

Echovirus 1 infektion vaikutus epidermaalisen kasvutekijäreseptorin endosytoosiin ja signalointiin.

Ilari Kuronen
Pro Gradu tutkielma
University of Jyväskylä
Department of Biological and Environmental Science
Cell and Molecular Biology
02.12.2013

Alkusanat

Tämä pro-gradu työ perustuu 1.9.2011 ja 24.2.2012 välisenä aikana Akatemiantutkija Varpu Marjomäen tutkimusryhmässä tehtyihin laboratorionkokeisiin. Puhtaaksikirjoitus tehtiin 01.02.2012 ja 12.08.2013 välisenä aikana. Varpu Marjomäelle kuuluu suuri kiitos välittömästä läsnäolosta, maltillisista neuvoista ja rohkaisevasta ohjauksesta. Moona Huttunen (tätä aloitettaessa vielä Lehkonen ☺) ja Nina Rintanen ovat antaneet valtaisan avun vastauksillaan kysymyksiin jotka koskivat käytännön laboratoriotöitä sekä pohdintoja tämän kaiken ja elämän tarkoituksesta. Ilman Lassi Paavolaista olisin yhä kiinni tietokonenäytön edessä hakkaamassa avuttomana näppäimistöä ymmärtämättä mitä BioImageXD:llä voi todella tehdä. Kiitos rakkaalle Tirulle siitä, että olet kestänyt pilkkuvirheitäni sekä tukenut minua läpi opintojeni. Ja suuri kiitos myös vanhemmilleni, siskolle ja Danalle kaikesta siitä tasapainosta mitä olette antaneet opintoelämälleni.

| | | |
|-------------------------------|---|--------------------------|
| Tekijä: | Ilari Kuronen | |
| Tutkielman nimi: | Echovirus 1 infektion vaikutus epidermaalisen kasvutekijäreseptorin endosytoosiin ja signaalointiin | |
| English title: | Echovirus 1 infections effects on epidermal growth factor receptor endocytosis and signaling | |
| Päivämäärä: | 12.8.2013 | Sivumäärä: 47 + 4 |
| Laitos: | Bio- ja ympäristötieteiden laitos | |
| Oppiaine: | Solubiologia | |
| Tutkielman ohjaaja(t): | Varpu Marjomäki | |

Tiivistelmä:

Epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR) on yhdessä kollageeni- ja lamiinireseptori $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa tärkeä tekijä solun selviytymisen, kiinnittymisen ja jakautumisen säätelmissä sekä syöpäsoluissa.

Kasvutekijän sitoutumisen jälkeen EGFR:t dimerisoituvat, endosytoituvat klatriinivälitteisen endosytoosin kautta ja kulkeutuvat solun sisällä kolmen eri reitin mukaisesti: 1) EGFR-ligandi-kompleksi voi ubikitinaation seurauksena päätyä lysosomaaliseen pH:sta riippuvaan hajoitukseen, EGFR kierrättyy takaisin solukalvolle 2) ligandin irtoamisen tai 3) UBPY de-ubikitinaatioenstymymin toimesta.

$\alpha 2\beta 1$ -integriinireseptori klusteroituu solukalvolle kiinnittytyään kollageeniin, lamiiniin, Echovirus1:een tai vasta-aineeseen ja endosytoituu ligandistaan riippuen joko klatriini- tai kaveoliini-lipidilauttavälitteisellä endosytoosilla.

Proteiinikinaasi C:n (PKC) aktivaatio vaikuttaa sekä integriinin, että EGFR:n endosytoosissa. $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosi on riippuvainen PKC α -aktivaatiosta. EGFR:lla threoniini 654:n fosforylaatio PKC α :n toimesta estää reseptorin ubikitinaation ja ohjaa sen kierrättävälle endosytoottiselle reitille.

Aikaisempien tutkimuksiemme mukaan EGFR- ja $\alpha 2\beta 1$ -Integriiniendosomit kulkeutuvat solun sisällä hyvin lähellä toisiaan päätyen lopulta monivesikulaaarisiin rakenteisiin. Reseptorit eivät kuitenkaan ole fyysisessä kontaktissa ja niiden vesikkelit ovat eri pH:ta. EGFR:n ja Integriinin välillä tiedetään kuitenkin olevan yhteyksiä ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kautta tapahtuvan Echovirus1-infektion on havaittu vaikuttavan EGFR-hajotukseen.

Tässä tutkimuksessa halusimme selvittää kuinka EV1-infektio vaikuttaa EGFR-säätelyyn. Keuhkosyöpäsolulinja A549:n EV1-infektioitujen ja infektoimattomien solujen lyso- tai proteosomaalinen hajotus estettiin bafilomysiiniA:lla, calpainilla tai bortezomibilla. PKC α :n vaikutusta tutkittaessa kinaasi aktivoitiin phorboli 12-myristaatti 13-asetaatilla. Käsiteltyjä soluja kuvattiin konfokaalimikroskoopilla joko pedattuina kaksiuolotteisesti tai elävinä neliuolotteisesti. Kvantitatiivinen kuvadata-analyysi tehtiin BioImageXD:llä. Kasvutekijällä aktivoituja A549-soluja kuvattiin myös transmissioelektronimikroskoopilla.

Tuloksemme osoittivat että EGFR kulkeutui koeasetelmissämme samankaltaisten endosomaalisten rakenteiden kautta kuin EV1- $\alpha 2\beta 1$ -Integriinikompleksi. EV1-infektio vaikuttaa EGFR-kuljetukseen PKC α -aktivaatiota muistuttavalla tavalla: EGFR ohjautuu kierrättävälle endosytoosireitille ja sen hajotus heikkenee. Tuloksemme viittaavat EV1-infektion vaikuttavan EGFR:iin juuri PKC α -aktivaation kautta. EV1- $\alpha 2\beta 1$ -integriinikompleksin hajotuksen estyminen näytti myös lisäävän EGFR:n kertymistä solujen sisälle, joten viruksen vaikutus EGFR-reittiin välittyy vielä endosytoosin jälkeenkin. Nämä tulokset ovat yhdenmukaisia aikaisemmin tehtyjen havaintojen kanssa, joiden mukaan $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EGFR:n välillä on selvä, vaikkakaan ei fyysinen, vuorovaikutus. On hyvin mahdollista että EV1 hyötyy EGFR:-hajotuksen hidastamisesta. Virukselle on hyödyllistä pitkittää EGFR:n solunsisäistä signaalointia, joka säätlee Ras-ERK-signaalointisarjan kautta mitogeneesiä ja PI3-Akt-signaalointireitin kautta johtaa anti-apoptoottiseen signaalointiin. Molempien signaalointireittien säätely mahdollistaa virukselle paremmat solunsisäiset replikaatio-olosuhteet.

Avainsanat: Endosomaalinen kuljetus, Epidermaalinen kasvutekijäreseptori, $\alpha 2\beta 1$ -Integriini, Echovirus 1, Proteiinikinaasi C

Author: Ilari Kuronen
Title of thesis: Echovirus 1 infections effects on epidermal growth factor receptor endocytosis and signaling
Finnish title: Echovirus 1 infektion vaikutus epidermaalisen kasvutekijäreseporin endosytoosiin ja signalointiin
Date: 12.8.2013 **Pages:** 47 + 4
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisor(s): Varpu Marjomäki

Abstract:

Alongside with collagen and lamin receptor $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, epidermal growth factor receptor (EGFR) is a crucial factor in cell survival, attachment, proliferation, mitosis and metastasis formation. Growth factor attachment dimerizes EGFRs which in turn induces clathrin dependent endocytosis of the EGFR-Ligand complex. EGFR has three distinct pathways within the cell: 1) EGFR-ligand complex undergoes lysosomal pH-dependent degradation by ubiquitination or gets recycled back to the cell surface through 2) ligand detachment or 3) UBPY de-ubiquitination enzyme.

$\alpha 2\beta 1$ -Integrin clusters on cellular membrane after collagen, lamin, Echovirus1 or antibody attachment and gets endocytosed, depending on the ligand, either by clathrin or caveolae-lipidraft dependent endocytosis. Proteinkinase C (PKC) activation affects both integrin and EGFR endocytosis. $\alpha 2\beta 1$ -Integrin endocytosis is dependant on PKC α activation. Phosphorylation of EGFR threonine 654 by PKC α inhibits receptor ubiquitination and directs it to recycle endosomal route.

Our previous studies show close proximity between the EGFR and $\alpha 2\beta 1$ -Integrin endosomes as they get transported by intracellular pathways but these endosomes vary in pH and have no physical contact. EGFR and Integrin pathways have also been shown to be intertwined together and EV1 Infection through $\alpha 2\beta 1$ -Integrin is shown to affect EGFR-degradation.

The goal of this study was to illustrate how EV1 infection modifies EGFR-regulation. Lyso- and proteosomal degradation in EV1 infected and uninfected A549 pulmonary cancer cells was inhibited by bafilomycinA, calpain or bortezomib. PKC α studies were performed by activating the kinase with phorbol 12-myristate 13-acetate. Treated cells were imaged with confocal microscope by 2D-imaging of fixed samples or 4D-imaging of live samples. Quantitative image analysis was performed with the BioImageXD image software. Growth factor activated cells were also imaged by transmission electron microscope.

Our results show that in our laboratory model EGFR was transported through endosomal structures similar to the transport of EV1- $\alpha 2\beta 1$ -Integrin complex. EV1 was shown to affect EGFR transport with resemblance to PKC α activation: EGFR is directed to recycle endosomal pathway with reduced receptor degradation. Further studies indicated that these results were indeed due to PKC α activation by EV1. The Inhibition of EV1- $\alpha 2\beta 1$ -Integrin complex degradation seemed to result in cytoplasmic EGFR accumulation proving that EV1 retains its effects on EGFR pathway also after the endocytosis. These results are consistent with the previous findings that show interplay between the $\alpha 2\beta 1$ -Integrin and EGFR. It's very likely that down regulation of EGFR degradation is beneficial to EV1: Prolonged intracellular signaling by EGFR that regulates mitogenesis through PI3-Akt and Ras-ERK-signaling cascade results in anti-apoptotic signaling. Regulation of these two pathways enables favorable and better conditions for the EV1's intracellular replication.

Keywords: Endosomal transport, Epidermal growth factor receptor, $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, Echovirus 1, Proteinkinase C

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Lyhenteet | 7 |
| 2 | Johdanto | 8 |
| 2.1 | Endosytoosi | 8 |
| 2.1.1 | Makropinosytoosi | 9 |
| 2.1.2 | Klatriinivälitteinen endosytoosi | 10 |
| 2.1.3 | Kaveoliini- ja lipidilauttavälitteinen endosytoosi | 12 |
| 2.2 | Endosomaalinen kuljetus | 13 |
| 2.3 | $\alpha 2\beta 1$ -integroinireseptori | 14 |
| 2.3.1 | $\alpha 2\beta 1$ -integroinin endosytoosi | 15 |
| 2.4 | Epidermaalisen kasvutekijän reseptori | 17 |
| 2.4.1 | EGFR:n endosytoosi | 17 |
| 2.4.2 | EGFR:n endosomaalinen kuljetus, kierrätys ja hajotus | 18 |
| 2.4.3 | EGFR:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integroinireseptorin väliset vuorovaikutukset | 19 |
| 2.5 | Echovirus 1 | 20 |
| 2.5.1 | EV1:n rakenne | 21 |
| 2.5.2 | EV1:n sisäänotto soluun $\alpha 2\beta 1$ -integroinin avulla | 21 |
| 2.5.3 | EV1:n kuljetusreitti solun sisällä | 22 |
| 3 | Tutkimuksen tarkoitus | 23 |
| 4 | Materiaalit ja menetelmät | 24 |
| 4.1 | Solulinjat, virukset, vasta-aineet ja reagenssit | 24 |
| 4.2 | Virusinfektio ja EGF käsittelyt | 24 |
| 4.3 | Inhibiittori käsittelyt | 25 |
| 4.4 | Immunofluoresenssi ja konfokaalimikroskopia | 25 |
| 4.5 | Elektronimikroskooppinäytteiden valmistus ja transmissioelektronimikroskopia | 26 |
| 4.6 | Mikroskooppidata-analyysi | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 5 Tulokset | 28 |
| 5.1 Inhibitio- ja EV1-käsittelyjen vaikutus EGFR:n hajotukseen..... | 28 |
| 5.1.1 vATPaasi-inhibitio pysäyttää EGFR-hajotuksen..... | 28 |
| 5.1.2 Kalpaiini inhibitio hidastaa EGFR-hajotusta..... | 28 |
| 5.1.3 Proteosomi inhibitio..... | 31 |
| 5.1.4 EV1 infektion vaikutus EGFR:n vaimennussäätelyyn | 31 |
| 5.2 Inhibitioiden ja EV1:n vaikutus EGFR:n N- ja C-terminuksen signaaliin | 35 |
| 5.3 Varhaisten aikapisteiden 3D livekuvaus A549-soluissa | 36 |
| 5.3.1 Inhibitioiden vaikutus aikaisissa aikapisteissä..... | 36 |
| 5.3.2 EV1-infektion ja PMA-käsittelyn vaikutus varhaisissa aikapisteissä..... | 38 |
| 5.4 $\alpha 2\beta 1$ integriinin ja EGFR:n sijainti TEM kuvauksissa | 38 |
| 6 Tulosten tarkastelu | 40 |
| 6.1 EGFR-reitillä integriinireitin kanssa analogisia rakenteita | 40 |
| 6.2 EV1 infektio vaikuttaa EGFR reittiin PKC α :n kaltaisesti | 40 |
| 6.3 EV1- $\alpha 2\beta 1$ -Integriinikompleksi hidastaa EGFR hajotusta | 43 |
| 6.4 EV1 saattaa hyväksikäyttää EGFR reitin signalointia | 44 |
| 7 Lähdeluettelo | 46 |

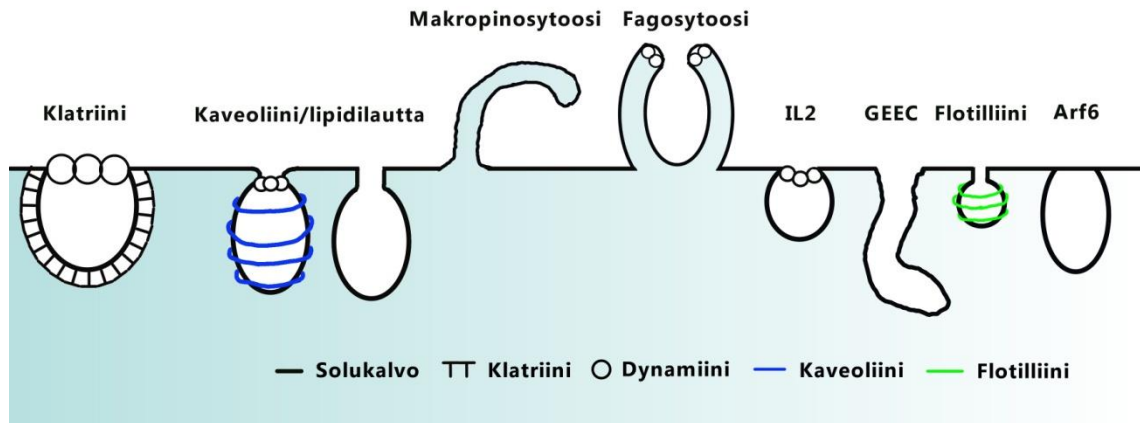
1 Lyhenteet

| | |
|--------------------------------|--|
| Cav1 | Kaveoliini 1 kuoriproteiini |
| CCP | Klatriinipäällysteinen kuoppa |
| CCV | Klatriinipäällysteinen vesikkeli |
| CME | Klatriinivälitteinen endosytoosi |
| -DMEM | Seerumiton Dulbeccos Modified Eagle Medium |
| ECM | Solunulkopuolinen matriisi |
| EE | Varhainen endosomi |
| EGF | Epidermaalinen kasvutekijä |
| EGFR | Epidermaalisenkasvutekijän reseptori |
| ESCRT | Endosomaaliseen kuljetukseen vaadittava järjestelykompleksi |
| EV1 | Echovirus 1 |
| FA | Solun kiinnityspiste |
| ILV | Lumeninsisäinen vesikkeli |
| LE | Myöhäinen endosomi |
| ME | Kypsyvä endosomi |
| MIP | Maksimi-intensiteettiprojektio |
| MVB | Monivesikulaarinen rakenne |
| PKC | Proteiinikinaasi C |
| PKCα | Proteiinikinaasi C α |
| PMA | Phorboli 12-myristaatti 13-asetaatti |
| PI(3)K | Fosfatidyli-inositoli-3-kinaasi |
| RE | Kierrättäväendosomi |
| RTK | Reseptorityrosiinikinaasi |
| TEM | Transmissioelektronimikroskopia |
| TGF-α | Muuttava kasvutekijä- α |
| V-ATPaasi | Vakuolaarisen tyypin H ⁺ -adenosiinitrifosfataasi |

2 Johdanto

2.1 Endosytoosi

Endosytoosilla tarkoitetaan solukalvon uudelleenjärjestäytymistä solun sisäiseksi kalvorakenteiksi. Solukalvo on solun raja-aita ulkomaailmaan, joka antaa suvereniteetin valita solun sisälle otettavat partikkelit. Endosytoosi toimii solun kommunikaatiovälineenä: kalvolla tapahtuvat vuorovaikutukset antavat tietoa solua ympäröivistä olosuhteista. Endosytoottisesti solun sisälle välittyvät signaalireitit mahdollistavat solun mukautumisen sen ympärillä vallitseviin olosuhteisiin ja ulkoisiin ärsykkeisiin. Solukalvoreseptoreiden signalointia voidaan muuttaa, vahvistaa tai vaimentaa siirtämällä ne endosytoottisesti solun sisälle. Ulkoa sisäänpäin suuntautuvan säätelyn lisäksi endosytoosilla voidaan vaikuttaa solukalvon proteiini- ja lipidikoostumukseen solun sisältä lähtevällä säätelyllä. Sisältä ulospäin suuntautuva säätely on avainasemassa solun kalvoproteiinien pintaekspressiolle, solukalvon koon säätelylle ja oikeanlaisen solukalvoviskositeetin ylläpitämiselle (Davletov ja Montecucco, 2010). Endosytoosin tutkimus on paljastanut, kuinka soluille on kehittynyt useita erilaisia tapoja muokata solukalvoaan endosytoottisiksi vesikkeleiksi (kuva 1) ja kuinka vaihtoehtoiset reitit takaavat kalvoliikenteen dynaamisemman ja herkemmän säätelyn. Solukalvo toimii myös solun ihona säätelemällä partikkeleiden sisäänottoa ja suojaa solua ulkopuolisilta patogeeneilta. Useat patogeenit osaavat kuitenkin hyväksikäyttää solulle alun perin hyödyllisiä sekä välttämättömiä endosytoottisia signaalireittejä (Doherty ja McMahon, 2009). Tässä yhteydessä käsittelemme tutkimuksellemme tärkeimpien reittien, eli klatriiniväitteisen, makropinosytoottisen, kaveoliini- ja lipidilauttavälitteisen reitin yksityiskohtiin.



Kuva 1. Kuvassa koottuna yleisimmät eläinsolun endosytoottiset mekanismit. Pinosytoottiset nesteiden, liuenneiden aineiden ja pienten partikkelien endosytoottiset mekanismit ovat dynamiini riippuaiset klatriini- ja kaveoliinivälitteinen endosytoosi, lipidilauttojen kautta tapahtuva endosytoosi, makropinosytoosi ja useat uudet endosytoosimekanismit. Tiettyihin solutyyppeihin rajattu fagosytoosi vastaa suurien partikkelien sisäänotosta. Lisäksi on kuvailtu useita muita tietyille lastimolekyyleille spesifejä sisäänottomekanismejä kuten interleukiini 2:n (IL2), flotiillinin, adenosiinidifosfaatti(ADP)-ribosylaatio tekijä 6:n (Arf6) ja glykosyylifosfatidyylinositoli (GPI) rikkaiden varhaisten endosomilokeroiden (GEEC) kautta tapahtuva endosytoosi. Kuva mukailtu (Mercer ym, 2010) pohjalta.

2.1.1 Makropinosytoosi

Yksinkertaisuutensa ja heikomman selektiivisyytensä takia makropinosytoosia pidetään solujen vanhimpänä endosytoottisena mekanismina. Makropinosytoosi ei riipu reseptorin ja kohdelastin rekrytoimien vaikuttajamolekyyliden tiettyihin solukalvon pisteisiin rekrytoimista endosytoosiin tarvittavista tekijöistä (ks. yleiskatsaus Kirkham ja Parton, 2005). Rakkuloiden kuroutumisen käynnistää esimerkiksi kasvutekijän aikaansaama reseptori-tyrosiini kinaasi (RTK)-aktivaatio, joka johtaa solukalvon poimuttumiseen. Osa poimuista kuroutuu edelleen nestettä sisältäviksi endosytoottisiksi rakkuloiksi solun sisälle muodostaen endosytoottisia vesikkeleitä. Kuroutuvien rakkuloiden keskinäinen koko sekä muoto voivat vaihdella paljon ja myös rakkulan solun ulkopuolisesta tilasta ottaman nesteen koostumus on vaihtelevaa ja epäspesifistä. Onnistunut makropinosytoottisen rakkulan kuroutuminen on usean tekijän yhtälö. Rho-guanosiinitrifosfataasi Rac1 ja F-aktiini aiheuttavat aktiiniristidoksin muodostumista solun kalvopoimujen alueella yhdessä myosiinisupistustekijöiden kanssa säädellen aktiinin polymerisaatio-, stabiilius- ja kierrätystekijöihin (Ridley ym, 1992). Myös Rab5 GTPaasi sekä guaniinukleotidivaihtotekijä RN-tre Rab5 GTPaasi-aktivaatioproteiini-kanssavaikuttaja lokalisoituvat kalvopoimuihin ja aiheuttavat aktiiniristidosten muodostumista (Lanzetti ym, 2004). Kalvopoimujen ja makropinosomin muodostumista edesauttava, Fosfatidyylinositoli-3-kinaasin (PI(3)K) ja RTK:den aktivoima, proteiini

kinaasi C:n (PKC) rooli tapahtumassa on yhdistetty makropinosytoottisen signaalin muuttamiseen ja vahvistamiseen (Ridley ym, 1992). Fosforyloitu C-terminaaliasitova proteiini-1/brefeldinA-ADP ribolysoitusubstraatti leikkaa kuroutuneen makropinosytoottisen rakkulan ainakin epidermaalisen kasvutekijän (EGF) aktivoimissa makropinosomeissa ja sen uskotaan olevan tärkeä leikkuutekijä myös muissa makropinosomeissa (Liberali ym, 2008).

Proteiini- ja lipidipohjaisten tekijöiden lisäksi Na^+ - ja H^+ - Ionienvaihto solukalvolla on tärkeä osa makropinosytoosia. Ioninvaihtoinhibiittori amiloridin ja sen johdannaisen 5[N-ethyl-N.isopropyl]-amiloridin on näytetty estävän makropinosomien muodostumisen, mutta ne eivät ehkäise muita endosytoottisia reittejä (West ym, 1989). Ionivaihdon inhibitiota amiloridilla ja sen johdannaisella sekä vastetta kasvutekijäaktivaatioon on pidetty yhtenä makropinosytoosin tunnusmerkeistä. Kuroutuneen rakkulan sulkeutumista ja leikkautumista solukalvolta määrittävät kinaasit, myosiinit, fuusio- ja jakautumistekijät sekä GTPaasit (ks. yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009).

Kuroutuneiden makropinosytoottisten endosomien kuljetusreittien on todettu vaihtelevan solutyypin mukaan. Esimerkiksi makrofaageissa ja munuaisen soluissa endosomit läpikäyvät happamoitumisen ja päätyvät lysosomaaliseen hajotukseen (West ym, 1989). Ihmisen orvaskeden A431 syöpäsoluissa makropinosomien taas on todettu kierrättyvän suurimmin osin takaisin solukalvolle jossa ne vapauttavat sisältönsä takaisin solunulkopuoliseen tilaan (Hewlett ym, 1994). Kasvutekijästimuloituissa soluissa tapahtuvan makropinosomien kierrätyksen on ehdotettu johtuvan solun tarpeesta uudelleenjärjestellä solukalvoa pintareseptoriaktivaation jälkeen (ks. yleiskatsaus Kerr ja Teasdale, 2009).

2.1.2 Klatriinivälitteinen endosytoosi

Klatriinivälitteisen endosytoosin (CME) tyypillisimpinä tehtävinä on pidetty kalvoreseptoreihin kiinnittyneiden lastien ja kalvoreseptorisignaloinnin välittymisen säätelyä sekä hermosolujen synaptisten vesikkeleiden koon ja koostumuksen säätelystä (ks. yleiskatsaus McMahon ja Boucrot, 2011). Klatriinipäällysteisen kuopan (CCP) ja vesikkelin (CCV) muodostuminen solukalvosta, siitä irtoaminen ja lopulta muuttuminen varhaiseksi endosomiksi voidaan jakaa viiteen peräkkäiseen

vaiheeseen: nukleatio, lastin valinta, klatriiniverkon rakentuminen, vesikkelin irtileikkaus ja klatriiniristikon purku.

Nykytiedon valossa nukleatio käynnistyy nukleatiomodulin muodostumisella solukalvolle mikä samalla määrittää paikan CCP:n muodostumiselle. Nukleatiomoduli koostuu kalvoa muovaavasta FCH-domeeni only-proteiineista (FCHO), epidermaalisen kasvutekijäreseptori(EGFR)reitin substraatti 15:ta (EPS15) ja intersektiineistä (Henne ym, 2010; Reider ym, 2009; Stimpson ym, 2009). FCHO proteiineihin kuuluva F-BAR-domeenin kyky muodostaa tiukkoja kalvokaarteita on ehdoton edellytys CCP:n muodostumiselle (Reider ym, 2009; Henne ym, 2010). Nukleatiokompleksi rekrytoi solukalvolle adaptor proteiini 2:n, joka sitoutuu kalvon fosfatidyyl-inositoli-4,5-bisfosfaattiin sekä kalvoproteiinien solulimahäntiin μ - ja σ -alayksiköillään tai lastimolekyyleihin epäsuorasti erilaisten lisäadaptoriproteiinien välityksellä (Boucrot ym, 2010; Collins ym, 2002; Henne ym, 2010). On myös esitetty, että kaikki CCP:n proteiinit toimivat sekä lastimolekyylien adaptoreina, että kalvon kaartumiseen vaikuttavina tekijöinä. Kaikkien CCP:n proteiinien osallistuminen näihin kahteen tehtävään voisi selittää kuinka solukalvokaareutumisen onnistuu erilaisten lastiadaptorien kiinnittyessä AP2:een (ks. yleiskatsaus McMahon ja Boucrot, 2011).

Solukalvolle muodostuneen kompleksin ympärille alkaa seuraavaksi muodostua klatriiniverkko. Soluliman klatriinitriskeliat polymerisoituvat yhtenäiseksi kuoreksi stabiloiden CCP:n rakennetta. Klatriiniverkko siirtää lastin lisäadaptoriproteiineja ja kalvon kaartumistekijöitä verkon reuna-alueille missä niiden oletetaan toimivan kaikkein tehokkaimmin (Tebar ym, 1996; Saffarian ym, 2009). CCP:n irtileikkaus solukalvosta tapahtuu BAR-domeenin omaavien proteiinien rekrytoiman dynamiinientsyymien toimesta, jota ilman kuroutuminen jää klatriiniverkon rakennusasteelle (ks. yleiskatsaus McMahon ja Boucrot, 2011). CCP:n lopullinen koko ei ole vakio vaan määräytyy CCP:n sisälle otetun lastin koon mukaan (Ehrlich ym, 2004). Aktiinitukirankapolymerisaation on osoitettu olevan osatekijänä joissain CME-tapauksissa ja sen uskotaan vaikuttavan juuri ennen CCP:n irtileikkaamista solukalvosta (Taylor ym, 2011). CCP:n klatriinitukiverkko puretaan triskelioiksi ATPaasi lämpöshokkijohdannais-70:n ja sen kanssavaikuttaja auxiliinin toimesta heti solukalvolta leikkautumisen jälkeen (Schlossman ym, 1984; Ungewickell ym, 1995). Klatriiniverkon poistaminen mahdollistaa kuroutuneen vesikkelin vapaan liikkumisen solulimassa ja fuusioitumisen sen kohde-endosomin kanssa.

CCP:n sekä CCV:n muodostumisesta vastaavien proteiiniyksiköiden koostumuksen muokkaaminen adaptoriproteiineilla mahdollistaa useiden eri proteiinien sisällyttämisen CCV:iin, kuitenkin säilyttäen tarkan kontrollin ja hyvän toistettavuuden lastin valinnassa.

2.1.3 Kaveoliini- ja lipidilauttavälitteinen endosytoosi

Kaveoliini- ja lipidilauttavälitteistä endosytoosia voidaan summata dynamiinista riippuvana lipidilauttojen reittinä, joka endosytoituu kaveoliinin tai sen vastineen kaltaisten proteiinien avulla. Yksi kuvaus solukalvon lipidilautoille on heterogeeninen, 10-200 nm kokoinen, erittäin dynaaminen steroli- ja sfingolipidirikas domeeni, joka jakaa solun prosesseja osiin. Pienemmät lautat voivat stabilisoida muodostaessaan suurempia alustoja proteiinien välisten vuorovaikutusten kautta (Pike, 2006). Nopean dynamiikan sekä liuotinherkkyyden takia lipidilauttatutkimus on vaikeaa ja niiden kuvantamisvaikeudet ovat johtaneet myös koko domeenien olemassaolon kyseenalaistamiseen (Munro, 2003). Kaveolat ovat lipidilauttojen yhteyteen syntyviä kolesteroli- ja sfingolipidirikkaita kuoppia joita lihaksistoon kuulumattomissa soluissa stabiloi kaveoliini 1 (Cav1) sekä kaveoliini 2-kuoriproteiinit ja myös kaveoliini 3-proteiini poikkijuovaisessa sekä osin sileässä lihaksistossa (Tang ym, 1996). Solukalvolta kuroutuneen kaveolan kohtalona on kolme vaihtoehtoa. Rakenteeltaan stabiili kaveola voi fuusioitua Ras-sukulaisproteiini Rab5:stä riippumattomalla tavalla kaveosomeihin, Rab5:stä riippuvaisesti aikaisiin endosomeihin tai kierrättyä takaisin solukalvolle missä kuorirakenteet hyödynnetään uusiokäyttöön (Pelkmans ym, 2004). Uusimpien havaintojen mukaan kaveoliineja löytyy myös aikaisten endosomien (EE) jälkeisistä rakenteista, mikä on asettanut kyseenalaiseksi muista vesikkelityypeistä itsenäisen kaveoliini-käsitteen (Karjalainen ym, 2011).

Lauttavälitteiselle endosytoosille on määritetty useita eri tekijöitä jotka ovat sille välttämättömiä tai säätelevät sen toimintaa. Dynamiini on osallisena kaveolin kuroutumisessa solukalvolta: Rakkulat eivät irtoa solukalvosta ilman dynamiinia ja Dyn2 proteiinin on havaittu olevan suorassa kontaktissa Cav1:n kanssa (Yao ym, 2005). Proteiinikinaasi C α :n (PKC α) sekä proto-onkogeneeni tyrosiini-proteiinikinaasi Src:n on osoitettu inhibiittori ja mutaatiotutkimusten kautta olevan korvaamattomassa roolissa indusoidun lauttavälitteisen endosytoosin onnistumiselle solukalvolta (Sharma ym, 2004). Ehdoton vaatimus lauttavälitteiselle endosytoosille on myös solukalvon

tuntumassa oleva ehjä aktiinitukiranka ja tukirangan on havaittu läpikäyvän uudelleen järjestäytymistä muodostumassa olevien vesikkeleiden ympärillä (Parton ym, 1994; Pelkmans ym, 2002).

Lauttavälitteisen endosytoosin on osoitettu olevan osallisena useiden erilaisten solukalvon signaalireseptoreiden, kuten EGF-, Insuliini- ja Hedgehodgereseptorien endosytoosissa sekä myös osallisena ionikanava- ja Ca^{2+} -signaloinnissa (ks. yleiskatsaus Wang ym, 2005; Krajewska ja Maslowska, 2004; Cheng ja Jaggar, 2006). Lauttavälitteisten vesikkelien runsas ilmentyminen rasvasoluissa, Cav1:n vuorovaikutukset kolesterolin, rasvahappojen ja vuorovaikutukset lipidipisaroiden kanssa sekä Cav1:n tärkeä rooli maksan regeneraatiossa ovat vahvoja todisteita kuljetuksen osallistumisesta solujen lipidisäätelyyn (ks. yleiskatsaus Parton ja Simons, 2007).

2.2 Endosomaalinen kuljetus

Endosomaalinen kuljetus vastaa nimensä mukaisesti solun sisälle endosytoitujen vesikkeleiden kuljettamisesta solulimassa. Endosomaalisen järjestelmän tehtävät ja mahdollisuudet eivät kuitenkaan rajoitu pelkkään vesikkelien liikkuttamiseen. Endosytoosi vastaa myös molekyylien solun sisäisestä järjestelystä, kierrättämisestä, hajottamisesta, prosessoinnista ja transsytoosista (ks. yleiskatsaus Mercer ym, 2010). Endosomien kuljetus solun sisällä tapahtuu sentrosomista haarautuvaa mikrotubulusverkostoa ja solukalvon tuntumassa olevaa aktiinirankaa pitkin kinesiini-, dyneiini- ja myosiinimoottoriproteiinien luoman liikkeen avulla (ks. yleiskatsaus Vale, 2003). Endosomaalinen järjestelmä on hyvin dynaaminen kokonaisuus jossa eri vesikkelit fuusioituvat ja kuroutuvat toistuvasti. Vesikkelifuusion on osoitettu olevan riippuvaista vesikkeli- ja kohde-SNARE-proteiinien toiminnasta lipidikalvolla: SNARE-kompleksi kuroo vesikkelikalvot yhteen ja fuusioi ne toisiinsa (Weber ym, 1998).

Endosomaalisen järjestelmän vesikkelit voidaan luokitella useampaan eri luokkaan, mutta järjestelmä on paikoin liukuva eikä täysin absoluuttinen. Rab-proteiinit säätelevät solun sisäistä kuljetusta rekrytoimalla useita erilaisia guanosiinitrifosfaattisidonnaiseen Rab-proteiinimuotoon sitoutuvia vaikuttajamolekyylejä (ks. yleiskatsaus Stenmark ja Olkkonen, 2001). Rabit lokalisoituvat eniten vesikkeleiden tubulaarisille alueille, joilta tapahtuu aktiivisin molekyylien sisäänotto ja poisto endosomeista.

Endosomaalisten vesikkelien Rab-proteiinikoostumus mahdollistaa niiden luokittelun kuvassa 1 näkyviin ryhmiin: EE:t, kypsyvät-, kierrättävät- ja myöhäiset endosomit (ME, RE ja LE). Toinen endosomaalisten vesikkelien erotteluun käytettävä mittari on niiden sisäinen pH. Osalla endosomeista vesikkelin sisäinen pH laskee sen liikkua kohti lysosomeja ja tumaa. Tästä pH-muutoksesta vastaa endosomikalvolla oleva vakuolaarisen tyyppin H⁺-adenosiinitrifosfaasi (V-ATPaasi) ja kloridikanavat jotka alentavat vesikkeli-pH:n muuttamalla sen sisäistä ionitasapainoa (Jentsch, 2008; Lafourcade ym, 2008). Endosomien lisäksi lysosomit, solulimakalvosto ja Golgin laite ovat tärkeässä osassa endosomaalista verkostossa.

EE:t ovat ensimmäinen solukalvolta kuroutuvien vesikkelien yhtymäkohta jossa pienemmät vesikkelit fuusioituvat isommiksi kokonaisuuksiksi. EE:sta molekyylijä lähetetään RE:hin jotka fuusioituvat takaisin solukalvoon, myöhäisiin LE:hin tai Golgin laitteeseen. Molekyylien kuljetus LE:hin tapahtuu RE:den kautta. RE:T ovat EE:n ja LE:n välimuoto joista voidaan löytää sekä EE:lle että LE:lle ominaisia endosomaalisiamarkkereita. Maturaation yhteydessä endosomeihin syntyy EE ja ME vaiheissa lumenin sisäisiä vesikkeleitä (ILV) endosomaaliseen kuljetukseen vaadittavan järjestelykompleksin (ESCRT) toimesta: ESCRT-koneiston ESCRT-I- ja ESCRT-II-proteiinit muodostavat endosomin sisäisen kalvosilmun, joka leikataan ESCRT-III-proteiinin Vps20, Snf7 ja Vps24 alayksiköiden toimesta (Wollert ym, 2009; Wollert ja Hurley, 2010). ILV:hin ESCRT:n toimesta siirrettävät molekyylit eivät enää kierräty solukalvolle vaan päätyvät lysosomaaliseen hajotukseen kun monivesikulaariset rakenteet (MVB) fuusioituvat lysosomien kanssa muodostaen endolysosomeja (ks. yleiskatsaus Luzio ym, 2009).

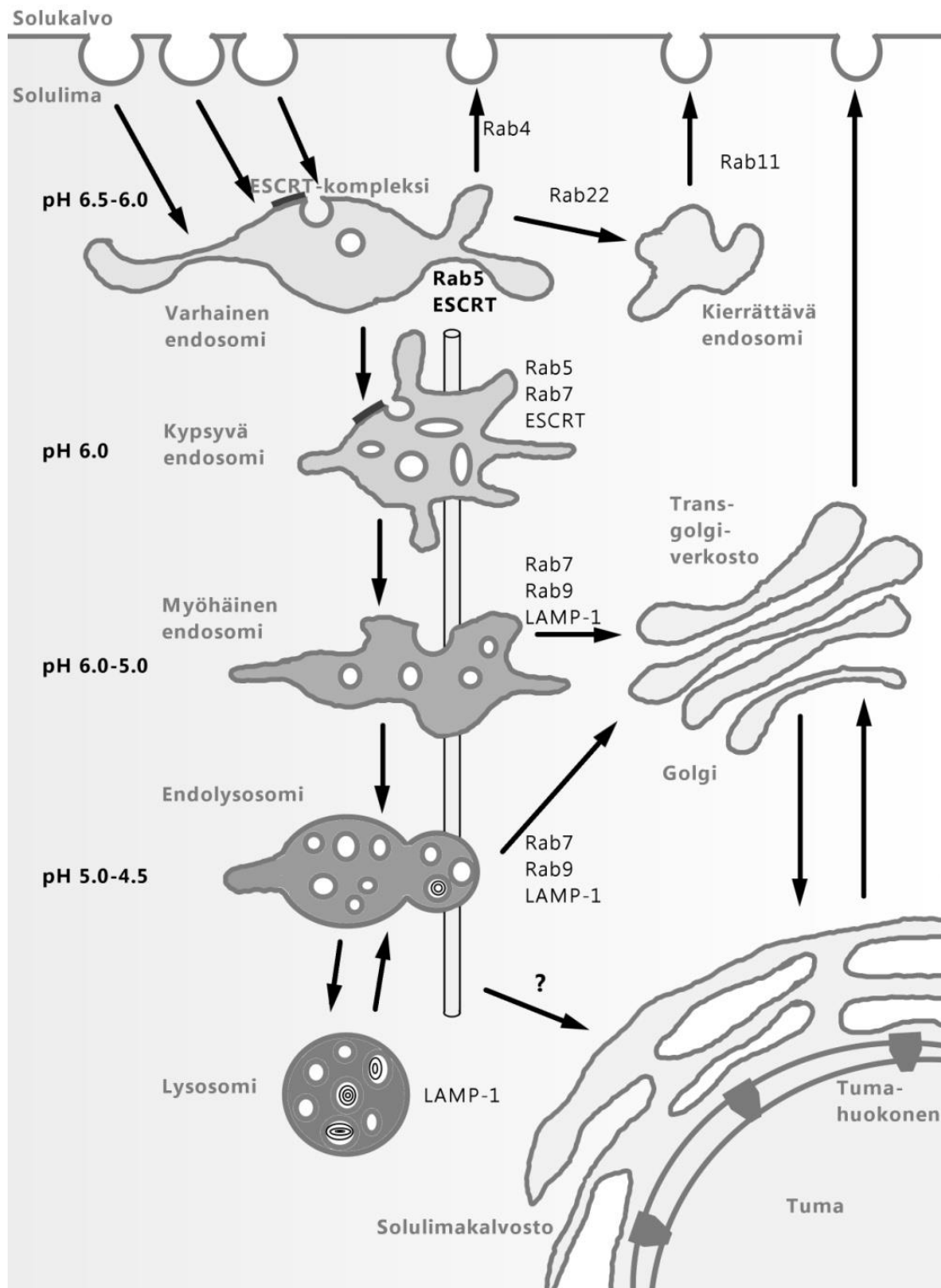
2.3 $\alpha 2\beta 1$ -integriinireseptori

$\alpha 2\beta 1$ -integriiniheterodimeeri on solukalvoreseptori, joka kuuluu integriiniproteiinien heimoon. Integriinien heimo koostuu 8 β - ja 16 α -integriinialayksikön muodostamista kovalenttisesti kytketystä heterodimeereistä. Tärkeimpinä tehtävinä integriineilla on kiinnittyminen solun ulkopuoliseen matriisiin (CME) kasvualustoihin kuten laminiiniin, kollageeniin, fibro- sekä vitronektiiniin, solujen väliset kiinnittymiset ja solun sisäisten signaalireittien aktivoiminen jotka johtavat vasteisiin kuten solun lisääntyminen, apoptoosi, muodon muutos, liikkuminen, geeniekspressio ja erilaistuminen (ks. yleiskatsaus Hynes, 2002). Integriinireseptoreita tavataan solukalvolla taipuneessa sekä

suoristuneessa konformaatioissa ja näiden konformaatioiden välillä on affiniteettiero reseptorin ligandiin. Tällaista affiniteettieroä hyödynnetään esimerkiksi verihutaleissa joiden oikealle toiminnalle on tärkeää, että kaikki solun integriinireseptorit eivät ole koko ajan aktivoituneessa tilassa. Jos kaikki verisuonen seinämien integriinireseptorit olisivat aktiivisina, verihutaleet muodostaisivat tukkeumia muuten terveille alueille. Nykymallin mukaan integriinireseptorin aktivaatio etenee kun taipunut integriini suoristuu β -alaysikön solulimahännän tarttuessa solun sisäiseen aktiiniin talinin ja kindliinin kautta, mikä johtaa suurempaan sitoutumisaffiniteettiin paikallaan olevaan solun ECM:n ligandiin kuin liukoiseen ligandiin (Schurpf ja Springer, 2011). $\alpha 2\beta 1$ -integriinin tärkeimpiä ligandeja ovat kollageeni sekä lamiini ja valinta näiden ligandien välillä uskotaan riippuvan siitä solutyypistä jossa $\alpha 2\beta 1$:tä ekspressoidaan (Elices ja Hemler, 1989). Aktiinitukirankaan integriinien sekä kiinnityspistekinaasin kautta muodostuvissa solun kiinnityspisteissä (FA) aktiinin ja integriini väliin jää noin 40 nm kokoinen ydinalue, joka koostuu kiinnitysproteiinien kerrostumista (Kanchanawong ym, 2010).

2.3.1 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosi

Integriinireseptorit läpikäyvät useiden eri solutyypin solukalvolla kierrätystä. Kierrätyksessä reseptorit endosytoidaan solun sisälle ja palautetaan välittömästi takaisin RE:n toimesta. Tällainen kierrätys on erityisen tärkeää solun FA:den säätelylle. Kierrätyksen säätelyn monimuotoisuutta lisää integriinien erilaiset endosytoottiset reitit eri olosuhteissa ja solutyypeissä (Ivaska ja Heino, 2011). Kollageeniä sitovan $\alpha 2\beta 1$ -integriinin on osoitettu endosytoituvan sekä klatriini- että Rab21 -riippuvaisella tavalla. (Pellinen ym, 2006; Pellinen ym, 2008). Kollageenin lisäksi $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosia on kuvattu tapauksissa joissa se sitoo Echovirus 1:tä (EV1) tai se klusteroidaan vasta-aineilla, mutta näissä tapauksissa sisäänotto tapahtuu klatriinista riippumattomilla mekanismeilla. Kaikilla mainituilla ligandeilla kiinnittyminen $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin aiheuttaa reseptorien lateraalisen liikkeen solukalvolla, joka klusteroi aktivoituneita $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä yhteen (Upla ym, 2004; Marjomaki ym, 2002; Giancotti ja Ruoslahti, 1999). EV1:n tarttuessa $\alpha 2\beta 1$ -integriinireseptoriin, EV1- $\alpha 2\beta 1$ -kompleksi internalisoituu PKC α -riippuvaisesti pH-neutraaleihin $\alpha 2$ -MVB:tä muodostaviin rakenteisiin, joihin kertyy myös Cav-1 proteiineja (Karjalainen ym, 2011; Karjalainen ym, 2008; Upla ym, 2004; Marjomaki ym, 2002).



Kuva 2. Endosomaalisen kuljetuksen kartta, joka näyttää kuljetukseen liittyvät rakenteet: varhaiset endosomit (EE), kierrättävät endosomit (RE), kypsyvät endosomit (RE), myöhäiset endosomit (LE), endolysosomit, lysosomit, solulimakalvoston ja Golgin laitteen. Kunkin rakenteen vierellä on niihin yhdistetyt proteiinimarkkerit ja vasemmassa reunassa rakenteiden sisäinen pH. Kuvassa on merkittynä myös kuljetukseen vaadittu endosomaalinen järjestelykompleksi (ESCRT) EE ja ME rakenteisiin. Mukailtu (ks. yleiskatsaus Mercer ym, 2010) pohjalta.

2.4 Epidermaalisen kasvutekijän reseptori

EGFR on nelihenkiseen ErbB kasvutekijäreseptoriperheeseen kuuluva RTK, jonka tärkeimpiä säätelykohteita ovat solun kasvu, kehitys ja erilaistuminen (ks. yleiskatsaus Roepstorff ym, 2008). Muita ErbB-perheen jäseniä ovat ErbB2, ErbB3 ja ErbB4 reseptorit. EGFR on yleisesti käytetty RTK-malli ja tutkituimpia solun reseptoreita muun muassa siksi, että se on tärkeä tekijä monissa syöpäkasvaimissa. EGFR:ia ilmenetään enemmän epidermaalisen syövän A431 solulinjoilla ja 30 %:lla kiinteistä kasvaimista on todettu EGFR toimintaa lisääviä mutaatioita jotka johtavat fokaaligeeni amplifikaatioon, geenikopiolukumäärän kasvuun ja proteiinitasojen nousuun geneettisen amplifikaation puuttuessa (ks. yleiskatsaus Wykosky ym, 2011). EGFR on solukalvon läpäisevä reseptori, jonka solun ulkopuolisessa N-terminaaliosassa on sitoutumispaikka ligandille ja haara reseptoridimerisaatiota varten. Solunsisäinen tyrosiinikinaasidomeeni ja useita fosforylaatiopaikkoja sisältävä C-terminaali liittyvät ECM-puoliseen osaan solukalvon läpäisevällä osiolla (ks. yleiskatsaus Normanno ym, 2005). Solukalvolla EGFR sijaitsee muiden RTK:den tavoin lipidilautoilla. Kaikkiaan EGFR:lla on kuusi raportoitua fysiologista ligandia joita sen tiedetään sitovan: EGF, muuttava kasvutekijä- α (TGF- α), Hepariniin sitova EGF, β -selluliini polysakkaridi, Amphireguliini, Epireguliini ja Epigeeni (ks. yleiskatsaus Roepstorff ym, 2008).

2.4.1 EGFR:n endosytoosi

Tasaisesti kasvavilla soluilla solun EGFR-pooli on sijoittunut pääosin ulkokalvoille, josta sitä kierrätetään solun sisälle nopeudella, joka on verrannollista tyvisolukalvon kierrätyksen nopeuteen (ks. yleiskatsaus Sorokin ja Goh, 2008). Ligandin sitoutuminen EGFR:n solun ulkopuoliseen ligandiasitovaan domeeniin johtaa reseptorin N-terminaalien konformaatiomuutoksiin jotka paljastavat reseptorin dimerisaatiohaaran ja mahdollistavat EGFR:ien dimerisaation (Ferguson ym, 2003). EGFR-aktivaation on osoitettu olevan riippuvaista solukalvon kolesteroliin poistumisesta reseptorin ympäriltä ja reseptoria ympäröivien lipidien koostumuksella uskotaan olevan vaikutusta ligandiin sitoutumattomien reseptorien dimerisaation estymiseen (Coskun ym, 2011).

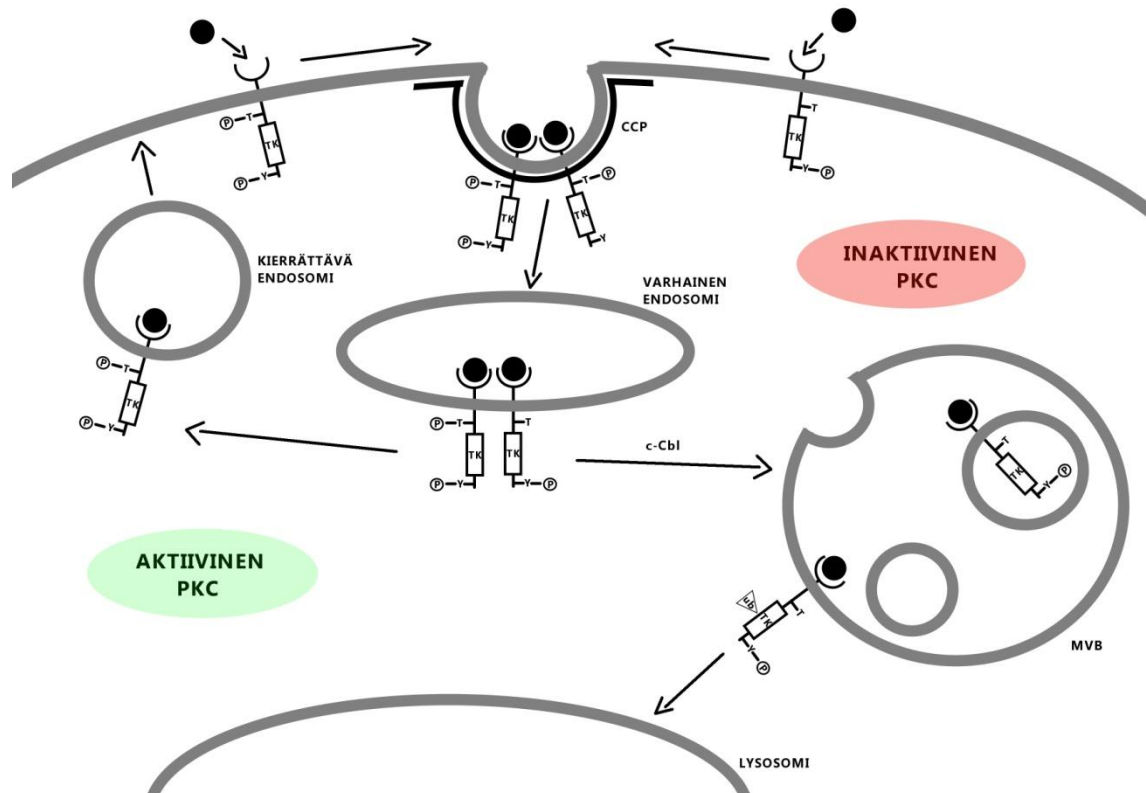
EGFR-sisäänotto tapahtuu pääosin CME:n kautta, mutta reseptorien on havaittu internalisoituvan myös klatriinista riippumattomilla tavoilla. Lauttavälitteisen

endosytoosin osuudesta EGFR:n endosytoosissa suurilla EGF-ligandipitoisuuksilla on ristiriitaisia tuloksia: osassa kokeista suuret EGF-pitoisuudet indusoivat kaveoliinivälitteistä EGFR endosytoosia (Sigismund ym, 2008) ja toisissa on kyseenalaistettu koko EGFR:n lauttavälitteinen endosytoosi (Kazazic ym, 2006). Fosforyloidun EGFR:n on osoitettu vaikuttavan AP2:n kanssa CCP:n muodostumiseen, mutta AP2:ta ei vaadita jotta EGFR-dimeeri siirtyisi CCP:hin (Johannessen ym, 2006). EGFR:n endosytoosi solun sisälle CCP:stä on laajemminkin todettu riippuvaiseksi reseptorin C-terminaalien tyrosiinien fosforyloinnista: mutaatiot fosforylaatiopaikoilla vähentävät endosytoosia. Vaikka ubikitinaatiolla c-Cbl toimesta on merkitystä reseptorin myöhemmälle kuljetukselle, sillä ei kuitenkaan uskota olevan vaikutusta itse endosytoosiin (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008).

2.4.2 EGFR:n endosomaalinen kuljetus, kierrätys ja hajotus

EGFR:n kohtalo sen sisäänoton jälkeen voi johtaa joko takaisin solukalvolle kierrättävälle reitille tai lysosomaaliseen hajotukseen (Kuva 3). Sääteily ja valinta näiden kahden reitin välillä ovat moniosainen reaktiosarja. Solun sisään otetut CCV:t menettävät nopeasti klatrinikuorensa ja kahdesta viiteen minuuttia sisäänoton jälkeen fuusioituvat EE:hin. EGFR-aktivaatio aktivoi E3-ubikitiiniproteiiniligaasi c-Cbl:n, jonka liittämä ubikitiini ohjaa EGFR:n lysosomaaliseen hajotukseen (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2008). Aktivoituneen EGFR:n lysosomaalinen hajotus ei kuitenkaan ole automaatio. EGFR:n throniini 654:n fosforylaatio PKC:n toimesta estää sen ubikitinaation ja ohjaa reseptorin kierrättävälle endosomaaliselle reitille (Bao ym, 2000). Myös EGFR:n de-ubikitinaatio de-ubikitinaatioentsyymi UBPY:n toimesta johtaa reseptorin kierrätykseen lysosomaalisen hajotuksen sijaan (Alwan ja van Leeuwen, 2007; Mizuno ym, 2005). Ubikitiinilla merkityt EGFR:t tunnistetaan ESCRT-kompleksin toimesta MVB:den uloimmalla kalvolla. Hrs ja signaalinvälitysadapterimolekyylit (STAM) muodostavat ESCRT-0-kompleksin, joka sitoo EGFR:n liitettyt ubikitiinit ja kiinnittää reseptorin MVB:n ulkokalvolle. ESCRT-0:lta EGFR rekrytoituu ESCRT-I-, -II- ja -III-komplekseille jotka ohjaavat sen MVB:n ILV:hin (ks. yleiskatsaus Roepstorff ym, 2008). siRNA kokeiden mukaan ESCRT-I on tärkein EGFR:n kierrättävältä reitiltä poissitova tekijä, kun taas ESCRT-II ja -III vaikuttavat vain reseptorin hajotuksen tehokkuuteen (Bache ym, 2006). ILV:hin ohjatut EGFR:t kulkeutuvat maturoituvan MVB:n mukana lysosomeihin ja hajoavat niiden

sisällä.(Rintanen ym, 2011; Rintanen, Karjalainen et al. 2011; Rintanen, Karjalainen et al. 2011)



Kuva 3. EGFR:n endosomaalinen kuljetus. Ligandin sitoutuessa EGFR:n sisäänotto tapahtuu CME:n kautta. Sisäänotettu reseptori ohjautuu joko ubikitiinileimattuna hajottavaan lysosomaaliseen kuljetukseen tai taikaisin solukalvolle kierrättävän endosomaalisen reitin kautta. Threoniini 654:n fosforylaatio aktivoituneen PKC:n kautta ja ubikitiinileimoja poistava de-ubikitinaatioentsyymi UBPY (ei kuvassa) edesauttavat kierrättävää kuljetusta. ESCRT-kompleksi siirtää ubikitinoidun EGFR:n MVB:n ILV:hin ja ohjaa reseptorin lysosomaaliseen hajotukseen. Kuva mukailtu (Bao ym, 2000) pohjalta.

2.4.3 EGFR:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integroinireseptorin väliset vuorovaikutukset

Yleisenä konseptina integriinien ja kasvutekijäreseptorien väliset vuorovaikutukset eivät vaikuta mahdollomalta ajatukselta, kun molempien tiedetään olevan aktiivisia tekijöitä syöpäsoluissa ja lisäksi säätelevän hyvin pitkälle samoja signaalireittejä. Nykyään tunnetaan useita tapauksia joissa integriinit sitoutuvat suoraan kasvutekijäreseptoreihin, aktivoivat kasvutekijäreseptoreita tai kontrolloivat endoteelisolun liikkumista ja verisuonien muodostumista kasvutekijäreseptorien kautta (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2011). Esimerkkinä tällaisesta vuorovaikutuksesta voidaan pitää tiettyjen integriinien kykyä aktivoida kasvutekijäreseptorin tavoin Shc-adaptoriproteiini-Ras-Mitogeneeniaktivoitua proteiinikinaasisarjaa (Wary ym, 1996).

Solukalvolle kasaantuneiden integriinien tiedetään myös pystyvän kasamaan yhteen solukalvon kasvutekijäreseptoreita ja aktivoimaan niitä joko suoraan fyysisellä

vuorovaikutuksella tai epäsuorasti sitoutumalla kasvutekijäreseptoreihin niiden ligandiriippuvaisen aktivaation jälkeen (Yamada ja Even-Ram, 2002). Esimerkiksi integriinien liittymisen CME-proteiineihin on todettu johtavan EGFR:ien ligandista riippumattomaan aktivaatioon. Integriinin aktivoiman EGFR:n tyrosiinifosfovastaanottajakohdat fosforyloituvat, mikä johtaa solun ulkopuolisten signaalisäädelyjen kinaasien ja Proteiinikinaasi-B:n kohteiden aktivaatioon Shc-adaptoriproteiinin, fosfolipaasi-C γ :n, p85:n PI-3K-alayksikön ja Cbl:n rekrytoinnin toimesta (Bill ym, 2004). Aktivaation lisäksi integriinit voivat myös hiljentää kasvutekijäreseptorien toimintaa: kollageeniin liittynyt α 1 β 1-integriinin β 1-alayksikkö kykenee välillisesti defosforyloimaan EGFR:ia ja heikentämään sen signalointia (Mattila ym, 2005).

Integriinien ja EGFR:ien välinen vuorovaikutus ei ole vain yksisuuntaista. EGFR:n aktivaatio voi johtaa solun muodonmuutokseen, missä α 2 β 1-integriinin α 2-alayksikön on todettu olevan korvaamattomassa osassa (Leabu ym, 2005; Yamanaka ym, 2003; Yamanaka, Koizumi et al. 2003) Adenokarsinoomasolulinjoilla EGF-aktivaation on osoitettu lisäävän α 2 β 1-integriinin solupinta ekspressiota, joka puolestaan kasvattaa solun liikkuvuutta ja vaikuttaa solun vuorovaikutuksiin ECM:n kanssa (Yamanaka ym, 2003). Solun pinnalla tapahtuvan α 2 β 1-ekspressiokasvun lisäksi EGF-aktivaation on huomattu hetkellisesti ohjaavan α 2-integriinejä kaveoliini/lipidilauttariippuvaiselle endosytoosireitille (Ning ym, 2007). Rintasyöpäsoluissa EGFR:n tai β 1-integriinin poistaminen on johtanut myös toisen reseptorin katoamiseen, osoittaen näiden kahden reseptorin olevan vahvasti kytköksissä toisiinsa (Reginato ym, 2003; Wang ym, 1998).

2.5 Echovirus 1

Virukset ovat minimalistisesta suunnittelustaan sekä rakenteestaan huolimatta äärimmäisen taitavia monimutkaisen solukoneiston manipuloijia. Virustutkimuksen kautta voidaan ehkäistä useita vaarallisia virustauteja ja viruksia hyödyntämällä on mahdollista löytää uusia hoitokeinoja myös viruksista riippumattomien sairauksien hoitamiseen. Virukset toimivat tutkimuksen perustyökaluina joiden avulla voidaan selvittää myös solujen toiminnan ja säätelyn perusteita. Ihmisen EV1 on *Enterovirus*-suvun suurimman alaryhmän echovirusten edustaja ja kuuluu *Picornaviridae*-heimoon (Auvinen ja Hyypia, 1990).

2.5.1 EV1:n rakenne

Vaipattoman EV1:n yksijuosteinen (+)RNA-genomi on pakkautunut noin 30 nm halkaisijan ikosahdraalisesti symmetriseen kapsidiin. Kapsidi koostuu VP1-, VP2-, VP3-kapsidiproteiinista ja pienestä VP4-proteiiniyksiköstä, joka sijoittuu proteiinikuoren sisäpuolelle. Kaikki neljä rakenneproteiinia muodostavat yhdessä proteomeerisen yksikön, joka toistuu yhteensä 60 kertaa viruskapsidissa (Filman ym, 1998). Viruksen rakenne kestää hyvin happaman pH:n ympäristöjä, mikä mahdollistaa sen infektion ruuansulatusjärjestelmän kautta. Ihmisen patogeeninä EV1:n tiedetään aiheuttavan ihottumaa, tulehduksia keuhkojen ilmatiehyissä, aivokalvossa, luusto- ja sydänlihaksistossa (Grist ym, 1978)

2.5.2 EV1:n sisäänotto soluun $\alpha 2\beta 1$ -integriinin avulla

Virukselle endosytoottisten mekanismit ovat vapaalippu solun sisälle ilman että sen invaasiosta jäisi solukalvolle merkkejä elimistön puolustukselle. EV1 käyttää endosytoosissa hyväkseen $\alpha 2\beta 1$ -integriinireseptoria (Bergelson ym, 1992). *Picornaviridae*-heimon integriiniä hyödyntävät virukset sitoutuvat α_v -integriinin MIDAS alueelle, mutta EV1:n on osoitettu sitoutuvan $\alpha 2$ -integriinin I-domeeniin alueelle, jota luontainen ligandi kollageeni ei sitoutuessaan käytä (King ym, 1997). Toisin kuin kollageeni, viruksen on todettu suosivan inaktiivista integriinikonformaatiota jossa reseptori on taipuneena kaksinkerroin. Tosin viruksen sitoutumista integriinireseptorin aktiiviseen konformaatioon pidetään myös mahdollisena (Jokinen ym, 2010). Virus-reseptorikompleksin sisäänotto solukalvolta tapahtuu klatriinista ja kaveoliinista riippumattomalla tavalla (Karjalainen ym, 2008). Sisäänotto on riippuvaista aktiinitukirangan hetkellisestä depolymerisaatiosta solukalvon läheisyydessä. PI-PLC:n, PI3K:n, sekä PKC:n inhibiittorit ehkäisevät viruksen endosytoosin, minkä lisäksi endosytoosia voi säädellä Rak1:n ja Pak1:n avulla sekä inhiboida EIPA:lla.

2.5.3 EV1:n kuljetusreitti solun sisällä

Virusinfektio vaikuttaa solunsisäiseen kuljetukseen kaksivaiheisesti. Infektion alussa soluun tunkeutuva virus hyödyntää solun kuljetusmekanismeja omaksi hyödykseen. Infektion loppupuolta kohti mentäessä virus hyväksikäyttää solun kuljetuskoneistoa kasatakseen uusia viruspartikkeleita. Sisäännotetut virusta sisältävät rakkulat kypsyvät solun sisällä edetessään α 2-MVB:ksi jotka sisältävät Hrs, TSG101-, VPS37A- ja VPS24-ESCRT-proteiineja. α 2-MVB-rakenteisiin kertyy myös Cav1-proteiinia, mutta sen uskotaan siirtyvän α 2-MVB:iin muiden kuin EV1-rakkkuloiden mukana. EV1-infektio on myös mahdollista estää TSG101:n, VPS37A:n sekä VPS24:n sammutuksella si-RNA käsittelyn kautta. (Karjalainen ym, 2011). EV1:n hyväksikäyttämä endosytoottinen kuljetusreitti voi alun perin olla kehittynyt liukoisen kollageenin endosytoosia varten α 2 β 1-integriinin toimesta (Rintanen ym, 2011).

Sytoplasmassa EV1 vapauttaa genominsa solulimaan ja genomien ohjaama virusreplikaatio alkaa solulimakalvostolla. EV1:tä sisältävät α 2-MVB:t näyttävät läpikäyvän tehokkaampaa α 2 β 1-integriinikompleksin hajotusta ja niiden pH on korkeampi kuin vasta-aineklusteroiduilla α 2-MVB:illä. Alustavien tulosten mukaan EV1 näyttäisi myös lisäävän MVB:den läpäisevyyttä tekemällä niistä huokoisempia: tämä johtaisi suurempaan Ca^{2+} konsentraatioon vesikkelien sisällä sekä tehostettuun kalpaiiniaktivaatioon ja viruksen mahdollisuuden tunkeutua solulimaan (Rintanen ym, 2011).

3 Tutkimuksen tarkoitus

Koska integriinit ja EGFR ovat tärkeitä tekijöitä syöpämetastaasien muodostumisessa, on äärimmäisen tärkeää saada tarkempaa tietoa näiden kahden reseptorin yhteisvaikutuksista solujen toimintaan. Tämän pro-gradu tutkimuksen tarkoituksena oli laajemmin selvittää mitkä tekijä vaikuttavat EV1-klusteroidun $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EGFR:n välisiin vuorovaikutuksiin. Aikaisemmissa Akatemiantutkija Varpu Marjomäen ryhmän tekemissä tutkimuksissa $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EGFR:n välillä on voitu havaita selviä kytköksiä, mutta näiden reseptorien endosytoottisten vesikkelien on samalla voitu nähdä olevan fyysisesti erillään (Rintanen ym, 2011). Halusimme selvittää tarkemmin kuinka $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin tarttuva EV1 vaikuttaa EGFR-reittiin. Häiritsemällä solun PKC α -fosforylaatiostatusta, lysosomaalista tai proteosomaalista hajoitusta pyrimme saamaan tarkempaa tietoa siitä, mitkä tekijät vaikuttavat EGFR:n hajoitukseen EV1-infektoiduissa A549-keuhkosyöpäsoluissa.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Solulinjat, virukset, vasta-aineet ja reagenssit

Solukokeissa käytettiin keuhkosyöpäsolulinja A549:ää (ATCC). EV1 (Farouk lajike, ATCC) oli puhdistettu aikaisempien protokollien mukaan (Marjomaki ym, 2002). Primaarisina vasta-aineina käytettiin kanin vasta-ainetta EV1:tä vastaan (Marjomaki ym, 2002), EGFR N-terminuksen vasta-aineita hiirestä (Thermo Scientific), EGFR C-terminuksen vasta-aineita kanista (Santa Cruz Biotechnology), Lamp1 vasta-ainetta hiirestä (Santa Cruz Biotechnology), EEA1 vasta-ainetta hiirestä (Becton Dickinson), Biotinyloitua a211E10 $\alpha 2\beta 1$ -vasta-ainetta (a211E10 Fedor Berditchevskin laboratorioista, biotinylointi omassa laboratoriossamme) ja hiiren seerumia. Sekundaarivasta-aineina käytimme kanin hiirivasta-ainetta (Sigma-Aldrich), vuohen hiiri- tai kanivasta-ainetta konjugoituna Alexa488:n tai Alexa555:n kanssa (Invitrogen), Ritzo 10 nm streptavidiniä (Oma laboratorio), 5 nm PA-kulta (CMC-Utrecht). Elektronimikroskooppinäytteiden valmistuksessa käytettiin eponia, uranyyliasettaattia sekä osmiumtetroksidia (Electron Microscopy Science). Kiinnitettyjen näytteiden petaamiseen käytettiin DAPI:a (Invitrogen) tai Mowiol 1,4-diazabisyklo[2,2,2]oktaani-petausaineella. Solukäsittelyihin käytettiin Calpeptiinia ja bafilomysiiniA:ta (Kalbiochem), Bortezomibia (LC laboratoriot), phoboli 12-myristaatti 13-asettaattia (PMA) (Sigma Aldrich) ja EGF:ää (Invitrogen).

4.2 Virusinfektio ja EGF käsittelyt

A549-soluja kasvatettiin peitinlaseilla noin 60 % lasista peittäviksi. Soluja näännytettiin kaksi tuntia seerumittomalla Dulbecco's Modified Eagle Medium (-DMEM) käsittelyllä +37 C° 5 % CO₂ ja virus sitoutettiin soluille -DMEM:ssä 45 min ajan jäällä. Live-kokeita varten EV1 sidonta integriinireseptoriin suoritettiin jäällä. Live kokeiden leimauksissa käytettiin hiiren EGFR-vasta-ainetta (10 ug/ml) ja kanin Alexa 488 konjugoitua hiirivasta-ainetta (6,7 ug/ml). Kolokalisaatiokokeissa EV1:lle tehtiin peräkkäiset leimaukset EV1-vasta-aineella (10 ug/ml) ja Alexa488:lla 86,7 ug/ml ennen sisäänottoa +37 C 5 % CO₂. EV1:n esileimaamisella ei ole todettu vaikutusta infektiotehokkuuteen. Viruksen M.O.I.-luku infektioidissa oli 100. -DMEM kasvatusliemi jossa oli 100 ng/ml EGF:ää lisättiin mahdollisen EV1 käsittelyn,

leimausten ja inhibiittorikäsittelyjen jälkeen jäällä oleville soluille, jotka siirrettiin lämpökaappiin.

4.3 Inhibiittori käsittelyt

Soluille tehtiin –DMEM starvaation viimeisen 30 minuutin aikana esikäsittely DMSO:hon liuotetulla 0,05 μM BafilomysiiniA:lla, 0,7 μM bortezomibilla, 50 μM Calpeptiinilla, 1 μM PMA:lla tai kontrollina 1 μM DMSO:lla ennen EV1 kiinnitystä, vasta-ainesidontoja ja EGF-stimulaatiota. Myrkkyjä oli läsnä sama konsentraatio myös EGF:ia sisältäneessä kasvatusliemessä.

4.4 Immunofluoresenssi ja konfokaalimikroskopia

A549-solut kiinnitettiin huoneenlämmössä käyttämällä 4% PFA:ta PBS:ssä 20-30 min ajan, solukalvoista tehtiin läpäiseviä käsittelemällä niitä huoneenlämmössä 5 min 0,2 % Triton-X PBS-liuoksella. Primaarivasta-ainekäsittely oli 45 min käsittely huoneenlämmössä 10 ng/ml vasta-aineilla liuotettuna PBS:ään jossa on 3 % naudan seerumin albumiinia. Vuohen vasta-aineita hiirtä tai kania vastaan konjugoituna Alexa488:aan tai -555:een (6,7 ug/ml) käytettiin sekundaarisena vasta-aineena 30 min RT käsittelyillä. Solut pedattiin käyttäen joko DAPI:a tai mowiol-DABCO:a ja kuvattiin joko Zeiss LSM 510 tai Olympus FV1000 CLSM konfokaalimikroskoopeilla. Jokaisen myrkkykäsittelyn eri aikapisteestä kuvattiin solujen z-akselin keskipisteen kohdalta kymmenen kuvaa samalla x/y-rajauksella ja yksi aikapistettä parhaiten edustava solu esimerkkikuvaksi.

Kuvauksia varten soluille tehtiin aiemmin kuvatut inhibiittori- ja viruskäsittelyt sekä leimaus hiiressä tuotetulla EGFR vasta-aineella. Live kuvauksissa 100 ng/ml EGF:ää sekä inhibiittori olivat muista kokeista poiketen CO_2 -vapaassa –DMEM kasvatusliemessä, joka lisättiin jäällä juuri ennen siirtoa kuvausalustalle. Kuvaukset suoritettiin Zeiss LSM 510 konfokaalimikroskoopilla käyttäen +37 $^{\circ}\text{C}$ lämpötilaan esilämmitettyä kuvausalustaa. Kuvauksissa valittiin kohteeksi kahdesta kolmeen solua, joista kuvattiin kolmiulotteinen kuvasarja 3, 6, 9, 12 ja 15 min aikapisteissä. Kuvatun solun ympäristöstä otettiin 15 min aikapisteessä myös kolmiulotteinen kuva josta silmämääräisesti tarkastettiin, että kuvatut solut edustavat näytteen enemmistöä.

4.5 Elektronimikroskooppinäytteiden valmistus ja transmissioelektronimikroskopia

Solut kasvatettiin maljoilla noin 70 % kasvatuspinta-alasta peittäväksi ja käsiteltiin hiiren EGFR-vasta-aineella 10 ug/ml, kanin hiirivasta-aineella 2,6 ug/ml, 5 nm PA-kullalla, hiiren seerumilla, Biotinyloidulla a211E10 vasta-aineella sekä 10 nm streptavidinikullalla ennen siirtoa kasvatuskaappiin 100 ng/ml EGF –DMEM kasvatusliemessä. Kiinnitettäessä solut huuhdottiin 0,1 M fosfaattipuskurilla ja niille laitettiin 2,5 % glutaraldehydi, jonka annettiin vaikuttaa 10 min ennen niiden kaapimista pois maljoilta eppendorffputkiin. Solut pelletöitiin kiinnitteessä swing-out-sentrifuugilla 30 min ajan 6000 rpm nopeudella ja pelletti jätettiin kiinnitteeseen yön yli 4 C° lämpötilassa. Pelletit pestiin kahdesti vedellä, valettiin 2,5 % agaroseen, fuugattiin, leimattiin 1 % osmiumtetroksidilla ja 1% uranyliasetaalilla sekä dehydroitiin asetonilla. Eponivalu aloitettiin 1:1 eponi-asetoniliuoksella ja jatkettiin 100 % eponikäsittelyllä yön yli sekoittaen. Pelletit siirrettiin valumuotteihin, pedattiin 100 % eponilla tunnin ajan 40 C° lämmössä ja lopulta polymerisoitiin 60 C° lämpötilassa yli 48 h. Näyteleikkaus ja hilavalmistus tehtiin Oulun yliopiston Elektronimikroskopian laitoksella. Näytteet kuvattiin JEOL 1400 transmissioelektronimikroskoopilla.

4.6 Mikroskooppidata-analyysi

Intensiteetti- ja tilavuusanalyysit kiinnitetyistä soluista saadulle datalle tehtiin BioImageXD-ohjelmalla (Kankaanpää ym, 2012) Dynamic threshold, Connected component labeling ja Segmented object analysis komentosarjan avulla. Solujen lukumäärä selvitettiin Gaussian smooth (kernel 3.0), Otsu multiple threshold (Otsu 1979, Liao 2001), Threshold, Object separation ja Analyze segmented objects protokollalla. Kolokalisaatioanalyysissä käytettiin BioImageXD:n sisällä olevaa kolokalisaatiotyökalua jolla määritettiin kahden eri kanavan pikseleiden välinen prosentuaalinen kolokalisaatio. EGFR-vesikkeleiden keskiarvoinen etäisyys toisistaan arvioitiin piirtämällä yhden solun ROI-rajaus (region of interest), jolle suoritettiin Dynamic threshold, Connected component labeling ja Segmented object analysis.

Livedatasta poistettiin turha tausta 1.0 kernelkoon Gaussian Smooth-suodattimella ja analysoitiin Dynamic threshold, Connected component labeling ja Analyze segmented

objects-komentosarjalla. 3D-kuvasarjoja varten näytteiden kirkkautta ja kontrastia nostettiin EGFR-vesikkeleiden havaitsemisen helpottamiseksi.

5 Tulokset

5.1 Inhibitio- ja EV1-käsittelyjen vaikutus EGFR:n hajotukseen

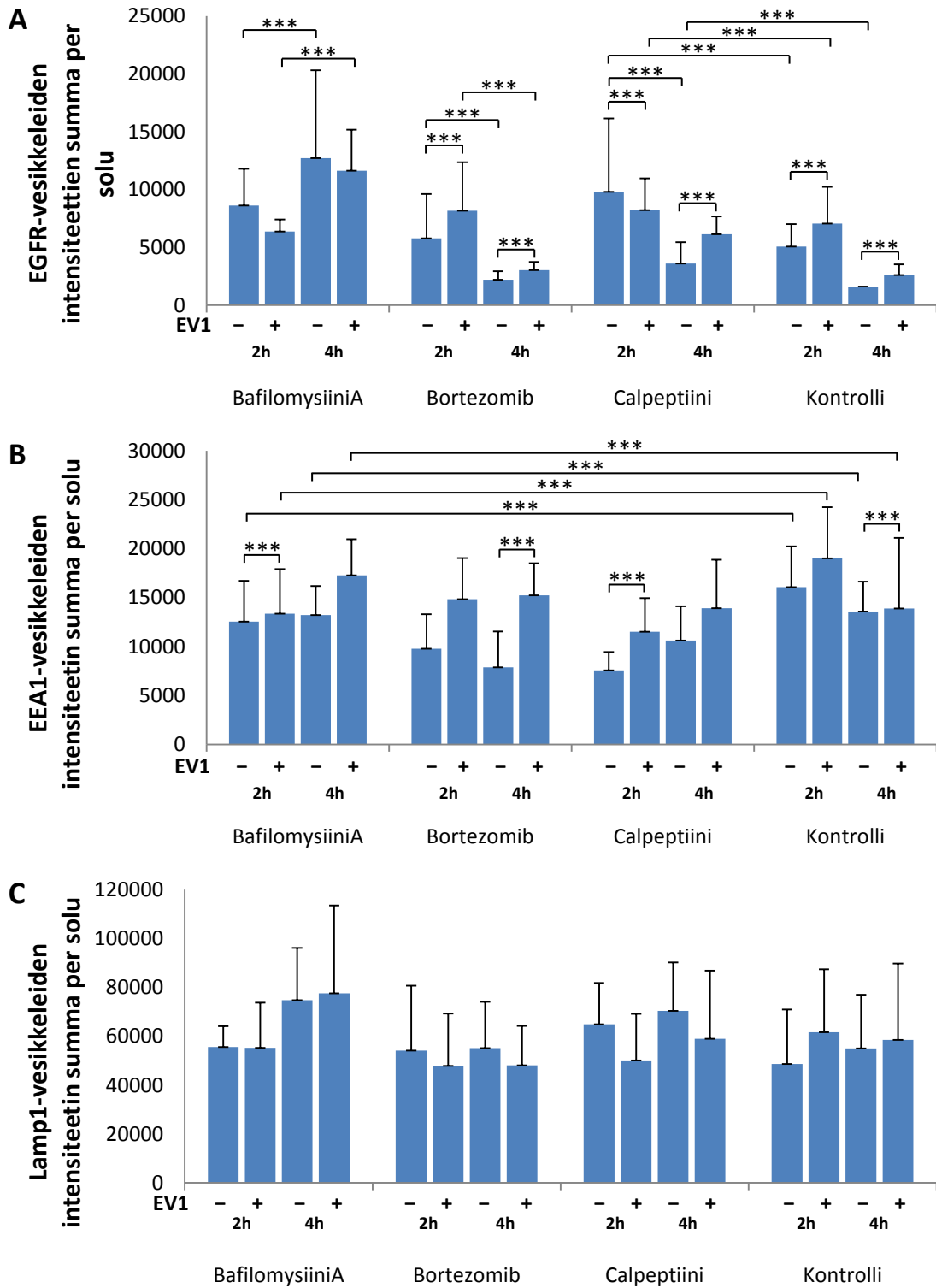
Inhibitiotutkimuksen tarkoituksena oli selvittää bafilomysiiniA:n, bortezomibin sekä Calpeptiinin vaikutus EGFR:n hajotukseen A549-soluissa kahden ja neljän tunnin aikapisteissä EGFR-stimulaation jälkeen. Solut infektoitiin EV1:llä, jotta viruksen vaikutus EGFR:in toimintaan voitiin nähdä eri inhibitioiden yhteydessä. EGFR-rakkuloiden sijaintia solussa tutkittiin aikaisten endosomien ja lysosomien markkereiden avulla (EEA1 ja Lamp1).

5.1.1 vATPaasi-inhibitio pysäyttää EGFR-hajotuksen

Solun endosomien pH:n lasku ja maturaatio lysosomeiksi pysäytettiin v-ATPaasi-inhibiittori BafilomysiiniA:lla. BafilomysiiniA-käsittely johti EGFR-intensiteetin summan nousuun 2h aikapisteestä 4h aikapisteeseen mentäessä (Kuva 4A). EEA1-intensiteetti oli EGFR:stä poiketen hieman kontrollia heikompa (Kuva 4B). Lamp1-värjäys ei poikennut suuresti kontrollileimauksista joten inhibitiolla ei ollut suurta vaikutusta myöhäisiin endosomeihin ja lysosomirakenteisiin (Kuva 4C). EGFR-kolokalisaatio EEA1-markkereiden kanssa oli vähäistä ja lähellä kontrollitasoja (Kuva 5A), mutta EGFR osoitti silmämääräisessä tarkastelussa huomattavaa kolokalisaatiota Lamp1-markkereiden kanssa (Kuva 5B). Silmämääräisellä tarkastelulla EGFR kolokalisaatio Lamp1-markkereiden kanssa kasvoi huomattavasti kahdesta tunnista neljään tuntiin mentäessä (Kuva 5B).

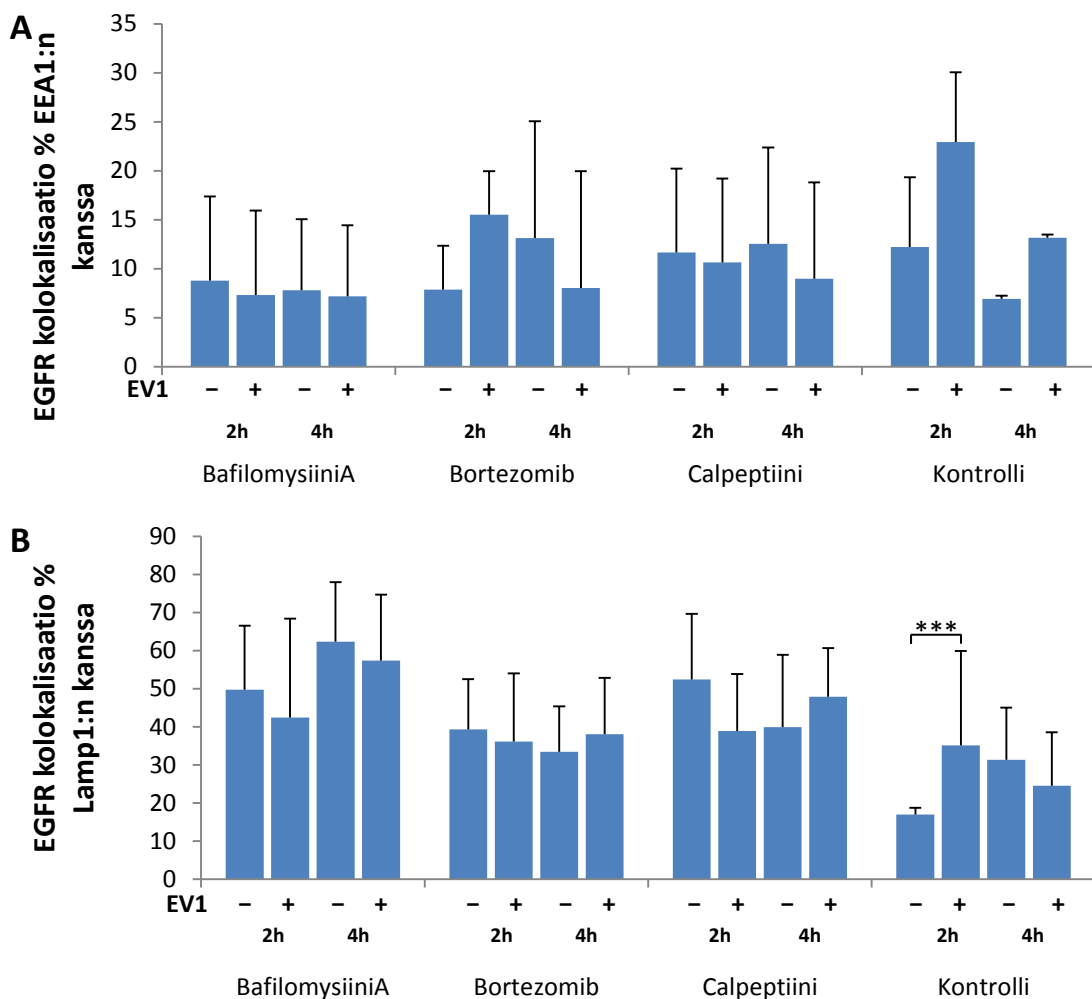
5.1.2 Kalpaiini inhibitio hidastaa EGFR-hajotusta

Kalpaiini-1:n ja -2:n roolia EGFR:n hajotuksessa selvitettiin käsittelemällä soluja Calpeptiinilla. Toisin kuin Bafilomysiinikäsittely, Calpeptiini ei johtanut EGFR-intensiteetin summan nousemiseen kahden ja neljän tunnin välillä (Kuva 4A). Calpeptiini kuitenkin nosti intensiteetin summaa huomattavasti kontrollinäytteitä korkeammalle tasolle kaikissa muissa tapauksissa 2h EV1 käsittelyä lukuunottamatta.



Kuva 4 A549-soluissa kaksi ja neljä tuntia 100 ng/ml EGF-stimulaation jälkeen mitattu bafilomysiinin, bortezomibin sekä Calpeptiinin vaikutus EV1 infektiota (+) ja ilman (-) (A) EGFR-vesikkeleiden intensiteetin, (B) EEA1 vesikkeleiden intensiteetin ja (C) Lamp1 vesikkeleiden intensiteetin summaan per solu. Kuvaajat ovat kolmesta erillisestä kokeesta valitut esimerkkikuvaajat. Otanta kustakin kokeesta on ollut kymmenen useamman solun sisältänyttä kuvaa.

EEA1-intensiteetin summat ovat vain hieman kontrolli- ja bafilomysiiniA-tuloksia heikompia (Kuva 4B). Kuten bafilomysiiniA:lla, myös Calpeptiinilla käsitellyillä soluilla Lamp1-vesikkelien intensiteetin summat olivat lähellä kontrollitasoja (Kuva 4C). EGFR:n kolokalisaatio EEA1-markkereiden kanssa oli silmämääräisellä arvioinnilla hieman BafilomysiiniA:ta vahvempaa (Kuva 5A). Kontrolliin verrattaessa calpeptiinikäsitellyillä soluilla voitiin silmämääräisesti havaita pienempi kolokalisaatioprosentti neljän tunnin aikapisteessä. EGFR-kolokalisaatio Lamp1-vesikkeleiden kanssa oli silmämääräisesti arvioiden kontrollia vahvempaa molemmissa aikapisteissä ja bafilomysiiniä heikompaa neljän tunnin kohdalla (Kuva 5B).



Kuva 5. A549 soluissa kaksi ja neljä tuntia 100 ng/ml EGF-stimulaation jälkeen mitattu bafilomysiinin, bortezomibin sekä Calpeptiinin vaikutus EV1-infektion kanssa (+) ja ilman (-) (A) EGFR vesikkeleiden kolokalisaatioprosenttiin EEA1-vesikkeleiden kanssa ja (B) EGFR vesikkeleiden kolokalisaatioprosenttiin Lamp1-vesikkeleiden kanssa. Kuvaajat ovat kolmesta erillisestä kokeesta valitut esimerkkikuvaajat. Otanta kustakin kokeesta on ollut kymmenen useamman solun sisältänyttä kuvaa.

5.1.3 Proteosomi inhibitio

Endosomien sisällä ja pinnalla tapahtuva proteosomaalinen hajotus estettiin Bortezomibilla. Bortezomib-käsitellyillä soluilla EGFR-intensiteetin summat pienenevät kahden ja neljän tunnin välillä (Kuva 4A). Suuruudeltaan arvot mukailivat kontrolliarvoja. Kontrolliarvoihin verrattaessa proteosomaalisen hajotuksen esto vähensi selvästi EEA1-vesikkeleiden intensiteetin summaa kahden tunnin aikapisteessä ja silmämääräisesti arvioiden myös neljässä tunnissa (Kuva 4B). Lamp1-vesikkeli-intensiteetin summa oli hyvin lähellä kontrollin arvoja (Kuva 4C). EGFR:n kolokalisaatio EEA1:n kanssa poikkeaa silmämääräisessä arvioinnissa kontrolliarvoista neljän tunnin aikapisteessä, jossa bortezomib-käsittely näyttää lisäävän kolokalisaation prosentuaalista tehokkuutta (Kuva 5A). Silmämääräisellä tarkastelulla myös EGFR:n Lamp1-kolokalisaatiossa näkyy selvä ero kontrolliin (Kuva 5B). Kahden tunnin kolokalisaatioprosentti on kontrollia korkeampi ja arvo laskee hieman siirryttäessä neljän tunnin aikapisteeseen.

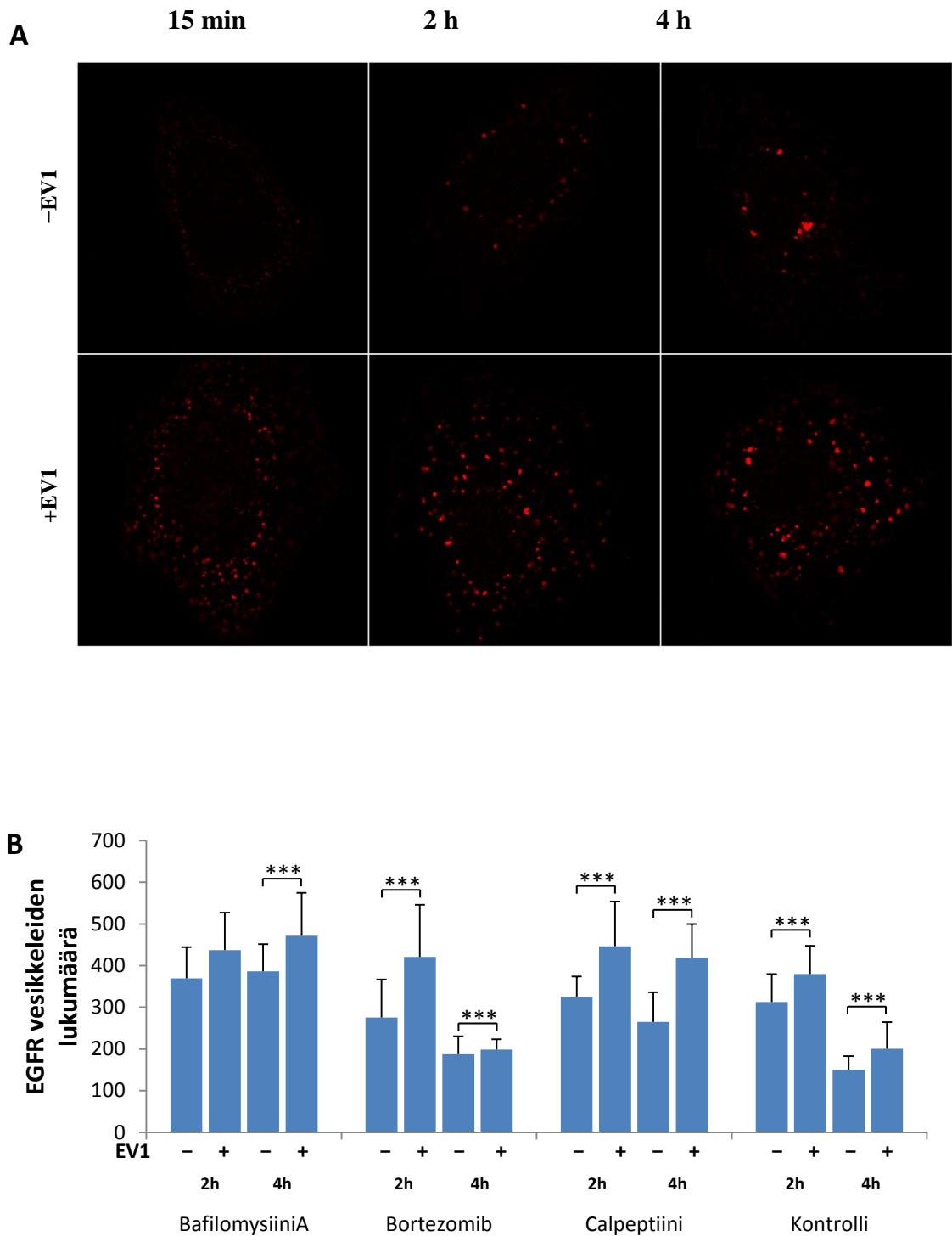
5.1.4 EV1 infektion vaikutus EGFR:n vaimennussäätelyyn

EV1-infektoitujen solujen EGFR-intensiteetin summa nousi kahden ja neljän tunnin aikapisteissä silmämääräisellä tarkastelulla kaikissa myrkkykäsittelyissä ja kontrollissa infektoimattomia soluja korkeammalle (Kuva 4A ja julkaisematon data). EGFR vesikkeleiden lukumäärän kasvu kahden ja neljän tunnin aikapisteissä oli myös havaittavissa kaikissa muissa tapauksissa, paitsi Bortezomib-käsittelyn neljän tunnin aikapisteessä (Kuva 6B). EV1-infektion vaikutus EGFR-vesikkelien hajontaan oli havaittavissa myös silmämääräisesti: EGFR-vesikkelit olivat levinneet kahden ja neljän tunnin kohdalla suuremmalle pinta-alalle kuin infektoimattomissa soluissa (Kuva 6A). EV1 johti myös useamman EGFR-vesikkelin ilmenemiseen vielä neljänkin tunnin aikapisteessä ja silmämääräisesti arvioiden EV1-infektio lisää myös pienempien EGFR-vesikkelien määrää myöhemmissä aikapisteissä (Kuva 6B).

EV1-infektio vaikutti kasvattavasti EEA1-vesikkeleiden intensiteetin summaan kaikissa tapauksissa, lukuun ottamatta bafilomysiinisolujen kahden ja kontrollisolujen neljän tunnin aikapisteitä (Kuva 4B). Kokeistamme saadut Lamp1-intensiteetin summan arvot nousivat vain kontrollisoluilla, bafilomysiiniA soluissa ero oli merkityksetön (Kuva

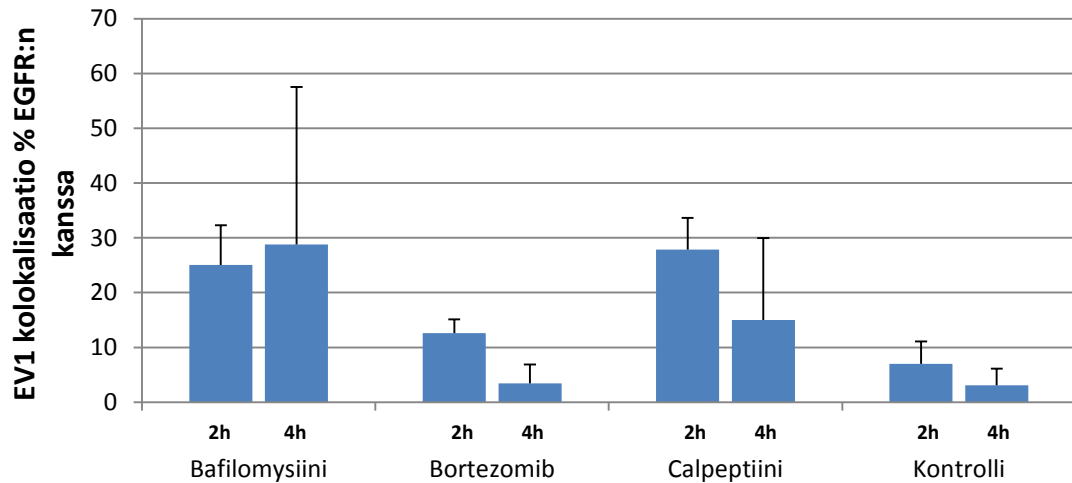
4C). Calpeptiinilla sekä bortezomibilla käsitellyillä soluilla infektiio vähensi Lamp1-intensiteetin summaa kaikissa aikapisteissä (Kuva 4C).

Kontrolli-soluilla EV1-infektio lisäsi EGFR:n kolokalisaatiota EEA1-markkereiden kanssa huomattavasti kahden ja neljän tunnin aikapisteissä (Kuva 5A).



Kuva 6. A) EGFR-vasta-aineella leimattuja A549-soluja kuvattuna 15 minuuttia, kaksi tuntia ja neljä tuntia EGF-stimulaation jälkeen joko EV1-infektion kanssa (+EV1) tai ilman (-EV1). Kuvan intensiteettiarvoja on nostettu vesikkelien sijainnin määrittämisen parantamiseksi. **B)** A549 soluissa kaksi ja neljä tuntia 100 ng/ml EGF-stimulaation jälkeen mitattu bafilomysiinin, bortezomibin sekä Calpeptiinin vaikutus EGFR vesikkeleiden lukumäärään EV1 infektion kanssa (+) ja ilman (-). Kuvajaajat ovat kolmesta erillisestä kokeesta valitut esimerkkikuvajaajat. Otanta kustakin kokeesta on ollut kymmenen useamman solun sisältänyttä kuvaa.

EGFR:n kolokalisaatio Lamp1-markkereiden kanssa kasvoi kahdessa tunnissa EV1-infektoituneissa soluissa, mutta heikkeni kahden ja neljän tunnin välillä (Kuva 5B). Bafilomysiinillä virus heikensi EGFR:n kolokalisaatioprosenttia hieman EEA1- ja Lamp1-markkereihin, mutta erot eivät olleet kovin suuria (Kuva 5A, 5B). Bortezomib-soluilla EV1 lisäsi EGFR kolokalisaatiota EEA1-markkereiden kanssa kahden tunnin aikapisteessä ja vähensi sitä neljässä tunnissa (Kuva 5A). EEA1:stä poiketen bortezomibilla oli hyvin vähän vaikutusta Lamp1-markkereiden kolokalisoitumiseen EGFR:n kanssa, kun kolokalisaatioprosentissa oli kahden ja neljän tunnin aikapisteissä vain pieniä eroja (Kuva 5B). Calpeptiinikäsittelyssä kolokalisaatio EEA1-markkereiden kanssa laski EV1-infektion johdosta molemmissa sekä kahden, että neljän tunnin aikapisteissä (Kuva 5A). EGFR:n kolokalisaatio Lamp1-markkereiden kanssa väheni EV1-infektoiduilla soluilla huomattavasti kahden tunnin aikapisteessä (Kuva 5B). EV1-viruksen kolokalisaatio EGFR-vesikkeleiden kanssa vaikutti pieneltä ja kolokalisaatioanalyysit vahvistivat niiden fyysisen vuorovaikutuksen vähäisyyden. Kontrollitasolla kolokalisaatio oli alle kymmenen prosenttiyksikköä kahden tunnin kohdalla ja heikkeni edelleen mentäessä neljään tuntiin (Kuva 7). Eri inhibiittoreiden vaikutus EV1:n kolokalisaatioon EGFR:n kanssa vaikutti olevan riippuvaista EGFR:n määrästä, koska se tuntui noudattavan EGFR-intensiteeteissä näkyviä trendejä (Kuva 7 ja 4A). BafilomysiiniA-käsittely lisää kolokalisaatiota kontrolliin verrattuna huomattavasti ja lisää sitä edelleen kahdesta tunnista neljään tuntiin (Kuva 7). Calpeptiini lisää kolokalisaation määrää kontrollia suuremmille tasoille, mutta ei ajan edetessä vahvista sitä. Bortezomibilla käsitellyissä soluissa kolokalisaatioarvot jäävät kontrollin tasolle. Silmämääräisessä tarkkailussa kolokalisaation aitoutta oli vaikea todentaa: EGFR- ja EV1-vesikkelit saattoivat olla hyvin lähekkäinkin, mutta suurta päällekkäisyyttä ei ollut nähtävissä.

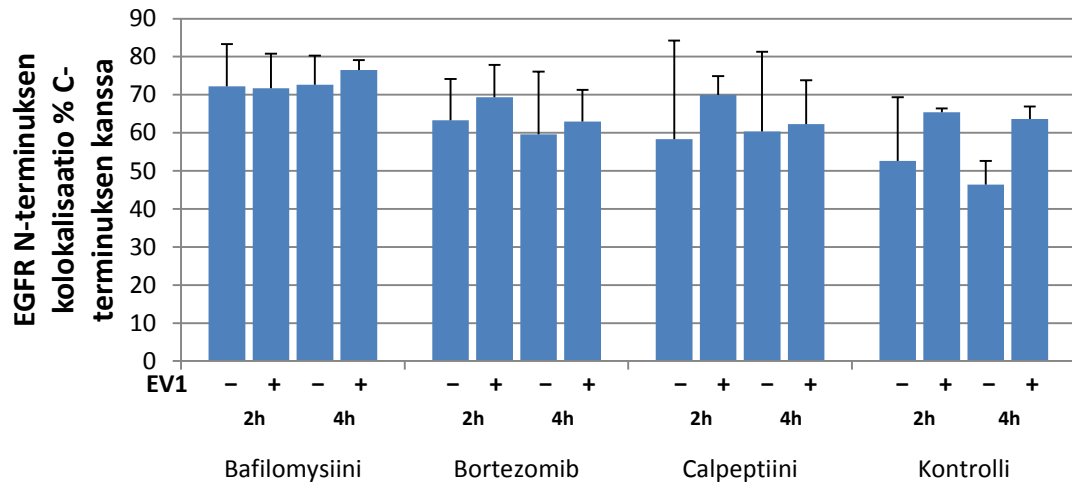


Kuva 7. A549-soluissa kaksi ja neljä tuntia 100 ng/ml EGF-stimulaation jälkeen mitattu bafilomysiinin, bortezomibin sekä Calpeptiinin vaikutus EV1:n kolokalisaatioon EGFR:n kanssa. EV1 infektion kanssa (+) ja ilman (-). Kuvaajat ovat kolmesta erillisestä kokeesta valitut esimerkkikuvaajat. Otanta kustikin kokeesta on ollut kymmenen useamman solun sisältänyttä kuvaa.

5.2 Inhibitioiden ja EV1:n vaikutus EGFR:n N- ja C-terminuksen signaaliin

EGFR C-terminus ohjataan MVB:ssä lumenin sisäisiin vesikkeleihin, N-terminuksen jäädessä niiden ulkopuolelle. Halusimme selvittää onko EGFR:n N- ja C-terminuksen hajotuksessa poikkeavuuksia niiden endosomaalisen kuljetuksen aikana, joka voisi johtua niiden poikkeavasta sijainnista MVB:n sisällä.

Jotta tietäisimme mitä EGFR proteiinin osaa seuraamme kussakin aikapisteessä, teimme EGFR:n tuplaleimauksen proteiinin solun ulkopuolisen N-terminuksen ja solun sisäisen C-terminuksen vasta-aineiden avulla. Inhibitioiden avulla oli tarkoitus selvittää eri hajotusreiteille olennaiset hajotustekijät. Lisäksi haluttiin tietää voiko viruskäsittelyllä vaikuttaa EGFR-hajotukseen. Kolokalisaatioanalyseissa molempien EGFR-markkereiden näytettiin kolokalisoituvan hyvällä prosentuaalisella arvolla (Kuva 8). Suurimmat erot kolokalisaatioprosenteille asettivat sekundaarivasta-aineet. 488 nm taajuudella emissoiva fluorofori johti suurempaan mitattuun intensiteettiin ja taustaemissioon kuin 555 nm taajuudella emissoinut vastine. Alexa-555-kanava kolokalisoitui siis paremmin Alexa-488-kanavan kanssa riippumatta siitä mihin primaariseen vasta-aineeseen ne olivat kytkettyinä. EGFR:n ulkopuolisen domeenin ja C-terminuksen kolokalisaatio solun sisällä säilyi kaikilla inhibiutioilla lähellä samoja



Kuva 8. A549-soluissa kaksi ja neljä tuntia 100 ng/ml EGF-stimulaation jälkeen mitattu bafilomysiinin, bortezomibin sekä Calpeptiinin vaikutus EV1-infektion kanssa (+) ja ilman (-) EGFR N-terminuksen kolokalisaatioon EGFR C-terminuksen kanssa. Kuvaajat ovat kolmesta erillisestä kokeesta valitut esimerkkikuvaajat. Otanta kustakin kokeesta on ollut kymmenen useamman solun sisältänyttä kuvaa.

arvoja kahdesta tunnista neljään tuntiin. Inhibitioiden väliset kolokalisaatioprosentit kuitenkin poikkesivat toisistaan. BafilomysiiniA näytti aiheuttavan kolokalisaatiota arviolta 70 %, Bortezomib sekä Calpeptiini 60 % ja kontrollisoluissa lähempänä 50 % vahvuudella. Mielenkiintoista kyllä, EV1 infektio näytti hieman lisäävän kolokalisaation määrää kaikilla aikapisteillä Bafilomysiinin kahdentunnin aikapisteitä lukuun ottamatta. Vahvin EV1:n indusoima kolokalisaatiolisäys näkyi kontrollisoluissa ja heikoin EV1-vaste oli havaittavissa bafilomysiiniA soluilla.

5.3 Varhaisten aikapisteiden 3D livekuvaus A549-soluissa

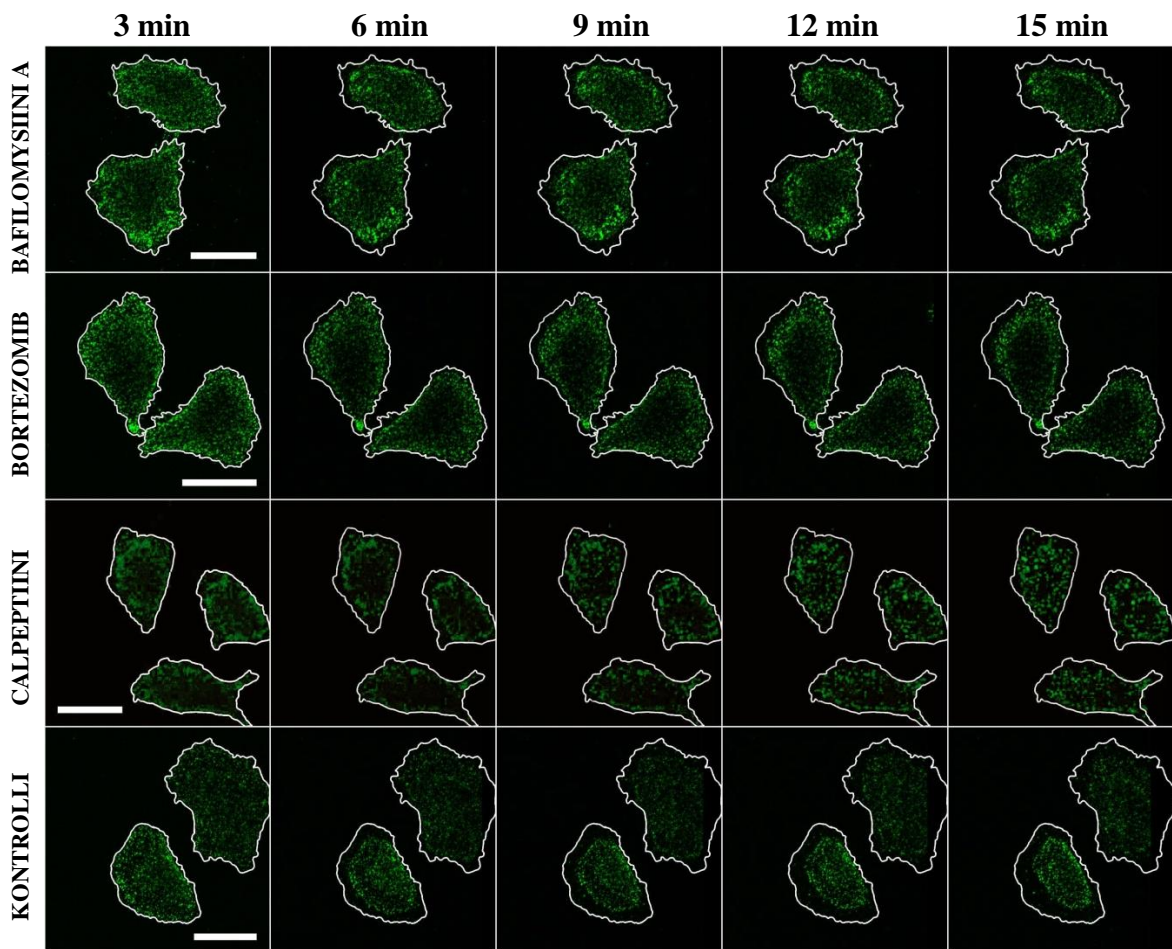
Halusimme tutkia kuinka kahden ja neljän tunnin aikapisteiden tarkkailussa käytetyt kolme inhibiittoria, PKC-aktivaattori PMA ja EV1-infektio vaikuttavat varhaisissa aikapisteissä EGFR-kiertokulkuun. Kolmiulotteisen ja nopean kuvauksen tarkoituksena oli saada kiinnitetyistä soluista saatua dataa täydentävää lisätietoa lyhyen aikavälin käyttäytymisestä ja EGFR:n avaruudellisesta jakautumisesta.

5.3.1 Inhibitioiden vaikutus aikaisissa aikapisteissä

Eri inhibiittoreiden vaikutukset varhaisten aikapisteiden live-datassa ilmensivät niin suurta vaihtelua että erojen havaitseminen eri käsittelyiden välillä oli mahdotonta. Silmämääräisellä tarkastelulla solujen 2D maksimi-intensiteettiprojektio-kvasarjat

(MIP) kuitenkin paljastivat eroavaisuuksia joita käytetyillä kuva-analyysialgoritmeilla ei voitu nähdä (Kuva 9).

BafilomysiiniA:lla EGFR rintama selvästi vetäytyi kohti solun keskustaa (kuva 9), mutta sen isojen vesikkelien osuus näytti olevan kontrolliin verrattaessa suurempi. Bortezomib osoitti aikaisissa aikapisteissä yhtäläisyyttä myöhäisten aikapisteiden kanssa (Kuva 9). Vesikkelien koko vaikutti samalta kontrollin kanssa ja rintaman vetäytyminen oli yhtä nopeaa kuin verrokilla. Calpeptiinin aiheuttama vaste jätti EGFR-vesikkelit tasaisesti ympäri solua ja tuntui lisäävän niiden kokoa kontrolliin verrattaessa (Kuva 9).

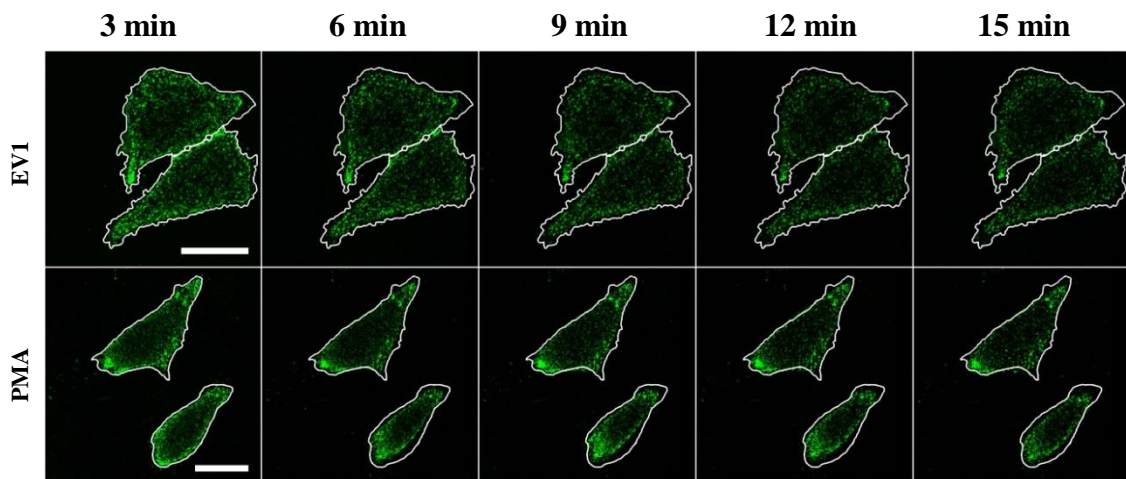


Kuva 9. Konfokaalimikroskoopilla kuvatun Z-leikesarjan maksimi-intensiteetiprojisointi EGFR-vasta-aineella leimatuista A549-soluista 3, 6, 9, 12 ja 15 minuutin jälkeen 100 ng/ml EGF-aktivaatiosta käsiteltynä joko bafilomysiini-, bortezomib- tai Calpeptiini-inhibiittoreilla. Vaalea reuna merkitsee vesikkelirintaman sijaintia 3 min aikapisteessä. Oikean puoleinen kontrollisolu on leikkautunut osittain pois mittauksen aikana tapahtuneen siirtymän takia. Mittajana 20 μm . Calpeptiini-solut on tekojärjätty punaisesta virheäksi. Jokainen käsittely edustaa eri solukokeista otettuja kuvia.

5.3.2 EV1-infektion ja PMA-käsittelyn vaikutus varhaisissa aikapisteissä.

Livekuvauksista saadussa objektien intensiteetti-, tilavuus- ja lukumäärädatassa oli suurta keskiarvohajontaa kun verrattiin EV1-infektoiduista soluista saatuja aikaisten aikapisteiden intensiteetti ja tilavuus kuvaajia infektoimattomien solujen kuvaajiin. EV1 infektion aiheuttamia muutoksia oli kuitenkin nähtävissä silmämääräisesti arvioitaessa 2D-MIP-kuvasarjoja (Kuva 10). EV1-infektoiduissa soluissa EGFR-vesikkelit eivät vetäytyneet kohti solun keskustaa yhtä suurissa määrin kuin verrokkitapauksissa (Kuva 10). EGFR-rintama jäi lähemmäksi 3 min tilannetta ja rakkulat kertyivät enemmän lähelle solukalvoa kuin tumaa.

PMA:lla käsitellyissä soluilla voitiin havaita samankaltainen vaste kuin EV1:llä (Kuva 10). PMA:lla EGFR-vesikkelit kertyivät enemmän solun reunoille, mutta EV1-vasteesta poiketen muodostui myös varsin suuria vesikkeleitä. Kiinnostuimme onko PMA:n aiheuttama vaste samankaltainen vielä myöhemmissäkin kahden ja neljän tunnin aikapisteissä.

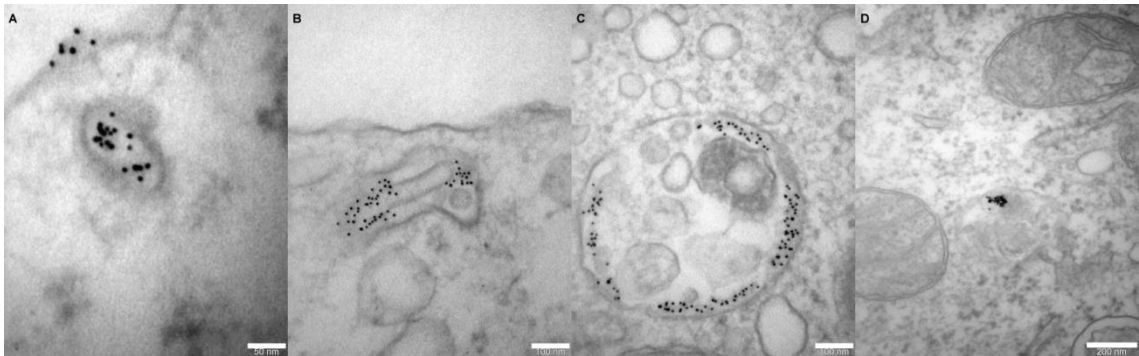


Kuva 10. Konfokaalimikroskooppilla kuvatun Z-leikesarjan maksimi-intensiteetti-projisointi EGFR-vasta-aineella leimatuista A549-soluista 3, 6, 9, 12 ja 15 minuutin jälkeen 100 ng/ml EGF aktivaatiosta infektoituna EV1:llä tai käsiteltynä PMA:lla. Vaalea reuna merkitsee vesikkelirintaman sijaintia 3 min aikapisteessä. Mittajana 20 µm. Jokainen käsittely edustaa eri solukokeista otettuja kuvia.

5.4 $\alpha 2\beta 1$ integriinin ja EGFR:n sijainti TEM kuvauksissa

Ryhmällämme oli aiempaa tietoa integriinin lokalisaatiosta MVB:issa. Halusimme nyt selvittää EGFR:n lokalisaatiota sen indusoidun sisänoton jälkeen käyttämällä korkearesoluutioista TEM kuvantamista tarkemman tiedon selvittämiseksi. A549-solut joissa oli 5 nm pA-kullalla leimattu EGFR ja 10 nm streptavidinikullalla leimattu $\alpha 2\beta 1$ -integriini kuvattiin 15 min ja 2 h EGFR-aktivaation jälkeen. Tuloksista selvisi $\alpha 2\beta 1$ -

integroinileimauksen olevan epäonnistunut, koska 10 nm kultapartikkeleita ei ollut nähtävissä missään näytteessä. EGFR nähtiin 15 min aikapisteessä klusteroituneena solukalvolla ja solukalvosta kuroutuneissa endosomeissa (Kuva 11A) sekä tubulaarisissa rakenteissa solukalvon tuntumassa (Kuva 11B). Kahden tunnin aikapisteessä EGFR oli selvästi harvemmassa ja päätyneenä EGF-MVB:hin tai morfologialtaan epäselviin rakenteisiin.



Kuva 11. SEM kuvia A549-soluista joissa näkyy 5 nm PA-kullalla leimattu EGFR ja 10 nm streptavidiinikultapartikkeleilla leimattu $\alpha 2\beta 1$ -integroini puuttuu kokonaan. (A) Kuva 15 min EGF-aktivaation jälkeen näyttää EGF:n klusteroituneena solukalvolla ja siitä kuroutuneessa endosomissa sekä tubulaarisista rakenteista solukalvon tuntumassa (B). 2h aikapisteessä EGFR oli siirtynyt monivesikulaarisiin rakenteisiin solun säsällä (C) ja klusteroituneiksi kasoiksi morfologialtaan näyte-epätarkkuuksien takia määrittämättömissä rakenteissa (D). Mittajana (A) 50 nm, (B) 100 nm, (C) 200 nm ja (D) 200 nm.

6 Tulosten tarkastelu

6.1 EGFR-reitillä integriinireitin kanssa analogisia rakenteita

SEM-kuvauksilla saimme tärkeää tietoa EGFR:n endosytoosista kokeissamme käytetyissä koeolosuhteissa. EGFR kulkeutuu solun sisälle samankaltaisissa rakenteissa kuin $\alpha 2\beta 1$ -integroini. Viidentoista minuutin aikapisteessä EGFR:n voidaan nähdä ohjautuneen morfologialtaan putkimaisiin aikaisiin endosomeihin solukalvon tuntumassa (Kuva 11B). Teoriassa 15 minuutin aikapisteessä EGFR:ia olisi pitänyt voida havaita myös MVB:issä. Ajanotto kuitenkin aloitettiin heti kun $+0\text{ }^{\circ}\text{C}$ lämpimät solut siirrettiin $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kasvatuskaappiin joten on loogista että solukalvon dynamiikka ei heti nolla-aikapisteessä vastaa normaaliolosuhteita. Kahden tunnin aikapisteissä on kuitenkin vielä nähtävissä kuinka EGFR:t ovat siirtyneet myös MVB-rakenteisiin (Kuva 11C). Vaikka koasetelmassa käytetyt 100 ng/ml konsentraatiot EGF:ää ovat huomattavasti yleisiä *in vivo* pitoisuuksia korkeampia, nykyisen tietämyksen valossa kaltriinivälitteinen endosytoosi on kuitenkin tärkein ja yleisin EGFR:n sisäänottoreitti ((Sorkin ja Goh, 2008; Madshus ja Stang 2009; Roepstorff ym, 2008). EM kuvat sisään otetusta EGFR molekyylistä paljastavat, että koasetelmissa käytetyt EGF-konsentraatiot eivät estä EGFR:n kulkua kaltriinivälitteisen sisäänottoreitin kautta. Tässä työssä kehitetyt TEM-näytteen valmistusprotokollat antavat hyvän pohjan, jolle rakentaa jatkossa tapahtuvaa kasvutekijöiden ja enterovirusten välisten vuorovaikutusten korkearesoluutioista kuvaamista.

6.2 EV1 infektio vaikuttaa EGFR reittiin PKC α :n kaltaisesti

Tutkimuksissamme havaitsemat EV1-infektion vaikutukset EGFR-reittiin muistuttavat vahvasti PMA:n aiheuttaman PKC- α -aktivaation aikaan saamia muutoksia EGFR:n sijainnissa solun sisällä. Molemmissa tapauksissa EGFR-vesikkelit näyttävät jäävän solukalvon tuntumaan tasaisesti levittyneinä. Kahden ja neljän tunnin kohdalla sama ilmiö on yhä selvästi nähtävissä: kontrollisoluisissa EGFR-vesikkelit ovat hajonneet ja lähellä tumaa, kun taas EV1- ja PMA-soluilla EGFR-hajotus on pienempää ja vesikkelit sijaitsevat kauempana tumasta. EGFR vesikkeleiden solukalvon läheisestä sijainnista EV1-infektoiduissa soluissa kertoo myös kolokalisaatiotulokset endosomaalisten markkereiden kanssa. Kahden tunnin aikapisteessä havaittu EV1-infektion lisäämä EGFR-vesikkeleiden jääminen aikaisiin endosomeihin osoittaa infektion hidastavan

EGFR:n kuljetusta pois solukalvolta kohti tumaa. EV1-infektio näyttää myös hetkellisesti lisäävän varhaisten endosomien määrää soluissa. Varhaisten endosomien lisääntyminen mitä todennäköisimmin johtuu soluun tunkeutuvan viruksen lisäämästä endosytoottisesta liikenteestä. Intensiteettianalyysit kahdessa ja neljässä tunnissa paljastavat että EV1-infektion vaikutus EGFR-signaaliin ei rajoitu vain sen fyysiseen sijaintiin. Virusinfektiolla on selvä vaikutus EGFR-intensiteettiin, eli solun sisään otetun EGFR:n määrään ja sen hajotuksen etenemiseen kahdesta neljään tuntiin. Viruksen aktivoimat mekanismit siis lisäävät myös EGFR-endosytoosia. Viruksen EGFR-hajotusta estävä vaikutus näkyi myös additiivisesti bafilomysiinikokeessa: bafilomysiiniA estää EGFR-hajotusta ja esto vain vahvistuu EV1-infektion vaikutuksesta. Koska bafilomysiiniA ei vaikuta EV1- $\alpha 2\beta 1$ -integroonin hajotukseen (Rintanen ym, 2011), EV1- $\alpha 2\beta 1$ -integroonikompleksien lukumäärää solussa voidaan olettaa säilyneen muuttumattomana samalla kun EGFR-arvot nousevat.

Kolme jo aikaisemmin havaittua ilmiötä $\alpha 2\beta 1$ -integroonin ja EGFR:n välisistä vuorovaikutuksista tukevat, yksilöinä ja yhdistettynä, oletuksiamme EV1-infektion PKC α :n kautta tapahtuvista EGFR-reittiä hidastavista vaikutuksista. 1) Viruksen reseptorin $\alpha 2\beta 1$ -Integroonin ja ECM:n välisten vuorovaikutusten tiedetään johtavan EGF:stä riippumattoman EGFR-kierrätysreitin aktivaatioon epiteelisoluissa (Bill ym, 2004). Tutkimuksessamme tehtyjen havaintojen perusteella ehdotamme että myös EV1-aktivoitu $\alpha 2\beta 1$ -integrooni voi lisätä EGFR-kierrätystä: EGFR-vesikkelien määrä on suurempi EV1-infektoiduissa soluissa ja morfologialtaan pienemmät vesikkelit näyttävät lisääntyneen. 2) Kierrätysreitin aktivoitumisen yhteydessä tapahtuvan PKC α -aktivaation tiedetään johtavan EGFR:n T654:n fosforylaatioon sekä EGFR-ubikitinaation ja hajotuksen estymiseen (Bao ym, 2000). 3) PKC α -fosforylaatio taas voi ryhmämme aiempien tutkimusten mukaan olla seurausta myös $\alpha 2\beta 1$ -integroonireitin signaloinnista (Upla ym, 2004), mikä tarkoittaisi että EV1:n laukaisema $\alpha 2\beta 1$ -Integroonisignalointi edesauttaisi EGFR-ubikitinaatiota. Kaikkiaan ehdotammekin mallia jossa EV1-aktivoitu $\alpha 2\beta 1$ -integrooni johtaa PKC α -fosforylaatiostatusmuutoksen kautta EGFR-reitin hidastumiseen ja EGFR-kierrätyksen kasvuun lisäämällä EGFR-ubikitinaatiota. Lisäksi mukana voi olla muitakin vielä kartoittamattomia tekijöitä jotka vaikuttavat EGFR:n kiertoon EV1-infektion aikana.

PKC α -statusmuutoksen lisäksi $\alpha 2\beta 1$ -integroiniaktivaation on myös osoitettu lisäävän EGFR-ekspressiota solukalvolla (Moro ym, 2002). Jos EV1-aktivoitu $\alpha 2\beta 1$ -integroini kykenee PKC α :n tavoin lisäämään EGFR-ekspressiota, tuloksemme korkeammista EGFR-tasoista voivat osin johtua EV1:n kyvystä säädellä myös aktivoimatonta EGFR:ää. Lisääntynyt EGFR-intensiteetti EV1-infektioitujen solujen myöhemmissä kahden ja neljän tunnin aikapisteissä johtuisi EV1-klusteroidun $\alpha 2\beta 1$ -integroinin aiheuttamasta EGFR-ekspression lisääntymisestä solukalvolla josta se ligandin sitoessaan siirtyy solun endosomaaliseen verkostoon.

Tulostemme varjossa on hyvin mahdollista että EV1-klusteroidun $\alpha 2\beta 1$ -integroinin aiheuttama PKC α -aktivaatiostatuksen muutos johtaa EGFR:n endosomaalisen kuljetuksen siirtymiseen hajottavasta kuljetusreitistä kierrättävään ja estää samalla EGFR-vesikkelien siirtymisen kohti tumaa. Estyneen endosomaalisen kuljetuksen lisäksi EV1 voi edesauttaa EGFR-EGF-vuorovaikutusten syntymistä lisäämällä EGFR-ekspressiota solukalvolla. EV1-infektio kuitenkin saa aikaan korkeammat EGFR C- ja N-terminuskolokalisatioarvot, joten on oletettavaa että EGFR-hajotuksen hidastuminen on EGFR-solukalvoekspressiota suuremmassa asemassa. Ryhmämme aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet EGFR- ja Integroini-MVB:den olevan erillisiä rakenteita niiden poikkeavien pH-arvojen takia (Rintanen ym, 2011). Tässä esitetyt EGFR- ja $\alpha 2\beta 1$ -reittien väliset, fyysisestä kontaktista riippumattomat, PKC α -aktivaation sekä EGFR-ekspression kautta tapahtuvat vuorovaikutukset ja aiemmat pH-mittauksiin pohjaavat EGFR- ja Integroini-MVB-rakenteiden eroavaisuuksia korostavat tulokset tukevat toisiaan: EGFR ja EV1- $\alpha 2\beta 1$ -Integroini vuorovaikuttavat vahvasti, mutta erillisistä endosytoottisista rakenteista ja ilman fyysistä kontaktia.

EV1:n ja EGFR:n välisten vuorovaikutusten jatkotutkimuksille konfokaalimikroskopiolla on äärimmäisen tärkeää saada kehitettyä uusia kuva-analyysialgoritmeja. Solunsisäisten vesikkelien liikkeen suuntaa ja nopeutta neliulotteisesti kuvaavat algoritmit mahdollistaisivat silmämääräistä tarkastelua analyttisemmän työkalun. Lisäksi on saatava tarpeeksi luotettavaa kuva-dataa, joka tukisi silmämääräisesti tehtyjä havaintoja pienempien EGFR-vesikkelien lukumäärän kasvusta. Kehittyvien kuva-analyysialgoritmien rinnalle tarvitaan korkeampaan aikaresoluutioon kykenevää kuvauslaitteistoa jotta yksittäisten vesikkelien neliulotteinen tarkastelu olisi mahdollista. Korkearesoluutioisten EM-kuvien ja

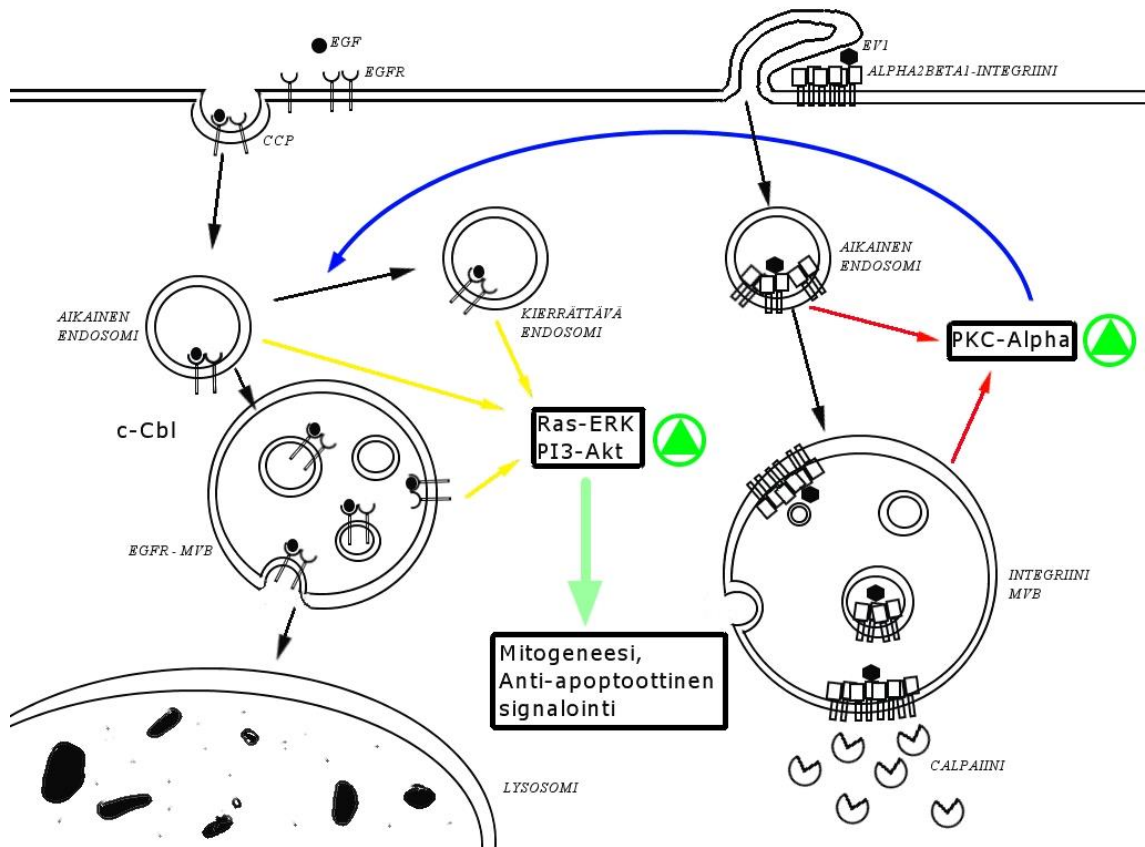
tarkempien konfokaalimikroskopi tulosten rinnalle tutkimuksia tulisi laajentaa myös PKC α -fosforylaatioita ja EGFR-ubikitinaatiota kuvaaviin western-blot analyysihin. Western-blot analyysit antaisivat mikroskopian ulottumattomissa olevaa tietoa proteiinien aktivaatiosta EV1-infektion aikana ja kuinka infektion vaikuttaa EGFR-fosforylaatiostatukseen.

6.3 EV1- α 2 β 1-Integriinikompleksi hidastaa EGFR hajotusta

Kalpaiinien tiedetään olevan päätekijöitä EV1-klusteroidun α 2 β 1-integriinin hajotuksessa, mutta niiden ei tiedetä säätelevän EGFR:n hajotusta (Rintanen ym, 2011). Tässä tutkimuksessa tehdyt kalpaiini-inhibitiot kahden ja neljän tunnin kohdalla osoittavat kuinka inhibitiolla näyttää olevan EGFR-hajotusta hidastava, mutta ei estävä vaikutus. Vähentynyt EV1-integriinikompleksin hajotus nostaa EGFR:n määrää solun sisällä kahden ja erityisesti neljän tunnin aikapisteissä. Viruskäsittelyllä ja kalpaini-inhibitiolla on siis samansuuntaista vaikutusta EGFR:n hajotukseen. Vaikka EGF-stimulaation on osoitettu lisäävän m-Kalpaiini aktiivisuutta ERK/MAP kinaasisarjan kautta (Glading ym, 2000), omat tutkimuksemme ovat kuitenkin osoittaneet, että EGF-stimulaatio ei suuresti vaikuta EV1:n aiheuttamaan α 2 β 1-integriiniklusteroitumiseen, kerääntymiseen MVB-rakenteisiin tai EV1 infekioon (Karjalainen ym, 2011). Havaittu lievä infektion lisääntyminen voi kuitenkin johtua nimenomaan tästä kalpainen aktivaation lisääntymisestä (Karjalainen ym, 2011). Saamamme tulokset viittaavat siihen että myöhemmissä aikapisteissä solun sisälle kertyvä EV1-integriinikompleksi jatkaa EGFR-hajotuksen ja kuljetuksen säätelyä. Ryhmässämme tehtyjen alustavien tulosten mukaan EV1-infektion aiheuttama muutos PKC- α -fosforylaatiostatuksen kasvussa näkyy tehokkaana vielä neljänkin tunnin jälkeen infektiosta. Voi olla, että kalpaiini-inhibition aiheuttama EGFR:n kertyminen johtuu vielä neljänkin tunnin aikapisteessä jatkuvasta PKC α -aktivaatiosta. Myöhemmissä neljän tunnin aikapisteissä tapahtuva EGFR-hajotuksen vähenemissäätely EV1- α 2 β 1-integriinin toimesta tarvitsee vielä tarkempia western-blot analyyssejä yhdessä kalpaiini-inhibiittoreiden kanssa.

6.4 EV1 saattaa hyväksikäyttää EGFR reitin signalointia

EGFR:n endosomaalinen kuljetus solulimassa on tärkeä osa sen signaloinnin säätelyä. Endosomeissa olevan aktivoituneen EGFR-reseptorin on myös osoitettu olevan kykenevä aktivoimaan Ras-Erk- ja PI3-Akt-signalointireittejä riittävästi, jotta sillä on todellinen vaikutus solun selviytymiselle (Wang ym, 2002; Pennock ja Wang, 2003). Endosomaalinen EGFR-signalointireitti on hyödyllinen soluja infektoivalle virukselle, koska Ras-Erk reitti on tärkeä osa mitogeneesiä ja PI3-Akt-reitti johtaa anti-apoptoottiseen signalointiin (Downward, 1998). Jos EV1 kykenee tässä työssä esitetyllä tavalla hidastamaan EGFR-hajotusta, se voi samanaikaisesti lisätä oman isäntäsolunsa elinajan odotetta ja parantaa omia mahdollisuuksiaan replikoitua isäntäsolunsa sisällä (Kuva 12). Ei kuitenkaan ole selvää, onko tämä EV1-infektion aiheuttama solun elinikäodotteen kasvaminen ratkaisevassa asemassa virusreplikaation kvantitatiivisuudelle. Tarkempi tutkiminen vaatii infektiotehokkuuden seuraamista olosuhteissa, joissa EGFR-signaloinnin kvantitatiivisuus on luotettavasti säädeltävissä. Erityisesti on tärkeää saada lisää myös tilastollisesti vahvistettuja tuloksia jotka tukevat silmämääräisesti tämän Pro Gradu työn aikana havaittuja ilmiöitä. Tämän saavuttaminen vaatii kuvaustekniikan tarkempaa standardoimista solukoiden välillä ja itse kuva-analyysialgoritmien parantamista.



KUVA 12. EV1-infektion ehdotettu vaikutus EGFR-endosytoosin säätelyyn. Integriiniaktiiviklusteroituminen ja endosytoosi johtavat PKC α -aktivaatioon, joka ohjaa EGFR:n kierrättävälle endosytoottiselle reitille. EGFR:n endosomaalinen signaali johtaa Ras-ERK sekä PI3-Akt aktivaatioon, mikä aiheuttaa mitogeneesiä edistävää ja anti-apoptoottista signaalia. Keltaiset nuolet kuvaavat EGFR:n, punaiset nuolet EV1-Integriinikompleksin, sininen nuoli PKC-Alphan ja vihreä Ras-ERK sekä PI3-Akt reittien aiheuttamia vaikutuksia. Vihreät kolmiot osoittavat aktivaatiota. Kuva mukailtu (Karjalainen ym, 2011).

7 Lähdeluettelo

- Alwan, H.A., ja J.E. van Leeuwen. 2007. UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) deubiquitination promotes EGFR degradation. *J.Biol.Chem.* 282:1658-1669.
- Auvinen, P., ja T. Hyypia. 1990. Echoviruses include genetically distinct serotypes. *J.Gen.Virol.* 71 (Pt 9):2133-2139.
- Bache, K.G., S. Stuffers, L. Malerod, T. Slagsvold, C. Raiborg, D. Lechardeur, S. Walchli, G.L. Lukacs, A. Brech, ja H. Stenmark. 2006. The ESCRT-III subunit hVps24 is required for degradation but not silencing of the epidermal growth factor receptor. *Mol.Biol.Cell.* 17:2513-2523.
- Bao, J., I. Alroy, H. Waterman, E.D. Schejter, C. Brodie, J. Gruenberg, ja Y. Yarden. 2000. Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *J.Biol.Chem.* 275:26178-26186.
- Bergelson, J.M., M.P. Shepley, B.M. Chan, M.E. Hemler, ja R.W. Finberg. 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science.* 255:1718-1720.
- Bill, H.M., B. Knudsen, S.L. Moores, S.K. Muthuswamy, V.R. Rao, J.S. Brugge, ja C.K. Miranti. 2004. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol.Cell.Biol.* 24:8586-8599.
- Boucrot, E., S. Saffarian, R. Zhang, ja T. Kirchhausen. 2010. Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One.* 5:e10597.
- Cheng, X., ja J.H. Jaggard. 2006. Genetic ablation of caveolin-1 modifies Ca²⁺ spark coupling in murine arterial smooth muscle cells. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 290:H2309-19.
- Collins, B.M., A.J. McCoy, H.M. Kent, P.R. Evans, ja D.J. Owen. 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell.* 109:523-535.
- Coskun, U., M. Grzybek, D. Drechsel, ja K. Simons. 2011. Regulation of human EGF receptor by lipids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 108:9044-9048.
- Davletov, B., ja C. Montecucco. 2010. Lipid function at synapses. *Curr.Opin.Neurobiol.* 20:543-549.
- Doherty, G.J., ja H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu.Rev.Biochem.* 78:857-902.
- Downward, J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10:262-267.
- Ehrlich, M., W. Boll, A. Van Oijen, R. Hariharan, K. Chandran, M.L. Nibert, ja T. Kirchhausen. 2004. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell.* 118:591-605.
- Elices, M.J., ja M.E. Hemler. 1989. The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:9906-9910.
- Ferguson, K.M., M.B. Berger, J.M. Mendrola, H.S. Cho, D.J. Leahy, ja M.A. Lemmon. 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol.Cell.* 11:507-517.
- Filman, D.J., M.W. Wien, J.A. Cunningham, J.M. Bergelson, ja J.M. Hogle. 1998. Structure determination of echovirus 1. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 54:1261-1272.
- Giancotti, F.G., ja E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285:1028-1032.

- Glading, A., P. Chang, D.A. Lauffenburger, ja A. Wells. 2000. Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J.Biol.Chem.* 275:2390-2398.
- Grist, N.R., E.J. Bell, ja F. Assaad. 1978. Enteroviruses in human disease. *Prog.Med.Virol.* 24:114-157.
- Henne, W.M., E. Boucrot, M. Meinecke, E. Evergren, Y. Vallis, R. Mittal, ja H.T. McMahon. 2010. FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science.* 328:1281-1284.
- Hewlett, L.J., A.R. Prescott, ja C. Watts. 1994. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J.Cell Biol.* 124:689-703.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Ivaska, J., ja J. Heino. 2011. Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 27:291-320.
- Jentsch, T.J. 2008. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol.* 43:3-36.
- Johannessen, L.E., N.M. Pedersen, K.W. Pedersen, I.H. Madshus, ja E. Stang. 2006. Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and Grb2-containing clathrin-coated pits. *Mol.Cell.Biol.* 26:389-401.
- Jokinen, J., D.J. White, M. Salmela, M. Huhtala, J. Kapyla, K. Sipila, J.S. Puranen, L. Nissinen, P. Kankaanpaa, V. Marjomaki, T. Hyypia, M.S. Johnson, ja J. Heino. 2010. Molecular mechanism of alpha2beta1 integrin interaction with human echovirus 1. *EMBO J.* 29:196-208.
- Kanchanawong, P., G. Shtengel, A.M. Pasapera, E.B. Ramko, M.W. Davidson, H.F. Hess, ja C.M. Waterman. 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature.* 468:580-584.
- Kankaanpaa, P., L. Paavolainen, S. Tiitta, M. Karjalainen, J. Paivarinne, J. Nieminen, V. Marjomaki, J. Heino, ja D.J. White. 2012. BioImageXD: an open, general-purpose and high-throughput image-processing platform. *Nat.Methods.* 9:683-689.
- Karjalainen, M., E. Kakkonen, P. Upla, H. Paloranta, P. Kankaanpaa, P. Liberali, G.H. Renkema, T. Hyypia, J. Heino, ja V. Marjomaki. 2008. A Raft-derived, Pak1-regulated entry participates in alpha2beta1 integrin-dependent sorting to caveosomes. *Mol.Biol.Cell.* 19:2857-2869.
- Karjalainen, M., N. Rintanen, M. Lehkonen, K. Kallio, A. Maki, K. Hellstrom, V. Siljamaki, P. Upla, ja V. Marjomaki. 2011. Echovirus 1 infection depends on biogenesis of novel multivesicular bodies. *Cell.Microbiol.* 13:1975-1995.
- Kazacic, M., K. Roepstorff, L.E. Johannessen, N.M. Pedersen, B. van Deurs, E. Stang, ja I.H. Madshus. 2006. EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae. *Traffic.* 7:1518-1527.
- Kerr, M.C., ja R.D. Teasdale. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 10:364-371.
- King, S.L., T. Kamata, J.A. Cunningham, J. Emsley, R.C. Liddington, Y. Takada, ja J.M. Bergelson. 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., ja R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim.Biophys.Acta.* 1745:273-286.
- Krajewska, W.M., ja I. Maslowska. 2004. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell.Mol.Biol.Lett.* 9:195-220.

- Lafourcade, C., K. Sobo, S. Kieffer-Jaquinod, J. Garin, ja F.G. van der Goot. 2008. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One*. 3:e2758.
- Lanzetti, L., A. Palamidessi, L. Areces, G. Scita, ja P.P. Di Fiore. 2004. Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases. *Nature*. 429:309-314.
- Leabu, M., S. Uniyal, J. Xie, Y.Q. Xu, C. Vladau, V.L. Morris, ja B.M. Chan. 2005. Integrin alpha2beta1 modulates EGF stimulation of Rho GTPase-dependent morphological changes in adherent human rhabdomyosarcoma RD cells. *J.Cell.Physiol.* 202:754-766.
- Liberali, P., E. Kakkonen, G. Turacchio, C. Valente, A. Spaar, G. Perinetti, R.A. Bockmann, D. Corda, A. Colanzi, V. Marjomaki, ja A. Luini. 2008. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J.* 27:970-981.
- Luzio, J.P., M.D. Parkinson, S.R. Gray, ja N.A. Bright. 2009. The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem.Soc.Trans.* 37:1019-1021.
- Madshus, I.H., ja E. Stang. 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., V. Pietiainen, H. Matilainen, P. Upla, J. Ivaska, L. Nissinen, H. Reunanen, P. Huttunen, T. Hyypia, ja J. Heino. 2002. Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J.Virol.* 76:1856-1865.
- Mattila, E., T. Pellinen, J. Nevo, K. Vuoriluoto, A. Arjonen, ja J. Ivaska. 2005. Negative regulation of EGFR signalling through integrin-alpha1beta1-mediated activation of protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Nat.Cell Biol.* 7:78-85.
- McMahon, H.T., ja E. Boucrot. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 12:517-533.
- Mercer, J., ja A. Helenius. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat.Cell Biol.* 11:510-520.
- Mercer, J., M. Schelhaas, ja A. Helenius. 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu.Rev.Biochem.* 79:803-833.
- Mizuno, E., T. Iura, A. Mukai, T. Yoshimori, N. Kitamura, ja M. Komada. 2005. Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Mol.Biol.Cell.* 16:5163-5174.
- Moro, L., L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, E. Boeri Erba, M. Smeriglio, E. Turco, S.F. Retta, M.G. Giuffrida, M. Venturino, J. Godovac-Zimmermann, A. Conti, E. Schaefer, L. Beguinot, C. Tacchetti, P. Gaggini, L. Silengo, G. Tarone, ja P. Defilippi. 2002. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J.Biol.Chem.* 277:9405-9414.
- Munro, S. 2003. Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell.* 115:377-388.
- Ning, Y., T. Buranda, ja L.G. Hudson. 2007. Activated epidermal growth factor receptor induces integrin alpha2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway. *J.Biol.Chem.* 282:6380-6387.
- Normanno, N., C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M.R. Maiello, A. De Luca, F. Caponigro, ja D.S. Salomon. 2005. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr.Drug Targets.* 6:243-257.
- Parton, R.G., B. Jøggerst, ja K. Simons. 1994. Regulated internalization of caveolae. *J.Cell Biol.* 127:1199-1215.
- Parton, R.G., ja K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8:185-194.

- Pelkmans, L., T. Burli, M. Zerial, ja A. Helenius. 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*. 118:767-780.
- Pelkmans, L., D. Puntener, ja A. Helenius. 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*. 296:535-539.
- Pellinen, T., A. Arjonen, K. Vuoriluoto, K. Kallio, J.A. Fransen, ja J. Ivaska. 2006. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J.Cell Biol.* 173:767-780.
- Pellinen, T., S. Tuomi, A. Arjonen, M. Wolf, H. Edgren, H. Meyer, R. Grosse, T. Kitzing, J.K. Rantala, O. Kallioniemi, R. Fassler, M. Kallio, ja J. Ivaska. 2008. Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Dev.Cell.* 15:371-385.
- Pennock, S., ja Z. Wang. 2003. Stimulation of cell proliferation by endosomal epidermal growth factor receptor as revealed through two distinct phases of signaling. *Mol.Cell.Biol.* 23:5803-5815.
- Pike, L.J. 2006. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J.Lipid Res.* 47:1597-1598.
- Reginato, M.J., K.R. Mills, J.K. Paulus, D.K. Lynch, D.C. Sgroi, J. Debnath, S.K. Muthuswamy, ja J.S. Brugge. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat.Cell Biol.* 5:733-740.
- Reider, A., S.L. Barker, S.K. Mishra, Y.J. Im, L. Maldonado-Baez, J.H. Hurley, L.M. Traub, ja B. Wendland. 2009. Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J.* 28:3103-3116.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, ja A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 70:401-410.
- Rintanen, N., M. Karjalainen, J. Alanko, L. Paavolainen, A. Maki, L. Nissinen, M. Lehtonen, K. Kallio, R.H. Cheng, P. Upla, J. Ivaska, ja V. Marjomaki. 2011. Calpains promote alpha2beta1 integrin turnover in non-recycling integrin pathway. *Mol.Biol.Cell.*
- Roepstorff, K., L. Grovdal, M. Grandal, M. Lerdrup, ja B. van Deurs. 2008. Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem.Cell Biol.* 129:563-578.
- Saffarian, S., E. Cocucci, ja T. Kirchhausen. 2009. Distinct dynamics of endocytic clathrin-coated pits and coated plaques. *PLoS Biol.* 7:e1000191.
- Schlossman, D.M., S.L. Schmid, W.A. Braell, ja J.E. Rothman. 1984. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J.Cell Biol.* 99:723-733.
- Schurpf, T., ja T.A. Springer. 2011. Regulation of integrin affinity on cell surfaces. *EMBO J.* 30:4712-4727.
- Sharma, D.K., J.C. Brown, A. Choudhury, T.E. Peterson, E. Holicky, D.L. Marks, R. Simari, R.G. Parton, ja R.E. Pagano. 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Mol.Biol.Cell.* 15:3114-3122.
- Sigismund, S., E. Argenzio, D. Tosoni, E. Cavallaro, S. Polo, ja P.P. Di Fiore. 2008. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev.Cell.* 15:209-219.
- Sorkin, A., ja L.K. Goh. 2008. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp.Cell Res.* 314:3093-3106.
- Stenmark, H., ja V.M. Olkkonen. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2:REVIEWS3007.
- Stimpson, H.E., C.P. Toret, A.T. Cheng, B.S. Pauly, ja D.G. Drubin. 2009. Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol.Biol.Cell.* 20:4640-4651.

- Tang, Z., P.E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D.S. Kohtz, I. Nishimoto, H.F. Lodish, ja M.P. Lisanti. 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J.Biol.Chem.* 271:2255-2261.
- Taylor, M.J., D. Perrais, ja C.J. Merrifield. 2011. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* 9:e1000604.
- Tebar, F., T. Sorkina, A. Sorkin, M. Ericsson, ja T. Kirchhausen. 1996. Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *J.Biol.Chem.* 271:28727-28730.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, S.E. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martin, L.E. Greene, ja E. Eisenberg. 1995. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature.* 378:632-635.
- Upla, P., V. Marjomaki, P. Kankaanpaa, J. Ivaska, T. Hyypia, F.G. Van Der Goot, ja J. Heino. 2004. Clustering induces a lateral redistribution of alpha 2 beta 1 integrin from membrane rafts to caveolae and subsequent protein kinase C-dependent internalization. *Mol.Biol.Cell.* 15:625-636.
- Vale, R.D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell.* 112:467-480.
- Wang, F., V.M. Weaver, O.W. Petersen, C.A. Larabell, S. Dedhar, P. Briand, R. Lupu, ja M.J. Bissell. 1998. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:14821-14826.
- Wang, X.L., D. Ye, T.E. Peterson, S. Cao, V.H. Shah, Z.S. Katusic, G.C. Sieck, ja H.C. Lee. 2005. Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca(2+)-activated K+ channels in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 280:11656-11664.
- Wang, Y., S. Pennock, X. Chen, ja Z. Wang. 2002. Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol.Cell.Biol.* 22:7279-7290.
- Wary, K.K., F. Mainiero, S.J. Isakoff, E.E. Marcantonio, ja F.G. Giancotti. 1996. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell.* 87:733-743.
- Weber, T., B.V. Zemelman, J.A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T.H. Sollner, ja J.E. Rothman. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell.* 92:759-772.
- West, M.A., M.S. Bretscher, ja C. Watts. 1989. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J.Cell Biol.* 109:2731-2739.
- Wollert, T., ja J.H. Hurley. 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature.* 464:864-869.
- Wollert, T., C. Wunder, J. Lippincott-Schwartz, ja J.H. Hurley. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature.* 458:172-177.
- Wykosky, J., T. Fenton, F. Furnari, ja W.K. Cavenee. 2011. Therapeutic targeting of epidermal growth factor receptor in human cancer: successes and limitations. *Chin.J.Cancer.* 30:5-12.
- Yamada, K.M., ja S. Even-Ram. 2002. Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat.Cell Biol.* 4:E75-6.
- Yamanaka, I., M. Koizumi, T. Baba, S. Yamashita, T. Suzuki, ja R. Kudo. 2003. Epidermal growth factor increased the expression of alpha2beta1-integrin and modulated integrin-mediated signaling in human cervical adenocarcinoma cells. *Exp.Cell Res.* 286:165-174.
- Yao, Q., J. Chen, H. Cao, J.D. Orth, J.M. McCaffery, R.V. Stan, ja M.A. McNiven. 2005. Caveolin-1 interacts directly with dynamin-2. *J.Mol.Biol.* 348:491-501.