

**Parechovirusinfektioiden laukaisema luontainen
immuunipuollustus soluviljelmissä.**

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Biokemian laitos

Molekulaarisen solubiologian
tutkinto-ohjelma

Maaliskuu 2019

Emmiisa Vuorinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunta

EMMILIISA VUORINEN: Parechovirusinfektioiden laukaisema luontainen
immuunipuollustus soluviljelmissä.

Pro gradu –tutkielma, 61 sivua, 9 liitettä

Biokemia

Maaliskuu 2019

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Ihmisen parechovirukset (HPeV:t) voivat aiheuttaa vakavia keskushermostoinfektioita vastasyntyneille. Tyypin 3 HPeV on yleisin aiheuttaja, mutta Tauriaisen ryhmä löysi Suomesta 2012 lapsia, joille HPeV4 aiheutti vakavan yleisinfektion. Sitä, miten HPeV:t aiheuttavat hermostoinfektioita, ei tunneta. Tarkoituksena on tutkia, miten sytokiinien ilmeneminen infektoiduissa soluissa eroaa eri virustyyppien ja -alatyppien välillä.

Tutkimme tätä infektoimalla ihmisen keuhkoepiteelisoluja (A549) sekä astrosyyttisoluja (T98G) ihmisen parechoviruksilla: HPeV1-Harris, HPeV3, HPeV4-FI ja HPeV4-NL sekä kontrollina Cocksakievirus B3:lla (CV-B3). Osa viruksista oli aiheuttanut vakavia tauteja ja osa lieviä. Käytimme kontrollina myös kaksinauhaista RNA:ta (Poly-IC), joka laukaisee sytokiinien tuotannon. Infektoidut solut ja niiden kasvatusliemi kerättiin 24 h, 48 h ja 72 h aikapisteissä. Määritimme solujen ilmentämiä sytokiineja kasvatusliemistä Proteome Profiler™ -kitillä. Tulosten perusteella valitsimme jatkotutkimusten sytokiinit. Niiden tuotantoa mitattiin kvantitatiivisella RT-PCR analyysillä sekä immunofluoresenssi värjäyksellä.

Kaikkien virusalatyppien sytokiiniprofiilit vaihtelivat keskenään ja solulinjojen välillä. HPeV3:n ja CV-B3:n välillä nähtiin samankaltaisuutta. Suurimmat erot nähtiin interleukiini-6:n (IL-6) tuotannossa: kaikki virukset estivät sen tuottoa A549 soluissa mutta tehostivat sitä T98G soluissa. Tutkimus on edelleen käynnissä, joten tulokset ovat alustavia. Tulokset viittaavat siihen, että HPeV:n sytokiiniprofiilit muistuttavat toisiaan ja CV-B3:n sytokiiniprofiileja. Kaikkien virusten sytokiiniprofiilit erosivat joiltain osin toisistaan, mutta vakavaa sairautta aiheuttaneiden virusten sytokiiniprofiilit eivät eronneet huomattavasti muiden virusten profiileista.

ASIASANAT: Ihmisen parechovirus, astrosyyttisolut, keuhkoepiteelisolut, sytokiini

TURUN YLIOPISTO

Department of Biochemistry

Faculty of science and engineering

EMMILIISA VUORINEN: Innate immunity response of cellcultures to Human Parechovirus infection.

Pro gradu –tutkielma, 61 pages, 9 appendixes

Biochemistry

March 2019

The originality of this thesis has been checked in accordance with the University of Turku quality assurance system using the Turnitin OriginalityCheck service.

Human parechoviruses (HPeVs) can cause severe central nervous system infections in newborn babies. These are mostly caused by HPeV type 3, but in 2012 several cases where HPeV4 caused sepsis like disease were discovered. So far there is little data on HPeV induced cytokine profiles. The goal was to study which cytokines are induced by HPeVs and how these cytokine profiles differ between virus types and isolates.

This was studied by infecting human lung epithelial cells A549 and astrocyte cells T98G with two HPeV4 isolates, one HPeV3, one HPeV1 and as control we used Coxsackievirus B3 (CV-B3). Some of these viruses had caused severe illness and others mild symptoms. Poly-IC was also used as a control to see which cytokines are induced by dsRNA in the cell lines. Induced cytokines were screened using Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Kit from cell culture supernatants. Selected cytokines were analyzed by qRT-PCR from extracted RNA of infected cells, and by double staining infected cells, using antibodies against viral protein or viral RNA and selected cytokines.

All virus isolates showed somewhat different cytokine profiles, which also differed between cell lines. Similarities were seen between HPeVs and CV-B3. There were no clear difference between cytokine profiles of virus types that caused severe or those that caused mild illness.

Key words: Human parechovirus, astrocytes, lung cells, cytokines

Sisällys

1	Lyhenteet	2
2	Johdanto	4
2.1	Parecho- ja enterovirukset	4
2.1.1	Parechoviruksen rakenne, genomi ja sen muuntuminen	5
2.1.2	Parechovirusten elinkierto	7
2.1.3	Parechovirusinfektion taudinkuva ja levinneisyys	9
2.2	Immunitetti	12
2.2.1	Parechovirusinfektio ja immuunipuollustus	14
2.2.2	Tutkimuksessa havaitut sytokiinit	15
2.3	Keskushermoston solut ja infektiot	17
2.4	Tutkimuksen tavoitteet	20
3	Materiaalit ja menetelmät	21
3.1	Solulinjat	21
3.2	Virukset	22
3.3	Solujen infektiokokeet	23
3.4	Sytokiinimääritykset	23
3.5	Viruspitoisuuden määrittäminen	26
4	Tulokset	28
4.1	Sytokiiniprofilin testaus Proteome Profilerilla	28
4.2	Sytokiini RT-qPCR	33
4.3	Sytokiini-immunofluoresenssivärjäys	37
4.4	Viruspitoisuuden määrittäminen	43
5	Tulosten tarkastelu	47
6	Kirjallisuus	49
7	Liitteet	55

1 Lyhenteet

ADEM	acute disseminated encephalomyelitis äkillinen hajapesäkkeinen keskushermostotulehdus
BSA	bovine serum albumin naudan seerumin albumiini
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid RNA:sta kopioitu DNA
CNS	central nervous system keskushermosto
CVB	coxsackievirus
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	dubelco's modified eagle media
DNA	deoxyribonucleic acid deoksiribonukleiinihappo
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid etyleenidiamiinitetraetikkahappo
EV	enterovirus
ER	endoplasmic reticulum endoplasminen kalvosto
FBS	fetal bovine serum vasikan sikiön seerumi
FPeV	ferret parechovirus ferretti parechovirus
HPeV	human parechovirus ihmisen parechovirus
HRP	horseradish peroxidase piparjuuriperoksidaasi
IF	Immunofluorescence immunofluoresenssi
IL	interleukin

	interleukiini
IRES	Internal ribosome entry site sisäinen ribosomin sisäänkäyntialue
LV	ljungan virus
MOI	multiplicity of infection solujen määrään verrattu virusmäärä
MPeV	Manhattan parechovirus manhattanin parechovirus
NK-solut	natural killer cells luontaiset tappajasolut
PBS	phosphate-buffered saline fosfaattipuskuroitu suolaliuos
ORF	open reading frame avoin lukukeskus
PCR	polymerase chain reaction polymeraasiketjureaktio
RGD	arginyl-glycyl-aspartic acid motif arginiini-glysiini-aspartaamihappo alue
RNA	ribonucleic acid ribonukleiinihappo
rpm	rounds per minute kierrokset minuutissa
RT-qPCR	real time quantitative polymerase chain reaction reaaliaikainen kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio
SEBV	sebokele virus
TLR	toll-like receptor toll:n kaltainen reseptori

2 Johdanto

2.1 Parecho- ja enterovirukset

Parechovirukset ovat pikornaviruksia, jotka usein aiheuttavat vatsatautia ja hengitystieinfektioita alle kuusivuotiailla. Ihmisen parechovirukset eli HPeV:t aiheuttavat harvoin oireita aikuisilla, mutta alle puolivuotiaille ne voivat olla hengenvaarallisia. HPeV infektio voi pahimmillaan johtaa aivokalvontulehdukseen, aivokuumeeseen ja vakavaan yleisinfektioon eli sepsiksen kaltaiseen tilaan. (Olijve ja muut 2018)

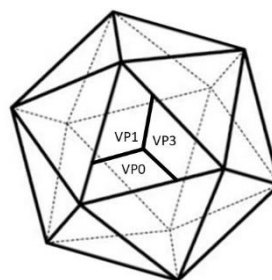
Ihmisen parechovirukset tunnistettiin ensikerran yli 50 vuotta sitten Amerikassa kesällä puhjennun vatsatautiepidemian yhteydessä. Tällöin löydettiin kaksi serotyypiltään erilaista virusta, jotka nimettiin echovirus 22:ksi ja 23:ksi sen perusteella, että niiden taudinkuva ja morfologia viittasi echovirusiin. (Wigand ja Sabin 1961) Kun näitä viruksia tutkittiin lisää, todettiin, että ne eroavat merkittävästi echovirusista sekvenssinsä, lisääntymismekanismien ja rakenteensa kautta. (Stanway ja muut 1994) Tämän vuoksi ne uudelleenluokiteltiin, jolloin *Pikornaviridae* perheeseen lisätiin parechovirusten suku. (Zell, Delwart, Gorbalenya, Hovi, King, Knowles, Lindberg, Pallansch, Palmenberg, Reuter, Simmonds, Skern, Stanway, Yamashita, & Ictv Report Consortium 2017) Nämä parechovirukset jaetaan nykyisin neljään lajiin: parechovirus A, B, C ja D:hen. Parechovirus B käsittää ljunگان virukset (LV), joita tunnetaan viisi genotyyppiä. Parechovirus C lajiin kuuluvat sebokele virukset (SEBV) ja parechovirus D:hen ferretti parechovirukset (FPeV). Parechovirus A:ta (HPeV) tunnetaan nykyisin 19 genotyyppiä ja niitä löydetään jatkuvasti lisää ympäri maailman. Näiden lisäksi on olemassa toistaiseksi luokittelematon manhattanin parechovirus (MPeV), joka infektoi rottia. (Lefkowitz ja muut 2018) Tässä tutkimuksessa keskitytään parechovirus A:han.

Enterovirukset eli EV:t, jotka kuuluvat pikornavirusiin, infektoivat ihmisiä ja ovat usein syynä lasten virustauteihin. Kuten parechovirukset myös enterovirukset voivat aiheuttaa hengenvaarallisia keskushermostoinfektioita kuten aivokalvontulehdusta ja

aivokuumetta pienillä lapsilla. Enterovirukset jaetaan 7 lajiin eli enterovirusiin A-D ja rhinovirusiin A-C (Zell ja muut 2017) A enterovirusia on löydetty 25 eri genotyyppiä, joista osa aiheuttaa vain lieviä tauteja kuten enterorokkoa, jonka yleisin aiheuttaja Suomessa on CV-16 (Vuorinen Tytti 2011) Sen sijaan EV71, joka on kuuluu myös enterovirus A:han, aiheuttaa pahimmillaan kuolemaan johtavan keskushermostoinfektion. (Stanway ja muut 2010) Enterovirus B:tä on löydetty 63 eri tyyppiä, joihin kuuluvat Coxsackievirus B eli CVB, jota käytettiin tässä tutkimuksessa vertailukohtana. CVB:t aiheuttavat yleensä vain lieviä tauteja, mutta voivat pahimmillaan saada aikaan sydänlihastulehduksen, keuhkokuumeen ja keskushermostoinfektioita. (Fields ja muut 2007)

2.1.1 Parechoviruksen rakenne, genomi ja sen muuntuminen

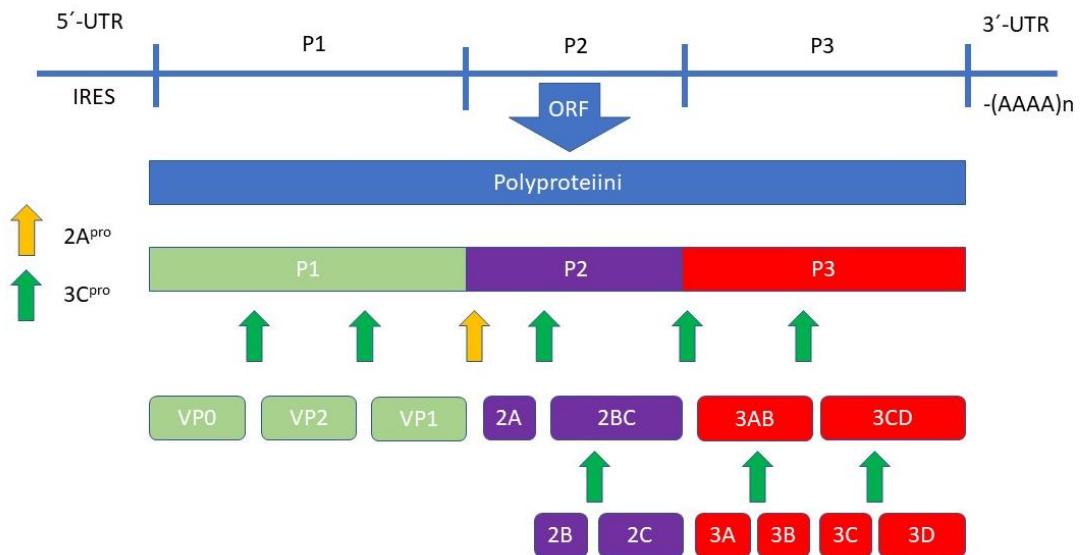
Pikornavirukset, joihin parechovirukset kuuluvat, ovat vaipattomia, yksinauhaisia ja positiivissuuntaisia RNA viruksia. Positiivissuuntainen RNA voidaan kääntää suoraan käyttökelpoiseksi proteiiniksi toisin kuin sen komplementaarinen nauha, jota kutsutaan negatiivissuuntaiseksi RNA:ksi. HPeV:n n. 7300 nukleotidin genomia suojaa symmetrinen, ikosahedraalinen kapsidi eli proteiinikuori, mistä muodostuu noin 28 nm kokoinen virus. (Hyypiä ja muut 1992) Tämä kapsidi muodostuu 60 protomeerista eli alayksiköstä, jotka rakentuvat kolmesta polypeptidiketjusta VP0, VP1 ja VP3, jotka ovat kooltaan noin 30 kDa (Kuva 1). Nämä kolme proteiinia muodostuvat viruksen lisääntymiskierron aikana yhdestä polyproteiinista, joka muokkautuu sekä translaation aikana ja sen jälkeen. Muiden pikornavirusten VP0 leikataan vielä VP2 ja VP4



Kuva 1: HPeV:n positiivissuuntaista RNA genomia suojaa ikosahedraalinen kapsidi.

polypeptidiketjuiksi ja niiden VP1 proteiiniaanalogin hydrofobinen tasku on vapaa toisin kuin parechoviruksilla. (Shakeel ja muut 2016)

HPEV:n genomi on yksinauhainen positiivissuuntainen RNA, joka voidaan jakaa neljään alueeseen. Nämä alueet ovat kaksi ei-transloitavaa aluetta 5'UTR ja 3'UTR, yksi avoin lukukehys ORF, joka transloidaan kerralla yhtenäiseksi polyproteiiniksi, sekä poly-A häntä. ORF:sta tuotettu polyproteiini leikataan useiksi esiaste molekyyleiksi, jotka lopulta muokataan rakenteellisiksi tai ei-rakenteellisiksi proteiineiksi. ORF jakautuu kahtia näiden kahden välillä arginiini-glysiini-aspartaamihappo alueen (RGD) kohdalla, joka on VP1 alueen 3'-päässä. ORF:n 5' päällä koodataan rakenteellisia proteiineja, joista muodostetaan pintaproteiinit VP0, VP1 ja VP3 kun taas ORF:n 3' päähän jäävät ei-rakenteellisten proteiinien koodit kuten kuvasta 2 voidaan havaita. (Faria ja muut 2009)



Kuva 2: HPeV:n genomin rakenne, proteiinia koodaava avoin lukukehys käännetään polyproteiiniksi, josta muokataan viruksen tarvitsemat rakenteelliset ja ei rakenteelliset proteiinit.

HPEV:n eri genotyypit voidaan tunnistaa VP1 alueen sekvenssin avulla. Tämä johtuu siitä, että VP1 alue muuntuu tehokkaasti (n. 10^{-3} substituutiota paikkaa kohden vuodessa). Esimerkiksi HPeV7 erilaistui HPeV3:sta noin 150 vuotta sitten. Parechovirus A laji erilaistui yhteisestä esi-isästä arviolta 400 vuotta sitten ja kehittyi tämän jälkeen erilaisiksi sukulinjoiksi. (Faria ja muut 2009)

Rekombinaatio eli uusien ominaisuuksien syntyminen virusten genomien yhdistyessä on suurimmalle osalle HPeV:stä evoluution tärkein tapa. Genomi muuntuu sekä pistemutaatioiden kautta että rekombinaation kautta. Se vaikuttaa HPeV:n leviämiseen

ja infektiivisyyteen ja tapahtuu enterovirusten kaltaisella tiheydellä. HPeV3 sen sijaan rekombinoituu vähän luultavasti biologisten esteiden vuoksi. Esimerkiksi samana vuonna eristetyistä HPeV:t tyypeistä 1, 4, 5 ja 6 puolet oli rekombinantteja kun taas HPeV3:sta yksikään ei ollut. Tähän saattaa myös vaikuttaa RGD motiivin puuttuminen HPeV3:lta, mikä muuttaa sen isäntäsolukriteerejä. Tämä johtaa sen ja muiden genotyyppien yhteisinfektioiden vähenemiseen ja siten rekombinaation vähenemiseen. (Benschop, K. S. M. ja muut 2008)

2.1.2 Parechovirusten elinkierto

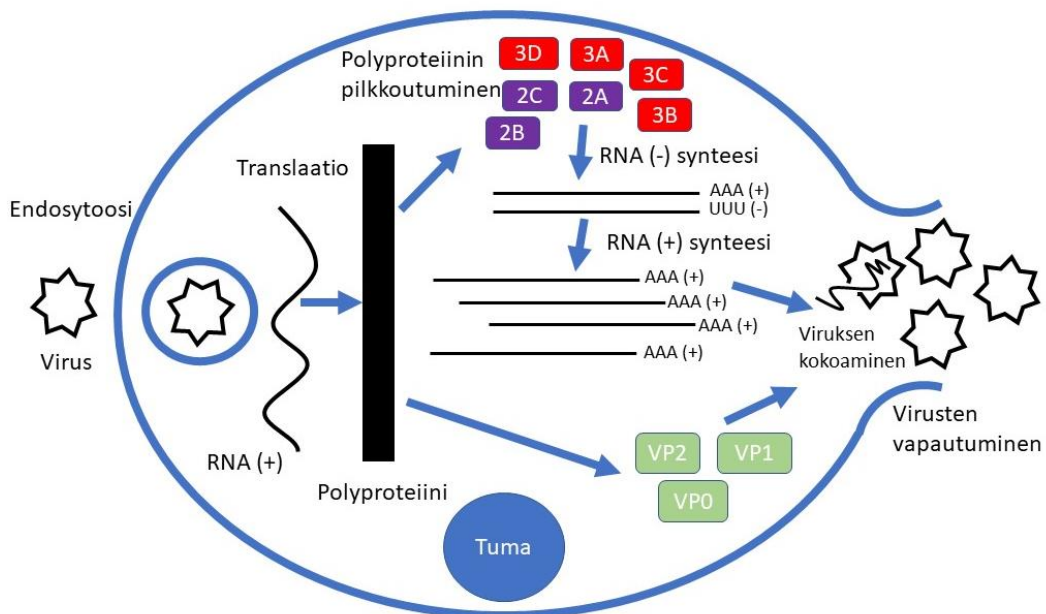
HPeV:t replikoituvat pääosin suolistokanavan ja hengitysteiden epiteelikudoksissa. Yleensä infektio rajoittuu näihin, mutta ne voivat myös levitä veren kautta muihin elimiin kuten maksaan ja aivoihin, jotka toimivat niiden sekundäärisinä replikaatiopaikkoina. (Harvala ja muut 2010) Eri genotyypit suosivat eri solutyyppejä. Eräessä tutkimuksessa HPeV3 replikoitui tehokkaammin hermosoluissa kuin HPeV1. Tämän lisäksi vakavia tauteja aiheuttaneet HPeV3:t replikoituvat tehokkaammin hermosoluissa kuin lieviä tauteja aiheuttaneet HPeV3:t. (Westerhuis ja muut 2012) Toisaalta Tauriaisen ryhmässä tehdyt infektiokokeet eivät tukeneet näitä havaintoja. (Siponen ja muut, julkaisematon)

Parechoviruksen elinkierto alkaa, kun se tunkeutuu solun sisään endosytoosin avulla. Tähän se käyttää aiemmin mainittua viruksen pinnalla olevaa kolmen aminohapon RGD aluetta, jonka isäntäsolun integriinit kuten $\alpha V\beta 1$ tunnistavat ja sitovat. Tämän jälkeen virus-integriini kompleksi otetaan solun sisään klatriiniriippuvaisen endosytoosin kautta. (Triantafilou ja muut 2005) Koska HPeV tyyppien 1, 2, 4, 5 ja 6 pintaproteiinit sisältävät kyseisen RGD alueen, käyttävät nämä kaikki todennäköisesti reseptorina solun integriinejä. Sen sijaan HPeV3:lla tätä RGD motiivia ei ole, joten sen epäillään käyttävän jotain toista reseptoria päästäkseen solun sisälle. (Al-Sunaidi ja muut 2007) Tämä voi vaikuttaa HPeV3:n isäntäsolumieltymyksiin, mikä taas selittää, miksi HPeV3 infektioilla on erilainen epidemiologia ja kliiniset oireet kuin muilla HPeV genotyypeillä. (Benschop, K. ja muut 2008) Toisaalta joiltain muiltakin yksittäisiltä HPeV 1, 5 varianteilta ja

tunnetuilta HPeV 7, 8, 10, 11, 13-15 kannoilta puuttuu myös RGD motiivi. (Olijve ja muut 2018)

Sitoutuminen integriiniin tekee viruksen proteiiniuoresta epävakaa ja aloittaa viruksen genomien vapauttamisen solulimaan. Viruksen päästyä solulimaan 5'UTR:llä sijaitseva sisäinen ribosomin sitoutumiskohta IRES ohjaa ribosomin sitoutumista lähelle aloituskohdan kodonia. (Nateri ja muut 2000) Tämän jälkeen tuotetaan viruksen polyproteiini. Tämän polyproteiinin pilkkoutuminen tapahtuu kolmevaiheisesti ja alkaa polyproteiinin jakautumisella kolmeen P1-, P2-, ja P3-proteiiniin. 2A^{pro} ja 3C^{pro} proteaasit pilkkovat nämä kolme välivaiheen proteiineiksi ja lopullisiksi virusproteiineiksi. 2A^{pro} katkaisee polyproteiinin P1 ja P2 alueiden välistä, kun 3C^{pro} leikkaa P2 ja P3 proteiinit toisistaan. Tämän lisäksi 3C^{pro} pilkkoo myös pintaproteiinit sekä useita välivaiheproteiineja lopullisiksi virusproteiineiksi. Tätä havainnollistetaan kuvalla 2. Kaikkiaan parechoviruksen polypeptidistä pilkotaan 3 pintaproteiinia ja 7 ei-rakenteellista proteiinia, jotka ovat tärkeitä viruksen elinkierrossa ja isäntäsolun hallitsemisessa. (van der Linden ja muut 2015) Esimerkiksi 3D on RNA riippuvainen RNA polymeraasi, joka kopioi viruksen genomien replikaation aikana. 3D:n replikoima HPeV genomi pakataan etukäteen rakennettuun prokapsidiin. Viruksen elinkierto tulee loppuunsa, kun virusproteiinit aloittavat vesikkelien muodostumisen ja tehostavat solukalvon läpäisevyyttä. Tämä johtaa solun hajoamiseen, mikä vapauttaa virukset. (Stanway ja Hyypiä 1999) Tätä viruksen elinkaarta havainnollistetaan kuvalla 3.

6-8 tunnin jälkeen HPeV1 on käynyt läpi koko elinkiertonsa ja suurimmat muutokset infektoitussa solussa ovat ribosomien häviäminen endoplasmiselta kalvostolta (ER), ER:n laajentuminen ja Golgin laitteen hajoaminen. (Krogerus ja muut 2003) Toisin kuin useat picornavirukset, HPeV:t eivät sammuta isäntäsolun omaa proteiinisynteesiä. Tämä luultavasti johtuu siitä, ettei sen 2A proteiinilla ole sellaista proteaasi aktiivisuutta, joka estäisi normaalin solun cap-riippuvaisen translaation. (Samuilova ja muut 2004)



Kuva 3: HPeVn elinkierto. HPeV pääsee isäntäsoluunsa endosytoosin avulla. Viruksen sitoutuminen reseptoriinsa saa kapsidin hajoamaan, jolloin yksinauhainen RNA vapautuu. Tästä RNA:sta tuotetaan yksittäinen polyproteiini, josta muokataan kaikki viruksen tarvitsemat proteiinit. Viruksen genomi replikoidaan negatiivisuuntaisen RNA:n kautta ja pakataan valmiiksi rakennetun prokapsidin sisälle ennen isäntäsolun hajoamista ja virusten vapautumista.

2.1.3 Parechovirusinfektion taudinkuva ja levinneisyys

Useimmiten parechovirusinfektio jää oireettomaksi. Lähes kaikilla aikuisilla löytyy verestä vasta-aineita HPeV1:lle, mikä kertoo aikaisemmasta HPeV infektiosta, joko oireisesta tai oireettomasta. Pääsääntöisesti nämä vasta-aineet pysyvät verenkierrossa koko iän. Eri genotyyppien vasta-aine positiivisuus populaatiossa vaihtelevat alueiden välillä, sen mukaan kuinka paljon kyseistä virusta esiintyy. Esimerkiksi HPeV3 vasta-aine positiivisuus aikuisissa on Tanskassa 10 % ja Japanissa 73 %, mikä todennäköisesti heikentää vastasyntyneen äidiltään saamaa suojaa HPeV3 infektoita vastaan verrattuna HPeV1 infektoihin. Japanissa napanuorasta otetun verinäytteen vasta-aine positiivisuus HPeV3:aa kohtaan oli huomattavasti alhaisempi kuin HPeV1:stä kohtaan. Tämän lisäksi vakavasta HPeV3 infektiosta kärsivien vastasyntyneiden kohdennettu vasta-ainemäärä oli alhainen taudin alussa, mutta nousivat infektion edetessä. Tämä kertoo neutraloivien vasta-aineiden tärkeydestä, kun taistellaan HPeV3 infektiota vastaan. (Aizawa ja muut 2015)

Tautia aiheuttavia parechovirusinfektioita esiintyy usein vain alle kuusivuotiailla lapsilla, jotka tällöin kärsivät yleensä vatsataudista tai hengitystieinfektiosta. HPeV1 on vastuussa suurimmasta osasta infektioita, jonka lisäksi myös HPeV3, 4 ja 6 ovat aiheuttaneet sairauksia. Alle 6 kuukauden ikäisillä lapsilla HPeV3 ja HPeV4 voivat aiheuttaa vakavampi oireita aivokalvontulehduksesta vakavaan yleisinfektioon. Vanhemmat lapset kärsivät useammin vatsaoireista ja, mitä nuoremasta vauvasta on kyse, sitä enemmän todetaan hengitystie- ja hermosto-oireita. (Chieochansin ja muut 2011) Ennenaikaisesti syntyneiden lasten on todettu olevan herkempiä vaarallisille HPeV3 infektioille. (Olijve ja muut 2018) Vuonna 2017 havaittiin ensimmäinen aikuinen potilas, joka kärsi HPeV:n aiheuttamasta aivokalvontulehduksesta ja menehtyi sen aiheuttamiin ongelmiin. Näytteen vähäisyyden vuoksi HPeV:tä ei tutkimuksessa pystytty tyypittämään. (Chimunda ja muut 2018) HPeV6 infektoi useammin yli vuoden ikäisiä ja aiheuttaa vatsaoireita, mutta voi pahimmillaan johtaa myös keskushermostoinfektioon ja verenmyrkytyksen kaltaiseen tilaan. (Chieochansin ja muut 2011)

Vatsatauti on yleisin HPeV infektion aiheuttama tauti. Lähes kaikkien HPeV genotyyppien on todettu aiheuttavan sitä, mutta HPeV1 on todettu yleisimmäksi HPeV4 ja 6 lisäksi. HPeV:n aiheuttamaan vatsatautiin liittyy usein kuumeilua, oksentelua ja ripuli. Nämä johtavat pahimmillaan nestehukkaan ja sairaalahoitoon. (Yip ja muut 2014)

Hengitystieinfektioita kuten keuhkokuumetta aiheuttavat suurimmaksi osaksi HPeV1, 3 ja 6 genotyypit. HPeV voidaan havaita sekä ylä- että alahengitysteissä ja se aiheuttaa oireita kuten yskää ja äkillistä hengenahdistusta vaihtelevasti. (Sharp ja muut 2012) Tämän lisäksi potilailla, joiden ulostenäyte on HPeV positiivinen, on todettu olevan hengitystieoireita kuten yskää, hengityksen pihinää ja tukkoisuutta. (Pham ja muut 2011)

Suurin osa vakavista HPeV infektioista oli HPeV3:n aiheuttamia, mutta joitakin yksittäisiä muiden genotyyppien aiheuttamia tapauksia on havaittu, kuten Suomessa 2012 löydetty neljä HPeV4 tapaus. (Kolehmainen ja muut 2014) HPeV aiheuttaa vakavia infektioita suurimmaksi osaksi alle puolivuotiaille vastasyntyneille, jotka tällöin kärsivät sepsiksen kaltaisesta tilasta ja keskushermostotulehduksista. Monet näistä tapauksista voidaan tunnistaa kuumeen, kiukkuisuuden ja ihottuman kautta sekä muiden sepsiksen

oireiden perusteella. Oireet muistuttavat enterovirusinfektion aiheuttamia oireita. (Selvarangan ja muut 2011; Khatami ja muut 2015)

Pahimmillaan nämä vakavat infektiot voivat aiheuttaa keskushermostotulehduksen. HPeV:t ovat toiseksi yleisin aivokalvontulehduksen aiheuttaja Amerikassa ja Australiassa heti enteroviruksen jälkeen. (Leber ja muut 2016; Britton, Philip ja muut 2016) Kouristukset ovat yleisiä oireita HPeV:n infektoidessa keskushermostoa, mutta myös ihottuma on yleistä. Infektio aiheuttaa myös muutoksia aivojen valkoisessa aineessa ja kallonsisäistä verenvuotoa erityisesti etuajassa syntyneillä vastasyntyneillä. Valkoisen aineen muutokset voi aiheuttaa pitkäaikaisia ongelmia kuten kehityksen hidastumista ja kehityshäiriöitä. (Britton, Philip Neil ja muut 2016) HPeV infektio keskushermostossa voi myös aiheuttaa äkillisen velttohalvauksen. Sen on myös todettu liittyvän ADEM:n eli äkillisen hajapesäkkeisen keskushermoston tulehduksen kehittymiseen. (Verboon-Maciolek ja muut 2008; Kurz ja muut 2015)

HPeV infektiot ovat yleisiä koko maailmassa. HPeV1 vaikuttaa hallitsevalta genotyypiltä yksittäistä tutkimusta lukuun ottamatta, joiden mukaan HPeV15 löytyi suurimmasta osasta potilaita Pakistanissa. Vallitseva HPeV tyyppi vaihtelee vuodenajan ja tutkittavien määrän vuoksi. (Olijve ja muut 2018), (Alam ja muut 2013)

HPeV infektioiden esiintyvyys pitkin vuotta vaihtelee genotyypin mukaan. Esimerkiksi HPeV1 tartuntoja ilmenee ympäri vuoden, mutta ne yleistyvät kesällä tai syksyllä, riippuen missä tutkimus on tehty. Suomessa HPeV infektoita esiintyy selkeästi eniten syksyllä (Tauriainen ja muut 2007; Kolehmainen ja muut 2012) Sen sijaan HPeV3 infektoita puhkeaa runsaammin usein joka toinen vuosi, parillisina vuosina. On arveltu tämän liittyvän virusten muuntautumiseen esim. rekombinaation avulla, mutta tätä ei ole vahvistettu. Voimakkaina HPeV3 vuosina erityisesti kesä- ja syyskaudella havaitaan paljon infektoita. (van der Sanden, S. M. G. ja muut 2013)

HPeV infektio leviää tehokkaasti lasten keskuudessa. Erityisesti alle kaksivuotiaiden on todettu tartuttavan tautia, sillä eräässä tutkimuksessa on todettu, että riski saada vakava HPeV3 infektio on 11 kertainen, jos perheessä on alle 2 vuotias lapsi. (Nielsen ja muut 2016) HPeV tarttuu sekä oireettomista että oireilevista kantajista ulosteen välityksellä, sillä virusten määrä on usein samankaltainen kummallakin kantajalla.

Tartunnan saanut potilas erittää viruksia ulosteeseensa yli 50 päivää. (Kolehmainen ja muut 2012), (Tapia ja muut 2008) HPeV voi tarttua myös hengitysteiden välityksellä, mutta tätä on tutkittu vähemmän. Viruksia erittyy hengitysteiden kautta kahdesta kolmeen viikkoa tartunnan jälkeen. (Sharp ja muut 2012)

2.2 Immunitaetti

Ihmisen immunitaetti jakautuu synnynnäiseen eli luontaiseen immunitaettiin ja hankittuun eli adaptatiiviseen immunitaettiin. Synnynnäinen immunitaetti aktivoituu nopeasti virusinfektion tapahtuessa. Synnynnäinen immunitaetti toimii ensisijaisesti kehon luontaisten esteiden kautta kuten ihon, veri-aivoesteen, limakalvojen sekä niiden eritteiden ja värekarvojen kautta. Tämän lisäksi joidenkin elinten kuten mahan matala pH, entsyymit, detergentit ja kehon normaali mikrobisto toimivat osana synnynnäisen immunitaetin yleispuolustusta. Synnynnäinen immunitaetti puolustaa kehoa myös syöjäsolujen eli fagosyyttien toiminnan kautta, kun nämä nielevät elimistön taudinaiheuttajia ja tuhoavat ne. Fagosytit jakautuvat monosyytteihin ja granulositytteihin ja kulkeutuvat veren välityksellä tulehduspaikalle, jonne niitä houkuttelevat kemokiinit. Kemokiinit ovat proteiineja, joita synnynnäinen immunitaetti tuottaa komplementin avulla. Komplementti on signaalintijärjestelmä, joka aktivoituttuaan voimistuu, sillä sen proteiinit kykenevät aktivoimaan monia reitin seuraavan vaiheen proteiineja. (Hänninen 2011) Tätä komplementtijärjestelmää aktivoivat sytokiinit, joita synnynnäinen immunitaetti tuottaa tunnistessaan virushyökkäyksen. Nämä interferoni ja tulehdusta voimistavat sytokiinit aktivoivat myös dendriittisoluja ja magrofageja sekä houkuttelevat tulehdusalueelle NK-soluja eli luonnollisia tappajasoluja. (Dotzauer ja Kraemer 2012)

Mikäli synnynnäinen immunitaetti ei riitä viruksen tuhoamiseen hankittu immunitaetti käynnistyy. Tämä tapahtuu Th-solujen eli auttaja-T-solujen avulla. Hankittu immunitaetti toimii lymfosyyttien ja vasta-aineiden avulla. Vasta-aineen on tunnistettava spesifinen mikrobi, mikä tekee hankitun immunitaetin alkamisesta huomattavasti hitaampaa. (Whitton ja muut 2010)

Virusinfektio voi laukaista voimakkaan tulehdusreaktion, mikä saa tulehduspaikan solut tuottamaan runsaasti akuutin vaiheen proteiineja kuten interleukiineja. Nämä aktivoivat muita synnynnäisen immunitetin sytokiinien tuotantoa ja estävät joidenkin proteiinien valmistuksen. Akuutin vaiheen proteiineja tuotetaan muissakin elimissä. Esimerkiksi maksassa käynnistyy CRP proteiinin tuotto, jolloin sen määrä veressä saattaa kasvaa jopa tuhatkertaiseksi. CRP on vastuussa komplementin klassisen reaktiotien aktivoinnista, minkä se tekee sitoutumalla kudossaurion vapauttamiin nukleotideihin ja solukalvolipideihin. C3 taas on proteiini, joka kiinnittyy mikrobien pintaan ja näin aktivoi leukosyytit, jolloin ne alkavat fagosytoimaan. (Hänninen 2011)

Aiemmin mainitut sytokiinit välittävät viestejä kehon eri solujen välillä eli ne toimivat välittäjäaineina. Tämä viestinvälitys voi toimia autokriinisesti, jolloin solu aktivoi itsensä, parakriinisesti, jolloin solu viestii lähellään oleville soluille, tai endokriinisesti, jolloin verenkierto välittää sytokiinit eri kudoksessa olevalle kohdesolulle. Sytokiineja on lähes kaksisataa ja niillä on monipuolisia tehtäviä kehon säätelyssä sekä erityisesti immuunipuolustuksen aktivoinnissa. Sytokiinit säätelevät esimerkiksi valkosolujen erilaistumista ja toimivat linkkinä synnynnäisen ja hankitun immunitetin välillä. Sytokiinit voidaan lajitella muutamaa luokkaan niiden toiminnan ja merkityksen perusteella. (Meri Seppo ja Julkunen Ilkka 2011)

Aiemmin mainitut kemokiinit eli soluja houkuttelevat kemotaktiset sytokiinit ovat yksi näistä luokista. Ne houkuttelevat valkosoluja tulehduspaikalle kudoksiin. Jokainen valkosolutyyppi ilmentää tietylle kemokiinille spesifisiä reseptoreja pinnallaan, jotka sitoessaan ligandinsa aktivoivat solun muuttamaan morfologiaansa hyvin nopeasti. Tämä muutos mahdollistaa solun tunkeutumisen verisuonen läpi kudokseen ja suoraan tulehdusalueelle. (Meri Seppo ja Julkunen Ilkka 2011)

Interleukiinit ovat toinen sytokiiniiryhmä, joiden merkitys korostuu erityisesti tulehdusreaktion alkuvaiheessa. Ne saattavat olla tulehdusta voimistavia eli tulehdusta voimistavia sytokiineja kuten IL-6 ja IL-8 tai tulehdusreaktiota hillitseviä eli anti-inflammatorisia sytokiineja kuten IL-4 ja IL-10. Tulehdusta voimistavat sytokiinit aktivoivat immuunipuolustuksen soluja esimerkiksi tuottamaan lisää kemokiineja ja tulehdusta voimistavia sytokiineja. Tulehdusreaktiota hillitsevät sytokiinit pyrkivät

estämään tulehdusta aiheuttamasta kudostuhoa. Ne vähentävät kohdesolujensa sytokiinituotantoa ja voivat estää tulehdusta voimistavien sytokiinien sitoutumisen reseptoreihinsa sitoutumalla niihin itse tai sitoutumalla suoraan sytokiiniin. (Meri Seppo ja Julkunen Ilkka 2011)

Näiden lisäksi interferonit, jotka ovat yksi sytokiiniiryhmä, osallistuvat immuunipuolustukseen varoittamalla virusinfektiosta ja tehostamalla solujen puolustusta. Interferoneja on kolmea tyyppiä; tyyppi I, tyyppi II ja tyyppi III. Interferonit voimistavat antiviraalisten molekyylien tuottoa, estävät solujen kasvua ja jakautumista sekä lisäävät syöjäsolujen aktiivisuutta. Näin virusten lisääntyminen vähenee tai estyy jopa kokonaan. (Meri Seppo ja Julkunen Ilkka 2011)

Näiden lisäksi on olemassa Th1- ja Th2-sytokiineja, jotka ohjaavat hankittua immunitettä. Th1-sytokiinit kuten IL-2 ja IL-12 vahvistavat soluvälitteistä immunitettä olemalla T- ja NK-solujen kasvutekijöitä ja osallistumalla Th1-solujen erilaistumiseen. Th2-sytokiinit taas vahvistavat vasta-ainevälitteisen immuunipuolustuksen toimintaa esimerkiksi IL-5 kautta, joka osallistuu Eosinofiilien kasvuun ja aktivointiin. Myös IL-10, joka toimii tulehdusta vastustavana sytokiininä hillitsemällä Th1-sytokiinien vaikutusta. (Meri Seppo ja Julkunen Ilkka 2011)

Sytokiinit toimivat usein myös kasvutekijöinä ja ovat siten elintärkeitä esimerkiksi valkosolujen erilaistumiselle ja lisääntymiselle. Kasvutekijäsytokiinit kuten IL-3 ja IL-9 tehostavat kantasolujen kasvua ja erilaistumista luuytimessä sekä erytropoietiini (epo) säätelee punasolujen valmistusta. Tästä syystä useita sytokiineja käytetään lääkeaineina. Esimerkiksi tämän erytropoietiinin avulla voidaan hoitaa punasoluanemiaa, sillä se tehostaa punasolujen muodostumista. (Meri Seppo ja Julkunen Ilkka 2011)

2.2.1 Parechovirusinfektio ja immuunipuollustus

Synnyynnäinen immunitetti vastaa siis nopeasti spesifisiin viruskomponentteihin tuottamalla sytokiineja. Tätä synnyynnäisen immunitetin vastetta säädellään Toll:n kaltaisilla kalvoproteiineilla (TLR). TLR7 ja TLR8 reseptorit isäntäsolussa havaitsevat viruksen, joka on päässyt solun sisään. Näitä TLR-proteiineja on runsaasti endosomien

sisäpinnalla, jossa ne voivat tunnistaa viruksen yksinauhaisen RNA:n ja aktivoida sytokiineja, jotka säätelevät ja voimistavat tulehdusta. Muun muassa HPeV:n tapauksessa ne tekevät tämän MyD88 sopeutusproteiinin kautta, joka stimuloi NF-KB:n ilmenemistä. NF-KB sitoutuu yhdessä muutaman muun sytokiinin kanssa tyyppin I IFN:n promoottorialueelle, mikä johtaa tulehdusta voimistavien sytokiinien tuottoon. (Triantafilou ja muut 2005) Tämän TLR aktivaation on ehdotettu liittyvän vastasyntyneiden hermostovammoihin HPeV:n infektoidessa keskushermostoa, sillä se saa aikaan axonien kasvua ja neronien apoptoosia eli hallittua solukuolemaa. (Hiscott 2007)

Hankitun immunitetin vasta-aineiden on todettu usein kohdistuvat HPeV:n VP1 alueen RGD motiiviin. Tämän lisäksi HPeV:n VP0 proteiinista on löydetty toinenkin alue, jonka vasta-aineet tunnistavat. (Joki-Korpela ja muut 2000) Yhden tutkimuksen mukaan kaikissa rakenneproteiineissa on immunogeenisiä epitooppeja eli antigeenisia alueita. (Annu Alho ja muut 2003) Ihmisen soluja apuna käyttäen on pystytty tuottamaan kahta HPeV1:lle spesifistä vasta-ainetta, AM18 ja AM28. AM18 tunnistaa RGD alueen ja tuhoaa viruksen aggregoimalla sen ja estämällä integriinejä sitoutumasta sen pintaproteiineihin. AM28 sen sijaan estää RNA:n vapautumisen viruksen sisältä tunnistamalla kapsidiepitoopin, joka muodostuu VP0 ja VP3 alueen silmukoista. (Shakeel ja muut 2015)

2.2.2 Tutkimuksessa havaitut sytokiinit

IL-6 eli interleukiini 6 toimii tulehdusta voimistavana sytokiininä. Sitä tuotetaan infektion ja kudosaaurion aikana. Lisäksi se tehostaa immuunipuolustuksen akuutin faasin vasteita, verisolujen erilaistumista eli hematopoiesia ja immuunireaktioita. Sitä säädellään translaation ja transkription jälkeisten muokkausten kautta ja näiden pettäessä IL-6 liittyy kroonisiin tulehduksiin ja autoimmuunisairauksiin. (Tanaka ja muut 2014)

Interleukiini 8 (IL-8), joka tunnetaan myös nimellä CXCL-8, on sytokiini, joka houkuttelee luokseen neutrofiileja ja aktivoi niitä. Monet kudokset ja makrofagit erittävät sitä. Sitä säädelään transkription avulla repression ja aktivaation kautta. (Bickel 1993)

CXCL12 on integriiniperheen alfa-kemokiini. Se toimii kemokiini reseptori 4:n ligandina ja liittyy moniin solutoimintoihin kuten tulehdusreaktioon, hematopoieesiin ja sikiön kehittymiseen. Tämän vuoksi CXCL12 aktiivisuus on tiukasti säädeltyä esimerkiksi lähetti RNA:n erilaisilla silmukoinneilla ja translaationjälkeisten muokkausten avulla. (Okuyama ja muut 2018)

CCL2 kuuluu C-C perheen kemokiineihin, joka houkuttelee luokseen monosyyttejä ja basofiileja. Sitä erittävät esimerkiksi monosyytit, astrozyytit ja jotkin syöpäsolut. Sillä on merkittävä rooli monissa immuunisairauksissa, joihin liittyy monosyyttien tunkeutumista kuten psoriaasikseen. (O'Connor ja muut 2015)

CCL5 C-C kemokiini ligandi, jota tuottavat esimerkiksi T lymfosyytit, makrofagit ja tietyt syöpäsolut. Se liittyy erityyppisten leukosyyttien kuten T solujen, eosinofiilien ja makrofagien kutsumiseen tulehdusalueelle. CCL5 myös indusoi tiettyjen luontaisten tappajasolujen aktivoinnin ja erilaistumisen, jotta ne tuottavat C-C kemokiineilla aktivoitavia tappajasoluja. (Aldinucci ja Colombatti 2014)

Magrofaakioen migraation inhibiittoriproteiini MIF on cytokiini, jota monet kehon solut kuten hermosolut erittävät. Se liittyy useisiin biologisiin prosesseihin kuten solujen houkutteluun, sytokiiniaktiivisuuteen, reseptorien sitomiseen ja säätelytekijänä toimimiseen. MIF:llä on tärkeä merkitys Alzheimerin taudissa ja kasvaimien kehittämiseltä puolustautumisessa. (Leyton-Jaimes ja muut 2018)

MxA eli myxovirus resistenssi proteiini 1 on interferoneihin perustuvan virusvastaisen vasteen tärkeä välittäjä monia viruksia vastaan. Sitä säädelään tiukasti tyypin I ja III interferonien kautta ja sillä on monia yhteisiä ominaisuuksia suurien GTPaasien kanssa. MxA antiviraalinen toiminta perustuu sen rakenteeseen, joka sitoutuu sille herkkien virusten pintaproteiineihin ja estää niiden replikaation. (Haller ja Kochs 2011)

GAPDH eli glyseraldehydi-3-fosfaatti dehydrogenaasi on glykolyttinen entsyymi, jota pidetään solun ylläpitokseenä ja näin ollen käytetään sisäisenä kontrollina useissa

proteiineihin, mRNA:han ja DNA:han keskittyvissä tutkimuksissa. Sillä on monipuolisia tehtäviä energiamekaniikassa ja jotkut tutkimukset viittaavat siihen, että se on yksi solukuoleman säätelijä. GAPDH:ta säädellään tiukasti transkription ja translaation jälkeisten muokkauksien kautta. (Zhang ja muut 2015) GAPDH:ta käytettiin työssä kontrollina sytokiiniin RT-qPCR analyseissä.

2.3 Keskushermoston solut ja infektio

Aivot rakentuvat pääasiallisesti neuroneista ja gliasoluista. Gliasolut jaetaan seuraaviin alaluokkiin: astrosyytti-, oligodendrosyytti- ja microglia soluihin. Neuronit vastaavat kognitiivisista kyvyistä ja gliasolut tiedonvälityksestä. Astrosyytit tukevat muita hermosoluja sekä aivo-veriastian endoteelisoluja sekä ohjaa neuronien ja axonien kasvua aivojen kehityksen aikana. Oligodendrosyytit kiertyvät axonien ja hermosolujen ympärille eristäen ne ympäristöstään. Mikroglia solut aktivoituvat tulehduksen tai vaurion tapahtuessa esim. sytokiiniin avulla ja toimivat kuten makrofakit syöden taudinaiheuttajia ja esitellen vasta-aineita. (McKenzie ja muut 2018)

HPeV:n, ja muiden virusten aiheuttamat keskushermostoinfektiot ovat harvinaisia, sillä normaalisti toimiva immuunipuolustus ja veri-aivoesteen fysiologinen muuri estää taudinaiheuttajia pääsemästä keskushermostoon. Silti HPeV infektio keskushermostossa voi johtaa hermovaurioon, kehityshäiriöihin ja jopa kuolemaan. Silti virus harvoin pääsee leviämään varsinaiseen aivokudokseen vaan aiheuttaa aivokalvontulehduksen infektoimalla aivoja ympäröiviä kalvoja. Tämä aktivoi synnynnäisen immunitetin tuottamaan sytokiineja kuten INF-1:stä, millä hillitään viruksen replikoitumista ja näin leviämistä, kunnes hankittu immunitetti aktivoituu. Esimerkiksi vahingoittuneet hermosolut alkavat tuottaa INF- γ ja IL-6, mikä aktivoi lähellä olevat solut kuten astrosyytit ja mikroglia solut tuottamaan sytokiineja. (Griffin 2003)

Veri-aivoeste on kehon ensimmäinen puolustuslinja keskushermostoinfektioita vastaan. Se rakentuu hiussuonten endoteelikudoksesta, jonka endoteelisolut ovat pakkautuneet huomattavasti tiukemmin kuin muualla kehossa, sekä astrosyyttien ulokkeista. Nämä perivaskulaariset ulokkeet huolehtivat ravintoaineiden kulkeutumisesta hermosoluille,

aineenvaihdunnan tuotteiden poistumisesta sekä kemiallisen tasapainon säilymisestä. (Pawlina ja Ross 2018)

Hiussuonten endoteelien välille jää rakoja, joiden kautta esimerkiksi ravinteet ja lääkeaineet voivan kulkeutua. Veri-aivoeste säätelee aineiden kulkua tiukasti ja vain rasvaliukoiset sekä pienet molekyylit kykenevät kulkeutumaan vapaasti sen lävitse. Jotkin aineet mahtuvat kulkeutumaan endoteelisolujen väleistä niiden tiiviystä huolimatta, kun taas suuremmat molekyylit kuten sokeri läpäisevät sen kulkemalla endoteelisolujen lävitse. Tämä tapahtuu erityisten kuljetusproteiinien kautta tai vesikkelikuljetuksessa. (Jouko Savolainen ja Anne Mannila 2005)

Veri-aivoeste on ohuempi tai saattaa jopa puuttua kokonaan hormonisäätelyyn liittyvistä sirkumventikulaarisista elimistä, jotka reunustavat kolmatta ja neljättä aivokammiota sekä käpylisäkkeestä ja väliaivoista. (Pritchard & Alloway 1999). Normaalissa tilassa taudinaiheuttajat eivät kykene kulkemaan veri-aivoesteen lävitse. Kehon epänormaali tila kuten tulehdus, verenpaine, hapenpuute ja kasvaimet voivat lisätä veri-aivoesteen läpäisevyyttä. Voimakas tulehdus saattaa saada endoteelisolujen tiiviit sidokset katkeamaan tai häiritä tiukasti säädeltyä vesikkelikuljetusta solujen läpi. Tällainen häiriö antaa taudinaiheuttajille ja useille muille tekijöille mahdollisuuden kulkea vapaasti normaalisti läpäisemättömän esteen läpi keskushermostoon. (de Vries ja muut 1997; Stamatovic ja muut 2008)

Alun perin ajateltiin, että veri-aivoesteen kehitys olisi vastasyntyneellä vielä kesken, jolloin sen endoteelikudoksen läpäisevyys olisi suurempi. Tämä selittäisi alle puolivuotiaiden herkkyyden vakaville keskushermostoinfektioille, joita HPeV:kin aiheuttaa. Nyttemmin on kuitenkin todettu, että vastasyntyneiden aivo-verieste saattaa olla jopa tiiviimpi kuin aikuisilla. Vaikuttaa siltä, että veri-aivoesteen endoteelikudoksen tiiviit sidokset ja tiukasti säädellyt kuljetusmekanismit kehittyvät jo varhaisessa sikiövaiheessa. (Saunders ja muut 2012)

Aivo-veriesteen astrosyyteillä on tärkeä rooli immuunipuolustuksen tiedottamisessa keskushermoston infektoituessa. (Choi ym. 2014). Tämä tapahtuu sytokiinien välityksellä, joita erittävät myös keskushermoston makrofagit, aivojen endoteelisolut sekä mikrogliaisolut. (de Vries ja muut 1997) Tämän lisäksi myös neuronit saattavat

tuottaa IL-6:sta tietyissä tilanteissa. Tämä IL-6 säätelee hermosolujen ja synapsien toimintaa. (Gruol 2015) Näiden lisäksi keskushermostossa tuotetaan MCP-1 eli CCL2:sta, joka liittyy keskushermostoinfektioihin, jotka aiheuttavat aivojen rappeutumista. (Gerard ja Rollins 2001) Sitä tuotetaan astrosyyteissä, neuroneissa ja migroglia soluissa pääasiassa aivokuoressa ja hypotalamuksessa. Astrosyytit, migroglia solut ja aikuisten neuronit tuottavat myös CXCL12:sta. (Banisadr ja muut 2003) Mikäli sitä koodaava geeni on vahingoittunut pikkuaivot ja hippocampus eivät kehity normaalisti. Tämä viittaa siihen, että CXCL12:sta on merkittävä tekijä neurogeneesissä eli hermojen kasvussa. (Zou ja muut 1998; Lu ja muut 2002)

2.4 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksessa selvitetään, miten eri HPeV virusvariantit vaikuttavat astrozytti- ja keuhkoepiteelisolujen sytokiini tuotantoon. Tarkoituksena on verrata toisiinsa HPeV4 kantoja, joista toinen on eristetty vakavasta keskushermostoinfektiosta kärsineeltä lapselta ja toinen lieväoireiselta lapselta, ja selvittää voiko solujen sytokiini tuotannolla olla kytkös virusten taudinaiheuttamiskykyyn. Tämän lisäksi näitä verrataan HPeV1, vakavan sairauden aiheuttaneeseen HPeV3:seen sekä enterovirus B tyyppin CVB3 virukseen.

- Selvittää keuhkoepiteelisolujen ja astrozyttisolujen sytokiini tuotannon muutoksia HPeV infektion aikana.
- Vertailla eri HPeV tyyppien ja alatyypin aiheuttaman infektion vaikutusta solujen sytokiini tuotantoon.
- Vertailla keuhkoepiteelisolujen ja astrozyttisolujen sytokiini tuotantoa ja sen muutoksia HPeV infektion aikana.
- Löytää mahdollinen tulehdusmarkkeri, joka kertoo HPeV:n taudinaiheuttamiskyvystä

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Solulinjat

Varsinaisissa tutkimuksissa käytettiin kahta ihmisen syöpäsolulinjaa: hermoperäisiä astrozyyttejä (T98G) ja keuhkoepiteelisoluja (A549). T98G solulinjaa ylläpidettiin RPMI 1640 kasvatusliemessä, johon oli lisätty 10 % vasikan sikiön seerumia (Fetal bovine serum FBS), l-glutamiini (10 µl/ml) sekä gentamysiiniä (10 µg/ml). A549 keuhkoepiteelisoluja kasvatettiin DMEM-kasvatusliemessä, johon oli lisätty 10% FBS:ää, l-glutamiinia ja gentamysiiniä. FBS:n määrää vaihdettiin kokeiden sitä vaatiessa, mutta solulinjoja kasvatettiin aina + 37 °C lämpötilan ja 5 % hiilidioksidipitoisuuden säilyttävässä inkubaattorissa.

Taulukko 1: Tutkimuksessa käytetyt solulinjat

Nimi	Eliö	Kudos	Tyyppi	Tauti	Mediumi
A549	Ihminen	Keuhko	Epiteeli	Karsinooma	DMEM
T98G	Ihminen	Aivo	Fibroblasti/ Astrosyytti	Glioblastooma multiformi	RPMI 1640

solumäärät optimoitiin tulosten vertailukelpoisuuden parantamiseksi ja tarvittavan viruslaimennoksen laskemiseksi. Solumaton tuli olla konfluentti, eli täyttää kasvualusta tasaisesti, yhden tai kolmen vuorokauden kuluttua solujen jakamisesta. Solumäärän optimointi tehtiin sekä 24-kuoppalevyille, että 96-kuoppalevyille. Kuoppiin lisättiin eri solumääriä kolmen rinnakkaisen sarjoissa 30 000 – 225 000 väliltä. Solujen annettiin kiinnittyä kuoppien pohjaan ja mikroskoipoitiin, jotta saatiin selville solujen määrä konfluentissa kuopassa. Kuopat mikroskoipoitiin uudelleen vuorokauden ja kolmen vuorokauden kuluttua, jolloin saatiin selville tasaisimman ja konfluenteimman solumaton aikaansaanut solumäärä. Tämän perusteella valittiin taulukossa 2 näkyvät solumäärät.

Taulukko 2: Tarvittavat solumäärät konfluenttiin kasvuston aikaansaamiseksi yhden tai kolmen vuorokauden kulutta kasvatuksen aloittamisesta.

Solulinja	24-levy jaettu*	24-levy konfluentti	96-levy jaettu**	96-levy konfluentti
A549	210 000	400 000	65 000	100 000
T98G	225 000	352 000	50 000	100 000

* 24-kuoppalevyille pipetoitava määrä soluja, jotta saavuttavat konfluentin kasvun 3 vrk:n kuluttua

** 96-kuoppalevyille pipetoitava määrä soluja, jotta saavuttavat konfluentin kasvun 1 vrk:n kuluttua

3.2 Virukset

Tutkimuksessa soluja infektoitiin useilla ihmisen parechovirusilla sekä CV-B3 coxsacievirusella, jota käytettiin vertailukohtana. Virusten tiedot on koottu taulukkoon 3. HPeV1-Harris on laboratorio-olosuhteisiin sopeutunut kanta, joka löydettiin 1956. HPeV3 virusisolaatti oli eristetty vakavasta yleisinfektiosta kärsineestä lapsesta Hollannissa. Myös HPeV4-NL, on eristetty Hollannissa, mutta vain lievästi sairastuneelta lapselta. HPeV4-FI virusisolaatti on eristetty vuonna 2012 alle kahden kuukauden ikäiseltä pääkaupunkiseutulaiselta lapselta, joka kärsi vakavasta yleisinfektiosta. Tutkimuksessa käytettiin puhdistettuja viruskantoja. Kaikkien virusten koko genomi on selvitetty ja ne löytyvät geenibankista (GenBank, NCBI).

Taulukko 3: Tutkimuksessa käytetyt viruskannat.

Kanta	Genotyyppi	Maa	Vuosi	Lyhenne	Taudin vakavuus
Harris	HPeV1	USA	1956	HPeV1-Harris	Lievä
152037	HPeV3	Hollanti	2001	HPeV3	Vakava
K251176-02	HPeV4	Hollanti	2002	HPeV4-NL	Lievä
FI12236	HPeV4	Suomi	2012	HPeV4-FI	Vakava
Nancy	CV-B3	USA	1949	CV-B3	ei tietoa

3.3 Solujen infektiokokeet

Kokeet tehtiin tasapohjaisilla ja päällystämättömillä 24-kuoppalevyillä. Aikaisemmissa testeissä sopiviksi todetut määrät soluja lisättiin kuoppiin. Solujen annettiin kiinnittyä kasvatusalustaan joko yön yli tai 3 vrk (+37 °C, 5% CO₂).

Solut infektoitiin lisäämällä virusta sen veran, että kutakin solua kohden oli viisi infektiivistä virusta (MOI 5). Käytettiin kasvatusliuosta, joka sisälsi 2 % FBS:ää normaalin 10 % sijaan, sillä solujen ei haluttu enää kasvavan. Virusten annettiin kiinnittyä soluihin (+37 °C, 5 % CO₂), minkä jälkeen kasvatusliuos vaihdettiin, jolloin päästiin eroon kiinnittymättömistä viruksista. Infektoimattomille kontrollisoluille lisättiin virussuspension sijaan pelkkää kasvatusliuosta (2% FBS). Infektioiden etenemistä seurattiin mikroskopoimalla soluja. Viruksen kasvun voi havaita virusten aikaansaaman sytopaattisen efektin perusteella, eli solut pyöristyvät vähitellen ja kuolevat, jolloin ne irtoavat kuoppien pohjalta. Infektioiden annettiin edetä ja näytteitä kerättiin 6 h, 24 h, 48 h ja 72 h kuluttua infektiosta. Kasvatusliemet otettiin talteen ja osasta kuopista irrotettiin solut manuaalisesti raaputtamalla. Näytteet pakastettiin -70°C jatkotutkimuksia varten. Toisten kuoppien solut kiinnitettiin pohjiin 4 %:lla formaldehydillä. Positiivisena vertailukohtana soluihin transformoitiin poly-IC yksinaihaista RNA:ta lipofektamiini 2000 reagenssin avulla valmistajan ohjeiden mukaan. (Liite 1) Tästä kerättiin näytteet samaan tapaan mutta vain 6h ja 24h kuluttua transformoinnista.

3.4 Sytokiinimääritykset

Proteome Profiler: Kerätystä kasvatusliuoksesta mitattiin infektion aikana solujen erittämät sytokiinit Proteome Profiler™ -kitillä (R&D Systems) sen ohjeita noudattaen. (Liite 2) Proteome Profiler™ testi tehtiin tuoreista pakastamattomista näytteistä. Kitin nitroselluloosamembraani ja siihen kiinnitetyt sytokiinikohtaiset vasta-aineet peitettiin näyteliuksella, joka koostui puskuri 4:stä (500 µl), puskuri 5:stä (500 µl),

kasvatuslieminäytteestä (500 µl) ja biotinoloiduista vasta-aineista (15 µl). Membraania inkuboiitiin keinuttelussa yön yli (+4 °C), jonka jälkeen näyteliuos pestiin pois, jotta sitoutumattomat vasta-aineet poistuisivat. Membraaniin kiinnittyneet sytokiinit havainnoitiin niihin sitoutuneilla biotinoloiduilla vasta-aineilla streptavidin-HRP:N ja kemiluminesenssin avulla. Tämän havaitsemiseen käytettiin Odysseyn Li-Cor -laitetta, jonka antamia kuvia analysoitiin ImageStudio ja GIMP ohjelmilla.

Tämän lisäksi selvitettiin, kuinka paljon sytokiineja solut olivat tuottaneet suhteessa aikaan (6 h, 24 h, 48 h ja 72 h), joka infektiosta oli kulunut. Tätä testattiin infektoimalla A549 soluja HPeV1-Harriksella. Kuuden tunnin kuluttua infektiosta ei havaittu sytokiinituotantoa, mutta seuraavissa aikapisteissä sytokiinimäärä nousi ajan funktiona. Koska kuuden tunnin aikapisteessä ei havaittu merkittävää sytokiinituotantoa, se päätettiin hylätä.

Kvantitatiivinen sytokiini RT-PCR: Jotta sytokiineja voitiin tutkia reaaliaikaisella kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (RT-qPCR), infektiokokeissa kerätyistä solunäytteistä eristettiin RNA RNeasy Mini kitillä (Qiagen) valmistajan ohjeiden mukaan. (Liite 3) RNA pitoisuus mitattiin DS-11 spektrometrillä (Denovix) ja rinnakkaiset näytteet yhdistettiin jatkotutkimuksia varten. RNA:t kopioitiin cDNA:ksi High capacity RNA-to-cDNA kitillä (appliedbiosystems) valmistajan ohjeita noudattaen. (Liite 4) Tämän kitin primerit (oligo d(T)16) ja sekalaisia oktameereja) tulivat sen puskurin mukana. cDNA näytteet säilytettiin -20°C kunnes niillä ajettiin RT-qPCR TaqMan Gene Expression Master Mix-kittiä (appliedbiosystems) käyttäen valmistajan ohjeiden mukaan, paitsi käyttäen pienempää lopputilavuutta 20 µl:aa 50 µl:n sijaan vähentäen Master Mix:n määrää 25 µl:sta 10 µl:aan. (Liite 5) RT-qPCR ajettiin Rotor-Gene Q (Qiagen) laitteella, taulukon 4 esittämällä ohjelmalla. Testattavia sytokiineja olivat IL-6, IL-8, CXCL12, CCL2, CCL5, MIF, MxA ja kontrollina käytetty GAPDH. RT-qPCR tuloksista saadut Ct arvot normalisoitiin käyttäen $\Delta\Delta Ct$ menetelmää, sillä perinteistä standardikäyrää ei ollut saatavilla.

Taulukko 4: RT-qPCR:ssä käytetyn ohjelman vaiheet.

Vaihe	Lämpötila	Aika	Toistot
1	50 °C	2 min	1
	95 °C	10 min	
2	95 °C	15 s	40
	60 °C	1 min	
3	4 °C	∞	

Immunofluoresenssivärjäys: Solujen infektion aikana erittämiä sytokiineja tutkittiin myös immunofluoresenssivärjäyksellä (IF-värjäys), jossa käytetään hyväksi leimattuja spesifisiä vatsa-aineita. Käytetyt vasta-aineet on koottu taulukoihin 5 ja 6. Tämä aloitettiin viljelemällä A549 (65 000 s/k) ja T98G (50 000 s/k) soluja tasapohjaisella 96-kuoppalevyllä yön yli, minkä jälkeen ne infektoitiin kuten aiemmin käyttäen MOI 5 virusmäärää. Kiinnitettiin solut kuten aiemmin 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin kuluttua infektiosta. Solut käsiteltiin 0,1 %:lla Triton-X100:lla 10 min huoneenlämmössä, jotta solukalvot muuttuvat läpäisemättömäksi ja vasta-aineet pääsevät solujen sisään. Tämän jälkeen pestiin kolmesti PBS:llä ja lisättiin primäärivasta-aineet, jotka oli laimennettu PBS-puskuriin, johon oli lisätty 3 % BSA:ta. Mikäli sytokiinin tunnistava vasta-aine oli tuotettu kanissa, käytettiin viruksen havaitsemiseen hiiriessä tuotettua vasta-ainetta. Kun taas sytokiinin vasta-aineen ollessa hiiriessä tuotettua vasta-ainetta, käytettiin viruksen tunnistamiseen kanissa tuotettua vasta-ainetta. Levyjä inkuboitettiin keinutellussa 1,5 h ja pestiin kolmesti PBS:llä. Seuraavaksi lisättiin anti-kani tai anti-hiiri sekundäärivasta-aine, jotka oli laimennettu samaan BSA- PBS-puskuriin. Sekundäärivasta-ainetta inkuboitettiin levyillä 45 min ravistelussa valolta suojattuna, sillä näiden fluoresenssileima on valonarka. Tämän jälkeen kiinnittymätön sekundäärivasta-aine pestiin pois kolmesti PBS:llä ja lisättiin tumaväri (DAPI), joka oli laimennettu (1/3000) BSA-PBS-puskuriin. Inkuboitettiin 10 min ravistelussa valolta suojattuna, minkä jälkeen levyjä pestiin vielä kolmesti PBS:llä. Kolmannen pesun jälkeen kuopat tyhjennettiin ja täytettiin säilytysliuoksella (PBS) ja siirrettiin parafilmiin käärittynä ja valolta suojattuna -20 °C säilytykseen kuvantamiseen saakka. Levyt mikroskoipoitiin ja

kuvattiin Evos FL Auto Cell Imaging Systems fluoresenssimikroskoopilla (Thermo Fisher Scientific).

Taulukko 5: Sytokiineja tunnistavat vasta-aineet ja niiden kanssa käytetyt sekundäärivasta-aineet, sekä käytetyt laimennokset.

Vasta-aine	Primääri	Laimennos	Sekundääri	Laimennos
MxA	Kani	1:5000	Alexa 568 anti-kani	1:400
MIF	Kani	1:1000	Alexa 568 anti-kani	1:400
IL-6	Kani	1:200	Alexa 568 anti-kani	1:400
CXCL12	Hiiri	1:100	Alexa 568 anti-hiiri	1:400
IL-8	Hiiri	1:50	Alexa 568 anti-hiiri	1:400
CCL2	Hiiri	1:400	Alexa 568 anti-hiiri	1:400

Taulukko 6: Virusvasta-aineet, sekundäärivasta-aineet ja käytetyt laimennokset.

Vasta-aine	Tunnistus- kohta	Primääri	Laimennos	Sekundääri	Laimennos
mabJ	dsRNA*	Hiiri	1:400	Alexa 488 anti-hiiri	1:400
K316	Pinta- proteiinit	Kani	1:200	Alexa 488 anti-kani	1:400

* Kaksinauhainen RNA

3.5 Viruspitoisuuden määrittäminen

Tulosten oikeudellisuuden takaamiseksi oli tärkeää, että varmistettiin solujen infektoituminen. Tähän käytettiin kolme menetelmää: IF-värjäystä suoraan soluista, infektiivisyys titrausta (TCID₅₀) ja RT-PCR:ää levyiltä kerätyistä kasvatusliemistä. Näin varmistuttiin siitä, että virukset olivat onnistuneesti infektoineet solut.

Immunofluoresenssivärjäys suoritettiin kuten sytokiini-immunofluoresenssivärjäys, mutta ainoastaan virukseen kohdistuvia vasta-aineita käyttäen, jotka näkyvät taulukossa 6.

Immunofluoresenssivärjäyksen lisäksi infektio varmistettiin TCID50 titrauksella, johon käytettiin kerättyjä kasvatusliuosnäytteitä. Tämä tehtiin 96-kuoppalevyllä infektoiden A549-soluja (350 000 s/k) aiemmin infektoitujen solujen kasvatusliuosnäytteillä 1/10 laimennossarjalla. Koe suoritettiin lisäämällä levyille ensin 100 µl kasvatusliuosta (2 % FBS) ja sekoittamalla siihen viruslaimennos. Tämän jälkeen lisättiin solut 1:1 suhteessa (100 µl) aloittaen laimeimman kasvatusliuoslaimennoksen sisältävistä kuopista, jotta mahdollinen virusten siirtyminen olisi vähäistä. Levyjä inkuboitii 7 vuorokautta 37 °C, 5 % CO₂ mikroskopoiden levyä sytopaattisen efektin varalta 5 vuorokauden ja 7 vuorokauden kuluttua. Kun sytopaattinen efekti havaittiin, voitiin laskea viruksen TCID50 arvo, jonka perusteella saatiin selville, paljonko infektiokykyistä virusta oli näytteessä.

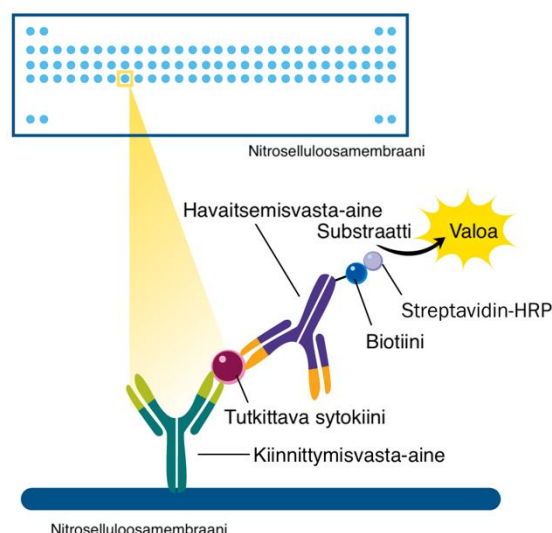
Näiden lisäksi RT-qPCR:ää käytettiin selvittämään solujen tuottamaa virusmäärä. Virus-RNA eristettiin kasvatusliuosnäytteistä Viral RNA mini spin -kitin (QIAamp) avulla valmistaja ohjeita noudattaen. (Liite 6) Tästä RNA:sta kopioitiin cDNA:ksi liitteen 7 protokollan perusteella. Reaktiota inkuboitii tunnin ajan + 42 °C. Tätä cDNA:ta käytettiin yhdessä alukkeiden (parechovirukselle HPeV-F30 ja HPeV-F31 tai enterovirukselle ENRI (3+) ja ENRI (4-), Maxima SYBR Green:n/KAPA SYBR FASR Universal Mix:n kanssa. RT-qPCR monistus tehtiin Rotor Gene PCR-laitteetta käyttäen RT-qPCR-ohjelmaa. (Liite 8)

4 Tulokset

4.1 Sytokiiniprofilin testaus Proteome Profilerilla

Tutkimuksessa selvitettiin, mitä sytokiineja solut tuottavat parechovirusinfektion seurauksena ja miten eri virusvarianttien indusoimat sytokiinituotannot eroavat toisistaan. Lisäksi haluttiin, että toinen solulinjoista edustaisi astrosyyttisoluja, jotka olivat tutkimuksen pääkohteena. Vertailusolukkena haluttiin käyttää solulinjaa, jolta on käytetty aikaisemmissa tutkimuksissa.

Solun ulkopuolelle eritettyjä sytokiineja tutkittiin Proteome Profiler™ Human Cytokine Array –kitillä (R&D Systems), jonka perusteella valittiin, mitä sytokiineja tutkittiin tarkemmin. Proteome Profiler™-testin avulla voitiin tunnistaa 36 ihmisen eri sytokiinia ja määrittää niiden pitoisuuksien suhteet toisiinsa. Testin toiminta perustuu sytokiinispesifisiin vasta-aineisiin, jotka on kiinnitetty nitroselluloosamembraanille parittaisiksi täpliksi. Näytteen sytokiinit kiinnittyvät näihin vasta-aineisiin, minkä jälkeen ne havaitaan biotinyloidulla vasta-aineella ja Streptavidin-HRP/kemiluminesenssireaktiolla. Tätä havainnollistetaan kuvalla 4.

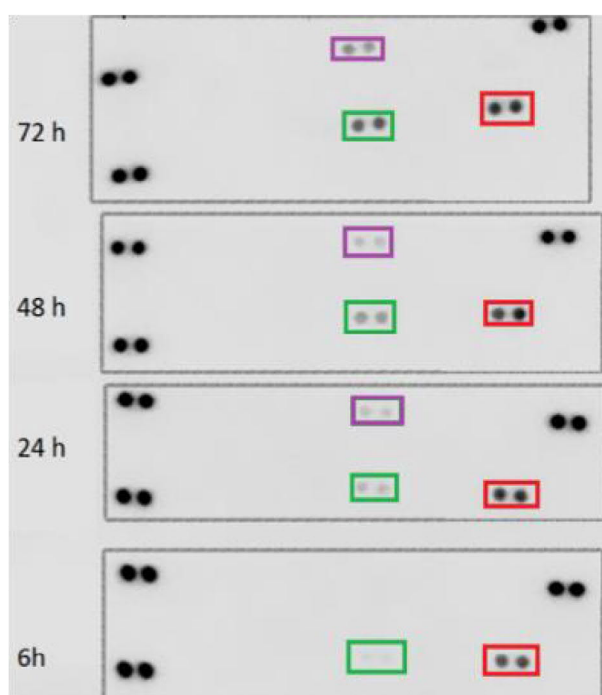


Kuva 4: Proteome Profiler menetelmän toimintaperiaate. Sytokiinit tunnistavat nitroselluloosamembraanille kiinnitetyt spesifiset vasta-aineet. Kiinnittyneet sytokiinit havaitaan biotinyloidun vasta-aineen ja Streptavidin-HRP:n avulla. Signaali saadaan kemiluminesenssina. (Kuva muokattu lähteestä www.rndsystems.com)

Tuotetut sytokiinit nähdään tummentuneina täplinä. Täplien tummuus korreloi sytokiinin määrän mukaan. Nämä kuvattiin LiCor Odyssey Fc kuvantamislaitteella. Kitin mukana tulleen viitekuvan (Liite 9) mukaan selvitettiin, mikä täplä tarkoittaa mitäkin sytokiinia. Taulukko 7 näyttää tutkimuksessa havaitut sytokiinit ja kertoo millä värillä ne on kuvissa korostettu.

Taulukko 7: Proteome Profiler tuloskuivissa käytetyt sytokiinikorostusvärit.

Sytokiini	Väri
MIF	Green
Serpin E1	Red
CXCCL1/GRO α	Purple
IL-8	Orange
MCP-1	Yellow
IL-6	Brown
CXCL12/SDF-1	Black
IL-16	Grey
CD40 ligand/TNFSF5	Pink
CXCL11/I-TAC	Blue
IL-1ra	Dark Grey
IL-21	Dark Red
CCL1/i-309	Light Blue
sTREM-1	Dark Blue
IP-10/ CXCL10	Olive
IL-13	Bright Pink
ICAM/CD54	White

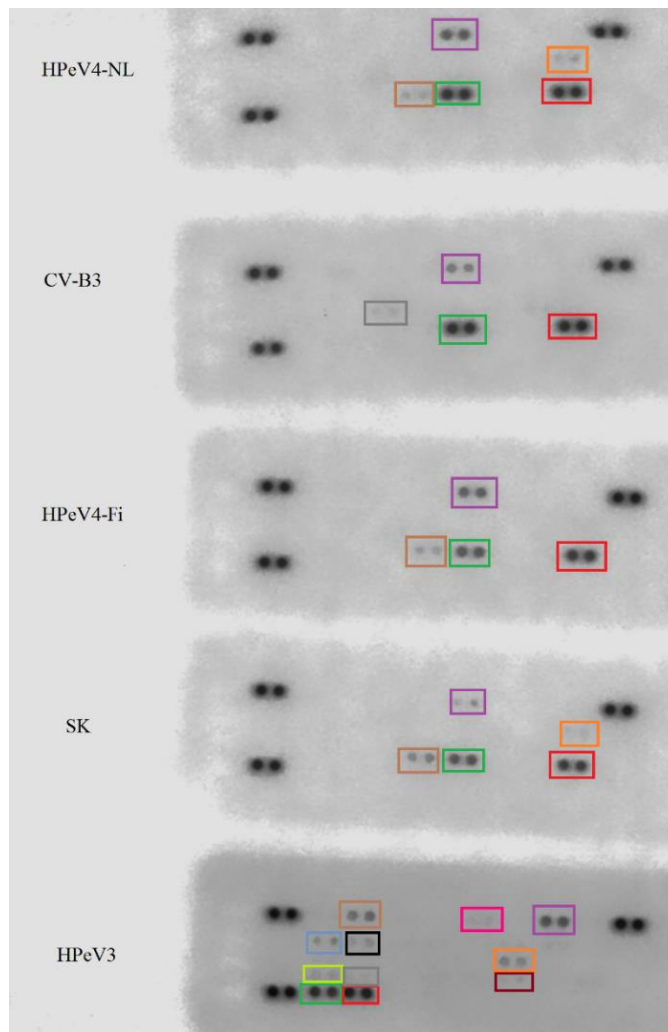


Kuva 5: A549 solujen erittämien sytokiinien määrä kasvoi mitä kauemmin infektiosta HPeV1-Harris:ksella oli kulunut.

Ennen useamman viruksen käyttöä tutkittiin, miten aika vaikutti solujen sytokiinituotantoon tekemällä Proteome Profiler™ määrittäminen eri aikapistenäytteistä HPeV1-Harris infektoidun A549:n näytteistä, minkä tulokset näkyvät kuvassa 7. Aikaisimmassa 6 tunnin aikapisteessä ei juurikaan näy vielä sytokiinituotantoa, mutta jo 24 tunnin aikapisteessä sytokiinien määrä on selkeytynyt. Tuotettujen sytokiinien määrä kasvaa ajan kuluessa ja 72 tunnin kuluttua niitä on eniten. Kun näytteet yhdistetään kuuden tunnin aikapisteen alhainen sytokiinipitoisuus saattaa heikentää tuloksia, joten se päätettiin jatkossa hylätä.

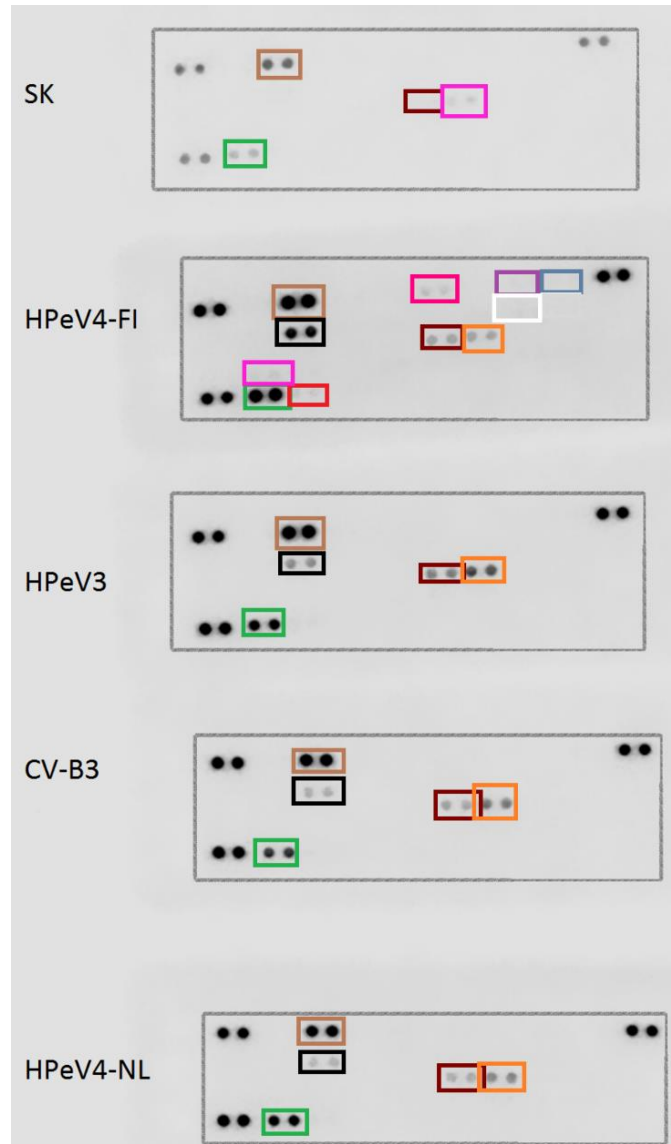
Seuraavaksi A549 ja T98G soluja infektoitiin useilla eri viruksilla. Kasvatusliuos- ja solunäytteet kerättiin 24, 48 ja 72 tunnin aikapisteissä. Kasvatusliuosnäytteistä tehtiin Proteome Profiler™ -testi, jonka tulosten perusteella valittiin sytokiinit, joita tutkittiin RT-qPCR:n avulla.

A549 infektoitumaton solu tuottaa viittä sytokiinia: MIF, Serpin E1, IL-8, IL-6 ja CXCL1, minkä voi havaita kuvasta 8. HPeV4-Fi ja CV-B3 heikentävät IL-8 ja IL-6:n tuotantoa niin, että IL-8 ei voida enää havaita kummankaan infektioimissa soluissa ja IL-6 häviää CV-B3:lla infektoiduilta soluilta, jotka sen sijaan tuottava IL-1ra:ta. HPeV4-NL infektion aikaansaama sytokiiniprofiili on lähimpänä infektoitumatonta kontrollia. HPeV3 infektio saa A549:t tuottamaan monipuolisen sytokiiniprofiilin ja lisää infektoitumattomassa kontrollissa esiintyneiden sytokiinien tuotantoa. Kaikki infektiot voimistavat Serpin E1:n tuotantoa.



Kuva 6: Eri virusten indusoimat sytokiiniprofiilit A549 soluissa. Alin membraani on aikaisemmasta erästä, minkä vuoksi sen sytokiinitäplät ovat eri järjestyksessä.

T98G solut tuottavat neljää sytokiinia ilman infektiota: MIF, IL-13, IL-6 ja IL-21, minkä voi nähdä kuvasta 9. HPeV4-NL infektoitujen T98G:den sytokiiniprofiili on jälleen lähimpänä



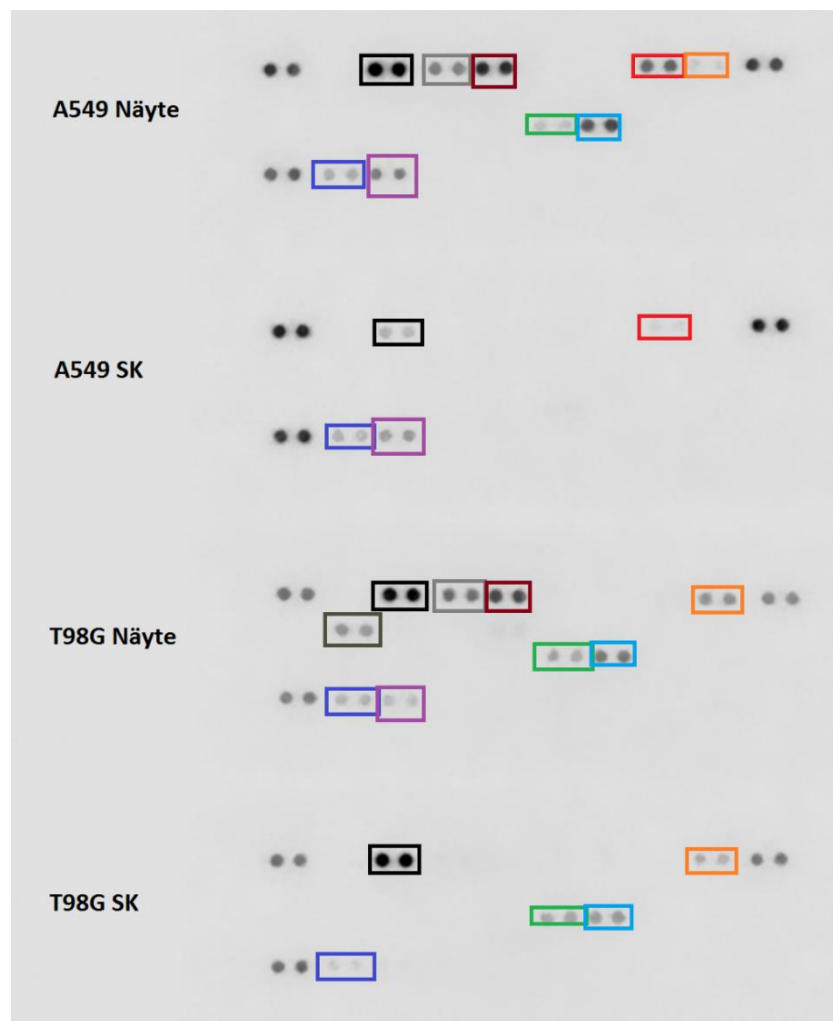
Kuva 7: Eri virusten indusoimat sytokiiniprofiilit T98G soluissa.

solukontrollia. HPeV3 ja CV-B3 infektoidut T98G:t antavat hyvin samankaltaiset sytokiiniprofiilit, joissa IL-13 on korvautunut IL-8:lla ja CXCL12:sta. Niissä solukontrollin tuottamien sytokiinien määrä on myös lisääntynyt. HPeV4-Fi infektio saa T98G:t tuottamaan monipuolisesti sytokiineja ja säilyttämään kaikki infektoimattoman kontrollin tuottamat sytokiinit. Myös se voimistaan sytokiinien tuotantoa infektoimattomaan kontrolliin verrattuna.

Positiivisena kontrollina käytettiin kaksinauhaista RNA:ta (dsRNA), jota ei luonnostaan esiinny soluissa ja siksi solu tulkitsee sen vieraaksi, esim. virukseksi. Tätä tutkittiin Poly-

IC:n avulla, joka transfektoitiin soluun lipofektamiini 2000 reagenssin avulla. Poly-IC:n rakenne on samankaltainen kaksinauhaisen RNA:n kanssa, vaikka se rakentuu inosiinihapon ja sytidyylihapon polymeereista. Näin sitä voidaan käyttää vertailukohtana tilanteeseen, jossa viraaliset RNA nauhat muodostavat kaksinauhaista RNA:ta replikoituessaan. Solu reagoi Poly-IC:hen kuten se reagoisi virusinfektiossa solun sisällä muodostuvaan kaksinauhaiseen RNA:han. Poly-IC ei pysty estämään solujen proteiinituotantoa, joten se ei saa aikaan sytokiinien hiljentymistä, mitä virukset voivat tehdä.

Poly-IC sai solut tuottamaan sytokiineja runsaammin ja monipuolisemmin, minkä voi havaita kuvasta 10. Eri solulinjojen sytokiiniprofiilit ovat samankaltaiset poly-IC:n läsnäollessa lukuunottamatta IL-1ra:ta, jota T98G tuotti. Tämän lisäksi vain A549 tuotti Serpin-E1:stä poly-IC:n läsnä ollessa.



Kuva 8: Poly-IC:n tuottamat sytokiinit A549 ja T98 soluissa. A549 ja T98G näytteet on transformoitu poly-IC:llä, A549 SK ja T98G SK ovat solukontrolleja.

4.2 Sytokiini RT-qPCR

Irrotetuista soluista eristettiin RNA, minkä jälkeen rinnakkaiset näytteet poolattiin. Näiden poolattujen näytteiden RNA muutettiin cDNA:ksi, mistä ajettiin RT-qPCR. Tulokset, jotka RT-qPCR:stä saatiin, normalisoitiin $\Delta\Delta Ct$ menetelmällä, sillä tavanomaista standardikäyrää ei ollut saatavilla. $\Delta\Delta Ct$ menetelmässä näytteen ja kontrollin dataa verrataan ensin vertailugeenin dataan, jotta normalisoidaan muuttujat näytteiden määrän ja laadun välillä. Näitä normalisoituja arvoja, joita kutsutaan ΔCt arvoiksi, verrataan sitten toisiinsa, jolloin saadaan $\Delta\Delta Ct$ arvot. Nämä laskutoimitukset suoritetaan tässä yhteydessä näin:

$$\Delta Ct(\text{sytokiini-infektio}) = Ct \text{ näyte}(\text{sytokiini-infektio}) - Ct \text{ vertailu (GAPDH-infektio)}$$

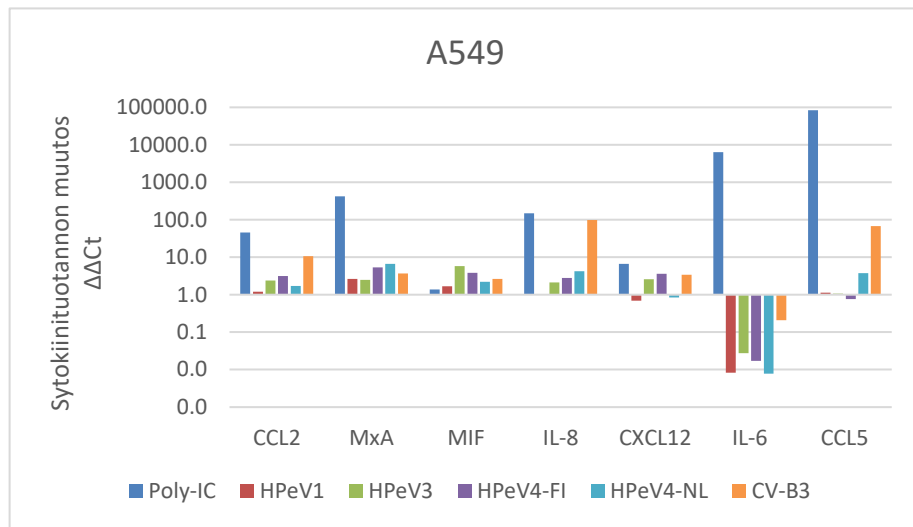
$$\Delta Ct (\text{sytokiini-solu}) = Ct \text{ näyte}(\text{sytokiini-solu}) - Ct \text{ vertailu (GAPDH-solu)}$$

$$\Delta\Delta Ct (\text{sytokiini-infektio}) = \Delta Ct (\text{sytokiini-infektio}) - \Delta Ct (\text{sytokiini-solu})$$

GAPDH:ta käytettiin vertailugeeninä, sillä se on solun ylläpitogeneeni. $\Delta\Delta Ct$ menetelmän avulla eri solulinjojen näytteitä, jotka oli infektoitu eri viruksilla, voitiin verrata toisiinsa. Tulokset esitetään \log_{10} skaalassa, jossa 1 kuvastaa infektoimattoman solukontrollin tasoa. Tämän lisäksi kokoomakuvissa näytetyt tulokset ovat eri aikapisteistä laskettuja keskiarvoja.

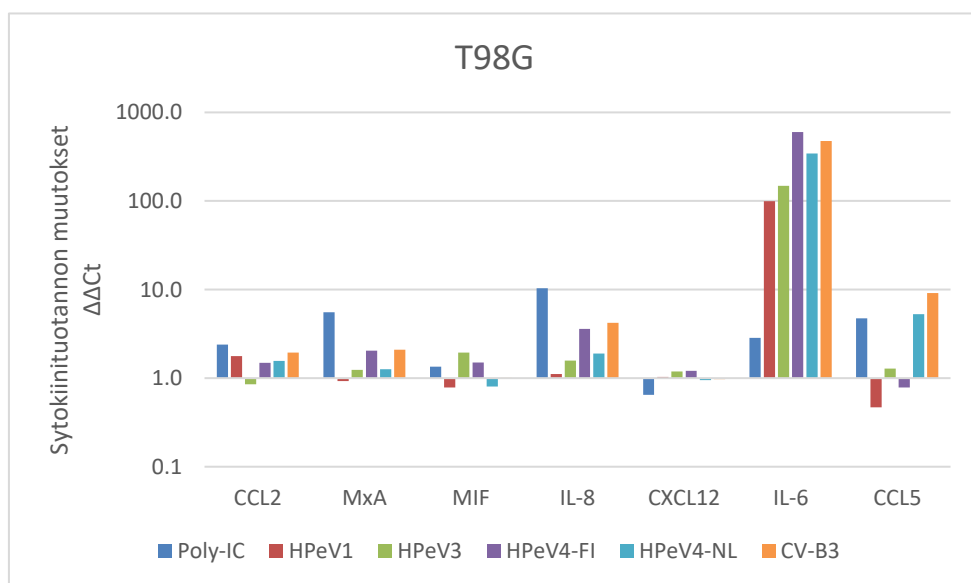
A549 solut tuottivat korkeampia sytokiinitasoja infektion seurauksena. Ainoastaan IL-6:n tapauksessa infektio vähensi solujen sytokiinituotantoa. Poly-IC, joka toimii kontrollina, sai aikaan voimakkaimmat sytokiinituotannon lisäyksen. Tämän lisäksi myös CV-B3 lisäsi erityisesti IL-8 ja CCL5:n tuotantoa. Muiden virusten infektiot aiheuttivat

toisiinsa verrattuja samankaltaisia muutoksia A549:n sytokiinituotannossa. Tulokset kuvasta 11.



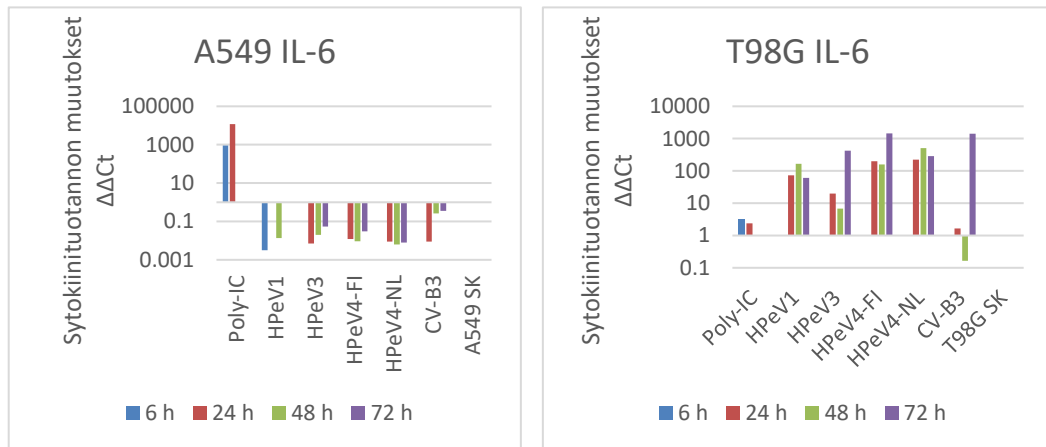
Kuva 9: Sytokiinitasojen muutokset A549 soluissa infektion seurauksena.

Kuten A549:llä myös T98G:llä sytokiinituotanto kasvoi infektion seurauksena. IL-6 sytokiini eroaa jälleen muista, sillä sitä solut tuottivat huomattavasti enemmän. Tämän lisäksi Poly-IC sai jälleen solut tuottamaan enemmän sytokiineja. T98G:llä eri virusten välillä on nähtävissä enemmän eroja. Erityisesti IL-8 ja CCL5 tuotanto vaihtelee eri virusinfektioiden välillä. CXCL12 tuotanto ei muutu juuri lainkaan. Nämä tulokset ovat nähtävillä kuvassa 12.



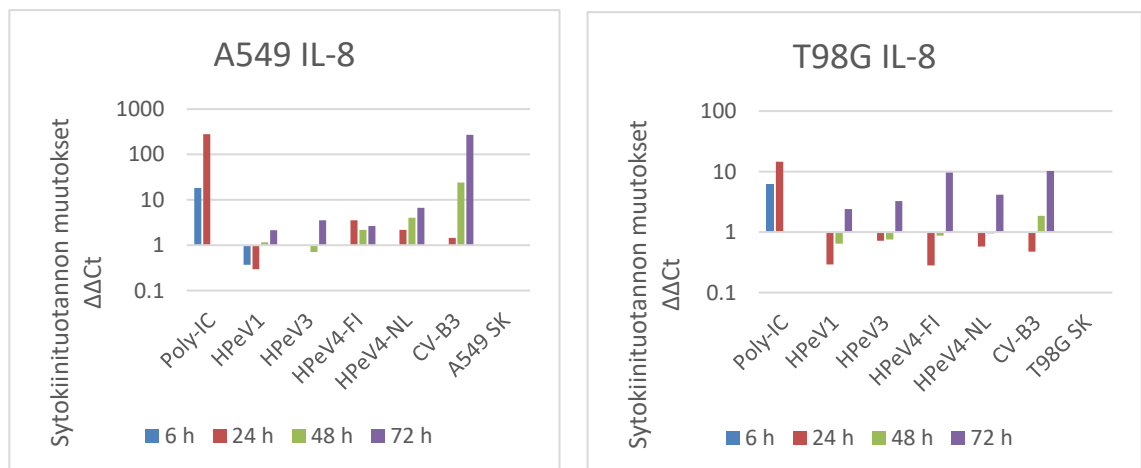
Kuva 10: Sytokiinitasojen muutokset T98G soluissa infektion seurauksena.

IL-6 tuotannossa havaittiin suurimmat erot. A549:llä sen tuotanto väheni parhaimmillaan lähes tuhannesosaan, kun taas T98G:llä sen tuotanto kasvoi keskimäärin 500 kertaiseksi. Poly-IC käsittelyn jälkeen molemmat solulinjat tuottivat enemmän IL-6:sta, mutta T98G soluissa huomattavasti vähemmän kuin virukset. Eri virustyyppien infektio aiheuttaa samansuuntaisen sytokiinituotannon muutoksen solulinjassa. IL-6:n tuotannon muutoksia havainnollistetaan kuvalla 13.



Kuva 11: IL-6 tuotannon muutokset A549 ja T98G soluissa.

IL-8:n tuotannon muutokset olivat myös mielenkiintoisia. T98G:n kohdalla IL-8:n tuotanto oli ensin vähäisempää ja kasvoi, mitä pidempään infektio oli ollut käynnissä. Tämä sama efekti havaitaan myös A549:llä, mutta HPeV4-FI infektio sai solut käyttäytymään päinvastoin. Tämän näkee kuvasta 14.

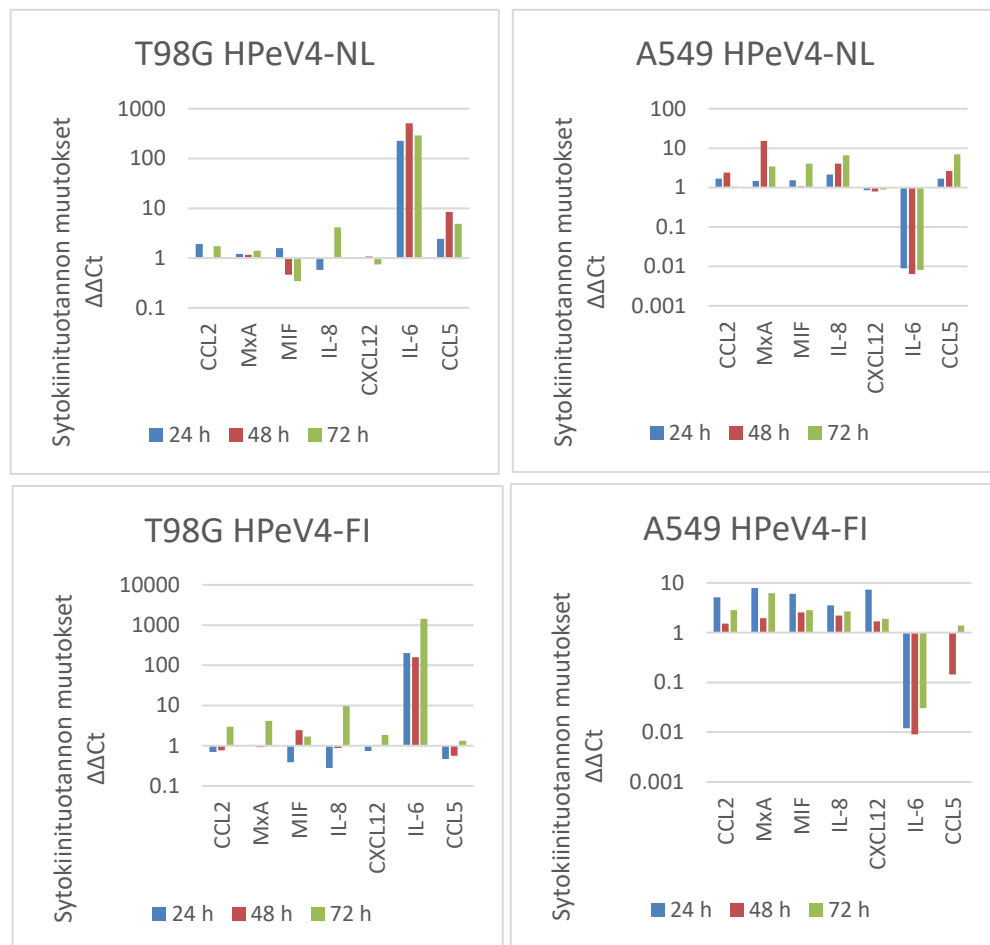


Kuva 12: IL-8:n tuotannon muutokset A549 ja T98G soluissa.

Mikäli verrataan eri virustyyppien aiheuttamien infektioiden vaikutuksia toisiinsa, havaitaan, että sytokiinituotanto reagoi yleensä samaan tapaan. Esimerkiksi verrattaessa kahta eri HPeV4 isolaattia toisiinsa huomataan, että muutokset sytokiinien tuotannossa ovat usein samansuuntaisia, vaikka niiden voimakkuus voi vaihdella.

Erojakin löytyy kuten CCL5:n tuotannon muutoksissa. HPeV4-FI infektio vähentää sen tuotantoa, kun taas HPeV4-NL infektio lisää sitä. Joitain eroja havaitaan myös CXCL12 ja MIF:n kohdalla. Tulokset esitetty kuvassa 15.

Näiden tulosten ja aiempien Proteome Profiler tulosten perusteella valittiin sytokiinit immunofluoresenssitesteihin. Valituiksi tulivat kaikki muut paitsi CCL5. MxA, MIF ja CCL2 käyttäytyivät samankaltaisesta A549 soluja infektoidessa, mutta erosivat toisistaan paljon T98G soluilla.



Kuva 13: HPeV4 infektioilla on keskenään samankaltaiset vaikutukset kummankin solulinjan sytokiinituotantoon.

4.3 Sytokiini-immunofluoresenssivärjäys

Solujen infektiota ja niiden erittämiä sytokiineja tutkittiin epäsuoralla immunofluoresenssilla, jossa ensimmäisessä vaiheessa kiinnitetään vatsa-aine (pimääri) haluttuun sytokiiniin tai virukseen ja toisessa vaiheessa kiinnitetään edellisen vasta-aineen tunnistava leimattu vasta-aine (sekundääri), jonka avulla voidaan havainnoida sytokiinia tuottavat solut. Sytokiinit tunnistavat primäärivasta-aineet oli tuotettu joko hiiressä tai kanissa ja niiden sekundäärivasta-aine valittiin sen mukaan joko anti-hiireksi tai anti-kaniksi. Sytokiinin sekundäärivasta-aineen fuoresoiva leiman väriksi valittiin punainen (aallonpituus 568). Viruksen värjäystä varten käytettiin leimattua anti-kani tai anti-hiiri vasta-ainetta, väriksi valittiin vihreä (aallonpituus 488). Mikäli sytokiinvärjäyksessä käytettiin kanissa tuotettua vasta-ainetta, käytettiin virusvärjäyksessä hiiressä tuotettua monoklonaalista vasta-ainetta (mabj2), joka tunnistaa kaksinauhaisen RNA:n, jota parechovirus tuottaa lisääntyessään. Mikäli sytokiinvärjäyksessä käytettiin hiiressä tuotettua vasta-ainetta, käytettiin virusvärjäyksessä polyklonaalista kanin antiseerumia (K316), joka tunnistaa HPeV pintaproteiineja. Tämän lisäksi tumat värjättiin DAPI:lla, jotta nähtäisiin, missä solu on. Tämän värjäyksen kuvia voitiin osittain verrata RT-qPCR:n tuloksiin, vaikka värjäys antoi tuloksia proteiinitasolla RT-qPCR:n RNA tason sijaan.

Värjäyskuvista näkee, että A549 solut tuottivat keskimäärin suuremman pitoisuuden sytokiineja kuin T98G solut. Lisäksi virukset lisääntyivät paremmin A549 soluissa. Molemmilla solulinjoilla havaitaan, että sytokiinia tuottavat sekä infektoituneet että infektoitumattomat solut. Tämän lisäksi on nähtävillä myös soluja, jotka eivät tuota sytokiinia infektiosta huolimatta.

Esimerkkikuvasarjassa (kuva 16), jossa punaisella on värjätty sytokiini IL-8 ja vihreällä viruksen kaksinauhainen RNA, verrataan HPeV4-NL infektion vaikutuksia eri aikapisteissä kummassakin solulinjassa. A549 soluilla RT-qPCR tulosten mukaan sytokiinituotanto kasvaa ajan funktiona. IF-värjäyksissä ei näy selkeää IL-8 tuotannon lisäystä. T98G:n kohdalla IL-8 tuotannossa on havaittavissa samankaltainen kasvu ajan

kuluessa RT-qPCR menetelmällä, mutta IF-värjäyskuivissa ei näy selkeää punaisen värin voimistumista.

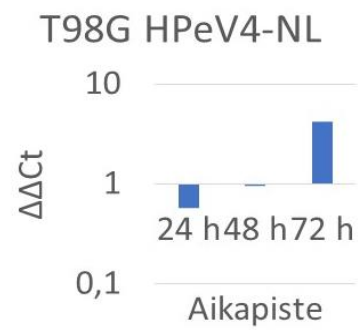
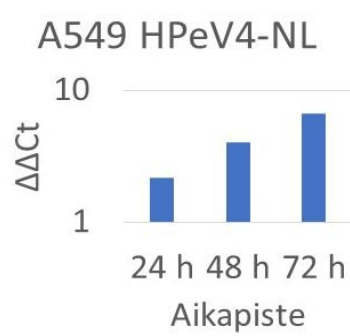
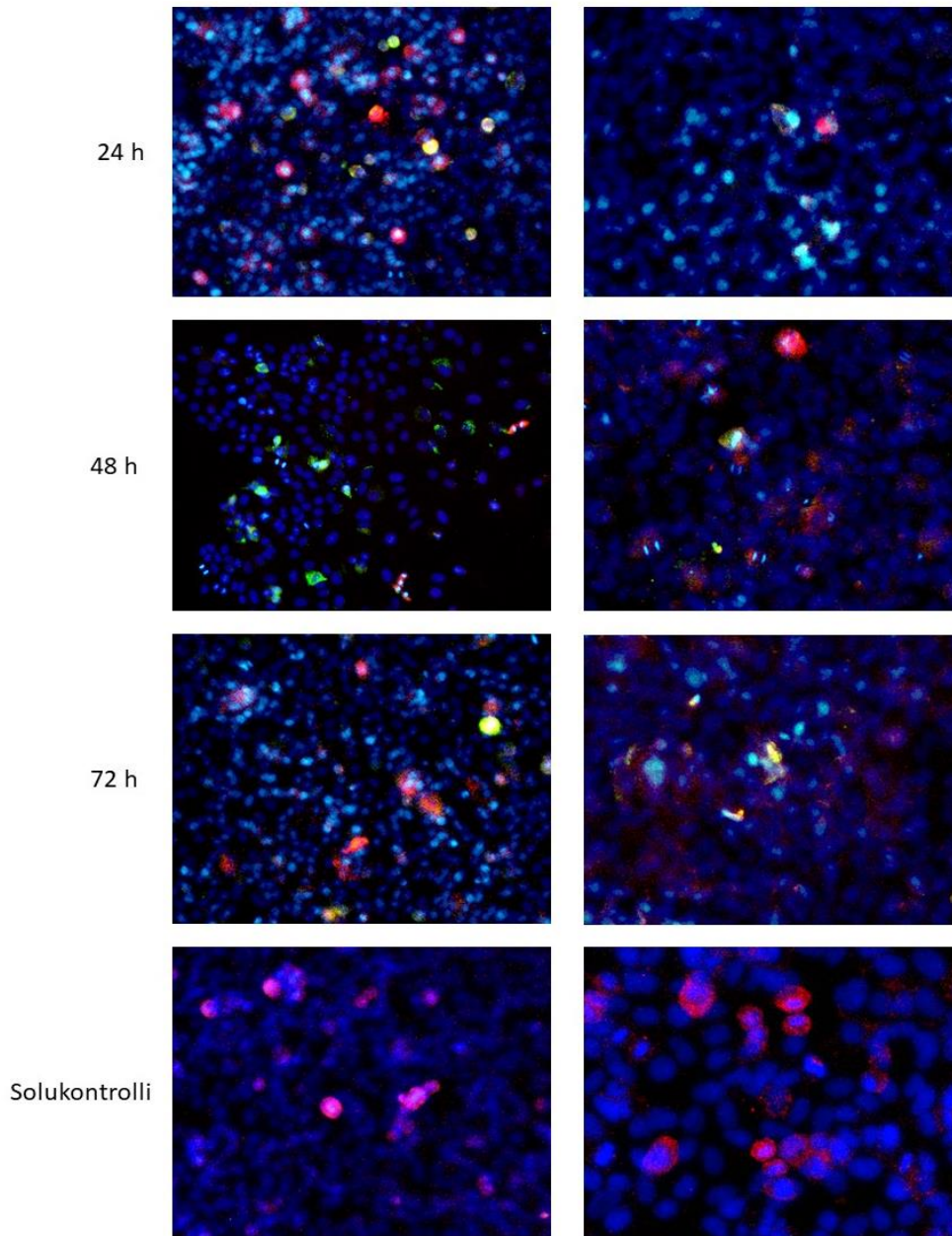
IF-värjäyksen tulokset erosivat useiden sytokiininien kohdalla RT-qPCR:n tuloksista. Vaikka selkeää sytokiinitasojen nousua havaittiin RT-qPCR:llä, niin IF-värjäystulokset eivät vahvistaneet tuloksia. Esimerkiksi IL-6:n tuotannon vähentymistä ei havaittu lainkaan toisin kuin RT-qPCR antoi olettaa kuvassa 13. CCL2 ja CXCL12 tuotantoa ei havaittu juurikaan. Sen sijaan MxA:n, MIF:n ja IL-8:n tuotanto vaikutti suurimmaksi osaksi yhteneväiseltä RT-qPCR:n antaman tulosten kanssa. Esimerkiksi MxA:n tuotannon yhteneväisyydet voidaan havaita kuvasta 17. HPeV1-Harriksen ja HPeV4-FI:n kohdalla MxA:n tuotanto säilyy lähes muuttumattomana eri aikapisteiden välillä, mikä näkyy sekä kuvissa että RT-qPCR tuloksissa. MxA:n tuotanto kasvaa ajan kuluessa muilla viruksilla ja Poly-IC:llä. Tämän näkee parhaiten CV-B3 infektion yhteydessä. Poly-IC saa A549 solut tuottamaan runsaasti MxA:ta, joka näkyy kirkkaana punaisena värinä, verrattuna solukontrolleihin.

T98G solujen sytokiinituotanto oli heikkoa ja viruksen kyky infektoida näitä soluja on heikompi kuin A549 solujen. Kuten A549:llä osa T98G:n IF-värjäyskuivista ei antanut yhteneväisiä tuloksia RT-qPCR:n tulosten kanssa. T98G näytti värjäystulosten perusteella tuottavan kohtuullisesti CCL2 ja CXCL12, mutta viruksen kasvusta ei voitu varmistua, joten tulokset eivät ole luotettavia. IL-6 sytokiinia havaittiin runsaasti, mutta siitäkään huolimatta sen tuotanto ei näyttänyt moninkertaistuvan kuten RT-qPCR:n tulokset antaisivat olettaa. Myös T98G:llä MxA, MIF ja IL-8 antoivat eniten RT-qPCR vahvistavia tuloksia. Kuvassa 18 havainnollistetaan MxA:n tuotannon muutoksia T98G soluissa, jotka vahvistavat RT-qPCR:n tuloksia kuten A549:llä. T98G:n MxA:n tuotanto ei juurikaan muutu HPeV4-NL ja HPeV3 infektion vaikutuksesta. IF-värjäyksessä HPeV1-Harris infektoitujen T98G:n MxA tuotanto kasvoi 72 tunnin aikapisteessä verrattuna 24 tunnin aikapisteeseen. RT-qPCR tuloksissa tapahtuu samankaltainen kasvu, mutta ei yhtä voimakkaana kuin, mitä mikroskooppikuvat antaisivat olettaa. HPeV4-FI ja CV-B3 infektioiden kohdalla on sama tilanne, mutta toisin päin, eli RT-qPCR tuloksissa sytokiinitasot nousivat. Poly-IC saa T98G:t tuottamaan MxA:ta solukontrollia runsaammin.

IL-8

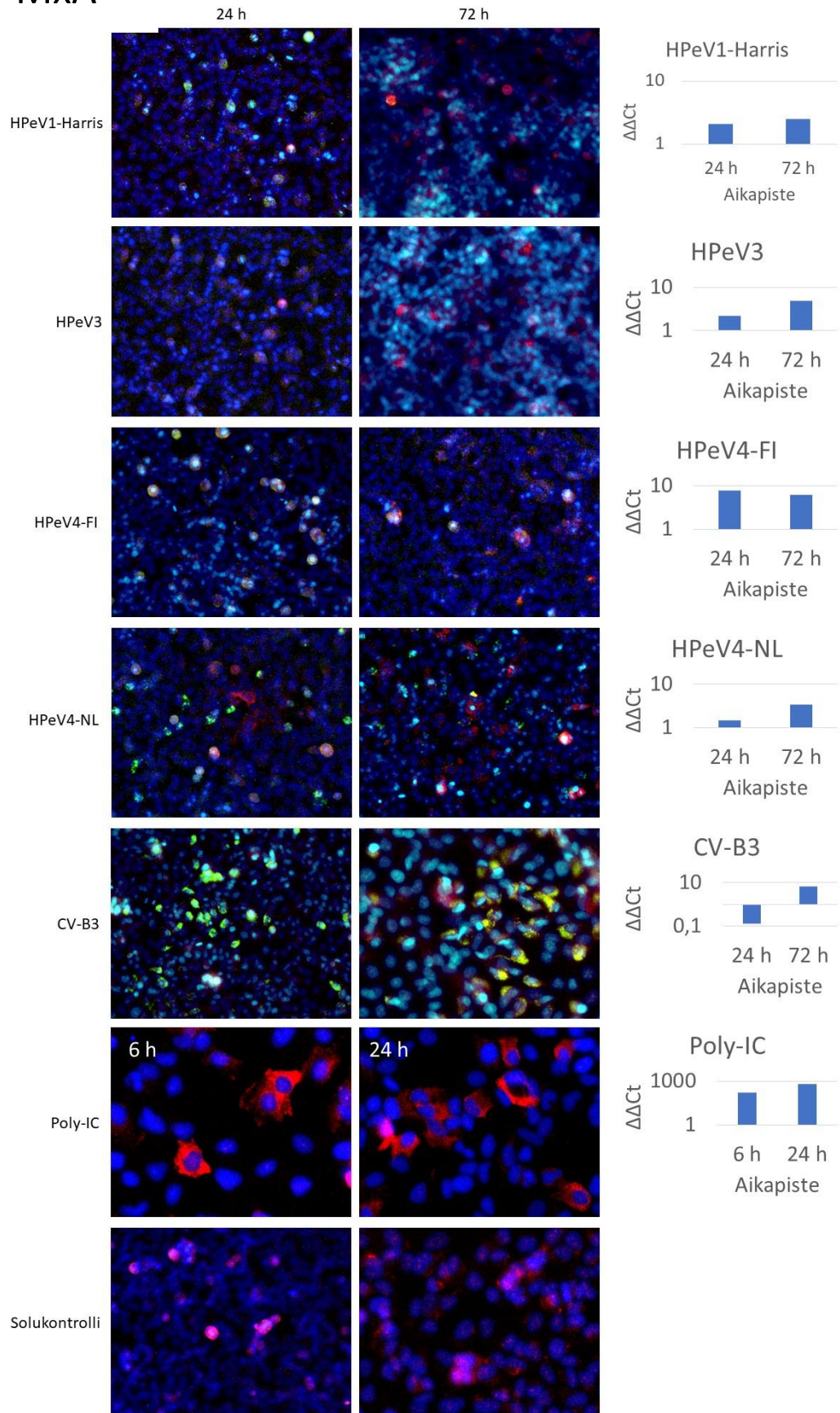
A549
HPeV4-NL

T98G
HPeV4-NL



Kuva 14: IL-8:n tuotanto ajan funktiona. Y-akseli kertoo sytokiini tuotannon muutoksista. HPeV4-NL:lla infektoidut A549 ja T98G solut. IF-värjäyskuivissa näkyy sytokiini punaisella, virus vihreällä ja solujen tumat sinisellä. Alla samat tulokset RT-qPCR määrittämisistä.

MxA

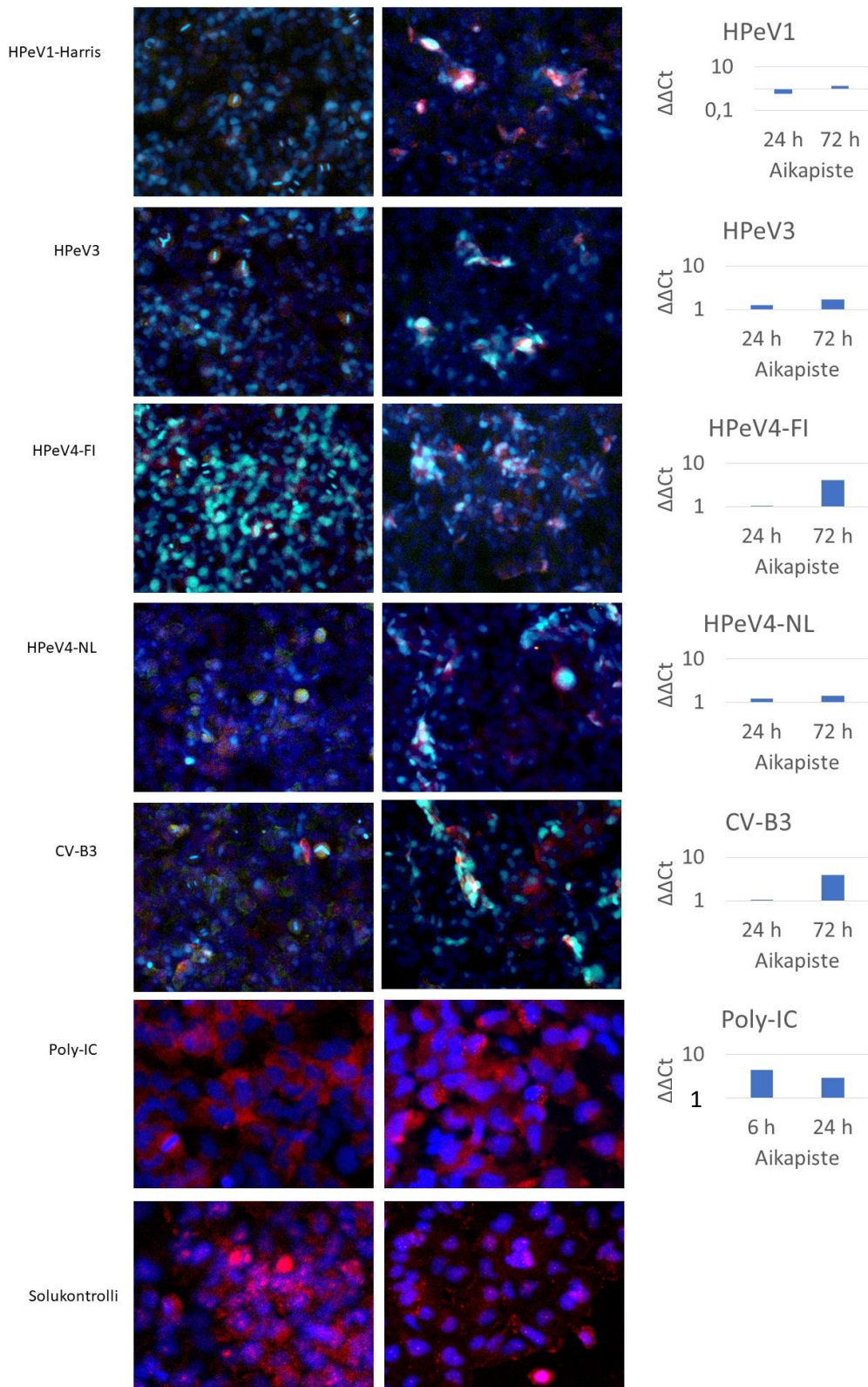


Kuva 15: A549 solujen MxA tuotannon muutokset. Y-akseli kertoo sytokiini tuotannon muutoksista. Vasemmalla IF-värjätyt solut (punainen = sytokiini, vihreä => virus, sininen = tuma). Oikealla samat tulokset määritettynä RT-qPCR:llä.

MxA

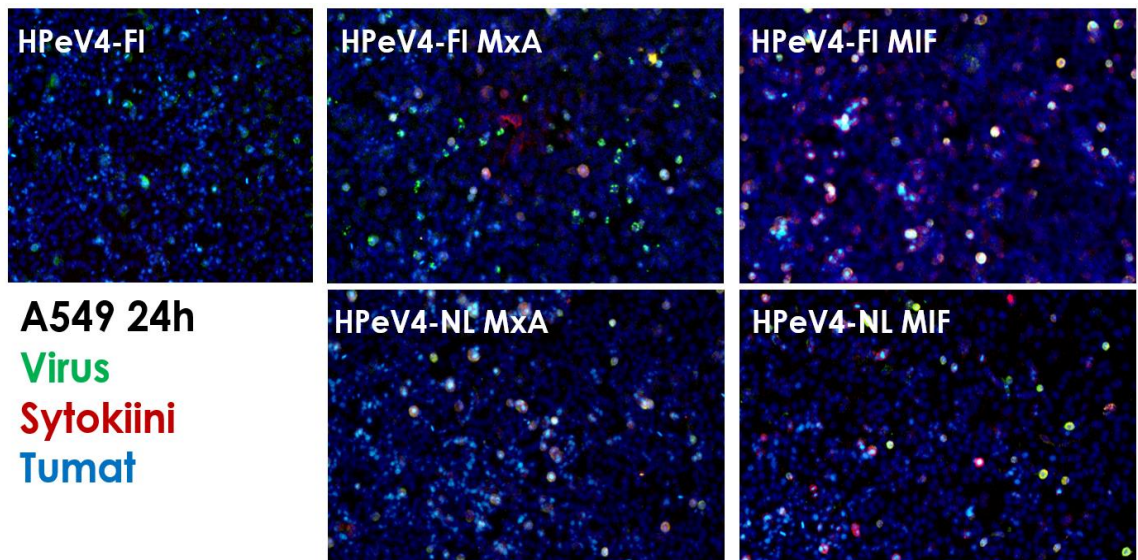
24 h

72 h

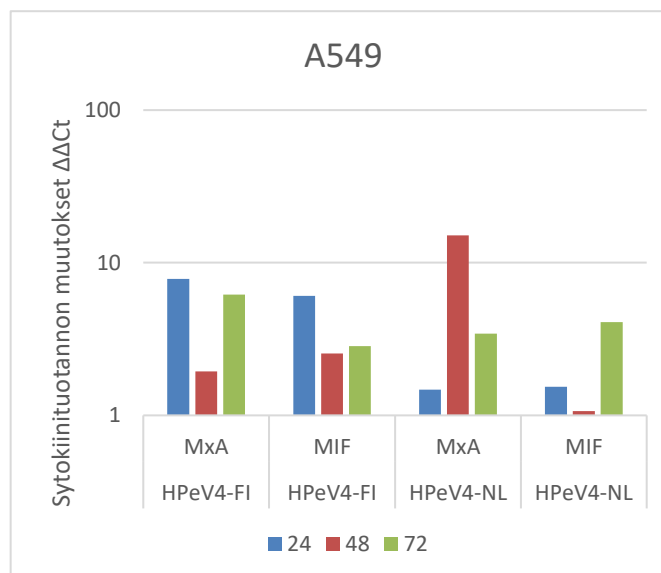


Kuva 16: T98G solujen MxA tuotannon muutokset. Y-akseli kertoo sytokiini tuotannon muutoksesta Vasemmalla IF-värjättyt solut (punainen = sytokiini, vihreä = virus, sininen = tuma). Oikealla samat tulokset määritettynä RT-qPCR:llä.

Kuvissa 19 ja 20 verrataan kahden eri isolaatin, HPeV4-FI ja HPeV4-NL, MxA:n ja MIF:n tuotantoa IF-värjäyskuvina ja RT-qPCR tuloksina. MxA:n kohdalla havaitaan, että sitä tuotetaan joissain virusta sisältävissä soluissa, mutta myös soluissa niiden lähistöllä. MIF:n kohdalla on toisin ja infektoituneet solut tuottavat sitä runsaasti, jolloin siniseksi värjätyt tumat ympäristö näyttää vihreän tai punaisen sijaan keltaiselta. HPeV4-FI:llä infektoidut A549 solut näyttäisivät tuottavan enemmän MxA:ta ja MIF:ä kuin HPeV4-NL:llä infektoidut, mikä tukee RT-qPCR:stä saatuja tuloksia.



Kuva 18: MxA:n ja MIF:n tuotto infektoiduissa A549 soluissa kahden eri HPeV4 variantin seurauksena. Immunofluoresenssivärjäys 24 tunnin kuluttua infektiosta.



Kuva 17: MxA:n ja MIF:n tuotto infektoiduissa A549 soluissa RT-qPCR menetelmällä määritettynä.

4.4 Viruspitoisuuden määrittäminen

Vaikka aikaisemmin on todettu, että kaikki työssä käytetyt virukset infektoivat valittuja solulinjoja, niin tulosten luotettavuuden varmistamiseksi on tarkistettava jokaisen infektiokokeen onnistuminen. Tämä tehtiin kolmella eri menetelmällä RT-qPCR menetelmällä, TCID50 titrauksella ja IF-värjäyksellä.

TCID50 titraus (tissue culture infective dose) perustuu virusliuoksesta tehtävään laimennossarjaan, jolla haetaan laimeinta virusliuosta, jossa vielä virus kykenee aiheuttamaan infektion soluissa. Infektoituneet solut tunnistetaan virusten aiheuttamasta sytopaattisesta efektistä. Sytopaattinen efekti voidaan havaita mikroskoopilla solujen pyöristymisenä ja irtoamisena kasvatusalustastaan. HPeV3:n TCID50 on haastavampaa, sillä HPeV3 ei aiheuta selvästi havaittavaa sytopaattista efektiä, jolloin soluista ei päällisin puolin voi nähdä onko infektiota onnistunut ja viruksen lisääntyminen täytyy varmistaa joko IF-värjäyksellä tai RT-qPCR menetelmällä. TCID50 titraus kertoo virusmäärän, jolla puolet soluista infektoituvat. TCID50 titrauksen tulokset on esitetty taulukossa 8. Titrausten perusteella näyttäisi siltä, ettei HPeV3 infektoineet T98G soluja, kun taas RT-qPCR tulosten perusteella virus näytti kasvavan (Taulukko 9). Sekä titrausten, että RT-qPCR tulosten perusteella HPeV4-FI ei näyttänyt infektoivan A549-soluja. Toisaalta IF-värjättyissä soluissa havaittiin HPeV4-FI kasvavan (Kuva 21 ja 22) kummassakin solukossa.

Taulukko 8: Infektiivisen viruksen määrä TCID50 titrauksella määritettynä.

Virus	T98G TCID ⁵⁰ /ml	A549 TCID ⁵⁰ /ml
HPeV1-Harris	1,58E+03	2,81E+08
HPeV3	0	1,58E+02
HPeV4-FI	1,58E+02	0
HPeV4-NL	8,89E+10	2,81E+09
CV-B3	2,81E+04	1,58E+11

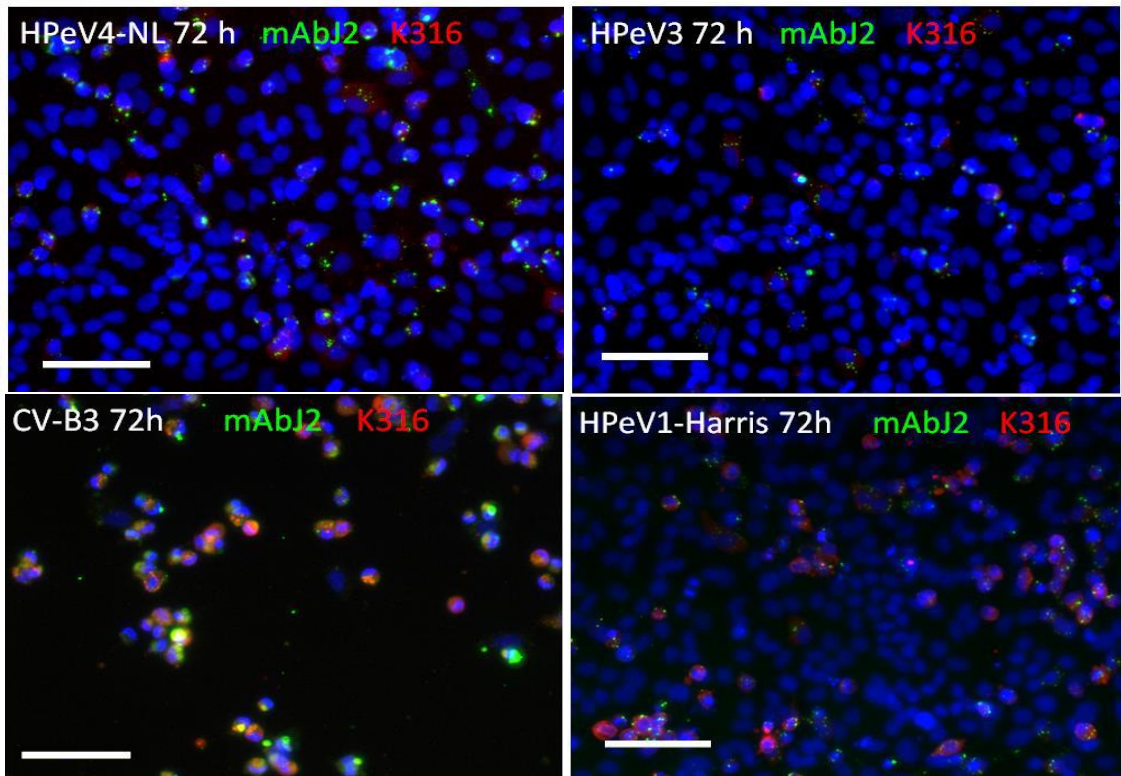
Infektiosta varmistuttiin myös RT-qPCR:n avulla. Tämä tehtiin kasvatuskokeista kerätyistä kasvatusliemistä eristetystä virus-RNA:sta RT-qPCR:llä ja selvittämällä saadut

kynnysarvot eli Ct arvot. Nämä Ct arvot näkyvät taulukossa 10, mistä voidaan havaita, että kaikissa näytteissä oli virusta lukuun ottamatta HPeV4-FI:llä infektointua A549 solunäytettä.

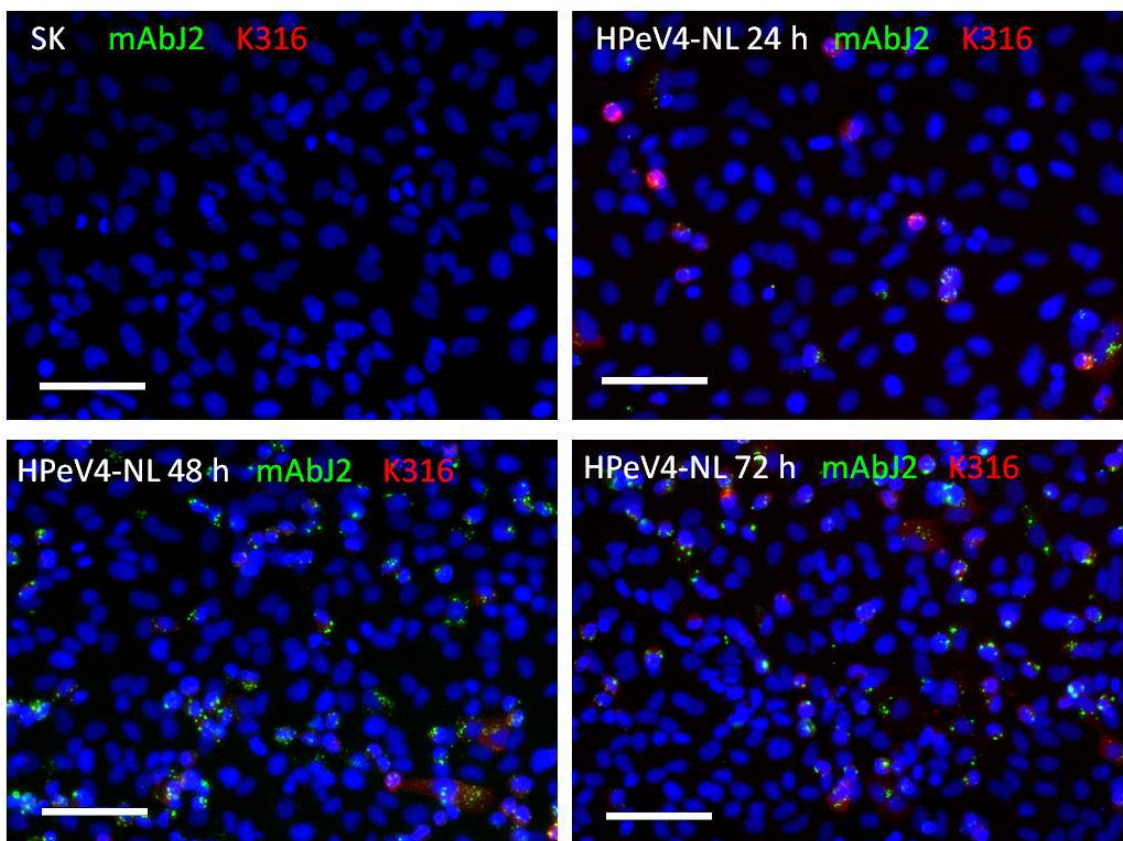
Taulukko 9: Viruksen määrä RT-qPCR:n tulokset.

Virus	T98G Ct	A549 Ct
HPeV1-Harris	27,89	26,92
HPeV3	16,61	29,07
HPeV4-FI	32,72	-
HPeV4-NL	19,51	31,74
CV-B3	26,23	11,89

Solujen infektioituminen varmistettiin myös IF-värjäyksellä. Tässä värjäyksessä mabJ2 vasta-aine värjäsi kaksinauhaisen RNA:n, joka näkyy kuvissa vihreänä. Virusproteiinit taas värjättiin antiseerumilla K316, joka on kuvassa punaisella. Tumat värjättiin DAPI:lla, jonka näkyy sinisenä. Esimerkkinä tästä on HPeV4-NL:llä infektoidut A549 solut kuvassa 25. Solukontrollissa (SK) on nähtävillä ainoastaan tumat sinisenä, mutta jo 24 tunnin kuluttu infektiosta voidaan nähdä punaisella värjättyä virusproteiinia ja vihreällä värjättyä kaksinauhaista RNA:ta. 48 ja 72 tunnin kuluttua infektiosta viruksen määrä kasvaa entisestään. Tämän lisäksi kuvassa 24 näkee kuinka 72 tunnin kuluttua kaikki virukset lukuunottamatta HPeV4-FI:tä ovat onnistuneesti infektioineet solut. CV-B3:n kohdalla infektio oli edennyt niin nopeasti, että suurin osa soluista oli irronnut.

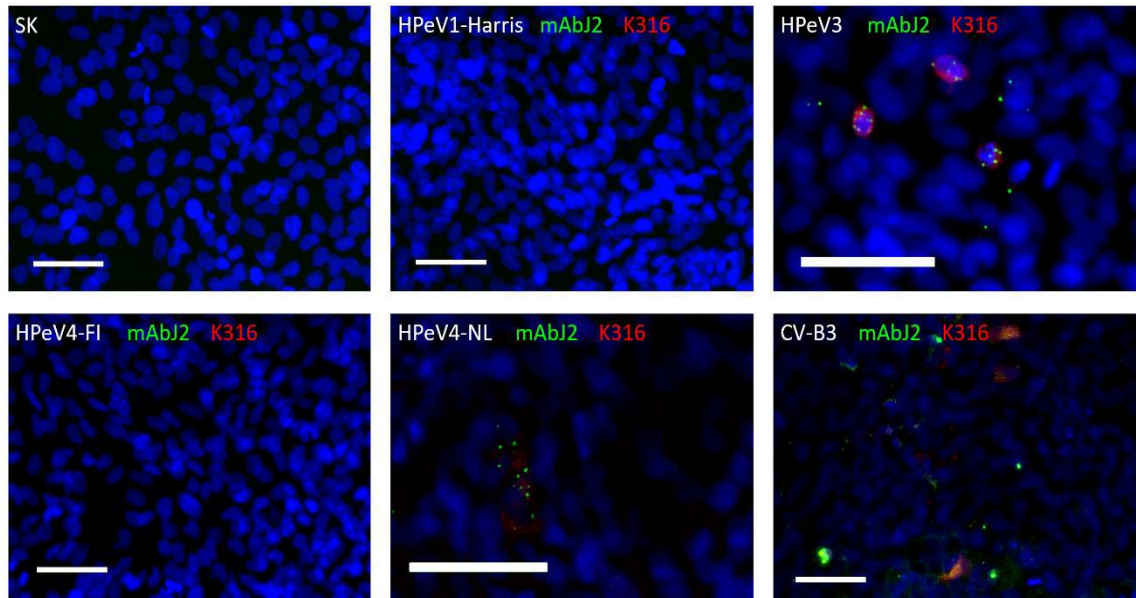


Kuva 19: Eri viruksilla infektoidut A549 solut 72 tunnin kuluttua infektoinnista. Viruksen kaksinauhainen RNA ja proteiinit ovat nähtävillä IF-värjäyskuivissa vihreällä ja punaisella.



Kuva 20: Viruksen, HPeV4-NL, kaksinauhainen RNA ja proteiinit lisääntyvät ajan kuluessa infektoiduissa A549 soluissa.

Tämä värjäys toistettiin T98G soluilla, minkä tulokset nähdään kuvasta 23. Siitä on selvästi nähtävillä, että vain HPeV3, HPeV4-NL ja CV-B3 olivat onnistuneesti infektoineet solut. Sen sijaan HPeV1-Harris ja HPeV4-FI infektiot eivät näyttäneet onnistuneilta, sillä virus-RNA:ta tai -proteiinia ei ole nähtävillä.



Kuva 21: Eri viruksilla infektoidut T98G solut 72 tunnin kuluttua infektoinnista. Viruksen kaksinauhainen RNA ja proteiinit ovat nähtävillä IF-värjäyskuivissa vihreällä ja punaisella.

5 Tulosten tarkastelu

Tutkimuksessa havaittiin A549 keuhkoepiteelisolujen ja T98G astrozyttisolujen sytokiini tuotannon muuttuvan, kun ne infektoituvat HPeV:llä. A549:t ja T98G:t tuottivat sytokiineja yhtä monipuolisesti. Sen sijaan A549 solujen todettiin tuottavan suurempi pitoisuus sytokiineja. Solulinjojen sytokiiniprofiilit olivat osittain erilaiset, mikä viittaa siihen, että niiden kyky tuottaa sytokiineja on erilainen.

IL-6 oli tutkituista sytokiineista mielenkiintoisin. Se indusoitui voimakkaasti T98G:llä ja repressoitui A549:llä. Näin voimakas ero on mahdollinen, mutta kokeet tulisi uusida, jotta tuloksesta voitaisiin varmistua. Muiden sytokiinien tuotannon muutokset jäivät alle kymmenkertaisiksi, eivätkä antaneet selkeitä tuloksia. Tässä vaiheessa tutkimusta on vaikeaa sanoa, minkä tasoinen sytokiini tuotannon muutos on merkittävä. Lisäksi IF-värjäyskuvien perusteella vain noin 10 % soluista oli infektoitunut, mikä merkittävästi laimentaa sytokiinien määrää. Todellisuudessa yksittäisten infektoituneiden solujen sytokiini tuotannon muutokset saattavat olla aivan eri tasolla. Tämä tarkoittaa sitä, että solujen infektioprosentti saattaa vaikuttaa tuloksiin. Infektiossa käytettiin MOI 5 eli jokaista solua kohden oli viisi virusta. Näille viruksille annettiin tunti aikaa kiinnittyä ennen niiden pesemistä pois, jotta infektio kehittyisi samaa tahtia kaikissa soluissa. Virusmäärän kasvattaminen ei siis välttämättä olisi muuttanut infektioprosenttia, mutta viruksille olisi voinut antaa enemmän aikaa kiinnittyä solujen pintarakenteisiin.

Kontrollina toiminut CV-B3 oli viruksista infektiivisin erityisesti A549:llä, mutta myös suurin osa HPeV:stä infektoi selvästi molempia solulinjoja. Ainoastaan HPeV4-FI infektio vaikuttaa epäonnistuneen viruspitoisuuden määrittysten perusteella. Tästä ei kuitenkaan ole täyttä varmuutta sillä HPeV1-FI infektoitujen solujen sytokiini tuotannon muutokset olivat samankaltaisia RT-qPCR tuloksissa kuin muilla viruksilla. Tämän perusteella voisi olettaa, että infektio on onnistunut. Nämäkin kokeet olisi toistettava, jotta tuloksista saataisiin varmuus.

Tulosten perusteella eri virustyyppien infektio saa aikaan samankaltaisen muutoksen solujen sytokiini tuotannossa. Tutkimuksessa pyrittiin myös selvittämään eroavatko vakavampia tauteja aiheuttavien virustyyppien aikaansaamat sytokiinivasteet jotenkin

lievempää sairautta aiheuttaneiden virustyyppien aikaansaamista sytokiinivasteista. Selkeitä eroja vakavaa tai lievää sairautta aiheuttavien virusten välillä ei havaittu. Tässä tutkimuksessa ei pystytty tunnistamaan yksittäistä sytokiinia tai sytokiiniprofiilia, jonka avulla viruksinfektion voisi tunnistaa. HPeV:n taudinaiheuttamiskyvystä kertovaa tulehdusmarkkeria ei siis löydetty. Tulehdusmarkkerin kehitystyötä varten olisi tulokset toistettava ja käytävä läpi useampia sytokiineja.

Tutkimus on alkuvaiheessa ja näytteet, joilla testit tehtiin, oli poolattu cDNA:n valmistusvaiheessa. Tämä tarkoittaa, että tuloksille ei kykene tekemään tilastollisia analyysejä. Kokeet olisi toistettava poolaamatta rinnakkaisia näytteitä, jotta saataisiin vertailtavia tuloksia. Tämän lisäksi IF-värjäyksissä solut kasvoivat ryppäinä eivätkä tasaisena mattona kuopan pohjalla, minkä lisäksi soluja myös irtosi runsaasti. Tämän vuoksi IF-värjykset erityisesti sytokiinien osalta tulisi uusina selkeämpien ja tarkempien kuvien saamiseksi sekä tulosten varmistamiseksi. Eri menetelmillä saadut tulokset eivät kaikilta osin tue toisiaan, mikä hankaloittaa tulosten tulkitsemista. Kokeet uusimalla niiden tuloksista saataisiin suurempi varmuus.

6 Kirjallisuus

Aizawa, Y., Watanabe, K., Oishi, T., Hirano, H., Hasegawa, I. & Saitoh, A. (2015) Role of maternal antibodies in infants with severe diseases related to human parechovirus type 3. *Emerging Infectious Diseases* **21**:1966.

Alam, M.M., Khurshid, A., Shaikat, S., Rana, M.S., Sharif, S., Angez, M., Nisar, N., Naeem, M. & Zaidi, S.S.Z. (2013) Human Parechovirus Genotypes -10, -13 and -15 in Pakistani Children with Acute Dehydrating Gastroenteritis. *PLOS ONE* **8**:e78377.

Aldinucci, D. & Colombatti, A. (2014) The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm* **2014**:292376.

Al-Sunaidi, M., Williams, ÇH., Hughes, P.J., Schnurr, D.P. & Stanway, G. (2007) Analysis of a New Human Parechovirus Allows the Definition of Parechovirus Types and the Identification of RNA Structural Domains. *J Virol* **81**:1013-1021.

Annu Alho, Jane Marttila, Jorma Ilonen & Timo Hyypiä (2003) Diagnostic Potential of Parechovirus Capsid Proteins. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:2294-2299.

Banisadr, G., Skrzydelski, D., Kitabgi, P., Rostène, W. & Parsadaniantz, S.M. (2003) Highly regionalized distribution of stromal cell-derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur J Neurosci* **18**:1593-1606.

Benschop, K.S.M., Williams, ÇH., Wolthers, K.C., Stanway, G. & Simmonds, P. (2008) Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *Journal of General Virology* **89**:1030-1035.

Benschop, K., Thomas, X., Serpenti, C., Molenkamp, R. & Wolthers, K. (2008) High prevalence of human Parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. *J Clin Microbiol* **46**:3965-3970.

Bickel, M. (1993) The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* **64**:456-460.

Britton, P.N., Dale, R.C., Nissen, M.D., Crawford, N.W., Elliott, E.J., Macartney, K., Khandaker, G., Booy, R. & Jones, C.A. (2016) Parechovirus Encephalitis and Neurodevelopmental Outcomes. *Pediatrics* **137**:e20152848.

Britton, P., Dale, R., Blyth, C., Clark, J., Crawford, N., Marshall, H.S., Elliott, E., Macartney, K., Booy, R. & Jones, C. (2016) The Causes and Clinical Features of Childhood Encephalitis in Australia: A Multicentre, Prospective, Cohort Study. *Open Forum Infect Dis* **3**.

Chieochansin, T., Vichiwattana, P., Korkong, S., Theamboonlers, A. & Poovorawan, Y. (2011) Molecular epidemiology, genome characterization, and recombination event of human parechovirus. *Virology* **421**:159-166.

- Chimunda, T., Subramanian, R., Smith, J. & Mahony, A. (2018) First reported case of Human Parechovirus encephalitis in an adult patient complicated by Refractory Status Epilepticus. *IDCases* **15**:e00475.
- Choi, S.S., Lee, H.J., Lim, I., Satoh, J. & Kim, S.U. (2014) Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS ONE* **9**:e92325.
- de Vries, H.E., Kuiper, J., de Boer, A.G., Van Berkel, T.J. & Breimer, D.D. (1997) The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol Rev* **49**:143-155.
- Dotzauer, A. & Kraemer, L. (2012) Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: an overview. *World Journal of Virology* **1**:91.
- Faria, N.R., de Vries, M., van Hemert, F.J., Benschop, K. & van der Hoek, L. (2009) Rooting human parechovirus evolution in time. *BMC Evol Biol* **9**:164.
- Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (2007) *Fields Virology*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Fortuna, D., Cárdenas, A.M., Graf, E.H., Harshyne, L.A., Hooper, D.C., Prosnjak, M., Shields, J. & Curtis, M.T. (2017) Human parechovirus and enterovirus initiate distinct CNS innate immune responses: Pathogenic and diagnostic implications. *J Clin Virol* **86**:39-45.
- Gerard, C. & Rollins, B.J. (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* **2**:108-115.
- Griffin, D.E. (2003) Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nat Rev Immunol* **3**:493-502.
- Gruol, D.L. (2015) IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology* **96**:42-54.
- Haller, O. & Kochs, G. (2011) Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* **31**:79-87.
- Hänninen, A. (2011) Immunological regulation of acute inflammatory reaction. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja* **127**:1679.
- Harvala, H., Wolthers, K.C. & Simmonds, P. (2010) Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* **23**:224-230.
- Hiscott, J. (2007) Triggering the Innate Antiviral Response through IRF-3 Activation. *J Biol Chem* **282**:15325-15329.
- Hyypiä, T., Horsnell, C., Maaronen, M., Khan, M., Kalkkinen, N., Auvinen, P., Kinnunen, L. & Stanway, G. (1992) A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *PNAS* **89**:8847-8851.
- Joki-Korpela, P., Roivainen, M., Lankinen, H., Pöyry, T. & Hyypiä, T. (2000) Antigenic properties of human parechovirus 1. *Journal of General Virology* **81**:1709-1718.
- Jouko Savolainen & Anne Mannila (2005) Veri-aivoeste lääkekehityksen haasteena.

- Khatami, A., McMullan, B.J., Webber, M., Stewart, P., Francis, S., Timmers, K.J., Rodas, E., Druce, J., Mehta, B., Sloggett, N.A., Cumming, G., Papadakis, G. & Kesson, A.M. (2015) Sepsis-like Disease in Infants Due to Human Parechovirus Type 3 During an Outbreak in Australia. *Clin Infect Dis* **60**:228-236.
- Kolehmainen, P., Jääskeläinen, A., Blomqvist, S., Kallio-Kokko, H., Nuolivirta, K., Helminen, M., Roivainen, M., Lappalainen, M. & Tauriainen, S. (2014) Human parechovirus type 3 and 4 associated with severe infections in young children. *Pediatr Infect Dis J* **33**:1109-1113.
- Kolehmainen, P., Oikarinen, S., Koskiniemi, M., Simell, O., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H. & Tauriainen, S. (2012) Human parechoviruses are frequently detected in stool of healthy Finnish children. *Journal of Clinical Virology* **54**:156-161.
- Krogerus, C., Egger, D., Samuilova, O., Hyypiä, T. & Bienz, K. (2003) Replication complex of human parechovirus 1. *J Virol* **77**:8512-8523.
- Kurz, H., Prammer, R., Bock, W., Ollerieth, R., Bernert, G., Zwiauer, K., Aberle, J.H., Aberle, S.W., Fazekas, T. & Holter, W. (2015) Intracranial hemorrhage and other symptoms in infants associated with human parechovirus in Vienna, Austria. *Eur J Pediatr* **174**:1639-1647.
- Leber, A.L., Everhart, K., Balada-Llasat, J., Cullison, J., Daly, J., Holt, S., Lephart, P., Salimnia, H., Schreckenberger, P.C., DesJarlais, S., Reed, S.L., Chapin, K.C., LeBlanc, L., Johnson, J.K., Soliven, N.L., Carroll, K.C., Miller, J., Dien Bard, J., Mestas, J., Bankowski, M., Enomoto, T., Hemmert, A.C. & Bourzac, K.M. (2016) Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria, Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol* **54**:2251-2261.
- Lefkowitz, E.J., Dempsey, D.M., Hendrickson, R.C., Orton, R.J., Siddell, S.G. & Smith, D.B. (2018) Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res* **46**:D717.
- Leyton-Jaimes, M.F., Kahn, J. & Israelson, A. (2018) Macrophage migration inhibitory factor: A multifaceted cytokine implicated in multiple neurological diseases. *Exp Neurol* **301**:83-91.
- Lu, M., Grove, E.A. & Miller, R.J. (2002) Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7090-7095.
- McKenzie, A.T., Wang, M., Hauberg, M.E., Fullard, J.F., Kozlenkov, A., Keenan, A., Hurd, Y.L., Dracheva, S., Casaccia, P., Roussos, P. & Zhang, B. (2018) Brain Cell Type Specific Gene Expression and Co-expression Network Architectures. *Scientific Reports* **8**:8868.
- Meri Seppo & Julkunen Ilkka (2011) *Immunologia, Sytokiinit*. **2019**.
- Nateri, A.S., Hughes, P.J. & Stanway, G. (2000) In vivo and in vitro identification of structural and sequence elements of the human parechovirus 5' untranslated region required for internal initiation. *J Virol* **74**:6269-6277.
- Nielsen, N.M., Midgley, S.E., Nielsen, A.C.Y., Christiansen, C.B. & Fischer, T.K. (2016) Severe Human Parechovirus Infections in Infants and the Role of Older Siblings. *Am J Epidemiol* **183**:664-670.

O'Connor, T., Borsig, L. & Heikenwalder, M. (2015) CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **15**:105-118.

Okuyama, N.C.M., Cezar-Dos-Santos, F., Pereira, É.R., Trugilo, K.P., Cebinelli, G.C.M., Sena, M.M., Pereira, A.P.L., Aranome, A.M.F., Mangieri, L.F.L., Ferreira, R.S., Watanabe, M.A.E. & de Oliveira, K.B. (2018) Genetic variant in CXCL12 gene raises susceptibility to HPV infection and squamous intraepithelial lesions development: a case-control study. *J Biomed Sci* **25**:69.

Olijve, L., Jennings, L. & Walls, T. (2018) Human Parechovirus: an Increasingly Recognized Cause of Sepsis-Like Illness in Young Infants. *Clin Microbiol Rev* **31**.

Pawlina, W. and Ross, M.H. (2018) *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, Lippincott Williams & Wilkins.

Pham, N.T.K., Takanashi, S., Tran, D.N., Trinh, Q.D., Abeysekera, C., Abeygunawardene, A., Khamrin, P., Okitsu, S., Shimizu, H., Mizuguchi, M. & Ushijima, H. (2011) Human parechovirus infection in children hospitalized with acute gastroenteritis in Sri Lanka. *J Clin Microbiol* **49**:364-366.

Samuilova, O., Krogerus, C., Pöyry, T. & Hyypiä, T. (2004) Specific interaction between human parechovirus nonstructural 2A protein and viral RNA. *J Biol Chem* **279**:37822-37831.

Saunders, N.R., Liddelow, S.A. & Dziegielewska, K.M. (2012) Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol* **3**:46.

Selvarangan, R., Nzabi, M., Selvaraju, S.B., Ketter, P., Carpenter, C. & Harrison, C.J. (2011) Human Parechovirus 3 Causing Sepsis-like Illness in Children From Midwestern United States. *The Pediatric Infectious Disease Journal* **30**:238-242.

Siponen, A. Kolehmainen, P. Tauriainen, S. Growth characteristics of parechovirus types 1-6 in cell cultures. (Manuscript)

Shakeel, S., Westerhuis, B.M., Ora, A., Koen, G., Bakker, A.Q., Claassen, Y., Wagner, K., Beaumont, T., Wolthers, K.C. & Butcher, S.J. (2015) Structural Basis of Human Parechovirus Neutralization by Human Monoclonal Antibodies. *J Virol* **89**:9571-9580.

Shakeel, S., Westerhuis, B.M., Domanska, A., Koning, R.I., Matadeen, R., Koster, A.J., Bakker, A.Q., Beaumont, T., Wolthers, K.C. & Butcher, S.J. (2016) Multiple capsid-stabilizing interactions revealed in a high-resolution structure of an emerging picornavirus causing neonatal sepsis. *Nature communications* **7**:11387.

Sharp, J., Bell, J., Harrison, C.J., Nix, W.A., Oberste, M.S. & Selvarangan, R. (2012) Human parechovirus in respiratory specimens from children in Kansas City, Missouri. *J Clin Microbiol* **50**:4111-4113.

Stamatovic, S.M., Keep, R.F. & Andjelkovic, A.V. (2008) Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol* **6**:179-192.

Stanway, G. & Hyypiä, T. (1999) Parechoviruses. *J Virol* **73**:5249-5254.

Stanway, G., Kalkkinen, N., Roivainen, M., Ghazi, F., Khan, M., Smyth, M., Meurman, O. & Hyypiä, T. (1994) Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. *J Virol* **68**:8232-8238.

Stanway, G., Knoles, N.J., King, A.M.Q. and Hovi, T. (2010) *The Picornaviruses*.

Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**.

Tapia, G., Cinek, O., Witsø, E., Kulich, M., Rasmussen, T., Grinde, B. & Rønningen, K.S. (2008) Longitudinal observation of parechovirus in stool samples from Norwegian infants. *Journal of Medical Virology* **80**:1835-1842.

Tauriainen, S., Martiskainen, M., Oikarinen, S., Lönnrot, M., Viskari, H., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M. & Hyöty, H. (2007) Human parechovirus 1 infections in young children—no association with type 1 diabetes. *Journal of Medical Virology* **79**:457-462.

Triantafyllou, K., Vakakis, E., Orthopoulos, G., Ahmed, M.A.E., Schumann, C., Lepper, P.M. & Triantafyllou, M. (2005) TLR8 and TLR7 are involved in the host's immune response to human parechovirus 1. *European Journal of Immunology* **35**:2416-2423.

van der Linden, L., Wolthers, K.C. & van Kuppeveld, Frank J. M. (2015) Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses* **7**:4529-4562.

van der Sanden, S. M. G., Koopmans, M.P.G. & van der Avoort, H. G. a. M. (2013) Detection of human enteroviruses and parechoviruses as part of the national enterovirus surveillance in the Netherlands, 1996-2011. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**:1525-1531.

Verboon-Maciolek, M.A., Groenendaal, F., Hahn, C.D., Hellmann, J., Loon, A.M.v., Boivin, G. & Vries, L.S.d. (2008) Human parechovirus causes encephalitis with white matter injury in neonates. *Annals of Neurology* **64**:266-273.

Vuorinen Tytti (2011) Ihotaudit, Saatavilla Internetissä (vaatii käyttäjätunnuksen) www.oppiportti.fi/op/iht00084: Duodecim.

Westerhuis, B.M., Koen, G., Wildenbeest, J.G., Pajkrt, D., de Jong, M.D., Benschop, K.S.M. & Wolthers, K.C. (2012) Specific cell tropism and neutralization of human parechovirus types 1 and 3: implications for pathogenesis and therapy development. *Journal of General Virology* **93**:2363-2370.

Whitton, J.L., Fujinami, R.S. and Kemball, C.C. (2010) *The Picornaviruses*, American Society of Microbiology.

Wigand, R. & Sabin, A.B. (1961) Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* **11**:224-247.

Yip, C.C.Y., Lo, K., Que, T., Lee, R.A., Chan, K., Yuen, K., Woo, P.C.Y. & Lau, S.K.P. (2014) Epidemiology of human parechovirus, Aichi virus and salivirus in fecal samples from hospitalized children with gastroenteritis in Hong Kong. *Virol J* **11**:182.

Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G. & Yamashita, T. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *WOS*.

Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. & Ictv Report Consortium, n. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol* **98**:2421-2422.

Zhang, J., Zhang, F., Hong, C., Giuliano, A.E., Cui, X., Zhou, G., Zhang, G. & Cui, Y. (2015) Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med* **12**:10-22.

Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I. & Littman, D.R. (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**:595-599.

7 Liitteet

Liite 1

Poly-IC:n tranfektoiminen Lipofektamiini 2000 reagenssin avulla.

1. Vaihdettiin soluille antibiootiton kasvatusliuos.
2. Laimennettiin Poly-IC 50 µl OptiMem I reduced Serum Medium ilman seerumia ja inkuboitii 5 min huoneenlämmössä.
3. Laimennettiin Lipofektamiini 2000 50 µl OptiMem 1 kasvatusliuosta ja inkuboitii 5 min huoneenlämmössä.
4. Yhdistettiin nämä laimennokset ja inkuboitii 20 min huoneenlämmössä.
5. Lisättiin 100 µl näytettä solujen kasvatusliuokseen.
6. Inkuboitii 6 tai 24 tunnin ajan ennen näytteiden keruuta.

Liite 2

Proteome Profiler™ Human Cytokine Array -kitin (R&D Systems) käyttö kasvatusliuoksen sytokiinien määrittämiseksi.

1. Kitin nitroselluloosamembraania inkuboidaan 2 ml:ssä Array Buffer 4:sta ravistelussa 1h ja huoneenlämmössä.
2. Näyteliuos valmistetaan sekoittamalla ja inkuboimalla sitä 1 h huoneenlämmössä.
 - Array Buffer 4 500 µl
 - Array Buffer 5 500 µl
 - UV-säteilyllä inaktivoitua kasvatusliuosnäytettä 500 µl
 - Sytokiinit tunnistavien biotinyloitujen vasta-aineiden seos 15 µl
3. Korvataan nitroselluloosamembraanilla oleva Array Buffer 4 näyteliuoksella ja inkuboidaan membraania yön yli +4 °C.
4. Näyteliuos poistetaan ja membraania pestään kolmesti 1xWash Buffer -pesuliuoksella 10 min ravistelussa huoneenlämmössä.
5. Array Buffer 5:llä laimennetaan Streptavidin-HRP -liuos (1:2000) ja membraania inkuboidaan siinä 30 min ravistelussa huoneenlämmössä.
6. Membraania pestään kuten kohdassa 4.
7. Kemiluminesenssireagenssit sekoitetaan 1:1 ja membraania inkuboidaan 1 ml:ssä tätä seosta 1 min huoneenlämmössä.

Liite 3

RNA:n eristys RNeasy Mini kitillä (Qiagen)

1. Lisätään kerättyyn solunäytepellettiin 350 µl RLT-puskuria
2. Lisätään 350 µl 70 % etanolia ja sekoitetaan pipetoimalla edestakaisin
3. Siirretään 700 µl näytettä kitin mukana tulevaan RNeasy Mini pyörityskolonneihin, joka asetetaan 2 ml keräysputkeen.
4. Sentrifugoidaan 15 s 10 000 g. Heitetään neste pois keräysputkesta.
5. Lisätään 700 µl RW1-puskuria ja sentrifugoidaan 15 s 10 000 g.
6. Pestään lisäämällä 500 µl RPE-puskuria ja sentrifugoidaan 15 s 10 000 g.
7. Pestään lisäämällä 500 µl RPE-puskuria ja sentrifugoidaan 2 min 10 000 g.
8. Siirretään RNeasy mini pyörityskolonneihin puhtaaseen 2 ml keräysputkeen ja sentrifugoidaan 1 min 10 000 g membraanin kuivaamiseksi.
9. Eluoidaan kahdesti 30 µl RNAasi vapaalla vedellä 1 min 10 000 g.

Liite 4

cDNA:n valmistus RNA:sta High Capacity RNA-to-cDNA kitillä (appliedbiosystems)

1. Valmistetaan reaktioliuos oheisen taulukon mukaan.
2. Spinnattiin putket
3. Inkuboitiin reaktiota 60 min 37 °C ja pysäytettiin reaktio lämmittämällä putkia 5 min 95 °C ja jäädytettiin sitten 4 °C
4. Säilöttiin – 20 °C

Ainesosa	Määrä (µl)
2x RT-puskuri	10
20x Entsyymisekoitus	1
RNA näyte	9
Nukleaaasivapaa vesi	0
Yhteensä	20

Liite 5

Sytokiini-RT-qPCR näytteiden valmistelu ja RT-qPCR ohjelma

1. Valmistetaan reaktioliuos oheisen taulukon mukaan.
2. Ajettiin RT-qPCR oheisen taulukon kertoman ohjelman mukaan.

Ainesosa	Määrä (µl)
2x Master Mix	10
20x Expression Assay	1
cDNA näyte	5
Steriili vesi	4
Yhteensä	20

Vaihe	Aika	Lämpötila	Kerrat
Reaktion valmisteluvaihe	2 min	50 °C	x1
DNA:n alkudenaturaatio	10 min	95 °C	x1
DNA:n denaturaatio	15 s	95 °C	x40
Sytokiinitunnistimen sitoutuminen ja ketjun pidentyminen	1 min	60 °	

Liite 6

RNA:n eristäminen Qiagenin QIAamp® Viral RNA mini spin -kitillä

1. 140 µl virusnäytettä sekoitetaan 15 s vorteksoinnilla 560 µl ALV-puskuria, johon on lisätty Carrier RNA
2. Inkuboidaan 10 min huoneenlämmössä
3. Lisätään 560 µl 99%:sta etanolia ja sekoitetaan vorteksoiden
4. Siirretään 630 µl näytettä QIAamp column -putkeen.
5. Sentrifugoidaan 1 min 8000 rpm
6. Toistetaan vaiheet 4 ja 5.
7. Pylvään membraani pestään 500 µl:lla AW1-puskurilla, joka sisältää 99 % etanolia.
8. Sentrifugoidaan 1 min 8000 rpm
9. Pylvään membraani pestään AW2-puskurilla.
10. Sentrifugoidaan 3 min 13200 rpm.
11. RNA eluoidaan pylvään membraanilta 60 µl:lla AVE-liuosta, jonka annetaan inkuboitua 1 min ennen sentrifugointia 1 min 8000 rpm.

Liite 7

cDNA:n valmistaminen kasvatusliuosnäytteistä eristetystä viruksen RNA:sta.

1. Valmistettiin oheisen taulukon perusteella näyteliuos.
2. Inkuboitii 60 min 37 °C
3. Inkuboitii 15 min 70 °C
4. Säilytettiin +4 °C

Reagenssi	Määrä
RNA näyte	5 µl
M-MLV RT transkriptaasientsyymi	0,1 µl
5 xM-MLV RT reaktiopuskuri	4 µl
Rnaasi RiboLock RI	0,1 µl
dNTP (10 mM)	4 µl
Reverse aluke	0,4 µl
Steriili vesi	6,4 µl
Yhteensä	20 µl

Liite 8

RT-qPCR näytteiden valmistus, alukkeet ja RT-qPCR ohjelma

1. Valmistettiin näyteliuos oheisen taulukon mukaan.
2. Ajettiin RT-qPCR oheisen taulukon ohjelmalla.

Aluke	Sitoutumis lämpötila	Sekvenssi
HPeV-F31 Reverse	54,5 °C	3'- CTGGGGCCAAAAGCCA -5'
HPeV-K30 Forward	54,5 °C	3'- GGTACCTTCTGGGCATCCTTC -5'
ENRI (4-) Reverse	54,5 °C	3'- GAAACACGGACACCCAAAGTA -5'
ENRI (3+) Forward	54,5 °C	3'- CGGCCCTGAATGCGGCTAA -5'

Reagenssi	Määrä
Maxima SYBR Green / KAPA SYBR FAST Universal Mix	12,5 µl
aluke Fw (10 pmol/µl) ENRI: 3+ / HPeV: K30	0,5 µl
aluke Re (10 pmol/µl) ENRI: (4-) / HPeV: F31	0,5 µl
Templaatti DNA (cDNA)	5,0 µl
Steriili vesi	6,5 µl
Yhteensä	25 µl

Vaihe	Aika	Lämpötila	Toistot
1. DNA:n alkudenaturaatio	5 min	95 °C	x1
2. DNA:n denaturaatio	10 s	95 °C	x45
3. Alukkeiden sitoutuminen	20 s	60 °C	
4. Ketjujen pidentyminen	20s	72 °C	
5. Ketjujen lopullinen pidentyminen		72°C→95°C, 0,5 °C/s	x1
6. Näytteen säilöntä.	∞	4 °C	

Liite 9

Proteome Profiler membraanin sytokiinikartta ja membraanikaavio.

Pisteet	Vaihtoehtoiset pisteet	Kohde
A1, A2	-	Referenssi
A3, A4	A13, A14	CCL1
A5, A6	D9, D10	CCL2
A7, A8	D13, D14	MIP-1 α
A9, A10	E3, E4	CCL5
A11, A12	A5, A6	TNFSF5
A13, A14	A3, A4	C5a
A15, A16	A11, A12	CXCL1
A17, A18	D5, D6	CXCL10
A19, A20	-	Referenssi
B3, B4	D7, D8	CXCL11
B5, B6	E5, E6	CXCL12
B7, B8	A7, A8	G-CSF
B9, B10	A9, A10	GM-CSF
B11, B12	A15, A16	CD54
B13, B14	A17, A18	IFN- γ
B15, B16	B3, B4	IL-1 α
B17, B18	B5, B6	IL-1 β
C3, C4	B7, B8	IL-1ra
C5, C6	B9, B10	IL-2
C7, C8	B11, B12	IL-4
C9, C10	B13, B14	IL-5
C11, C12	B15, B16	IL-6
C13, C14	B17, B18	IL-8
C15, C16	C3, C4	IL-10
C17, C18	C5, C6	IL12p70
D3, D4	C7, C8	IL-13
D5, D6	C9, C10	IL-16
D7, D8	C11, C12	IL-17A
D9, D10	C13, C14	IL-17E
D11, D12	-	IL-18
D13, D14	-	IL-21
D15, D16	C17, C18	IL-27
D17, D18	D3, D4	IL-32 α

E1, E2	E1, E2	Referenssi
E3, E4	D11, D12	MIF
E5, E6	D17, D18	Serpin E1
E7, E8	E7, E8	TNF-1
E9, E10	E9, E10	TREM-1
E19, E20	E19, E20	Negatiivinen kontrolli

Proteome Profiler membraanin koordinaatit

