

Ville Rantasalo

PUUTIAISAIVOKUUMEVIRUKSEN RAKENNEPROTEIINIEN VAIKUTUS LUONTAISEN IMMUNITEETIN VASTEISIIN

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevätlukukausi 2018

Ville Rantasalo

PUUTIAISAIVOKUUMEVIRUKSEN RAKENNEPROTEIINIEN VAIKUTUS LUONTAISEN IMMUNITEETIN VASTEISIIN

Biolääketieteen laitos

Kevätlukukausi 2018

Ohjaaja: professori Ilkka Julkunen

Lähiohjaaja: dosentti Laura Kakkola

*Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä*

TURUN YLIOPISTO  
Biolääketieteen laitos

RANTASALO, VILLE: Puutiaisaivokuumeviruksen rakenneproteiinien vaikutukset luontaisen immunitetin vasteisiin

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 39 s., 2 liites.

Biolääketieteen laitos

Syöpä, infektiot ja immunitetti

Heinäkuu 2018

---

Puutiaisaivokuumevirus (engl. tick-borne encephalitis virus, TBEV) on puutiaisen välityksellä ihmiseen tarttuva virus, joka voi aiheuttaa jopa fataalin meningoencefaliitin. TBEV flavivirus, ja sen perimä on muiden flavivirusten tapaan RNA:ta. Sillä on kolme rakenneproteiinia ja seitsemän ei-rakenneproteiinia, joiden geneettisen koodin perimä-RNA kantaa. Flavivirusten tiedetään pystyvän estämään luontaisen immunitetin vasteita etenkin interferonivälitteisiä signaaleita estämällä. Tässä työssä on ollut tarkoitus tutkia flavivirusten immuno-evasiomekanismeja erityisesti TBEV:n rakenneproteiinien vaikutuksesta luontaisen immunitetin vasteisiin. Tutkimuksessa tutkittiin myös potilasseerumeista vasta-aineita TBEV:n rakenneproteiineja kohtaan.

TBEV:n kolmen rakenneproteiinin geenit monistettiin, kloonattiin ja ekspressoitiin nisäkässoluissa potilasseerumien vasta-ainetestausta ja interferonivasteeseen vaikuttamisen mittaamista varten. Nisäkässolun ekspressoimia proteiineja testattiin neljää potilasseerumia vastaan. Seerumit olivat peräisin potilailta, joilla oli todettu IgG- ja IgM-vasta-ainepositiivinen TBEV:n aiheuttama enkefaliitti. Toisessa tutkimuksen osiossa tutkittiin, hiljentävätkö viruksen rakenneproteiinit solun interferonituotantoa.

Tutkimuksessa havaittiin, että neljän potilaan seerumeista ei löytynyt vasta-aineita puutiaisaivokuumeviruksen kolmea rakenneproteiinia vastaan. Rakenneproteiineista yhden, kapsidiproteiinin, todettiin olevan mahdollinen interferoniantagonisti, sillä se vaimensi jossain määrin interferonipromoottorin toimintaa.

Puutiaisaivokuumevirus on merkittävä siinä missä muutkin flavivirukset, sillä sen aiheuttama tauti on vakava ja siihen ei rokotteen lisäksi ole spesifistä antiviraalista hoitoa. Maailmalla yleisemmät ja suurempia epidemioita aiheuttavat flavivirukset ovat hyvin aktiivisen tutkimuksen kohteita, mutta TBEV on niille läheistä sukua ja rakenteeltaan saman tyyppinen. Yhden rakenneproteiinin mahdollinen interferoniantagonismi voi olla merkittävä löydös flavivirusinfektioiden patogeneesin ymmärtämisessä ja hoitomuotojen suunnittelemisessa.

Asiasanat: puutiaisaivokuumevirus, luontainen immunitetti, interferoni, interferoniantagonisti

# SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	3
2 PUUTIAISAIVOKUUMEVIRUS .....	4
2.1 Flavivirukset .....	4
2.2 Puutiaiset ja TBEV.....	4
2.3 Puutiaisaivokuumevirusinfektiot Suomessa .....	5
2.3 Taudinkuva .....	6
2.4 Puutiaisaivokuumeviruksen genomi ja rakenneproteiinit .....	7
2.5 Flaviviruksen proteiinien funktiot .....	8
2.6 Immuunivaste ja interferonit .....	8
2.6 Flavivirukset, puutiaisaivokuumevirus ja luontainen immuunivaste .....	10
3 LABORATORIOTYÖN TARKOITUS.....	12
4 SANASTO .....	13
5 AINEISTO JA MENETELMÄT .....	14
5.1 PCR .....	14
5.2 PCR-tuotteiden erotus geelielektroforeesilla.....	14
5.3 Geenin ja plasmidin käsittely restriktioentsyymillä .....	15
5.4. Geenin ligaatio pEBB-HA-N- plasmidiin.....	16
5.5 Transformaatio.....	16
5.6 Bakteerien kasvatus maljoilla.....	16
5.7 Plasmidien eristys bakteereista.....	16
5.8 Sekvensointi .....	16
5.9 Glyserolistokin valmistus.....	17
5.10 Kloonaus pGEX-2T- plasmidiin .....	17
5.11 Envelope -proteiinin geenin kloonaus TA-vektoriin, transformatio ja blue-white -selektio....	17
5.12 Plasmidien endotoksiinipuhdistus .....	18
5.13 Transfektio Huh-7 soluihin ja immunofluoresenssimikroskopia.....	18
5.14 Lusiferaasireportteri.....	19
5.15 Alukkeet .....	20
6 TULOKSET JA TULKINTA.....	21
6.1 TBE-viruksen rakenneproteiinien kloonaus plasmidiin .....	21
6.2 TBEV:n rakenneproteiinien tuotto nisäkässolussa ja immunofluoresenssianalyysi HA-vasta- aineella sekä potilasseerumeilla .....	23
6.3 TBEV:n rakenneproteiinien vaikutus luontaisen immunitetin $\Delta$ RIG-I reitin aktivoitumiseen....	31
7 YHTEENVETO .....	34
8 LÄHTEET.....	36
9 LIITTEET .....	39



# 1 JOHDANTO

Tämän syventävien opintojen opinnäytetyönä tehdyn tutkimuksen tavoite on selvittää, estävätkö puutiaisaivokuumeviruksen (*engl. tick-borne encephalitis virus, TBEV*) rakenneproteiinit luontaisen immuniteetin vasteita. Kirjallisuutta ja julkaisuja tutkittiin TBEV:n ja muiden flavivirusten vastaavien ominaisuuksien osalta. Laboratoriossa tutkittiin myös neljän vasta-ainepositiivisen TBEV-infektion sairastaneen potilaan seerumien vasta-aineita rakenneproteiineja vastaan.

Yleisesti ottaen, virusinfektio aktivoi nisäkässolussa luontaisen immuniteetin vasteen, ja virus pyrkii estämään infektoituneen solun reaktiota ja jatkamaan etenemistä eliön muihin soluihin. Luontaisen immuniteetin vasteiden välttäminen ja estäminen olisi virukselle eduksi, ja useilta flaviviruksilta on löydetty tämän kaltaisia ominaisuuksia.

Tutkimuksessa tarkastellaan lyhyesti puutiaisaivokuumeviruksen aiheuttaman taudin esiintymistä ja taudinkuvaa sekä flavivirusten ominaisuuksia, sikäli kuin ne ovat aiheeseen liittyviä. Painopiste on kuitenkin puutiaisaivokuumeviruksen immuunivastetta moduloivissa ominaisuuksissa. Niiden ymmärtämiseksi selvitettiin flavivirusten aiheuttaman immuunivasteen luonnetta ja lyhyesti yleisemmin virusinfektioon liittyvän luontaisen immuniteetin vasteen luonnetta. Laboratoriossa puutiaisaivokuumeviruksen kolmen rakenneproteiinin geenit kloonattiin ekspressioplasmidiin ja niiden avulla proteiineja ekspressoitiin nisäkässoluissa. Ekspressoidun proteiini avulla etsittiin ihmisseerumeista vasta-aineita ja laboratoriotyön toisessa osassa tutkittiin rakenneproteiinien vaikutusta solun interferonigeenien ilmentymiseen

## 2 PUUTIAISAIVOKUUMEVIRUS

### 2.1 Flavivirukset

Arbovirukset ovat ryhmä viruksia, joiden vektoreina toimivat niveljalkaiset. Arbovirukset lisääntyvät vektoreissa, ja vektorin välityksellä leviävät myös muihin eliöihin, joissa ne aiheuttavat infektion ja lisääntyvät. Arboviruksiin kuuluu monta virussukua, joista yksi on Flavivirukset. Flaviviruksiin kuuluu merkittävä joukko taudinaiheuttajaviruksia: denguevirus (DENV), zikavirus (ZIKV), keltakuumevirus (YFV), Langat-virus (LGTV), Länsi-Niilin virus (WNV) ja puutiaisaivokuumevirus (TBEV). Flavivirukset ovat neurotrooppisia, eli ne kykenevät tunkeutumaan veriaivoesteen läpi aivoihin aiheuttaen aivokudoksen infektion.

Vain pieni osa flavivirusinfektion saaneista kokee neurologisen taudin (Neal 2014). Aivoihin päästyään virukset infektoivat neuronit tai niiden tukisolukon ja siten taudin kliininen manifestaatio voi olla akuutti paralyysi, meningoenkefaliitti, dystonia tai jopa parkinsonismi. Zikaviruksen on todettu aiheuttavan sikiölle vakavia kehitysvammoja, muun muassa mikrokefaliaa. Aikuiselle se voi aiheuttaa esimerkiksi Guillain-Barrén oireyhtymän (Pardigon 2017).

Flavivirukset luokitellaan RNA-viruksiksi. Niiden perimä on yksijuosteisena RNA:na positiivisäie-muodossa eli viruksen RNA on yksi suuri lähetti-RNA. Se luetaan isäntäsolussa ja siitä tuotetaan yksi iso proteiini, ns. polyproteiini. Isäntäsolun proteiinisynteesin mekanismit ja viruksen omat proteaasientsyymit pilkkovat polyproteiinista toiminnallisia viruksen proteiineja ja toisaalta rakenneproteiineja osiksi uusiin viruspartikkeleihin (Vapalahti & Vaheri 2010).

### 2.2 Puutiaiset ja TBEV

Flavivirusten ryhmään kuuluvan puutiaisaivokuumeviruksen eli TBEV:n vektori on puutiainen, *Ixodes persulcatus* tai *Ixodes ricinus*. Näiden niveljalkaisten avulla TBEV voi tarttua ihmiseen ja aiheuttaa menigniitin, enkefaliitin tai meningoenkefaliitin taudinkuvan. Eri puutiaiset ovat yleisiä eri maantieteellisillä alueilla ja kantavat viruksen eri muotoja.

Puutiaisaivokuumeviruksella on kolme muotoa, eurooppalainen (TBE-Eu), siperialainen (TBE-Sib) ja Kaukoidän muoto (TBE-FE). Suomessa tavataan lähinnä eurooppalaista ja siperialaista muotoa. Suomen TBEV-tartuntatilastot vastaavat muuta Pohjois-Eurooppaa: siperialainen virus on harvinaisempi ja siihen on liitetty vakavampi taudinkuva, kun taas eurooppalainen virus taudinaiheuttajana on yleisempi ja lievempi (Jääskeläinen ym. 2010; Metsi ym. 2015; Wahlberg ym. 2006). Korkein kuolleisuus ja jälkisairastavuus liittyvät Kaukoidän virustyyppiin, jota onneksi ei vielä ole Suomessa tavattu (Jääskeläinen et al. 2006; Metsi, Vuorela, Kantele, et al. 2015). Puutiainen kantaa

virusta vain harvoin. On paljon todennäköisempää löytää puutiainen joka ei kanna virusta kuin löytää virusta kantava puutiainen – Suomessa kerätyn aineiston potilaista tehdyssä tutkimuksessa havaittiin, että vain 0,1 – 2 % riskialueiden puutiaisista kantoi virusta (Metsi ym. 2015.)

TBEV:tä kantaa pääasiassa kaksi puutiaista: *Ixodes ricinus* ja *Ixodes persulcatus*. *I. ricinus* kantaa yleensä TBEV:n eurooppalaista tyyppiä ja *I. persulcatus* kantaa kahta muuta virustyyppiä. *I. ricinus* tavataan Euroopan ja Lähi-Idän alueella, Uralin alueelta Länsi-Ranskaan asti. *Ixodes persulcatus* tavataan Itä-Euroopassa ja Aasiassa (Lindquist & Vapalahti 2008.). Näistä tiedoista hieman poiketen on Suomessa tavattu Kokkolan saaristoalueella siperialaista TBE-virusta (TBE-Sib), jonka kantaja oli *Ixodes persulcatus* eli Siperian ja Kaukoidän virustyyppin tyyppillinen kantaja. Siperialainen TBE-virusmuoto on ennen ollut Pohjois- ja Länsi-Euroopassa harvinainen, ja löydös herätti Suomessa keskustelua vakavamman puutiaisaivokuumeviruksen mahdollisesta leviämisestä (Jääskeläinen ym. 2006). Edelleen poikkeuksena sääntöön, Terveiden ja Hyvinvoinnin laitoksen (THL) raportissa vuodelta 2013 mainitaan *Ixodes persulcatus* -puutiaisen levittäneen Eurooppalaista virusmuotoa Simon kunnassa (THL:n puutiaisaivokuumeiryhmän raportti, 2013). Samankaltainen tieto on julkaistu Emerging Infectious Diseases -lehdessä kirje-osiossa: *Ixodes persulcatus* oli kantanut TBEV:n eurooppalaista muotoa (Jääskeläinen et al. 2011).

### 2.3 Puutiaisaivokuumevirusinfektiot Suomessa

Taudin esiintymistiheys vaihtelee Suomessa maantieteellisesti. Eniten tapauksia on perinteisesti tavattu Ahvenanmaalla, kun taas vähiten tapauksia ilmaantuu Manner-Suomessa. Tosin nykyään Ahvenanmaalla rokotus virusta vastaan on ilmainen (valtion kustantama) ja sen vuoksi Ahvenanmaalaisten tapausten osuus on pienenevässä (Metsi ym. 2015; Tartuntataudit Suomessa 2016 THL:n raportti, 2017). Uusia tautitapauksia ilmenee Suomessa eniten länsirannikolla, Ahvenanmaalla ja Turun saaristossa. Suomessa havaitaan vuosittain uusia tapauksia noin 20 – 40 kappaletta. Suomessa vuosina 2010 – 2012 havaittiin 120 potilastapausta, joiden vasta-ainelöydökset ja oireet tukivat diagnoosia TBEV-infektiosta. Itä- ja Pohjois-Suomessa tautia esiintyy harvoin, joskin tällä vuosikymmenellä tapauksia on tavattu yhä kauempaa idästä ja pohjoisesta, muun muassa Kokkolan läheltä Simon kunnasta on löytynyt virusta ja tautitapauksia (Jääskeläinen ym. 2011; THL 2013)

THL:n tartuntatautirekisterissä on merkinnät todetuista puutiaisaivokuumeinfektioista vuosien 1995 ja 2018 väliltä. Varsinais-Suomen sairaanhoitopiirissä on tuona ajanjaksona todettu yhteensä 125 puutiaisaivokuumeetapausta. Vuotuisten tapausten määrä on ollut nousussa, sillä vuosien 1995 ja 2015 välillä eli kahdessakymmenessä vuodessa tapauksia on rekisteröity 43, kun taas niitä seuraavan kahdeksan vuoden aikana on todettu melkein kaksinkertainen määrä, 82 tapausta. Koko Suomessa



tämän ajanjakson aikana on todettu 736 puutiaisaivokuumeetapausta. Valtaosa näistä, 222 tapausta, on Ahvenanmaalta. Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirissä tapauksia on ollut 182. Tilaston käsittämän ajanjakson aikana koko suomen TBE-infektioista 529 kappaletta (72 %) on todettu Lounais-Suomessa (Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta 3 / 2018).

### 2.3 Taudinkuva

Virustauti alkaa, kun puutiainen tarttuu puremalla ihmiseen. Vektorina toimivan puutiaisen elinkaari on nelivaiheinen ja kahden viimeisen elämänvaiheensa (nymfi ja aikuinen) aikana puutiainen voi tarttua ihmiseen puremalla. Silloin se voi syljen välityksellä tartuttaa kantamansa viruksen. On myös tiedossa tapauksia, joissa infektio on saatu pastöroimattoman maidon välityksellä. Puutiainen kantaa virusta vain harvoin, ja tartunnan saaminen ei automaattisesti johda oireiseen tautiin sillä vain noin 10 – 30 % tartunnan saaneista kehittää oireita. Tämä selittää sitä, että kliinisesti todettava tai merkityksellinen tauti on melko harvinainen (Metsi ym. 2015.).

Tyypillinen puutiaisaivokuumeviruksen aiheuttama tauti on kaksivaiheinen. Ensin ilmaantuu noin viikon kestävä flunssan tyyppinen oireisto, johon kuuluu kuumetta ja yleistä sairauden tunnetta sekä yleistyneitä särkyjä. Sen jälkeen on noin viikon lähes oireeton jakso, minkä jälkeen alkavat meningoenkelfaliitin oireet: päänsärky, tajunnan tason häiriöt, valonarkuus, pahoinvointi ja niskajäykkyys. Tällaista potilasta tutkiessaan lääkäri voi myös todeta fokaalisia neurologisia löydöksiä. Taudin ensivaiheen ilmaantuminen ei tarkoita sitä, että seuraa myös taudin toinen vaihe. Tartunnan ja ensivaiheen sairauden seurauksena voi olla pelkkä serokonversio eli vasta-aineiden kehittyminen virusta vastaan. Ensivaiheen sairastaneista 20 – 30 %:lla tauti jatkuu toiseen vaiheeseen eli meningoenkefaliittiin asti (THL.fi Puutiaisaivotulehdus 2017; Lindquist & Vapalahti 2008; Růžek ym. 2010.).

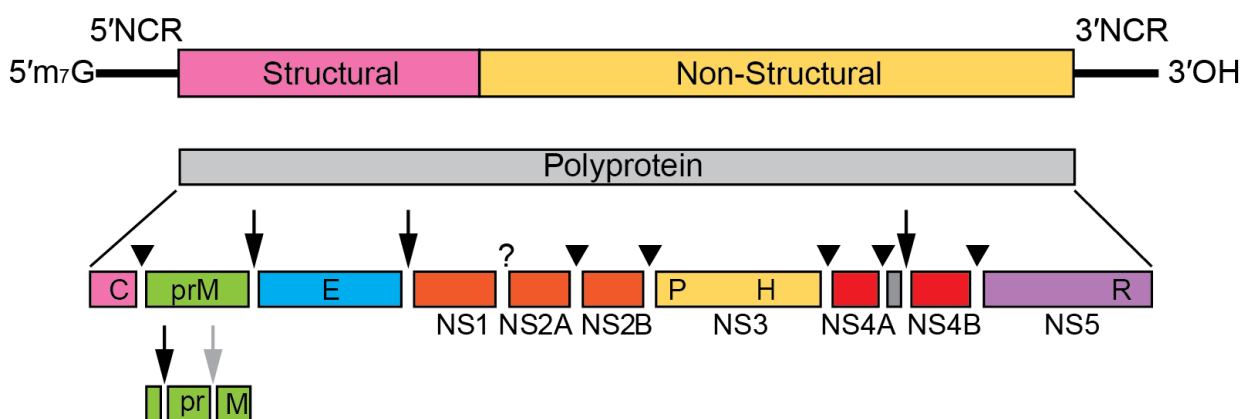
Potilaan kannalta voi olla oleellista, minkä virustyyppin tartunnan hän on saanut. Eurooppalaisen virustyyppin taudinkuva on lievin ja ennuste paras kolmesta. Eurooppalaisen puutiaisaivokuumeviruksen infektio on usein myös oireeton. Huonoin ennuste liittyy Kaukoidän virukseen ja eniten jälkisairastavuutta ja pysyviä neurologisia vaurioita esiintyy sairastetun Siperian tai Kaukoidän virustyyppin infektion jälkeen. Kaukoidän virustyyppin infektio ei useinkaan ole kaksivaiheinen, vaan sen aiheuttama tauti on yksivaiheinen ja aiheuttaa neurologisia oireita siinä missä kahden muun virustyyppin aiheuttamat taudit etenevät yleensä kaksivaiheisena (Charrel ym. 2004; Dörrbecker ym. 2010.). Puutiaisaivotulehdus voi olla fataali tai se voi jättää pysyviä neurologisia vaurioita. Virusta vastaan on tehokas rokote, joka Suomessa kuuluu rokotusohjelmaan Turun saaristossa (Paraisten kunta), Simon kunnassa ja Ahvenanmaalla, eli riskialueilla asuville. Rokotetta suositellaan myös kesäisin paljon aikaa saaristossa viettäville mökkiläisille ja veneilijöille, mutta heidän

tulee itse kustantaa rokotuksensa. Rokote kattaa tehokkaasti kolme virustyyppiä sillä vaikka ne ovat eri lajeja ne ovat silti immunologisesti samankaltaisia (Charrel ym. 2004; Metsi ym. 2015.).

Virus pääsee veriaivoesteen läpi ja voi aiheuttaa vakavan infektion (Neal 2014). Miksi se pääsee niin pitkälle? Miksi virus jatkaa alkuvaiheen jälkeen leviämistään? Immuunijärjestelmän vasteiden välttäminen voi olla osa selitystä. Viruksen havaitseminen aiheuttaa isäntäsolussa luontaisen immuniteetin vasteen taudinaiheuttaja ollessa elimistölle ennestään tuntematon. Monien virusten proteiinien tiedetään yrittävän hillitä tätä vastetta. Jos viruksen proteiinit hiljentävät isännän yrityksiä tuhota ja estää virusinfektio, virus voi levitä laajemmin elimistöön.

## 2.4 Puutiaisaivokuumeviruksen genomi ja rakenneproteiinit

Laboratoriotyön ja virusproteiinien tutkimuksen pohjan muodostaa puutiaisaivokuumeviruksen genomi ja sen perusteella tuotettava polyproteiini, josta rakenneproteiinit ovat peräisin. Alla on esitetty flavivirusten RNA-genomi, ja sen perusteella tuotettavat proteiinit. Kaikilla flaviviruksilla on hyvin samankaltainen genomi: yksi positiivisäie-RNA, josta luetaan polyproteiini. Siitä pilkotaan solussa kuvan mukaiset pienemmät proteiinit. Huomattavaa on, että vain pienempi osa genomisesta tiedosta on varsinaisia viruksen rakenneproteiineja kapsidi- (*engl. capsid, C*), promembraani- (*engl. promembrane, P*), membraani- (*engl. membrane, M*) ja vaippaproteiineja (*engl. envelope, E*) varten. Suurempi osa viruksen genomista on varattu toiminnallisille nonstruktuuraali eli ei-rakenneproteiineille (*engl. non-structural, NS*) joita on yhteensä seitsemän kappaletta.



▼ NS2B-3 protease    ▼ Signal peptidase    ▼ Golgi protease    ? Unknown protease(s)

Kuva 1. Flaviviruksen genomi. Lähde: [https://talk.ictvonline.org/ictv-](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus)

[reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus)

C = Capsid, kapsidi, pr = promembrane, promembraani, M = Membrane, membraani ja E = Envelope, vaippa

## 2.5 Flaviviruksen proteiinien funktiot

Rakenneproteiinit ovat nimensä mukaisia ja ovat osa viruksen rakennetta. Virus koostuu RNA:ta ympäröivästä kuoresta ja solusta peräisin olevasta vaipasta. Kapsidiproteiini muodostaa rungon vuorovaikutuksessa RNA:n kanssa virionin muodostumisessa. Promembraaniproteiini ja membraaniproteiini ovat yksi ja sama kompleksi kunnes ne pilketaan virionin kypsymisen edetessä. Promembraani stabiloi vaippaproteiinia ja se irtoaa ennen viruksen vapautumista solusta ekstrasellulaaritilaan. Membraaniproteiini jää vaippaproteiinin kanssa viruksen pinnalle. Viruksen tunkeutuessa uuteen soluun vaippaproteiini tarttuu solun pinnan reseptoreihin ja saa aikaan viruksen kiinnittymisen ja solukalvojen fuusion. Siten vaippaproteiini saattaa viruksen solun sisälle.

Ei-rakenne proteiinit ovat tärkeitä toiminnallisia proteiineja. Niiden tehtävä on avustaa virusta sen eri elinkierron vaiheissa. NS1-proteiini auttaa virusta replikaatiossa. NS3-proteiini on seriiniproteaasi, joka osallistuu polyproteiinin pilkkomiseen ja translaation jälkeiseen muokkaamiseen. NS2A- ja 2B-proteiinit toimivat NS3-proteiinin kanssa yhteistyössä. NS4A- ja 4B-proteiinit toimivat replikaatiossa membraanin integroinnissa. NS5-proteiini on RNA-polymeraasi joka tuottaa viruksen perimän uuteen virioniin. NS5-proteiiniin sisältyy myös metyyli transferaasientsyymi, joka modifioi RNA:ta (Petersen ja Barrett, *Clinical Virology, Arthropod-Borne Flaviviruses* 2009.).

## 2.6 Immuunivaste ja interferonit

Mikrobi-infektio aiheuttaa luontaisen immunitetin vasteen, ensilinjan yleisreaktion. Reaktio on mikrobin suhteen epäspesifi, toisin sanoen erilaiset mikrobit saavat aikaan saman tyyppisen vasteen. Luontainen immunitetti edistää hankinnaisen, mikrobispesifin, immunitetin muodostumista. Viruksen tunkeutuessa isäntäänsä solu infektoituu ja reagoi tunkeutuvaan virukseen torjuntamekanismeillaan. Virusinfektion aikana viruksen monistumisen seurauksena syntyy solulle vieraita molekyylejä ja solussa on viruksen perimää ja proteiineja. Solun luontaisen immunitetin komponentit reagoivat näihin vieraisiin molekyyleihin.

Viruksen kohtaava solu havaitsee viruksen solun pinnan reseptorilla tai solun sisältä: esimerkiksi solut voivat havaita viruksen sytoplasmansa liukoisten reseptorien kuten RIG-I:n avulla, tai solun membraaneilla sijaitsevilla reseptoreilla, esimerkiksi Tollin kaltaisilla reseptoreilla (TLR, *engl. Toll-like receptor*). Puutiaisaivokuumevirus tarttuu iholle ja infektoi dendriittisoluja ja ihokudoksen soluja. Myös makrofagit ja monosyytit ovat viruksen infektiolle alttiita. Jos tartunta saadaan maitotuotteista mahasuolikanavasta, on runsas suoliston imukudos ja sen dendriittisolut mahdollisesti ensimmäinen infektion kohtaava kudos (Dörrbecker et al. 2010.). Infektoidussa solussa tieto viruksen havaitsemisesta viedään tumaan signaaleita pitkin, esimerkiksi RIG-I-IRF3- signaalinvälitysreitillä pitkin (Kuva 1). RIG-I -molekyylä havaitsee viruksen RNA:n, aktivoituu, ja vie viestin edelleen IRF3:lle

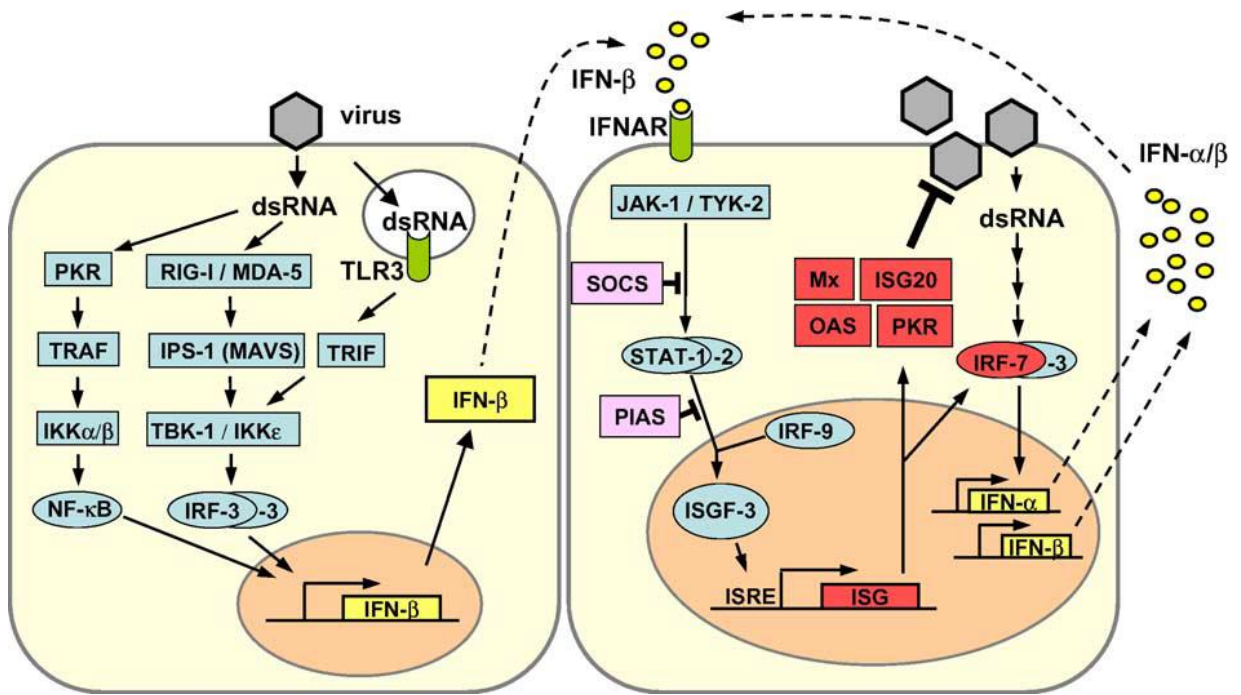
(engl. *interferon regulatory factor 3*). Se toimii transkription aloittajana tarttumalla tumassa aktivoitavien geenien promoottorialueisiin. IRF3 aktivoi interferonin promoottorin joka aloittaa interferonin geenin luennan. Lopulta solussa tuotetaan interferonia vasteena viruksen havaitsemiselle (Haller ym. 2006.).

Luontaisen immunitetin vaste välittyy solulta toiselle interferonien välityksellä. Ne ovat sytokiineja, solujen välisen viestinnän proteiineja. Interferonit jaetaan luokkiin I, II ja III. Interferoneista antiviraalisia ovat I- ja III-luokan interferonit joista luokkaan I kuuluvat  $\alpha$ - ja  $\beta$ -interferonit ja tyyppin III interferoneihin kuuluvat  $\lambda$ -interferonit. Nämä interferonit yleensä aloittavat infektoituneen solun vasteen virusinfektioille, ja etenkin I-luokan  $\alpha$ - ja  $\beta$ -interferonit sekä III-luokan  $\lambda$ -interferonit ovat oleellisia virusinfektion alkuvaiheissa. Niiden toiminnan pyrkimys on estää virusinfektion eteneminen häiritsemällä replikaatiota ja indusoimalla soluissa antiviraalinen tila (Lin and Young 2014; Solunetti.fi.).

Näiden interferonien tuotannon ja erityksen käynnistää itse virusinfektio, viruksen osien havaitseminen solussa tai virusreplikaation käynnistyminen, kun sen sivutuotteena vapautuu viruksen perimäainesta jonka solun luontaisen immunitetin mekanismit havaitsevat (Haller et al. 2006; Kotenko et al. 2003). RNA-viruksen infektiossa dsRNA:ta eli kaksijuosteista RNA:ta tunnistaa MDA5 -molekyyli ja lyhyitä dsRNA-molekyyliä ja ssRNA:ta eli yksijuosteista RNA:ta tunnistaa RIG-I-molekyyli. Viruksen replikaatiossa viruksen ssRNA-tyyppisestä perimästä muodostuu myös dsRNA:ta, joten molemmat tunnistusmolekyylit ovat oleellisia RNA-viruksen havaitsemisessa. RIG-I ja MDA5-molekyylit aktivoituvat havaittuaan ligandinsa ja aloittavat signaalivälityksen joka johtaa interferonituotantoon. Puutiaisaivokuumevirus on ssRNA-virus, joten nämä kaksi signaalivälityksen aloittavaa molekyyliä ovat infektion immuunivasteen alkuvaiheessa tärkeitä (Haller ym. 2006; Kotenko ym. 2003.).

Interferonien tuotto — eli vaste infektiolle — ei jää vain infektoituneen solun sisälle vaan interferoni eritetään solun ulkopuolelle. Ensimmäisenä viruksella infektoitunut solu varoittaa muita soluja, kun se ensin tunnistaa viruksen ja sitten käynnistää interferonituotannon ja lopulta erittää interferonin muille soluille viestiksi. Ulkopuoliset solut, esimerkiksi neutrofiilit ja NK-solut reagoivat interferonien tuomaan viestiin tunkeutuneesta viruksesta. Toinen solu tunnistaa interferonin reseptorillaan (esim. IFNAR) ja se aktivoi signaalivälitysreitit toisessa solussa (Kuva 2). Luokan I interferonien aktivoima signaalitie johtaa mm. JAK-STAT-signaalintireittiä pitkin solun transkriptiotekijöiden aktivaatioon ja edelleen tumaan siirtymiseen, aloittaen antiviraalisten molekyylien (esim. MxA, OAS, PKR tai viperiini) tuotannon ja sitä kautta tuloksena on antiviraalisen tilan induktio tässä toisessa solussa (Best ym. 2005; Lin & Young 2014; Nicklas ym. 2012.).

Oleellista ajatuksessa on, että vaste ei ole pelkästään infektoituneen solun sisäinen vaan havaitun viruksen aiheuttama vaste välittyy muille soluille. Näin interferonit toimivat viestinviejinä virusinfektiovaarasta elimistön muille soluille.



Kuva 2. Kaavakuva virusinfektion laukaisemasta interferonivasteesta (Haller ym. 2006). Viruksen RNA aktivoi kolme eri transkriptioon johtavaa signaalitietä, ja tumasta luetaan IFN-β geeni ja sen mukainen interferoni tuotetaan ja eritetään ulos solusta. Interferoni kohtaa solun ulkopuolisessa tilassa toisen solun pinnalla reseptorinsa (IFNAR) joka laukaisee JAK-STAT-signaalitien. JAK-STAT- signaalitietä pitkin viesti siirtyy tämän toisen solun tumaan. Tumassa käynnistyy ISG:n (interferonin stimuloima geeni, engl. *interferon stimulated gene*) luenta, ja viesti johtaa lopulta antiviraalisten proteiinien tuottoon, esimerkiksi MxA-proteiinin tuottoon.

Flavivirusinfektion ensivaste solussa aiheuttaa luokan I ja III interferonien tuoton. Luokan III λ-interferonien ekspressio on säädelty osittain samoin kuin luokan I α- ja β-interferonien, joten RIG-I tien aktivaatio voi johtaa α-, β- tai λ-interferonigeenien promoottorien aktivaatioon ja sitä kautta vastaavien interferonien tuottoon. Viruksen havaitseminen välittyy tumaan TLR3-, TLR7-, MDA5- tai RIG-I-molekyylien käynnistämien signaaliteiden kautta ja saa aikaan edellä mainittujen interferonien tuotannon (Österlund ym. 2007.). Tässä tutkimuksessa tutkittiin luokan III λ-interferonin promoottorin aktivaatiota RIG-I-signaalitietä keinotekoisesti aktivoimalla, kun solussa samalla ekspressoitään TBEV:n rakenneproteiineja.

## 2.6 Flavivirukset, puutiaisaivokuumevirus ja luontainen immuunivaste

Flavivirusinfektioiden patofysiologiaa on tutkittu paljon, sillä tämän suvun virukset aiheuttavat trooppisissa maissa infektioitauteja ja kuolemia. Interferonit ovat immuunireaktion keskiössä, joten niiden selvittäminen on tarpeen virusten aiheuttamien tautien ymmärtämisessä. Esimerkiksi solujen esikäsitteily luokan I α- ja β-interferoneilla inhiboi flavivirusten replikaatiota (Best ym. 2005; Ye ym.

2013). Virukset pyrkivät välttämään nämä solun suojaimekanismit. On havaittu, että virusproteiinit voivat estää interferonien signaalireittejä, jotka johtaisivat antiviraalisiin vasteisiin solussa. Tällöin virus estää luontaisen immunitetin vasteita (Haller ym. 2006; Ye ym. 2013).

Flaviviruksista puutiaisaivokuumeviruksen, Länsi-Niilin viruksen ja Japanin aivokuumeviruksen on havaittu välttävän solun RNA-virusten tunnistusmolekyylejä TLR3:a, TLR7:a sekä RIG-I:tä. Virus saa perimänsä näiltä tunnistusmolekyyleiltä piiloon, jolloin interferonivälitteisen immuunivasteen käynnistyminen viivästyy (Ye ym. 2013.). Flavivirusten proteiineista etenkin ei-rakenneproteiinien on havaittu osallistuvan immuunivasteen väistämiseen. Ainakin Langat-viruksen, Japanin aivotulehdusviruksen, dengueviruksen, keltakuumeviruksen ja Länsi-Niilin viruksen NS5-proteiinien tiedetään olevan interferoniantagonisteja. Näiden virusten NS5-proteiinin on todettu estävän JAK-STAT-interferonireittiä, ja Länsi-Niilin viruksen NS1-proteiinin on todettu inhiboivan  $\beta$ -interferonin transkriptiota (Best ym. 2005; Nicklas ym. 2012; Ye ym. 2013.).

Puutiaisaivokuumeviruksen infektiossa useat solutyypit voivat infektoitua, ja antigeenejä esittelevät dendriittisolut ovat tärkeässä osassa. Ne tuottavat sytokiineja — mukaan lukien interferoneja. Immuunijärjestelmän soluissa toimii samanlainen JAK-STAT-signaalireitti kuin muissa elimistön soluissa. Lisäksi virusreplikaatio toimii makrofageissa vilkkaasti, ja siten ne ovat mahdollisesti osallisia virusten leviämässä. Neutrofiilit ja NK-solut infektoituvat myös, ja virus etenee lopulta imusolmukkeisiin asti. Lopulta kiihtyvä replikaatio saa aikaan viremian ja virus pääsee leviämään muihin kudoksiin (Dörrbecker et al. 2010.).

Puutiaisaivokuumeviruksen NS5-proteiinilta on löydetty samankaltaisia interferonireittejä estäviä ominaisuuksia kuin muiltakin flaviviruksilta. TBEV:n NS5 proteiinin osoitettiin estävän JAK-STAT-signaalitien STAT1-molekyylin fosforylaatiota. Fosforylaation häiriön takia signaalireitti ei johdakaan viestiä virusinfektiosta solun tumaan ja aiheuta antiviraalisten geenien transkriptiota, kuten JAK-STAT-signaalireitin kuuluisi tehdä (Werme ym. 2008.).

Flavivirusten rakenneproteiineista ei sen sijaan löydy paljoa vastaavan kaltaista tietoa. Länsi-Niilin viruksen vaippaproteiinin on todettu estävän interferoni  $\beta$ :n ja muiden sytokiinien tuotantoa, kun niiden tuotantoon johtavia signaalireittejä stimuloitiin poly(I:C):llä. Näin myös vaippaproteiini osallistuu luontaisen immunitetin vasteiden väistämiseen. Poly(I:C) on synteettinen kaksijuosteinen RNA-molekyylä, joka muistuttaa viruksen replikaatiossa syntyvää RNA:ta ja toimii luontaisen immunitetin vasteen laukaisijana. (Arjona ym. 2007).

### 3 LABORATORIOTYÖN TARKOITUS

Tämän opinnäytetyötutkimuksen tarkoitus on selvittää, onko puutiaisavokuumeviruksen rakenneproteiineilla edellä kuvatun kaltaisia ominaisuuksia, joilla ne edesauttaisivat virusta väistämään luontaisen immunitetin vasteet. Laboratoriossa tutkittiin *in vitro* -nisäkässoluilla, miten interferonituoton käynnistävä mekanismi käyttäytyy, kun soluissa on läsnä viruksen rakenneproteiineja.

Kliinisen näkökulman nimissä työssä tutkittiin myös, löytyykö neljästä potilasseerumista vasta-aineita TBEV:n rakenneproteiineja kohtaan. Seerumit on kerätty potilailta, joilla on aiemmin todettu TBEV-infektio. Potilaiden verinäytteet on tutkittu TYKS:in kliinisen mikrobiologian osastolla, ja niiden on aiemmin todettu olevan IgG- ja IgM-vasta-ainepositiivisia TBEV:lle.

Flavivirukset pyrkivät väistämään luontaisen immunitetin vasteita, mutta TBEV:n rakenneproteiinien osallisuudesta immuno-evasioon ei ole paljoa tietoa. Viruksen esiintymisalue luonnossa laajenee, ja se voi aiheuttaa ihmiselle hankalan taudin, jolle ei toistaiseksi ole olemassa spesifisiä antiviraalisia lääkkeitä. Siksi olisi tärkeää tuntea viruksen infektiomekanismit. Tulevaisuudessa viruksiin tullaan varmasti kehittämään spesifejä hoitoja. Ne eivät kuitenkaan ole mahdollisia, jollei viruksen toimintaa tunneta tarkoin.

## 4 SANASTO

Luettavuuden nimissä tälle sivulle on koottu lyhyt luettelo sanoista ja lyhenteistä, joita laboratoriotyössä ja tulosten tulkinnassa käytetään toistuvasti. Näin lukijan on helpompi ymmärtää, millaisia työvaiheita tutkimukseen sisältyi ja millaisiin mekanismeihin tulokset ja työvaiheet liittyvät.

PCR = Polymerase chain reaction

Plasmidi = rengasmainen DNA-molekyyli, johon voi entsyymaattisesti liittää DNA-materiaalia

Insertti = plasmidiin liitettävä DNA-pätkä

Ligaatio = insertin liittäminen plasmidiin

Transfektio = plasmidin siirtäminen eläinsolun sisälle

Transformaatio = plasmidin siirtäminen bakteerisolun

Promoottori = DNA:ssa ennen geeniä oleva säätelyalue. RNA-polymeraasi tarttuu promoottoriin ja aloittaa geenin luennan

Interferoni = pro-inflammatorinen sytokiini, soluvälityksen välittäjäaine, joka kertoo muille soluille alkaneesta infektiosta ja saa aikaan kohdesolussa antiviraalisen tilan.

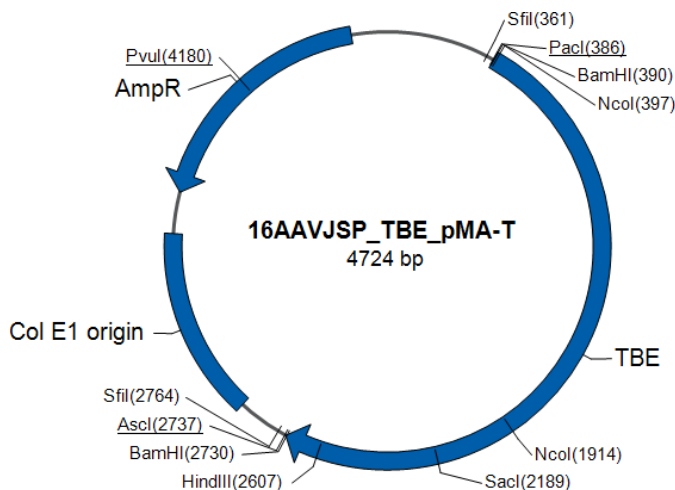


## 5 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 5.1 PCR

Viruksen rakenneproteiinien geenit tilattiin synteettisenä DNA:na valmiiksi kloonattuna plasmidiin (GeneArt, ThermoFisher) joka sisälsi yhtenä kompleksina rakenneproteiinigeenit. Rakenneproteiinit ovat kapsidi (engl. *Capsid*, C), promembraani (engl. *promembrane*, P), membraani (engl. *membrane*, M) ja vaippaproteiini (engl. *envelope*, E). Näiden rakenneproteiinien geenit monistettiin plasmidista PCR:llä (engl. *polymerase chain reaction*) käyttäen geenispesifisiä alukkeita (engl. *primers*). Monistuksessa käytettiin Phusion Polymerase –entsyymiä (Thermo scientific) jossa on monistuksen aikana mutaatioiden syntymisen tehokkaasti estävä proof reading -toiminto. Monistuksessa käytettyjen alukkeiden sekvenssit, käytetty PCR-reaktio ja monistusohjelma on kuvattu liitteessä 1.

Valmiin tilatun plasmidin sekvenssi sekä BamHI-entsyymin leikkauskohdat on esitetty liitteessä 2 ja kuvassa 3.



Kuva 3. Kaupallinen plasmidi, josta TBEV:n rakenneproteiinien geenit monistettiin. TBEV:n rakenneproteiinien sekvenssi liitteessä 2.

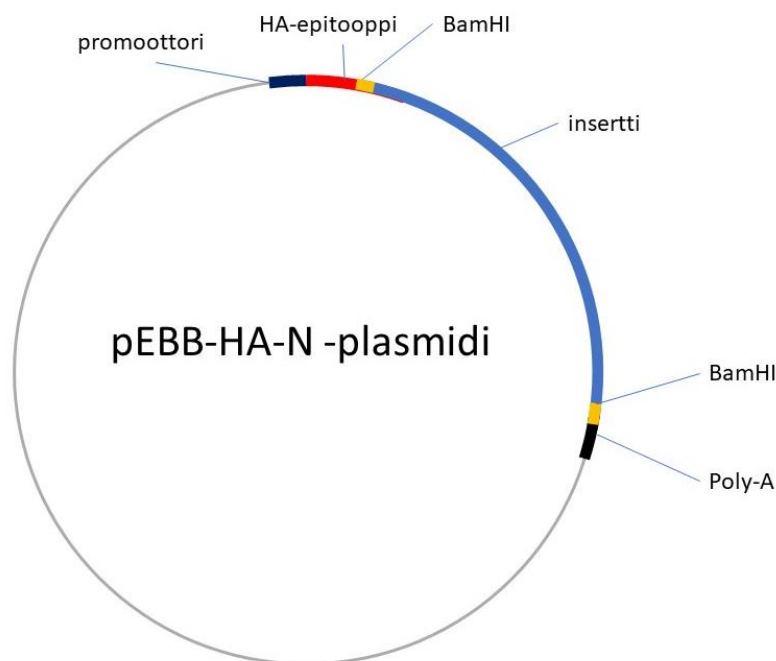
### 5.2 PCR-tuotteiden erotus geelielektroforeesilla

PCR-reaktioiden tuotteet eroteltiin 1,5 % agarosigeelissä geelielektroforeesilla, jossa eri kokoiset PCR:n tuottamat geenimateriaalit ajautuvat jännitekentässä ja erottuvat kokonsa perusteella. Agarosigeeliin lisättiin etidiumbromidia, joka tarttuu nukleiinihappoihin ja näkyy fluoresoivana UV-valossa. Oikean kokoinen PCR- tuote leikattiin irti skalpellilla ja DNA eristettiin agarosista Thermo Scientific Gene JET Gel Extraction Kit:llä.

### 5.3 Geenin ja plasmidin käsittely restriktioentsyymillä

Geenialueet tuotettiin PCR:llä alukkeilla, joissa on leikkauskohdat BamHI- restriktioentsyymille. Näiden entsyymispesifisten kohtien avulla monistettu geeni voidaan liittää haluttuun ekspressioplasmidiin. Geenien koodaamat proteiinit haluttiin tuottaa jatkossa ihmisperäisissä soluissa, joten geenit liitettiin pEBB-HA-N-plasmidiin, jossa on ennen luettavaa geeniä promoottorialue, josta geenin luenta aloitetaan ihmisperäisissä soluissa. Sen jälkeen plasmidissa on poly-A—jaksoa tuottava sekvenssi, joka tarvitaan lähetti-RNA:ssa. Geenin eteen jää vielä HA-markkerin eli influenssaviruksen HA-proteiinin antigeenista osaa tuottava lyhyt jakso, jonka tehtävä on mahdollistaa soluissa tuotetun proteiinin tunnistaminen HA-vasta-aineilla.

Plasmidiin liitettävän PCR-tuotteen (C, E, M, P) päät käsiteltiin BamHI-restriktioentsyymillä. Leikattu DNA (eli insertti) puhdistettiin ja liitettiin ligaatioreaktiossa pEBB-HA-N- plasmidiin. Plasmidi oli avattu myös BamHI-restriktioentsyymillä. Jotta BamHI-entsyymillä avattu plasmidi ei muodostaisi plasmidia ilman siihen liitettävää DNA-inserttiä – eli self-ligaation estämiseksi – Promegan Fast AP - entsyymiä käytettiin plasmidin päiden defosforylointiin. BamHI- entsyymillä leikattu ja Fast AP:lla defosforyloitu plasmidi puhdistettiin geelistä Gel Extraction Kitillä. Puhdistetun plasmidin ja inserttien DNA-pitoisuudet mitattiin spektrofotometrillä (NanoDrop Technologies, NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer).



Kuva 4. Kaaviokuva pEBB-HA-N -plasmidista.

#### 5.4. Geenin ligaatio pEBB-HA-N- plasmidiin

Ligaatiossa pEBB-HA- plasmidi ja rakenneproteiinin geeni liitetään toisiinsa siten, että geeni eli insertti otetaan osaksi plasmidia. Plasmidissa ennen inserttiä on geenin luennan aloittava aloituskodoni (ATG) ja lopussa luennan lopettava lopetuskodoni (TAA). Ligaatioreaktion katalysoi ligaasientsyymi (T4 Ligase tai Fast Ligase, Thermo Scientific ja Promega). Ligaasientsyymi liittää insertin ekspressioplasmidiin aukileikattuun kohtaan.

#### 5.5 Transformaatio

Ligaatioreaktiot transformoitiin DH5 $\alpha$ -soluihin, jotka ovat kompetentteja *Escherichia coli* – bakteereja. Nämä bakteerisolut ovat nimenomaan geenien kloonamiseen tarkoitettuja heikennettyjä bakteereja, jotka eivät ole patogeenisia. Kompetenssi tarkoittaa tässä tapauksessa bakteerisolun kykyä ottaa sisäänsä geneettistä materiaalia ja tuottaa sitä lisää. Transformaatioissa geneettinen materiaali siirtyy bakteerin sisälle kloridisuolojen ja lämpöshokin välityksellä. Ligaatioreaktiot transformoitiin bakteereihin ja bakteerit levitettiin kasvamaan Luria Broth -agaroosia sisältäville Petri-maljoille.

#### 5.6 Bakteerien kasvatus maljoilla

Bakteereja kasvatettiin Petri-maljoilla yön yli. Antibioottiselektiossa käytettiin ampisilliinia (0,1%), koska tässä työssä käytetyissä plasmideissa on resistenssigeeni ampisilliinille. Näin maljoilla saatiin kasvamaan vain ne bakteerit, joihin pEBB-HA-N-plasmidi on transformaatioissa siirtynyt, siirtäen samalla paitsi kloonattavan geneettisen sisällön, myös ampisilliinin resistenssigeenin bakteeriin.

#### 5.7 Plasmidien eristys bakteereista

Maljoilta valittiin 6 pesäkettä jokaista transformaatiota kohden. Pesäkkeiden bakteerit kasvatettiin yli yön Luria Broth-liuoksessa (0,1% ampisilliini) ja bakteereista eristettiin plasmidi-DNA (Gene JET Plasmid Miniprep Kit, Thermo SCIENTIFIC). Eristetyt plasmidit tarkistettiin insertin suhteen katkaisemalla plasmidit BamHI-entsyymillä. Leikattu plasmidi ajettiin agaroosigeelissä. Näin nähtiin, oliko insertti liittynyt plasmidiin.

#### 5.8 Sekvensointi

Sekvensointiin käytettiin kaupallista firmaa GATC Biotech AG, [www.gatc-biotech.com](http://www.gatc-biotech.com). Yritys ja sen toiminta on Saksassa. Sinne lähetettiin sekvensointiin tarkoitettut alukkeet ja pEBB-HA-N-plasmidi, jonka sisälle oli ligaatiossa liitetty TBEV:n rakenneproteiinin geeni.

## 5.9 Glyserolistokin valmistus

Bakteereista, joissa oli plasmidissa kapsidi-, membraani- ja promembraaniproteiinien geenit sekvensoinnin perusteella oikeassa suunnassa, tehtiin glyserolistokki  $-80^{\circ}\text{C}$  pakastimeen viruslaboratorion tulevaa käyttöä varten.

## 5.10 Kloonaus pGEX-2T- plasmidiin

Puutiaisaivokuumeviruksen rakenneproteiinien geenit kloonattiin myös pGEX-2T- plasmidiin. Se on ekspressioplasmidi proteiinien tuotantoon *E. Coli* -bakteereissa. Tällä plasmidilla tuotettuihin proteiineihin jää aminopäähän GST-markkeri (glutathioni-S-transferaasi). Myös tässä tehtiin PCR:llä monistetuille rakennegeeneille BamHI-digestio ja plasmidille BamHI- ja Fast AP-ensyymikäsittely. Nanodrop-laitteella mitattiin plasmidin ja inserttien pitoisuudet. Insertit liitettiin plasmidiin Fast Ligase-ligaasientsyymillä. Ligaatioreaktiot transformoitiin DH5 $\alpha$  – bakteerisoluihin ja plasmidi pesäkkeet analysoitiin kuten yllä.

## 5.11 Envelope -proteiinin geenin kloonaus TA-vektoriin, transformaatio ja blue-white -selektio

Envelope-rakenneproteiinia yritettiin kloonata pGEM-TA -plasmidiin (Promega). Tämä plasmidi on valmiiksi lineaarisessa muodossa ja siinä on T-nukleotidit vapaana molemmissa insertin kiinnittymiskohdan päissä. Tällöin insertiksi sopii PCR-tuote, jossa on A-nukleotidit molemmissa päissä plasmidiin liittämistä varten. Tässä toisessa plasmidissa kloonamista varten vaippaproteiinin geeni monistettiin uudelleen PCR:llä synteettisestä plasmidista. PCR-tuotteen päihin lisättiin DreamTaq -entsyymillä A-nukleotidit, jotta ligaatioreaktiossa ligaasientsyymi (Fast Ligase) voisi liittää insertin pGEM-TA -vektoriin. Ligaatio, transformaatio ja pesäkkeiden analyysi tehtiin kuten yllä.

Blue-white-selektiossa transformaatioiden kasvualustalle lisätään kasvavien pesäkkeiden värjäämiseksi kaksi väriainetta, 5-bromo-4kloro-3-indolyl-D-galaktosidi (X-Gal) ja isopropyyli- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidi (IPTG). Kompetenteissa DH5 $\alpha$ -soluissa  $\beta$ -galaktosidaasientsyymi toimii vain, jos bakteerisolulla on plasmidin (esim. pGEM-TA) mukana LacZ-geenin. LacZ-geeni sisältää geneettisen koodin  $\beta$ -galaktosidaasin 146:lle ensimmäiselle aminohapelle. Näin pesäkkeet, joissa on kokonainen plasmidi ilman inserttiä ilmenevät päivänvalossa sinisinä. Sininen väri muodostuu, kun toimiva  $\beta$ -galaktosidaasi pilkkoo X-Gal-substraattia. Jos bakteerisolussa on insertin sisältävä plasmidi, tulee plasmidin LacZ-geeni luettua väärin. Silloin bakteerisolussa tuotetaan toimimaton  $\beta$ -galaktosidaasientsyymi. Näin ei muodostu sinistä väriä, vaan insertin sisältävän plasmidin sisältävät pesäkkeet näkyvät päivänvalossa valkoisina.

## 5.12 Plasmidien endotoksiinipuhdistus

Niistä pesäkkeistä, joista sekvensoinnissa löytyi plasmidissa oikeassa orientaatioissa eli lukusuunnassa oleva TBEV:n geeni, eristettiin plasmidit Qiagenin EndoGree Plasmid Maxi Kitillä eukaryoottisolujen transfektiota varten. Tällä eristysmenetelmällä saavutettiin suuremmat pitoisuudet DNA:ta ja poistettiin bakteeriperäiset endotoksiinit. Tämä työvaihe on tärkeä: tarvittavien geenien tuotanto tapahtuu kompetenteissa *E. coli* -bakteereissa. Silloin ei voi välttää bakteereista lähtöisin olevia molekyyliä, kuten lipopolysakkarideja, jotka ovat tämän työn suhteen epäpuhtauksia (endotoksiineja). Bakteeriperäiset molekyylit itsessään aktivoivat luontaisen immunitetin vasteita, ja tässä työssä on tarkoitus tutkia virusproteiinien vaikutusta luontaisen immunitetin vasteisiin. Siten bakteeriperäisten endotoksiinien aiheuttama immuunivasteiden aktivaatio olisi kontrolloimatonta ja haittaisi tulosten tulkintaa. Kitin sisältämällä endofree- käsittelyllä plasmidit puhdistettiin bakteeriperäisistä epäpuhtauksista.

## 5.13 Transfektio Huh-7 soluihin ja immunofluoresenssimikroskopia

TBE-viruksen rakenneproteiinien vaikutuksia tutkittiin nisäkässoluissa. Tätä tarkoitusta varten geeniä on ekspressoitava eli proteiinia on tuotettava nisäkässoluissa. Huh-7 solut ovat ihmisen hepatosellulaarikarsinooman hyvin erilaistuneita soluja. Tässä työssä Huh-7 soluja käytettiin immunofluoresenssitutkimukseen. Soluja kasvatettiin Eagle-MEM kasvatusliuoksessa 37°C:ssa ja 5% hiilidioksidipitoisuudessa. Solut kasvatettiin pyöreiden objektilasien päälle, ja niihin transfektoitiin TBEV:n kolmen rakenneproteiinin geenit, zikaviruksen vastaavien rakenneproteiinien geenit ja kontrollina influenssaviruksen nukleoproteiinin (NP) geeni. Solussa geenistä ekspressoitiin insertin mukainen proteiini ja sen eteen kiinnittyneenä HA-epitoppi tunnistusta varten, paitsi influenssaviruksen NP-proteiinissa, jossa on myc- ja His-epitopit.

Plasmidit transfektoitiin soluihin TransIT (Mirus) -transfektioagenssia ja OptiMem-mediumia (Gibco) käyttäen. Transfektioituja soluja kasvatettiin yön yli ja solut fiksattiin formaliinilla (4 %) ja PBS-liuoksella. Immunologista detektiota varten solut käsiteltiin PBS-liuoksella, johon on lisätty 1% BSA (*engl. bovine serum albumine*). BSA:n tehtävä on peittää epäspesifit vasta-aineiden sitoutumispaikat. Solukalvojen permeabilisointiin käytettiin 0,1 % Tween-20 -liuosta. Tämän tarkoitus on paljastaa solun sisäosien antigeeniset epitopit vasta-aineille. Tämän jälkeen soluja inkuboitiin huoneenlämmössä primääri- ja sekundaarivasta-aineissa.

Transfektion ja proteiinien tuoton onnistuminen varmistettiin immunologisella HA-epitopin tunnistamisella. Primäärivasta-aineena käytettiin hemagglutiniinin eli HA-epitopin tunnistamiseen

Biolegendin Anti-HA 11 Epitope Tag Antibodya. Se on hiiressä tuotettu monoklonaalinen IgG1 -luokan vasta-aine HA-epitoppia vastaan. Hiiren IgG puolestaan tunnistettiin vuohessa tuotetulla fluoresoivalla Alexa-568 fluorokromilla konjugoidulla anti-mouse -sekundaarivasta-aineella, joka näkyy fluoresenssimikroskoopissa punaisena.

TBEV-infektion sairastaneiden potilaiden seerumin IgG-vasta-aineet tutkittiin käyttämällä primäärivasta-aineena potilaan seerumia. Seerumin IgG-vasta-aineet tunnistettiin käyttämällä vuohessa tuotettua fluoresoivalla Alexa-488 fluorokromilla konjugoitua anti-human-vasta-ainetta, joka näkyy fluoresenssimikroskoopissa vihreänä.

Värjäysten jälkeen lasit, joiden päällä solut oli kasvatettu, fiksattu ja värjätty, siirrettiin objektilasille. Mikroskopointia varten petausaineena lasien välissä käytettiin Thermo Fisherin ProLong Gold Antifade -reagenssia, jossa on mukana DAPI-väri, joka värjää näytteen solujen tumat siniseksi fluoresenssimikroskoopissa. Lasit mikroskoipoitiin ja kuvattiin Leica DFC-700-T-fluoresenssimikroskoopilla ja Leica Application Suite X -ohjelmalla.

#### 5.14 Lusiferaasireportteri

TBE-viruksen proteiinien kykyä estää luontaisen immunitietin vasteita tutkittiin käyttämällä HEK-293 soluja, jotka ovat ihmisen embryonaalista munuaissolulinjaa. Solut transfektoituvat tehokkaasti ja niissä on toimivat luontaisen immunitietin mekansimit.

Soluihin transfektoitiin neljä plasmidia: RIG-I -proteiinin (*engl. Retinoic acid inducible gene 1*) aktiivista muotoa eli delta-RIG-I:tä tuottava ekspressioplasmidi, interferoni  $\lambda$ :n promoottorin ja sen säätelyn alla tulikärpäsen (*engl. Firefly, Photinus pyralis*) lusiferaasientsyymien geenin sisältävä plasmidi, Renillan (*engl. Sea pansy, Renilla Reniformis*) lusiferaasientsyymigeenin ekspressioplasmidi sekä tutkittavia rakenneproteiineja tuottavat ekspressioplasmidit. Transfektiot tehtiin TransIT-reagenssilla. Transfektioituja soluja kasvatettiin yön yli, ja lusiferaasi- ja renillatuotot analysoitiin Promegan Dual-luciferase Reporter Assay System -kitillä ja bioluminesenssi mitattiin Perkin Elmerin Victor 3 -laitteella.

Lusiferaasireaktioiden bioluminesenssin voimakkuudet suhteutettiin toisiinsa. Mitatuista bioluminesenssiarvoista laskettiin tulikärpäsen lusiferaasin tuottamille arvoille suhteellinen luminesenssiyksikkö, RLU (*engl. relative light unit*) Renillan lusiferaasiarvojen avulla. Mitatut arvot piirrettiin graafiseen taulukkoon. Lusiferaasin tuottamien suhteellisten arvojen laskemiseen ja taulukon piirtämiseen käytettiin Microsoftin Office Excel -ohjelmaa.

## 5.15 Alukkeet

PCR-menetelmässä monistettavan geenin alku- ja loppupäähän hybridisoituu monistettavalle geenille spesifiset alku- ja loppupään alukkeet (*engl. primers*). Aluke on oligonukleotidi, josta polymeerasientsyymi aloittaa DNA:n monistamisen. PCR:ssä alukkeiden liittymistä ja irtoamista monistettavista templaateista säädellään lämpötilalla. Alla on esitetty rakenneproteiinigeenien monistamiseen käytetyt alukkeet ja niiden hybridisaatiolämpötilat. BamHI-entsyymien leikkauskohdat ovat lihavoituna ja geenin luennan lopetuskodoni on punaisilla kirjaimilla.

### TBEV primers

#### Capsid

Fwd 5'-AAAGCG **GGATCC** GTC'AAG'AAG'GC -3'

Rev 5'-AAAGCG **GGATCC****TTA** CCC'CAA'CAG'AG -3'

$T_m(\text{fwd})$  64.4 °C

$T_m(\text{rev})$  64.7 °C

#### Propeptide

Fwd 5'-AAAGCG **GGATCC** ACG'CTT'GCT'GCA'AC -3'

Rev 5'-AAAGCG **GGATCC****TTA** GCG'CCT'TGT'C -3'

$T_m(\text{fwd})$  68.6 °C

$T_m(\text{rev})$  65.9 °C

#### Membrane protein

Fwd 5'-AAAGCG **GGATCC** TCA'GTG'CTG'ATC' -3'

Rev 5'-AAAGCG **GGATCC****TTA** AGC'GTA'GAC'C -3'

$T_m(\text{fwd})$  63.3 °C

$T_m(\text{rev})$  62.9 °C

#### Envelope protein

Fwd 5'-AAAGCG **GGATCC** TCG'CGT'TGC'AC -3'

Rev 5'-AAAGCG **GGATCC****TTA** CGC'CCC'CAC' -3'

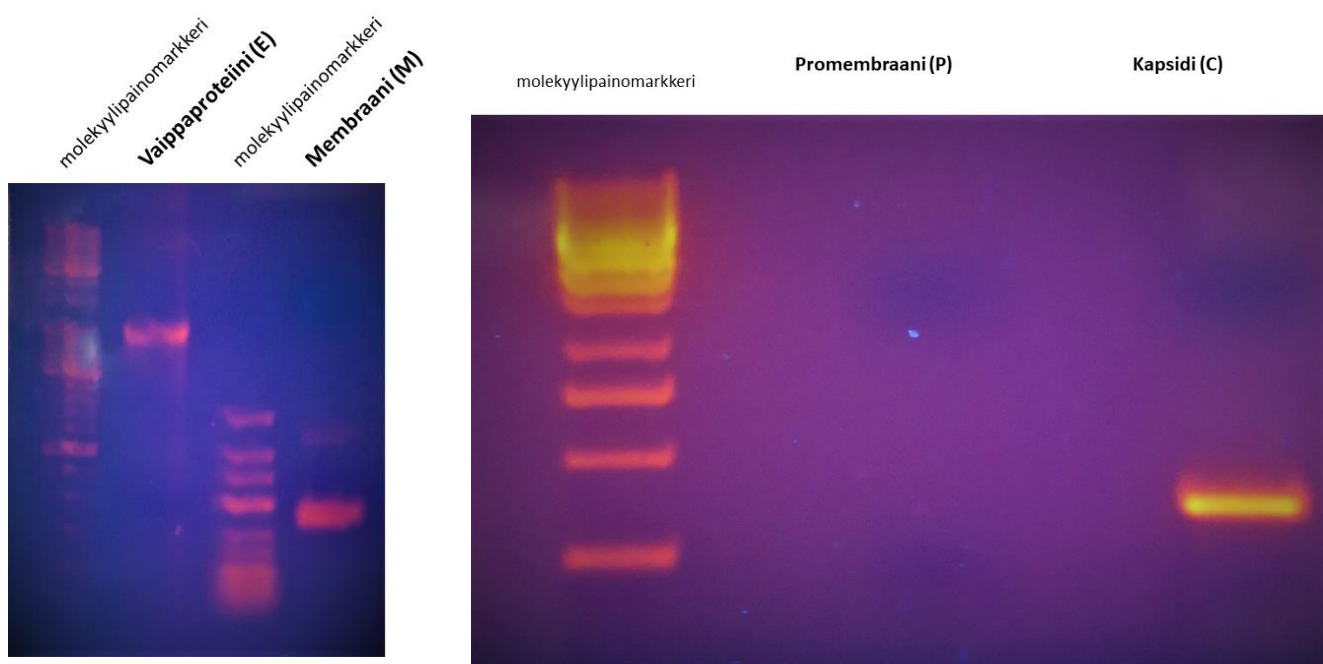
$T_m(\text{fwd})$  67.2 °C

$T_m(\text{rev})$  68.5 °C

## 6 TULOKSET JA TULKINTA

### 6.1 TBE-viruksen rakenneproteiinien kloonaus plasmidiin

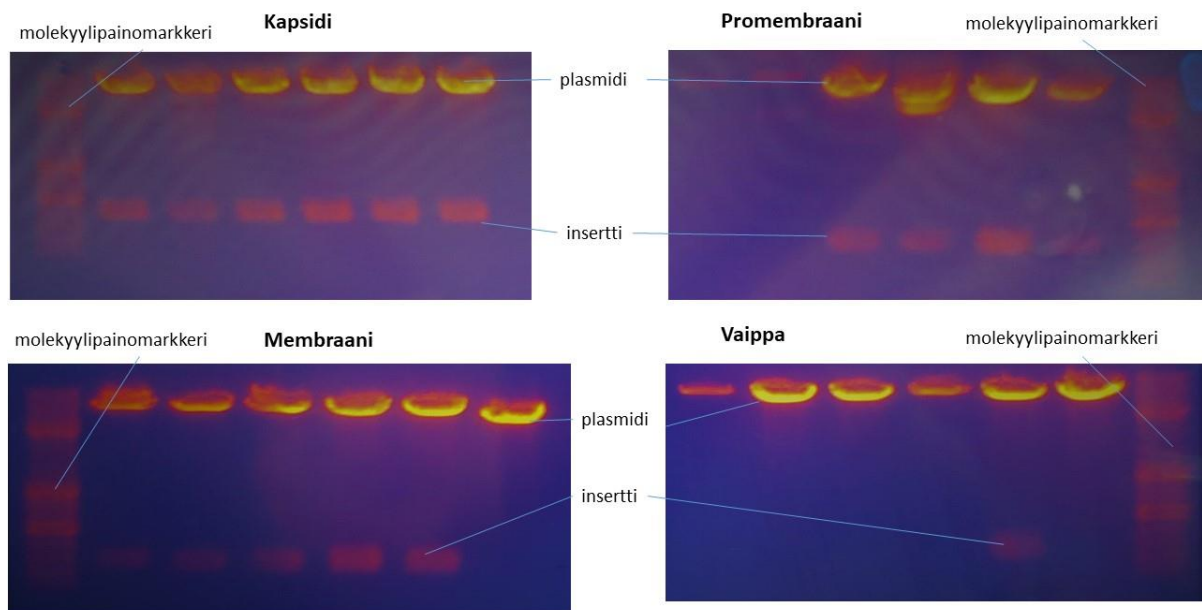
Puutiaisavokuumeviruksella on neljä rakenneproteiinia, jotka ovat kapsidi (*C*, *Capsid*), vaippa (*E*, *Envelope*), membraani (*M*, *Membrane*) ja promembraani (*P*, *Promembrane*). Geenit – ja proteiinit, joita niistä tuotetaan, ovat hyvin eri kokoisia. Suurin on vaippaproteiinin geeni, 1488 nukleotidia (nt). Kapsidin geenin koko on 336 nt, promembraaniin geenin koko on 279 nt ja membraaniproteiinin geenini koko on 225 nt. Kaikkien neljän proteiinin geeni monistettiin PCR:llä onnistuneesti. Kuvassa 6 on onnistunut tulos kapsidiproteiinin, vaippaproteiinin ja membraaniproteiinin geenin monistamisesta. Promembraanin geeni monistettiin PCR:llä vielä erikseen.



Kuva 5. PCR:llä monistettujen rakenneproteiinigeenien geelielektroforeesi.

Kapsidi-, membraani- ja promembraaniproteiinien geenit kloonattiin pEBB-HA-N-plasmidiin. Insertin yhdistyminen plasmidiin analysoitiin geelielektroforeesilla ja kolme geeniä (kapsidi, membraani ja promembraani) kloonattiin onnistuneesti pEBB-HA-N-plasmidiin (kuva 6). Sekvensoinnilla löydettiin ne pesäkkeet, joihin transformaatioissa oli siirtynyt plasmidi, jossa insertti eli rakenneproteiinin geeni oli oikeassa lukusuunnassa. Niistä pesäkkeistä kerätyistä plasmideista tehtiin endotoksiinipuhdistus jatkossa tapahtuvaa nisäkässolutyöskentelyä varten. Näin saatiin kolmen rakenneproteiinin geenit kloonattua pEBB-HA-N -plasmidiin niin, että ne ovat oikein päin ja niistä voidaan tuottaa geenin mukainen proteiini.





Kuva 6. Bakteripesäkkeistä eristetyt plasmidit analysoitiin insertin suhteen leikkaamalla BamHI-entsyymillä ja ajamalla leikkaustuotteet geielektroforeesissa.

Vaippaproteiinin geenin kloonauksen pEBB-HA-N-plasmidiin ei onnistunut useista yrityksistä huolimatta. Vaippaproteiinin geenin monistaminen PCR:llä onnistui kuten muidenkin, mutta bakteripesäkkeistä, joihin geenin sisältävä plasmidi oli transformoitu, ei löydetty oikean kokoista DNA-materiaalia. Vaippaproteiini ja sen geeni on tutkituista suurin, 1488 kb, ja sen suuri koko tai sekvenssi voi tehdä siitä vaikean käsiteltävän. Geeni voi myös olla bakteereille toksinen, jolloin sen kloonaminen bakteereissa on hankalaa.

Kolmen rakenneproteiinin (C, M, P) geenit oli tarkoitus kloonata proteiinien tuotantoa varten pGEX-2T-plasmidiin, mutta kloonauksen ei onnistunut. Plasmidit, joihin insertti oli lugaatioissa liitetty, eivät transfektoituneet bakterisoluihin onnistuneesti. Bakteriviljelmissä kasvoi vain muutamia pesäkkeitä, ja niistä ei geielektroforeesissa löytynyt oikean kokoista inserttiä. Kyseinen plasmidi käyttäytyy transfektioissa arvaamattomammin kuin pEBB, joka osaltaan selittää epäonnistumista.

Vaippaproteiinin geeniä yritettiin kloonata pGEM-TA-plasmidiin, joka on pEBB:n tapaan ekspressioplasmidi. Geeni ligoitiin plasmidiin, ja blue-white selektiossa löytyi vain muutamia pesäkkeitä, joissa värin perusteella oli insertin sisältävä plasmidi sisällä. Kuitenkaan näistä pesäkkeistä ei onnistuttu monistamaan oikean kokoista DNA-materiaalia PCR:llä.

## 6.2 TBEV:n rakenneproteiinien tuotto nisäkässolussa ja immunofluoresenssianalyysi HA-vasta-aineella sekä potilasseerumeilla

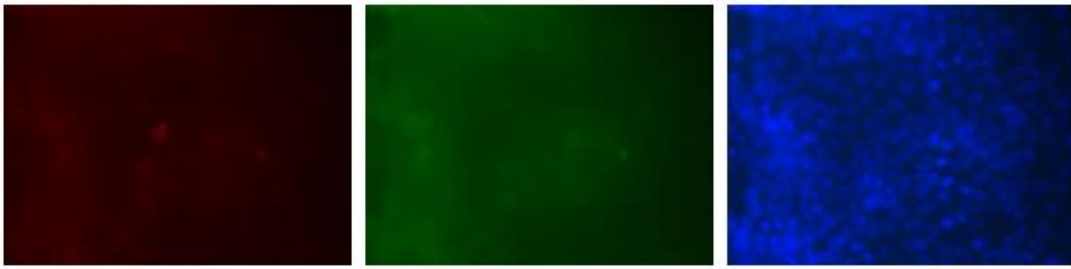
TBEV:n rakenneproteiineista kapsidi-, membraani- ja promembraaniproteiinien geenit transfektoitiin Huh-7 soluihin. Transfektiossa käytetty pEBB-HA-N -plasmidi sisältää lukusuunnassa peräkkäin paitsi siihen ligaatiossa liitetyn geenin, myös HA-markkerin geenisekvenssin. Transfektiossa plasmidi vie geenin solun sisälle, ja plasmidista DNA:sta tuotetaan haluttu proteiini ja sen alkuun muutaman aminohapon mittainen osa, HA-markkeri. Tuotettavassa proteiinissa kiinni oleva HA-markkeri on tunnistettavissa immunologisesti sille spesifillä vasta-aineella eli primäärivasta-aineella. Primäärivasta-aine ei vielä itsessään fluoresoi, vaan primäärivasta-aine tunnistetaan sekundaarivasta-aineella, jossa on fluoresoiva osa. Transfektion ja vasta-ainekäsittelyn jälkeen immunofluoresenssimikroskoopin kuvassa onnistuneesti transfektoituneessa solussa tuotettu proteiini näkyy punaisena. Huh-7 solu on nisäkässolu ja se ei itsessään sisällä HA-markkeria. Siten HA-markkerin tunnistus immunofluoresenssilla on spesifi kertomaan transfektion ja proteiinituoton onnistumisesta. Lisäksi HA-markkerin primäärivasta-aine on antigeenilleen spesifinen, joten se ei tuota paljoa taustareaktiota koska näytteissä on sen antigeeniä vain transfektoituneiden pEBB-plasmidien DNA:sta tuotettujen proteiinien yhteydessä.

Potilasseerumit ovat peräisin TYKS:in kliinisen mikrobiologian osaston potilasaineistosta sellaisilta potilailta, joilla on todettu puutiaisaivokuume ja heidän seerumeista on todettu löytyvän TBEV:lle diagnostisia IgG- ja IgM-luokan vasta-aineita. Seerumeista täten oletettiin löytyvän ihmisen vasta-aineita TBE-viruksen rakenneproteiineja vastaan. Tässä tutkimuksessa seerumin ihmisvasta-aineet toimivat primäärivasta-aineina, jotka tunnistavat solussa tuotettua TBEV:n rakenneproteiinia. Ihmisvasta-aineet eivät fluoresoi, vaan ne tunnistettiin mikroskoopissa vihreänä näkyvällä FITC-merkatulla antihumaanivasta-aineella. Seeruminäytteiden immunofluoresenssi tuottaa enemmän epäspesifistä taustareaktiota, sillä käytetyt Huh-7 solut ovat ihmisperäinen solulinja. Sen vuoksi seeruminäytteiden ihmisvasta-aineet voivat löytää muita, tälle työlle epäspesifisiä antigeenejä tutkittavista soluista.

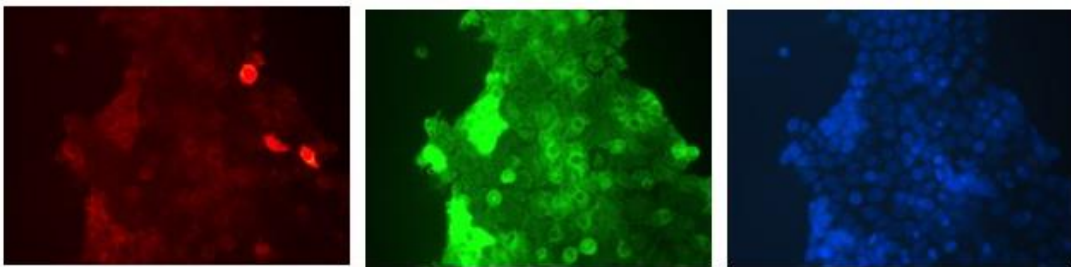
Kuvissa 8 - 10 on Huh-7 soluja, joihin on transfektoitu puutiaisaivokuumeviruksen rakenneproteiinien geenit. Rakenneproteiinit on tunnistettu soluista HA-epitoppiin sitoutuvalla anti-HA vasta-aineella, ja samalla on analysoitu mahdolliset potilasseerumissa olevat TBEV vasta-aineet. Puutiaisaivokuumeviruksen rakenneproteiinia tuotetaan vain niissä soluviljelmän soluissa, joissa transfektio on onnistunut. Proteiineissa on HA-epitoppi, joka näkyy kuvissa punaisena. Tumat värjäävä DAPI-värjäys näkyy kuvissa sinisenä ja osoittaa, kuinka tiheästi viljelmässä on soluja. Kapsidiproteiinin geenin transfektiotehokkuus oli melko alhainen, sillä DAPI -värjäyksen perusteella

viljelmästä on saatu objektilasille paljon soluja, mutta niistä vain harva on HA-epitoopin suhteen positiivinen (kuva 8). Membraaniproteiinin (kuva 9) ja promembraaniproteiinin (kuva 10) transfektiotehokkuus on niin ikään melko heikko, sillä DAPI:lla värjäytyy runsaasti tumia, mutta vain harva solu on HA-epitoopin suhteen positiivinen. Kaikkia kolmea TBEV:n rakenneproteiinia kuitenkin tuotetaan soluissa, joihin plasmidi on transfektoitunut. Potilasseerumien IgG-vasta-aineita tunnistettiin vihreänä näkyvällä sekundaarivasta-aineella, jonka kertymistä nähdään joissakin soluissa runsaasti (kuvat 8 -10). Seerumin vasta-aine ei kuitenkaan näy samoissa soluissa kuin HA-epitooppi, vaan on levinnyt diffuusisti. Siten värjäytyminen ei ole merkki puutiaisaiivokuumeviruksen rakenneproteiinin tunnistamisesta, vaan kyseessä on epäspesifinen taustareaktio.

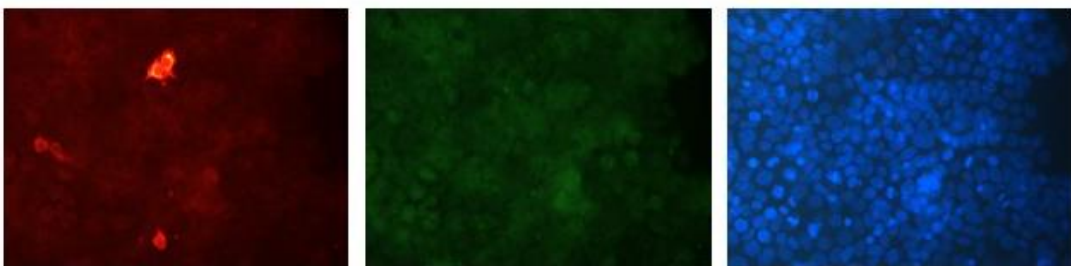
Seerumi 1



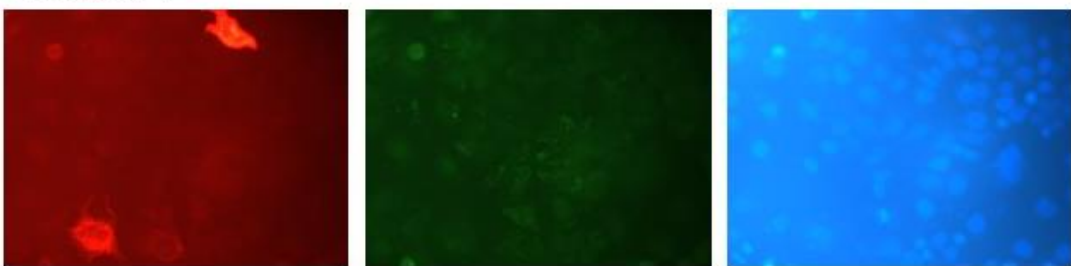
Seerumi 2



Seerumi 3

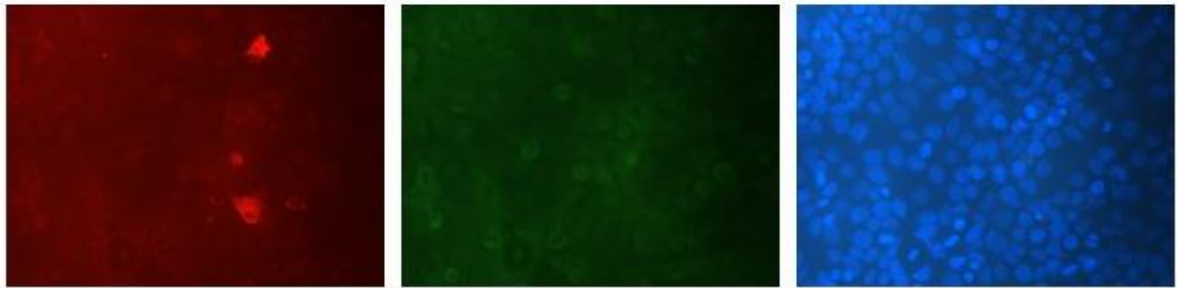


Seerumi 4

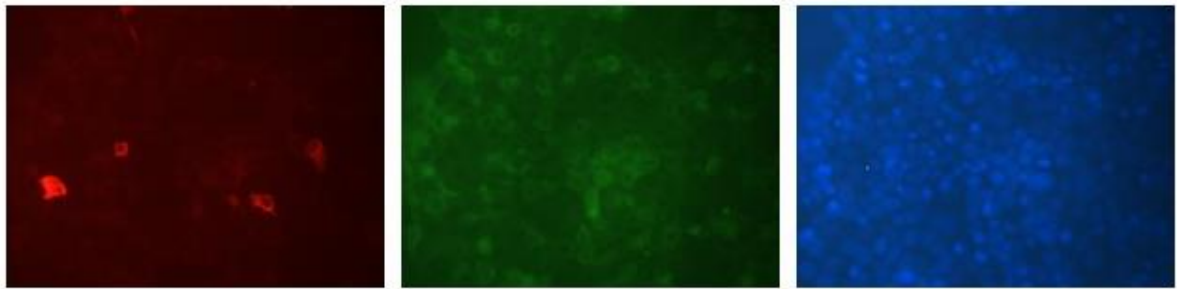


Kuva 7. Immunofluoresenssikuva Huh-7 soluista, joihin on transfektoitu puutiaisavokumeviruksen kapsidiproteiinin geeni. HA-epitoppi = punainen, potilasseerumin IgG = vihreä, tuma = sininen.

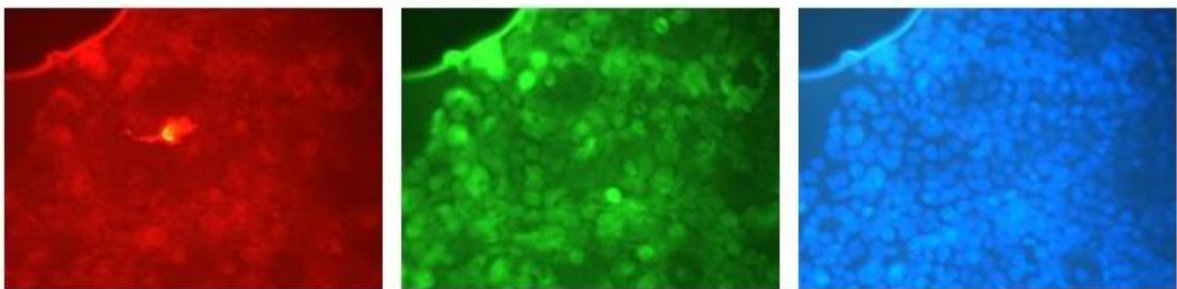
Seerumi 1



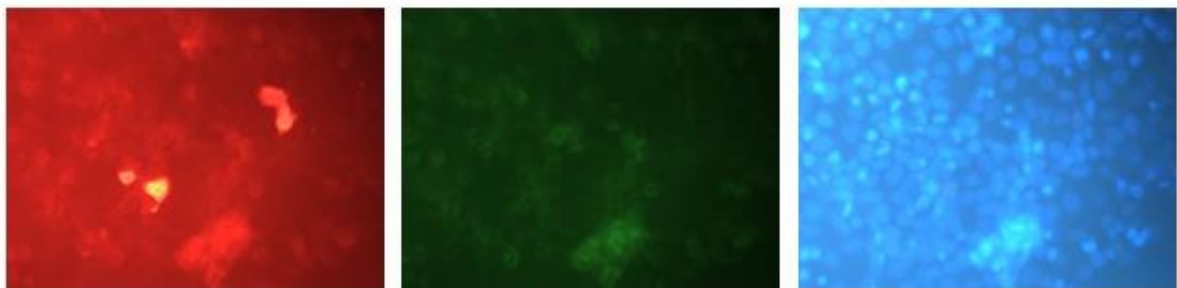
Seerumi 2



Seerumi 3

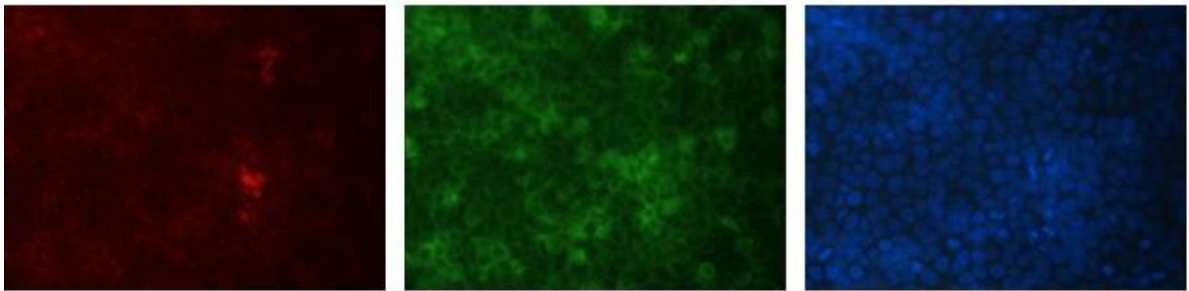


Seerumi 4



Kuva 8. Immunofluoresenssikuva Huh-7 soluista, joihin on transfektoitu puutiaisavokuumeviruksen membraaniproteiinin geeni. HA-epitooppi = punainen, potilasseerumin IgG = vihreä, tuma = sininen.

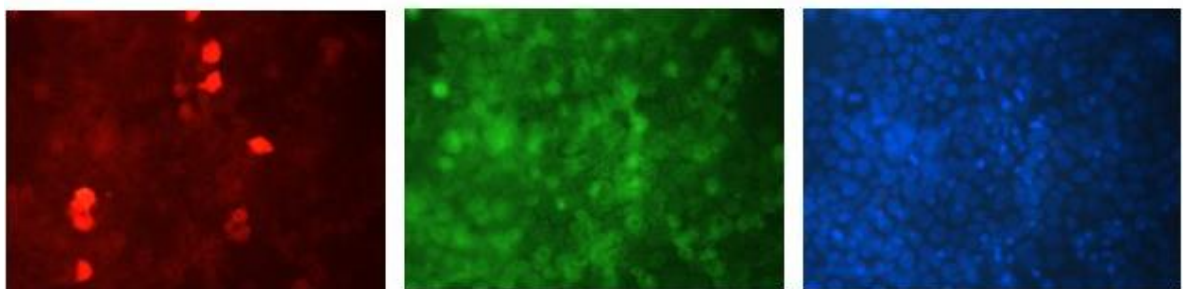
Seerumi 1



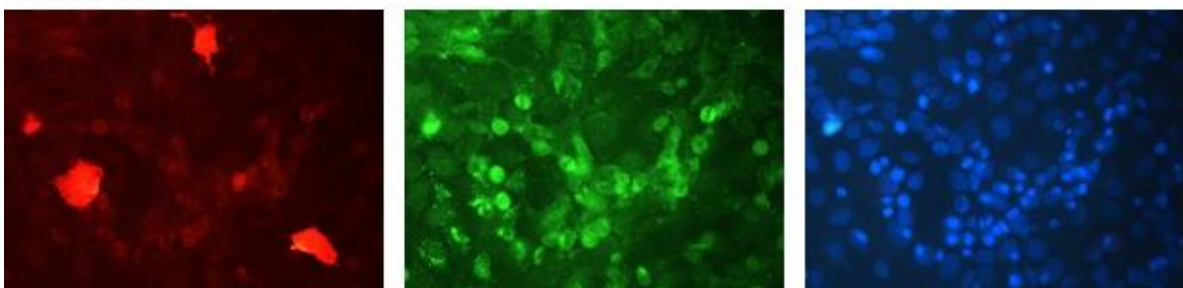
Seerumi 2



Seerumi 3



Seerumi 4

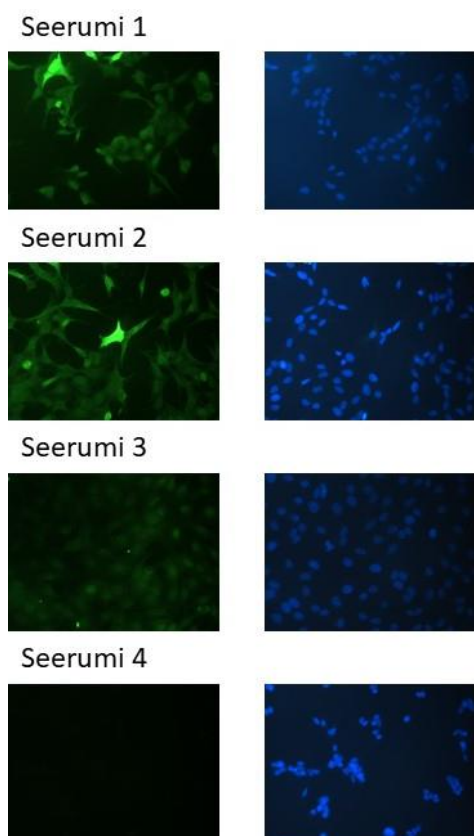


Kuva 9. Immunofluoresenssi HUH-7 soluista, joihin on transfektoitu puutiaisaivokuumeviruksen promembraaniproteiinin geeni. HA-epitooppi = punainen, potilasseerumin IgG = vihreä, tuma = sininen.



Tämän työn immunofluoresenssitutkimuksissa yksikään HA-epitoopin suhteen positiivinen solu ei ollut positiivinen TBEV-potilaiden seerumien IgG-vasta-aineiden suhteen. Potilasseerumeista ei siten löytynyt vasta-aineita, joiden antigeeni olisi TBEV:n kapsidi-, membraani tai promembraaniproteiini. Vastaavan kaltaisia tutkimuksia TBEV:n rakenneproteiinien vasta-aineista tai seroprevalenssista on melko vähän. Vuonna 1995 julkaistussa artikkelissa mainitaan, että viruksen proteiineihin kohdistuvia vasta-aineita löydetään verenkierrosta akuutin TBEV-infektion yhteydessä 8 – 70 päivän ajan (Matveeva ym. 1995.). Myöhemmin rokotetutkimusten myötä on selvinnyt, että flavivirusten pinnalla esiintyvä vaippaproteiini E on vasta-ainetuotannon ensisijaisesti käynnistävä antigeeni ja proteiineista immunogeenisin. Vaippaproteiinin E ja NS1-proteiinin vasta-aineiden on myös huomattu suojaavan eläinmalleissa flavivirusten aiheuttamalta taudilta (Diamond ym 2009; Heinz & Stiasny 2012.).

Influenssaviruksen nukleoproteiinin (NP) geeni transfektoitiin Huh-7 soluihin detektiomenetelmän kontrollina. Sen plasmidivektorissa ei ole HA-epitoopin sekvenssiä, joten sen tuottoa soluissa ei voitu analysoida HA-vasta-aineella. Influenssaviruksen NP-geenillä transfektoiduissa soluissa seeruminäytteiden 1, 2 ja 3 kohdalla (kuva 11) nähdään seerumin vasta-aineiden tunnistavan selkeästi NP-positiivisia soluja. Seerumi 4 ei reagoi influenssaviruksen NP-proteiinille. Seerumien vasta-aineiden immunofluoresensseissa ei tule esille paljoa epäspesifistä taustareaktiota.

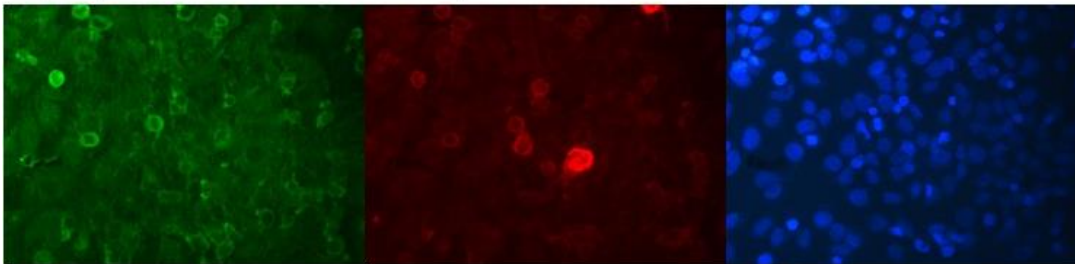


Kuva 10. Influenssaviruksen NP-proteiinin geeni on transfektoitu Huh-7 soluihin. DAPI = sininen, potilasseerumin IgG = vihreä.

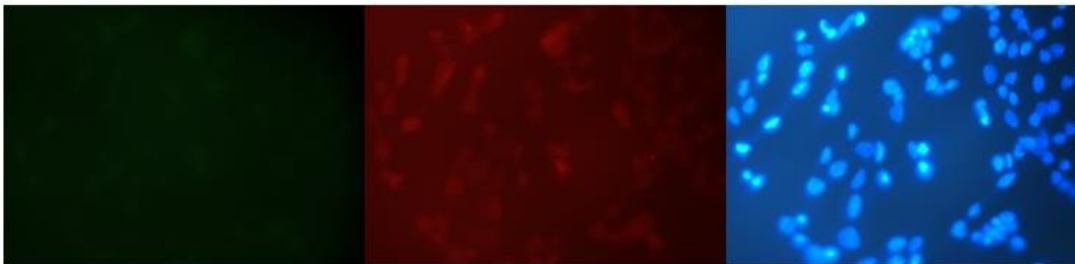
Tämän tuloksen perusteella potilasseerumeissa 1, 2 ja 3 on vasta-aineita influenssaviruksen NP-proteiinia vastaan. Nämä seeruminäytteet ovat siten todennäköisesti influenssavirusta vastaan rokotetulta tai aiemmin influenssainfektion sairastaneelta potilaalta. Tämä varmistaa, että menetelmä toimii, joten TBEV:n rakenneproteiinien suhteen saatu negatiivinen tulos potilasseerumeiden osalta ei johdu menetelmän toimimattomuudesta.

Zikavirus on flavivirus ja TBEV:n sukulainen. Tässä työssä käytettiin zikaviruksen vastaavia rakenneproteiineja kontrollina potilasseerumin vasta-aineiden spesifisyydelle ja toisaalta ristireaktiivisten vasta-aineiden identifioimiseksi. Yhtä flavivirusta vastaan muodostetut vasta-aineet saattavat olla ristireaktiivisia toisen flaviviruksen rakenteille ja tunnistaa niiden antigeenisia osia, sillä ne ovat rakenteellisesti ja genomiltaan toisiaan muistuttavia.

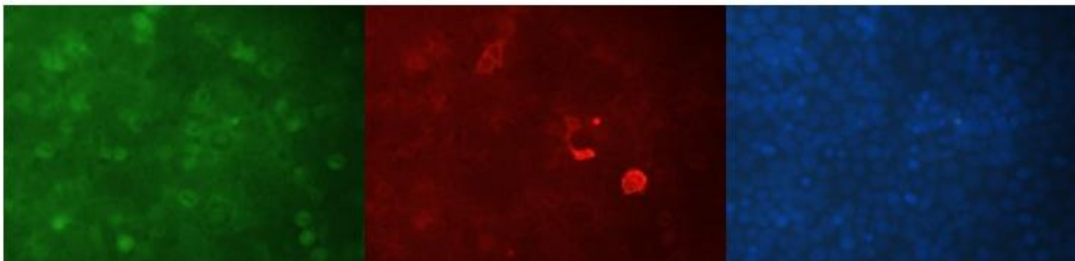
Kapsidiproteiinin detektio antihumaani- ja HA -vasta-aineilla



Membraaniproteiinin detektio antihumaani- ja HA -vasta-aineilla



Promembraaniproteiinin detektio antihumaani- ja HA -vasta-aineilla



Kuva 11. Immunofluoresenssikuvat Huh-7 soluista, joihin on transfektoitu zikaviruksen vastaavat rakenneproteiinit. Seerumin 2 tulos on näytetty esimerkkinä. HA-epitoppi = punainen, potilasseerumin IgG = vihreä, tuma = sininen



Zikaviruksen rakenneproteiinien geenit olivat samanlaisessa pEBB-HA-N -plasmidissa kuin TBEV:n rakenneproteiinien geenit. ZIKV:llä on TBEV:lle analoginen perimä ja siten vastaavat proteiinit, joten sitä käytettiin ihmisseerumien vasta-aineiden spesifisyyden kontrollina. Oletus oli, että ZIKV:n rakenneproteiinien geneilla transfektoiduista soluista ei löydy antigeeniä ihmisseerumin vasta-aineille. Zikavirusta ei tiedetä esiintyvän Suomessa, joten suomalaisilla potilailla ei todennäköisesti ole vasta-aineita virusta vastaan, kun eivät sitä ole kohdanneet. Sen sijaan pEBB-HA-N -plasmidista tuotetun proteiinin merkinä HA-epitoppi löytyisi soluista. Jos seerumin vasta-aineet sitoutuisivat ZIKV:n rakenneproteiineihin, olisi kyseessä todennäköisimmin ristireagointi.

Odotetusti, ZIKV:n proteiinien geneilla transfektoidut Huh-7 solut ekspressoivat zikaviruksen proteiineja ja HA-epitoppi löytyi soluista osoittaen transfektion ja proteiinien tuoton onnistumisen. Potilasseerumeilla ei löytynyt spesifiä värjäytymistä zikaviruksen geneilla transfektoiduista soluista. Kuvassa 15 on esitetty yhden potilasseerumin tulokset. Vastaava tulos (HA-epitoppi positiivinen, ei ihmisseerumien vasta-ainereaktiota) saatiin myös muiden seerumien kohdalla. Nämä tulokset osoittavat, että potilasseerumeissa ei ollut zikaviruksen rakenneproteiineja tunnistavia vasta-aineita.

Flavivirusten ristireagoivat vasta-aineet voivat olla ongelmallisia tutkimuksessa, ilmiö saattaa vaikuttaa infektiotaudin kliiniseen ilmentymään ja ne saattavat vaikeuttaa diagnostiikkaa. Esimerkiksi dengueviruksen yhden serotyypin infektio tuo elinikäisen immuniteetin kyseistä serotyyppiä vastaan, mutta vain ohimenevän suojan kolmea muuta DENV-tyyppiä vastaan. Ristireaktiiviset vasta-aineet eivät siis suojaa pitkään ja aiheuttavat lisäksi ADE-efektin (*engl. antibody-dependent enhancement*) välityksellä vakavamman denguekuumeen toisen infektion kohdalla (Heinz & Stiasny, 2012). Tutkimustyössä ristireaktiiviset vasta-aineet voivat aiheuttaa vääriä tulkintoja infektion aiheuttajaviruksesta.

Flaviviruksen p-membraani- ja membraaniproteiinit ovat samaa PrM-kompleksia, kunnes ne pilkkotaan erilleen. Kompleksin pilkkoutuminen on osa viruksen maturaatiota, ja epäkypsän viruksen ehjä prM-kompleksi saattaa vaikuttaa viruksen pinnan epitoppeihin jotka immuunpuolustus kohtaa. Tällöin virusta vastaan kehitettävät vasta-aineet sitoutuvat eri tavalla pinnan antigeeneihin, ja toisaalta virusten kypsyessä vasta-aineiden antigeenit voivat jäädä piiloon, kun kypsissä viruksissa prM onkin pilkottu kahteen osaan. Länsi-Niilin viruksen pintaepitoppeja tunnistavat vasta-aineet olivat heikompia kypsiä viruksia kuin heterogeenistä viruspopulaatiota vastaan, kun ne eivät olleet altistuneet kypsille virioneille (Nelson ym. 2008; Pierson ym. 2008.).

Vasta-ainetutkimuksen negatiivisen tuloksen TBEV:n suhteen voi selittää se, että tuotetut proteiinit eivät ole vahvasti immunogeenisiä. Potilaiden infektion aiheuttanut TBE-virus on voinut olla eri serotyyppiä, ja laboratoriossa tuotettu virusproteiini on ollut siihen nähden liian erilainen, jotta seerumin vasta-aineet kykenisivät sitoutumaan sen antigeeneihin. Seerumeiden vasta-ainepitoisuus on myös voinut olla matala, ja toisaalta tutkimuksessa transfektiotehokkuus oli suhteellisen huono, joka osaltaan saattaa selittää tulosta. On myös mahdollista, että seeruminäytteet on otettu potilaasta ennen kuin potilas on ehtinyt kehittää vasta-aineita virusta tai sen rakenneproteiineja vastaan. Lisäksi edellä kuvattu maturaatioon liittyvä epitooppien muuntuminen PrM:n pilkkoutuessa on saattanut vaikuttaa vasta-aineiden sitoutumiseen.

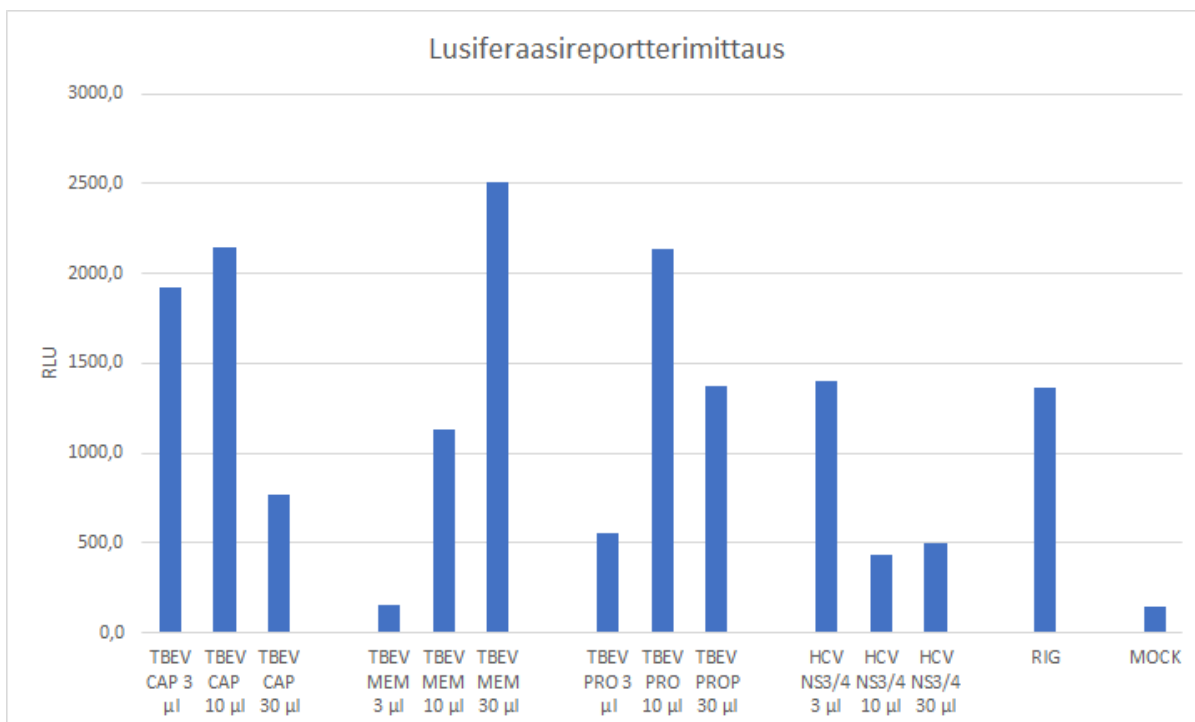
### 6.3 TBEV:n rakenneproteiinien vaikutus luontaisen immunitetin $\Delta$ RIG-I reitin aktivoitumiseen

Lusiferaasireporterien avulla saadaan selville nisäkässolun immuunivasteeseen kuuluvan RIG-I-signaalin toiminnan muutos, kun solussa ekspressoidaan TBEV:n rakenneproteiinin geeniä. HEK-293 soluihin transfektoitiin plasmideissa Renillan (*engl. sea pansy, Renilla Reniformis*) lusiferaasientsyymin geeni, tulikärpäsen lusiferaasientsyymin geeni interferoni-lambda-1 (IFN- $\lambda$ 1) promoottorin kontrollin alaisena,  $\Delta$ RIG-I:n geeni sekä puutiaisavokumeviruksen kolmen rakenneproteiinin geenit. Solut tuottavat transfektoitujen geenien tuotteita:  $\Delta$ RIG-I -proteiinia, tulikärpäsen lusiferaasientsyymiä, jos IFN- $\lambda$ 1 promoottori aktivoituu, renillan lusiferaasientsyymiä ja TBEV:n rakenneproteiineja (kapsidi, membraani ja promembraani).

Menetelmässä viruksen läsnäolo solussa simuloidaan transfektoimalla RIG-I-proteiinin aktiivisen muodon,  $\Delta$ RIG-I:n, geeni soluun. RIG-I on solusignaaloinnin proteiini, joka aktivoituu havaitessaan soluun tunkeutunutta viruksen ssRNA:ta.  $\Delta$ RIG-I puolestaan on RIG-I -molekyylin alati aktiivinen muoto, joka aktivoi signaalintietä ilman ssRNA:n havaitsemista tai muuta aktivaattoria. Signaalintie johtaa transkriptiotekijä IRF3:n (*engl. interferon regulatory factor*) aktivoitumiseen. IRF3 on IFN- $\lambda$ 1:n promoottorin aktivoiva transkriptiotekijä, joka aloittaa interferonin geenin luennan infekoituneessa solussa.

Tulikärpäsen lusiferaasientsyymin määrä ja aktiivisuus ja siten mitattava bioluminesenssi riippuu jatkuvasti aktiivisen  $\Delta$ RIG-I:n aktivoiman signaalitien päässä olevan interferoni  $\lambda$ 1:n promoottorin aktiivisuudesta. Jos TBEV:n rakenneproteiinit ovat interferoni  $\lambda$ 1:n tuotannon aloittavan RIG-I -välitteisen signaalitien tai interferoni  $\lambda$ 1:n promoottorin estäjiä, ne vähentävät signaalitien ja promoottorin aikaansaamaa lusiferaasientsyymin tuotantoa ja soluviljelmistä mitataan vähemmän

bioluminesenssia. *In vivo* RIG-I:n signaalitien aktivaation seurauksena olisi interferonituotto, mutta nyt promoottorin aktivaation seurauksena solu tuottaa lusiferaasientsyymiä.



Kuva 12. Lusiferaasireportterisysteemillä ja rakenneproteiinien geneilla transfektoiduista HEK-293 -soluista mitattu suhteellinen luminesenssi (RLU = suhteellinen luminesenssiyksikkö, engl. *relative light unit*).

Tulosten tulkinnassa kuvassa 17 tulikärpäsen lusiferaasientsyymien toiminnan tuottama bioluminesenssi on suhteutettu Renillan lusiferaasin aktiivisuuden tuottamaan luminesenssiin. RIG kuvaa  $\Delta$ RIG-I:n aktiivisuutta ilman TBEV:n proteiinia. MOCK on negatiivinen kontrolli ja kertoo taustareaktion luminesenssin. Menetelmän kontrollina käytettiin hepatiittivirus C:n NS3/4-proteiinia joka on tunnettu interferoniantagonisti. Sitä on aiemmin tutkittu vastaavalla tutkimusasetelmalla ja HCV:n NS3/4 -proteiinin on huomattu estävän tehokkaasti  $\Delta$ RIG-I -välitteistä interferonipromoottorin aktivaatiota (Kaukinen ym. 2006.). Myös tässä tutkimuksessa HCV NS3/4-proteiinilla oli selvä inhibitorinen vaikutus interferonipromoottorin aktivaatioon.

Puutiaisaivokuumeviruksen kapsidiproteiinin suurin transfektoitu pitoisuus näyttää jossakin määrin estävän  $\Delta$ RIG-I -välitteisen interferonipromoottorin aktivaation. Membraaniproteiinin kohdalla lusiferaasin aktiivisuus lisääntyy transfektoidun  $\Delta$ RIG-I:n konsentraation lisääntyessä, joten se ei tässä asetelmassa näytä estävän interferonipromoottorin aktivoitua. Promembraanin kohdalla tuloksen tulkinta on hankalaa, sillä interferonipromoottorin aktiivisuus vaihtelee transfektoidusta plasmidimäärästä riippumatta.

Luontaisen immunitetin vasteiden ja niiden inhibition näkökulmasta flavivirusten rakenneproteiineista on julkaistu vähän tietoa. Rakenneproteiineja kaiken kaikkiaan on tutkittu vähemmän kuin ei-rakenneproteiineja. Siksi tämän tutkimuksen tuloksen vertailukelpoisuutta on vaikea arvioida. Muutamia flavivirusten rakenneproteiineja koskevia julkaisuja onnistuttiin löytämään vertailuun.

Zikaviruksesta on valmistettu laboratoriossa rekombinantti-kanta, jossa historiallisen zikaviruksen rakenneproteiinit korvattiin nykyisen, Etelä-Amerikan epidemian aiheuttaneen kannan rakenneproteiineilla ja huomattiin, että ne ovat heikompia tunkeutumaan isäntäsoluun kuin historiallisen kannan rakenneproteiineilla varustettu virus (Bos ym. 2018.). Japanin aivokuumeviruksen rekombinantti-kapsidiproteiini vähensi typpioksidin (NO) vapautumista makrofageissa, joissa typpioksidi liittyy immuunivasteen aktivaatioon. Viruksen rekombinantti-vaippaproteiinin läsnä ollessa typpioksidia ei vapautunut makrofageista. Rekombinantti-kapsidiproteiini myös stimuloi interleukiinien 2 ja 6 sekä TNF- $\alpha$ :n vapautumista makrofageista, ja kapsidiproteiini stimuloi interleukiini 8:n ja TNF- $\alpha$ :n promoottoreita. (Chen ym. 2009.).

Länsi-Niilin viruksen rakenneproteiineista vaippaproteiinin on todettu estävän luontaisen immunitetin vasteita. Se estää dsRNA:n laukaiseman signaalitien alavirran signaalintiproteiinia RIP1 (*engl. receptor-interacting protein 1*) vähentämällä RIP1-molekyylin polyubikinaatiota. Tässä työssä tutkittiin RIG-I:n laukaisema signaalitie kulkee tämän RIP1-molekyylin kautta. Arjona ym. stimuloivat signaalitietä poly(I:C):llä (nk. synteettinen dsRNA) ja huomasivat, että vaippaproteiinin läsnäolo vähentää poly(I:C):n laukaisemia immuunivasteita, koska vaippaproteiinin geeneillä transfektoiduista soluista mitattiin huomattavasti vähemmän sytokiineja, joiden tuotantoon signaalitie normaalisti johtaa. Siten RIP1-molekyylin välittämän signaalitien häiritseminen edesauttaa virusta väistämään isäntäsolun immuunivasteita: vaikka RIG-I tai MDA5 tunnistaa viruksen dsRNA:n ja aloittaa solusignaaloinnin, ei viesti mene perille tumaan asti (Arjona ym. 2007.). Dengueviruksen rakenneproteiinien interaktioita isäntäsolun proteiinien kanssa koskevassa tutkimuksessa selvisi, että 31 ihmisen proteiinia interaktioi viruksen proteiinien kanssa. Merkittävimpiä interaktioita olivat ne, jotka koskivat veren hyytymismekanismien proteiineja ja luontaisen immunitetin mekanismien proteiineja. Promembraanin ja membraaniproteiinin kompleksin PrM:n todettiin olevan vahvimmin yhteydessä luontaisen immunitetin interferonivasteen proteiineihin. (Folly ym. 2011).

Rakenneproteiineilla on siis vaikutusta luontaisen immunitetin vasteisiin, mutta kokonaiskuvan rakentamiseksi tarvittaisiin enemmän ja toistettuja tutkimuksia rakenneproteiinien immuno-evasiomekanismeista.

## 7 YHTEENVETO

TYKS kliinisen mikrobiologian osastolla tutkittujen puutiaisaivokuumeen sairastaneiden potilaiden seerumeista ei löytynyt vasta-aineita puutiaisaivokuumeviruksen kolmea rakenneproteiinia vastaan. Potilailta oli kyllä sairauden diagnoosivaiheessa löytynyt TBEV:lle diagnostisia IgG- ja IgM-vasta-aineita, mutta näiden vasta-aineiden antigeeni on viruspartikkeli, ei niinkään yksittäinen ja eristetty viruksen osa tai molekyyli. Flavivirusten vaippaproteiini on virionissa päällimmäisin ja neutraloivien vasta-aineiden päämääräinen antigeeni. TBEV:n E-vaippaproteiinigeeniä ei tässä työssä onnistuttu kloonamaan laboratoriotyöskentelyä varten.

RIG-I-reitin aktivaation tutkiminen tuotti tutkimuksen selkeimmän ja onnistuneimman löydöksen: puutiaisaivokuumeviruksen kapsidiproteiini ja promembraaniproteiini estävät mahdollisesti isäntäsolun interferonigeenien ilmentymistä, tarkemmin RIG-I- välitteistä interferonipromootorin aktivaatiota. Kapsidiproteiinin kohdalla saatiin parempi osoitus interferonitoiminnan estosta, mutta kapsidiproteiinin ja promembraaniproteiinin interferoniantagonismi ei ole tämän työn tuloksen perusteella vielä varmaa, vaan koeasetelma tulisi toistaa. Tämän tuloksen perusteella se olisi tarkoituksenmukaista. Flavivirusten tai TBEV:n rakenneproteiinien immuunivastetta moduloivista mekanismeista ei ole paljoa julkaistua tietoa, ja yleensä flavivirusten proteiineja koskevat tutkimukset kohdistuvat lähinnä ei-rakenneproteiineihin, koska ne lähtökohtaisesti voivat muuttaa solun toimintoja. Siten ei-rakenneproteiinien immuno-evasiomekanismeista on enemmän tutkimusnäyttöä olemassa.

Potilasseerumien vasta-ainejärjysten tulos oli negatiivinen, joskin menetelmä oli teknisesti onnistunut ja metodi oli toimiva. Rakenneproteiineista E-vaippaproteiini indusoi voimakkaasti immuunivastetta ja on se neutraloivien vasta-aineiden ensimmäinen kohde, ja se on myös ensimmäinen antigeeni, jonka immuunipuolustus kohtaa (Diamond ym. 2009.). Diagnostisesti merkittävät vasta-aineet sen sijaan eivät yleensäkään muodostu yksittäistä rakenneproteiinia kohtaan, vaan viruspartikkeleita ja niiden pintaa kohtaan. Diagnostiikassa tunnistetaan ihmisen tuottamia vasta-aineita rekombinanttisilla prME-kompleksin sisältävillä antigeeneillä (Levanov ym. 2014.). Siten on mahdollista, että potilasseerumien vasta-aineet eivät kohdistuisi yksittäiseen rakenneproteiiniin, vaan viruksen pintaproteiinien antigeenisesti tärkeisiin epitooppeihin.

Saavutetut tulokset ovat käyttökelpoisia viruslaboratorion tulevissa kokeissa, sillä kapsidi-, membraani- ja promembraaniproteiinien geenin sisältäviä plasmideja säilöttiin tulevaa käyttöä varten. Lisäksi tämä tutkimus tarjoaa kaksi hypoteesia, joita voi testata: TBEV:n kapsidiproteiini estää

luontaisen immunitetin vasteita, ja diagnostisille vasta-aineille positiivisen potilaan verestä ei löytyne vasta-aineita puutiaisaivokuumeviruksen sisäisiä ydinproteiineja kohtaan.

## 8 LÄHTEET

- Arjona, Alvaro et al. 2007. "West Nile Virus Envelope Protein Inhibits DsRNA-Induced Innate Immune Responses." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179(12):8403–9. Retrieved March 22, 2018 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056386>).
- Best, Sonja M. et al. 2005. "Inhibition of Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling by a Tick-Borne Flavivirus and Identification of NS5 as an Interferon Antagonist." *Journal of Virology* 79(20):12828–39.
- Bos, Sandra et al. 2018. "The Structural Proteins of Epidemic and Historical Strains of Zika Virus Differ in Their Ability to Initiate Viral Infection in Human Host Cells." *Virology* 516(February):265–73. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.003>).
- Charrel, Remi N. et al. 2004. "Tick-Borne Virus Diseases of Human Interest in Europe." *Clinical Microbiology and Infection* 10(12):1040–55.
- Chen, Shu-O., Shih-Hua Fang, Dien-Yun Shih, Tien-Jye Chang, and Jau-Jin Liu. 2009. "Recombinant Core Proteins of Japanese Encephalitis Virus as Activators of the Innate Immune Response." *Virus Genes* 38(1):10–18.
- Diamond, Michael S., Theodore C. Pierson, and Daved H. Fremont. 2009. "The Structural Immunology of Antibody Protection against West Nile Virus." *October* (2):212–25.
- Dörrbecker, Bastian, Gerhard Dobler, Martin Spiegel, and Frank T. Hufert. 2010. "Tick-Borne Encephalitis Virus and the Immune Response of the Mammalian Host." *Travel Medicine and Infectious Disease* 8(4):213–22.
- Folly, Brenda B., Almeriane M. Weffort-santos, C. G. Fathman, and Luis R. B. Soares. 2011. "Dengue-2 Structural Proteins Associate with Human Proteins to Produce a Coagulation and Innate Immune Response Biased Interactome."
- Haller, Otto, Georg Kochs, and Friedemann Weber. 2006. "The Interferon Response Circuit: Induction and Suppression by Pathogenic Viruses." *Virology* 344(1):119–30.
- Heinz, Franz X. and Karin Stiasny. 2012. "Flaviviruses and Flavivirus Vaccines." *Vaccine* 30(29):4301–6. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.114>).
- Jaakola, Sari. 2017. *Tartuntataudit Suomessa 2016*.
- Jääskeläinen, Anu et al. 2006. "Siberian Subtype Tickborne Encephalitis Virus, Finland." 12(10):1568–1569,1570,1571.
- Jääskeläinen, Anu E. et al. 2010. "Tick-Borne Encephalitis Virus in Ticks in Finland, Russian Karelia and Buryatia." *Journal of General Virology* 91(11):2706–12.
- Jääskeläinen, Anu E., Tarja Tonteri, Elina Sironen, Antti .. Pakarinen, Laura. Vaheri, and Olli. Vapalahti. 2011. *European Subtype Tick-Borne Encephalitis Virus in Ixodes Persulcatus Ticks*.
- Kaukinen, Pasi et al. 2006. "Hepatitis C Virus NS2 and NS3/4A Proteins Are Potent Inhibitors of Host Cell Cytokine/Chemokine Gene Expression." *Virology Journal* 3:1–13.
- Kotenko, Sergei V. et al. 2003. "IFN-As Mediate Antiviral Protection through a Distinct Class II Cytokine Receptor Complex." *Nature Immunology* 4(1):69–77.
- laitos, Terveyden ja hyvinvoinnin. 2013. *Pitäisikö TBE-Rokotusohjelmaa Laajentaa? . Puutiaisaiivokuumerokotustyöryhmä*.
- Levanov, Lev et al. 2014. "Diagnostic Potential and Antigenic Properties of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus Subviral Particles Expressed in Mammalian Cells from Semliki Forest Virus Replicons." *Journal of Clinical Microbiology* 52(3):814–22.
- Lin, Fan ching and Howard A. Young. 2014. "Interferons: Success in Anti-Viral Immunotherapy."

- Cytokine and Growth Factor Reviews* 25(4):369–76.
- Lindquist, Lars and Olli Vapalahti. 2008. "Tick-Borne Encephalitis." *The Lancet* 371(9627):1861–71. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673608608004>).
- Matveeva, V. A. et al. 1995. "Antibodies against Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Non-Structural and Structural Proteins in Human Sera and Spinal Fluid." *Immunology Letters* 46(1–2):1–4.
- Metsi, Julia, Marjo Vuorela, and Anu Kantele. 2015. "Puutiaisaivokuume Suomessa 2010–2012." 1367–75.
- Metsi, Julia, Marjo Vuorela, Anu Kantele, Markku Kuusi, and Jarmo Oksi. 2015. "Puutiaisaivokuume Suomessa 2010 - 2012." *2015;131(15):1367-75* 131(14):1367–75. Retrieved (<http://www.duodecimlehti.fi/lehti/2015/15/duo12354>).
- Neal, J. W. 2014. "Flaviviruses Are Neurotropic, but How Do They Invade the CNS?" *Journal of Infection* 69(3):203–15. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.05.010>).
- Nelson, Stevenson et al. 2008. "Maturation of West Nile Virus Modulates Sensitivity to Antibody-Mediated Neutralization." *PLoS Pathogens* 4(5).
- Nicklas, Theresa A. et al. 2012. "The Interferon Signaling Antagonist Function of Yellow Fever Virus NS5 Protein Is Activated by Type I Interferon." 43(1):35–41.
- Osterlund, P. I., T. E. Pietila, V. Veckman, S. V. Kotenko, and I. Julkunen. 2007. "IFN Regulatory Factor Family Members Differentially Regulate the Expression of Type III IFN (IFN- $\gamma$ ) Genes." *The Journal of Immunology* 179(6):3434–42. Retrieved (<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.6.3434>).
- Pardigon, N. 2017. "Mécanismes Physiopathologiques de l'infection Du Système Nerveux Central Par Les Flavivirus." *Transfusion Clinique et Biologique* 24(3):96–100. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2017.05.005>).
- Petersen, Lyle R. and Alan D. T. Barrett. 2009. "Arthropod-Borne Flaviviruses." Pp. 1176–1215 in *Clinical Virology*.
- Pierson, Theodore C., Daved H. Fremont, Richard J. Kuhn, and Michael S. Diamond. 2008. "Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development." *Cell Host & Microbe* 4(3):229–38. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312808002606>).
- Růžek, Daniel, Gerhard Dobler, and Oliver Donoso Mantke. 2010. "Tick-Borne Encephalitis: Pathogenesis and Clinical Implications." *Travel Medicine and Infectious Disease* 8(4):223–32.
- Solunetti.fi. n.d. "YLEINEN IMMUUNIVASTE VIRUSINFECTIOISSA." Retrieved ([http://www.solunetti.fi/fi/histologia/yleinen\\_immuunivaste\\_virusinfektioissa/2/](http://www.solunetti.fi/fi/histologia/yleinen_immuunivaste_virusinfektioissa/2/)).
- THL. 2017. "Puutiaisaivotulehdus - Infektiaudit - THL." Retrieved January 27, 2018 (<https://www.thl.fi/fi/web/infektiaudit/taudit-ja-mikrobit/virustaudit/puutiaisaivotulehdus>).
- THL. n.d. "Tartuntatautirekisterin Tilastotietokanta, THL." Retrieved March 12, 2018 ([https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/shp/fact\\_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12194](https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/shp/fact_shp?row=area-12260&column=time-12059&filter=reportgroup-12194)).
- Vapalahti, Olli. and Antti. Vaheri. 2010. "Flavivirukset." in *Mikrobiologia*.
- Wahlberg, Peter et al. 2006. "TBE in Åland Islands 1959-2005: Kumlinge Disease." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 38(11–12):1057–62.
- Werme, Karin, Michael Wigerius, and Magnus Johansson. 2008. "Tick-Borne Encephalitis Virus NS5 Associates with Membrane Protein Scribble and Impairs Interferon-Stimulated JAK-STAT Signalling." *Cellular Microbiology* 10(3):696–712.
- Ye, Jing, Bibo Zhu, Zhen F. Fu, Huanchun Chen, and Shengbo Cao. 2013. "Immune Evasion Strategies



of Flaviviruses." *Vaccine* 31(3):461–71. Retrieved  
(<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.015>).

## 9 LIITTEET

### Liite 1.

TBEV:n rakenneproteiinien geenit sisältävän yhdistelmäplasmidin sekvenssi. TBEV-proteiinien ilmentämistä varten valmistettiin synteettinen viruksen rakenneproteiinigeeni, jonka sekvenssi perustui Kumlinge 25-03 polyproteiinigeenin sekvenssiin (GenBank: GU183379.1). Geenin alku- ja loppupäihin tehtiin BamHI-restriktioentsyymien leikkauskohta geenin kloonauksen varten, mistä syystä geeninsisäinen BamHI-leikkauskohta mutatoitiin C -> A. Proteiinien ilmentymisen tehostamiseksi geenin 5'-päähän tuli nk. Kozak-konsensus sekvenssi ja E-proteiinin loppuun Stop-kodonit. Yksittäiset proteiineja koodaavat alueet on merkitty punaisella (C-proteiini), vihreällä (prM-proteiini) ja mustalla (E-proteiini).

**ggatccacc**ATGGTCAAGAAGGCCATCCTGAAAGGTAAGGGGGCGGTCCCCCTCGACGATTGTCGAAAGAGAC  
CGCAACGAAGACGCGTCAACCCAGAGCCCAATGCCAATGGGCTTGTGTTGATGCGCATGATGGGGATCTT  
GTG  
GCATGCCGTAGCTGGCACCGCGAGAAACCCCGTATTGAAGGCGTTCTGGAACCTCAGTCCCTCTGAAACAG  
GCCACAGCAGCACTGCGGAAGATCAAAGGACAGTGAGTGCCCTAATGGTTGGCTTGCAAAAACGTGGGA  
AAAGGAGGTCAGCGACGGACTGGATGAGCTGGTTGCTGGTCATTACTCTGTTGGGGATGACGCTTGCTGC  
AACGGTGAGGAAAAGAAAGGGACGGCTCACTGTGATTAGAGCTGAAGGAAAGGATGCAGCAACTCAGGTG  
CGTGTGGAGAATGGCACCTGTGTGATCCTGGCTACTGACATGGGGTCATGGTGTGATGATTCACTGTCCT  
ATGAGTGTGTGACCATAGATCAAGGAGAAGAGCCTGTTGACGTGGATTGTTTTGCCGGAACGTTGATGG  
AGTCTATTTGGAGTATGGACGCTGTGGGAAACAGGAAGGCTCACGGACAAGGCGCTCAGTGCTGATCCCG  
TCCCATGCTCAGGGAGAGCTGACGGGGAGGGGACACAAATGGCTAGAAGGAGACTCGTTGCGAACACACC  
TCACTAGAGTTGAAGGATGGGTCTGGAAGAACAGGCTACTTGCCTTGCGATGGTTACCGTTGTGTGGTT  
GACCCTGGAGAGTGTGGTGACCAGGGTCGCCGTTCTGGTTGTGCTCCTGTGTTTGGCACCGGTCTACGCT  
TCGCGTTGCACACACTTGGAAAACAGGGACTTTGTGACTGGTACTCAGGGGACTACGAGGGTCACCTTGG  
TGCTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACCATAACAGCTGAGGGGAAGCCTTCAATGGATGTGTGGCTTGACGC  
CATTTACCAGGAGAACCCTGCTAAGACACGTGAGTACTGTCTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTT  
GCAGCCAGATGCCAACGATGGGACCAGCCACTTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGA  
GAGATCAGAGTGATCGAGGCTGGGGCAACCACTGTGGACTGTTGGAAAGGGTAGCATTGTGGCCTGTGT  
CAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAAGAAAGCCACAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACG  
GTCAAAGTGAACACACACGGGAGACTATGTTGCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCGT  
CCTTCACAGTTTCTTCAGAGAAAACCACTTCTGACTATGGGTGAGTATGGAGATGTGTCTTTGTTGTGCAG  
GGTTGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCCAGACCGTCATCCTTGAGCTTGACAAGACAGTGGAACACCTTCCA  
ACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGACTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGGAGCGCAA  
ACTGGAATAACGCAGAAAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCT  
CGGAGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTTGTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAG  
TACCACCTGAAGAGTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGGTCTTACGT  
ACACAATGTGTGACAAAACAAAGTTCACATGGAAGAGAGCTCCAACAGATAGTGGGCATGACACAGTGGT  
CATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTGTAGGATACCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCA  
GATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCAACAATTGAAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGA  
TGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATCATCTATGTTGGGGAAGTACAGTACCAATGGTTCCAAAAAGGGAG  
CAGCATTGGAAGGGTTTTTCAAAGACCAAGAAAGGTATAGAAAGACTGACAGTGTAGGAGAGCACGCC  
TGGGACTTCGGTTCTGCTGGAGGCTTTCTGAGTTCAATTGGGAAGGCGGTGCACACGGTCTTGGTGGT  
CTTTCAACAGCATCTTCGGGGGAGTAGGGTTTCTGCCAAAGCTTTTATTAGGAGTAGCATTGGCTTGGTT  
GGGCTGAACATGAGAAACCCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGCTGGAGGTCTGGTCTTGCCATG  
ACCTTGGGGTGGGGGCGTAA**ggatcc**

Liite 2. Virusproteiinien geenien monistamiseen käytetty PCR-ohjelma.

T(°C)	t(s)	sykli
95°C	120s	x 1
95°C	30s	x 10
45°C	15s	
72°C	60s	
95°C	30s	x 25
58°C	15s	
72°C	60s	
72°C	420s	x 1

Liite 3. Molekyylipainomarkerit Gene ruler mix ja 1kb ladder (Thermo Fischer)

