

**$\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja stimuloitun epidermaalisen kasvutekijä-  
reseptorin reittien yhteydet**

**Anita Mäki**

**Pro gradu -tutkielma**

**Jyväskylän yliopisto**

**Bio- ja ympäristötieteen laitos**

**Solubiologia**

**Helmikuu 2011**

## **Alkusanat**

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksella, solubiologian osastolla kesällä ja syksyllä 2010. Ensimmäiseksi tahdon kiittää tutkielmani ohjaajaa dosentti Varpu Marjomäkeä valtavan innostavasta, kärsivällisestä ja kannustavasta ohjauksesta tutkielmani eri vaiheissa. Suuret kiitokset kuuluvat myös jokaiselle tutkimusryhmäläiselle, joiden neuvot laboratoriotyöskentelyssä ja tulosten analysoinnissa helpottivat vastausten löytämistä loputtomiin kysymyksiini. Suurin kiitos kuuluu rakkaalle aviomiehelleni Laurille tuesta, rohkaisusta ja uskomattomasta kärsivällisyydestä.

---

<b>Tekijä:</b>	Anita Mäki	
<b>Tutkielman nimi:</b>	$\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja stimuloitun epidermaalisen kasvutekijäreseptorin reittien yhteydet	
<b>English title:</b>	Interplay between the pathways of $\alpha 2\beta 1$ -integrin and stimulated epidermal growth factor receptor	
<b>Päivämäärä:</b>	22.2.2011	<b>Sivumäärä:</b> 61
<b>Laitos:</b>	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
<b>Oppiaine:</b>	Solubiologia	
<b>Tutkielman ohjaaja(t):</b>	FT Varpu Marjomäki	

---

### Tiivistelmä

Integriinien ja kasvutekijäreseptorien kulku solussa yhdistyy monimutkaisen vuorovaikutusten verkoston kautta. Ympäristön olosuhteista riippuvaisesti integriinit ja kasvutekijäreseptorit kantavat pääasiallisen vastuun solun selviytymisestä, kasvusta, erilaistumisesta, vaeltamisesta ja lisääntymisestä. Integriinit kiinnittävät solut alustansa ja kasvutekijäreseptorit voivat vastata liukoisten ligandien haasteisiin.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit reagoivat ligandihinsa, joita voivat olla matriksimolekyylit, virukset ja keinotekoisesti myös vasta-aineet. Integriinien klusterointi viruksella tai vasta-aineilla aiheuttaa integriinin internalisaation endosomeihin, kun taas sitoutuminen matriksimolekyyleihin saa aikaan integriinien kulkeutumisen fokaaliliadheesioihin. Epidermaalisen kasvutekijäreseptorin (EGFR) aktivaatio on riippuvaista kasvutekijäligandin kiinnittymisestä reseptoriin. Integriinien klusteroituminen ja EGFR:n stimulaatio johtaa reseptorien internalisoitumiseen sekä aktivoituneeseen signaalivälitykseen, jonka täytyy olla tarkasti organisoitua sekä ajallisesti että paikallisesti.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli testata  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja stimuloitun EGFR:n vuorovaikutuksia. Tutkimuksessa selvitettiin  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien klusteroinnin vaikutusta EGFR:n polkuun ja EGF-stimulaation merkitystä  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin polkuun. Lisäksi tutkittiin EGFR:n ja  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin internalisaatiopolkujen vuorovaikutuksia. Tutkimuksessa käytettiin immunoleimaamista, konfokaalimikroskopiaa, läpäisyelektronimikroskopiaa ja elävien solun kuvaamista laajakenttämikroskoopilla. Tulokset osoittivat, että integriinien klusterointi hidastaa EGFR:ien hajotusta, mutta EGF-stimulaatio ei vaikuta integriinien hajotukseen. Tutkimuksessa havaittiin solun pinnalla olevaa kolokalisaatiota  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja stimuloimattoman EGFR:n välillä. Stimulaation ja internalisaation jälkeen kolokalisaatiota löydettiin kuitenkin vain vähän. Elävien solujen kuvaaminen osoitti enemmän kolokalisaatiota perustuen todennäköisesti kuvausten heikompaan resoluutioon. Tutkimuksessa tarkasteltiin myös mahdollisia kolokalisaation virhetulkintoja laajakenttämikroskopiakuvausten analyyseissä. Tämän tutkimuksen tuloksista voidaan päätellä, että integriinien klusterointi toimii negatiivisena säätelijänä EGFR:ien hajotukselle. Vaikka EGFR ja  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit kolokalisoituvat osittain solun pinnalla, internalisaation jälkeen reseptoreja sisältävät endosomit kulkivat samoja reittejä ilman merkittävää kolokalisaatiota. Huolimatta vähäisestä kolokalisaatiosta EGFR:n ja integriinin välillä sytoplasmisissa rakenteissa, integriinin internalisaatioreitillä on selkeä vaikutus EGFR-reitin toimintaan solussa. EGFR:n vähentynyt hajoaminen solussa mahdollisesti lisää EGFR:n signalointia solussa, pitää solua pitempään hengissä ja voi olla siten edullinen viruksen lisääntymisen kannalta.

---

**Avainsanat:** epidermaalinen kasvutekijäreseptori,  $\alpha 2\beta 1$ -integriini, endosytoosi

---

**Author:** Anita Mäki  
**Title of thesis:** Interplay between the pathways of  $\alpha 2\beta 1$ -integrin and stimulated epidermal growth factor receptor  
**Finnish title:**  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja stimuloitun epidermaalisen kasvutekijäreseptorin reittien yhteydet  
**Date:** 22.2.2011 **Pages:** 61  
**Department:** Department of Biological and Environmental Science  
**Chair:** Cell Biology  
**Supervisor(s):** Ph.D. Varpu Marjomäki

---

### Abstract

The pathways of integrins and growth factor receptors are connected through a complex network of interactions in the cell. Depending on the environmental conditions these receptors are largely responsible for the survival, growth, differentiation, migration and proliferation of the cell. Integrins attach cells to the matrix and growth factor receptor enables cells to react to the soluble ligands.  $\alpha 2\beta 1$ -integrins respond to their ligands i.e. matrix molecules, viruses, and artificially also antibodies. Integrin clustering by viruses or antibodies results in endocytosis of integrins to endosomes whereas binding to the matrix molecules targets integrins to focal adhesions. Epidermal growth factor receptor (EGFR) activation depends on binding of the growth factor ligand. Integrin clustering and EGFR activation result in receptor internalization and activation of signaling transduction pathways which have to be precisely orchestrated spatially and temporally.

The aim of this study was to test the interactions between  $\alpha 2\beta 1$ -integrin and EGFR triggered pathways. The objective of this study was to examine the clustering effects of  $\alpha 2\beta 1$ -integrin on EGFR pathway and the effects of EGF-stimulation on  $\alpha 2\beta 1$ -integrin pathway. Furthermore the interactions of the internalization pathways of EGFR and  $\alpha 2\beta 1$ -integrin were studied. The testing included immunolabelling experiments, confocal fluorescence microscopy, transmission electron microscopy, and live-cell imaging. The results indicated that the clustering of integrins delay the degradation of EGFR but no effect on the degradation of integrins was discovered by the EGF-stimulation. In this study colocalization on the cell surface was observed between  $\alpha 2\beta 1$ -integrin and unstimulated EGFR. However, after stimulation and internalization very low levels of colocalization were found. The live cell imaging showed higher colocalization probably based on poor resolution. The possible misinterpretations of colocalization concerning the analysis of wide-field microscopy were also under consideration. Findings of this study suggest that the clustering of integrins functions as a negative regulator for EGFR degradation. Though EGFR and  $\alpha 2\beta 1$ -integrin partly colocalize on the cell surface, after internalization, endosomes containing receptors followed the same routes without considerable colocalization. Regardless of the low colocalization between EGFR and integrins in the cytoplasmic structures, integrin internalization pathway clearly contributes to the EGFR route in the cell. Reduced degradation of EGFR in the cell probably enhances EGFR signaling, prolongs the life-time of the cell and may be thus advantageous to the proliferation of virus.

---

**Keywords:** epidermal growth factor receptor,  $\alpha 2\beta 1$ -integrin, endocytosis

## Sisällysluettelo

Alkusanat .....	2
Tiivistelmä .....	3
Abstract .....	4
Sisällysluettelo .....	5
Lyhenteet .....	6
1 JOHDANTO .....	7
1.1 Solujen kommunikointi .....	7
1.1.1 Solunulkoiset viestimolekyylit .....	7
1.1.2 Solukalvon entsyymireseptorit .....	8
1.1.3 Epidermaalinen kasvutekijäreseptori .....	9
1.1.4 Integriinit .....	11
1.2 Solun vesikkeliliikenne .....	15
1.2.1 Endosytoosi .....	15
1.2.2 Tyrosiinikinaasireseptorien kalvoliikenne .....	19
1.2.3 Epidermaalisen kasvutekijäreseptorin hajotus .....	26
1.2.4 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosi .....	28
1.3 Integriinin ja kasvutekijäreseptorien vuorovaikutukset .....	30
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS .....	33
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT .....	34
3.1 Tutkimuksessa käytetyt solut, virukset, vasta-aineet ja kasvutekijät .....	34
3.2 Konfokaalimikroskopia .....	34
3.2.1 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusterointi vasta-aineilla tai viruksella ja EGFR:n stimulaatio .....	34
3.2.2 Solujen fiksaatio, leimaaminen ja tarkastelu .....	35
3.3 Elävien solujen kuvaaminen laajakenttämikroskoopilla .....	35
3.4 Elektronimikroskopia .....	36
4 TULOKSET .....	38
4.1 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusterointi hidastaa EGFR:n hajotusta .....	38
4.2 Stimuloitu EGFR ei edistä $\alpha 2\beta 1$ -integriinin hajoamista .....	40
4.3 Laajakenttä-, elektroni- ja konfokaalimikroskopia osoittivat EGFR:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kolokalisoituvan vain vähän .....	41
4.3.1 Elävien solujen laajakenttämikroskopiakuviassa stimuloitujen EGFR:n ja klusteroitujen $\alpha 2\beta 1$ -integriinin polut kohtasivat osittain .....	41
4.3.2 Elektronimikroskopiakuviassa $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä sijoittui moniin eri rakenteisiin ja EGFR:t leimautuivat heikosti .....	46
4.3.3 Klusteroimaton $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja stimuloimaton EGFR kolokalisoituvat solun periferiassa, mutta vain vähän muualla .....	47
4.3.4 EGF-pitoisuudella oli vaikutusta EGFR:ien internalisaatioon .....	48
4.3.5 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin vasta-aine ja EGF voivat kilpailla solukalvolle tartumisessa .....	49
4.3.6 Internalisaation varhaisessa vaiheessa ja 2h:n aikapisteessä $\alpha 2\beta 1$ -integriinit ja stimuloitujen EGFR:t kolokalisoituvat vain vähän .....	50
5 TULOSTEN TARKASTELU .....	52
Lähdeluettelo .....	58

## Lyhenteet

CCP	klatriinipäällysteinen kuopake (clathrin-coated pit)
CEMM	kolesterolirikastunut osa solukalvolla (engl. cholesterol-enriched membrane microdomain)
CIE	klatriinista riippumaton endosytoosi (engl. clathrin-independent endocytosis)
CME	klatriinivälitteinen endosytoosi (engl. clathrin-mediated endocytosis)
GPCR	G-proteiinilinkitetty reseptori (engl. G-protein coupled receptor)
ECM	soluväliaine (engl. extracellular matrix)
EE	varhainen endosomi (engl. early endosome)
EGFR	epidermaalinen kasvutekijäreseptori (engl. epidermal growth factor receptor)
ENTH	epsinin N-terminaalinen homologia (engl. epsin N-terminal homology)
ER	solulimakalvosto (engl. endoplasmic reticulum)
EV1	Echovirus 1
FC	integriinien keskittynyt kiinnittymiskohta (engl. focal contact)
ILV	sisävesikkeli (engl. intraluminal vesicle)
MAPK	mitogeneaktivoituva proteiinikinaasi (engl. mitogen-activated protein kinase)
MVB	monivesikkelinen rakenne (engl. multivesicular body)
LE	myöhäinen endosomi (engl. late endosome)
PI3P	fosfatidyli-inositoli 3-fosfaatti (engl. phosphatidylinositol 3-phosphate)
PKB	proteiinikinaasi B (engl. protein kinase B)
PKC	proteiinikinaasi C (engl. protein kinase C)
RTK	tyrosiinikinaasireseptori (engl. receptor tyrosine kinases)
SAO $\alpha$ 2/45	Ihmisperäinen $\alpha$ 2-integriiniä stabiilisti ekspressoiva osteosarkoomasolulin ja, klooninro 45

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Solujen kommunikointi

Solut aistivat ympäristöään ja kommunikoivat toisten solujen kanssa solun pinnalla olevien reseptorien avulla. Jokaisella monisoluisen eläimen solulla on kyky reagoida reseptoreiltaan signaaleihin, joita ympäröivät solut lähettävät. Reseptorien aktivaatio alkaa usein solun ulkopuolelta tulevan ligandin eli signaalimolekyylin kiinnittymisestä reseptoriin. Ligandin kiinnittyminen saa aikaan monimutkaisen signaalien tapahtumasarjan solun sisällä. Solun reseptorien endosytoosi, jossa solukalvolta kuroutuu sisäänpäin kuljetusrakkula, seuraa usein reseptorien aktivaatiota. Signaalireseptorit ja solukalvolla olevat proteiinit kulkeutuvat endosyyttiselle väylälle, jossa tapahtuu proteiinien lajittelu erilaisiin kalvolla eristettyihin osastoihin solun sisällä. Proteiinit voivat päätyä kierrätettäviksi takaisin solukalvolle tai hajotettavaksi tähän tehtävään erikoistuneissa lysosomeissa. Endosytoosin avulla on mahdollista vaikuttaa erilaisiin signaalivälitystapahtumiin. Solulle on myös välttämätöntä säädellä pinnalla olevien reseptorien määrää. Vaikka solujen signaali ja endosytoosi esitetään usein erillisinä prosesseina, nämä eläinsolujen toiminnat ovat kytkeytyneet tiiviisti ja kaksisuuntaisesti toisiinsa (ks. yleiskatsaus Sorkin ja von Zastrow, 2009).

### 1.1.1 Solunulkoiset viestimolekyylit

Monisoluisen eläimen solut voivat käyttää satoja erilaisia signaalimolekyylejä kommunikointiin. Proteiinit, pienet peptidit, aminohapot, nukleotidit, steroidit, retinoidit, rasvahapojohdannaiset ja liukoiset kaasut, kuten typpioksidi ja hiilimonoksidi ovat esimerkkejä erilaisista signaalimolekyyleistä. Suurin osa signaloivista soluista erittää viestimolekyylejensä eteenpäin eksosytoosilla. Eritettävät molekyylit ovat solun sisällä pienessä kalvon ympäröimässä rakkulassa, joka kiinnittyy ja liittyy solukalvolle. Kalvorakkulan sisältö vapautetaan solukalvon toiselle puolelle soluvälitilaan. Osa viestintämolekyyleistä vapautuu diffuusion avulla solukalvon läpi ja osa tulee solusta esille soluvälitilaan jääden signaloivan solun pinnalle. Tällöin vain vierekkäiset solut kommunikoivat keskenään.

Solujen välinen viestintä jaotellaan viiteen ryhmään signaalimolekyylin kulkeman matkan perusteella. Endokriinisessä signaloinnissa eritetyt hormonit kulkeutuvat verenkierron mukana laajalle alueelle eri kohdesoluille. Parakriininen signaali kohdistuu lähistöllä oleviin soluihin ja toimii paikallisesti. Tällöin eritettyjen signaalimolekyylin ei ole tarkoitus

toimia etäällä ja sen vuoksi molekyylit otetaan yleensä nopeasti kohdesoluihin, tuhotaan solun ulkopuolella olevilla entsyymeillä tai tehdään liikkumattomiksi soluväliaineessa (ECM, engl. extracellular matrix). Kontaktiin perustuva viestintä on yleistä esimerkiksi yksilönkehityksen aikana ja immuunijärjestelmässä. Autokriinisessä signaloinnissa solun erittämä viestimolekyyli voi kiinnittyä saman solun reseptoriin. Yksilönkehityksessä, tiettyssä solujen erilaistumisvaiheessa, on näin mahdollista vahvistaa solun kehityksellistä suuntaa. Autokriininen signalointi vahvistuu, kun joukko identtisiä, vierekkäisiä soluja tuottaa suuren määrän eritettyjä signaalimolekyylejä. Synaptinen viestintä esiintyy hermosoluissa. Kaikki signalointiin osallistuvat viestimolekyylit tarvitsevat solun, jonka pinnalle on syntetisoitu molekyylille erikoistunut reseptori.

### 1.1.2 Solukalvon entsyymireseptorit

Solukalvon reseptorien kolme suurinta ryhmää jaotellaan niiden signaalivälitysmekanismien mukaan. Ionikanavareseptorit toimivat nopeissa synaptisissa signaalivälityksissä sähköisesti varautuneissa soluissa. G-proteiinilinkitetyt reseptorit (GPCR, engl. G-protein coupled receptor) muodostavat suurimman ryhmän solukalvon reseptoreista. Ne voivat epäsuorasti joko aktivoida tai tehdä toimimattomiksi solukalvolle linkitettyjä entsyymejä tai ionikanavia. Vuorovaikutus reseptorin ja kohdeproteiinin välillä tapahtuu trimeerisen, GTP:tä sitovan, G-proteiinin välityksellä. Entsyymireseptorit ovat toiseksi suurin solukalvoseptoriryhmä. Aktivoituneina ne toimivat entsyymeinä suoraan tai liittyvät toisiin entsyymeihin aktivoiden niiden katalyyttisen ominaisuuden.

Entsyymireseptorit välittävät, solunulkoisten signaalien vasteena, soluille kehotuksen kasvuun, lisääntymiseen, erilaistumiseen tai selviytymiseen. Vasteen laukaisevia signaaliproteiineja kutsutaan kasvutekijöiksi, jotka toimivat yleensä hyvin pieninä pitoisuuksina paikallisesti. Häiriöt solujen lisääntymisessä, erilaistumisessa, selviytymisessä ja vaeltamisessa haittaavat kokonaisvaltaisesti solun toimintaa ja epänormaali signalointi entsyymireseptorien kautta on usein syynä esimerkiksi syöpäsairauksiin.

Solun sisällä proteiinien fosforylaatiolla ja defosforylaatiolla voidaan säädellä informaation kulkua tarkasti. Proteiinikinaasit ovat entsyymejä, jotka liittävät fosforiryhmiä ja proteiinifosfataasit hydrolysoivat fosforiryhmiä (ks. yleiskatsaus Denu ym., 1996). Kinaasit ja fosfataasit toimivat partnereina ja niiden aktiivisuus säätelee solun signaalitapahtumia. Kinaasien on todettu kontrolloivan signaalivasteen moninkertaistumista ja fosfataaseilla



oletetaan olevan tärkeä osuus signaalivasteen nopeuden ja keston kontrolloimisessa (ks. yleiskatsaus Tonks, 2006).

Solukalvon entsyymireseptorit ryhmitellään niiden toiminnan mukaan. Tyrosiinikinaasireseptoreilla (RTK, engl. reseptor tyrosine kinases) on tärkeä rooli solun ulkopuolelta tulevien signaaliproteiinien, kuten kasvutekijöiden ja hormonien, tulkitsemisessa solulle. Ligandin kiinnittyminen reseptoriin saa aikaan reseptorien autofosforylaation, kun reseptorien soluliman puoleiset domeenit fosforyloivat toinen toisensa. Tyrosiinikinaaseja aktivoivat reseptorit (engl. tyrosine-kinase-associated receptors) tarvitsevat toimintaansa solun sisällä olevia tyrosiinikinaaseja, jotka fosforyloivat erilaisia kohdeproteiineja, usein myös itse reseptoreja. Monet tämän ryhmän reseptoreista ovat riippuvaisia Src-proteiinikinaasista. Tyrosiinifosfataasireseptorit (engl. reseptorlike tyrosine phosphatases) siirtävät fosfaattiryhmiä tietyistä solun sisällä olevista signaaliproteiineista. Seriinireseptorit (engl. reseptor serine/threonine) fosforyloivat tiettyjä seriinejä ja treoniineja. Nämä reseptorit aktivoituvat dimeerisen, tranformoiva kasvutekijä  $\beta$ :n (engl. transforming growth factor- $\beta$ ) välityksellä. Reseptorien toiminta säätelee esim. yksilönkehityksen aikaisia rakenteita, lisääntymistä, solujen erilaistumista, soluväliaineen tuotantoa, solun kuolemaa ja immuunijärjestelmän toimintaa. Guonylaattisyklaasireseptorit (engl. receptor guanylyl cyclases) katalysoivat syklisen GMP:n tuotannon. Histidiinikinaasia aktivoivista reseptoreista (engl. histidine-kinase-associated receptors) löytyy esimerkkejä bakteereista, joiden kemotaksis välittyy reseptorien kautta. Kinaasiaktiivisuus välittyy bakteerin flagellan moottoriin ja saa aikaan bakteerin liikkumisen muutoksen.

### 1.1.3 Epidermaalinen kasvutekijäreseptori

Epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGFR, engl. epidermal growth factor receptor) (tunnetaan myös nimellä ErbB1) on yksi alaryhmä neljästä ErbB-proteiinista, joihin kuuluvat myös ErbB2, ErbB3 ja ErbB4 (tunnetaan myös nimillä HER1–HER4) reseptorit. ErbB2:lta puuttuu kyky vuorovaikutukseen ligandien kanssa ja ErbB3:n kinaasiaktiivisuus on puutteellinen. Vaikka näiltä kahdelta reseptorilta puuttuukin autonomia, ne muodostavat kompleksin muiden ErbB-reseptorien kanssa ja osallistuvat solun signalointiin (ks. yleiskatsaus Citri ja Yarden, 2006).

Kaikki ErbB-reseptorit ovat RTK-entsyymireseptoreja. ErbB-reseptoreilla on solunulkoinen ligandia sitova domeeni, yhden kerran solukalvon läpäisevä domeeni ja soluliman puo-

lella tyrosiinikinaasidomeeni. Kun epidermaalinen kasvutekijä (EGF, engl. epidermal growth factor) tai joku samaan sukuun luokiteltu peptidikasvutekijä kiinnittyy reseptoriin, seuraa reseptorin homo- tai heterodimeerin muodostuminen. Dimerisaatio stimuloi reseptorin oman tyrosiinikinaasiaktiivisuuden ja siitä seuraa tiettyjen tyrosiiniaminohappotähteiden autofosforylaatio reseptorin soluliman puoleisissa domeeneissa. Nämä fosforyloidut aminohappotähteet toimivat telakkana muille signaalimolekyyleille, jotka puolestaan osallistuvat signaloinnin kaskadiin solun sisällä (ks. yleiskatsaus Olayioye ym., 2000).

ErbB1-, ErbB3- ja ErbB4-reseptoreihin voi kiinnittyä 13 erilaista ligandia (ks. yleiskatsaus Citri ja Yarden, 2006). Ligandien ja reseptorien välisten vuorovaikutuksien spesifisyyksien määrä on valtava. Tästä seuraa ErbB-verkoston yhdistelmällinen luonne, joka tarkoittaa monien erilaisten homo- tai heterodimeeristen reseptorien muodostumista.

EGFR:ään kiinnittyy useita erilaisia ligandeja ja se voi muodostaa homodimeerisen tai kolme toimivaa heterodimeeristä reseptoria (ks. yleiskatsaus Citri ja Yarden, 2006). Solun sisällä tämä fosforyloitu EGFR värvää paikalle monia signaalivälitysproteiineja, kuten adaptoriproteiini GRB2:n (engl. growth-factor-receptorbound-2) ja Shc (engl. Src-homology-2-containing) -proteiinin. Nämä puolestaan vastaavat Ras-proteiinin värväämisestä ja mitogeeniaktivoituva proteiinikinaasin (MAPK, engl. mitogen-activated protein kinase) aktivaatiosta. Signaalivälittäjä ja transkription aktivaattori-5:n (STAT5, engl. signal transducer and activator of transcription-5) toiminta kytkeytyy myös EGFR:ään. Reseptorin C-terminaalinen osa sisältää tunnistuskohdan ubikitiiniligaasi Cbl:lle. Signaali EGFR:n välityksellä on negatiivisesti säädeltyä Cbl:n toimittaman ubikitiinylaation kautta.

Solun elinympäristön muutokset ravinteiden, kasvutekijöiden, sytokiinien ja vaurioittavien tekijöiden pitoisuuksissa sekä fysikaaliset stimulaatiot aktivoivat MAP-kinaasien kaskadin. Nisäkkäiden MAP-kinaasit voidaan jaotella neljään eri alaluokkaan, jotka ovat ERK 1/2 (engl. extracellular signal-regulated kinase), ERK5, JNK:t ja p38:t (ks. yleiskatsaus Cuen-da ja Rousseau, 2007). Olennaista näille kaikille MAPK signaalivälityspolulle on kolme porrastettua signaalimoduulia, jotka muodostuvat seuraavista proteiinikinaasista: MAPK kinaasi-kinaasit (MKKK:t), MAPK-kinaasit (MKK:t) ja MAPK:t. Nisäkkäillä tunnetaan neljä p38 MAP-kinaasia:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ja  $\delta$ . Soluissa p38 MAP-kinaasit toimivat monien fysiologisten toimintojen säätelijöinä.

Monissa kasvaimissa EGFR on mutatoitunut. Useimmin esiintyvät mutaatiot tehostavat reseptorin omaa tyrosiinikinaasiaktiivisuutta tai niiltä on hävinnyt säätelydomeeni, jolla voitaisiin ehkäistä reseptorin toimintaa (ks. yleiskatsaus Pines ym., 2010). Näiden mutatoituneiden, jatkuvasti aktiivisten reseptorien toiminta jatkuu signaalivälityksen alavirtaan. Syöpälääkkeet voivat kohdistua EGFR-signaalivälityksen katkaisuun. Sekä EGFR-kohdennetut kinaasien estäjät että monokloonalliset vasta-aineet reseptoreille voivat toimia syövän hoitokeinoina. Mutanttien reseptorien signaalivälityksen alavirran ymmärtäminen on tärkeää parannettaessa tai kehitellessä EGFR:lle kohdistuneita terapioita ja lääkkeitä.

ErbB-reseptorien verkosto on yksi laajimmin tutkituista signaalivälitysalueista ja siitä on kirjoitettu kymmeniä tuhansia tieteellisiä artikkeleja, joissa kuvataan satoja reseptorien vuorovaikutuksia. ErbB-verkostoa voidaan kuvailla solun vankaksi informaation käsittelysystemiksi, jolla on monimutkainen, modulaarinen, yltäkylläinen ja systeemiä kontrolloiva luonne (ks. yleiskatsaus Citri ja Yarden, 2006). Tässä tutkielmassa päähuomio kiinnittyy EGFR:n internalisaatioon, osastoitumiseen solun sisällä, hajotukseen ja vuorovaikutukseen  $\alpha\beta1$ -integriinin kanssa.

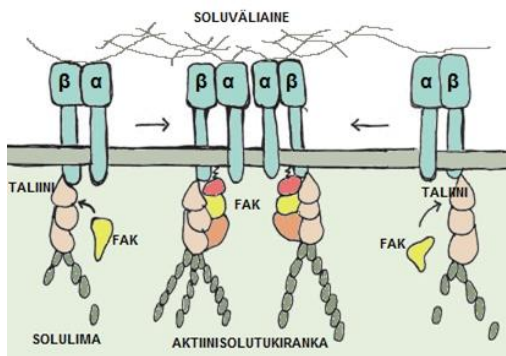
#### 1.1.4 Integriinit

Integriinit ovat reseptoreja, joita solu käyttää kiinnittymään ECM:ään, kuten kollageeneihin, lamiineihin ja fibronektiiniin. Verisoluilla integriinit auttavat soluja kiinnittymään myös toisiin soluihin. Heterodimeeriset,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -osista muodostuvat reseptorit linkittävät ECM:n solun sisällä olevaan aktiinisolutukirankaan. Heterodimerisaatio 19 eri  $\alpha$ -integriiniosasta ja 8  $\beta$ -integriiniosasta voi tuottaa 25 erilaista  $\alpha\beta$ -heterodimeeriä, jotka toimivat reseptoreina ECM:n molekyylielle melkein kaikissa solutyypeissä (ks. yleiskatsaus Caswell ym., 2009). Reseptorien  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaysiköillä on suuri N-terminaalinen, solun ulkopuolella oleva domeeni, yhden kerran solukalvon läpäisevä domeeni ja yleensä lyhyt, C-terminaalinen soluliman puoleinen domeeni (Zhu ym., 2008).

Integriinit välittävät ECM:n kemialliset ja mekaaniset viestit solulle. Nämä signaalit säätelevät soluliman kinaasien aktiivisuutta, kasvutekijäreseptoreja, ionikanavia ja kontrolloivat solun sisällä aktiinisolutukirangan organisoitumista. Integriinien signaalit osallistuvat solusyklin säätelyyn ja ohjaavat solua lisääntymään, erilaistumaan, elämään tai kuolemaan.

Integriinit eroavat solupinnan liukoisten signaalimolekyylien reseptoreista mm. siinä, että ne tarttuvat ligandehinsa löyhemmin ja esiintyvät solukalvolla kymmen- tai satakertaisesti suurempina pitoisuuksina (ks. yleiskatsaus Caswell ja Norman, 2008). Suuri määrä heikkoja kiinnittymiskohtia takaa solulle mahdollisuuden liikkumiseen. Integriinit aktivoivat myös viestinvälityksen solun sisällä. Siellä integriinit välittävät alavirtaan signaaleja mm. Rho GTPaasien, Src:n, proteiinikinaasi B:n (PKB, engl. protein kinase B, toiselta nimeltään Akt) ja MAPK:n välityksellä (ks. yleiskatsaus Caswell ja Norman, 2008).

Integriinit voivat signaloida solukalvon lävitse molempiin suuntiin (kuva 1). Solun ulkopuolista integriinien kiinnittymisaktiivisuutta säädelään solun sisäpuolelta (engl. inside-out signaling) ja ECM:ään tarttumien saa aikaan signaaleja, jotka siirretään solun sisälle (engl. outside-in signaling) (ks. yleiskatsaus Giancotti ja Ruoslahti, 1999). Monet integriinien signalointitoiminnoista tapahtuvat soluliman tyrosiinikinaasi-proteiinin, FAK:n (engl. focal adhesion kinase) välityksellä. Kun integriinit klusteroituvat eli kerääntyvät rykelmiksi solukalvolle ECM:n kontaktissa, FAK värähtyy paikalle solun sisällä olevien ankkuri-proteiinien, kuten taliinin, välityksellä.



Kuva 1. Integriinien kiinnittyminen soluväliaineeseen saa aikaan reseptorien klusteroitumisen ja solutukirankaan yhtymisen. Tämä lisää integriinien klusteroitumista ja soluväliaineen organisoitumista positiivisella feedback-syteemillä. (Mukailtu artikkelista Giancotti ja Ruoslahti 1999)

Integriinit toimivat signaalireseptoreina, mutta kasvutekijäreseptoreista poiketen niillä ei ole omaa entsyymaattista aktiivisuutta. Integriinien signalointi perustuu solun sisällä olevien proteiinien, kuten taliinin ja kindliinien, kiinnittymiseen reseptorin  $\beta$ -alaysikköön soluliman puolella (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010). Heterodimeeristen integriinien solun sisällä olevat domeenit voivat vaihdella konformaatiota niin, että ne ovat joko yhdessä tai erillään. Integriinien solun ulkopuolella olevien domeenien konformaatio ja halukkuus tarttua ligandiinsa ovat dynaamisesti säädeltyjä inside-out-signaloinnilla (Zhu ym., 2008). Kytkeytymällä solun aktiinisolutukirankaan integriinit saavat aikaan myös solun lujan

kiinnittymisen ECM:ään ja takaavat lamellipodia-työntymille hyvän pidon ja liikkumakyvyn. Liikkuvilla soluilla kiinnittyvyys on paikallisesti ja ajallisesti säädeltyä. Reseptorit ovat aktivoituneita lähellä lamellipodioitten kärkeä ja toimimattomia solun perällä helpottaen taakse jäävän ulokkeen sisäänpäin vetämistä ja reseptorien internalisaatiota (Zhu ym., 2008).

Integriinien sitoutuminen ligandiinsa riippuu reseptorien konformaatiosta (Zhu ym., 2008). Taipuneessa muodossa reseptorien kiinnittyminen on heikkoa. Aktiinifilamenttien polymerisoidessa integriinien  $\beta$ -alaysikön soluliman puoleinen domeeni kiinnittyy filamentteihin taliiniin tai kindliinien välityksellä. Sivuttainen venyminen solun pinnalla aiheuttaa integriinien solun ulkopuolisten osien ojentautumisen avoimeen muotoon. Kiinnittymien ECM:ään lisää sivuttaista vetovoimaa ja suosii lujempaa kiinnittymistä ligandiin, soluliman puoleisten  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaysiköiden domeenien etääntymistä toisistaan ja avoimen konformaation muotoa. Aktiinitukirangan hajoaminen poistaa sivuttaisen vetovoiman ja integriinien solun sisällä olevat  $\alpha$ - ja  $\beta$ -alaysiköiden domeenit vetäytyvät uudelleen toistensa lähelle ja reseptori pakottautuu suljettuun muotoon takaisin, jolloin ligandi irtoaa reseptorista. Vetovoimien ja ligandin puuttuessa integriinit esiintyvät suljetussa muodossa.

Aktiivisessa, ojennetussa muodossa  $\alpha 2$ -integriinien on todettu kiinnittyvän eri kollageenin muotoihin vähemmällä valikoivuudella kuin suljetussa muodossa (Tulla ym., 2008). Reseptorien aktivaatio voi olla perussy siihen, miksi integriinit pystyvät välittämään lujan kiinnittymisen alustaan myös vähemmän sopivien ligandien kautta. Tutkimuksissa on päätelty, että solun kiinnittyminen alustaan alkaa integriinin tunnistaessa tarkasti tietyn motiivin ECM:n proteiineissa. Ensimmäisen ligandin havaitseminen johtaa integriinien kerääntymiseen ja keskittyneen kiinnittymiskohdan (FC, engl. focal contact) muodostumiseen. Tämä reseptorien klusteroituminen voi johtua inside-out signaaleista, joita ensimmäiseen ligandiin kiinnittyminen saa aikaan. Myöhemmin kiinnittyminen vahvistuu, koska aktiivisessa muodossa esiintyvät integriinit ovat kykeneviä tarttumaan myös suureen määrään muita potentiaalisia ligandeja.

Integriinien luonnollisten ligandien lisäksi monet virukset käyttävät reseptoreja päästäkseen solun sisälle (Jokinen ym., 2010). On mahdollista, että reseptorit vaikuttavat suurelta osin viruksen endosyyttiseen reittiin.  $\alpha 2 \beta 1$ -integriinin on todettu toimivan pikornaviruksiin kuuluvien echo-virusten (EV) reseptorina (Marjomaki ym., 2002). Integriinit ovat hyviä

reseptoreja viruksille, koska integriinejä esiintyy runsaasti solun pinnalla ja ne tarttuvat suhteellisen heikosti luonnollisiin ligandehinsa (Jokinen ym., 2010). Virusinfektio alkaa viruksessa olevien partikkelien kiinnittymisestä tiettyihin solupinnan reseptoreihin. Monilla viruksilla on pintaproteiineja, jotka sisältävät arginiini-glysiini-asparagiinihappo motiivin (RGD), joka tunnetaan hyvin joidenkin integriinien tarttumiskohtana. Kollageenireseptori  $\alpha 2\beta 1$ -integriini tarttuu EV1:een RGD-riippumattomalla tavalla.

Integriinien signaalivälityksen avulla voidaan myös käynnistää viruksen endosytoosi. Integriinien klusteroituminen joko kollageenin tai vasta-aineiden vaikutuksesta johtaa nopeaan, ohimenevään p38 MAPK-signaalivälityksen aktivaatioon (Jokinen ym., 2010).  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin  $\alpha 2$ -domeenissa E336 (glutamaatti 336) on tärkeä osatekijä  $\alpha 2\beta$ -integriinin välittämässä p38 MAPK-aktivaatiossa. Jos E336 mutatoidaan, estyy integriinin konformaationaaliset muutokset avoimeen muotoon, mutta klusteroituminen ei esty. Integriinien E336-riippuvaisen konformaationaalisten muutosten osoittajana voidaan pitää p38-polun aktivaatiota. Tutkimuksissa on osoitettu, ettei  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien klusteroituminen EV1:llä merkittävästi aktivoinut p38-polkua infektion aikaisessa vaiheessa. Nämä tulokset osoittavat, että  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin luonnollisten ligandien ja EV1:n aktivaatiomekanismien välillä on perusteellisia eroja. Virus ei vaadi integriinien konformaationaalista muutosta, kiinnittyy aktivoimattomaan, taipuneeseen muodossa olevaan integriiniin ja saattaa päästä soluun käyttäen hyödykseen signaalivälityksen aktivaatiota, joka on riippuvaista reseptorien klusteroitumisesta.

Integriineilla on toiminnallisesti erikoislaatuisia piirteitä verrattuna tavallisiin liukoisten ligandien reseptoreihin (Schwartz ja Ginsberg, 2002). Integriinien tavalliset ligandit ovat liikkumattomia, joten niiden välittämä signaali tapahtuu topografisesti erilliseltä alueelta muuhun solukalvoon verrattuna. Lisäksi integriinien soluliman puolella olevat osat ankkuroituvat solun aktiinitukirankaan ja tarjoavat näin fyysisen kytkeytymisen solun sisäisten sekä ulkoisten filamenttien välille. Integriineilla on myös kyky edellä mainittuun inside-out-signaaliin, joten ne voivat säädellä hanakkuuttaan tarttua ligandehinsa konformaationaalisten muutosten avulla. Integriinien klusteroituminen myös lisää reseptorien hanakkuutta ligandiin kiinnittymiseen. Signaalivälitys integriineilla toimii kahteen suuntaan. Integriinien kohdalla myös mekaanisilla voimilla voidaan vaikuttaa solutukirankaan.

## 1.2 Solun vesikkeliliikenne

Eukaryoottisten solujen sisälle on kehittynyt hienostunut osastoituminen, jossa kalvot erottavat osastoja toisistaan. Solu voi ottaa sisäänsä nestettä, makromolekyylejä ja tiettyjä aineita endosytoosin avulla. Tässä tapahtumassa materiaali tulee otetuksi solun sisälle endosyyttisessä vesikkelissä, joka kuroutuu solukalvolta.

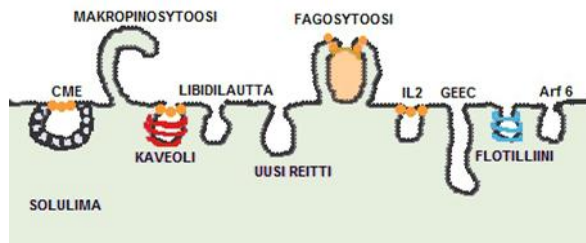
Endosytoosin vastakohtana kalvojen ympäröimiä osastoja käytetään eukaryoottisilla soluilla myös biosynteettisellä eksosytoosipolulla. Kalvojen ympäröimät osastot mahdollistavat uusien, solun valmistamien proteiinien, hiilihydraattien ja lipidien säätelyn sekä niiden jakelun solun ulkopuolelle. Endosytoosin kautta solukalvoa kulkeutuu paljon solun sisälle. Eksosytoosin avulla kalvo ja siinä olevat libidit sekä proteiinit kierrätetään takaisin solukalvolle. Sekä endosyyttisellä että eksosyyttisellä polulla molekyylejä kuljetetaan osastosta toiseen kalvon ympäröimissä kuljetusvesikkeleissä, jotka voivat olla pyöreitä, epäsäännöllisen muotoisia tai luovuttajaosastosta peräisin olevia fragmentteja. Solun sisällä hajotettaviksi tarkoitettut makromolekyylit voidaan toimittaa kalvojen ympäröimille lysosomeille, joissa makromolekyylejä hajottavat entsyymit ovat eristettyinä. Transsytoosissa solun sisälle otetut vesikkelit kulkevat läpi solun ja vesikkelien sisältö vapautetaan solun toiselle pinnalle. Vaeltavilla soluilla joidenkin solukalvon proteiinien on polarisoituva meno suuntaan. Polarisatiota voidaan pitää yllä joka diffuusiota estämällä tai aktiivisella endo-eksosytoosilla, jolla kohdennetaan tietyt proteiinit tietylle solupinnan alueelle (ks. yleiskatsaus Jones ym., 2006).

### 1.2.1 Endosytoosi

Nisäkässolujen endosyyttinen systeemi on monimutkainen, kalvojen ympäröimien osastojen verkosto. Kalvoliikenteen perustoimintoihin kuuluu lastin värvääminen, vesikkelin muodostuminen, vesikkelin kuljetus, vesikkelin kytkeytyminen ja yhtyminen. Näihin tapahtumiin osallistuu suuri määrä erilaisia proteiineja ja libidejä (ks. yleiskatsaus Liberali ym., 2008b).

Eläinsolujen endosyyttiset mekanismit voidaan jakaa kahteen pääryhmään sen mukaan, mitä solun sisälle otetaan (kuva 2) (ks. yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009). Pino-  
sytoosissa otetaan solun sisään nestettä, siihen liuenneita aineita ja pieniä partikkeleja. Pino-  
sytoosi käsittää klatriinivälitteisen endosytoosin (CME, engl. clatrin-mediated endocy-

tosis), makropinosytoosin, kaveoli / lauttavälitteisen endosytoosin ja muutamia muita mekanismeja, joista osa käyttää dynamiin-2:sta endosyyttisen painauman sulkijana. Fagosytoosi on rajoittunut tietyille fagosytoosiin erikoistuneille soluille. Sen avulla otetaan soluun reseptoriin riippuvaisesti suuret partikkelit kuten bakteerit.



Kuva 2. Endosyyttinen mekanismi voi toimia eläinsoluilla monella eri tavalla. Useimmat niistä määritellään pinosytoosiksi, johon kuuluu esim. klatriinivälitteinen endosytoosi (CME, engl. clathrin-mediated endocytosis), makropinosytoosi, kaveoli/lipidilauttavälitteinen mekanismi ja joitakin uusia mekanismeja kuten dynamiini-2:ta käyttäviä mekanismeja. Isot partikkelit otetaan soluun fagosytoosilla. Tunnettuja reittejä ovat myös interleukiini 2- (IL2, engl. interleukin 2) ja GEEC-reitit (engl. GPI-AP-enriched early endosomal compartments) sekä flotilliini- ja ADP-ribosylaatiotekijä 6 reitit (Arf6, engl. ADP-ribosylation factor 6). (Mukailtu artikkelista Mercer ym., 2010)

Nisäkässoluilla esiintyy samanaikaisesti useita eri endosyyttisiä reittejä (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). Niiden tarkempi jaottelu perustuu siihen, mitkä lipidit ja proteiinit ovat kullekin reitille välttämättömiä. Edellä mainittujen lisäksi muita tunnettuja, reittejä määritteleviä proteiineja ovat esim. GRAF1 (engl. GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1), kinaasit, pienet G-proteiinit ja aktiini. Osa endosytoiduista aineista käyttää vain yhtä reittiä, mutta suurin osa käyttää useita eri reittejä.

Endosyyttinen mekanismi vaatii solukalvoa muokkaavien proteiinien toimintaa (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). Ennen endosyyttisen vesikkelin muodostumista tarvitaan proteiineja, jotka saavat solukalvon kaareutumaan ja muodostuneen kuopakkeen irtoamaan solukalvolta. Sellaisia proteiineja ovat esimerkiksi ENTH (engl. epsin N-terminal homology) -domeenin sisältämät proteiinit, BAR-superperheen proteiinit, arf-perheen pienet G-proteiinit, aktiinin polymerisaatiota nukleoivat proteiinit ja dynamiinisuperperheen proteiinit.

Dynamiini on tärkeä tekijä esim. CME:ssä ja kaveoliinista riippuvaisessa endosytoosissa (ks. yleiskatsaus Gould ja Lippincott-Schwartz, 2009). Vuorovaikutukset adaptoriproteiiniin ja GTPaasi dynamiinin välillä johtaa dynamiinirenkään muodostumiseen valmistuvien klatriinipäällysteisten kuopakkeiden (CCP, engl. clathrin coated pit) ympärille. Tästä seuraa kuopakkeen irtoaminen solukalvolta ja vesikkelin syntyminen. Solun sisälle pääsemi-



sen jälkeen klatriini irtoaa vesikkeleistä ja rakkulat yhtyvät aikaisiin endosomeihin (EE, engl. early endosome). Tätä polkua käyttävät kierrätettävät reseptorit kuten tranferriini- ja LDL-reseptorit (engl. low density lipoprotein). Kaveoliinista riippuvainen endosytoosi on tärkeää esim. myrkkyjen, virusten, bakteerien ja kiertelevien proteiinien solun sisälle ottamisessa. Dynamiinia tarvitaan myös kaveoliinia sisältävien vesikkeliin, kaveosomien, muodostumiseen ja irtoamiseen solukalvosta. Yksi edellisistä poikkeava internalisaatiotapa, joka ei tarvitse klatriinia, kaveoliinia eikä dynamiinia, on GTPaasi Arf6:n aktivaatiota vaativa mekanismi. Tällä mekanismilla internalisoidaan esim. integriinejä ja glykosyylifosfatidyyli-inositoli linkitettyjä proteiineja (GPI-AP, engl. glycosylphosphatidylinositol-anchored protein).

Tärkeimpiä endosyyttisiä soluosastoja ovat aikaiset EE:t, myöhäiset ensodomit (LE, engl. late endosome) ja lysosomit (ks. yleiskatsaus Mercer ym., 2010). Kypsyvää EE:tä, joka on välimuoto EE:stä ja LE:stä, voidaan nimetä ME:ksi (engl. maturing endosome), koska ne sisältävät Rab5:sta ja Rab7:ää, proteiineja, jotka voivat toimia merkkeinä eri endosyyttisille osastoille. Endosomi-systeemi kytkeytyy tiukasti solun erityssysteemiin vesikkeliin sukkuroidissa endosomien, trans-Golgi verkoston ja solukalvon välillä.

Monivesikkelinen rakenne (MVB, engl. multivesicular body) määritellään organelliksi, joka on muodostunut kalvon eristämästä alueesta solulimassa ja joka sisältää monia 40–90 nm kokoisia sisävesikkelejä (ILV, engl. intraluminal vesicle) (ks. yleiskatsaus Raiborg ym., 2003). MVB:t muodostuvat EE:stä ja pitävät sisällään molekyyliä, jotka ovat internalisoitu endosytoosin välityksellä. Ne saavat myös biosynteesin tuotteita trans-Golgi verkostolta, esimerkiksi lysosomaalisten entsyymien esiasteita. Useimmissa solutyypeissä aikaiset MVB:t kypsyvät myöhäisiksi MVB:ksi tai yhtyvät niihin. Myöhäiset MVB:t puolestaan liittyvät lopulta lysosomeihin. Solukalvon läpäisevien proteiinien lajittelu topologisesti solulimasta erilliseen, rajoitettuun ympäristöön, palvelee oletetusti muutamaa tärkeää tehtävää. Ensiksi, MVB:n sisällä ja ILV:n kalvolla olevat, solukalvon läpäisevät proteiinit tulevat alttiiksi lysosomaalisten hydrolaasien toimittamalle hajotukselle. Toiseksi, MVB:n sisällä olevat ILV:t voivat auttaa säilymään niitä proteiineja, jotka on tarkoitettu vapauttaa solun ulkopuolelle jonkun säätelymekanismin turvin. Kolmanneksi, reseptorien signalointi, on ainakin teoriassa, mahdollista MVB:n solulimasta erottavalla kalvolla, muttei ole mahdollista ILV:stä käsin.

Endosyyttisellä mekanismilla solu voi kontrolloida lipidien ja proteiinien kokoonpanoa solukalvolla sekä säädellä vuorovaikusta ympäristönsä kanssa. Endosytoosilla säädellään myös mitoosia, antigeenin esittelyä, solun vaeltamista ja signaalikaskadeja (ks. yleiskatsaus Doherty ja McMahon, 2009). Endosytoosia luonnehdittiin pitkään mekanismiksi, jonka avulla aktiiviset signaalireseptorit johdetaan hajotukseen. Nykyisin on vakiintunut käsitys, että minkä tahansa signaalivälityksen toiminta on solun sisäisestä tapahtumapaikasta riippuvaista. Endosomit ovat todettu avain paikoiksi signaalikompleksien kokoontumiselle (ks. yleiskatsaus Gould ja Lippincott-Schwartz, 2009). Reseptorikinaasit, muut kalvoihin liittyvät kinaasit, signaalivälityksen adaptoriproteiinit ja signaali-GTPaasit voivat sijoittua tiettyihin vesikkeleihin ja osastoihin solun sisällä (ks. yleiskatsaus Sorkin ja von Zastrow, 2009). Nämä molekyylit voidaan tuoda toistensa lähetyville vesikkelien kuljettamina ja kalvojen yhtymisen avulla. Samoin signaloivat molekyylit voidaan erottaa toisistaan kalvojen jakautumisen myötä, tehdä toimimattomiksi tai viedä hajotettaviksi endosyyttisen kalvosysteemin avulla. Endosytoosilla onkin tärkeä rooli signaalivälityksessä.

Endosyyttinen systeemi tarjoaa signaalivälityksen reaktioille sekä joustavuuden että muuntautumiskyvyn tilassa ja ajassa (ks. yleiskatsaus Liberali ym., 2008). Tuhannet proteiinit osallistuvat signaalivälityksen tapahtumasarjaan ja endosytoosia kontrolloiva koneisto muodostuu sadoista proteiineista (ks. yleiskatsaus Sorkin ja von Zastrow, 2009). Joillakin proteiineilla on rooli molemmissa tapahtumasarjoissa. Esimerkiksi adaptoriproteiinilla voi olla kaksi tehtävää.  $\beta$ -arestin välittää aktivoituneen GPCR:n endosytoosia kiinnittymällä klatriiniin ja sen adaptoriproteiinkompleksiin, AP2:een. Samalla  $\beta$ -arestin osallistuu signaalivälitykseen tarjoamalla tuen MAPK-signaalivälityksen komponenteille. Jotkut entsyymit katalysoivat näennäisesti kahta erillistä, itsenäistä reaktiota. Kinaasien, esimerkiksi proteiinikinaasi-C:n, tiedetään vaikuttavan signaalivälityskaskadeissa, mutta ne voivat olla osallisina myös reseptorien endosytoositapahtumassa.

Taudinaiheuttajat ovat myös oppineet hyödyntämään endosytoosia päästäkseen solun sisälle. Monet integriinejä reseptoreinaan käyttävistä viruksista internalisoidaan CME:llä ja niitä löytyy myöhemmin endosomeista (Jokinen ym., 2010). Jotkut virukset tunkeutuvat soluun makropinosomeissa. Toiset virukset käyttävät muita mekanismeja internalisaatioon, mutta osa niistäkin voi tarvita makropinosytoosia tunkeutuessaan soluun (ks. yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009). Nämä huomiot tuovat esiin sen, että virukset voivat valikoivasti muokata erilaisia endosyyttisiä mekanismeja. Pieni, vaipaton EV1 kiinnittyy  $\alpha 2\beta 1$ -

integrointiin solukalvolla ja tulee internalisoiduksi reseptoreineen solun sisälle (Karjalainen ym., 2008). Kahden tunnin kuluessa internalisaatiosta EV1 on kulkeutunut kaveosomeihin, mutta internalisaation alku vaiheissa suurin osa viruksista on riippumaton kaveoleista, jotka ovat pieniä, solun sisälle kuroutuvia, kaveoliiniproteiinia sisältäviä kuopakkeita solukalvolla. Internalisaatio tapahtuu lipidilauttojen välityksellä putkimaisiin vesikkeleihin. Tutkimusten perusteella voidaan päätellä, että virus käyttää hyödykseen makropinosytoosia (ks. yleiskatsaus Mercer ja Helenius, 2009).

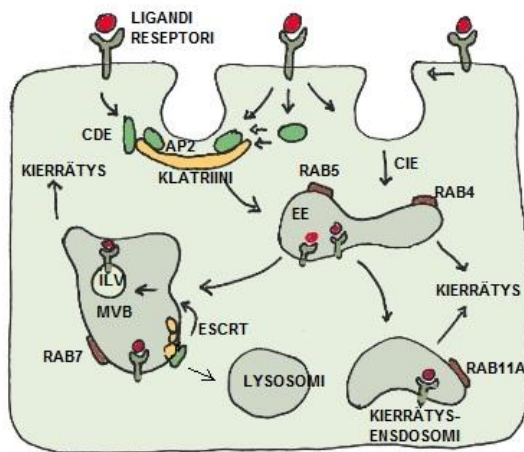
Virusten pinnalla on isäntäsolun reseptoreihin kiinnittyviä kapsidiproteiineja tai viruksen vaipasta kohoavia glykoproteiiniulokkeita (ks. yleiskatsaus Mercer ym., 2010). Reseptorien ja virusosien yksittäiset vuorovaikutukset ovat yleensä heikkoja, mutta useiden vuorovaikutusten syntyessä kiinnittyminen voimistuu ja tarttuminen soluun on käytännössä peruuttamaton. Tämä moneen kohtaan kiinnittyminen johtaa reseptorien klusteroitumiseen ja signaalivälityksen aktivoitumisen. Tietty virukset tarttuvat tiettyihin reseptoreihin. Tämä reseptorien spesifisyys määrittää myös viruksen endosyyttisen reitin valinnan ja solun sisällä kulkeutumisen. Esimerkiksi parvovirus, joka tarttuu transferriinireseptoriin, käyttää klatriinivälitteistä reittiä solun sisään tunkeutumisessa ja kykenee palautumaan solun pinnalle takaisin reseptorin kanssa. Rhinovirukset, jotka kiinnittyvät LDL-reseptoreihin, irtoavat reseptoreistaan EE:ssä ja kulkeutuvat LE:hin.

Kun virus on internalisoitunut endosyyttisessä vesikkelissä, sen kulku solun sisällä voi seurata reseptorin fysiologisten ligandien kuten ravinteet, hormonit, kasvutekijät ja ECM:n komponentit, reittiä (ks. yleiskatsaus Mercer ym., 2010). Käytössä oleva endosomaalinen systeemi vastaa molekyylien lajittelusta, kierrätyksestä, hajotuksesta, prosessoinnista tai soluun tulevien aineiden transsytoosista.

### 1.2.2 Tyrosiinikinaasireseptorien kalvoliikenne

Ligandin kiinnittyminen reseptoriin aktivoi monen signaloivan reseptorin endosytoosin (ks. yleiskatsaus Sorkin ja von Zastrow, 2009). Sekä EGFR:t että useat GPCR:t voidaan ottaa solun sisällä CME:llä. On myös osoitettu, että RTK:t tulevat solun sisään klatriinista riippumattomalla endosytoosilla (CIE, engl. clathrin-independent endocytosis). Endosyyttiset vesikkelit, jotka ovat muodostuneet joko CME:llä- tai CIE-mekanismilla, yhtyvät EE:ssä. Endosomaalista liikehdintää kontrolloidaan useilla Rab-proteiineilla, jotka ovat Ras-superperheen pieniä GTP:tä sitovia proteiineja. Jokainen GTP-kiinnitteinen Rab-

proteiini sijoittuu tietyn tyyppiseen endosomiin ja värvää muita toiminnallisia proteiineja (kuva 3). Sen jälkeen kun reseptorit ovat saapuneet Rab5:tä sisältäviin EE:hin, reseptorit voidaan nopeasti kierrättää takaisin solukalvolle Rab4-riippuvaisella mekanismilla, kuljettaa kierrätysosastoon, joka sisältää Rab11A:ta, tai reseptorit voivat jäädä endosomiin, joka kypsyy MVB:ksi ja LE:ksi. ILV:t muodostuvat MVB-rakenteiden sisälle kalvon sisäänpäin kääntyneistä painaumista ESCRT-kompleksien (engl endosomal sorting complex required for transport) osallistuessa tapahtumaan. Kypsymien EE:stä LE:ksi edellyttää Rab7 värväytymistä ja niiden endosomaalisten osatekijöiden poistumista, jotka aiheuttavat reseptorien kierrätyksen. Jos reseptorit on tarkoitus hajottaa, ne on ohjattu ILV:hin MVB:n sisällä. Sen jälkeen MVB:t tai LE:t yhtyvät lysosomeihin, joissa tapahtuu reseptorien lopullinen hajoitus proteolyyttisten entsyymien toimesta.



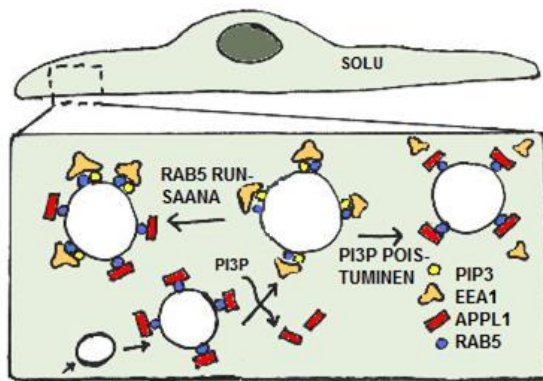
Kuva 3. Tyrosiinikinaasireseptorien joko CME- tai CIE-mekanismilla muodostuneet vesikkelit yhtyvät EE:ssä. Rab-proteiinit kontrolloivat endosyyttistä liikehdintää. Jokainen GTP-kiinnitteinen Rab-proteiini sijoittuu tietyn tyyppiseen endosomiin. EE:hen, joka sisältää Rab4:sta, saapumisen jälkeen reseptorit voidaan kierrättää takaisin solukalvolle Rab4-riippuvaisella mekanismilla, kuljettaa kierrätysosastoon, joka sisältää Rab11A:ta, tai reseptorit voivat jäädä endosomiin, joka kypsyy MVB:ksi. ILV:t ovat muodostuneet MVB:n kalvon sisäänpäin kääntyneistä painaumista ESCRT-kompleksien (engl endosomal sorting complex required for transport) osallistuessa tapahtumaan. Kypsymien EE:stä LE:ksi edellyttää Rab7-proteiinin osallisuutta. Hajotettaviksi menevät reseptorit ohjataan ILV:hin MVB:n sisällä. Sen jälkeen MVB:t yhtyvät lysosomeihin, joissa proteolyttiset entsyymit hajottavat reseptorit. (Mukailtu artikkelista Sorkin ja von Zastrow, 2009)

Endosyyttisen kuljetuksen aikana reseptorit voidaan defosforyloida, ubiquitinyloida ja erottaa ligandistaan (ks. yleiskatsaus Sadowski ym., 2009). Näillä tapahtumilla on vaikutusta signaaloinnin heikentymiseen. Tapahtumat, jotka johtavat reseptorin joko hajotukseen tai kierrätykseen, päättävät solun ylläpitämän vapaiden reseptorien määrän ja vaikuttavat siten ligandin stimuloiman vasteen voimakkuuteen.

Sellaisissa systeemeissä, joissa aktiivinen reseptori internalisoidaan solun sisälle nopeasti, on tärkeää säilyttää reseptorin mahdollisuus signaalivälitykseen myös endosytoosin jälkeen (ks. yleiskatsaus Sorkin ja von Zastrow, 2009). Reseptorin aktiivisuuden säilyttäminen endosomin muodostumisen jälkeenkin varmistaa signaloinnin keston ja intensiteetin. Muutamilla RTK:illa, esimerkiksi EGFR:lla, ligandit ovat kiinnittyneinä reseptoreihin, reseptorit ovat fosforyloituja ja aktiivisia aina LE:hen liikkumiseen asti. Suurin osa signaloinnista EGFR:n välityksellä tapahtuu endosomaalisesta osastosta käsin (Wiley, 2003). Reseptorin sijoittumisosasto määrittää stimuloitun EGFR:n välittämää signaalia (Irwin ym., 2010). Erilainen signaali riippuu siitä, sijoittuuko EGFR endosomeihin, mitokondrioon, tumaan vai solukalvolle. Sijoittuminen endosomeihin johtaa erityisesti ligandi-riippuvaaseen ERK:n aktivaatioon ja p38 MAPK -signaalivälityspolulle. Solukalvolla EGFR toimii sekä MAPK että PKB -signaalivälitysten muokkaajana. Tumassa reseptori voi toimia transkriptio-tekijänä. Solulimassa tapahtuvan signaalivälityksen lisäksi EGF-reseptoreita onkin havaittu tumassa (ks. yleiskatsaus Wang ym., 2010b). Tumassa sijaitsevan EGFR:n ja syövän eri muotojen välillä on todettu olevan korrelaatiota. Reseptorien sijainti tumassa voi olla syy siihen, miksi EGF-reseptoreja vastaan kohdennetut syöpälääkkeet eivät tehoa. Taaksepäin suuntautuva liikenne Golgista solulimakalvostoon (ER, engl. endoplasmic reticulum) säätelee EGFR:n kuljetusta tumaan (Wang ym., 2010a).

Pienillä GTPaaseilla ja fosfoinositideillä on tärkeä osuus endosyyttisen liikehdinnän suunnanäyttäjinä. Pieni GTPaasi Rab5 ja 3-fosforyloitu fosfoinositidi sijaitsevat EE:ssä ja koordinoivat muita proteiineja, jotka ovat tärkeitä EE:n toiminnalle ja tulevalle kypsymiselle (Zoncu ym., 2009). Näihin tärkeisiin proteiineihin kuuluvat esim. EEA1:t (engl. early endosomal antigen 1), joiden tehokas värväytyminen paikalle perustuu yhtäaikaiseen kiinnittymiseen sekä Rab5:een että fosfatidyli-inositoli 3-fosfaattiin (PI3P, engl. phosphatidylinositol 3-phosphate). Endosomien luonnetta määrittää myös toiset Rab5:n värväämät proteiinit. Klassisista EEA1-proteiinia sisältävistä endosomeista poiketen näiden endosomien kalvolta löytyvät adaptoriproteiinit APPL1 ja -APPL2 (kuva 4). APPL-proteiinit tarttuvat Rab5:een, lipidikaksoiskalvoon ja reseptorien, kuten EGFR:n, soluliman puoleiseen osaan. APPL-endosomeihin muodostuu signaalikomplekseja, jotka säätelevät MAPK- ja Akt-signaalivälitystä. APPL1:n puuttuminen vaikuttaa merkittävästi MAPK- ja Akt-signaaliin johtaen mm. solujen kasvavaan apoptoosiin. APPL-endosomien, EEA1-endosomien, PI3P:n ja Rab5:n välisiä suhteita on tutkittu häiritsemällä fosfoinositidejä.

Tulosten mukaan APPL-endosomit, jotka osallistuvat kasvutekijäreseptorien kuljetukseen ja signalointiin, edustavat väliaikaista ja hyvin varhaista endosyyttistä vaihetta, jossa vesikkelien kuljetusmekanismina toimii sekä CME että CIE. Tutkimukset ovat osoittaneet, että PI3P kontrolloi APPL-endosomien kypsymistä ja signalointiominaisuuksia. APPL1:n ja APPL2:n on todettu osallistuvan myös solukalvon ja tuman väliseen signaalivälitykseen (Miaczynska ym., 2004). Endosomaalinen osasto, joka sisältää Rab5:sta ja APPL-proteiineja, toimii signaalivälityksen välivaiheena solukalvon ja tuman välillä. Molemmat APPL-proteiinit ovat tärkeitä tekijöitä solun lisääntymisessä.



Kuva 4. Uudet vesikkelit kypsyvät APPL1-positiiviksi (punaisella) ja Rab5-positiiviseksi (sininen) signaaliosomeiksi. PI3P:n tullessa vesikkelien ulottuville APPL1 poistuu ja se korvautuu PI3P:hen kiinnittyvillä proteiineilla kuten EEA1:llä. PI3P poistuminen aiheuttaa vesikkelien palautumisen APPL1-positiiviseksi. Lisääntynyt Rab5:n määrä sallii sekä APPL1:n että PI3P:hen kiinnittyvien proteiinien läsnäolon samassa endosomissa. (Mukaiilu artikkelista Zoncu ym., 2009)

Internalisaatioon käytetty reitti voi määrittää signaloivien reseptorien aktiivisuutta. Solun sisäistä reseptorien signalointikykyä on tutkittu vertaamalla EGFR:n eri internalisaatiomekanismeja, CME:tä ja CIE:tä, keskenään (Sigismund ym., 2008). Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään, onko eri mekanismien käytöllä fysiologista merkitystä solulle. Reseptoreja stimuloitiin alhaisella liganditasolla testatessa CME:tä ja suurella ligandipitoisuudella tutkittaessa CIE:tä. Tarkasteltaessa CIE:tä CME:n toiminta oli estetty. Tulosten perusteella pääteltiin, että CME ei ole pääasiallinen mekanismi EGFR:n hajotusreitillä, vaan CME johtaa reseptorin kierrätyksen kautta takaisin solukalvolle. Tutkimuksessa todettiin myös, että EGFR:n internalisaatio CIE:llä johtaa reseptorin tehokkaaseen hajotukseen. Internalisaatiomekanismilla havaittiin olevan paljon merkitystä EGFR:n kohtaloon ja signalointikykyyn. Tulokset osoittivat, että CME määrittää EGFR:n signaalivälityspolun keston ja että EGF-riippuvaiseen biologiseen vasteeseen, kuten DNA-synteesin, tarvitaan CME:tä.

EGFR:n endosytoosi ja hajotus ovat säädeltyjä useissa eri vaiheissa. Ubikitinylaatio on yksi mekanismi, jolla voidaan kontrolloida reseptorien endosytoosia (ks. yleiskatsaus Sorokin ja von Zastrow, 2009). Jopa suhteellisen pienet pitoisuudet ubikitiinia voivat olla riittäviä EGFR:n endosytoosissa (Kazazic ym., 2009). Ubikitiini-ligaaseihin kuuluvalla Cbl-proteiinilla on tärkeä tehtävä aktivoituneen EGFR:n ubikitinylaatioissa (Dikic, 2003). Myöhemmin tehdyillä tutkimuksilla korostetaan EGFR:n internalisaatioprosessin säätelymekanismien monipuolisuutta (Huang ym., 2007). Internalisaation säätelyyn osallistuvat monet kinaasi-mekanismit, ubikitinylaatiosta riippuvaiset ja ubikitinylaatiosta riippumattomat mekanismit. Kun ubikitiiniin kiinnittyvät kohdat, lysiini-aminohappotähteet EGFR:n kiinaasi domeenissa tunnistettiin, voitiin tehdä analyysyjä käyttämällä mutatoituneita domeeneja. Näissä analyyseissä näytettiin, että ubikitinylaatio on olennaista kohdistettaessa reseptori lysosomaaliseen hajotukseen, mutta sillä ei ole suurta merkitystä EGFR:n internalisaatioissa. Päätelmät tehtiin sen perusteella, että mutantit reseptorit, joilla ei ollut tärkeitä ubikitinylaatiokohtia, ilmensivät normaalia internalisaatioastetta. Vaikka kaikki EGFR:n kiinaasi-domeenin lysiini-aminohappotähteet mutatoitiin, reseptori tuli mutaatiosta huolimatta ja mitättömän pienellä ubikitinylaatiolla internalisoiduksi kilpailukykyisellä asteella villityyppisten EGFR:ien kanssa. Tästä pääteltiin, ettei ubikitinylaatio ole välttämätöntä CME:ssä.

Epsin 1 proteiinilla on todettu olevan merkittävä rooli CME:ssä (Ford ym., 2002). Proteiini kiinnittyy CME:n kuorikomponenttien osiin kuten, klatriiniin, Eps15:sta (engl. epidermal growth factor pathway substrate 15) ja AP2-kompleksiin. Epsin proteiiniperheen konservoituneimmat ominaisuudet ovat ENTH-domeeneissa. Epsinin-proteiini ohjataan endosytoitavalle alueelle kiinnittämällä se fosfatidylinositoli-4,5-bisfosfaatti (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) -solukalvolipidiin. Kiinnittyessään PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>:iin epsin 1 muovaa välittömästi kalvon kaarevuutta klatriinin polymerisoituessa. Yksinkertaisilla lipidikalvoilla epsiini on yksin riittävä elementti avustamaan klatriinpäällysteisen kuopakkeen syntyä. Epsin 1:n oletetaan vuorovaikuttavan ubikitinyloidun EGFR:n kanssa epsinissä olevan ubikitiinivuorovaikutus motiivin (UIM, engl. ubiquitin-interacting motif) kautta (Kazazic ym., 2009). Kun epsin 1:n tuottoa häirittiin käyttämällä siRNA-molekyylejä (engl. small interfering RNA), stimuloituneen EGFR:n internalisaatiota voitiin estää. Toimenpiteellä ei ollut vaikutusta transferriini-reseptorin internalisaatioon. On päätelty, että epsin 1 on spesifisesti osallisena EGFR:n endosytoosissa.

Vertailtaessa EGFR:ien internalisaatioon osallistuvien mekanismien yleisyyttä CME:n on todettu olevan suosituin mekanismi (Kazazic ym., 2006). Vähäisessä määrin EGFR:iä voidaan internalisoida myös kaveolien välityksellä. Elävien solujen kuvauksilla, joissa käytettiin valkaisun jälkeistä fluoresenssin palautumis (FRAP, engl. fluorescence recovery after photobleaching) -analyysiä, todettiin, ettei korkea EGF-pitoisuus lisännyt reseptorin internalisaatiota kaveolien välityksellä. Aktivoituneiden EGFR:n liikkuvuus kaveoleihin ei lisääntynyt yli normaalin, alhaisen kaveoli-välitteisen internalisaatiotason, joka on ominaista stimuloimattomille soluille. Aktivoidun EGFR:n liikkumista on selvennetty myös sisäisen heijastuksen fluoresenssimikroskopiolla (TIR-FM., engl. total internal reflection fluorescence microscopy) elävillä HeLa (engl. human epithelial carcinoma cell line) soluilla (Rappoport ja Simon, 2009). Näissä tutkimuksissa todettiin, että EGFR ei paikannu kaveolien kanssa ennen eikä jälkeen aktivoinnin, EGFR kolokalisoituu CCP:ien kanssa vain aktivoinnin jälkeen, aktivoinnista ei seuraa uusien klatriinikuopakkeiden syntyä, aktivoituneet EGFR:t klusteroituvat valmiiksi muodostuneelle klatriini-verkostolle ja AP2-kompleksi osallistuu aktivoidun EGFR:n internalisaatioon. Kokeilla on myös todettu, että mutatoituneet, CME:ssä välttämättömät proteiinit, estivät EGFR:n internalisaatiota (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2009). Lisäksi RNA-häirintä (RNAi, engl. RNA interference) klatriini- ja dynamiini-proteiinien tuoton estämiseksi rajoitti EGFR:n endosytoosia.

Endogeenistä EGFR:ää tuottavilla HeLa-soluilla tehdyillä tutkimuksilla, joissa seurattiin mm. ubikitinylaation merkitystä EGFR:n endosytoosin, osoitettiin, että EGFR voidaan endosytoida sekä CME:llä että CIE:llä (Sigismund ym., 2005). Immunofluoresenssimikroskopian ja immunoelektronimikroskopian avulla tehdyillä kokeilla osoitettiin, että stimulaatio alhaisilla EGF-pitoisuuksilla (1,5 ng/ml) johti lähes poikkeuksetta CME:hen ja merkittävää reseptorin ubikitinyloitumista ei havaittu. Korkeammilla ligandi-pitoisuuksilla (20 ng/ml) arviolta puolet reseptoreista endosytoitiin CIE:llä, lipidilautta-riippuvaisella tavalla ja reseptorit tulivat ubikitinyloiduiksi. Lisääntynyt signaali tai nopea reseptorien hajotus olivat yhteydessä vallitsevaan internalisaatioreittiin. Matalissa ligandi-pitoisuuksissa, CME:ssä, reseptori oli merkittävästi tyrosiini-fosforyloitu ja kykenevä tehokkaaseen alavirran signaaliin. Korkeissa ligandipitoisuuksissa CIE:n ollessa merkittävää, ei havaittu lisäystä signaaliin, mutta EGFR:n hajotuksen lisääntyminen oli helposti havaittavissa. Tästä pääteltiin, ettei kaveoli / lipidilautta -internalisaatio osallistu EGFR-signaaliin, vaan etupäässä reitti ohjaa reseptorin hajotukseen.



Kaveoliini 1 -proteiinin kerääntymien solukalvolle ei aina johda suureen kaveolien määrän muodostumiseen, joten pidetään todennäköisenä, että niiden muodostaminen on solussa säädeltyä (Orlichenko ym., 2006). Ihmisen haimasyöpäsoluilla (PANC-1, engl. pancreatic adenocarcinoma) ja kontrolleina olleilla rotan munuaissoluilla (NRK, engl. normal rat kidney epithelial cell) tehdyillä kokeilla todettiin, että EGF stimulaatio aiheutti merkittävän lisäyksen kaveoli-rakenteiden määrään solukalvolla. Soluja käsiteltiin 30 ng/ml EGF-pitoisuudella 0 min, 5 min, ja 20 min ennen fiksaatiota. Solut ilman EGF-stimulaatiota ilmensivät vain vähäistä kaveolimäärää solukalvolla. Solut, jotka oli stimuloitu EGF:llä, osoittivat 5 ja 20 minuutin jälkeen 8–10 kertaista lisäystä kaveoli-rakenteissa. Tutkimuksen avulla osoitettiin, kuinka solussa säädelään kaveoliinien muodostumista. Kaveoli 1:n fosforylaation, joka tapahtuu EGF:n signaalikaskadin stimuloimana, osoitettiin säätelevän kaveolien muodostumista.

Tutkimuksissa on yritetty selvittää ja ratkaista EGFR:n endosyytoosiin liittyviä ristiriitaisia tutkimustuloksia kaveoli- ja klatriinivälitteisten polkujen välillä (Rappoport ja Simon, 2009). Kaveoliinivälitteisen endosyytoosin perustana ovat olleet >20 ng/ml EGF-pitoisuudet. Joissakin tutkimuksissa taas päätellään, että jopa 100 ng/ml:n EGF-pitoisuuksilla EGFR käyttää ainoastaan CME:tä. Yhden hypoteesin mukaan aktiivoinen EGFR sijaitsee kaveoleissa, kunnes ligandin kiinnittyminen saa aikaan poistumisen kaveolista internalisaation jatkuessa CME:llä. Osassa niistä tutkimuksista, joissa päätellään EGFR:n käyttävän CME:tä, rapoportoidaan aktivoituneen EGFR:n aiheuttavan uusien CCP:ien muodostumista.

Kun EGF kiinnittyy EGFR:ään, reseptorin internalisaatio nopeutuu (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2009). Monet kokeelliset todisteet tukevat näkemystä, jossa päätellään EGFR-ligandikompleksin endosyytoosin kiihtymisen olevan seurausta CCP:ien käytöstä. Endosyyttisistä reiteistä CME on nopeinta ja se on tehokkaasti säädeltyä solukalvoa läpäisevien proteiinien internalisaatiota. Ligandilla aktivoitujen reseptorien on havaittu kerääntyvän CCP:hin ja CME:n on todettu olevan EGFR:n internalisaatiossa käytetyin mekanismi. EGFR:n internalisaatiiovauhdin on todettu vastaavan muiden CME:tä käyttävien reseptorien vauhtia. EGFR:n nopea internalisaatiiovauhti, joka on ominaista CME:ssä, toimii vain matalissa, fysiologisissa EGF-pitoisuuksissa ( $\leq 1-2$  ng/ml). Nostettaessa EGF-pitoisuutta EGF:n internalisaation vauhti laskee selvästi. On oletettu, että nopea internalisaatio toimii rajallisesti ja sen kapasiteetti ylittyy, jos solukalvolla esiintyy runsaasti EGF-reseptorikomplekseja. Tällaisessa tilanteessa suurin osa internalisaatiosta tapahtunee hitaal-

la kinetiikalla, joka matkii lyhyttä ja nopeaa reseptorien kiertoa, jota solu käyttää jatkuvasti tapahtuvassa, stimuloimattomassa EGFR:ien endosytoosissa.

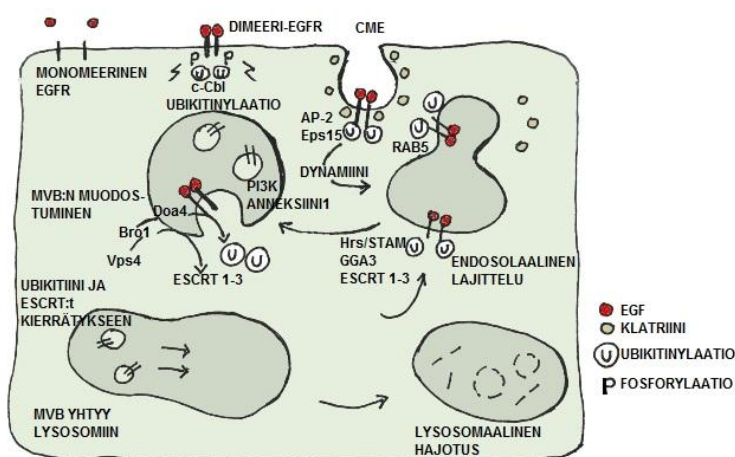
### 1.2.3 Epidermaalisen kasvutekijäreseptorin hajotus

Internalisaation jälkeen EGFR:t hajotetaan tehokkaasti ja se johtaa dramaattiseen laskuun EGFR-proteiinin puoliutumisaikassa ( $t_{1/2}$ ) (ks. yleiskatsaus Sorkin ja Goh, 2009). Eri solulinjoilla puoliutumisaikat voivat vaihdella paljon. Tavallisen vaihtuvuuden (engl. turnover) nopeus kaikilla stimuloimattomilla ErbB-reseptoreilla on riippuvainen niiden ilmentymistasosta solukalvolla, solunsisäisen kuljetuksen hajotusasteesta ja oletettavasti internalisaation intensiivisyydestä. Hajotusnopeutta on mitattu käyttämällä [<sup>35</sup>S]metioniinia ja kysteiiniä uusien, juuri syntetisoitujen reseptorien leimaamiseen (Sorkin ja Duex, 2010). Syntetisoimisen ja solun pinnalle saapumisen jälkeen EGFR:n hajoamisen puoliutumisaika vaihteli 8–24 tuntiin tai pidempään, riippuen solutyypistä ja EGFR:ien määrästä solukalvolla. Puoliutumisaikoja voitiin nopeuttaa huomattavasti, jos EGFR aktivoitiin ligandilla.

Vaikka ErbB-reseptoriperheen proteiineja löytyy pääasiassa solukalvolta, ne käyvät jatkuvaa kierrätystä solukalvon ja endosomalisten osastojen välillä (Wiley, 2003). Ligandin puuttuessa reseptoreja internalisoidaan hitaasti ( $t_{1/2}$  noin 30 min) ja ne palautetaan nopeasti takaisin solukalvolle. Reseptoreista vain EGFR:n näyttää muuttavan liikehdintää ligandin vaikutuksesta. Aktivoituneena reseptorin internalisaatio kiihtyy ja reseptorin polku johtaa lysosomeihin.

Kirjallisuudessa mainitaan lukuisia proteiineja ja mekanismeja, jotka ovat osallisina EGFR:n hajotusprosessissa. Heterodimeerinen G-proteiini johtaa signaaleja PM:ltä GPCR:n aktivaation seurauksena (Zheng ym., 2004). Näillä G-proteiineilla oletetaan olevan rooleja myös solun sisäisessä kalvoliikenteessä. Yksi heterodimeerin G-proteiinin osa, G $\alpha$ s, toimii mahdollisesti säätelijänä EGFR:ien endosytoosissa ja hajotusprosessissa. Osittain EE:eissa esiintyvän SCAMP3 (engl. secretory carrier membrane protein) -proteiinin oletetaan säätelevän negatiivisesti EGFR:n hajotusta ohjaamalla reseptorin kierrätyspolulle (Aoh ym., 2009). Prosessiin kuuluu SCAMP3:n ubiquitylaatio ja vuorovaikutus ESCRT-kompleksin kanssa. Entsyymi UBPY (engl. Ub-specific protease Y) deubikityloi aktivoituneet EGFR:t endosomeissa ja säätelee siten reseptorien hajotusta negatiivisesti (Mizuno ym., 2005). EGFR:n lysosomaalisen hajotuksen säätelyssä on osallisena Rab7 (Ceresa ja Bahr, 2006). Pelkistetty malli (kuva 5) EGFR:n hajotustiestä alkaa ligandin kiinnittymises-

tä monomeeriseen EGFR:iin (ks. yleiskatsaus Kirisits ym., 2007). Tapahtumasta seuraa reseptorin dimerisaatio ja autofosforylaatio. Fosforyloitu c-Cbl on värvätty paikalla, jossa se toimittaa monoubikitinylaation reseptorille. Ubikitinyloidut EGFR:t kerääntyvät CCP:hin ja tulevat internalisoiduiksi. Vesikkeli yhtyy EE:hen ja klatriini irtoaa siitä. Proteiinit Hrs/STAM (engl. hepatocyte growth factor-regulated substrate/signal-transducing adaptor molecule) ja GGA3 (engl. Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding) toimivat linkkeinä EGFR:n ja ESCRT-kompleksien välillä. Endosomaalinen lajitte-  
telukaskadi, ESCRT-I-III, käynnistää MVB:n muodostumisen. Ennenkuin ILV:t ovat muodostuneet, ESCRT-kompleksi ubikitiini kierrätetään takaisin solulimaan. Lopulta MVB:t ja lysosomit yhtyvät EGFR:t hajotetaan.



Kuva 5. EGFR:n hajotus alkaa ligandin kiinnittymisestä EGFR:iin, josta seuraa reseptorin dimerisaatio ja autofosforylaatio. Fosforyloitu c-Cbl on värvätty paikalla. Ubikitinyloidut EGFR:t kerääntyvät CCP:hin ja tulevat internalisoiduiksi. Vesikkeli yhtyy EE:hen ja klatriini irtoaa siitä. Proteiinit Hrs/STAM ja GGA3 toimivat linkkeinä EGFR:n ja ESCRT-kompleksien välillä. ESCRT-proteiinit käynnistävät MVB:n muodostumisen. Ennenkuin ILV:t ovat muodostuneet, ESCRT-kompleksi ja ubikitiini kierrätetään takaisin solulimaan. Bro1 värvää Doa4-deubikitinylaatioentsyymin ja Vps4:n paikalle ja ESCRT-kompleksi hajoaa. Lopulta MVB:t ja lysosomit yhtyvät EGFR:t hajotetaan. Lyhenteet: Vps (engl. vacuolar protein sorting), Eps (engl. epidermal growth factor pathway substrate), Hrs/STAM (engl. hepatocyte growth factor-regulated substrate/signal-transducing adaptor molecule) ja GGA3 (engl. Golgi-localized, gamma adaptin ear-containing, ARF-binding) (Mukailtu artikkelista Kirisits ym., 2007)

Tutkittaessa, hajotetaanko ligandin aktivoimat EGFR:t proteosomeissa vai lysosomeissa, käytettiin kokeellista proteosomin estäjää, laktakystiiniä ja lysosomaalisen hajotuksen estäjää, bafilomysiiniä (Alwan ym., 2003). Kokeissa osoitettiin, että proteosomien aktiivisuus auttoi EGFR:n hajotusta, vaikka se ei ollut välttämätöntä reseptorien hajotuksessa. Tutkimuksessa esitettiin myös, että ennen lysosomaalista hajotusta EGFR:n ubikitinylaatio puretaan. Tämän oletettiin helpottavan hajotettavaksi tarkoitetun EGFR:n lajittelua MVB:n ILV:hin. Proteosomien otaksuttiin osallistuvan Cbl:n hajotukseen, joka puolestaan saa ai-

kaan ubikitinylaation purkamisen. Reseptorin endosytoosia hahmottavassa mallissa esitettiin, että EGFR:n aktivaatio värvää paikalle Cbl adaptoriproteiineja, jotka puolestaan saavat aikaan reseptorin ubikitinylaation. Internalisaation jälkeen EGFR:iä sisältävät endosyyttiset vesikkelit yhtyvät EE:hin. Ennen reseptorin siirtymistä MVB:n sisävesikkeleihin proteosomit välittävät ubikitiiniketjujen poiston EGFR:stä. Valmiina olleiden lysosomien ja MVB:n yhtyminen johtaa lopulta reseptorin hajoamiseen. Tutkimuksessa oletettiin, että ubikitiinien irrottaminen reseptorista takaa solulle riittävän vapaiden ubikitiinien määrän ja se voi myös helpottaa reseptorien siirtymistä ILV:hin.

Proteiinikinaasi C:n (PKC, engl. protein kinase C) aktivaation on todettu estävän stimuloitun EGFR:n kulkeutumista LE:hen (Bao ym., 2000). PKC:n estovaikutus välittyy yhden EGFR:n treoniiniaminohappotähteen (treoniini 654) kautta. Tämä treoniini tulee fosforyloituksi PKC:n toimesta. Treoniinifosforyloitu-EGFR internalisoidaan normaalisti, mutta sen sijaan, että reseptori ohjautuisi lysosomaaliseen hajoamiseen, reseptorit palautuvat solukalvolle.

#### 1.2.4 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosi

$\alpha 2\beta 1$ -integriini toimii useiden epiteelisten ja mesenkymaalisten solujen kiinnittäjänä ECM:n kollageeniin (Upla ym., 2004).  $\alpha 2\beta 1$ -integriini välittää kollageenin internalisaatiota ja siksi se voikin olla säätelijänä myös ECM:n vaihdunnassa. Syntetisoinnin jälkeen  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin on todettu sijoittuvan solukalvolle lipidi-lauttoihin, GPI-AP:tä runsaasti sisältäviin solukalvon alueisiin, eikä niinkään kaveoleihin. Kaveolivälitteisestä  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien internalisaatiosta on esitetty malli, jonka mukaan joko vasta-aineilla tai EV1:llä indusoitu reseptorien klusterointi saa aikaan reseptorien sivuttaisen levittäytymisen kaveoleihin. Tästä seuraa aktivoituneiden kaveoleiden internalisaatio PKC $\alpha$  -riippuvaisella tavalla.

Myöhemmin tehdyillä tutkimuksilla on seurattu varhaista vaihetta  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien ja EV1:n internalisaatiossa (Karjalainen ym., 2008). Näissä tutkimuksissa on havaittu, että virus internalisoidaan yhdessä  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa tubulovesikulaarisiin rakenteisiin (engl. tubulovesicular structures) solun periferiassa. Tämä endosomaalinen osasto kypsyy myöhäiseksi kaveosomiksi, kaveoliini 1-positiiviseksi MVB:ksi, vasta 15 minuutin ja 2 tunnin välillä infektion alkamisesta. Ensimmäisten minuuttien aikana virusreseptorikompleksi ei käytä kaveoleja pääasiallisina internalisaatiomekanismeina vaan integriiniä sisältävät vesikkelit yhtyvät kaveosomeihin vasta solulimassa. Internalisaatiota

säädellään p21-kinaasi (Pak, engl. p21-activated kinase) 1:n, Rac1:n, PI3K:n, fosfolipaasi C:n (PLC, engl. phospholipase C) ja aktiinin avulla. Makropinosytoosin kaltaisessa EV1:n internalisaatiossa ja infektiossa tarvitaan myös CtBP1/BARS:ää (engl. C-terminal-binding protein-1/brefeldinA-ADP ribosylated substrate) vesikkelin irtoamiseksi kalvolta (Liberali ym., 2008a). EGF-riippuvainen makropinosytoosi sisältää samoja säätelytekijöitä kuin EV1:n klusteroiman  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin endosytoosi (Liberali ym., 2008a).

$\beta$ -integriinien normaalista endo / eksosyyttisestä kierrosta solussa on esitetty malli, jossa ECM:n ja reseptorien vuorovaikutus johtaa integriinien klusteroitumiseen sekä FC:n syntymiseen, jossa reseptorit kiinnittyvät solun aktiinitukirankaan (ks. yleiskatsaus Pellinen ja Ivaska, 2006). Integriinien internalisaatio voi olla yhteydessä FC:n purkautumisen kanssa, jolloin myös tapahtuu aktiinista irtoaminen.  $\beta 1$ -integriinien ja ECM-proteiinien internalisaation avustajana toimii aktivoitunut PKC $\alpha$ , joka kiinnittyy  $\beta 1$ -integriinin soluliman puoleiseen häntäosaan.  $\beta 1$ -integriinien endosytoosia säädellään Rab5/Rab21:n ja mikrotubulusten sekä aktiivisen Afr6:n välityksellä. Endosomaalisissa osastoissa  $\beta 1$ -integriinit ovat tekemisessä Rab21-GTP:n kanssa reseptorin  $\alpha$ -osan soluliman puoleisen häntäosan kautta. Näistä endosomeista ja perinukleaarista RE:istä reseptorit kierrätetään takaisin solukalvolle Rab11:sta, Rab21:n ja Afr6:n säätelemänä.

Tutkimuksissa on osoitettu, että monet eri alayksiköt PKC-proteiinikinaasien perheessä edistävät solun vaeltamista (Ivaska ym., 2002). Näihin kuuluvat esim. PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  ja PKC $\epsilon$ . Solun liikkumisen suunnassa voidaan havaita eroja, jotka ovat riippuvaisia kyseessä olevan PKC:n toiminnasta. Jos PKC $\alpha$ :aa ilmennetään tietyissä soluissa normaalia enemmän, solut lisäävät sekä satunnaista liikettä että  $\beta 1$ -integriinin substraattia kohtaan suunnattua liikettä eli liikkeen lisäys kohdistuu suunnattuun ja satunnaiseen liikkeeseen. Sen sijaan PKC $\epsilon$ :n ylituotannon on näytetty lisäävän vain kasvupohjaan suuntautuvaa liikettä. Kun internalisoidut kalvon osat kohdistetaan takaisin vaeltavan solun etuosaan, CM kasvaa menosuunnassa. Tällä tapahtumalla oletettavasti vaikutetaan solun liikkeen suuntaan. On esitetty, että PKC $\alpha$  voi olla kontrolloijana integriinien internalisaatiossa ja reseptorien lopullisessa palauttamisessa CM:lle. Sen sijaan PKC $\epsilon$ :n oletetaan säätelevän reseptorin kierrätystä ja se voi olla ohjaamassa kierrätettäviä integriinejä tarkasti solun etuosaan. PKC $\epsilon$ :n on todettu kontrolloivan  $\beta 1$ -integriinien kierrätystä takaisin solukalvolle solutukirangan komponenttien fosforylaation avulla (Ivaska ym., 2005). Vimentini, joka kuuluu välikokoisiin filamentteihin, on kohteena PKC $\epsilon$ :n toimittamalle fosforylaatiolle ja PKC $\epsilon$ :n välittämä

vimentiinin aminoterminaalinen fosforylaatio säätelee integriinejä sisältävien vesikkelien pääsyä solukalvolle.

Transformattoimattomien, normaalien solujen kasvu on riippuvaista solun kiinnittymisestä alustaansa, koska signalointi monien signaalipolkujen kautta, kuten ERK:n, PI3-kinaasin ja Rac:n, vaatii integriinivälitteistä kiinnittymistä (del Pozo ym., 2005). Signaalivälityskomponentteja sijaitsee lipidilautoissa, kolesterolirikastuneissa osissa solukalvoa (CEMM, engl. cholesterol-enriched membrane microdomain). Integriinivälitteinen kiinnittyminen säätelee CEMM:ien kuljetusta solun sisään siten, että solun irtoaminen ECM:sta saa aikaan CEMM:n internalisaation. Tämä internalisaatio välittyy dynamiini-2:n ja kaveoliini-1:n kautta. Internalisaatio vaatii kaveoliini-1:n fosforylaation. Fosforyloidun kaveoliini-1:n siirtyminen FC:stä kaveoleihin saa aikaan CEMM:n internalisaation, josta seuraa Erk:n, PI3-kinaasin ja Rac:n toiminnan estyminen.

Integriinien kuljetusta säädellään monilla kinaaseilla ja moottoriproteiineilla (Pellinen ym., 2006). Edellä mainittujen Rab21:n ja Rab5:n on todettu toimivan integriinikuljetuksen positiivisina säätelijöinä. Integriinien endosytoosi kattaa useita internalisaatioreittejä ja ne voivat vaihdella eri heterodimeerien välillä. Ligandin kiinnittymisen jälkeen integriinien on todettu tulevan internalisoiduksi dynamiini- ja PKC $\alpha$ -riippuvaisella tavalla. Sen jälkeen  $\beta$ 1-integriinit ohjataan kaveosomeihin tai transferrini-positiivisiin endosomeihin riippuen kyseessä olevan heterodimeeristä, solutyypistä ja stimulaation aikaansaajasta. Tutkimukset ovat osoittaneet, että kaveoliinipäällysteiset ja muut endosomaaliset reitit leikkaavat toisiansa.  $\beta$ 1-integriinien internalisaation otaksutaan kuitenkin tapahtuvan klatriinista riippumattomasti (ks. yleiskatsaus Caswell ja Norman, 2006).

### 1.3 Integriinin ja kasvutekijäreseptorien vuorovaikutukset

Integriinien signaalien ja kasvutekijäreseptorien signaalien koordinointi on välttämätöntä elimistön eri osien suunnitelmalliselle erikoistumiselle (Schwartz ja Ginsberg, 2002). Integriinien klusteroituminen ja solun kiinnittyminen ECM:ään säätelee geenien ilmentymistä, solun kasvua, erilaistumista ja selviytymistä. Ligandien aktivoimat ja klusteroidut integriinit lähettävät biokemiallisia signaaleja, jotka kontrolloivat näitä tapahtumia. Monet integriinien signaalivälitykseen osallistuvista tekijöistä toimivat myös kasvutekijöiden signaalivälityspolulla.

Normaalisti solut kiinnittyvät ECM:ään ja tarvitsevat selviytymiseen ja lisääntymiseen signaaleja soluväliaineelta (ks. yleiskatsaus Giacotti ja Tarone, 2003). Kiinnittyminen alustaan vaikuttaa myös siihen, millä vasteella solu reagoi liukoisiin kasvutekijöihin ja sytokiineihin.

Munasarjasyövän solulinja soluilla (OVCA, engl. ovarian carcinoma cell) tehdyillä immunofluoresenssimikroskopia- ja immunosaostuskokeilla on päätelty, että aktivoitunut EGFR:t vaikuttavat tilapäisesti  $\alpha 2$ -integriinin ilmentymiseen solukalvolla (Ning ym., 2007). EGFR:ien aktivaatio saa aikaan integriini- $\alpha 2$ :n kaveoli / lautta-välitteisen ensosytoosin. Tutkimustuloksista on päätelty, että aktivoitunut EGFR voi toimia negatiivisena säätelijänä solukalvon  $\alpha 2$ :lle ja siten säädellä solun käyttäytymistä.

Integriinien säätelevät samoja signaalivälityspolkuja kasvutekijäreseptorien kanssa (ks. yleiskatsaus Ivaska ja Heino, 2010). Jotkut integriinit voivat jopa suoraan kiinnittyä kasvutekijöihin. Näistä tunnetaan esimerkiksi  $\alpha V\beta 6$  integriini, jonka rooli on tärkeä transformoivan kasvutekijä  $\beta$ :n (TGF- $\beta$ , engl. transforming growth factor- $\beta$ ) aktivaatiossa. Integriinit voivat tarttua myös angiogeneesiä, verisuonten uudismuodostumista, ja lymfangiogeneesiä, imusuonten uudismuodostumista, sääteleviin kasvutekijöihin. Fibroblastien kasvutekijä-1 (FGF-1, engl. fibroblast growth factor-1), hermokasvutekijä (NGF, engl. nerve growth factor,) tai kaksi muuta neurotrofista tekijää voi toimia suoraan ligandeina integriineille.

Integriinien ja kasvutekijäreseptorien vuorovaikutuksia vertailevissa malleissa on esitetty, että kasvutekijäreseptorin fosforylaatio voi tapahtua sekä kasvutekijä-riippuvaisesti että kasvutekijä-riippumattomasti (Yamada ja Even-Ram, 2002). Edellisessä tapauksessa integriini ja kasvutekijäreseptorit klusteroituvat solukalvolla ECM:n proteiinin, kuten fibronectiinin, vaikutuksesta. Integriini kompleksi värvää paikalle paljon eri proteiineja, mukaan lukien kasvutekijäreseptorit, ja stimuloi FAK:n tyrosiinin fosforylaation. Kuitenkin kasvutekijäreseptorien lisääntynyt fosforylaatio, MAPK signalointi ja lisääntymiseen aktivoiminen, riippuu kasvutekijän, kuten EGF:n, kiinnittymisestä kasvutekijäreseptoriin. Jälkimmäisessä, kasvutekijä-riippumattomassa mallissa, integriini ja runsaslukuiset EGFR:t klusteroituvat integriinin ligandin vaikutuksesta muodostaen väliaikaisen yhdistelmän, joka on riippuvainen Src:stä (soluliman tyrosiinikinaasi, joka koostuu pääasiallisesti kolmesta domeenista, SH2, SH3 ja kinaasi-domeenista). Nämä rykelmät värväävät paikalle p130Cas:n (engl. Crk-associated substrate), mutta ei FAK:ta, ja käynnistävät EGFR:en fosforylaation.

Tämä ligandi-riippumaton fosforylaatio ei fosforyloi tärkeää autofosforylointikohtaa (tyrosiini 1148) EGFR:ssä, mutta fosforyloi neljä muuta kohtaa reseptorissa ja stimuloi MAPK signaloinnin. Edelliset huomiot johtavat kysymyksiin, ovatko integriini- ja kasvutekijäreseptorit yleensä toisiaan lähellä jakaen keskenään signaalimolekyylejä ja kuinka integriinit voivat valikoivasti välttää fosforyloimasta pääasiallista autofosforylointikohtaa EGFR:ssä? Voiko joku kompleksin rakentumiseen tarvittavista proteiineista peittää tyrosiinin, joka normaalisti tulisi fosforyloiduksi?

Koska kasvutekijät ja integriinit jakavat monia yleisiä tekijöitä signaalivälityksessä, ne voivat vaikuttaa toistensa signaaleihin (Schwartz ja Ginsberg, 2002). Monessa tapauksessa normaalia kasvutekijäsignalointia ei edes tapahdu, jollei solu ole kiinnittyneenä ECM:ään tai toisiin soluihin integriinien välityksellä. Tästä periaatteesta on hyvä esimerkki MAPK-signaalivälityspolulta, koska tällä väylällä molempien reseptorien välittämät signaalit kohtaavat monessa eri kohdassa. Ras-proteiinin aktivaatio johtaa MAP-kinaasien, Raf:n, MEK:n ja lopulta ERK1:n ja ERK2:n, stimulaatioihin. Molempien reseptorien, sekä integriinien ja RTK:ien, signalointia tarvitaan solun lisääntymiseen, optimaaliseen selviytymiseen ja vaeltamiseen (ks. yleiskatsaus Giancotti ja Tarone, 2003). Integriinit jakavat signaaleja, jotka auttavat voimistamaan kasvutekijöiden stimuloimaa MAP-kinaasi signaalivälityspolkua (Parsons, 2003). Jos solut joutuvat kasvamaan ilman kasvualustaa suspensiossa, integriinisignalointi estyy. Tämän seurauksena heikentyy myös kasvutekijöiden kyky aktivoida MAP-kinaasikaskadi tehokkaasti. Tällä signaalivälityspolulla kasvutekijöiden ja integriinien yhteistyö kohtaa huomattavimmin. Näiden kahden reseptorin paikallinen ja koordinoitu aktivaatio määrittää solun kiinnittymiskompleksien uudelleen muovautumista, jakaa signaaleja solun kasvun kontrolloimiseen ja johtaa solua eteenpäin solusykliissä.

Kasvutekijäreseptorien endosytoosi on tärkeä vaihe kasvutekijöiden aikaansaamassa aktivaatiossa ja se johtaa alavirran signaalivälitykseen (Moro ym., 2002). Soluissa, joiden integriinit ovat kiinnittyneinä ligandeihinsa, EGFR:ien määrä solukalvolla on merkittävästi lisääntynyt. Tästä on päätelty, että pian integriinien kiinnittymisen jälkeen EGFR:t vakiintuvat solukalvolle. Koska reseptorien määrän kasvu solukalvolla tapahtuu kiinnittymisen aikaisimmassa vaiheessa, lisääntynyt esiintyminen ei voi olla seurausta transkription kiihtymisestä. Tapahtuma voi johtua joko EGFR:ien vähentyneestä internalisaatiosta tai lisääntyneestä kierrätyksestä.



## 2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää viruksella tai vasta-aineilla klusteroidun  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin internalisaatioreitin yhteydet aktiivisen epidermaalisen kasvutekijäreseptorin reitin kanssa. Tutkimuksen lähtökohtana oli löytää vastauksia kysymyksiin:

- 1) onko  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusteroinnilla vaikutusta EGFR:n fluoresenssisignaaliin solussa
- 2) onko EGF-stimulaatiolla vaikutusta  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin polkuun
- 3) ovatko EGFR:n ja  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin internalisaatiopolut vuorovaikutuksessa toistensa kanssa ja kolokalisoituvatko ne keskenään

### 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

#### 3.1 Tutkimuksessa käytetyt solut, virukset, vasta-aineet ja kasvutekijät

Tässä tutkimuksessa käytettiin ihmisen osteosarkoomasolulinjan soluja, joihin oli stabiilisti transfektoitu  $\alpha 2$ -integriini, (Ivaska ym., 1999). Kokeissa käytettiin SAOS $\alpha 2/45$  soluklooniversiota. Toisena solulinjana käytössä olivat ihmisen keuhkosityövän A549-solut (engl. human lung adenocarcinoma epithelial cell line). Soluja kasvatettiin +37 °C:ssa, 5 % CO<sub>2</sub>:ssa, DMEM:ssä (Dulbecco's modified Eagle Medium) (Gibco, Grand Island, USA), johon oli lisätty 10 % inaktivoitua FBS:ää, 2 mM L-glutamiinia, 100 IU/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien virusklusterointiin käytettiin EV1:tä (Faroukanta, ATCC), joka oli tuotettu viherapinan munuaissoluissa (saatu Timo Hyypiältä, Virologian osasto, Turun yliopisto) ja puhdistettu sakkaroosigradientilla (Marjomäki ym., 2002). Jos toisin ei mainita, primäärivasta-aineina  $\alpha 2$ -integriiniä vastaan käytettiin monokloonallista hiiressä tuotettua A211E10:tä (3,25 µg/ml) (oma tuotto) tai MCA2025:tä (5 µg/ml) (AbD Serotec). Sekundäärivasta-aineina toimivat vuohessa tuotetut, kania tai hiirtä vastaan toimivat Alexa 488-, Alexa 555- ja Alexa 594-konjugaatit (1,3 µg/ml) (Invitrogen). EGFR:n stimulaatioon käytettiin EGF-kasvutekijää (1 ng/ml tai 100 ng/ml) (Molecular Probes) tai biotinyloitua EGF:ää (0,5 µg/mml) (Invitrogen), johon kiinnityttiin streptavidini-Alexa 488 (5 µg/ml) (Invitrogen). Kaikki vasta-aineet ja kasvutekijä laimennettiin seerumittomaan DMEM:ään (-DMEM).

#### 3.2 Konfokaalimikroskopia

##### 3.2.1 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusterointi vasta-aineilla tai viruksella ja EGFR:n stimulaatio

SAOS $\alpha 2/45$ - tai A549-soluja kasvatettiin n. 60–70 % konfluenteiksi, jonka jälkeen niiden annettiin nälkiintyä (engl. starvation) -DMEM:ssä yhden tai kahden viimeisen tunnin ajan ennen koetta. Integriinit klusteroitiin käyttämällä A211E10- tai MCA2025-vasta-aineita tai EV1:tä laimennettuna -DMEM:ään. Primäärivasta-aineiden tai virusten annettiin kiinnittyä 45 min (virus 1 h) jäällä, jonka jälkeen soluja pestiin (3 x 5 min) +4 °C:lla -DMEM:llä. Klusteroivana sekundäärivasta-aineena käytettiin vuohessa tuotettua, hiirtä vastaan toimivaa Alexa 488-konjugaattia -DMEM:iin laimennettuna, jonka annettiin kiinnittyä primäärivasta-aineeseen 45 min jäällä. Pesut suoritettiin kuten edellä mainittu. EGFR:t stimuloitiin

-DMEM:iin lisätyllä EGF-kasvutekijällä (1 ng/ml tai 100 ng/ml) ja soluja inkuboitiin +37 °C:ssa 5 % CO<sub>2</sub>:ssa joko 15 min tai 2h.

### 3.2.2 Solujen fiksaatio, leimaaminen ja tarkastelu

Solut fiksattiin PBS:ään laimennetulla 4 % PFA:lla 25 min ajan ja permeabilisoitiin 5 min PBS:ään laimennetulla 0,2 % Triton-X-100:lla. EGFR:n leimaamiseen käytettiin kanissa tuotettua polykloonallista vasta-ainetta Rabbit Anti-EGFR:ää (1,3 µg/ml) (Santa Cruz Biotechnology) laimennettuna 3 % BSA-PBS:ään. Primäärivasta-aineen annettiin sitoutua 45 min RT:ssä, jonka jälkeen näytteet pestiin PBS:llä (3 x 5min). Sekundäärivasta-aineina käytössä olivat vuohessa tuotetut, kania vastaa toimivat Alexa 555- tai Aleksa 488-konjukaattit (5 µg/ml) laimennettuna 3 % BSA-PBS:ään. Niiden annettiin sitoutua 30 min RT:ssä. Pesut suoritettiin kuten edellä mainittu. Solujen petauksessa peitinlaseille oli käytössä tumen värjäävää petausaine, DAPI (Invitrogen). Soluja tarkasteltiin Olympus IX81 konfokaalimikroskoopilla, Fluoview-1000 ohjelmalla. Soluista kuvattiin yksi leike mahdollisimman keskeltä solua, kohdasta, jossa fluoresenssi-intensiteetti on suurimmillaan. Fluoresenssi-intensiteetti ja kolokalisaation analyysit määriteltiin BioImageXD-ohjelmistolla (Karjalainen et al. 2008). Intensiteettien ja kolokalisaation laskennassa kynnyksarvot asetettiin manuaalisesti, jolla pyrittiin eliminoimaan taustalla olevaa ja diffuusua fluoresenssia. Graaffisten esitysten tekemisessä ja merkitsevyyksien laskennassa käytettiin Microsoftin Excel taulukkolaskelmaohjelmaa.

### 3.3 Elävien solujen kuvaaminen laajakenttämikroskoopilla

A549-soluja kasvatettiin 8-kuoppamaljoissa (Ibidi 15 µ-slide 8 swell) kaksi päivää normaalisti, jonka jälkeen niitä käsiteltiin serumittomassa DMEM:ssä (-DMEM) 16 viimeistä tuntia ennen koetta. EGFR:t stimuloitiin -DMEM:iin lisätyllä biotinyloidulla EGF:llä (0,5 µg/ml) (Invitrogen) 45 min jäällä, jonka jälkeen soluja pestiin (3 x 5 min) +4 °C:lla -DMEM:llä. Seuraavaksi soluille lisättiin streptavidini-Alexa 488 (5 µg/ml) ja streptavidinin annettiin sitoutua biotiiniin 45 min jäällä. Pesut suoritettiin kuten edellä mainittu. Integriinien klusterointi tehtiin käyttämällä A211E10 tai MCA2025 vasta-aineita laimennettuna -DMEM:ään. Primäärivasta-aineiden annettiin kiinnittyä 45 min jäällä, jonka jälkeen pesut suoritettiin kuten edellä mainittu. Klusteroivana sekundäärivasta-aineena käytettiin vuohessa tuotettua, hiirtä vastaan toimivaa Alexa 594-konjukaattia (1,3 µg/ml) -DMEM:iin laimennettuna, jonka annettiin kiinnittyä primäärivasta-aineeseen 45 min jäällä. Pesut suo-

ritettiin kuten edellä mainittu. Biotinyloitu EGF ja integriinivasta-aineet lisättiin samaan aikaan, jonka jälkeen myös fluoresenssikonjugaatit lisättiin yhdessä. Pesujen jälkeen soluille vaihdettiin joko -DMEM tai 1 % DMEM (yön yli seurannoissa). Ibidi-maljat siirrettiin jäältä Zeiss Cell Observer HS widefield mikroskooppiin, jossa lämpötila oli +37 °C ja CO<sub>2</sub>-pitoisuus 5 % ja jossa internalisaation sallittiin alkavan. Kuvaaminen tapahtui Colibri LED -valolähteellä 470 (42 %) aallonpituudella Alexa 488:lle ja 590 (46 %) aallonpituuksilla ja Alexa 594:lle. Soluja videoitiin maksimi nopeudella, 15 s. intervallilla, 30 s. intervallilla tai 10 min intervallilla. Vesikkelien tarkka kolokalisaation havaitseminen varmistettiin kontrollivideolla. Videossa tarkasteltiin yhdellä primäärivasta-aineella merkattuja ja kahdella eri sekundäärivasta-aineella klusteroituja integriinejä (Alexa 488- ja 594-konjugaatit). Kontrollivideoina käytettiin myös fiksattuja (4 % PFA, 25 min), liikkumattomia soluja. Kolokalisaation analyysit määriteltiin BioImageXD-ohjelmistolla (Karjalainen et al. 2008). Kolokalisaatioiden laskennassa kynnsarvot asetettiin manuaalisesti, jolla pyrittiin eliminoimaan taustalla olevaa ja diffuusua fluoresenssia. Graaffiset esitykset Microsoftin Excel taulukkolaskelmaohjelmalla.

### 3.4 Elektronimikroskopia

Integriinien ja EGFR:n internalisaatiota, kolokalisaatiota ja vuorovaikutuksia tutkittiin elektronimikroskopian avulla sekä SAOS $\alpha$ 2/45-soluilla että A549-soluilla. Primäärivasta-aineet  $\alpha$ 2 $\beta$ 1-integriinille, joko A211E10 tai MCA2025, ja biotinyloitu EGF lisättiin yön yli näлкиinnytetyille soluille -DMEM:ään laimennettuna (ks. pitoisuudet ym. edellä). Vasta-aineiden ja ligandin annettiin sitoutua kohteisiinsa 45 minuutin ajan jäällä. Sitoutumattomat vasta-aineet ja kasvutekijät pestiin (3 x 5 min) -DMEM:llä. Sekundäärisenä vasta-aineena ja integriinien klusteroijana toimi kanissa tuotettu hiiren vasta-aine (Sigma) -DMEM:iin laimennettuna. Sen annettiin sitoutua näytteisiin 45 min jäällä. Pesut suoritettiin kuten edellä. Proteiini-A:n, jossa oli kiinni 5 nm kultapartikkeli, annettiin sitoutua sekundääriseen vasta-aineeseen 45 min ajan jäällä. Samaa laimennokseen (-DMEM:ssä) oli lisätty streptavidini-kulta, jossa oli kooltaan 10 nm kultapartikkeleja ja jonka annettiin sitoutua biotinyloituun EGF:ään kanssa. Pesut suoritettiin kuten aikaisemmin. Koe uusittiin A549-soluille niin, että biotinyloitu EGF ja streptavidinikulta sitoutettiin soluille ensin ja vasta sen jälkeen soluille annettiin integriinien primäärivasta-aineet ja klusteroiva sekundäärivasta-aine sekä kultapartikkelit. Tällä kontrolloitiin, ettei runsas kultaleimaus integriineille

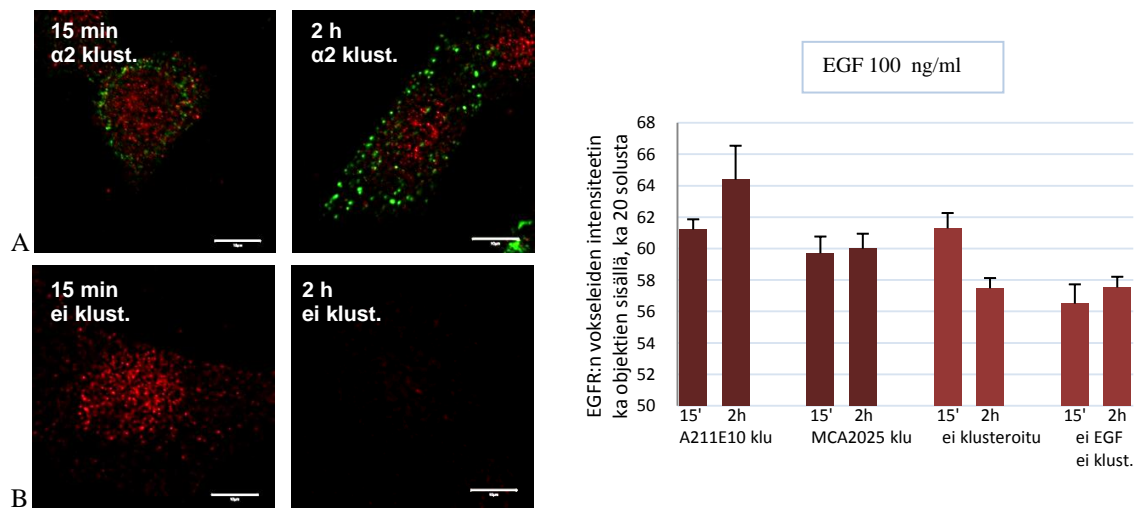
steerisesti estä streptavidiinikultaa sitoutumasta biotinyloituun EGF:ään. Soluja inkuboi-  
tiin seerumittomassa 0,2 %:ssa BSA-DMEM:ssä +37 °C:ssa, 5 % CO<sub>2</sub>:ssa joko 15 min tai  
2 h.

Solut pestiin kolme kertaa nopeasti (+4 °C) 0,1 M fosfaattipuskurilla ja fiksoitiin 0,1 M  
fosfaattipuskuriin laimennetulla 2,5 %:lla glutaraldehydillä 1 h:n ajan +4 °C:ssa. Pesut suo-  
ritettiin 0,1 M fosfaattipuskurilla (3 x 10 min) +4 °C:ssa. Seuraavaksi näytteet jälkifiksoi-  
ttiin 0,1 M fosfaattipuskuriin laimennetulla 1 %:lla osmiumtetraoksidilla (OsO<sub>4</sub>) 1 h:n ajan  
+4 °C:ssa. Pesut suoritettiin 0,1 M fosfaattipuskurilla (3 x 10 min) +4 °C:ssa. Näytteistä  
poistettiin vesi 70 prosenttisella etanolilla (3 x 5 min) ja 96 prosenttisella etanolilla (3 x 5  
min) RT:ssa. Soluja värjättiin 2 % uranyyliasetaatilla, joka oli liuotettu absoluuttiseen eta-  
noliin, 30min RT:ssä. Lopuksi tehtiin vielä yksi käsittely absoluuttisella etanolilla (3 x 5  
min). Näytteet valettiin eponiin, jonka annettiin polymerisoitua +60° C:ssa kolme vuoro-  
kautta. Hilanäytteet valmistettiin Oulun yliopistossa. Näytteitä tarkasteltiin JEOL  
JEM1200EX -läpäisyelektronimikroskoopilla (TEM, engl. transmission electron microscop-  
e), johon on liitetty Veleta-kamera (Olympus, USA). Kuvien käsittelyssä käytettiin  
ITEM-ohjelmaa (Soft Imaging System).

## 4 TULOKSET

### 4.1 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusterointi hidastaa EGFR:n hajotusta

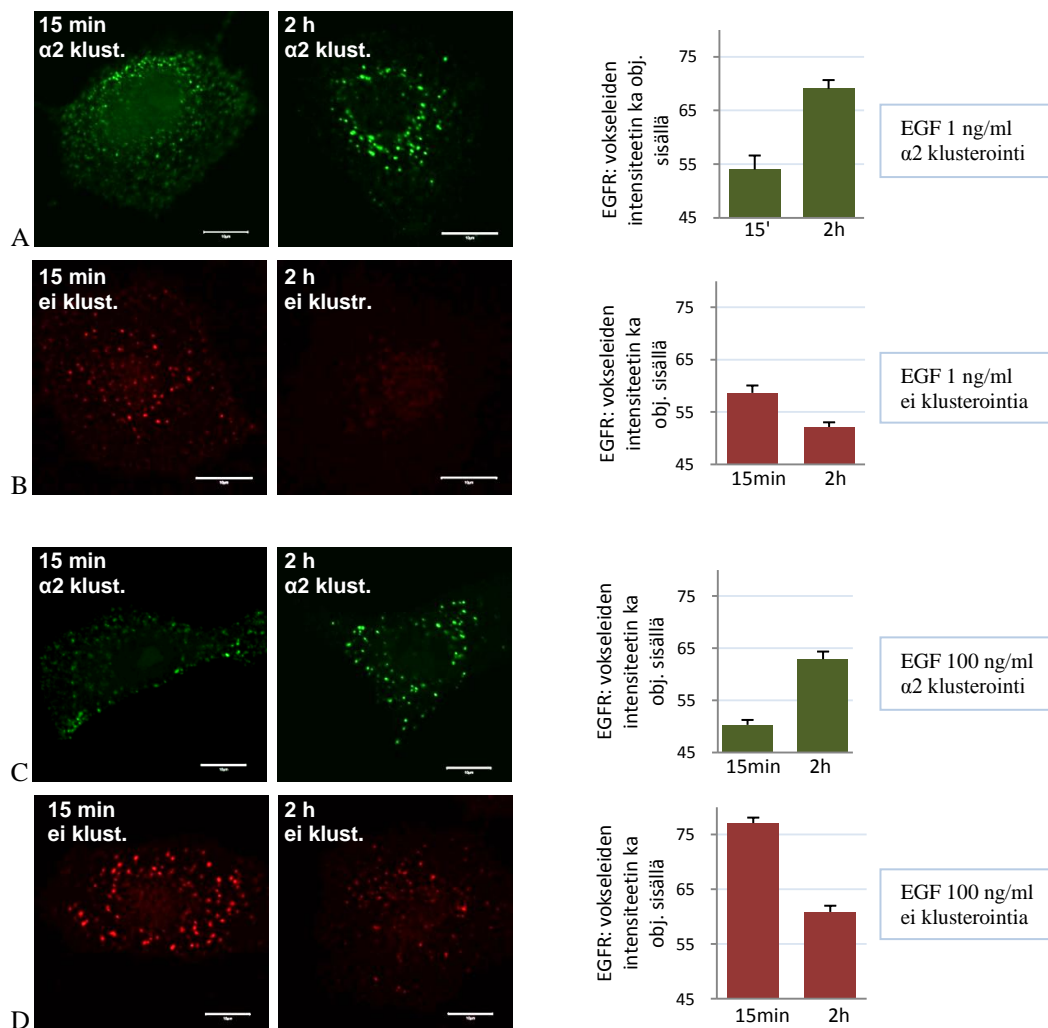
Tutkittaessa  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusteroinnin vaikutusta EGFR:n hajotukseen reseptorien internalisaatiota seurattiin 15 min ja 2 h:n aikapisteissä konfokaalimikroskopiolla. SAOS $\alpha 2/45$ -solujen EGFR:t stimuloitiin 1 ng/ml ja 100 ng/ml EGF-pitoisuudella. Integriinien klusterointiin käytettiin primäärivasta-aineena A211E10:tä tai MCA2025:tä ja sekundaarivasta-aineena sekä integriinin klusteroijana toimi hiiren vasta-aineita tunnistava Alexa 488-konjugaatti. Kun SAOS $\alpha 2/45$ -soluja stimuloitiin pienellä EGF-pitoisuudella (1ng/ml), EGFR:ien määrissä ei havaittu eroja alustavissa kokeissa (tuloksia ei näytetty). Sen sijaan isolla pitoisuudella (100 ng/ml) stimuloitaessa klusteroimattomien solujen EGFR:ien määrä väheni selvästi 2 h:n jälkeen (kuva 6). Jos soluja ei stimuloitu EGF:llä, tällaista intensiteetin vähenemistä ei havaittu. Kun solut klusteroitiin integriini-vasta-aineilla EGFR:ien intensiteetti ei laskenut vaan jopa hieman nousi A211E10-vasta-ainetta käytettäessä. Intensiteetit laskettiin kustakin solusta käyttämällä vokseleiden intensiteetin keskiarvoa segmentoitujen objektien sisällä.



Kuva 6.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusterointi vaikutti EGFR:ien hajotukseen 100ng/ml EGF-pitoisuudessa SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla. Klusteroidut integriinit näkyvät vihreinä (A) ja EGFR:t näkyvät punaisina (A, B). Klusteroidun solun EGFR:ien intensiteetti näkyy kirkaana 2 h:n kohdalla (A). Klusteroimattoman solun (B) EGFR:ien fluoresenssin intensiteetti on lähes hävinnyt 2 h aikapisteessä. Pylväskaavio osoittaa EGFR:ien intensiteettien erot eri aikapisteissä ja eri vasta-aineilla klusteroiduilla / klusteroimattomilla / stimuloimattomilla soluilla. Tulokset laskettiin 20 solun keskiarvona. Mittajana 10 $\mu$ m

Tutkimusryhmässämme aikaisemmin A549-soluilla tehdyillä kokeilla oli klusteroitu  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit A211E10 vasta-aineella. Soluja oli stimuloitu 1 ng/ml tai 100 ng/ml EGF-pitoisuuksilla ja solujen EGFR:t oli leimattu joka Alexa 488- tai Alexa 555-konjugaatilla.

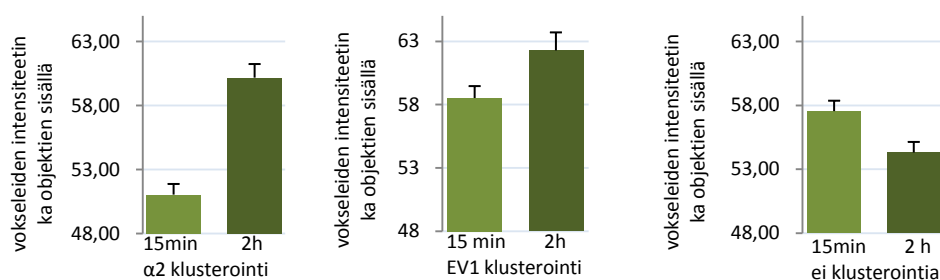
Tässä tutkimuksessa em. kokeen näytteitä kuvattiin konfokaalimikroskoopilla ja niistä analysoitiin integriinien klusteroinnin vaikutusta EGFR:ien hajotukseen. Klusteroiduissa soluissa (kuva 7, A ja C), 2h aikapisteessä, EGFR:ien intensiteetti näkyy vielä kirkkaana. Soluissa, joiden integriinejä ei ole klusteroitu (7, B ja D), 2 h aikapisteessä, EGFR:ien intensiteetti on huomattavasti pienentynyt. Analyysit osoittivat, että A549-soluilla eri EGF-pitoisuuksilla integriinien klusteroinnin seurauksena EGFR:ien intensiteetti nousi kun taas klusteroimattomien solujen EGFR:ien intensiteetti laski. Intensiteetit laskettiin kustakin solusta käyttämällä vokseleiden intensiteetin keskiarvoa segmentoitujen objektien sisällä.



Kuva 7.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusteroinnin seurauksena sekä 1ng/ml (A) että 100ng/ml (C) EGF-stimulaatiolla A549-soluilla EGFR:ien intensiteetti kasvoi 2h aikapisteessä. Klusteroiduissa soluissa (A, C) EGFR:t ovat värjätty vihreällä ja klusteroimattomissa (B, D) soluissa punaisella. Soluissa, joiden integriinejä ei ole klusteroitu (B, D), 2 h aikapisteessä, EGFR:ien intensiteetti on heikentynyt. Pylväskaavioiden tulokset laskettiin 20 solun ka:nä. Kaikkien solujen integriinit klusteroitiin A211E10 ( $\alpha 2$ ) vasta-aineen avulla. Mittajana 10  $\mu$ m

Kokeita integriinien klusteroinnin vaikutuksesta EGFR:ien fluoresenssisignaaliin tutkittiin vielä uudelleen, A549-soluilla, 100ng/ml EGF-pitoisuudella 15 minuutin ja 2 h:n aikapis-

teissä.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit klusteroitiin joko vasta-aineen avulla (A211E10 primäärivasta-aine ja Alexa 555-konjugaatti sekundäärivasta-aineena) tai viruksella, EV1:llä. Kontrollina käytettiin klusteroimattomia soluja. Soluissa, joiden integriinit oli klusteroitu vasta-aineella, EGFR:ien intensiteetti kasvoi huomattavasti 2 h:n aikapisteessä. Virusklusteroinnilla intensiteetti kasvoi myös, mutta vähemmän. Klusteroimattomien solujen EGFR:ien intensiteetti sen sijaan laski (kuva 8). Intensiteetit laskettiin konfokaalimikroskopiakuvista käyttämällä vokseleiden intensiteetin ka: a segmentoitujen objektien sisällä.

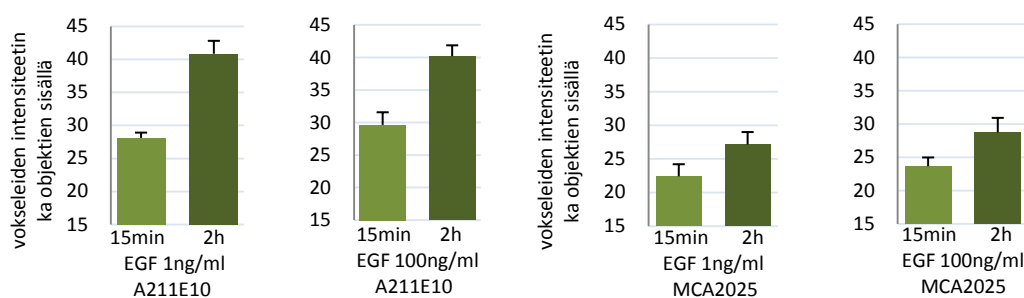


Kuva 8.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EV1 klusterointien seurauksena, 100ng/ml EGF-pitoisuuksilla, A549-soluilla, EGFR:ien intensiteetti kasvoi. Klusteroimattomien solujen intensiteetti laski. Pylväskaaviot havainnollistavat EGFR:ien vokseleiden intensiteettien erot eri aikapisteissä. Tulokset laskettiin 30 solun kesiarvona. Integriinit klusterointiin joko A211E10 ( $\alpha 2$ ) primäärivasta-ainetta (+ Alexa 555-konjugaatti) tai EV1 käyttäen.

## 4.2 Stimuloitu EGFR ei edistä $\alpha 2\beta 1$ -integriinin hajoamista

SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla tehdyillä kokeilla haluttiin selvittää, onko EGF-stimulaatiolla vaikutusta  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin fluoresenssin signaaliin.  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin fluoresenssin intensiteettiä 2 h:n aikapisteessä vertailtiin siten, että EGFR:t oli stimuloitu joko 1 ng/ml tai 100ng/ml EGF-pitoisuudella. Integriinien klusteroinnissa käytettiin primäärivasta-aineena A211E10:tä tai MCA2025:tä ja sekundäärivasta-aineena sekä integriinin klusteroijana toimi Alexa 488-konjugaatti. Konfokaalimikroskopiakuvista analysoitiin integriinireseptorien intensiteettiä 15 min ja 2 h:n aikapisteissä. Molemmilla vasta-aineilla ja molemmilla EGF-pitoisuuksilla integriinien fluoresenssin intensiteetin kasvu segmentoitujen objektien sisällä oli nähtävissä 2h aikapisteessä. Käytettäessä A211E10 primäärivasta-ainetta intensiteetin kasvu oli suurempaa kuin käytettäessä MCA2025 primäärivasta-ainetta. Eri EGF-pitoisuuksilla intensiteetin kasvussa ei ollut suurta eroa (kuva 9).





Kuva 9.  $\alpha 2\beta 1$ -integroinin fluoresenssin intensiteetti lisääntyi segmentoitujen objektien sisällä 2 h:n aikapisteessä SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla. EGFR:t stimuloitiin joko 1 ng/ml tai 100ng/ml EGF-pitoisuudella. Integroinien klusteroinnissa käytettiin primäärivasta-aineena A211E10:tä tai MCA2025:tä. Integroinien intensiteetit analysoitiin integroinireseptorien eri aikapisteissä keskiarvona 20 eri solusta. Pylväskaaviot havainnollistavat eri vasta-aineilla, eri aikapisteissä ja eri EGF-pitoisuuksilla mitatut intensiteetit.

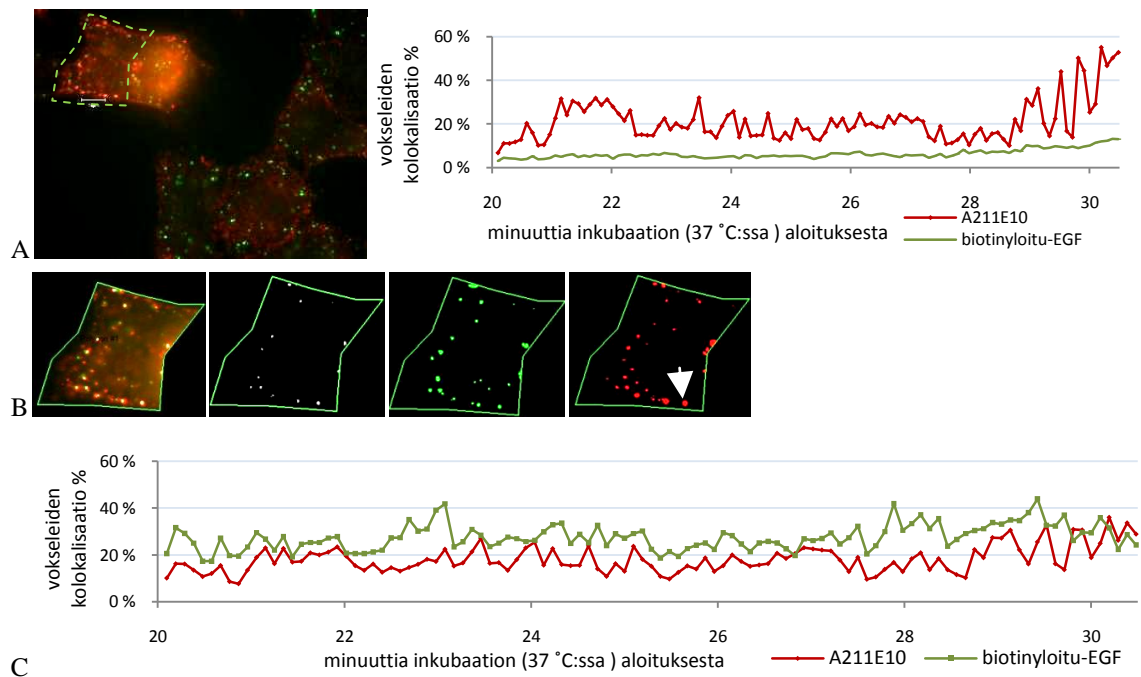
### 4.3 Laajakenttä-, elektroni- ja konfokaalimikroskopia osoittivat EGFR:n ja $\alpha 2\beta 1$ -integroinin kolokalisoituvan vain vähän

Tutkittaessa, ovatko stimuloitujen EGFR:n ja klusteroitujen  $\alpha 2\beta 1$ -integroinin internalisaatiopolut vuorovaikutuksessa toistensa kanssa ja kolokalisoituvatko ne keskenään, käytettiin elävien A549-solujen laajakenttäkuvauksia, läpäiselektronimikroskopiaa ja fiksattujen solujen konfokaalimikroskopiaa. Konfokaalimikroskopiakuvista analysoitiin lisäksi stimuloimattomien EGFR:ien ja klusteroimattomien  $\alpha 2\beta 1$ -integroinien kolokalisaatioeroja solun periferiassa ja solun sisäosissa. Konfokaalimikroskopiolla tarkasteltiin myös, vaikuttaako EGF-pitoisuus internalisoitujen EGFR:n määrään, kilpaileeko biotinyloitu-EGF  $\alpha 2\beta 1$ -integroinin kanssa solukalvolle tarttumisessa ja kuinka paljon ligandi-reseptorikompleksit kolokalisoituvat toistensa kanssa internalisaation varhaisessa vaiheessa. Lopuksi SAOS $\alpha 2/45$ -solujen konfokaalimikroskopiakuvista (kuva 6) laskettiin  $\alpha 2\beta 1$ -integroinien ja EGFR:ien kolokalisaatioprosentit eri EGF-pitoisuuksilla ja eri aikapisteistä.

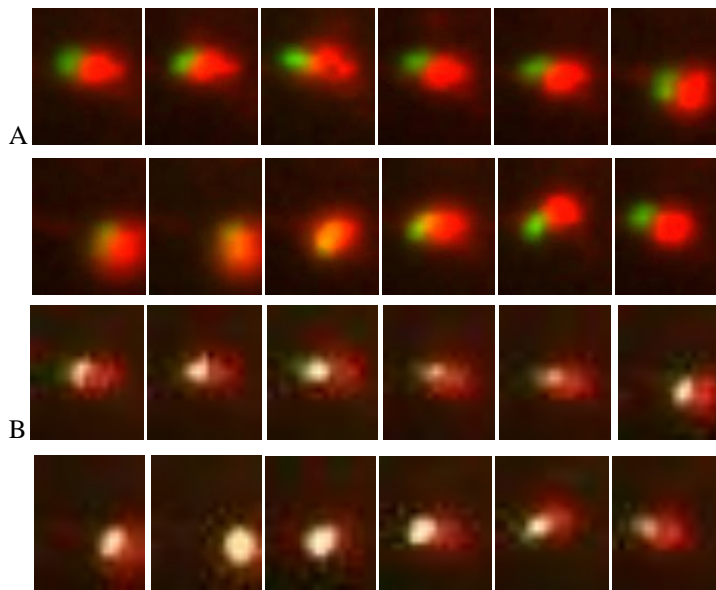
#### 4.3.1 Elävien solujen laajakenttämikroskopiakuvissa stimuloitujen EGFR:n ja klusteroitujen $\alpha 2\beta 1$ -integroinin polut kohtasivat osittain

Elävien solujen kuvaamisessa käytettiin A549-soluja tarkasteltaessa stimuloitujen EGFR:ien ja vasta-aineella klusteroitujen  $\alpha 2\beta 1$ -integroinien kolokalisaatiota ja reittien välisiä yhteyksiä. EGFR:t stimuloitiin biotinyloidulla EGF:llä. Integroineille primäärivasta-aineina käytettiin joko A211E10:ntä tai MCA2015:sta. EGFR:ien ja integroinien annettiin internalisoitua laajakenttämikroskoopin sisällä +37 °C:ssa 5 % CO<sub>2</sub>:ssa ja soluja kuvattiin aikasarjoina. Kuvista analysoitiin kolokalisaatioprosentit (kuvat 10, 12 ja 13) ja vesikkelien

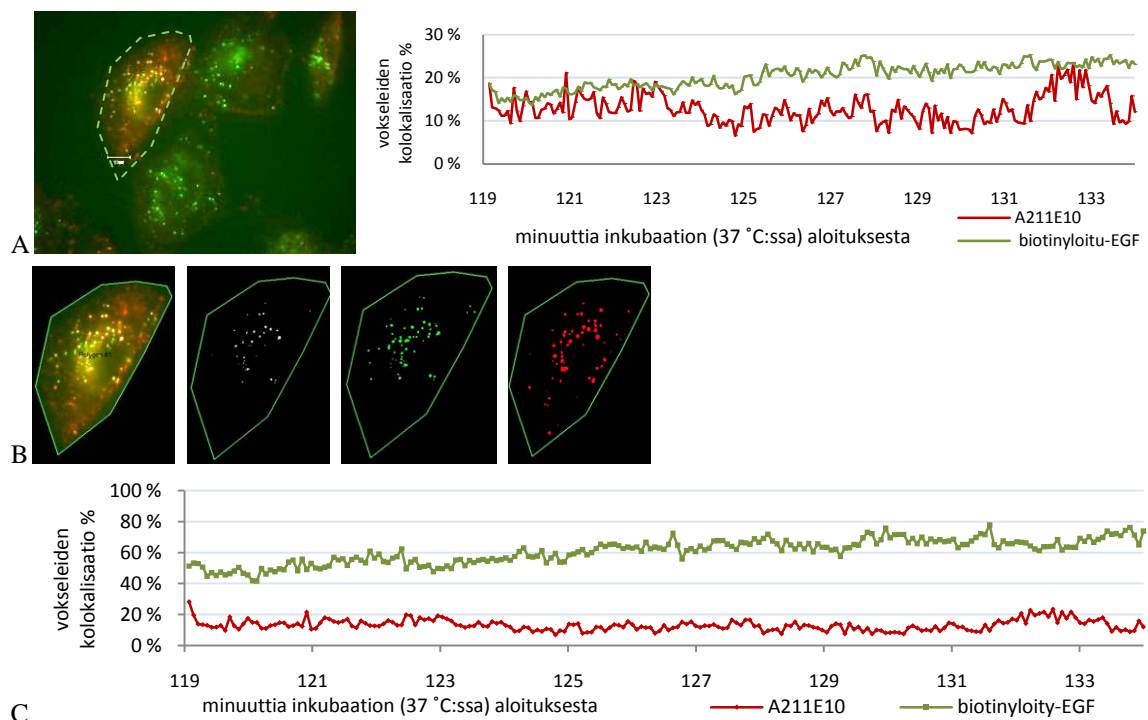
liikkumista seurattiin myös kuva kualta (kuva 11). Kuvasarjat osoittivat, että EGFR:ää (biotinyloitu-EGF oletettavasti sitoutuneena reseptoriin) tai  $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä sisältävien vesikkeliin reitit kulkivat toisiaan kohti, rinnakkain ja toisistaan eroten. Vesikkeliin suunta oli välillä satunnaista ja välillä vesikkelit näyttivät seuraavan toinen toistaan. Joistakin kuvista sai sen vaikutelman, että eri lastin sisältämät vesikkelit yhtyivät keskenään ja muodostivat suuremman vesikkeliin. Toisinaan taas näytti siltä, että yksi suurempi vesikkeli hajosi kahdeksi eri lastia sisältäväksi vesikkeliksi. Eri solujen välillä EGFR:ien ja integriinien leimautumisella oli suuria eroja. Toisissa soluissa saattoivat leimautua voimakkaasti vain EGFR:t (biotinyloitu-EGF oletettavasti sitoutuneena reseptoriin), joten erot kolokalisatioissa olivat suuret verrattaessa koko kuvan alueelta laskettuja kolokalisaatioita vain ROI-alueesta (engl. region of interest) laskettuihin kolokalisaatioihin (kuva 10 ja 12). Seurattaessa yksittäisten vesikkeliin liikettä (kuva 11) havaittiin EGFR:ää ja integriinejä sisältävien vesikkeliin läheinen yhteys, reittien samansuuntaisuus ja nopea liikkuminen toinen toisensa ympärillä.



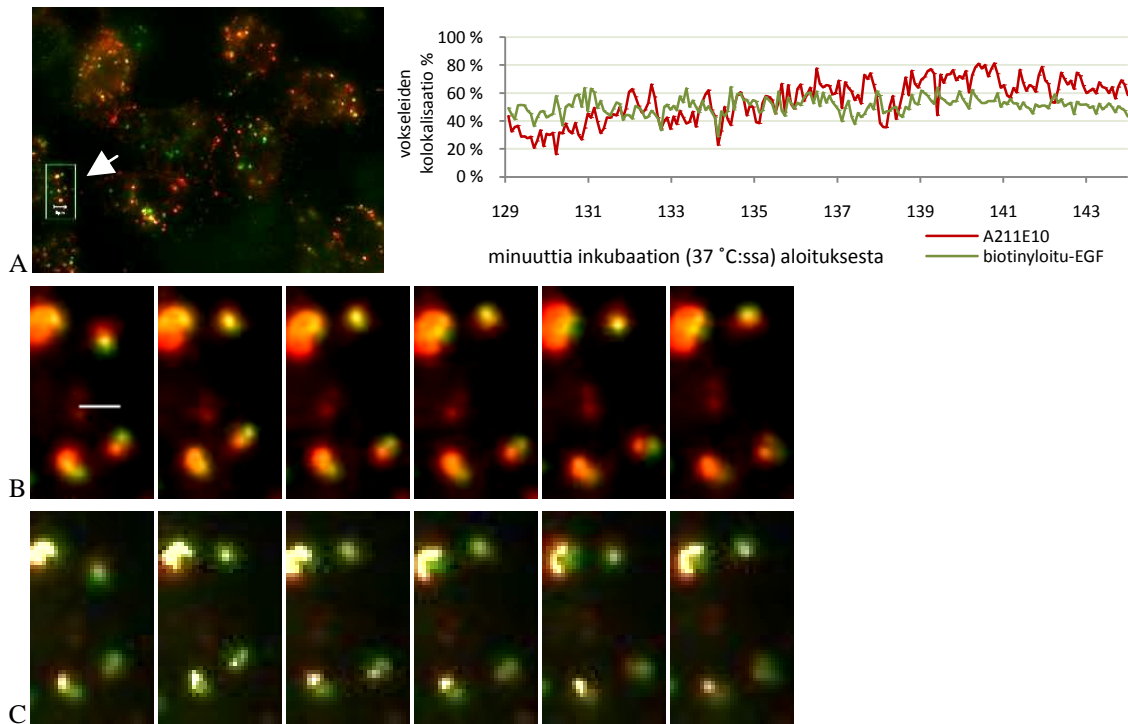
Kuva 10. Laajakenttämikroskopiakuvat elävistä soluista osoittivat, että stimuloidun EGFR:n (biotinyloitu-EGF oletettavasti sitoutuneena reseptoriin) ja klusteroidun  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin (A211E10 primääri vasta-aine käytössä) polut kohtasivat osittain, kun inkubaatio oli jatkunut 20 – 30 min. Kuvat on otettu 5,7 s välein. Integriinit näkyvät punaisina ja biotinyloidut EGF:t (+strepavidini 488) vihreinä. Koko kuvan alueelta (A) lasketut vokseleiden kolokalisaatioprosentit näkyvät oik. pisteakaaviossa. Kuvasta (A) erotettiin ROI-alue. Ensimmäisessä ROI-kuvassa (B) näkyvät valkoisena kolokalisoituvat alueet yhdessä EGFR:ien ja integriinien kanssa, toisessa kuvassa valkoisina vain kolokalisoituvat alueet, kolmannessa kuvassa EGFR:in kynnysarvon ylittäneet alueet ja neljännessä kuvassa integriinien kynnysarvon ylittäneet alueet (nuolen osoittamat vesikkelit kuvassa 11). Piskekaavio (C) osoittaa ROI-alueen kolokalisaatioprosentit. Mittajana 10  $\mu\text{m}$



Kuva 11. Kuvasarja peräkkäisten kuvien suurennetuista vesikkeleistä (A) (vesikkelit kuvasta 10, B nuoli) osoittaa vesikkeleiden liikkeen toisiaan kohti ja toisista pois päin. Vesikkelin liikkuminen myös kuva-alueella on todellista. Kuvat on otettu 5,7 s välein. Samasta kuvasarjasta otetuissa kuvissa (B) näkyy BioImageXD-ohjelmiston laskemat kolokalisaatioalueet valkoisina. Suurennos kuvasarjoissa A ja B ei ole täsmälleen sama.

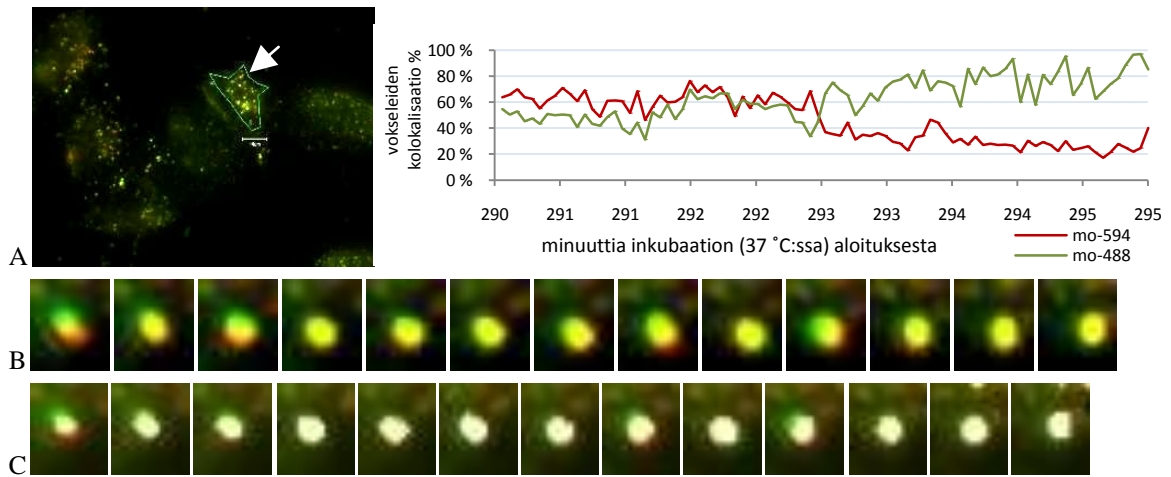


Kuva 12. Laajakenttämikroskopiakuva elävästä solusta osoittaa biotinyloidulla EGF:llä (+streptavidini-488) stimuloitua EGFR:n ja klusteroitua  $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin (A211E10 primäärivasta-aine käytössä) osittaista kolokalisaatiota 2 – 2 h 14 min kuluttua inkubaation alkamisesta. Kuvat on otettu 4,2 s välein. Integroinit näkyvät punaisina ja EGFR:t (biotinyloitu-EGF oletettavasti sitoutuneena reseptoriin) vihreinä. Koko kuvan alueelta (A) lasketut kolokalisaatioprosentit näkyvät oik. pistekaaviossa. Kuvasta (A) erotettiin ROI-alue. Ensimmäisessä ROI-kuvassa (B) näkyvät valkoisena kolokalisoituvat alueet yhdessä EGFR:ien ja integriinien kanssa, toisessa kuvassa vain kolokalisoituvat alueet, kolmannessa kuvassa EGFR:n kynnysarvon ylittäneet alueet ja neljännessä kuvassa integriinien kynnysarvon ylittäneet alueet. Pistekaavio (C) osoittaa ROI-alueen kolokalisaatioprosentit. Mittajana 10  $\mu\text{m}$



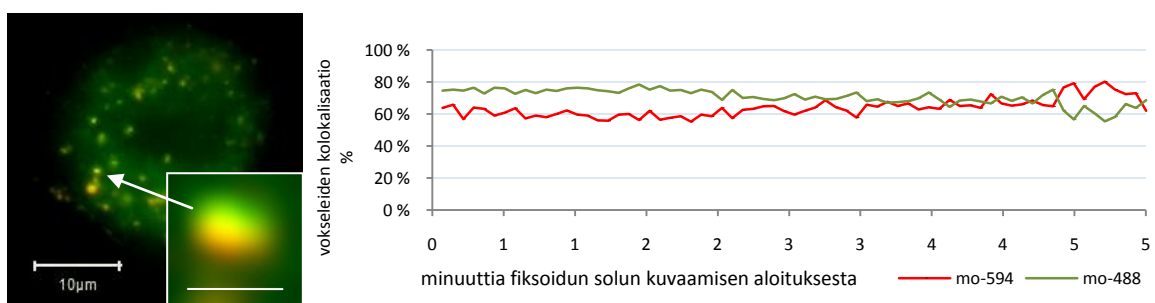
Kuva 13. Laajakenttämikroskopiakuvat elävistä soluista osoittivat, että biotinyloidulla EGF:llä stimuloitu EGFR ja klusteroitu  $\alpha 2\beta 1$ -integroiniin (MCA2025 primäärivasta-aine käytössä) käyttivät samoja reittejä, kun inkubaatio oli jatkunut 2 h 9min – 2h 24 min. Integroiniit näkyvät punaisina ja EGFR:t (biotinyloitu-EGF oletettavasti sitoutuneena reseptoriin) vihreinä. ROI-alueelta (A, nuoli) lasketut kolokalisaatioprosentit näkyvät pistekaaviossa. Kuvasarja (B) on otettu peräkkäisistä kuvista ROI-alueen sisällä olevista vesikkeleistä. Samasta kuvasarjasta otetuissa kuvissa (C) näkyy BioImageXD-ohjelmiston laskemat kolokalisaatioalueet valkoisina. Suurennos kuvasarjassa B ja C ei ole täsmälleen sama. Kuvat on otettu 4,6 s välein. Mittajana 5  $\mu\text{m}$  (A) ja 2  $\mu\text{m}$  (B)

Koska käytetyn laajakenttämikroskoopin vihreän ja punaisen kanavan kuvausten välille jää viive, haluttiin tutkia tämän viiveen vaikutusta kolokalisaation tulokseen. Kuvausviiveen aiheuttamaa kolokalisaation epätarkkuutta tarkasteltiin kontrollivideon elävistä soluista, joiden  $\alpha 2\beta 1$ -integroini oli leimattu A211E10 primäärivasta-aineella ja sekundäärivasta-aineina käytettiin sekä Alexa 488- että Alexa 594-konjukaattia. Kuvissa oli havaittavissa värien monensuuntaista polaroitumista ja vokseleiden kolokalisaatioprosenttien vaihtelu oli suurta (kuva 14). Jos polarisoituminen oli suurta, BioImage-ohjelmisto ei ilmeisesti laskenut vesikkeliön vokseleita kokonaan kolokalisoituviksi.



Kuva 14. Laajakenttämikroskopian kontrollikuvat elävistä soluista osoittivat värien polarisoitumista, kun  $\alpha 2\beta 1$ -integriini oli leimattu A211E10 primäärivasta-aineella ja sekundäärivasta-aineina käytettiin sekä Alexa 488- että Alexa 594-konjukaattia. ROI-alueelta (A, nuoli) lasketut kolokalisaatioprosentit näkyvät pistekaaviossa. Kuvasarja (B) on otettu peräkkäisistä kuvista ROI-alueen sisällä olevasta vesikkelistä. Samasta kuvasarjasta otetuissa kuvissa (C) näkyy BioImageXD-ohjelmiston laskemat kolokalisaatioalueet valkoisina. Suurennos kuvasarjassa B ja C ei ole täsmälleen sama. Kuvat on otettu 3,5 s välein. Mittajana (A) 10  $\mu\text{m}$

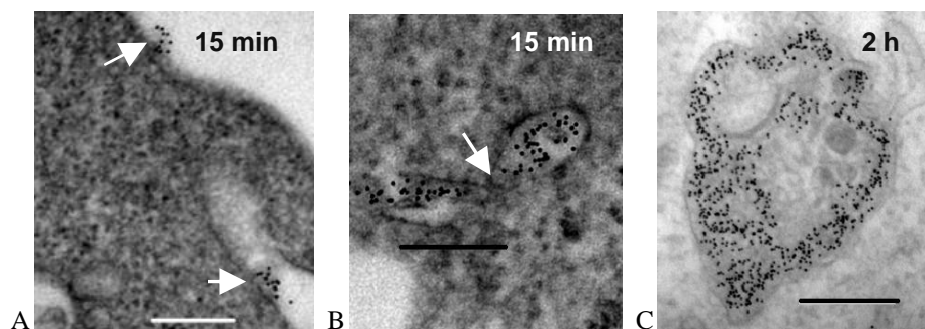
Käyttämällä em. käsittelyn saaneita, fiksattuja soluja, voitiin eliminoida vesikkelien liikkeestä johtuvaa kolokalisaatiovirhetulkintaa. Kuvaamalla aikasarjana fiksattuja soluja voitiin tarkastella, onko laitteen valolähteiden kohdistumisessa linjausvirhettä ts. kohdistuvatko molempien kanavien säteet samaan kohtaan. Fiksattujen solujen kontrollivideoissa oli tasaisempi ja korkeampi, 50 – 80 % kolokalisaatioprosentti. Kuvissa näkyi kuitenkin punaisen systemaattista polarisoitumista vihreän alapuolelle (kuva 15). Ilmiö johtui ilmeisesti laitteen pienestä linjausvirheestä. Luultavasti näistä reuna-alueista ei saatu positiivista kolokalisaatiotulosta.



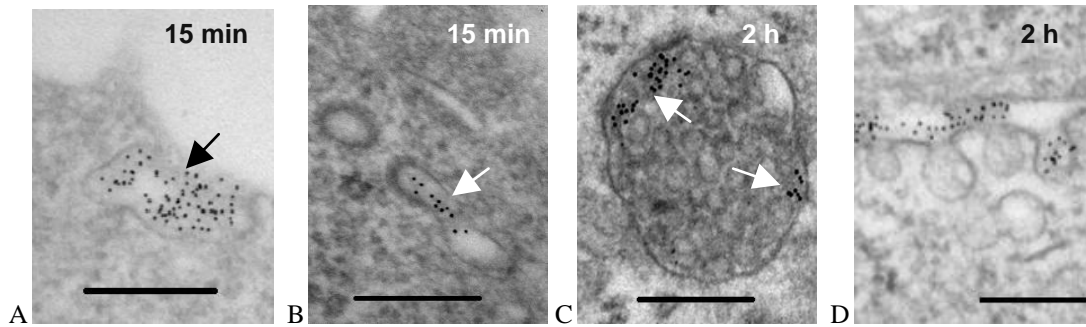
Kuva 15. Laajakenttämikroskopian fiksattujen solujen kontrollikuvista näkyi systemaattista värien polarisoitumista.  $\alpha 2\beta 1$ -integriini leimattiin A211E10 primäärivasta-aineella ja sekundäärivasta-aineina käytettiin sekä Alexa 488- että Alexa 594-konjukaattia. Pistekaaviossa oikealla on nähtävissä BioImageXD-ohjelmiston laskemat kolokalisaatioprosentit fiksoidusta solusta eri aikapisteissä. Solu oli PBS:ssä. Kuvat on otettu 4,4 s välein. Mittajana iso kuva 10  $\mu\text{m}$ , pieni kuva 1  $\mu\text{m}$

### 4.3.2 Elektronimikroskopiakuvissa $\alpha 2\beta 1$ -integriinejä sijoittui moniin eri rakenteisiin ja EGFR:t leimautuivat heikosti

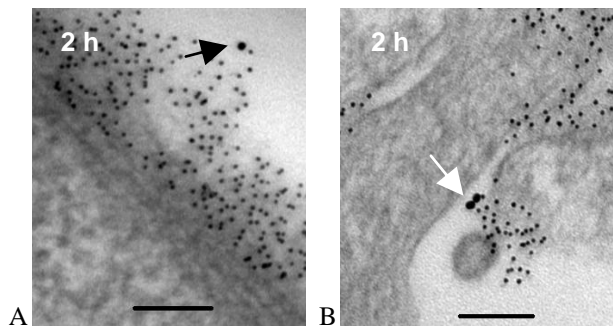
$\alpha 2\beta 1$ -integriinien ja EGFR:n internalisaatiota, kolokalisaatiota ja vuorovaikutuksia tutkittiin elektronimikroskopian avulla sekä SAOS $\alpha 2/45$ - soluilla että A549-soluilla. A211E10 tai MCA2025 toimivat primäärivasta-aineina  $\alpha 2\beta 1$ -integriinille, jotka visualisoitiin klusteroitumisen jälkeen proteiini-A:han liitetyn 5 nm kultapartikkelin avulla. EGFR:t stimuloitiin biotinyloidulla EGF:llä, johon sitoutettiin streptavidiinia, johon oli liitetty 10 nm kultapartikkeli. Integriinejä havaittiin paljon rykelminä kiinnittyneinä solukalvolle ja internalisoituneina tubulovesikulaarisiin rakenteisiin 15 min aikapisteessä. Solukalvolla integriinit esiintyivät myös solukalvon hieman sisäänpäin kääntyneissä painaumuksissa, joissa ei ollut havaittavissa mitään päällystettä. Kahden tunnin aikapisteessä integriinit esiintyvät runsaina erikokoisten MVB:ten sisällä. Sekä SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla että A549-soluilla leimatut integriinit löytyivät edellä mainituista rakenteista (kuvat 16 ja 17). A211E10 primäärivasta-ainetta käytettäessä, 2h aikapisteessä, integriinejä esiintyi lisäksi kaveoleissa. Biotinyloijat EGF:iä havaittiin vain muutamissa kohdissa solukalvolla kolokalisoituen MCA2025 vasta-aineella klusteroitujen integriinien kanssa sekä SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla että A549-soluilla (kuva 18). Kolokalisaatiokohdissa solukalvolla esiintyi runsaasti integriiniä mutta biotinyloitu-EGF näkyi vain muutamassa kohdassa. Biotinyloidulla EGF:llä stimuloitujen EGFR:ien internalisaatiota ei havaittu.



Kuva 16. Elektronimikroskopiakuvissa klusteroidut  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit internalisoituvat SAOS $\alpha 2/45$ -soluun. Integriinit ovat kiinnittyneinä solukalvolla (A) ja kuvan alaosassa oletettavasti menossa makropinosytoosilla solun sisälle 15 min aikapisteessä. Integriinejä nähtiin tubulovesikulaarissa (B) rakenteissa 15 min aikapisteessä. Integriinit esiintyivät usein runsaina MVB:n (C) sisällä 2 h aikapisteessä. Solujen  $\alpha 2$ -integriinit klusteroitumisen primäärivasta-aineena käytettiin A211E10:ntä. Leimauksessa käytettiin proteiini-A:ta, johon oli kiinnitetty 5 nm kultapartikkeli. Mittajana 200nm



Kuva 17. Elektronimikroskopiakuviissa A549-solujen klusteroidut  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit internalisoituvat soluun. Integriinit ovat kiinnittyneinä ja klusteroituneina solukalvolla (A) 15 min aikapisteessä. Sisäänmeno soluun näyttää tapahtuvan makropinosytoosilla. Integriinit ovat päässeet solun sisälle tubulovesikulaarisiin (B) rakenteisiin 15 min aikapisteessä. Kahden tunnin aikapisteessä integriinejä sijaitti paljon MVB:eissä (C). Integriinit lokalisoituivat 2h aikapisteessä myös solukalvolle (D) ja kaveoleihin. Solujen  $\alpha 2$ -integriinit klusteroinnin primäärivasta-aineena käytettiin A211E10:ntä. Leimauksessa käytettiin proteiini-A:ta, johon oli kiinnitetty 5 nm kultapartikkeli. Mittajana 200 nm



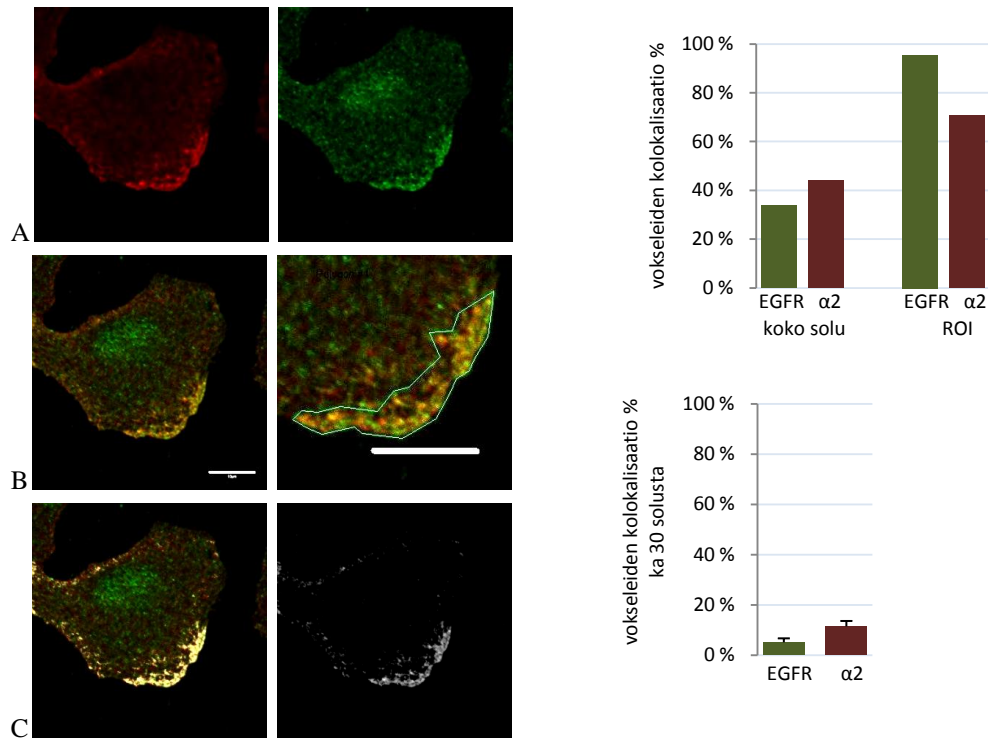
Kuva 18. Elektronimikroskopiakuviissa, 2h aikapisteessä, integriinit (5 nm leimaus) ja biotinyloitu-EGF (10 nm leimaus, nuoli) näkyvät solukalvolla kolokalisoituneina SAOS $\alpha 2/45$ -solussa (A) ja A549-solussa (B). Solujen integriinit klusteroitiin MCA2025 primäärivasta-aineella ja leimauksessa käytettiin proteiini-A:ta, johon oli kiinnitetty 5 nm kultapartikkeli. EGFR:t stimuloitiin biotinyloidulla EGF:llä ja se leimattiin streptavidiinilla, johon oli liitetty 10 nm kultapartikkeli. Mittajana 100 nm

#### 4.3.3 Klusteroimaton $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja stimuloimaton EGFR kolokalisoituvat solun periferiassa, mutta vain vähän muualla

Solun pinnalla tapahtuvaa kolokalisaatiota  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin EGFR:n välillä tutkittiin A549-soluilla, joille ei lisätty EGF:ää, joiden integriiniä ei klusteroitu ja jotka fiksoitiin suoraan 2 h kestäneestä nälkiintymisestä. Fiksaation jälkeen integriinin leimaukseen käytettiin primäärisenä vasta-aineena A211E10:ntä ja sekundäärisenä vasta-aineena Alexa 555-konjugaattia. EGFR:n leimauksessa käytettiin sekundäärisen vasta-aineena Alexa 488:aa. Konfokaalimikroskopiakuvista laskettiin kolokalisaatio yhden esimerkkisolun rajatulta alueelta, ROI:n avulla ja koko solun alueelta. Klusteroimaton  $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja stimuloimaton EGFR kolokalisoituvat solun periferiassa ja huomattavasti vähemmän solun sisällä. Molempien reseptorien voimakkaimmat fluoresenssien intensiteetit näkyvät samalla alueella solun periferiassa. Tällä alueella myös kolokalisaatio on merkittävää (kuva 19). Kolokali-



saatioprosentit laskettiin koko solun alueelta myös 30 solun keskiarvona, jolloin EGFR:ien vokselit kolokalisoiutuivat 5 % integriinien kanssa ja  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien vokselit kolokalisoiutuivat 11 % EGFR:ien kanssa. Lähes kaikilla soluilla näkyi huomattavaa EGFR:ien leimautumista tumassa (kuva 19).



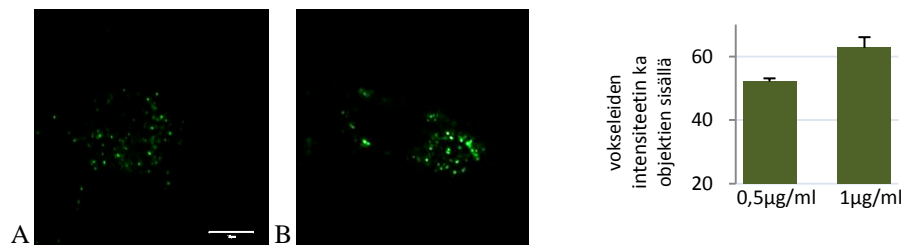
Kuva 19. A549-solun klusteroimaton  $\alpha 2\beta 1$ -integriini ja stimuloimaton EGFR kolokalisoiutuivat solun periferiassa, mutta vain vähän solun sisällä. Integriinit on värjätty punaisella ja EGFR vihreällä. Reseptorien voimakkaimmat intensiteetit näkyvät solun alareunassa (A). Värien mergekuvasta (B) on erotettu ROI-alue. BioImageXD:llä lasketut kolokalisaatioalueet (C) näkyvät kuvissa valkoisena, vas. mergekuvassa kaikki värit yhdessä ja oik. vain kolokalisaatioalueet. Ylin pylväskaavio osoittaa viereisen kuvan solusta EGFR:n ja  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin väliset kolokalisaatioprosentit koko solun alueelta ja ROI-alueelta. Alin pylväskaavio näyttää vokseleiden kolokalisaatiot 30 eri solun ka:nä. Mittajana  $10\mu\text{m}$

#### 4.3.4 EGF-pitoisuudella oli vaikutusta EGFR:ien internalisaatioon

Tutkimuksessa haluttiin selvittää, vaikuttaako EGF-pitoisuuden lisääminen internalisoitujen EGFR:ien määrään. A549-soluja oli nälkiinnytetty 1 h ennen kokeen aloittamista. Soluja inkuboitiin ( $+37\text{ }^\circ\text{C}$ :ssa  $5\%$   $\text{CO}_2$ :ssa) joko  $0,5\ \mu\text{g/ml}$  tai  $1\ \mu\text{g/ml}$  biotinyloidulla EGF-pitoisuudella ( $+\text{streptavidini-488}$ ) 2 h. Fiksattujen solujen konfokaalimikroskopiakuvista näkyi, että suuremmalla pitoisuudella solun sisällä olevien biotinyloitujen EGF:ien intensiteetti (kuva 20, B) oli suurempi kuin pienemmällä pitoisuudella (kuva 20, A). Sama ilmiö oli nähtävissä, kun soluja stimuloitiin joko  $1\ \text{ng/ml}$  tai  $100\ \text{ng/ml}$  EGF-pitoisuudella ja kun



integriinejä ei klusteroitu. Suuremmalla pitoisuudella EGFR:ien fluoresenssin intensiteetti oli korkeampi (kuva 7).

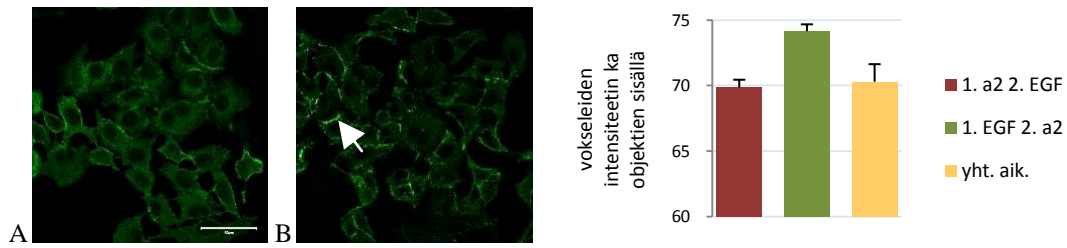


Kuva 20. Nostettaessa biotinyloidun EGF:n pitoisuutta internalisoituneiden, biotinyloitujen EGF:ien intensiteetti kasvoi 2 h:n aikapisteessä. A549-soluja inkuboitiin 1 h nälkiinnyttämisen jälkeen (+37 °C:ssa 5 % CO<sub>2</sub>:ssa) joko 0,5 µg/ml tai 1 µg/ml biotinyloidulla EGF-pitoisuudella (+streptavidini-488) 2 h. Pienemmällä pitoisuudella (A) intensiteetti on heikempi kuin suuremmalla (B) pitoisuudella. Pylväskaavio osoittaa intensiteettien erot eri pitoisuuksilla. Intensiteetin laskemisessa käytettiin 10 solun ka:a. Mittajana 10 µm

#### 4.3.5 $\alpha 2\beta 1$ -integriinin vasta-aine ja EGF voivat kilpailla solukalvolle tarttumisessa

Konfokaalimikroskopiakuvista tarkasteltiin, kilpaileeko biotinyloitu-EGF  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin vasta-aineen kanssa solukalvolle tarttumisessa. EGFR:ien (biotinyloitu-EGF oletettavasti sitoutuneena reseptoriin) fluoresenssin intensiteettiä vertailtiin soluista, joille lisättiin biotinyloitu-EGF (0,5 µg/ml) (+ streptavidini-488) ja A211E10-integriinivasta-ainetta (+ Alexa 555-konjugaatti) joko eri järjestyksessä tai yhtä aikaa 1 h:n nälkiinnyttämisen jälkeen. Solut fiksattiin suoraan jäältä. Intensiteetit laskettiin n. 300 solusta. Kuvista nähtiin, että EGFR:ien intensiteetti oli suurin, kun EGF lisättiin ensimmäiseksi (kuva 21, B). Jos soluille lisättiin A211E10-vasta-aine ensimmäiseksi, intensiteetti oli lähellä yhtäaikaisen lisäyksen tasoa. Monista, useampia soluja sisältävistä kuvista nähtiin, että solu-solu kontakteissa EGFR:ien intensiteetti oli voimakasta.

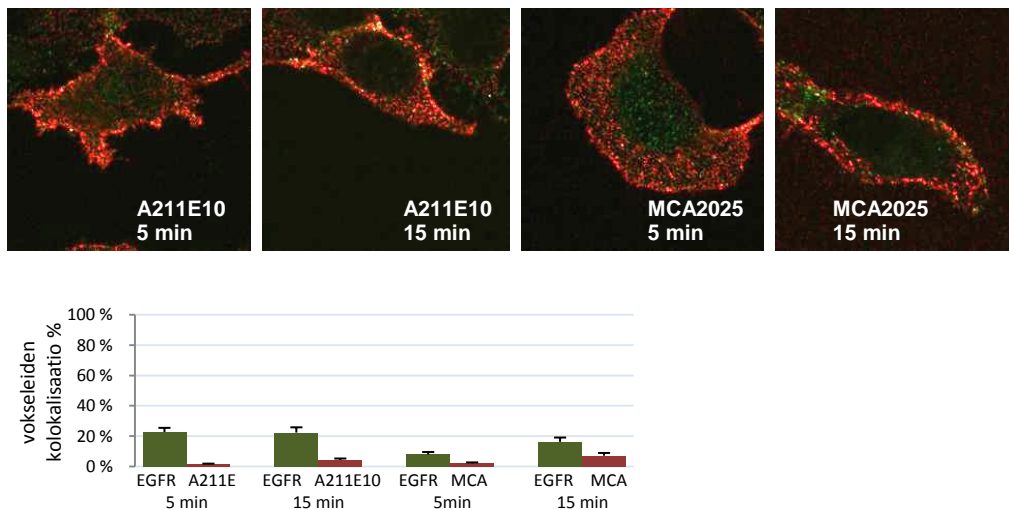
EGF:n solukalvolle tarttumisessa oli eroja myös silloin, kun soluja stimuloitiin 15 min 100 ng/ml EGF-pitoisuudella ja kun solujen  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit oli klusteroitu joko vasta-aineilla, EV1:llä tai solujen integriinit olivat klusteroimattomia (kuva 8). Soluista leimattujen EGFR:ien intensiteetti oli matalin vasta-aine klusteroinnilla. Klusteroimattomien ja EV1:llä klusteroitujen solujen EGFR:ien intensiteetti oli huomattavasti korkeampi.



Kuva 21. A549-solujen konfokaalimikroskopiakuvista tarkasteltiin, kilpaileeko biotinyloitu-EGF  $\alpha 2\beta 1$ -integroinin vasta-aineen kanssa solukalvolle tarttumisessa. Biotinyloidun EGF:n intensiteettiä mitattiin eri järjestystilanteissa. Kuvassa A näkyvät solut, joille lisättiin ensimmäiseksi A211E10 (a2) vasta-aine. Kuvassa B soluille annettiin ensiksi biotinyloitu-EGF ja A211E10-vasta-aine sen jälkeen. Solut fiksoitiin suoraan jäältä. Kokeen EGFR:ien intensiteetit laskettiin ka:nä n. 300 solusta. Pylväskaavio näyttää ligandien intensiteetit kutakin lisäämisjärjestystä käytettäessä. Mittajana 50  $\mu$ m

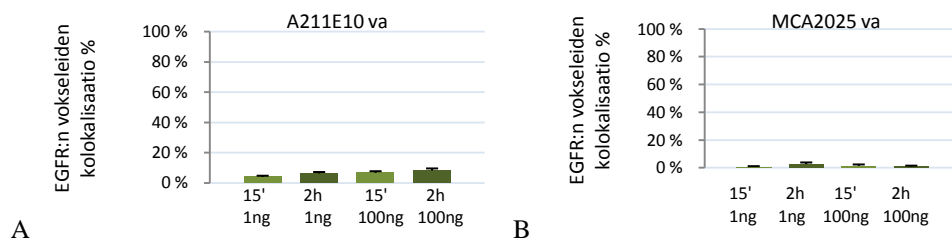
#### 4.3.6 Internalisaation varhaisessa vaiheessa ja 2h:n aikapisteessä $\alpha 2\beta 1$ -integroinit ja stimuloitujen EGFR:t kolokalisoituvat vain vähän

Konfokaalimikroskopiolla, A549-soluilla, tutkittiin klusteroitujen  $\alpha 2\beta 1$ -integroinien ja stimuloitujen EGFR:ien kolokalisaatiota internalisaation varhaisessa vaiheessa. A549-soluja stimuloitiin biotinyloidulla EGF:llä (0,5  $\mu$ g/ml) (+streptavidini-488). Integroinien klusterointiin käytettiin joko A211E10 tai MCA2025 primäärivasta-ainetta ja Alexa 555-konjugaattia. Vokseleiden kolokalisaatioprosentit laskettiin 5 minuutin ja 15 minuutin aikapisteistä. Näissä aikapisteissä integroinit esiintyivät vielä suurelta osin solujen reunoilla. EGFR:t (biotinyloitu-EGF oletettavasti sitoutuneena reseptoriin) sijoittuivat koko solun alueelle. Kolokalisaatioprosentit jäivät alhaisiksi kaikissa eri aikapisteissä (kuva 22).



Kuva 22.  $\alpha 2\beta 1$ -integroinin ja EGFR:n internalisaation varhaisen vaiheen kolokalisaatiota tutkittiin A549-soluilla. Solut stimuloitiin biotinyloidulla EGF:llä (0,5  $\mu$ g/ml) (+streptavidini-488:lla) (vihr.) ja integroinien klusterointiin käytettiin joko A211E10 tai MCA2025 primäärivasta-ainetta ja Alexa 555-konjugaattia (pun.). Konfokaalimikroskopiakuvissa näkyvät valkoisina myös BioImageXD-ohjelmiston laskemat kolokalisoituvat kohdat kynnyksarvon ylittäneiltä alueilta. Pylväskaavio havainnollistaa eri aikapisteiden kolokalisaatioprosentit ka:nä 30 solusta.

EGFR:n ja  $\alpha 2\beta 1$ - integriinien kolokalisaatioprosentit laskettiin vielä konfokaalimikrosko- piakuvista SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla tehdyistä näytteistä, joiden solut oli stimuloitu joko 1 ng/ml tai 100ng/ml EGF-pitoisuudella ja joiden integriinien klusteroinnissa käytettiin primääri- vasta-aineena A211E10:tä tai MCA2025:tä ja sekundäärivasta-aineina sekä integriinin klusteroijana toimi hiiren vasta-aineita tunnistava Alexa 488-konjugaatti. Solujen EGFR:t leimattiin solujen fiksaation jälkeen. Kaikissa kokeissa reseptorien välillä nähtiin vain vä- hän kolokalisaatiota (kuva 23).



Kuva 23. Pylväskaaviot osoittavat 15 min ja 2 h:n aikapisteissä EGFR:n kolokalisaatioprosentit  $\alpha 2\beta 1$ - integriinien kanssa. Solut oli stimuloitu joko 1 ng/ml tai 100ng/ml EGF-pitoisuudella ja solujen integriinien klusterointiin käytettiin primäärivasta-aineena A211E10:tä tai MCA2025:tä (+ sekundäärivasta-aine). EGFR:t leimattiin solujen fiksaation jälkeen. Vokseleiden kolokalisaatioprosentit on laskettu ka:nä 20 solus- ta.

Konfokaalimikroskopiassa korkean kolokalisaatioprosentin kontrollina käytettiin soluja, joiden integriinit oli klusteroitu biotinyloidulla A211E10 vasta-aineella, johon oli sitoutu- nut streptavidini-488 ja MCA2025 vasta-aineella, johon oli sitoutunut Alexa 555- konjugaatti. Odotetusti korkean kolokalisaation analysoinnin kontrolliksi valituissa soluis- sa (kuva 24) vokseleiden kolokalisaatio oli yli 80 %.



Kuva 24. Konfokaalimikroskopiassa korkean kolokalisaation analyysin kontrollina käytettyjen solujen in- tegriinit oli klusteroitu biotinyloidulla A211E10 vasta-aineella, johon oli sitoutunut streptavidini-488 ja MCA2025 vasta-aineella, johon oli sitoutunut Alexa-555. Merge kuvassa (A) näkyvät oranssina kolokalisoi- tuvat kohdat SAOS $\alpha 2/45$ -solussa 2 h:n aikapisteessä. Toisessa kuvassa (B) on nähtävissä valkoisina BioIma- geXD-ohjelmiston laskemat kolokalisoituvat alueet A-kuvan kynnsarvon ylittäneiltä alueilta. Pylväskaavio osoittaa vokseleiden kolokalisaatioprosentit sekä SAOS $\alpha 2/45$ -soluille että A549-soluille eri aikapisteissä ka:nä 30 solusta.

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä tutkimuksessa tarkasteltiin  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja EGFR:ien välisiä vuorovaikutuksia konfokaalimikroskopian, läpäisyelektronimikroskopian ja laajakenttämikroskopian avulla immunoleimauksia käyttäen.

Tutkimuksessa saaduista tuloksista voidaan päätellä, että  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin klusteroinnilla on negatiivinen vaikutus EGFR:ien hajotusnopeuteen. Ilmiö havaittiin SAOS $\alpha 2/45$ -soluissa suurilla EGF-pitoisuuksilla. Pienellä EGF-pitoisuudella klusteroimattomilla SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla EGFR:n hajoamista ei ollut havaittavissa. Todennäköisesti näillä soluilla ei ollut riittävästi EGFR:iä hajotuksen havainnointiin, joten tutkimuksia jatkettiin A549-solujen analysoinnilla. Aiemmin tehtyjen A549-solujen näytteistä havaittiin, että integriinien klusterointi hidasti EGFR:ien hajoamista sekä 1ng/ml että 100ng/ml EGF-pitoisuuksilla. Tutkimusta jatkettiin uudelleen A549-soluilla tehdyillä kokeilla, joissa integriinit klusteroitiin sekä vasta-aineella että viruksella. Edellä mainittu ilmiö toistui myös virusklusteroinnin seurauksena. Näiden tulosten perusteella voidaan olettaa, että integriinien klusterointi toimii mahdollisesti negatiivisena säätelijänä EGFR:ien hajotukselle.

Kasvutekijäreseptorien hajotuksen hidastumisesta voisivat hyötyä ne virukset, jotka käyttävät integriinejä reseptoreinaan. Esimerkiksi EV1:n on todettu käyttävän  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniä reseptorina soluun tunkeutumisessa (Marjomäki ym., 2002). Viruksen kiinnittyminen reseptoriinsa saa aikaan integriinireseptorien klusteroitumisen (Jokinen ym., 2010). Jos EGFR:in hajotusta voidaan hidastaa virusten toimittaman integriinien klusteroinnin seurauksena, virukselle voi tarjoutua solun loisena paremmat olosuhteet.

PKC:n aktivaation on todettu estävän stimuloitun EGFR:n kulkeutumista LE:hen (Bao ym., 2000). PKC:n estovaikutus välittyy EGFR:n treoniini 654:n kautta. Jos tämä treoniini tulee fosforyloiduksi PKC:n toimesta, treoniinifosforyloitu EGFR internalisoidaan normaalisti, mutta reseptoria ei ohjata lysosomaliseen hajotukseen. Lisäksi PKC toimii kontrolloijana integriinien internalisaatiossa (Ivaska ym., 2002) ja PKC $\alpha$ :n signaali on tärkeää EV1:n solun sisään pääsemisessä. Ilman PKC $\alpha$ :n aktivaatiota viruksen solun sisään pääseminen estyy. EV1 aktivoi PKC $\alpha$ :n  $\alpha 2\beta 1$ -integriiniin tarttumisen jälkeen (Upla ym., 2004). Virus hyötyy siis molempien mekanismien kautta tapahtuvassa PKC:n aktivaatiosta.

Tutkittaessa EGF-stimulaation vaikutusta  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin polkuun todettiin, että integriinin fluoresenssin intensiteetti lisääntyi segmentoitujen objektien sisällä 2 h:n aikapisteessä SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla. EGFR:t oli stimuloitu joko 1 ng/ml tai 100ng/ml EGF-pitoisuudella. Sekä A211E10:tä että MCA2025:tä vasta-aineiden käytöllä huomattiin sama intensiteetin nousu. Eri EGF-pitoisuudet eivät vaikuttaneet merkittävästi integriinien intensiteettiin. Kun integriinit klusteroitiin, intensiteetin kasvu oli odotettavissa, koska aikaisessa 15 min aikapisteessä integriinit olivat vielä hajallaan (diffusioituneina) ja siten segmentoitujen objektien intensiteetti jäi heikommaksi. Integriinejä havaittiin vielä paljon solun pinnalta 15 min aikapisteessä. Klusteroitumisen tapahduttua 2h aikapisteessä integriinit olivat internalisoituneet hyvin ja muodostivat kirkkaina nähtäviä kerääntymiä solun sisäosiin.

Tässä tutkimuksessa fluoresenssien intensiteetin analysoinnissa käytettiin vokseleiden intensiteetin keskiarvoa segmentoitujen objektien eli vesikkelien sisällä. Menetelmä on hyvä esim. silloin, kun solujen koot vaihtelevat ja se ei vaadi intensiteetin suhteuttamista solun kokoon tai vesikkelien määrään. Jos solussa on vain muutama erittäin kirkas vesikkeli, intensiteetti-arvot voivat kuitenkin näyttäytyä suhteettoman korkeina. Vokseleiden intensiteetin summasta voidaan havaita hyvin segmentoitujen alueiden kokonaisintensiteetti, mutta analyyseissä se on hyvä suhteuttaa esim. objektien määrään tai solun kokoon. Tämän tutkimuksen aikana tarkasteltiin myös kokonaisintensiteetin jakamista objektien määrällä ja tulokset olivat samansuuntaisia tutkimuksessa käytetyn menetelmän tulosten kanssa.

Kun  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien ja EGFR:n internalisaatiota, kolokalisaatiota ja vuorovaikutuksia tutkittiin elektronimikroskopian avulla, integriinien internalisaatiota saatiin seurattua hyvin. Aikaisempien tutkimusten (Karjalainen ym., 2008) kaltaisesti integriinien havaittiin internalisoituvan tubulovesikulaarisiin rakenteisiin solun sisälle sekä SAOS $\alpha 2/45$ - että A549-soluilla. A211E10 primäärivasta-ainetta käytettäessä, 2h aikapisteessä, integriinejä esiintyi lisäksi kaveoleissa A549-soluilla. Kahden tunnin aikapisteessä integriinit olivat saavuttaneet MVB:t. EGFR:t leimautuivat vain muutamissa kohdissa solukalvolla 2h aikapisteessä ja kolokalisoiutuivat klusteroitujen integriinien kanssa käytettäessä MCA2025-vasta-ainetta. Koe uusittiin A549-soluille niin, että biotinyloitu EGF ja streptavidiinikulta sitoutettiin soluille ensin ja vasta sen jälkeen soluille annettiin integriinien primäärivasta-aineet ja klusteroiva sekundäärivasta-aine. Näin varmistettiin, ettei runsas kultaleimaus integriineille estänyt streptavidiinikullan sitoutumista. EGFR:t leimautuivat silti vain muu-

tamassa kohdassa solukalvolla eikä niitä nähty internalisoituneina. Olosuhteiden ja koemethodien optimointi voisi olla ratkaisuna paremman visualisoinnin saavuttamiseksi.

Tutkittaessa laajakenttämikroskopiolla eläviä soluja stimuloitujen EGFR:ien ja klusteroitujen  $\alpha 2\beta 1$ -integroinien havaittiin kulkevan samoja reittejä. Internalisaatiota seurattiin videoista eri aikaväleillä. Mikroskopiakuvat elävistä soluista osoittivat, että stimuloitujen EGFR:n ja klusteroidun  $\alpha 2\beta 1$ -integroinin reitit kohtasivat usein. Eri lastin sisältämät vesikkelit pyörivät toinen toistensa ympärillä, välillä kohdaten toisensa ja välillä eroten toisistaan. Havaintojen perusteella voidaan olettaa, että EGFR- ja integroinivesikkelit kulkivat usein samoja mikrotubuluksia pitkin ja olivat vuorovaikutuksessa toistensa kanssa. Näissä elävien solujen kuvaamisissa integroinien stimuloijana käytettiin biotinyloitua EGF:ää. Tuloksissa ja tulosten tarkastelussa oletetaan, että ligandi on kiinnittynyt reseptoriin ja siksi käytetään ilmaisua EGFR. Fluoresenssisignaali tulee kuitenkin ligandiin kiinnittyneestä Alexa-väristä eikä voida olla täysin varmoja ligandi-reseptori-kompleksin muodostumisesta.

Laajakenttämikroskopia-analyseissä stimuloitujen EGFR:ien ja klusteroitujen  $\alpha 2\beta 1$ -integroinien väliset vokseleiden prosentuaaliset kolokalisaatiot vaihtelivat paljon. Kolokalisaatioanalysointi osoittautui haasteelliseksi. Sopivien kynnyksarvojen (engl. thresholds) määrittäminen oli yksi pulmallisimmista tehtävistä. Laajakenttämikroskopiakuvat ovat epätarkkoja ja fluoresenssin diffuusio on suurta. Tutkimusryhmässä jatketaan analysointia käyttäen avuksi kuvien dekonvoluutiota, jolla voidaan parantaa kuvien tarkkuutta. Kolokalisaatioanalyysiin on myös kehitteillä uusia algoritmeja ja matemaattisia menetelmiä. Tämän tutkimuksen materiaalia hyödynnetään em. kehitystyössä. Tässä tutkimuksessa käytetty analysointimenetelmä ja kynnyksarvojen asettelu johti positiivisiin vokseleiden kolokalisaatioihin eri lastin sisältämien vesikkeliin kohtaamisreunoilla. Epäilyttävä positiivinen kolokalisaatio aiheutui myös silloin, kun nämä vesikkelit olivat päällekkäin. Selvitettäväksi jää, onko kolokalisaatio todellista vai kulkevatko vesikkelit vain aivan lähekkäin. Todennäköistä epätarkkuutta analyysiin aiheutui myös viiveestä, joka johtuu kahdella eri fluoresenssillä kuvaamisesta valolähteen vaihtumisen viedessä aikaa. Vesikkelit voivat siirtyä viiveen aikana ja mahdollinen kolokalisaatio jää silloin havaitsematta tai ei-kolokalisoituvat vesikkelit voivat näyttäytyä samassa paikassa.

Kuvausviiveestä johtuvaa virhemahdollisuutta tutkittiin soluilla, joiden  $\alpha 2\beta 1$ -integriineille käytettiin yhtä primäärivasta-ainetta, johon sitoutettiin kahta eri sekundäärivasta-ainetta, Alexa 488- ja Alexa 594-konjugaattia. Tällä menetelmällä saatiin varmistettua kolokalisaation todellisuus. Kontrollikuvat elävistä soluista osoittivat, että kuvausviive eri kanavien välillä voi aiheuttaa värien polarisoitumista ja siten vaikuttaa vokseleiden kolokalisaatioprosenttiin. Polarisoituminen elävillä soluilla oli monensuuntaista eikä systemaattista joutuksen todennäköisesti vesikkelien satunnaisesta liikkeestä. Nopeasti liikkuvilla vesikkeleillä virhetulkinnan mahdollisuus kasvaa, kun kuvausviiveen aikana vesikkelit ehtivät siirtyä pidemmän matkan kuvausten välillä. Pistekaaviossa (kuva 14, A) näkyvä nopea kolokalisaation muutos voikin olla seurausta vesikkelien nopeasta liikkeestä. Tutkimusryhmässä jatketaan myös nopeuksien seuranta eri lastin sisältävien vesikkelien liikkeistä. Olisi mielenkiintoista vielä selvittää, jääkö nopeasti liikkuvilla vesikkeleillä kolokalisaatio hitaasti liikkuvia pienemmäksi. Yllä mainittu kuvausviive voisi olla siihen yhtenä vaikuttajana.

Kuvaamalla aikasarjana fiksattuja soluja (käsitelty samoin kuin em. aikaviiveen kontrollisolut) voitiin eliminoida vesikkelien liikkeestä johtuvaa kolokalisaatiovirhetulkintaa ja tarkastella, onko laitteen valolähteiden kohdistumisessa linjausvirhettä ts. kohdistuvatko molempien kanavien säteet samaan kohtaan. Fiksattujen solujen kontrollivideoissa oli odotetusti tasaisempi ja korkeampi, 50 – 80 % kolokalisaatioprosentti. Kuvausviiveestä ei ollut liikkumattomille soluille haittaa, mutta kuvissa näkyi kuitenkin punaisen systemaattista polarisoitumista vihreän alapuolelle (kuva 15). Ilmiö johtui ilmeisesti laitteen pienestä linjausvirheestä. Luultavasti näistä reuna-alueista ei saatu positiivista kolokalisaatiotulosta. Fiksoidut solut olivat PBS:ssä, joten liikkuva nestepinta saattoi aiheuttaa jonkin verran vaihtelua emittoitujen fluoresenssin määrään.

Tutkittaessa klusteroimattoman  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin ja stimuloimattoman EGFR:n kolokalisaatiota havaittiin solun periferiassa rajatulla alueella huomattavasti enemmän kolokalisaatiota kuin solun sisällä. Molempien reseptorien voimakkaimmat fluoresenssien intensiteetit näkyvät samalla alueella (kuva 19). Kirjallisuudessa mainitaan, että soluissa, joiden integriinit ovat kiinnittyneinä ligandeihinsa, EGFR:ien määrä solukalvolla on merkittävästi lisääntynyt (Moro ym., 2002). Oletettavasti voimakas kolokalisaatio solun periferiassa on seurausta integriinien kerääntymisestä fokaaliadheesioihin ja samalle alueelle paikantuneista EGFR:istä. Tässä analyysissä seurattiin vain yhden solun ROI-alueen mielenkiintoista ilmiötä, joten vertailua on vielä tehtävä lisää. Stimuloimattomien solujen reseptorien koloka-

lisaatiot koko solun alueetta laskettiin kuitenkin 30 solun keskiarvona ja tulokset osoittivat vain vähäistä kolokalisaatiota. Stimuloimattomilla soluilla näkyi myös huomattavaa EGFR:ien leimautumista tumassa (kuva 19). Tämä huomio on yhdenmukainen aikaisempien tutkimusten kanssa, joissa todetaan EGFR:ien kulkeutuvan myös tumaan (Irwin ym., 2010, Wang ym., 2010a ja Miaczynska ym., 2004).

Nostettaessa EGF-pitoisuutta kaksinkertaiseksi reseptoreihin sitoutuneiden ja solun sisällä olevien ligandi-reseptorikompleksien fluoresenssin intensiteetti kasvoi 2 h:n aikapisteessä. Todennäköisesti EGF-pitoisuuden nostaminen lisäsi reseptorien internalisaatiota. Kun fluoresenssin intensiteetit lasketaan biotinyloidun EGF:n ja streptavidini-Alexa-488 avulla, ei voida olla varmoja, osoittaako intensiteetti internalisoituja ligandi-reseptorikomplekseja vai ainoastaan Alexa väriä. Väri säilyy solussa oletettavasti pidempään kuin EGFR:t. Intensiteetin laskemisessa käytettiin keskiarvoa vain 10 solusta, joten havaintoa oli hyvä verrata myös muihin kokeisiin. Saman ilmiön huomattiin kuitenkin toistuvan kokeessa, jossa soluja oli stimuloitu joko 1 ng/ml tai 100 ng/ml EGF-pitoisuudella ja kun integriinejä ei klusteroitu ja EGFR:t oli leimattu jälkikäteen. Suuremmalla pitoisuudella EGFR:ien fluoresenssin intensiteetti oli korkeampi (kuva 7) kuin pienellä pitoisuudella.

Tarkasteltaessa, kilpaileeko biotinyloitu-EGF  $\alpha 2\beta 1$ -integriinin kanssa solukalvolle tarttumisessa, analysoitiin reseptoriin sitoutuneen, biotinyloidun EGF:n fluoresenssin intensiteettiä. Soluille oli lisätty biotinyloitu-EGF ja integriinivasta-ainetta joko eri järjestyksessä tai yhtä aikaa 1 h:n nälkiinnyttämisen jälkeen. Solut fiksattiin suoraan jäältä. Kuvista nähtiin, että reseptori-ligandikompleksin intensiteetti oli suurin, kun EGF lisättiin ensimmäiseksi (kuva 21, B). Tämän tutkimuksen kokeissa päädyttiin käyttämään ligandien yhtäaikaista lisäystä. Menetelmällä pyrittiin estämään mahdollinen lisäsjärjestyksen vaikuttama vääristymä tutkimustuloksiin. Monista useampia soluja sisältävistä kuvista nähtiin, että solu-solu kontakteissa intensiteetti oli voimakasta. Tutkimuksissa on osoitettu, että EGFR ja  $\alpha 2\beta 1$ -integriini esiintyvät yhdessä solun pinnalla ja EGFR-integriinikompleksi sijoittuu pääasiallisesti solu-solu kontaktipaikkoihin (Yu ym., 2000).

EGF:n solukalvolle tarttumisessa havaittiin eroja myös tilanteissa, joissa soluja stimuloitiin 15 min 100 ng/ml EGF-pitoisuudella ja solujen  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit oli klusteroitu joko vastaaineilla, EV1:llä tai solujen integriinit olivat klusteroimattomia (kuva 8). EGFR:ien intensiteetti oli matalin vasta-aine klusteroinnilla. Klusteroimattomien ja EV1:llä klusteroitujen



solujen EGFR:ien intensiteetti oli huomattavasti korkeampi. Kokeesta voidaan päätellä, että EGF:n kiinnittymishanakkuus reseptoriinsa on riippuvaista myös integriinien klusteroinnin aiheuttajasta. Ilmeisesti EV1:llä tapahtuva integriinien klusterointi ei estä EGF:n sitoutumista reseptoriin, mutta integriinivasta-aine voi estää EGF:n kiinnittymistä. Virus voi mahdollisesti hyötyä siitä, että EGFR:n internalisaatio ja signalointi ei esty viruksen toimittaman integriinien klusteroitumisen seurauksena. Vertailukokeita olisi mielenkiintoista toistaa.

Konfokaalimikroskopiolla, A549-soluilla, tarkasteltiin klusteroitujen  $\alpha 2\beta 1$ -integriinien ja biotinyloidulla EGF:llä stimuloitujen EGFR:ien kolokalisaatiota internalisaation varhaisessa vaiheessa ja SAOS $\alpha 2/45$ -soluilla myös 2 h:n aikapisteessä. Kaikissa kokeissa reseptorien välillä nähtiin vain vähän kolokalisaatiota.

Konfokaalimikroskopiakuvat ovat resoluutioltaan tarkempia kuin laajakenttämikroskopiakuvat, joten kolokalisaatioprosentit oli mahdollista havaita selvemmin. Kuitenkin myös konfokaalimikroskopiakuvista sopivien kynnsarvojen määrittely oli erittäin haastavaa ja vaikutti suuresti analysoinnin tuloksiin. Tutkimuksia jatkettiin myöhemmin tekemällä kuville dekonvoluutio, jolla voitiin parantaa kuvien tarkkuutta. Laajakenttämikroskopiassa, kuvausviiveen aiheuttaman virheen ja linjausvirheen lisäksi, vesikkelien tarkempi seuranta osoitti, että kolokalisaatioprosentti vääristyy ilmeisesti myös eri lastin sisältämien vesikkelien ollessa aivan vierekkäin. Huonon resoluution vuoksi vesikkelien lähekkäin olevat rajapinnat aiheuttavat ilmeisen väärän kolokalisaatio.

Aktivoituneiden EGFR:ien hajotus on tärkeä prosessi, koska solun täytyy pystyä lopettamaan kasvu- ja lisääntymissignaalit. Tässä tutkimuksessa havaittiin integriinien klusteroisella olevan vaikutusta tähän hajotusprosessiin. Tutkimuksen tuloksista voidaan päätellä, että integriinien klusterointi toimii negatiivisena säätelijänä EGFR:n hajotukselle. Tulokset osoittivat myös, että EGFR ja  $\alpha 2\beta 1$ -integriinit kolokalisoituvat osittain solun pinnalla ja että internalisaation jälkeen reseptorit kiertelevät toinen toisensa ympärillä kulkien samoja reittejä ilman merkittävää kolokalisaatiota. Vaikka reseptorien välinen kolokalisaatio osoitautui vähäiseksi sytoplasmisissa rakenteissa, integriinit voivat selvästi vaikuttaa EGFR:ien kohtaloon solussa. Vähentynyt EGFR:ien hajoaminen voi lisätä EGFR:in signalointia, auttaa solua säilymään hengissä pidempään ja saattaa olla hyödyllistä viruksen lisääntymisen kannalta.

## Lähdeluettelo

- Alwan, H.A., E.J. van Zoelen ja J.E. van Leeuwen. 2003. Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J.Biol.Chem.* 278:35781-35790.
- Aoh, Q.L., A.M. Castle, C.H. Hubbard, O. Katsumata ja J.D. Castle. 2009. SCAMP3 negatively regulates epidermal growth factor receptor degradation and promotes receptor recycling. *Mol.Biol.Cell.* 20:1816-1832.
- 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.
- Caswell, P. ja J. Norman. 2008. Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion. *Trends Cell Biol.* 18:257-263.
- Caswell, P.T. ja J.C. Norman. 2006. Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic.* 7:14-21.
- Caswell, P.T., S. Vadrevu ja J.C. Norman. 2009. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10:843-853.
- Ceresa, B.P. ja S.J. Bahr. 2006. Rab7 Activity Affects Epidermal Growth Factor:epidermal Growth Factor Receptor Degradation by Regulating Endocytic Trafficking from the Late Endosome. *J.Biol.Chem.* 281:1099-1106.
- Citri, A. ja Y. Yarden. 2006. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7:505-516.
- Cuenda, A. ja S. Rousseau. 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim.Biophys.Acta.* 1773:1358-1375.
- del Pozo, M.A., N. Balasubramanian, N.B. Alderson, W.B. Kiosses, A. Grande-Garcia, R.G. Anderson ja M.A. Schwartz. 2005. Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization. *Nat.Cell Biol.* 7:901-908.
- Denu, J.M., J.A. Stuckey, M.A. Saper ja J.E. Dixon. 1996. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell.* 87:361-364.
- Dikic, I. 2003. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem.Soc.Trans.* 31:1178-1181.
- Doherty, G.J. ja H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu.Rev.Biochem.* 78:857-902.
- Ford, M.G., I.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J. Praefcke, P.R. Evans ja H.T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* 419:361-366.
- Giancotti, F.G. ja E. Ruoslahti. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285:1028-1032.
- Giancotti, F.G. ja G. Tarone. 2003. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 19:173-206.
- Gould, G.W. ja J. Lippincott-Schwartz. 2009. New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10:287-292.

- Huang, F., L.K. Goh ja A. Sorkin. 2007. EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:16904-16909.
- Irwin, M.E., K.L. Mueller, N. Bohin, Y. Ge ja J.L. Boerner. 2010. Lipid raft localization of EGFR alters the response of cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J.Cell.Physiol.*
- Ivaska, J. ja J. Heino. 2010. Interplay between cell adhesion and growth factor receptors: from the plasma membrane to the endosomes. *Cell Tissue Res.* 339:111-120.
- Ivaska, J., H. Reunanen, J. Westermarck, L. Koivisto, V.M. Kahari ja J. Heino. 1999. Integrin alpha2beta1 mediates isoform-specific activation of p38 and upregulation of collagen gene transcription by a mechanism involving the alpha2 cytoplasmic tail. *J.Cell Biol.* 147:401-416.
- Ivaska, J., K. Vuoriluoto, T. Huovinen, I. Izawa, M. Inagaki ja P.J. Parker. 2005. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.* 24:3834-3845.
- Ivaska, J., R.D. Whelan, R. Watson ja P.J. Parker. 2002. PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J.* 21:3608-3619.
- 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.
- Jones, M.C., P.T. Caswell ja J.C. Norman. 2006. Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Curr.Opin.Cell Biol.* 18:549-557.
- 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.
- Kazacic, M., V. Bertelsen, K.W. Pedersen, T.T. Vuong, M.V. Grandal, M.S. Rodland, L.M. Traub, E. Stang ja I.H. Madhus. 2009. Epsin 1 is involved in recruitment of ubiquitinated EGF receptors into clathrin-coated pits. *Traffic.* 10:235-245.
- Kazacic, M., K. Roepstorff, L.E. Johannessen, N.M. Pedersen, B. van Deurs, E. Stang ja I.H. Madhus. 2006. EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae. *Traffic.* 7:1518-1527.
- Kirisits, A., D. Pils ja M. Krainer. 2007. Epidermal growth factor receptor degradation: an alternative view of oncogenic pathways. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 39:2173-2182.
- Liberali, P., E. Kakkonen, G. Turacchio, C. Valente, A. Spaar, G. Perinetti, R.A. Bockmann, D. Corda, A. Colanzi, V. Marjomaki ja A. Luini. 2008a. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J.* 27:970-981.
- Liberali, P., P. Ramo ja L. Pelkmans. 2008b. Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 24:501-523.
- 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.
- 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.

- Miaczynska, M., S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler-Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R.G. Parton ja M. Zerial. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 116:445-456.
- 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.
- 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.
- Olayioye, M.A., R.M. Neve, H.A. Lane ja N.E. Hynes. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 19:3159-3167.
- Orlichenko, L., B. Huang, E. Krueger ja M.A. McNiven. 2006. Epithelial growth factor-induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine 14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J.Biol.Chem*. 281:4570-4579.
- Parsons, J.T. 2003. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J.Cell.Sci*. 116:1409-1416.
- 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. ja J. Ivaska. 2006. Integrin traffic. *J.Cell.Sci*. 119:3723-3731.
- Pines, G., W.J. Kostler ja Y. Yarden. 2010. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett*. 584:2699-2706.
- Raiborg, C., T.E. Rusten ja H. Stenmark. 2003. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr.Opin.Cell Biol*. 15:446-455.
- Rappoport, J.Z. ja S.M. Simon. 2009. Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots. *J.Cell.Sci*. 122:1301-1305.
- Sadowski, L., I. Pilecka ja M. Miaczynska. 2009. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Exp.Cell Res*. 315:1601-1609.
- Schwartz, M.A. ja M.H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat.Cell Biol*. 4:E65-8.
- 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.
- Sigismund, S., T. Woelk, C. Puri, E. Maspero, C. Tacchetti, P. Transidico, P.P. Di Fiore ja S. Polo. 2005. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 102:2760-2765.
- Sorkin, A. ja J.E. Duex. 2010. Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor. *Curr.Protoc.Cell.Biol*. Chapter 15:Unit 15.14.

- Sorkin, A. ja L.K. Goh. 2009. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp.Cell Res.* 315:683-696.
- Sorkin, A. ja M. von Zastrow. 2009. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10:609-622.
- Tonks, N.K. 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 7:833-846.
- Tulla, M., M. Lahti, J.S. Puranen, A.M. Brandt, J. Kapyla, A. Domogatskaya, T.A. Salminen, K. Tryggvason, M.S. Johnson ja J. Heino. 2008. Effects of conformational activation of integrin alpha 1I and alpha 2I domains on selective recognition of laminin and collagen subtypes. *Exp.Cell Res.* 314:1734-1743.
- 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.
- Wang, Y.N., H. Wang, H. Yamaguchi, H.J. Lee, H.H. Lee ja M.C. Hung. 2010a. COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 399:498-504.
- Wang, Y.N., H. Yamaguchi, J.M. Hsu ja M.C. Hung. 2010b. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene.* 29:3997-4006.
- Wiley, H.S. 2003. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp.Cell Res.* 284:78-88.
- Yu, X., S. Miyamoto ja E. Mekada. 2000. Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J.Cell.Sci.* 113 ( Pt 12):2139-2147.
- Zheng, B., C. Lavoie, T.D. Tang, P. Ma, T. Meerloo, A. Beas ja M.G. Farquhar. 2004. Regulation of epidermal growth factor receptor degradation by heterotrimeric Galphas protein. *Mol.Biol.Cell.* 15:5538-5550.
- Zhu, J., B.H. Luo, T. Xiao, C. Zhang, N. Nishida ja T.A. Springer. 2008. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol.Cell.* 32:849-861.
- Zoncu, R., R.M. Perera, D.M. Balkin, M. Pirruccello, D. Toomre ja P. De Camilli. 2009. A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell.* 136:1110-1121.