännät ovat integriinien toiminnan kannalta tärkeitä. Muun muassa PKC α kiinnittyy β -ketjun soluliman puoleiseen osaan, josta se säätelee integriinin endosytoosia (Ng ym., 1999). Myös α -hännällä on oma roolinsa integriinien välittämässä signaloinnissa (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2000) ja endosytoosissa (Upla ym., 2004). Muita integriinien endo- ja eksosytoosin kannalta tärkeitä proteiineja ovat Rab- ja Arf-perheiden GTPaasit, jotka toimivat säätelijöinä endosomaalisten kalvojen rakenteissa ja dynamiikassa. Rab-GTPaasit toimivat solukalvolta irronneiden rakkuloiden ja niiden mukana kulkevien lastiproteiinien kuljetuksessa ja yhdistymisreaktioissa (ks. yleiskatsaus Zerial ja McBride, 2001). Useiden β 1-integriinien on havaittu kiertävän takaisin solukalvolle Rab11-positiivisissa rakenteissa. Muita integriinien endosytoosissa mukana olevia Rab-perheen jäseniä ovat Rab5 ja Rab21 (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010). Arf-GTPaasien avulla solukalvolle värvätään endosytoosireiteillä tarvittavia kuoriproteiineja, ja ne säätelevät myös päällystettyjen rakkuloiden muodostumista ja lastien valintaa (ks. yleiskatsaus D'Souza-Schorey ja Chavrier, 2006). Muun muassa Arf6:n on havaittu olevan mukana integriinien kierrätyksessä ja aktiinin uudelleen järjestäytymisessä (Powelka ym., 2004).

Integriinit voivat toimia patogeenien ensisijaisina tai avustavina reseptoreina (Kuva 3). Patogeenien sitoutuminen integriineihin aktivoi isäntäsolun signaalireitettä, jonka jälkeen

patogeenit usein endosytoidaan (ks. yleiskatsaus Marsh ja Helenius, 2006). Patogeenien sisäänotto voi muistuttaa integriinien normaalia endosytoosia, mutta mukana on usein integriinien sisäänmenolle vieraita molekyyliä, kuten erilaisia entsyymejä ja patogeenin itsensä erittämiä molekyyliä (ks. yleiskatsaus Marsh ja Helenius, 2006).



Kuva 3. Integriinien tehtävät soluissa. Integriinit ovat solun tärkeimpiä adheesioreseptoreita, ja ne välittävät signaaleja solukalvon läpi molempiin suuntiin. Lisäksi integriinit voivat toimia primäärisinä tai avustavina reseptoreina erilaisille patogeeneille. Myös integriinien ja kasvutekijäreseptoreiden välillä on havaittu yhteistyötä.

1.3.2. Integriinit ja kasvutekijäreseptorit

Integriinien, kasvutekijöiden ja kasvutekijäreseptoreiden välillä on havaittu yhteistyötä (Kuva 3). Osa integriineistä voi sitoutua kasvutekijäreseptoreihin ja aktivoida niitä. Lisäksi joidenkin kasvutekijäreseptoreiden on havaittu tarvitsevan integriinien kasautumista aktivoituaakseen tehokkaammin (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010). Tutkituin kasvutekijäreseptori-integriini -vuorovaikutus on EGFr:n ja integriinien välinen yhteys. EGFr:n määrä solussa voi vaikuttaa integriinien kautta tapahtuvaan solujen kiinnittymiseen ja toisaalta EGF-stimulaatio voi vaikuttaa solujen $\alpha 2$ -integriinin määrään (Krensel ja Lichtner, 1999; Ning ym., 2006). EGFr:n on todettu aktivoituvan myös ilman EGF:n läsnä oloa, ja reaktion on raportoitu olevan riippuvaista $\alpha 2$ -integriinistä (Ning ym., 2006).

1.4. Echovirus 1 (EV1)

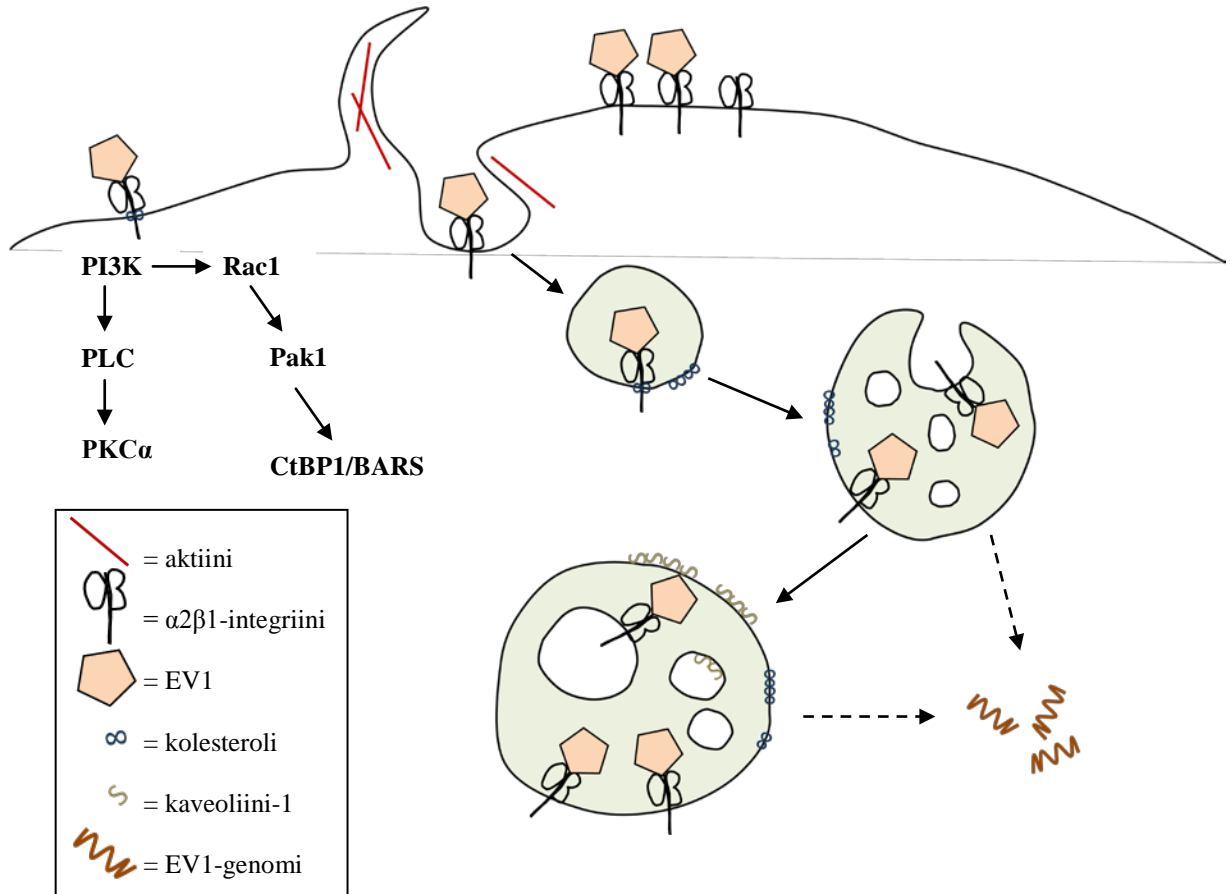
EV1 on Pikornaviridae-perheeseen kuuluva ihmisen patogeeni, joka voi aiheuttaa aivokalvon- ja sydäntulehduksia, ihottumaa sekä mietoja hengitystie- ja suolistotauteja (Grist ym., 1978). Vaipaton, halkaisijaltaan noin 30 nm:n mittainen ikosahedraalin muotoinen viruskapsidi pitää sisällään yksijuosteista +RNA -genomia (Filman ym., 1998).

1.4.1. EV1:n endosytoosi

Solun pinnalla EV1 sitoutuu $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin (Bergelson ym., 1992), joka normaalisti toimii kollageenireseptorina. Integriinin funktionaalisen I-domeenin on havaittu sitoutuvan EV1-kapsidiin (King ym., 1997; Xing ym., 2004). Sama domeeni on vastuussa myös kollageeniin sitoutumisesta, vaikka sitoutumisalueet eroavatkin kahden ligandin välillä (Bergelson ym., 1993). Viruksen sitoutuminen saa aikaan integriinien kasautumisen (Xing ym., 2004), mikä on tärkeää solunsisäisten signaalintireittien muodostumiselle (Miyamoto ym., 1996) sekä viruksen ja reseptorin sisäänmenolle (Kuva 4).

Havaintojen mukaan EV1:n endosytoosi on riippuvaista kolesterolista, mutta riippumatonta klatriinista ja kaveoliinista, vaikka virusendosomit voivatkin jossain määrin yhtyä näiden reittien kanssa solulimassa (Kuva 4; Pietiäinen ym., 2004; Karjalainen ym., 2008). EV1:n aiheuttamaa integriinien kasautumista ja sisäänmenoa voidaan matkia sitomalla spesifinen vasta-aine $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin (Upla ym., 2004). Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmeno on dynamiinista riippumatonta (Karjalainen ym., 2008), vaikka solutyypin välillä onkin havaittu eroavaisuuksia (Pietiäinen ym., 2004). Kasautunut $\alpha 2\beta 1$ -integriini ei myöskään näyttäisi käyttävän CLIC-DI -reittiä (Karjalainen ym., 2008). Dynamiinista riippumattomilla endosytoosireiteillä mukana oleva CtBP1/BARS on tärkeässä roolissa myös EV1:n ja sen reseptorin endosytoosissa (Liberali ym., 2008). Solukalvolta irronneet, kasautuneita $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä sisältävät rakkulat kypsyvät solulimassa monirakkulaendosomeiksi. Nämä endosomit eivät sisällä varhaisten endosomien, myöhäisen endosomien tai lysosomien markkeriproteiineja, mikä vahvistaa käsitystä klatriinista riippumattomasta endosytoosireitistä (Karjalainen ym., 2008). CtBP1/BARS -proteiinin lisäksi muita kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EV1:n endosytoosissa mukana olevia molekyylejä ovat muun muassa PKC α , Rac1, Pak1, PLC sekä PI3K (Kuva 4; Upla ym., 2004; Karjalainen ym.,

2008). Havaintojen mukaan EV1:n endosytoosi muistuttaa läheisesti makropinosytoosia (Karjalainen ym., 2008). Se, mistä rakenteesta ja miten EV1:n genomi vapautuu solulimaan, on vielä epäselvää.



Kuva 4. EV1:n endosytoosi. Solukalvolla EV1:n reseptorina toimii $\alpha 2\beta 1$ -integroini. Viruksen sitoutuminen kasauttaa integriinit, jonka jälkeen EV1 ja reseptori otetaan solujen sisään klatriinista, kaveoliinista ja dynamiinista riippumattomalla tavalla. Endosytoosissa mukana olevia avustavia ja/tai signaloivia proteiineja ovat muun muassa kolesteroli, PI3K, PLC, PKC α , Rac1, Pak1 ja CtBP1/BARS. Solulimassa virusendosomit kypsyvät monirakkulaendosomeiksi. EV1:n genomien solulimaan vapautumiseen liittyviä tapahtumia ei vielä tunneta kunnolla. Mukailtu artikkelista Karjalainen ym., 2008.

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen perustana olivat FT V. Marjomäen ryhmän aiemmat havainnot kasvatusliuoksen seerumipitoisuuden vaikutuksista kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoositehokkuuteen. Tässä pro gradu -työssä haluttiin tutkia tarkemmin, mitkä yksittäiset seerumiproteiinit vaikuttavat kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosissa. Tutkimuskohteeksi rajattiin kasvutekijät ja niiden reseptorit, koska näiden molekyylien ja integriinien välillä on havaittu yhteistyötä (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010). Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenon lisäksi pyrittiin selvittämään, vaikuttavatko kasvutekijät EV1:n infektioitehokkuuteen. Kokeet suoritettiin kahdella solulinjalla: $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ilmentävillä ihmisen osteosarkoomasoluilla (SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut) sekä ihmisen aortan sileillä lihassoluilla (HASMC-solut).

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. Työssä käytetyt solulinjat, virukset ja reagenssit

Kokeissa käytettiin ihmisen luusyöpäsolulinjaa (SAOS; American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA), joka ilmentää $\alpha 2$ -integriiniä (SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut; Ivaska ym., 1999) sekä ihmisen aortan sileä lihassolulinjaa (HASMC; Kari Airene, A.I.Virtanen - Instituutti, Kuopion yliopisto).

SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluja ylläpidettiin DMEM-kasvatusliuoksessa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), jossa oli 10 % (v/v) FBS-liuosta (Invitrogen), 2 mM L-glutamiinia (Invitrogen), 100 IU/ml penisilliiniä (Invitrogen), 100 mg/ml streptomysiiniä (Invitrogen) sekä 0,5 % genetisiiniä (G-418; Invitrogen). SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -kokeet suoritettiin DMEM-kasvatusliuoksissa, joissa oli 2 mM L-glutamiinia sekä 0, 1 tai 10 % FBS-liuosta. HASMC-soluja ylläpidettiin Medium 231 -kasvatusliuoksessa (Cascade Biologics Inc., Portland, OR, USA), johon lisättiin tarvittava lisäliuos (SMGS; Cascade Biologics Inc.) ohjeiden mukaisesti sekä 100 IU/ml penisilliiniä ja 100 mg/ml streptomysiiniä. HASMC-kokeet suoritettiin MEM-kasvatusliuoksessa (Invitrogen), johon lisättiin 2 mM L-glutamiinia sekä 0, 1 tai 10 % (v/v) FBS-liuosta. Sekä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ - että HASMC -soluja nälkiinnytettiin 16-18 tuntia.

Töissä käytettiin viherapinan munuaissoluissa (saatu Timo Hyypiältä, Virologian osasto, Turun yliopisto) tuotettua, sakkaroosigradientilla puhdistettua (Marjomäki ym., 2002) EV1:tä (Farouk-kanta; ATCC). Työssä käytetyt reagenssit ja vasta-aineet näkyvät taulukosta 1.

Taulukko 1. Taulukossa esitetty tässä pro gradu -työssä käytetyt vasta-aineet ja reagenssit.

Vasta-aine/Reagenssi	Kohdemolekyyli	Tuottoeläin	Kohde-eläin	Muuta
A211E10	α 2-integriini	Hiiri	Ihminen	Fedor Berditchevski, Institute of Cancer studies, Birmingham, UK
Biotinyloitu-A211E10	α 2-integriini	Hiiri	Ihminen	Biotinylointi suoritettu omassa laboratoriossa
α -EV1	EV1 -kapsidiproteiini	Kani	Ihminen	ks. Marjomäki ym., 2002
α -PDFGr β	PDFGr β	Kani	Ihminen	Cell Signaling
α -phoPDFGr β	Fosforyloitu PDFGr β	Kani	Ihminen	Cell Signaling
α -EFGr	EGFr	Kani	Ihminen	Santa Cruz
Streptavidin-488	Biotiini	-	-	Invitrogen
G α M-555	Hiiren vasta-aineet	Vuohi	Hiiri	Invitrogen
G α M-HRP	Hiiren vasta-aineet	Vuohi	Hiiri	BioRad
G α R-HRP	Kanin vasta-aineet	Vuohi	Kani	BioRad
DAPI-petausaine	DNA	-	-	Invitrogen
PDGF	-	-	-	Sigma-Aldrich
EGF	-	-	-	Invitrogen
VEGF	-	-	-	Seppo Ylä-Herttua, A.I.Virtanen -Instituutti, Kuopion yliopisto

3.2. Kasautuneen α 2 β 1-integriinin sisäänmeno- sekä virusinfektiokokeet

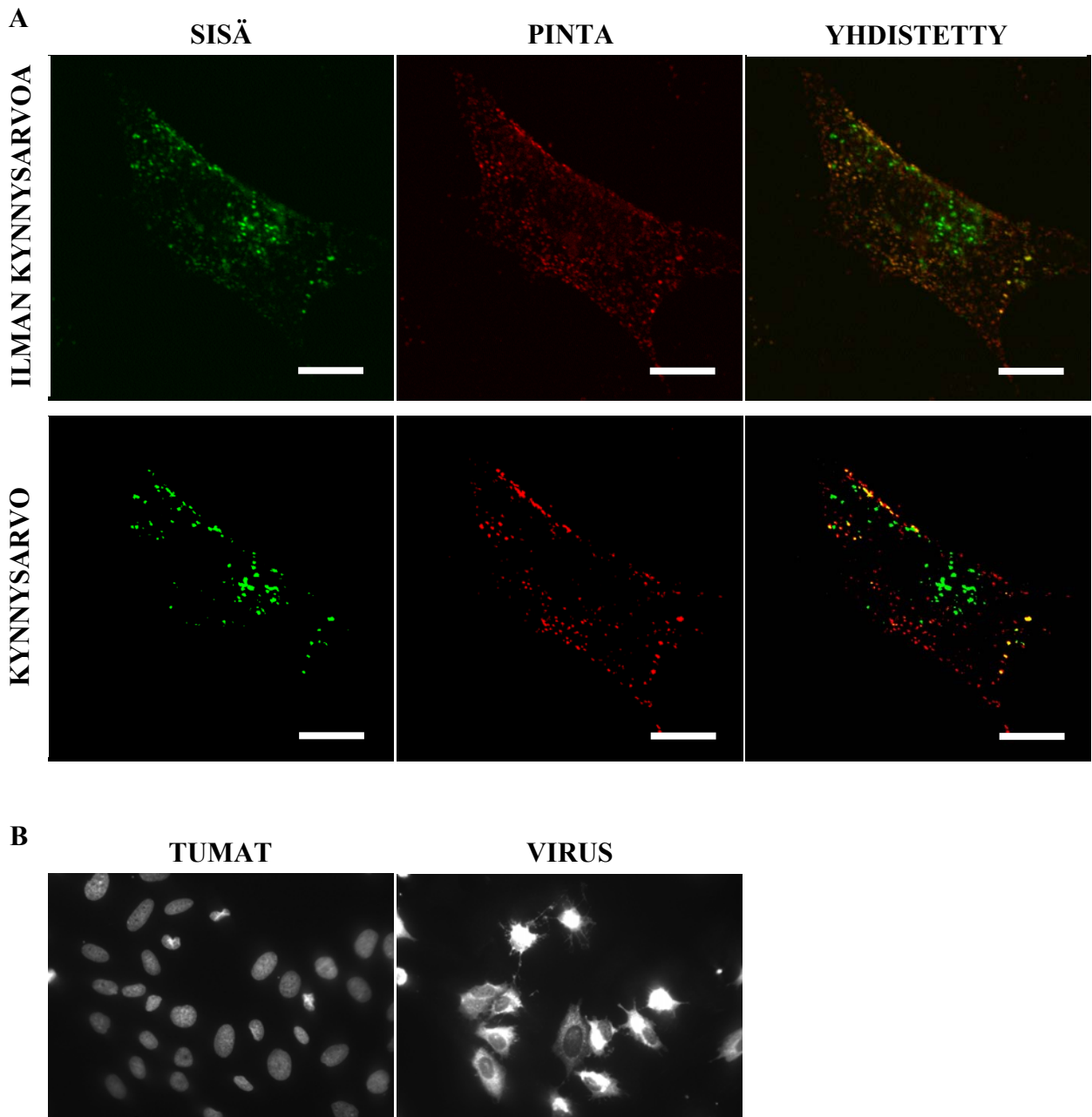
SAOS- α 2 β 1 -solujen α 2 β 1-integriinien kasuttaminen suoritettiin vasta-aineiden avulla. Spesifinen vasta-aine (biotinyloitu-A211E10) sidottiin soluihin (30 min, RT) DMEM-kasvatusliuoksessa, jossa 0 tai 1 % FBS-liuosta. Pesujen jälkeen primääriseen vasta-aineeseen sidottiin ensimmäinen sekundäärinen vasta-aine (streptavidin-488) lämpökaapissa (+ 37 °C, CO₂-pitoisuus 5 %, 2 h). Tarvittaessa lisättiin kasvutekijä (PDGF 5 tai 50 ng/ml). Pesujen jälkeen SAOS- α 2 β 1 -soluja pidettiin lämpökaapissa kahden tunnin ajan kasvatusliuoksessa, jossa oli joko 0 tai 10 % FBS-liuosta sekä tarvittaessa kasvutekijä. Kahden tunnin aikana solukalvolla kasautunut α 2 β 1-integriini otettiin solujen sisään. Käsittelyn jälkeen pinnalle jääneet α 2 β 1-integriinit leimattiin jäällä toisella sekundäärisellä vasta-aineella (G α M-555).

Kaikissa EV1-infektioissa M.O.I.-luku oli 100. EV1 sidottiin SAOS- α 2 β 1- ja HASMC -solujen pintaan jäällä 45 minuutin ajan DMEM- tai MEM -kasvatusliuoksissa, joissa oli 0 tai 1 % FBS-liuosta. Pesujen jälkeen solut laitettiin lämpökaappiin infektoitumaan kuudeksi tunniksi. Kasvutekijöiden (PDGF 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml ja EGF 0,6 tai 600 ng/ml) lisääminen tapahtui kokeesta riippuen joko ennen viruksen solujen pintaan sitomista (15 minuutin mittainen esiaktivointi lämpökaapissa) tai lämpökaappikäsittelyvaiheessa.

3.3. Immunofluoresenssi ja mikroskopointi

Solut fiksattiin (4 % PFA, 20 min RT) ja solukalvot läpäistiin tarvittaessa (0,2 % Triton X-100/PBS, 5 min RT). Leimauksessa käytettävät vasta-aineet laimennettiin PBS-liuokseen, jossa oli 3 % BSA:ta. Solut pedattiin DAPI-petausaineeseen ja kuvattiin kokeesta riippuen joko fluoresenssimikroskopilla (Leica DMR/BE, jossa Spot RT -kamera) tai Olympus-mikroskopilla (IX81), jossa Fluoview-1000 -konfokaalijärjestelmä.

Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenokokeessa vihreä signaali kertoi sisäänmenneen kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin määrän ja paikan solun sisällä. Punainen signaali kuvasti SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen pinnalle jäänyttä $\alpha 2\beta 1$ -populaatiota. Keltainen signaali kuvasti solujen pinnalle jääneitä kasautuneita $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä. Tuplaleimatut SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut kuvattiin z-leikesarjoina konfokaalimikroskopilla (Kuva 5A). EV1-infektiokeksessä fluoresoivilla väreillä leimattiin sekä soluja infektioitunut EV1 että tumat. Infektiokeksien solut kuvattiin fluoresenssimikroskopilla (Kuva 5B).



Kuva 5. Immunofluoresenssinäytteiden mikroskopointi ja datan käsittely. (A) Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenekoe. Konfokaalimikroskoopilla kuvatussa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solussa vihreä signaali kuvastaa solun sisäänmenneitä, kasautuneita $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä. Punainen signaali kuvastaa solun pinnalle jääneitä $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä ja keltainen solujen pinnalla olevia kasautuneita $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä. Ylärivin kuvasarjassa solu on esitetty ilman kynnsarvojen säätöä, alarivissä kynnsarvo säädetty BioImageXD-ohjelmalla. Sisäänmenneen leiman suhde pinnalle jääneeseen laskettiin BioImageXD-ohjelmalla. Kuvissa on esimerkkinä yksi kuvatuista z-leikkeistä, mittajana 10 μm . (B) EV1-infektio. Fluoresenssimikroskooppikuvista lasketaan sekä leimatut tumat että EV1:n täyttämät solut. Lukumäärien suhteiden avulla saadaan selville solujen infektoitumisprosentti.

3.4. Mikroskooppiaineiston analysointi

Kasautuneen ja sisäänmenneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin suhde solukalvolle jääneeseen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin määritettiin ilmaisen ja avoimen ohjelmiston, BioImageXD:n, avulla (<http://www.bioimagexd.net>). Analysointiin käytettiin kolokalisaatiotyökalua ja seuraavanlaista algoritmia: $([\text{kanava } 2]-[\text{kolokalisaatio}])/[\text{kanava } 1]$. Kanava 1 kuvastaa solun pinnalla leimautuneiden vokseleiden lukumäärää (Kuva 5A, punainen). Kanava 2 kuvaa leimautuneiden ja sisäänmenneiden $\alpha 2\beta 1$ -integriinien lukumäärää (Kuva 5A, vihreä). Kolokalisaatio tarkoittaa vokseleita, jotka ovat leimautuneet molemmilla sekundäärisillä vasta-aineilla (Kuva 5A, keltainen). Epäspesifisen taustan poistamiseksi algoritmiin hyväksyttiin vain vokselit, jotka jäivät asetetun kynnyksarvon yläpuolelle (Kuva 5A, alarivi).

EV1-infektiokokeessa fluoresenssimikroskoopilla kuvattiin useita soluja sisältäviä kenttäkuvia, joista laskettiin fluoresoivalla vasta-aineella leimattujen, infektoituneiden solujen sekä tumien lukumäärän suhde: $[\text{EV1-vasta-aineella leimattujen solujen lukumäärä}]/[\text{tumien lukumäärä}]$ (Kuva 5B). Tulokseksi saatiin solujen infektoitumisprosentti.

3.5. SDS-PAGE ja immunoblottaus

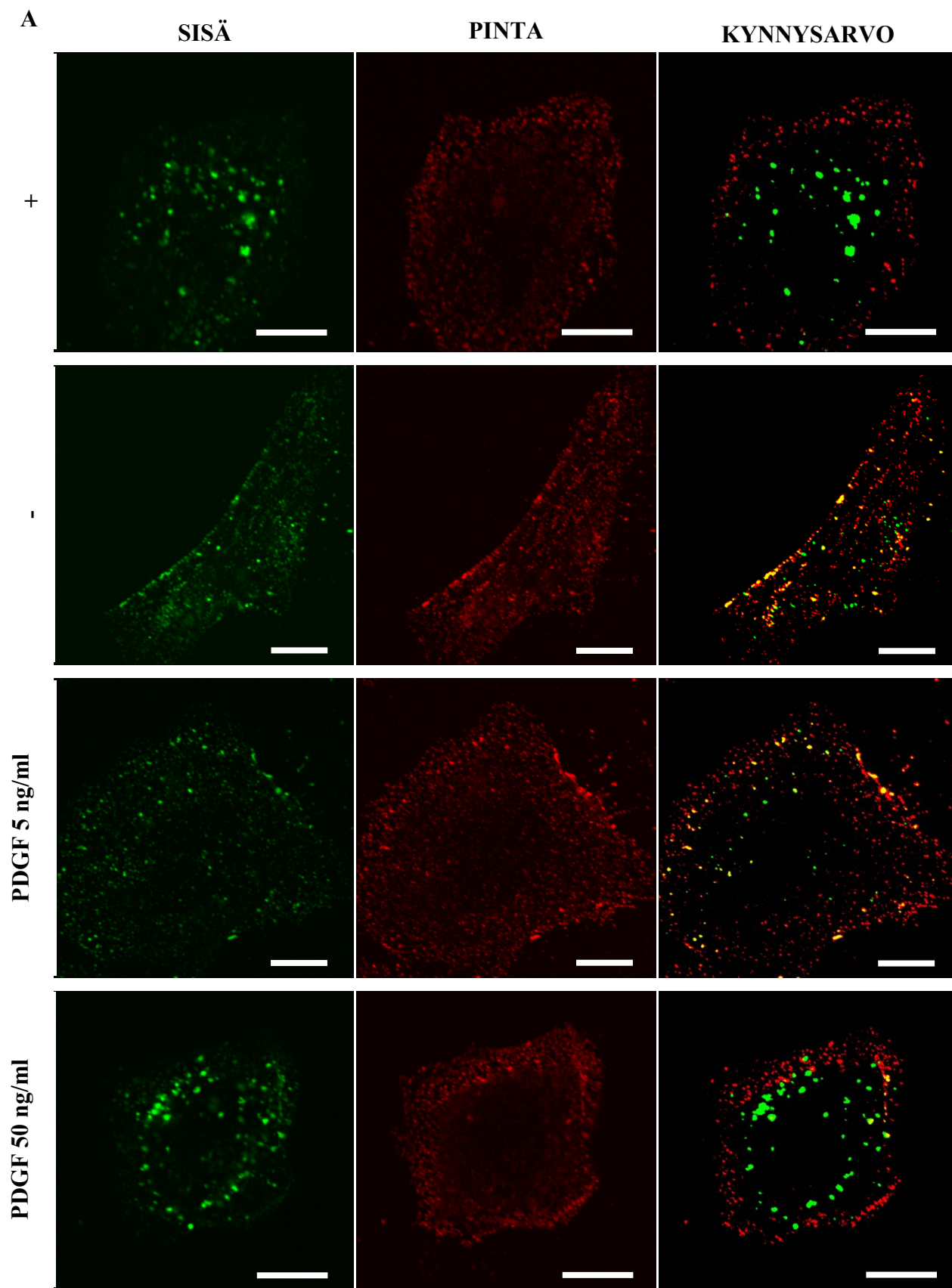
Integriinien kasauttaminen, kasvutekijästimulaatiot ja EV1-infektiot suoritettiin kuten yllä, mutta vain 15 minuutin mittaisilla lämpökaappikäsittelyillä. Kasvutekijästimulaatiot (PDGF 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml ja EGF 600 ng/ml) annettiin soluille integriinien kasauttamisen jälkeen. Näytteiden valmistuksen jälkeen solut hajotettiin keittämällä niitä 5 minuutin ajan 2 x Laemmli-puskurissa. Proteiinit eroteltiin toisistaan elektroforeesin avulla 7,5 % SDS-geelissä, ja siirrettiin polyvinyylideenifluoridikalvolle (PVDF-kalvo; Millipore). Proteiinien leimaamiseen käytettiin primäärisiä vasta-aineita sekä sekundäärisiä vasta-aineita, joihin oli liitetty HRP. HRP-signaali havaittiin SuperSignal-käsittelyn (BioRad Laboratories) jälkeen kemiallista luminesenssia mittaavalla laitteella (BioRad Laboratories).

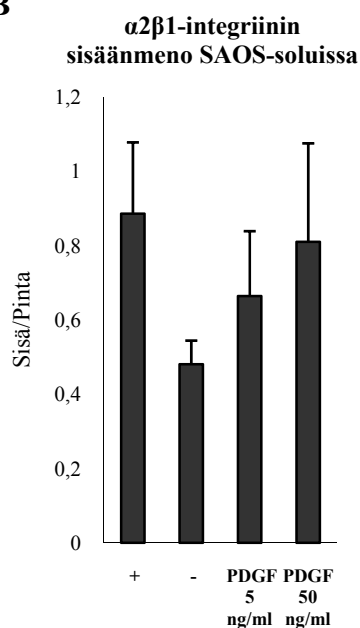
4. Tulokset

4.1. Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosi PDGF-stimuloituissa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa

Aiemmat tutkimukset FT V. Marjomäen ryhmässä olivat osoittaneet, että kasvatusliuoksen seerumipitoisuus vaikuttaa kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosihokkuuteen. Tässä pro gradu -työssä keskityttiin seerumista löytyviin kasvutekijöihin ja niiden solukalvolla sijaitseviin reseptoreihin, koska näiden molekyylien ja integriinien välillä on havaittu yhteistyötä (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010).

Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosihokkuus määritettiin SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluista sisään otettujen ja pinnalle jääneiden $\alpha 2\beta 1$ -integriinien suhteiden avulla. Kokeissa oli mukana seerumin kanssa kasvatettuja ja käsiteltyjä, nälkiintyneitä, sekä PDGF-stimuloituja (5 tai 50 ng/ml) SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluja. Ensimmäisten vasta-ainesidontojen aikana SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen pinnalla olleet $\alpha 2\beta 1$ -integriinit kasautuivat ja leimautuivat. Integriinien annettiin kulkeutua solujen sisään kahden tunnin ajan, minkä jälkeen solukalvolle jääneet $\alpha 2\beta 1$ -integriinit leimattiin. Konfokaalimikroskoopilla kuvatuista soluista (Kuva 6A) laskettiin BioImageXD-ohjelman avulla endosytoitujen $\alpha 2\beta 1$ -integriinien vokseleiden suhde verrattuna pinnalle jääneisiin integriineihin. Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmeno oli nälkiintyneissä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa noin puolta heikompaa kuin seerumissa kasvaneissa soluissa (Kuva 6B). PDGF-stimulaatiot näyttivät lisäävän $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenoa nälkiintyneissä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa (Kuva 6B).



B

Kuva 6. Kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integroinin sisäänmenotehokkuus SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa.

(A ja B) Kokeissa kontrollina toimivat SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut, jotka käsiteltiin seerumin läsnä ollessa (+). Lisäksi mukana olivat nälkiintyneet (-) sekä PDGF:llä nälkiintymisen jälkeen käsitellyt (PDGF 5 tai 50 ng/ml) SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut. SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen pinnalla olleet $\alpha 2\beta 1$ -integroinit kasautettiin ja leimattiin spesifisten vasta-aineiden avulla. Leimattujen integriinien annettiin mennä solujen sisään kahden tunnin ajan, jonka jälkeen pinnalle jääneet $\alpha 2\beta 1$ -integroinit leimattiin.

(A) Esimerkkikuvat kustakin näytteestä. Sisäänmennyt $\alpha 2\beta 1$ -integroini näkyy kuvissa vihreällä (sisä) ja pinnalle jäänyt punaisella (pinta). Kynnysarvosarakkeessa näkyvillä molemmat kanavat (molemmilla sekundääreillä leimautuneet integriinit keltaisella). Kynnysarvo on asetettu epäspesifisen leiman poistamiseksi. Konfokaalimikroskooppikuvien avulla soluista laskettiin sisäänmenneen $\alpha 2\beta 1$ -integroinin suhde verrattuna solujen pinnalle jääneeseen. Mittajanat ovat 10 μm .

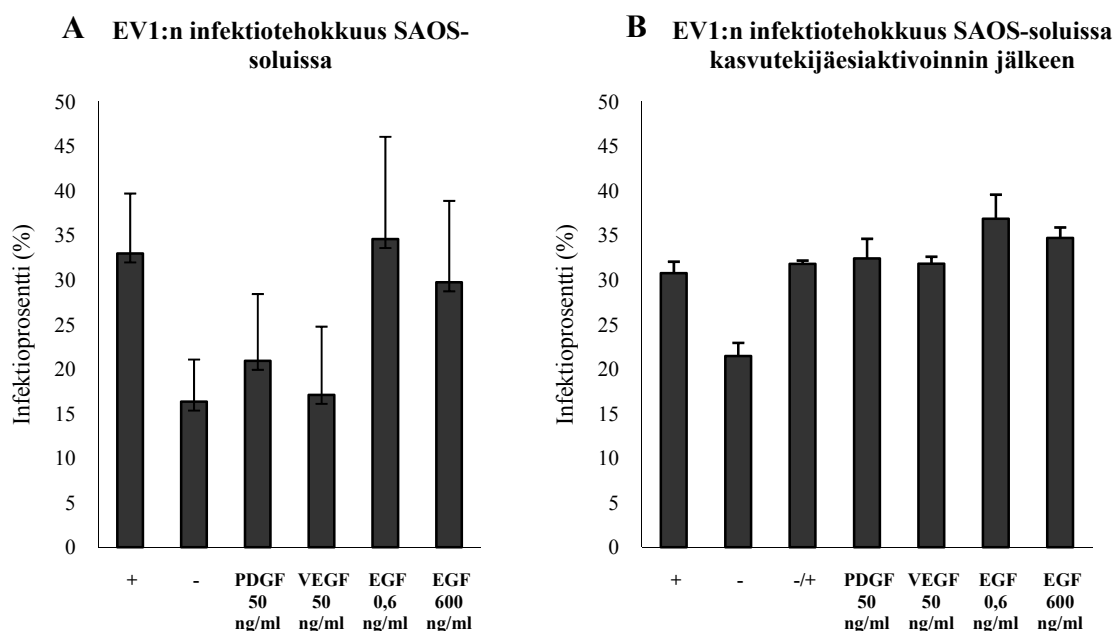
(B) Jokaisesta näytteestä analysoitiin BioImageXD-ohjelmalla kymmenen SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solua. Pylväät ovat kolmen toistokerran keskiarvoja ja hajonnat on määritetty tulosten keskivirheiden perusteella.

4.2. EV1-infektio kasvutekijästimuloituissa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa

Seuraavaksi haluttiin tutkia, vaikuttaako SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen nälkiinnyttäminen tai nälkiintyneiden solujen kasvutekijäaktivoinnit EV1-infektioitehokkuuteen. EV1 sidottiin SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen pintaan ja annettiin kulkeutua soluihin ja infektoida niitä kuuden tunnin ajan. Kuuden tunnin aikana infektoituneen solun solulima täyttyy EV1-kapsidiproteiinista. Fiksatuista soluista leimattiin sekä EV1-kapsidiproteiini että tumat, ja näytteet kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla (Kuva 5B). Eri tapausten infektioprosentit saatiin jakamalla infektoituneiden solujen lukumäärä tumien lukumäärällä. Nälkiintyneet SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut infektoituivat noin puolta heikommin kuin seerumin läsnä ollessa kasvaneet SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut (Kuva 7A). Kun nälkiintyneitä soluja aktivoitiin kasvutekijöillä (PDGF 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml ja EGF 0,6 sekä 600 ng/ml) viruksen sitomisen jälkeen, infektioprosentit nousivat ei-nälkiintyneiden solujen tasolle EGF-aktivaatiossa (Kuva 7A). Myös PDGF- ja VEGF -stimulaatiot paransivat EV1-infektioitehokkuutta joillain toistokerroilla (Kuva 7A).

Kasvutekijöiden sitoutuminen saa yleensä aikaan kasvutekijäreseptoreiden nopean sisäänoton soluihin (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Seuraavaksi tutkittiin, mitä EV1-

infektiotehokkuudelle tapahtuu, jos kasvutekijäreseptorit aktivoidaan ennen viruksen sitoutumista. Näлкиintyneitä SAOS- α 2 β 1 -soluja stimuloitiin ennen EV1:n pintaan sitomista 15 minuutin ajan seerumilla (10 % FBS), PDGF:llä (50 ng/ml), VEGF:llä (50 ng/ml) tai EGF:llä (0,6 ja 600 ng/ml; Kuva 7B). Seerumi tai kasvutekijät olivat mukana myös kuuden tunnin lämpökaappikäsittelyissä. Myös tässä koeasetelmassa seeruminäлкиintyneet SAOS- α 2 β 1-solut infektoituivat heikoiten (Kuva 7B). Kuitenkin sekä seerumilla että yksittäisillä kasvutekijöillä esiaktivoiminen sai solut infektoitumaan vähintään yhtä tehokkaasti kuin ei-näлкиintyneet solut (Kuva 7B).

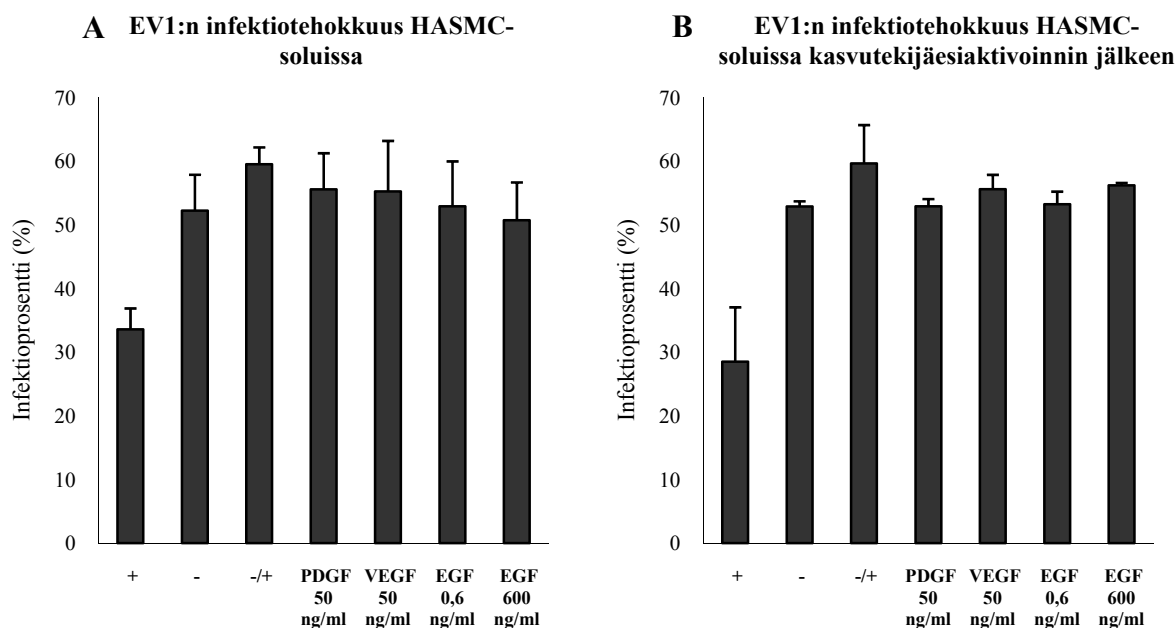


Kuva 7. EV1-infektiotehokkuus SAOS- α 2 β 1 -soluissa. Kokeissa kontrolleina toimivat SAOS- α 2 β 1 -solut, jotka kasvatettiin ja käsiteltiin seerumin läsnä ollessa (+). Lisäksi kokeissa oli mukana näлкиintyneitä (-) sekä seerumilla (-/+) että kasvutekijöillä (PDGF 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml ja EGF 0,6 ja 600 ng/ml) käsiteltyjä näлкиintyneitä soluja. Soluja stimuloitiin kasvutekijöillä (A) viruksen sitomisen jälkeen tai (B) ennen viruksen sitoutumista. Viruksen annettiin infektoida soluja kuuden tunnin ajan, minkä jälkeen EV1-kapsidiproteiini sekä solujen tumat leimattiin fluoresoivilla väriaineilla. Fluoresenssimikroskoopikuvien perusteella eri tapauksista laskettiin infektioprosentit (infektoituneiden solujen lukumäärä/kaikkien solujen lukumäärä). Jokaisesta näytteestä laskettiin vähintään 150 solua. Pylväät ovat kolmen toistokerran keskiarvoja ja hajonnat on määritetty tulosten keskivirheiden perusteella.

4.3. EV1-infektio kasvutekijästimuloituissa HASMC-soluissa

Normaalisti SAOS-soluissa ei ilmennetä $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä. Stabiilin transfektion seurauksena SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ilmenee ylimäärin (Ivaska ym., 1999). Tämän vuoksi seeruminäлкиinnyttämisen sekä kasvutekijöiden vaikutus EV1-infektiotehokkuuteen haluttiin selvittää myös solulinjalla, jossa $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ilmennetään normaalisti. Solulinjaksi valittiin HASMC-solut.

HASMC-solujen EV1-infektioit suoritettiin kuten SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa. Toisin kuin SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solut, näлкиintyneet HASMC-solut infektoituivat paremmin kuin ei-näлкиintyneet solut (Kuvat 8A ja B). Ennen viruksen sitoutumista tai sen jälkeen näлкиintyneille soluille lisätyt seerumi tai yksittäiset kasvutekijät eivät parantaneet, mutta eivät myöskään heikentäneet infektiota (Kuvat 8A ja B).



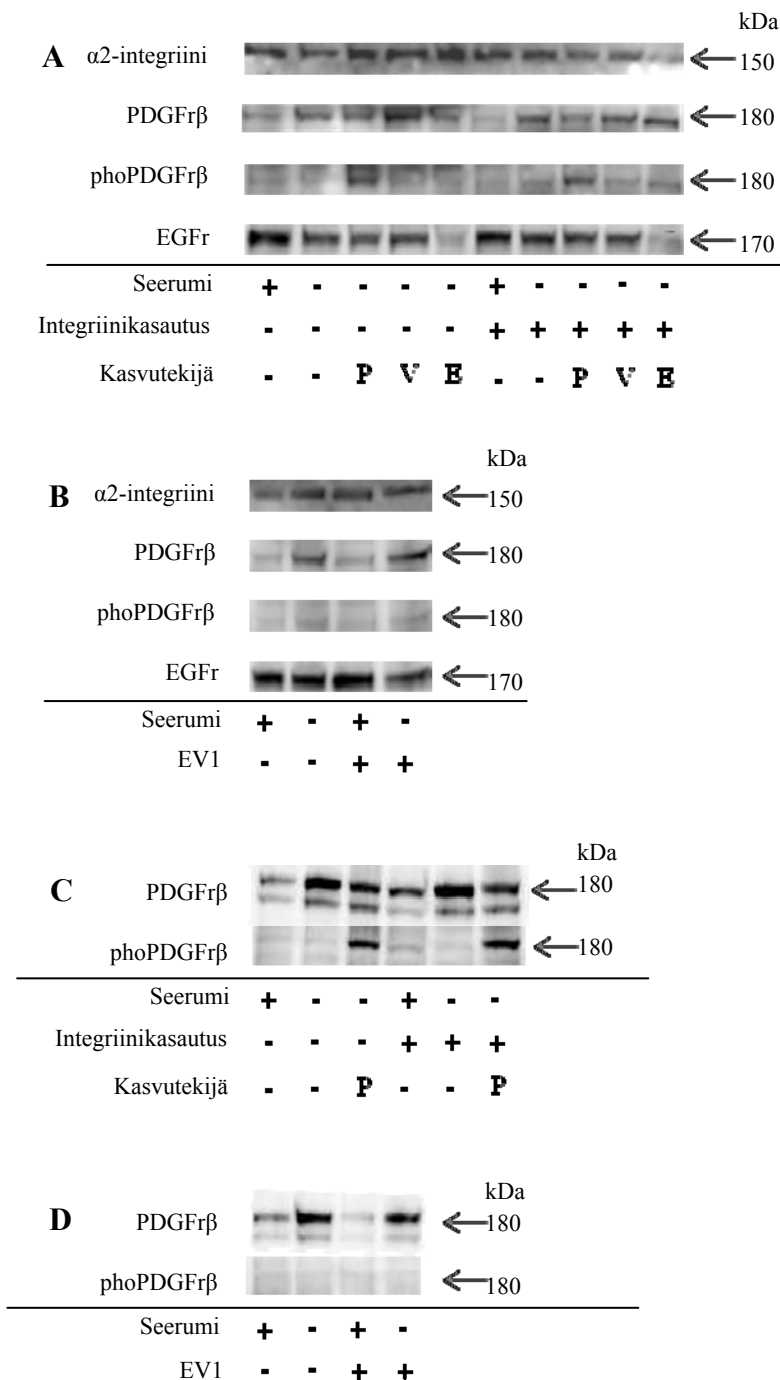
Kuva 8. EV1-infektiotehokkuus HASMC-soluissa. Kokeissa kontrolleina toimivat HASMC-solut, jotka kasvatettiin ja käsiteltiin seerumin läsnä ollessa (+). Lisäksi kokeissa oli mukana näлкиintyneitä (-) sekä seerumilla (-/+) että kasvutekijöillä (PDGF 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml ja EGF 0,6 ja 600 ng/ml) käsiteltyjä näлкиintyneitä soluja. Soluja stimuloitiin kasvutekijöillä (A) viruksen sitomisen jälkeen tai (B) ennen viruksen sitoutumista. Viruksen annettiin infektoida soluja kuuden tunnin ajan, minkä jälkeen EV1-kapsidiproteiini sekä solujen tumat leimattiin fluoresoivilla väriaineilla. Fluoresenssimikroskoopikuvien perusteella eri tapauksista laskettiin infektioprosentit (infektoituneiden solujen lukumäärä/kaikkien solujen lukumäärä). Jokaisesta näytteestä laskettiin vähintään 150 solua. Pylväät ovat neljän toistokerran keskiarvoja ja hajonnat on määritetty tulosten keskivirheiden perusteella.

4.4. Integriinien kasautumisen ja EV1:n sitoutumisen vaikutukset $\alpha 2\beta 1$ -integriineihin sekä kasvutekijäreseptoreihin

Seuraavaksi haluttiin selvittää, muuttuvatko $\alpha 2\beta 1$ -integriinien tai kasvutekijäreseptoreiden määrät SAOS- $\alpha 2\beta 1$ - ja HASMC -soluissa nälkiintymisen, kasvutekijästimuloinnin, integriinien kasautumisen tai EV1:n sitoutumisen seurauksena. Eri tavoin käsitellyt ja 15 minuuttia lämpökaapissa olleet solut hajotettiin, ja niiden proteiinit eristettiin SDS-PAGE:n avulla. Proteiiniyöhykkeet siirrettiin PVDF-kalvolle proteiinien leimausta varten.

Solujen nälkiinnyttäminen nosti PDGFr β :n määrää sekä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ - että HASMC -soluissa, muttei vaikuttanut EGFr:n tasoihin (Kuvat 9A-D). Molemmissa solulinjoissa PDGF-stimulaatiot saivat PDGFr β :n totaalimäärän vähenemään ja fosforyloidun muodon lisääntymään (Kuvat 9A ja C). SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa myös integriinin kasautuminen saattoi hieman lisätä PDGFr β :n aktivaatiota ja nostaa fosforyloituneen muodon tasoja (Kuva 9A). SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluille annettu lyhyt EGF-stimulaatio laski selvästi EGFr-tasoja (Kuva 9A). Lisäksi SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa kasautuneen $\alpha 2$ -integriinin määrä näyttäisi vähenevän ainakin EGF:llä stimuloitaessa (Kuva 9A).

SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa EV1:n sitoutuminen ja endosytoosin varhaiset vaiheet eivät näyttäneet vaikuttavan $\alpha 2$ -integriinin määrään soluissa (Kuva 9B). Kummassakaan solulinjassa EV1-infektion alkuvaiheilla ei myöskään näyttäisi olevan vaikutusta PDGFr β :n tai sen fosforyloituneen muodon määriin (Kuvat 9B ja D). Nälkiintyneissä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa EV1 vaikuttaisi kuitenkin vähentävän EGFr:n määrää (Kuva 9B).



Kuva 9. Seeruminäлкиintymisen, kasvutekijästimuloinnin, integriinien kasautumisen sekä EV1:n sitoutumisen vaikutukset $\alpha 2\beta 1$ -integroinin ja kasvutekijäreseptoreiden määrään SAOS- $\alpha 2\beta 1$ - (A ja B) ja HASMC -soluissa (C ja D).

(A-D) Kokeissa mukana oli seerumin läsnä ollessa kasvaneita ja käsiteltyjä soluja (Seerumi +) sekä näлкиintyneitä soluja (Seerumi -).

(A ja C) SAOS- $\alpha 2\beta 1$ - ja HASMC -solujen pinnalla olleet $\alpha 2\beta 1$ -integroinit kasautettiin spesifisten vasta-aineiden avulla (Integroinikasautus +). Kasautuneiden integriinien annettiin endosytoitua 15 minuutin ajan.

(A ja C) Osa näлкиintyneistä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ - ja HASMC -soluista aktivoitiin kasvutekijöillä (Kasvutekijä P, V, E) 15 minuutin ajan.

(B ja D) SAOS- $\alpha 2\beta 1$ - ja HASMC -solujen pintaan sidottiin EV1 (EV1 +) ja viruksen annettiin endosytoitua 15 minuutin ajan.

(A-D) Näytteiden valmistamisen jälkeen solut hajotettiin keittämällä niitä 2 x Laemmli -puskurissa 5 minuutin ajan. Proteiinit eroteltiin SDS-PAGE:n avulla, ja siirrettiin PVDF -kalvolle leimaamista varten. Kalvoilta leimattiin $\alpha 2$ -integroini, PDGFr β , phoPDGFr β ja EGFr. Sekundääriseen vasta-aineeseen liitetyn HRP:n määrä havaittiin BioRad:n kuvauslaitteella.

P = PDGF 50 ng/ml

V = VEGF 50 ng/ml

E = EGF 600 ng/ml

5. Tulosten tarkastelu

Tutkimusajatus perustui aiempiin havaintoihin, joiden mukaan seerumia tarvitaan SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa tehokkaaseen kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänottoon. Tarkoituksena oli selvittää, miten seerumi ja siitä löytyvät kasvutekijät vaikuttavat kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EV1:n endosytoosiin. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että integriinit ja kasvutekijäreseptorit sijaitsevat solukalvolla samoilla alueilla, ja että näillä molekyyileillä on selkeitä vaikutuksia toistensa ilmentymiseen ja/tai signalointiin (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010). Työssä käytettiin transfektoidun SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solulinjan lisäksi HASMC-soluja, jotka ilmentävät normaaleja määriä $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä.

5.1. Kasvutekijät edistävät $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenoa SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa

Tutkimus aloitettiin toistamalla aiemmat kokeet, joiden mukaan kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmeno heikentyy nälkiintyneissä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa (Kuvat 6A ja B). Nälkiinnyttäminen ei muuttanut SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen $\alpha 2$ -integriinitasoa (Kuvat 9A ja B), joten heikentynyt $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänotto ei selity esimerkiksi integriinin määrän vähenemisellä. On kuitenkin huomioitava, että $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmeno ei esty kokonaan nälkiintyneissä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa. Seerumin läsnä olo ei ole kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosin kannalta välttämätön, mutta sillä on tapahtumaa tehostava vaikutus. Koska kasvutekijäreseptoreilla on osoitettu olevan selviä yhteyksiä $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010), päätimme selvittää, vaikuttaako joku niistä kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoositehokkuuteen. Nälkiintyneiden SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen PDGF-stimulointi tehosti kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenoa (Kuvat 6A ja B). Tehostava vaikutus näytti myös paranevan PDGF-pitoisuuden kasvaessa. Kasvutekijöistä ainakin PDGF voi siis tehostaa $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosia.

Vaikka SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen nälkiinnyttäminen ei vaikuttanut solujen $\alpha 2$ -integriinin tasoihin (Kuvat 9A ja B), haluttiin vielä tarkistaa, vaikuttavatko solujen nälkiinnyttäminen ja/tai $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasauttaminen kasvutekijäreseptoreiden ilmentymisiin. Aiemmissa tutkimuksissa PDGF β :n tason on todettu nousevan nälkiintyneissä lihassoluissa

(Zimmermann ym., 2006). Samaan tulokseen päädyttiin myös SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen kohdalla (Kuvat 9A ja B). Tarkasteltaessa PDGFr β :n fosforyloitumista havaittiin, että PDGF-stimulaation lisäksi phoPDGFr β :n tasoja nosti hiukan myös $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kasauttaminen (Kuva 9A). On mahdollista, että kasautunut $\alpha 2\beta 1$ -integriini pystyy aktivoimaan solukalvon PDGFr:ja ja näin ollen vaikuttamaan omaan endosytoosiinsa. Kasvutekijäreseptoreiden on aiemminkin raportoitu pystyvän aktivoitumaan ilman kasvutekijästimulaatiota, ja reaktion on lisäksi todettu olevan riippuvaista $\alpha 2$ -integriinistä (Ning ym., 2006). Ehkä integriinien endosytoosi ei nälkiintyneissä SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa esty kokonaan, koska integriinien kasauttaminen saa itsenäisesti aikaan tarvittavan PDGFr β -aktivaation. Immunoblottauskokeita (Kuvat 9A-D) ei vasta-aineongelmista johtuen pystytty toistamaan, joten lisätutkimukset olisivat tarpeen.

Ihmisen seerumin fysiologinen EGF-pitoisuus on alle 1 ng/ml (Joh ym., 1986). Kirjallisuudesta löytyy useita tutkimuksissa käytettyjä EGF-stimulointipitoisuuksia, ja tulosten mukaan EGFr:n endosytoosi sekä solunsisäiset vaiheet voivat olla riippuvaisia käytetystä EGF-konsentraatiosta (ks. yleiskatsaukset Balbis ja Posner, 2010; Sorkin ja Goh, 2010). Pienillä EGF-pitoisuuksilla (<10 ng/ml) stimuloitaessa EGFr:n ajatellaan poistuvan lipidilautoilta ja ohjautuvan signaloivalle, klatriinivälitteiselle endosytoosireitille. Suurilla pitoisuuksilla (>100 ng/ml) aktivoitaessa EGFr:n on todettu ohjautuvan hajotusreitille suoraan lipidilautoilta. Immunoblottaus tulosten mukaan korkealla EGF-pitoisuudella (600 ng/ml) stimuloitaessa EGFr hajoaa 15 minuutin aikana (Kuva 9A). Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet näin nopean hajoamisen mahdolliseksi (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Duex, 2010). EGF-stimulaatio näyttäisi lisäksi saavan aikaan kasautuneen $\alpha 2$ -integriinin hajoamisen jo 15 minuutin aikana (Kuva 9A). Kuitenkin FT V. Marjomäen ryhmän uusimmat tulokset ovat kyseenalaistaneet tämän havainnon. Toisin kuin PDGFr β :n kohdalla, EGFr:n määrä ei näytä lisääntyvän nälkiintyneissä soluissa (Kuvat 9A ja B). Immunoblottaus tulosten toistamisen lisäksi olisikin mielenkiintoista tutkia tarkemmin, mitä kasautuneen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosissa tapahtuu EGF-stimulaatiossa.

5.2. Kasvutekijät tehostavat EV1-infektiota SAOS- α 2 β 1 -soluissa

EV1:n reseptorina solukalvolla toimii α 2 β 1-integriini (Bergelson ym., 1992). Viruksen sitoutuminen reseptoriinsa aiheuttaa integriinien kasautumisen ja lopulta reseptori-viruskompleksin endosytoosin makropinosytoosin kaltaisella reitillä (Xing ym., 2004; Karjalainen ym., 2008). Seerumi ja kasvutekijöistä ainakin PDGF tehostavat kasautuneen α 2 β 1-integriinin sisäänmenoa nälkiintyneissä SAOS- α 2 β 1 -soluissa (Kuvat 6A ja B). Seuraavaksi haluttiin testata, vaikuttavatko solujen seeruminälkiinnyttäminen ja/tai kasvutekijästimulaatiot EV1:n infektiotehokkuuteen.

Kasvutekijöiden vaikutuksia EV1:n infektiotehokkuuteen selvitettiin kahdella koejärjestelyllä. Ensimmäisessä kokeessa nälkiintyneille SAOS- α 2 β 1 -soluille annettiin lyhyt kasvutekijästimulaatio heti viruksen solun pintaan sitoutumisen jälkeen (Kuva 7A). Toisessa kokeessa stimulaatio annettiin soluille ennen viruksen sitoutumista (Kuva 7B). Immunoblottaustulosten mukaan SAOS- α 2 β 1 -solujen α 2-integriinien määrä ei laske nälkiintymisen seurauksena (Kuvat 9A ja B). Tästä huolimatta EV1:n infektiotehokkuus laski nälkiintyneissä SAOS- α 2 β 1 -soluissa (Kuvat 7A ja B). Koska solujen nälkiinnyttäminen ei kuitenkaan täysin estänyt infektiota, voidaan todeta, ettei seerumi ole välttämätön EV1-infektioille. Kun kasvutekijästimulaatiot annettiin viruksen sitoutumisen jälkeen, infektiotehostui selkeimmin EGF-aktivaatiossa (Kuva 7A). Koska aktivoituneet EGFr:t hajotetaan soluissa nopeasti (Kuva 9A; yleiskatsaus Sorkin ja Duex, 2010), on todennäköistä, että aktivoitujen EGFr:en välittämät signaalit ovat tärkeitä EV1-infektion alkuvaiheissa, esimerkiksi viruspartikkelin endosytoosissa tai sen varhaisissa vaiheissa solulimassa. Mielenkiintoista on, että immunoblottauksen mukaan nälkiintyneissä SAOS- α 2 β 1 -soluissa EV1:n endosytoosin varhaiset vaiheet (15 min) voisivat kiihdyttää EGFr:n hajotusta (Kuva 9B). EV1:n sitoutuminen nälkiintyneen SAOS- α 2 β 1 -solun pintaan voi mahdollisesti saada aikaan EGFr:n aktivoitumisen, endosytoosin ja ohjautumisen hajotusreitille. Idea ei ole mahdoton, sillä esimerkiksi α 2-integriinin on todettu pystyvän aktivoimaan EGFr:ta, kun stimuloiva kasvutekijä ei ole paikalla (Ning ym., 2006). Lisäksi sekä integriinien että inaktiivisten EGFr:en on ajateltu sijaitsevan solukalvon lipidilautoilla (ks. yleiskatsaus Mukherjee ym., 2006; Ning ym., 2006). Toisaalta tässä työssä esiteltyihin

immunoblottaustuloksiin on suhtauduttava varauksella, koska vasta-aineongelmien takia niitä ei pystytty toistamaan. Virussidonnan jälkeen tehdyt PDGF- ja VEGF -stimulaatiot paransivat EV1:n infektiotehokkuutta osassa kokeissa, vaikka tulokset eivät olleet yhtä selviä kuin EGF-stimulaatioissa (Kuva 7A). Tehokkaan infektion saavuttamiseksi EV1 saattaa tarvita PDGF- ja VEGF -stimulaatioita jo ennen viruksen endosytoosia, ehkä jopa viruksen solukalvolle kiinnittymisvaiheessa. Toisin kuin kasautunut $\alpha 2\beta 1$ -integroini, EV1 ei näyttäisi kuitenkaan aktivoivan PDGFr β :aa (Kuvat 9A ja B).

Aktivoituneiden kasvutekijäreseptoreiden tiedetään siirtyvän nopeasti solun sisään (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Toisen koejärjestelyn avulla haluttiinkin selvittää, mitä EV1-infektiotehokkuudelle tapahtuu, jos SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen kasvutekijäreseptoreita aktivoidaan seerumilla tai yksittäisillä kasvutekijöillä ennen viruksen sitoutumista. Lyhyet kasvutekijästimulaatiot (15 min) näyttivät saavan SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa aikaan EGFr:n hajoamisen ja PDGFr β :n aktivoitumisen (Kuva 9A). Infektiokokeet puolestaan osoittivat, että nälkiintyneiden SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen esiaktivointi seerumilla tai yksittäisillä kasvutekijöillä nosti EV1-infektiotehokkuuden samalle tasolle ei-nälkiintyneiden solujen kanssa (Kuva 7B). Vaikka 15 minuutin EGF-stimulaatio näyttäisi ohjaavan EGFr:t hajotusreitille (Kuva 9A), voidaan silti olettaa, että solujen pinnalle ja endosomeihin jää myös aktiivisia, signaloivia reseptoreita (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Esimerkiksi VEGFr-2:n on todettu VEGF-stimulaation seurauksena aktivoituvan ja ohjautuvan hajotusreitille, jossa noin puolet reseptorista hajoaa 20 minuutin kuluessa (Lampugnani ym., 2006). Lyhyet kasvutekijäesiaktivoinnit riittävät siis palauttamaan nälkiintymisen jälkeen normaaleiksi ainakin ne SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen toiminnot, joita tehokas EV1-infektio toimiakseen tarvitsee. RTK:en aktivoitumisen on havaittu lisäävän solujen endosytoosia (Donepudi ja Resh, 2008), mikä voi omalta osaltaan tehostaa EV1:n endosytoosia ja infektiota.

5.3. HASMC-solujen nälkiinnyttäminen tehostaa EV1-infektiota

SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ilmentetään stabiilin transfektion seurauksena ylimäärin, ja näillä soluilla saadut tulokset haluttiin vielä varmentaa toisella solulinjalla. Kokeissa päädyttiin käyttämään HASMC-soluja, joissa $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä ilmentetään V. Marjomäen aiempien tutkimuksien mukaan suhteellisen runsaasti. Kuten SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa, myös HASMC-solujen immunoblottaustulokset paljastivat PDGFr β :n tasojen nousevan nälkiintyneissä soluissa ja laskevan PDGF-stimulaatiossa (Kuvat 9A ja C). PDGF-stimulaatio näyttäisi siis ohjaavan osan PDGFr β :sta hajotukseen. Myös PDGF-stimulaation vaikutukset phoPDGFr β -tasojen nousuun oli selvästi havaittavissa (Kuva 9D). Koska HASMC-soluille ei tehty $\alpha 2\beta 1$ -integriinin sisäänmenoanalyysiä, ei voida sanoa, kuinka tehokkaasti HASMC-solut ottaisivat $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä sisäänsä eri seerumi- tai kasvutekijästimulaatiotilanteissa. Kantaa ei voida myöskään ottaa esimerkiksi HASMC-solujen $\alpha 2$ - tai EGFr-tasoihin, sillä näitä proteiineja ei vasta-aineongelmien vuoksi leimattu PVDF-kalvolta.

Poiketen SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluista, nälkiintyneet HASMC-solut infektoiduivat tehokkaammin kuin ei-nälkiintyneet solut (Kuvat 8A ja B). Kun nälkiintyneille HASMC-soluille annettiin täydellistä seerumia tai yksittäisiä kasvutekijöitä EV1:n pintaan sitomisen jälkeen, pysyivät infektiotehokkuudet suurin piirtein samoina tai paranivat hiukan nälkiintyneisiin soluihin verrattuna (Kuva 8A). HASMC-solujen nälkiinnyttäminen näyttäisi luovan ihanteelliset olosuhteet EV1-infektioille. Tämän pro gradu -työn puitteissa saatiin selville muun muassa PDGFr β :n määrän kasvu HASMC-solujen nälkiinnyttämisen aikana. On siis mahdollista, että nälkiintyneiden HASMC-solujen tehokkaan EV1-infektion takana on lisääntyneiden kasvutekijäreseptoreiden määrä solukalvolla. Immunoblottausleimaukset paljastivat myös, että PDGFr β :n määrä väheni EV1:n sitoutumisen jälkeen ainakin seerumikäsitellyissä soluissa (Kuva 9D). EV1 voi siis kiihdyttää PDGFr β :n endosytoosia ja hajotusta. Lisätutkimukset asian tiimoilta olisivat kuitenkin paikallaan, sillä vaikka PDGFr β :n määrä soluissa näyttäisi laskevan EV1:n kiinnittymisen seurauksena, ei phoPDGFr β :n tasoissa havaittu muutoksia (Kuva 9D).

HASMC-solujen esiaktivoinnit seerumilla tai kasvutekijöillä ennen EV1:n sitoutumista eivät muuttaneet solujen infektoitumistehokkuuksia (Kuva 8B). Sekä ilman esiaktivointia että sen kanssa HASMC-soluista huonoiten infektoituivat ei-nälkiintyneet solut (Kuvat 8A ja B). Molemmissa kokeissa tehokkaimmin näyttivät infektoituvan nälkiintyneet HASMC-solut, joille annettiin täydellistä seerumia joko ennen EV1-tartutusta tai heti sen jälkeen (Kuvat 8A ja B). Tulokset herättävät kysymyksen siitä, mitä HASMC-soluille tapahtuu nälkiinnyttämisen aikana. Nyt tehtyjen tutkimuksien perusteella on hankala arvioida, miksi EV1-infektiotehokkuus on parhaimmillaan juuri nälkiintyneissä HASMC-soluissa.

5.4. Yhteenveto

Endosytoituakseen tehokkaasti kasautunut $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja EV1 tarvitsevat SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -soluissa aktiivisia kasvutekijäreseptoreita. Nälkiinnyttäminen nostaa solujen kasvutekijäreseptoreiden tasoja, ja on mahdollista, että virus ja/tai kasautunut $\alpha 2\beta 1$ -integriini osaa tarvittaessa itse aktivoida kasvutekijäreseptoreita. Nyt tehdyissä tutkimuksissa yksikään kasvutekijöistä ei kuitenkaan noussut muita tärkeämmäksi. Nälkiintyneiden SAOS- $\alpha 2\beta 1$ -solujen EV1-infektiotehokkuudet nousivat ei-nälkiintyneiden solujen tasolle riippumatta siitä, esiaktivoitiinko soluja yksittäisillä kasvutekijöillä vai täydellisellä seerumilla. HASMC-soluista tehokkaimmin infektoituivat nälkiintyneet solut. Tehdyt tutkimukset eivät kuitenkaan paljasta syytä kahden solulinjan erilaiseen käyttäytymiseen.

6. Lähdeluettelo

- Abella, J.V. ja Park, M. 2009. Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 296:E973-84.
- Acconcia, F., Sigismund, S. ja Polo, S. 2009. Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp.Cell Res.* 315:1610-1618.
- Aderem, A. ja Underhill, D.M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu.Rev.Immunol.* 17:593-623.
- Allen, L.H. ja Aderem, A. 1995. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J.Exp.Med.* 182:829-840.
- Araki, N., Egami, Y., Watanabe, Y. ja Hatae, T. 2007. Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Exp.Cell Res.* 313:1496-1507.
- Balbis, A. ja Posner, B.I. 2010. Compartmentalization of EGFR in cellular membranes: role of membrane rafts. *J.Cell.Biochem.* 109:1103-1108.
- Benmerah, A. ja Lamaze, C. 2007. Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic.* 8:970-982.
- Bergelson, J.M., Chan, B.M., Finberg, R.W. ja 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., Shepley, M.P., Chan, B.M., Hemler, M.E. ja Finberg, R.W. 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science.* 255:1718-1720.
- Caron, E. ja Hall, A. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science.* 282:1717-1721.
- Clement, C., Tiwari, V., Scanlan, P.M., Valyi-Nagy, T., Yue, B.Y. ja Shukla, D. 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J.Cell Biol.* 174:1009-1021.
- Conner, S.D. ja Schmid, S.L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 422:37-44.
- Daniel, E.E., El-Yazbi, A. ja Cho, W.J. 2006. Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis. *J.Cell.Mol.Med.* 10:529-544.
- Doherty, G.J. ja McMahon, H.T. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu.Rev.Biochem.* 78:857-902.
- Donepudi, M. ja Resh, M.D. 2008. c-Src trafficking and co-localization with the EGF receptor promotes EGF ligand-independent EGF receptor activation and signaling. *Cell.Signal.* 20:1359-1367.
- Dreux, A.C., Lamb, D.J., Modjtahedi, H. ja Ferns, G.A. 2006. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis.* 186:38-53.
- D'Souza-Schorey, C. ja Chavrier, P. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7:347-358.
- Filman, D.J., Wien, M.W., Cunningham, J.A., Bergelson, J.M. ja Hogle, J.M. 1998. Structure determination of echovirus 1. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 54:1261-1272.

- Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N. ja Roberts, L.O. 2010. Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J.Gen.Virol.* 91:1428-1438.
- Gesbert, F., Sauvonnet, N. ja Dautry-Varsat, A. 2004. Clathrin-Independent endocytosis and signalling of interleukin 2 receptors IL-2R endocytosis and signalling. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 286:119-148.
- Grist, N.R., Bell, E.J. ja 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.
- Gruenberg, J. ja van der Goot, F.G. 2006. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7:495-504.
- Hansen, C.G. ja Nichols, B.J. 2009. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *J.Cell.Sci.* 122:1713-1721.
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H.H. ja Helenius, A. 2010. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J.Cell Biol.* 191:615-629.
- Heikkila, O., Susi, P., Tevaluoto, T., Harma, H., Marjomaki, V., Hyypia, T. ja Kiljunen, S. 2010. Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by β 2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J.Virol.* 84:3666-3681.
- Heldin, C.H. ja Westermark, B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol.Rev.* 79:1283-1316.
- Herbst, R.S. 2004. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 59:21-26.
- Hewlett, L.J., Prescott, A.R. ja Watts, C. 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J.Cell Biol.* 124:689-703.
- Holmes, K., Roberts, O.L., Thomas, A.M. ja Cross, M.J. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell.Signal.* 19:2003-2012.
- Holmes, K., Roberts, O.L., Thomas, A.M. ja Cross, M.J. 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell.Signal.* 19:2003-2012.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Ivaska, J. ja Heino, J. 2010. Interplay between cell adhesion and growth factor receptors: from the plasma membrane to the endosomes. *Cell Tissue Res.* 339:111-120.
- Ivaska, J. ja Heino, J. 2000. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol.Life Sci.* 57:16-24.
- Ivaska, J., Reunanen, H., Westermarck, J., Koivisto, L., Kahari, V.M. ja Heino, J. 1999. Integrin α 2 β 1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the α 2 cytoplasmic tail. *J.Cell Biol.* 147:401-416.
- Joh, T., Itoh, M., Katsumi, K., Yokoyama, Y., Takeuchi, T., Kato, T., Wada, Y. ja Tanaka, R. 1986. Physiological concentrations of human epidermal growth factor in biological fluids: use of a sensitive enzyme immunoassay. *Clin.Chim.Acta.* 158:81-90.

- Karjalainen, M., Kakkonen, E., Upla, P., Paloranta, H., Kankaanpää, P., Liberali, P., Renkema, G.H., Hyypia, T., Heino, J. ja Marjomaki, V. 2008. A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in alpha2beta1 integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol.Biol.Cell.* 19:2857-2869.
- King, S.L., Kamata, T., Cunningham, J.A., Emsley, J., Liddington, R.C., Takada, Y. ja Bergelson, J.M. 1997. Echovirus 1 interaction with the human very late antigen-2 (integrin alpha2beta1) I domain. Identification of two independent virus contact sites distinct from the metal ion-dependent adhesion site. *J.Biol.Chem.* 272:28518-28522.
- Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S.J., Kurzchalia, T.V., Sharma, D.K., Pagano, R.E., Hancock, J.F., Mayor, S. ja Parton, R.G. 2005. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J.Cell Biol.* 168:465-476.
- Krensel, K. ja Lichtner, R.B. 1999. Selective increase of alpha2-integrin sub-unit expression on human carcinoma cells upon EGF-receptor activation. *Int.J.Cancer.* 80:546-552.
- Kumari, S. ja Mayor, S. 2008. ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nat.Cell Biol.* 10:30-41.
- Kumari, S., Mg, S. ja Mayor, S. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 20:256-275.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A. ja Dautry-Varsat, A. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol.Cell.* 7:661-671.
- Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Gagliani, M.C., Tacchetti, C. ja Dejana, E. 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J.Cell Biol.* 174:593-604.
- Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., Bockmann, R.A., Corda, D., Colanzi, A., Marjomaki, V. ja Luini, A. 2008. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J.* 27:970-981.
- Luzio, J.P., Parkinson, M.D., Gray, S.R. ja Bright, N.A. 2009. The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem.Soc.Trans.* 37:1019-1021.
- Madshus, I.H. ja Stang, E. 2009. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *J.Cell.Sci.* 122:3433-3439.
- Marjomaki, V., Pietiainen, V., Matilainen, H., Upla, P., Ivaska, J., Nissinen, L., Reunanen, H., Huttunen, P., Hyypia, T. ja Heino, J. 2002. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J.Virol.* 76:1856-1865.
- Marsh, M. ja Helenius, A. 2006. Virus entry: open sesame. *Cell.* 124:729-740.
- Mercanti, V., Charette, S.J., Bennett, N., Ryckewaert, J.J., Letourneur, F. ja Cosson, P. 2006. Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups. *J.Cell.Sci.* 119:4079-4087.
- Mercer, J. ja Helenius, A. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat.Cell Biol.* 11:510-520.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S. ja Yamada, K.M. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J.Cell Biol.* 135:1633-1642.

- Mukherjee, S., Tessema, M. ja Wandering-Ness, A. 2006. Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function. *Circ.Res.* 98:743-756.
- Naslavsky, N., Weigert, R. ja Donaldson, J.G. 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol.Biol.Cell.* 15:3542-3552.
- Ng, T., Shima, D., Squire, A., Bastiaens, P.I., Gschmeissner, S., Humphries, M.J. ja Parker, P.J. 1999. PKC α regulates β 1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *EMBO J.* 18:3909-3923.
- Ning, Y., Buranda, T. ja Hudson, L.G. 2007. Activated epidermal growth factor receptor induces integrin α 2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway. *J.Biol.Chem.* 282:6380-6387.
- Norbury, C.C. 2006. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology.* 117:443-451.
- Orth, J.D. ja McNiven, M.A. 2006. Get off my back! Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles. *Cancer Res.* 66:11094-11096.
- Pelkmans, L. ja Helenius, A. 2003. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15:414-422.
- Pietiainen, V., Marjomaki, V., Upla, P., Pelkmans, L., Helenius, A. ja Hyypia, T. 2004. Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events. *Mol.Biol.Cell.* 15:4911-4925.
- Powelka, A.M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L.M., Sonnenberg, A. ja Hsu, V.W. 2004. Stimulation-dependent recycling of integrin β 1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic.* 5:20-36.
- Rajendran, L. ja Simons, K. 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. *J.Cell.Sci.* 118:1099-1102.
- Rappoport, J.Z. ja Simon, S.M. 2003. Real-time analysis of clathrin-mediated endocytosis during cell migration. *J.Cell.Sci.* 116:847-855.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. ja Zerial, M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell.* 122:735-749.
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R.G. ja 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.
- Sadowski, L., Pilecka, I. ja Miaczynska, M. 2009. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp.Cell Res.* 315:1601-1609.
- Sauvonnet, N., Dujeancourt, A. ja Dautry-Varsat, A. 2005. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of γ cytokine receptor. *J.Cell Biol.* 168:155-163.
- Schafer, D.A., Weed, S.A., Binns, D., Karginov, A.V., Parsons, J.T. ja Cooper, J.A. 2002. Dynamin2 and cortactin regulate actin assembly and filament organization. *Curr.Biol.* 12:1852-1857.
- Simons, K. ja Toomre, D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1:31-39.
- Sorkin, A. ja Duex, J.E. 2010. Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor. *Curr.Protoc.Cell.Biol.* Chapter 15:Unit 15.14.
- Sorkin, A. ja Goh, L.K. 2008. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp.Cell Res.* 314:3093-3106.

- Spoden, G., Freitag, K., Husmann, M., Boller, K., Sapp, M., Lambert, C. ja Florin, L. 2008. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One*. 3:e3313.
- Upla, P., Marjomaki, V., Kankaanpaa, P., Ivaska, J., Hyypia, T., Van Der Goot, F.G. ja Heino, J. 2004. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol.Biol.Cell*. 15:625-636.
- van der Blik, A.M., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M. ja Schmid, S.L. 1993. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J.Cell Biol*. 122:553-563.
- Vidal, C., Geny, B., Melle, J., Jandrot-Perrus, M. ja Fontenay-Roupie, M. 2002. Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood*. 100:4462-4469.
- Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Brachmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C. ja Grinstein, S. 2001. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J.Cell Biol*. 155:19-25.
- Watts, C. 2006. Phagosome neutrality in host defense. *Cell*. 126:17-19.
- Xing, L., Huhtala, M., Pietiainen, V., Kapyta, J., Vuorinen, K., Marjomaki, V., Heino, J., Johnson, M.S., Hyypia, T. ja Cheng, R.H. 2004. Structural and functional analysis of integrin alpha2I domain interaction with echovirus 1. *J.Biol.Chem*. 279:11632-11638.
- Zerial, M. ja McBride, H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol*. 2:107-117.
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C.C., Donaldson, J.G. ja Greenberg, S. 1998. A requirement for ARF6 in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J.Biol.Chem*. 273:19977-19981.
- Zimmermann, O., Zwaka, T.P., Marx, N., Torzewski, M., Bucher, A., Guilliard, P., Hannekum, A., Hombach, V. ja Torzewski, J. 2006. Serum starvation and growth factor receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J.Vasc.Res*. 43:157-165.
- Zwang, Y. ja Yarden, Y. 2009. Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic*. 10:349-363.