

Infektiivisen pikornaviruksen tuottaminen virus-RNA:sta

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Biokemian laitos
Biokemia
Tammikuu 2018

Tero Kallio

Ohjaajat:
FT, dosentti Petri Susi
FT Pirjo Merilahti
Turun yliopisto / Virusoppi

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

TURUN YLIOPISTO

Biokemian laitos

KALLIO, TERO: Infektiivisen pikornaviruksen tuottaminen virus-RNA:sta

Pro gradu -tutkielma, 75 s.

Biokemia

Tammikuu 2018

Pikornavirukset ovat vaipattomia RNA-virusia, joiden genomi muodostuu yksinauhaisesta positiivissäikeisestä RNA:sta. Pikornavirukset kuuluvat *Picornaviridae*-heimoon ja ne ovat yleisimpiä ihmisen taudinaiheuttajia. Suurin osa pikornavirusinfektioista on oireettomia. Tyypillisin oireinen tauti on nuhakuume, mutta tämän lisäksi pikornavirukset aiheuttavat laajan kirjon vakavampia tautitiloja kuten aivokalvontulehdusta, velttohalvausta ja maksa- ja sydänlihastulehdusta. Työn tavoitteena oli selvittää, miten viruksesta tehdystä cDNA-kloonista saadaan tuotettua uusia lisääntymiskykyisiä viruspartikkeleita. Tätä tutkittiin transfektoimalla soluihin joko suoraan virusgenomin sisältävää rengasmaista plasmidia (cDNA-kloonina) tai sen linearisoitua muotoa (linearisointi tapahtui virusgenomin 3'-päästä), samasta plasmidista tuotettua *in vitro* -transkriptoitua RNA:ta (IVT-RNA) tai samasta plasmidista tuotettua PCR-tuotetta. Viruksen lisääntymistä havainnoitiin immunofluoresenssimikroskopiolla. Kaikki neljä cDNA-muotoa tuottivat yllättäen lisääntymiskykyisiä virusia. Tuottomenetelmiä käytettiin muokattujen virusten ominaisuuksien tutkimiseen. Tutkittavina virusina käytettiin pikornavirus-sukuun kuuluvia ihmisen parechovirus 1:tä (HPeV-1) ja sen mutanttimuotoa HPeV-1-RGDdel, jonka genomista on poistettu kolmen aminohapon pituinen RGD-alue, ja coxsackievirus A9 -kantaa (CV-A9) ja tämän mutanttimuotoa CV-A9-eGFP, jossa virusgenomiin on lisätty eGFP:tä eli vihreää fluoresoivaa proteiinia tuottava geeni. RGD-alueen vaikutusta HPeV-1-viruksen infektiokykyyn tutkittiin ihmisen keuhkokarsinoomasoluilla. RGD-alueella näytti olevan selvä vaikutus infektiokykyyn, koska HPeV-1-villityyppi kykeni infektoimaan solut, kun taas HPeV-1-RGDdel ei kyennyt. CV-A9-eGFP-infektiota seurattiin reaaliajassa EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla kahdessa solulinjassa: ihmisen keuhkokarsinoomasoluissa ja viherapinan munuaissoluissa. Viruksen etenemisen kuvantaminen reaaliaikaisesti osoittautui mahdolliseksi käytetyillä koeasetelmilla.

Asiasanat: pikornavirukset, cDNA-kloonin, transfektio, fluoresenssimikroskopia

Sisällys

1	Johdanto	5
2	Kirjallisuuskatsaus	8
2.1	Pikornavirusten jaottelu - taksonomia.....	8
2.2	Pikornaviruspartikkelin rakenne.....	10
2.3	Pikornavirusten genomi.....	11
2.4	Pikornavirusten infektiocykli	12
2.4.1	Pikornavirusten ja solureseptorien väliset vuorovaikutukset.....	14
2.4.2	Pikornavirusten tavat kiinnittyä eri reseptoreihin	17
2.4.3	Pikornaviruksen siirtyminen solun sisään endosytoottisesti.....	18
2.4.4	Pikornaviruksen translaatio sekä virus-RNA-synteesi	19
2.5	Virusten eteneminen solukossa	21
2.6	Pikornavirusten tuottaminen cDNA-klooneista ja genomin muokkaus virustutkimuksessa	23
2.7	Pikornavirusten nopea muuntuminen.....	26
2.8	Pikornavirukset patogeeneinä ja virustautien ehkäiseminen rokotteilla	28
2.9	Pikornavirusvektorit terapeuttisessa käytössä.....	30
3	Työn tavoitteet	32
4	Materiaalit ja menetelmät.....	33
4.1	Käytetyt plasmidit	33
4.2	Plasmidien linearisointi	33
4.3	<i>In vitro</i> -transkriptoidun RNA:n valmistus	33
4.4	T7-PCR-tuotteiden amplifikointi LR-PCR:llä	35
4.5	Transfektiot nisäkässoluihin ja transfektiotehokkuuden määrittäminen	36
4.6	LR-PCR-tuotteiden kloonaukseen Zero Blunt -PCR-kloonauksitillä.....	37

4.7	HPeV-1- ja HPeV-1-RGDdel-virusten infektiivisyyden tutkiminen	40
4.8	Infektion etenemisen kuvaaminen reaaliaikaisesti	41
5	Tulokset.....	44
5.1	IVT-RNA:n ja T7-PCR-amplikonien tuottaminen.....	44
5.2	Transfektiotehokkuuden määrittäminen	46
5.3	T7-PCR-tuoteiden kloonaukseen Zero Blunt -vektoriin.....	51
5.4	RGD-alueen vaikutus HPeV-1:n infektiokykyyn.....	53
5.5	Infektion etenemisen tutkiminen reaaliajassa CV-A9-eGFP-viruksella	56
6	Tulosten tarkastelu	59
6.1	Transfektiokoekset.....	59
6.1.1	Plasmidin säätelyalueiden vaikutuksen tutkiminen	61
6.2	HPeV-1:n RGD-osan vaikutus viruksen infektiokykyyn	62
6.3	CV-A9-eGFP-viruksen etenemisen kuvantaminen reaaliaikaisesti	64
7	Päätelmät.....	68

Lyhenteet:

A549	Ihmisen epiteelikeuhkokarsinoomasolulinja
AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
BSA	Naudan seerumin albumiini-proteiini, "bovine serum albumin"
CAR	Coxsackie- ja adenovirusreseptori
cDNA	Komplementaarinen DNA, "complementary DNA"
CMV	Ihmisen cytomegalovirus
CPE	Sytopaattinen vaikutus, "cytopathic effect"
CV-A9	Coxsackievirus A9
CV-A21	Coxsackievirus A21
DAF	Solupinnan reseptoriproteiini, "decay accelerating factor"
DMEM	Soluviljelyliuos, "Dulbeccos' s modified Eagle' s media"
eGFP	Tehostettu vihreää fluoresoiva proteiini, "enhanced green fluorescent protein"
eIF	Eukaryoottinen aloitustekijä, "eukaryotic initiation factor"
EV-A71	Enterovirus A71
FDA	Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto, "Food and Drug Administration"
FMDV	Suu- ja sorkkatautivirus, "foot-and-mouth disease virus"
GMK	Viherapinan munuaissolulinja, "green monkey kidney cell line"
HPeV-1	Ihmisen parechovirus 1, "human parechovirus 1"
ICAM-1	Solupinnan reseptoriproteiini, "intracellular adhesion molecule"
ICTV	Kansainvälinen komitea virusten luokitteluksi, "International committee on taxonomy of viruses"
IFA	Immunofluoresenssitesti, "immunofluorescence assay"

Ig	Immunoglobuliini
IPV	Inaktivoitu poliorokote, "inactivated polio vaccine"
IRES	Geeninsisäinen ribosomin sitoutumisalue, "internal ribosome entry site"
IVT-RNA	<i>In vitro</i> -transkriptoitu RNA
kDa	Kilodalton
KO	Poistogeeninen, "knock-out"
LDLR	Alhaisen tiheyden lipoproteiinireseptori, "low density lipoprotein receptor"
LRP	LDLR:n kaltainen proteiinireseptori, "LDLR-like receptor"
LR-PCR	Koko virusgenomin kattava PCR, "long-range PCR"
MHC-I	MHC-I-molekyyli, "major histocompatibility complex class I molecule"
OPV	Suun kautta otettava poliorokote, "oral poliovirus vaccine"
PBS	Fosfaattipuskuroitu saliini, "phosphate buffered saline"
PCR	Polymeraasiketjureaktio, "polymerase chain reaction"
PVR	Poliovirusreseptori, "poliovirus receptor"
RFP	Punaista fluoresoiva proteiini, "red fluorescent protein"
RGD	Arginiini-glysiini-asparagiinihappo
RT-qPCR	Kvantitatiivinen käänteistranskriptaasi-PCR, "quantitative reverse transcriptase-PCR"
T1D	Tyypin 1 diabetes
UTR	Ei-transloitu alue, "untranslated region"
VLDLR	Hyvin alhaisen tiheyden lipoproteiinireseptori, "very low density lipoprotein reseptor"
VPg	"Genome linked viral protein"

1 Johdanto

Pikornavirukset ovat pienikokoisia vaipattomia viruksia, joiden genomi muodostuu yhdestä positiivissäikeisestä RNA-molekyylistä. Pikornavirukset aiheuttavat monia erilaisia tauteja ihmisille ja nisäkkäille. Yleisimmät pikornavirusten aiheuttamat taudit kuten nuhakuume ovat lieviä, mutta ne voivat aiheuttaa myös paljon vakavampia sairauksia kuten velttohalvausta ja sydän- ja aivokalvontulehdusta. (Tuthill ja muut 2010.)

Perinteisessä virustutkimuksessa viruksen ominaisuuksia voidaan tutkia muokkaamalla sen genomia. Koska pikornavirukset ovat RNA-viruksia, niiden RNA-genomi tulee kääntää DNA-muotoon, ns. cDNA-klooniksi (eng. complementary DNA), jotta sitä voidaan muokata (Hou ja muut 2015). Aikaisemmin pikornavirusten cDNA-kloonit rakennettiin käyttäen monivaiheisia kloonausmenetelmiä, joissa virusgenomi kloonattiin pala palalta plasmidirunkoon (Heikkilä ja muut 2011). Nykyään cDNA-kloonien tekemiseen käytetään selvästi nopeampia menetelmiä, joissa pikornaviruksen koko RNA-genomi käänteiskopioidaan yksinauhaiseksi cDNA:ksi, josta voidaan tuottaa kaksinauhainen DNA-juoste entsyymaattisin keinoin tai PCR-monistuksen avulla, ja kloonata tämä geenivektoriin (Hou ja muut 2015; Yang ja muut 2015). Infektiiviset cDNA-kloonit mahdollistavat virusten geenien muokkaamisen, mikä taas mahdollistaa viruksen molekyylibiologian, replikaation ja rakennetutkimuksen ja esim. turvallisten rokotteiden kehittämisen (Hou ja muut 2015).

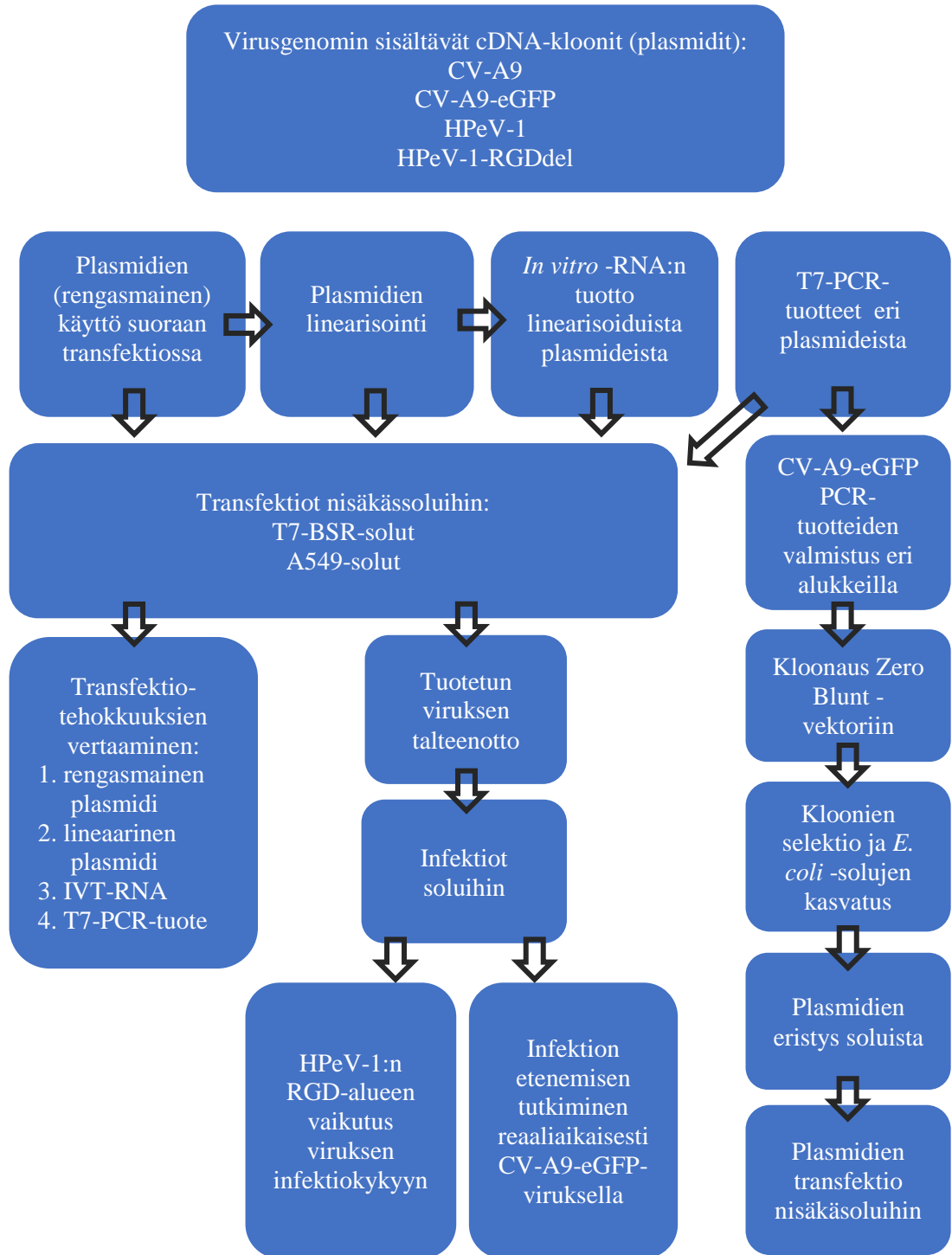
Työn päätavoite oli selvittää, kuinka infektiivisiä pikornaviruksia voidaan tuottaa käyttäen cDNA-kloonina lähtömateriaalina. Työssä käytettiin kahta eri pikornavirusgenomin sisältävää cDNA-kloonina: coxsackievirus A9 (CV-A9) ja sen muokattu muoto, CV-A9-eGFP-virus, jossa CV-A9-viruksen genomiin oli lisätty vihreää fluoresoivaa proteiinia (eGFP) tuottava geeni. Työssä pyrittiin selvittämään, voidaanko viruspartikkeleita tuottaa transfektoimalla virusgenomi nisäkäsoluihin suoraan rengasmaisena plasmidina tai sen linearisoituna muotona, käyttämällä cDNA-kloonista tuotettua *in vitro* -transkriptoitua RNA:ta (IVT-RNA) tai rengasmaisesta plasmidista tuotettua PCR-tuotetta.

Transfektiotehokkuustutkimuksen rinnalla tuotettiin myös toista pikornavirusta, ihmisen parechovirus 1:stä (HPeV-1), jolla pyrittiin selvittämään HPeV-1:n kapsidiproteiinissa

olevan RGD-tripeptidin (arginiini-glysiini-asparagiinihappo) roolia viruksen ja isäntäsolun välisessä vuorovaikutuksessa. HPeV-1:n RGD-alueen vaikutusta viruksen infektiokykyyn tutkittiin käyttämällä muokkaamatonta virusta ja sen mutanttimuotoa (HPeV-1-RGDdel) (Hughes ja muut 1995), josta oli poistettu RGD-aluetta koodaava geenialue. RGD-alueen vaikutusta infektiioon tutkittiin vertailemalla kyseisten virusten aiheuttamia infektiota rinnakkain saman solulinjan soluihin. Hypoteesina oli, että HPeV-1 tarvitsee RGD-aluetta kiinnittyäkseen solun reseptoriin infektoidakseen solun.

CV-A9-eGFP-virusinfektiota seurattiin myös reaaliaikaisesti käyttäen EVOS FL AUTO-fluoresenssimikroskooppia. Virusinfektion aikana soluihin tuottuu liukoista eGFP-proteiinia, mikä mahdollistaa viruksen etenemisen kuvaamisen reaaliaikaisesti, sillä soluja ei tarvitse erikseen käsitellä esimerkiksi leimatuilla vasta-aineilla viruksen havaitsemiseksi. Kuvantamisessa käytettiin kontrolleina sekä CV-A9-villityyppiä että pelkkää solukontrollia, joissa kummassakaan ei ollut havaittavissa eGFP:n tuottamaa vihreää fluoresenssia.

Työn aikana tehdyissä transfektiokokeissa havaittiin, että CV-A9-eGFP:tä saatiin tuotettua transfektoimalla cDNA-klooni suoraan rengasmaisena plasmidina soluille. Tämän takia päätettiin selvittää, kuinka cDNA-kloonin virusgenomin edessä olevat erilaiset säätelyalueet ja niiden sijainnit vaikuttavat viruspartikkelien muodostumiseen solutransfektiossa. Säätelyalueiden tutkiminen toteutettiin kehittämällä erilaisia pitkiä PCR-alukkeita, joissa mukanaolevat säätelyalueet ja niiden sijainnit vaihtelivat suhteessa virusgenomiin. Näillä alukkeilla monistettiin erilaisia koko genomin mittaisia PCR-tuotteita käyttäen templaattina CV-A9-eGFP-viruksen plasmidia. PCR-tuotteet kloonattiin uusiin plasmideihin ja uudet kloonit transfektoitiin soluille, minkä jälkeen eri kloonien transfektiotehokkuuksia pyrittiin vertaamaan toisiinsa. Kuvassa 1. on esitetty työn vaiheet vielä prosessikaavion avulla.



Kuva 1. Prosessikaavio tutkimuksen etenemisestä. Kuvassa on esitetty työn eri vaiheet ja tutkimushaarat kaaviomuodossa.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Pikornavirusten jaottelu - taksonomia

Pikornavirukset kuuluvat *Picornavirales*-lahkon *Picornaviridae*-heimoon, johon kuuluu kirjoitushetkellä 80 eri lajia, jotka on ryhmitelty 35 suvun alle (International Committee on Taxonomy of Viruses [www], viitattu 23.10.2017). Pikornavirusten eri viruslajit jaetaan vielä eri virustyypppeihin (International Committee on Taxonomy of Viruses [www], viitattu 23.10.2017).

Tässä työssä käytettiin *Parechovirus*- ja *Enterovirus*-suvun viruksia, joista molemmista yhtä tyyppiä ja kantaa. *Parechovirus*-suvun tyyppi oli ihmisen parechovirus 1:n (HPeV-1) Harris-kanta ja *Enterovirus*-suvun virus oli coxsackievirus A9:n (CV-A9) Griggs-kanta. Esimerkkinä taksonomisesta jaottelusta voidaan esittää CV-A9, joka jaotellaan seuraavasti: Lahko: *Picornavirales*, heimo: *Picornaviridae*, suku: *Enterovirus*, laji: *Enterovirus B*, tyyppi: ihmisen coxsackievirus A9, isolaatti: Griggs-kanta. Pikornavirusten taksonomiaa on esitelty tarkemmin seuraavan sivun taulukossa 1.

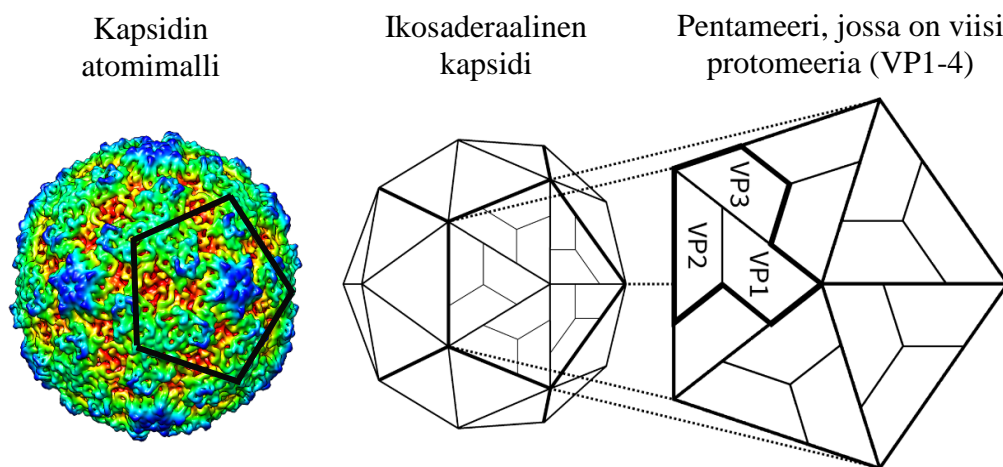
Taulukko 1. Pikornavirusten taksonominen jaottelu.

Heimo (35 kpl)	Lajien määrä (80 kpl)	Esimerkki lajista	Työssä käytetty tyyppi
<i>Ampivirus</i>	1	<i>Ampivirus A</i>	
<i>Aphtovirus</i>	4	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>	
<i>Aquamavirus</i>	1	<i>Aquamavirus A</i>	
<i>Avihepatovirus</i>	1	<i>Avihepatovirus A</i>	
<i>Avisivirus</i>	3	<i>Avisivirus A</i>	
<i>Cardiovirus</i>	3	<i>Cardiovirus A</i>	
<i>Cosavirus</i>	5	<i>Cosavirus A</i>	
<i>Dicipivirus</i>	1	<i>Cacidivirus A</i>	
<i>Enterovirus</i>	13	<i>Enterovirus B</i>	coxsackievirus A9
<i>Erbovirus</i>	1	<i>Erbovirus A</i>	
<i>Gallivirus</i>	1	<i>Gallivirus A</i>	
<i>Harkavirus</i>	1	<i>Harkavirus A</i>	
<i>Hepatovirus</i>	9	<i>Hepatovirus A</i>	
<i>Hunnivirus</i>	1	<i>Hunnivirus A</i>	
<i>Kobuvirus</i>	6	<i>Aichivirus A</i>	
<i>Kunsagivirus</i>	1	<i>Kunsagivirus A</i>	
<i>Limnipivirus</i>	3	<i>Limnipivirus A</i>	
<i>Megrivirus</i>	1	<i>Melegrivirus A</i>	
<i>Mischivirus</i>	3	<i>Mischivirus A</i>	
<i>Mosavirus</i>	1	<i>Mosavirus A</i>	
<i>Oscivirus</i>	1	<i>Oscivirus A</i>	
<i>Parechovirus</i>	4	<i>Parechovirus A</i>	ihmisen parechovirus 1
<i>Pasivirus</i>	1	<i>Pasivirus A</i>	
<i>Passerivirus</i>	1	<i>Passerivirus A</i>	
<i>Potamipivirus</i>	1	<i>Potamipivirus A</i>	
<i>Rabovirus</i>	1	<i>Rabovirus A</i>	
<i>Rosavirus</i>	1	<i>Rosavirus A</i>	
<i>Sakobuvirus</i>	1	<i>Sakobuvirus A</i>	
<i>Salivirus</i>	1	<i>Salivirus A</i>	
<i>Sapelovirus</i>	3	<i>Avian sapelovirus</i>	
<i>Senecavirus</i>	1	<i>Senecavirus A</i>	
<i>Sicinivirus</i>	1	<i>Sicinivirus A</i>	
<i>Teschovirus</i>	1	<i>Teschovirus A</i>	
<i>Torchivirus</i>	1	<i>Torchivirus A</i>	
<i>Tremovirus</i>	1	<i>Tremovirus A</i>	

*Lähde: International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV: www.ictvonline.org,
Virus Taxonomy: 2016 release. Viitattu 23.10.2017.

2.2 Pikornaviruspartikkelin rakenne

Pikornavirukset ovat pienikokoisia vaipattomia viruksia, joiden genomi muodostuu yhdestä positiivisäikeisestä RNA:sta. Pikornaviruksen kapsidin ulkohalkaisija on tyypillisesti noin 30 nm. Pikornavirusten kapsidi koostuu 60 protomeerista, joista kukin muodostuu neljästä eri rakenneproteiinista: VP1, VP2, VP3 ja VP4. Viiden protomeerin ryhmä muodostaa pentagonin muotoisen pentameerin ja kaksitoista pentameeria muodostavat lopulta valmiin ikosahedraalisen kapsidin (kuva 2.). (Hogle ja muut 1985, Rossmann ja muut 1985.)



Kuva 2. Pikornaviruksen rakennekuva. Kuvassa vasemmalla on esitetty tyypillisen enteroviruksen kapsidin atomimalli. Oikealla on kuvattu kapsidin rakenne skemaattisesti. VP1-VP4-proteiinit muodostavat protomeerin (kapsidissa kaikkiaan 60 kpl), viisi protomeeria muodostavaa pentameerin ja 12 pentameeria muodostavat lopulta ikosahedraalisen kapsidin (keskellä). Protomeerin VP4-proteiini sijaitsee partikkelin sisäpinnalla, eikä siksi näy kuvassa. (Muokattu Ylä-Pelto ja muut 2016.)

Viruspartikkelin kehittyessä, VP0-kapsidiproteiini leikkaantuu VP4- ja VP2-komponenteiksi virionin kypsymisen viimeisessä vaiheessa (Rossmann ja muut 1985). Viruksen kehittymisen loppuvaiheessa tapahtuvaa VP0-proteiinin leikkaantumista ei kuitenkaan esiinny kaikilla pikornaviruksilla, vaan esimerkiksi parechoviruksilla VP0-proteiini pysyy ehjänä ja kehittynyt virioni sisältää vain kolme rakenneproteiinia: VP0, VP1 ja VP3 (Stanway ja Hyypiä 1999).

VP1-, VP2-, VP3- ja VP4-rakenneproteiinien sekvenssit eroavat toisistaan, joten ne eivät ole homologisia toistensa kanssa. VP4-proteiini eroaa kolmesta muusta proteiinista selvästi eniten. Esimerkiksi polioviruksen VP1-proteiini koostuu 306 aminohaposta (~ 33 kDa), VP2 272 aminohaposta (~ 30 kDa), VP3 238 aminohaposta (~ 26 kDa) ja VP4 69

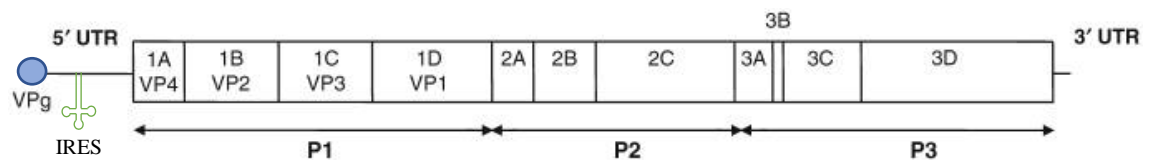
aminohaposta (~ 7,5 kDa). (Hogle ja muut 1985.) VP1-, VP2- ja VP3-proteiinit ovat kuitenkin perusrakenteeltaan samankaltaisia ja ne muodostuvatkin nuolen mallisesta kahdeksansäikeisestä β -tynnyrirakenteesta, jossa β -tynnyrit ovat linkittyneet toisiinsa eri pituisten luuppien avulla. Luoppien pituudet ja β -tynnyrien kallistuneisuudet määrittelevät pitkälti viruspartikkelin pinnan topologian ja sitä kautta myös viruksen reseptorin kiinnittymisspesifisyyden sekä antigeeniset ominaisuudet. (Tuthill ja muut 2010.)

2.3 Pikornavirusten genomi

Pikornavirusten genomi muodostuu yhdestä positiivissäikeisestä RNA-molekyylistä, jonka pituus on noin 7000-8500 nukleotidiä. Virus-RNA:n infektiivisyys perustuu siihen, että se käyttäytyy samalla tavoin kuin mRNA eli siitä transloidaan pitkä polyproteiini, joka pilkotaan replikaatiossa ja virusrakenteessa tarvittaviksi proteiineiksi. (Tuthill ja muut 2010; Racaniello 2013.) Pikornavirusten genomirakenne ja orientaatio ovat hyvin konservoituneet. Genomin 5'-päässä on kovalenttisesti kiinnittynyt pieni VPg-peptidi (eng. genome-linked protein). VPg koodataan yhden virusgeenin toimesta, ja sen pituus pikornaviruksesta riippuen vaihtelee 22-24 aminohapon välillä. (Flanegan ja muut 1977.) VPg vastaa pikornaviruksen RNA-synteesin aloitusvaiheesta toimimalla proteiini-primerina, joihin RNA-polymeraasit voivat kiinnittyä aloittaakseen RNA-synteesin (Paul ja muut 1998; Paul ja Wimmer 2015). Pikornavirusten genomin 3'-päässä on taas useiden perättäisten adeniini-emästen muodostama polyA-osa, minkä pituus vaihtelee viruksesta riippuen (Tuthill ja muut 2010; Racaniello 2013).

Genomissa on vain yksi avoin lukukehys eli ORF (eng. open reading frame), jonka molemmilla puolilla on omat translaation osallistumattomat UTR-alueet (eng. untranslated region). 5'-pään UTR-alue on hyvin pitkä, noin 600-1200 nukleotidia ja se sisältää monia tärkeitä replikaation ja translaation osallistuvia säätelyelementtejä. (Tuthill 2010; Racaniello 2013.) Yksi sen tärkeistä säätelyelementeistä on IRES-kohta (eng. internal ribosome entry site), joka toimii ribosomin tarttumismiskohtana ja ohjaa vuorovaikutuksillaan mRNA:n translaatiota ja sen aloittamista (Paul ja muut 1998). Pikornavirusten IRES tarvitsee useita eri säätelyproteiineja translaation aloittamiseksi, joita ovat esimerkiksi erilaiset eIF-tekijöiden (eng. eukaryotic initiation factor) muodostamat translaationaloituskompleksit (Avanzino ja muut 2017). Genomin

translaatioissa tuotetaan aluksi yksi pitkä aminohappoketju, polyproteiini, joka leikataan viruksen koodaamien proteaasien toimesta pienemmiksi proteiineiksi. Viruksen rakenteelliset proteiinit sijaitsevat polyproteiinin N-terminaalisen alueen ensimmäisen kolmanneksen sisällä (VP1-4), kun taas loppupäässä sijaitsee proteiinit, jotka vastaavat solun olosuhteiden muokkaamisesta optimaaliseksi viruksen replikaatiolle (2A-C ja 3A-D). Pikornaviruksesta riippuen rakenteellinen prekursoriproteiini voi olla suoraan polyproteiinin N-terminaalisen pään perässä, tai sen edessä voi olla lisäksi ei-rakenteellinen proteiinisekvenssi. Genomin 3'-päässä oleva UTR-alue on taas verrattain lyhyt, vain noin 40 – 330 nukleotidin pituinen. (Tuthill ja muut 2010.) Kuvassa 3. on esitetty enteroviruksen genomi havainnollistavana laatikkojanana.



Kuva 3. Enteroviruksen genomi ja siitä koodattavat proteiinit. Laatikoitu alue kuvaa avointa lukukehystä, jonka molemmissa päissä on UTR-alue (eng. untranslated region), jota ei siis transloida. Translaation ja proteolyttisen käsittelyn jälkeen muodostuu tuotteet P1, P2 ja P3. P1-polyproteiini on viruksen kapsidin esiaste, joka sisältää valmiista kapsidista löytyvät VP1-4-rakenneproteiinit. P2- ja P3-alueiden proteiinit taas osallistuvat polyproteiinin prosessointiin, isäntäsolun ympäristön muuttamiseen ja RNA-genomin replikaatioon. Eri pikornavirussukujen viruksien välillä on pieniä eroavaisuuksia. (Muokattu Tuthill ja muut 2010.)

2.4 Pikornavirusten infektiocykli

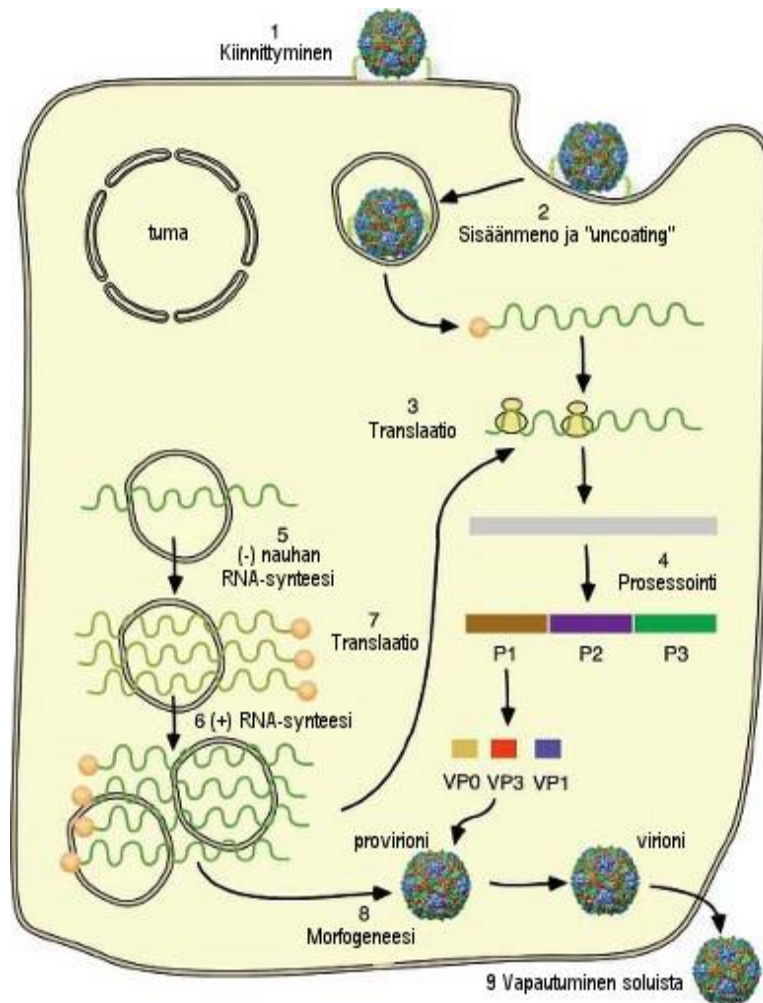
Pikornavirusten infektiocykli alkaa, kun virus tunkeutuu solun sisään. Tämä tapahtuu yleensä viruksen kiinnittymisellä isäntäsolun pinnalla olevaan reseptoriin tai reseptoreihin, joilla on tärkeä rooli myös solusignaaloinnissa ja endosytoosissa. Yleisesti ottaen pikornavirusten reseptorispesifisyys vaihtelee sekä sukujen että lajien välillä. Enterovirusten virus-reseptorivuorovaikutuksia on tutkittu eniten. (Tuthill ja muut 2010; Racaniello 2013.)

Kun pikornavirus on kiinnittynyt solun reseptoriin, virus siirtyy solun sisään endosytoottisen vesikkelin sisällä. Eri virussukujen tiedetään käyttävän erilaisia tapoja solukalvon läpäisyyn ja monia eri endosytoosipolkuja onkin identifioitu. Yksi parhaiten tunnetuista pikornavirusten endosytoosimekanismeista on klatriinivälitteinen endosytoosi, jossa ligandi, kuten virus, pääsee solun sisään klatriinipäällysteisten vesikkelien välityksellä. Vesikkelistä poistetaan kuitenkin lopulta klatriinipäällyste ja

vesikkeli muuttuu varhaiseksi endosomiksi. Toinen hyvin tunnettu endosytoosireitti on kaveoliinivälitteinen endosytoosi, joka taas on riippuvainen solumembraanilla olevista lipidilautoista ja kolesteroleista. (O'Donnell ja muut 2008; Tuthill ja muut 2010; Racaniello 2013.)

Pikornaviruksen päästyä endosyyttisesti solun sisään, se vapauttaa RNA-genominsa sytoplasmaan. Kyseistä prosessia kutsutaan englanniksi uncoating-vaiheeksi ja se tapahtuu viruksen vesikulaarisessa kulkeutumisvaiheessa. (Tuthill ja muut 2010). Uncoating-mekanismiin tarkkaa toimintaperiaatetta ei vielä tunneta. Mekanismista kuitenkin tiedetään, että viruksen kulkeuduttua solun sisään, kapsidien pintaproteiineissa tapahtuu konformaatiomuutoksia, joiden seurauksena kapsidiin syntyy huokosia, joiden kautta viruksen RNA vapautuu sytoplasmaan (Shakeel ja muut 2013). Vapautuneesta virus-RNA:sta (vRNA) syntetisoidaan translaatiossa polyproteiini, joka leikataan autokatalyyttisesti proteiineiksi, jotka ovat välttämättömiä sekä genomien replikaatiolle että uusien viruspartikkelien tuottamiselle. Proteiinien leikkaantuminen tapahtuu pääasiassa, 2A^{pro} ja 3C^{pro} tai 3CD^{pro} virusproteiinien toimesta. Syntetisoitujen virusproteiinien joukkoon kuuluvat RNA:sta riippuvat RNA-polymeraasit sekä erilaiset avustajaproteiinit, joita tarvitaan genomien replikaatiossa ja mRNA-synteesissä. Genomien replikaation ensimmäisessä vaiheessa positiivissäikeinen RNA kopioidaan negatiivissäikeiseksi välituotteeksi, josta seuraavassa vaiheessa tuotetaan taas toinen positiivinen RNA-säie. Nämä vaiheet tapahtuvat sytoplasmassa pienissä membraanivesikkeleissä, jotka on indusoitu monien virusproteiinien toimesta. Kun kapsidiproteiineja on tuotettu tarpeeksi, alkaa viruskapsidin muodostusprosessi. Kuoriproteiinin prekursori P1-proteiini leikataan protomeereiksi, jotka järjestäytyvät rakenteellisiksi pentameereiksi kuten kuvassa 2. on esitetty. Uusi syntetisoitu positiivinen RNA-säie yhdistyy pentameerien kanssa ja muodostaa lopulta infektiivisen viruspartikkelin. (Racaniello 2013.)

Solumallissa yhteen kokonaiseen infektiocykliin menevä aika on noin 7-10 tuntia riippuen esimerkiksi virustyyppistä, lämpötilasta, pH:sta, isäntäsolusta ja viruspartikkelien määrästä (Racaniello 2013). Pikornavirukset vapautuvat isäntäsolusta solun hajotessa, mutta jotkut pikornavirukset voivat vapautua solusta myös ilman sytopaattista efektiä. Äskettäin on esitetty, että virusten vapautuminen ei-sytopaattisesti voisi tapahtua eksosomien välityksellä (Raab-Traub ja Dittmer 2017). Pikornavirusten infektiocyklin eteneminen solussa on esitetty havainnollisesti kuvassa 5.



Kuva 4. Pikornaviruksen replikaatiosykli. (1) Virus kiinnittyy solun reseptoriin/reseptoreihin ja (2) viruksen genomi vapautuu kapsidin sisältä (uncoating). (3) VPg irrotetaan virus-RNA:sta, joka sen jälkeen transloidaan. (4) polyproteiini leikataan yksittäisiksi virusproteiineiksi. RNA-synteesi tapahtuu membraanivesikkeleissä virusproteiinien indusoimana (ei näy kuvassa). (5) Viruksen (+)-säikeinen RNA kopioidaan täysimittaiseksi (-)-nauhaiseksi RNA:ksi virus-RNA-polymeraasin toimesta, (6) joka kopioidaan taas ylimääräiseksi (+)-RNA-säikeeksi. (7) Infektion alkuvaiheessa uudesta (+)-säikeisestä RNA:sta tuotetaan translaatiolla lisää virusproteiineja. Infektion myöhemmissä vaiheissa (+)-säikeet pakkautuvat uusiin viruspartikkeleihin. (9) Uudet syntetisoidut viruspartikkelit vapautuvat solun hajoessa. (Muokattu Racaniello 2013.)

2.4.1 Pikornavirusten ja solureseptorien väliset vuorovaikutukset

Solureseptorit sijaitsevat solun pinnalla ja osallistuvat solusignaalointiin kiinnittymällä erilaisiin solun ulkopuolella sijaitseviin ligandeihin. Reseptoreilla on tärkeä rooli useimpien virusten solun sisäänmenossa. Pikornavirusten kohdalla reseptorit osallistuvat solukiinnittymiseen, signaalointiin ja endosytoosiin, sekä viruskapsidin rakenteellisten muutosten laukaisemiseen viruksen siirtämiseksi solun sisään. Enterovirusten virusreseptorivuorovaikutuksia on tutkittu varsin kattavasti, mutta uudempien sukujen

reseptorivuorovaikutuksia ei vielä tunneta. (Tuthill ja muut 2010; Racaniello 2013.) Solupinnan normaalit molekyylit toimivat pikornavirusreseptoreina, ja monet pikornavirukset käyttävät samaa reseptoria. Joillekin pikornaviruksille, kuten polioviruksille ja rinoviruksille, riittää vain yksi reseptori viruksen siirtymiseksi solun sisään. Toiset virukset tarvitsevat ns. apureseptorin, joka mahdollistaa lopulta viruksen sisäänmenon. (Racaniello 2013.) Esimerkiksi coxsackievirus A21 tarvitsee solun sisäänmenoon ICAM-1-adheesiomolekyylin (eng. intercellular adhesion molecule 1) lisäksi myös DAF-reseptoria (eng. decay-accelerating factor) (Shafren ja muut 1997).

Pikornavirukset käyttävät useiden eri ryhmien solureseptoreja. Seuraavaksi esitetään muutamia reseptoriryhmiä yksityiskohtaisemmin. Immunoglobuliinisuperperheeseen (Ig-superperhe) kuuluvat reseptorit sisältävät useita hyvin mallinnettuja eri enterovirusten käyttämiä reseptoreja. Rinovirukset ovat yleisimpiä nuhakuumeen aiheuttavia viruksia ja useimmat niistä käyttävät ICAM-1-adheesiomolekyyliä reseptorinaan. Soluadheesioproteiini CD155-molekyyli, joka tunnetaan poliovirusreseptorina (PVR), vaikuttaa mm. sikiön kehittymiseen ja syövän edistymiseen. Coxsackie- ja adenovirusreseptorit ovat komponentteja epiteelisolukon solujen välissä olevissa tiiviissä liitoksissa (eng. tight junction). Kaikki edellä mainitut reseptorimolekyylit ovat tyypin 1 membraaniglykoproteiineja, jotka koostuvat solunulkoisista immunoglobuliinin (Ig) kaltaisista alueista, yhdestä solunläpäisevästä alueesta sekä yhdestä solunsisäisestä alueesta. Virusreseptorista riippuen solunulkoisten Ig:n kaltaisten alueiden määrät vaihtelevat, esimerkiksi PVR-reseptoreissa on kolme ja CAR-reseptorissa on kaksi Ig:n kaltaista domeenia. (Tuthill 2010; Racaniello 2013.)

Komplementin kontrolliryhmän reseptoriperheeseen kuuluva DAF-reseptori toimii useiden enterovirusten reseptorina, vaikka se tunnetaankin yleisesti mikrobien reseptorina. DAF-reseptori muodostuu neljästä solunulkoisesta toistuvasta konsensusosasta, joka on kiinnittynyt membraaniin glykosyylifosfatidyliinositolimolekyylistä muodostuvaan ankkuriin. Toisin kuin Ig-kaltaisten reseptorien tapauksessa, DAF-kiinnittyminen ei ole konservoitunutta, vaan eri viruksilla on monia eri kiinnittymiskohtia sekä kapsidissa että reseptorissa. Kiinnittyminen ei aina tapahdu enteroviruksen kapsidissa olevaan kanjoniin, eikä kiinnittyminen myöskään laukaise kapsidin rakenteellisia muutoksia. (Tuthill ja muut 2010.) DAF-reseptori toimii primaarisena reseptorina, jolla se saa viruksen kiinnittymään ensin soluun, mutta tämän lisäksi sen tarvitsee tehdä yhteistyötä toisen apureseptorin kanssa aiheuttaakseen viruksen

infektiivisen sisäänmenon. Esimerkiksi coxsackievirus A21 käyttää DAF- ja Ig-perheeseen kuuluvan ICAM-1-reseptorin yhteisvaikutusta infektiivisessä solun sisäänmenossa. (Shafren ja muut 1997.)

Vaikka adheesiomolekyylillä ICAM-1 toimii reseptorina enemmistölle rinovirusia, myös LDLR-reseptorien, LDLR-kaltaisten proteiinireseptorien (LRP) sekä hyvin alhaisen tiheyden lipoproteiinireseptorien (VLDLR) on havaittu toimivan reseptoreina vähemmistöryhmälle rinovirusia (eng. minor group rhinovirus) (Hofer ja muut 1994). Nämä reseptorit rakentuvat seitsemästä (LDLR), kahdeksasta (VLDLR) tai 31:stä (LRP) solunulkoisesta ligandiin sitoutuvasta domeenista, sekä solun läpäisevästä domeenista ja solunsisäisestä domeenista (Tuthill ja muut 2010). Toisin kuin rinovirusten ICAM-1-vuorovaikutuksissa, LDLR-vuorovaikutus ei liity kapsidin kanjoniin, eikä se indusoi kapsidin muutoksia, vaan reseptorin viidesti toistuvan ligandikopion muodostaman kompleksin uskotaan kiinnittyvän viruksen kapsidissa olevan viisinkertaisen akselin ympärille kiertäen kapsidin kärjen muodostaen useita heikkoja sidoksia. Tällöin useat alhaisen affiniteetin sidokset muodostavat yhdessä korkean aviditeetin. Symmetrisen partikkelimuotonsa ansiosta pikornavirukset voivat kiinnittyä useaan reseptoriin samanaikaisesti saavuttaen näin vielä suuremman aviditeetin. (Hewat ja muut 2000.)

Monet pikornavirukset käyttävät reseptoreinaan integriinejä. Integriinit ovat heterodimeerisiä soluadheesioreseptoreja, jotka muodostuvat ei-kovalenttisesti toisiinsa sitoutuneista α - ja β -alaysikköistä. Kukin alaysikkö on glykoproteiini, jolla on suuri pallonmuotoinen solunulkoinen domeeni, transmembraaninen domeeni sekä pieni solunsisäinen domeeni. Nisäkkäillä on havaittu useita eri $\alpha\beta$ -assosiaatioita: kahdeksan eri β -alaysikköä voi esiintyä 18 eri α -alaysikkön kanssa muodostaen 24 erilaista tunnettua integriiniä. Integriinit voivat kiinnittyä erilaisiin ligandeihin kuten kollageeniin, laminiiniin, leukosyytteihin ja RGD-tripeptidiin. Integriinit ovat allosterisia reseptoreita ja ne voivat lähettää solusignaaleja membraanin läpi molempiin suuntiin: ulkoa sisälle ja sisältä ulos. Ligandin, esimerkiksi viruksen, kiinnittyminen solun integriinireseptorin solunulkoiseen domeeniin saa aikaan reseptorin konformaatiomuutoksia, joka laukaisee ulkoa-sisälle menevän signalointikaskadin solumembraanin olosuhteiden muokkaamiseksi otollisiksi viruksen sisäännotolle. (Hynes 2002.)

RGD-tripeptidin tunnistavia integriinejä ovat kaikki viisi α V-integriiniä (α V β 1, α V β 3, α V β 5, α V β 6, α V β 8), kaksi β 1-integriiniä (α 5 β 1, α 8 β 1) sekä α IIB β 3-integriini

(Humphries ja muut 2006). Viruksien, joiden kapsidissa on RGD-alue, on usein todettu käyttävän integriinireseptoreja. Esimerkiksi aftovirusten sukuun kuuluva suu- ja sorkkatautivirus (FMDV, eng. foot-and-mouth disease virus) voi kiinnittyä integriinireseptoreihin $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 6$ ja $\alpha V\beta 8$, joista kuitenkin vain muutamat toimivat luonnollisissa infektioidissa. (Jackson ja muut 1997; Duque ja muut 2004.)

Integriinit ovat myös enterovirusten ja parechovirusten reseptoreja ja niitä käyttävät esimerkiksi CV-A9 (Hughes ja muut 1995; Heikkilä ja muut 2008) ja HPeV-1 (Seitsonen ja muut 2010; Merilahti ja muut 2016a). Molemmilla viruksilla RGD-alue sijaitsee lähellä VP1-kapsidiproteiinia sijaitsevassa C-terminaaliosassa (Merilahti ja muut 2012). αV -integriineillä, esimerkiksi $\alpha V\beta 3$ - ja $\alpha V\beta 6$ -integriineillä, on osoitettu olevan hyvin keskeinen rooli HPeV-1-infektion alkamisessa (Seitsonen ja muut 2010). CV-A9:n tapaus ei ole kuitenkaan yhtä yksiselitteinen, koska sen on osoitettu pystyvän infektoimaan soluja myös ilman RGD-alueen ja integriinin välistä vuorovaikusta (Hughes ja muut 1995). Pikornaviruksen kiinnittyminen integriinireseptoriin ei laukaise viruksen kapsidin muutoksia, vaan kiinnittyminen mahdollistaa vain endosytoosin alkamisen. Jotkut integriinireseptoriin kiinnittyvät pikornavirukset voivat tarvita myös apureseptoria. Integriineihin kiinnittyvät enterovirukset tarvitsevat apureseptorivuorovaikutusta infektoidakseen solun, esimerkiksi CV-A9:n on esitetty käyttävän $\alpha V\beta 3$ -integriinin ja $\beta 2$ -mikroglobuliinin yhteisvaikutusta viruksen sisäänmenossa, missä $\alpha V\beta 3$ -integriini vastaa viruksen kiinnittymisestä solun pintaan ja $\beta 2$ -mikroglobuliini vastaa sisäänmenoprosessista (Triantafilou ja muut 2002). $\beta 2$ -mikroglobuliini on osa MHC-I-molekyylikompleksia (major histocompatibility complex class I). Myöhemmin CV-A9:n on osoitettu suosivan $\alpha V\beta 6$ -integriinejä soluun kiinnitymisessä ja käyttävän apureseptorina $\beta 2$ -mikroglobuliinia, joka vastaa lähinnä viruksen sisäänmenoprosessista (Heikkilä ja muut 2010).

2.4.2 Pikornavirusten tavat kiinnittyä eri reseptoreihin

Pikornavirusten tavat kiinnittyä reseptoreihin vaihtelevat eri lajien ja tyyppien välillä. Vaikka pikornavirusten neljä kapsidiproteiinia ovat järjestyneet samalla tavalla, kapsidin pinnan muodot vaihtelevat silti eri virusten välillä. Nämä pinnan muotojen eroavaisuudet johtavat useisiin eri kiinnittymistapoihin. Esimerkiksi enterovirusten kapsidissa kunkin 5-kertaisen akselin ympärillä on kanjoni, kun taas aftoviruksilla ja kardioviruksilla ei ole

kyseistä kanjonia. Enterovirusten kanjonit ovat kohtia, jotka vuorovaikuttavat Ig-kaltaisten solureseptorien kanssa. Eri virusten, esimerkiksi poliovirusten, rinovirusten ja coxsackievirusten, virusreseptorivuorovaikutuksista on tehty malleja, jotka perustuvat cryo-elektronimikroskopiolla ja röntgenkristallografiolla saatuun rakennetietoon. Mallit osoittavat, että vain poliovirus- ja ICAM-1-reseptorit läpäisevät kyseisten virusten kanjonin. (Racaniello 2013.)

Kaikilla rinoviruksilla kanjoni ei kuitenkaan ole vastuussa reseptorivuorovaikutuksesta, vaan esimerkiksi LDLR-reseptoreihin kiinnittyvät rinovirukset kiinnittyvät kapsidissa 5-kertaisen akselin lähellä olevaan kanjonin ympäröimään tähden muotoiseen kohtaan useilla heikoilla sidoksilla, kuten yllä LDLR-reseptoreja kuvaavassa kappaleessa on esitetty. Tämän kiinnittymisen avaintekijä on rinovirusten VP1-proteiinin 224-positiossa oleva lysiini-aminohappo, jonka on osoitettu kiinnittyvän LDLR-reseptoreihin ja se on konservoitunut kaikissa LDLR-reseptoriin kiinnittyvissä rinoviruksissa. Tätä 224-position konservoitunutta lysiiniä ei esiinny niissä rinoviruksissa, jotka kiinnittyvät ICAM-1-reseptoriin. (Racaniello 2013.)

Integriineihin kiinnittyvät pikornavirukset käyttävät solukiinnittymiseen kapsidin pinnalla olevaa erityistä RGD-tripeptidiä. FMDV-viruksilla RGD-alue on VP1-kapsidiproteiinin pinnalla olevassa β G- β H-luupissa (Jackson ja muut 1997). FMDV voi myös vaihtoehtoisesti kiinnittyä toiseen reseptoriin, heparaanisulfaattiin (HS), viruskannasta riippuen, mutta ei ole tietoa, mikä HS:n rooli on itse infektiossa (O'Donnell ja muut 2008). CV-A9:n ja HPeV-1:n RGD-alue sijaitsee VP1-kapsidiproteiinin C-terminaalien 17 aminohapon mittaisessa ulkonemassa, jonka avulla ne kiinnittyvät solun pinnalla oleviin integriinireseptoreihin (Hughes ja muut 1995; Heikkilä ja muut 2008, Merilahti ja muut 2012).

2.4.3 Pikornaviruksen siirtyminen solun sisään endosytoottisesti

Kun pikornavirus on kiinnittynyt solureseptoriin, se siirtyy endosytoottisesti vesikkelin sisällä sytoplasmaan replikaation aloituskohtaan. Virukset käyttävät useita eri endosytoosimekanismeja solun sisäänmenoon ja sama virus voi käyttää vaihtoehtoisesti erilaisia reittejä. Endosytoosimekanismit on luokiteltu kolmeen eri päätyyppiin: pinosytoosiin, makropinosytoosiin ja fagosytoosiin. Pinosytoosimekanismit on jaoteltu

vielä eri tyyppeihin, esimerkiksi kaveoliini-välitteiseksi, Arf6-riippuvaiseksi ja klatriini-välitteiseksi. (Mercer ja Greber 2013.)

Pikornavirusten endosytoosimekanismeista klatriini-välitteisiä ja kaveoliini-välitteisiä mekanismeja on tutkittu eniten. Klatriini-välitteinen endosytoosissa ligandi esimerkiksi virus kiinnittyy solureseptoriin, minkä jälkeen se saapuu plasmamembraanin sisäpuolelle muodostaen yhdessä klatriini-proteiinin ja dynamiini-GTPaasin avulla klatriinipäällysteisen vesikkelin, joka kuroutuu ja irtoaa plasmamembraanista solun sisään muodostaen varhaisen endosomin. Kaveoliini-välitteinen endosytoosi on taas riippuvainen solukalvolla olevista lipidilautoista ja kolesterolista ja vesikkeli päällystetään kaveoliini-proteiinilla sisäänmenossa. Jotkut pikornavirukset käyttävät kuitenkin myös makropinosytoosia, jossa ligandia ei päällystetä erillisillä proteiineilla, toisin kuin klatriini- ja kaveoliini-välitteisessä endosytoosissa. Makropinosytoosi on aktiivista riippuvainen endosytoosimekanismi, jossa plasmamembraani kuroutuu ulospäin ottaen ligandin kuroumiensa sisään ja muodostaen makropinosyyttinen vakuolin. Kun membraanin kuroumat palaavat takaisin plasmamembraanin luokse, ne muodostavat nestetäytteisen kuopan, joka sulkeutuu ja muodostaa endosomin membraanin fuusioituessa. Pikornavirusten endosytoosimekanismit ovat hyvin monimutkaisia ja eri virustyyppit käyttävät eri mekanismeja ja ne voivat vaihdella samalla virustyyppillä käytettäessä eri solulinjoja. (Tuthill ja muut 2010; Mercer ja muut 2010; Mercer ja Greber 2013.)

2.4.4 Pikornaviruksen translaatio sekä virus-RNA-synteesi

Viruksen saapuessa solun sisään ja RNA:n vapautuessa sytoplasmaan uncoating-vaiheen jälkeen, virus-RNA:sta aloitetaan translaatio, koska virus-RNA:ta ei pystytä kopioimaan millään solun omalla RNA-polymeraasilla, eikä virus vie soluun mitään viruksen koodaamaa entsyymiä. mRNA:n translaation aloituskompleksien muodostumiseen on kaksi päämallia: 5'-pästä riippuvainen sekä IRES-alueesta riippuvainen, joista 5'-pään aloituksessa aloituskompleksien järjestäytyminen on riippuvainen 5'-pästä, kun taas IRES-riippuvaisessa aloituksessa 5'-päästä ei tarvita, vaan aloituskompleksien järjestäytymisen tapahtuu vuorovaikutuksessa IRES-alueiden kanssa. Useimmat sellulaariset mRNA:t aloittavat translaation 5'-pääriippuvaisesti, mutta pikornavirukset käyttävät IRES-riippuvaista aloitusta ja kaikilla pikornaviruksilla on IRES-osa genomien

5'-pään UTR-alueella. (Racaniello 2013). IRES toimii ribosomin pienen 40S-alayksikön kiinnittymiskohtana, mikä mahdollistaa muiden translaatioelementtien aktivoimisen ja lopulta translaation aloittamisen. IRES rakentuu hyvin järjestäytyneistä RNA-rakenteista ja ne muodostavat erilaisia sekundaarirakenteita, jotka mahdollistavat ribosomin kiinnittymisen. (Tolbert ja muut 2017.) Pikornavirusten IRES-osat on jaettu neljään eri ryhmään niiden rakenteidensa perusteella. IRES-rakenteissa on kuitenkin tiettyjä alueita, joilla on tärkeä rooli ribosomin kiinnittymisessä ja niiden sijainnit vaihtelevat eri virussukujen välillä. Etenkin AUG-tripleteillä on tärkeä rooli ribosomin kiinnittymiselle. (Racaniello 2013; Salas-Martinez ja muut 2015.)

Translaation aloittamiseen tarvitaan useita erilaisia säätelyproteiinikomplekseja kattamaan IRES-alueiden laaja kirjo. Viruksesta ja sen IRES-tyypistä riippuen, translaation aloitukseen osallistuu erilaisten eIF-proteiinien muodostamia komplekseja, jotka vuorovaikuttavat ribosomin 40S-osan kanssa. Eri pikornavirukset käyttävät erilaisia eIF-proteiinikomplekseja, ja yhdenkään yksittäisen proteiinin ei ole havaittu olevan elintärkeä kaikille virus-IRES-rakenteille. Yleinen ominaisuus näillä sellulaarisilla IRES-alueiden aktivoivilla proteiineilla on, että ne ovat RNA:han kiinnittyviä proteiineja, jotka voivat muodostaa multimeerejä, jotka pystyvät kiinnittymään IRES-alueeseen useasta kohdasta. (Racaniello 2013; Salas-Martinez ja muut 2015; Avanzino ja muut 2017.)

Sen lisäksi että pikornavirukset käyttävät IRES-riippuvaista translaation aloitusta, infektiossa tuotetut erilaiset pikornavirusproteasit vaikuttavat myös isäntäsolun geeniekspressioon. Esimerkiksi proteasit 2A, L ja 3C estävät solun oman mRNA:n 5'-päästä riippuvan translaation tehostaen näin omaa replikaatiota solussa. (Racaniello 2013; Salas-Martinez ja muut 2015.)

Pikornaviruksen positiivissäikeisen RNA:n ainoasta ORF-alueesta syntetisoidaan yksi pitkä polyproteiini, joka leikataan viruksen koodaamien proteinaasien toimesta. Tämä mahdollistaa useiden proteiinituotteiden synteessin yhdestä RNA-genomista. Polyproteiinia ei löydy infektioituneista soluista, koska se prosessoidaan heti kun proteinaaseja koodaavat sekvenssit on transloitu. Kaikki pikornavirusgenomit koodaavat ainakin yhtä proteinaasia joka on 3C^{pro} tai 3CD^{pro}, kun taas toiset koodaavat lisäksi myös L^{pro} tai 2A^{pro}-proteinaasia. Polyproteiinin käsittelytavan etu on, että proteolyyttisen prosessoinnin nopeudella voidaan säädellä myös proteiinien ekspressiota. (Racaniello 2013.)

RNA-genomin syntetisoiminen tapahtuu sytoplasmassa olevissa membraanivesikkeleissä RNA-riippuvaisen RNA-polymeraasin ($3D^{pol}$) toimesta. $3D^{pol}$ tuotetaan prekursoriproteiinista leikkaamalla se $3CD^{pro}$ -proteinaasin toimesta. $3D^{pol}$ muistuttaa rakenteeltaan muita polymeraaseja eli DNA-riippuvaista DNA-polymeraasia, DNA-riippuvaista RNA-polymeraasia ja RNA-riippuvaista DNA-polymeraasia. (Racaniello 2013.) Polymeraasien aktiivinen kohta sijaitsee kämmenosassa. $3D^{pol}$ on yleisrakenteeltaan samankaltainen muiden polymeraasien kanssa, mutta se eroaa muista sen sormi- ja peukalo-domeenien osalta. $3D^{pol}$ vastaa sekä negatiivisen säikeen ja sitä seuraavan positiivisen RNA-säikeen synteestistä ja on siten erittäin tärkeä viruksen lisääntymiselle. (Campagnola ja muut 2008.) RNA-synteessissä virus tarvitsee $3D^{pol}$:n lisäksi erilaisia avustajaproteiineja, joita ovat 2A, 2B, 2C, 2 BC, ja 3AB. Avustajaproteiinit avustavat virus-RNA-synteessin eri vaiheissa esimerkiksi $2A^{pro}$ -proteiinilla on proteolyyttisen vaikutuksen lisäksi havaittu tärkeä rooli RNA-synteessin negatiivisen säikeen syntetisoinnin aloitusvaiheessa. Kyseistä avustavaa toimintamekanismia ei kuitenkaan tunneta, kuten ei tunneta myöskään monien muiden avustajaproteiinien mekanismeja, vaikka niillä tiedetäänkin olevan jokin selkeä rooli virus-RNA-synteessissä. (Racaniello 2013.) Pikornavirusten genomissa olevalla VPg-proteiinilla on havaittu olevan myös tärkeä rooli virus-RNA-synteessin aloittamisessa. RNA-synteessin aloitus $3D^{pol}$ toimesta on monimutkainen tapahtuma, johon osallistuu VPg-proteiinin lisäksi useita avustajaproteiineja, jotta $3D^{pol}$ -polymeraasi voi aloittaa virus-RNA-synteessin. (Paul ja muut 1998.)

2.5 Virusten eteneminen solukossa

Edetäkseen solukossa, kudoksessa tai eliössä, virukset tarvitsevat aina isäntäsolua. Viruspartikkelin vapautuminen solusta mahdollistaa virusinfektion etenemisen toisiin soluihin tai kudoksiin. Virusten tiedetään liikkuvan sekä solu-soluvälitteisesti, että soluvapaasti. Virusten soluvälitteisestä siirtymisestä on paljon tutkimustietoa ja eri virusten tiedetään käyttävän useita erilaisia biologisia synapseja. Soluvapaasta liikkumisesta on taas selvästi vähemmän tietoa. Solu-soluvälitteistä siirtymistä on havaittu esimerkiksi neurologisten synapsien kautta hermosolujen välillä, immunologisten synapsien kautta antigeeniä esittelevien solujen ja T-lymfosyyttien välillä. Virusten siirtymisellä erilaisten synapsien kautta, solureseptoreilla ja niiden sijainnilla on tärkeä merkitys. (Mothes ja muut 2010.) Myös virusten lateraalinen

liikkuminen solun pinnalla tehostaa infektiota ja viruksen siirtymistä solulta toiselle. Virukset käyttävätkin solumembraanin dynaamisia ominaisuuksia monilla tavoin hyväksi ja virukset voivat esimerkiksi kiinnittyä solumembraanin kiinnittymistekijään tai primaarireseptoriin, jonka jälkeen ne liikkuvat lateraalisesti ja vuorovaikuttavat sekundaarisen signaalireseptorin kanssa tai laukaisevat endosytoosin. (Burckhardt ja Greber 2009.)

Lyyttisestä soluvapaasta leviämismekanismeista tiedetään paljon vähemmän. Soluvapaassa leviämisessä tarvitaan viruspartikkelien poistumista isäntäsolusta joko yksittäisenä suurena määränä tai progressiivisesti kasvavana määränä. Eläimissä tämä johtaa lopulta viremiaan ja mahdollistaa viruspartikkelien leviämisen veren mukana. (Yakimovic ja muut 2012.) Sen lisäksi että vapautuneita viruspartikkeleita on oltava paljon, partikkelien täytyy olla riittävän vakaita, hitaasti poistettavia sekä vielä riittävän tehokkaita kiinnittymään ja infektoimaan infektoimattomat kohdesolut. Jotta soluvapaa infektio onnistuisi, tulee kaikkien edellä mainittujen ominaisuuksien toteutua. Vaikka soluvapaalla leviämisellä on heikkouksia verrattuna solu-soluvälitteiseen leviämiseen, sen etuna on riippumattomuus spesifisistä solu-soluvuorovaikutuksista, joka voi esimerkiksi tehostaa viruksen etenemistä ihmiseltä toiselle. (Mothes ja muut 2010.) Pikornavirusten tiedetään leviävän lyyttisesti, eli viruksen replikoiduttua riittävästi, solulle tapahtuu morfologisia muutoksia, joita kutsutaan sytopaattisiksi muutoksiksi (eng. cytopathic effects, CPE) jossa solu lopulta näivettyy kokonaan vapauttaen tuotetut viruspartikkelit soluvälitilaan. Vapautuneet viruspartikkelit siirtyvät soluvapaasti infektoitujen läheisiä soluja. Sytopaattisten efektien aiheuttajaa ei vielä tunneta. (Racaniello 2013.)

Viime aikoina on havaittu, että virukset voivat edetä soluvapaasti myös ilman lyyttistä vapautumista erilaisten solunulkoisten vesikkeliin, eli eksosomien muodossa. Eksosomaalisessa leviämisessä virukset voivat siirtyä infektoituneesta solusta ei-infektoituun soluun soluvapaasti ilman reseptorivuorovaikutuksia. Eksosomivälitteisessä leviämisessä infektoituneessa solussa pikornaviruspartikkeleiden ympärille muodostuu lipidimembraanikalvo ja ne voivat lopulta poistua solusta autofagosomisina membraanipäällysteisinä eksosomeina. (Robinson ja muut 2014; Chen ja muut 2015.) Yleisesti solujen on ajateltu käyttävän autofagista kuljetusta solun ravinteiden kuljettamisessa liikuttamalla esimerkiksi soluorganelleja solusta toiselle eksosomisesti vesikkeliin sisällä, mutta myös virusten on havaittu käyttävän samoja mekanismeja.

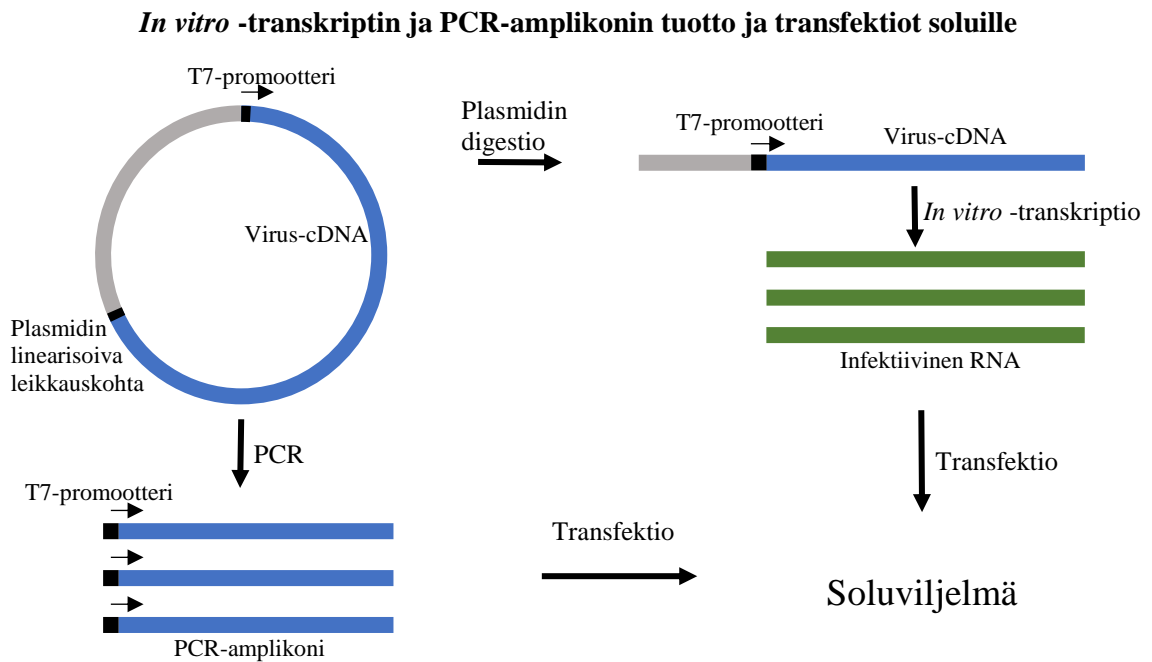
Virusten vapautuessa autofagoottisina eksosomeina, yhdessä eksosomissa voi olla useampia, jopa muutamia kymmeniä viruspartikkeleita, mikä mahdollistaa selvästi korkeamman infektiotehokkuuden kuin yksittäinen lyytisesti vapautunut viruspartikkeli (Chen ja muut 2015). Virusten etenemistä eksosomien muodossa ja niiden mekanismeja on kuvailtu kattavasti Raab-Traub ja Dittmerin (2017) kokoelma-artikkelissa.

2.6 Pikornavirusten tuottaminen cDNA-klooneista ja genomien muokkaus virustutkimuksessa

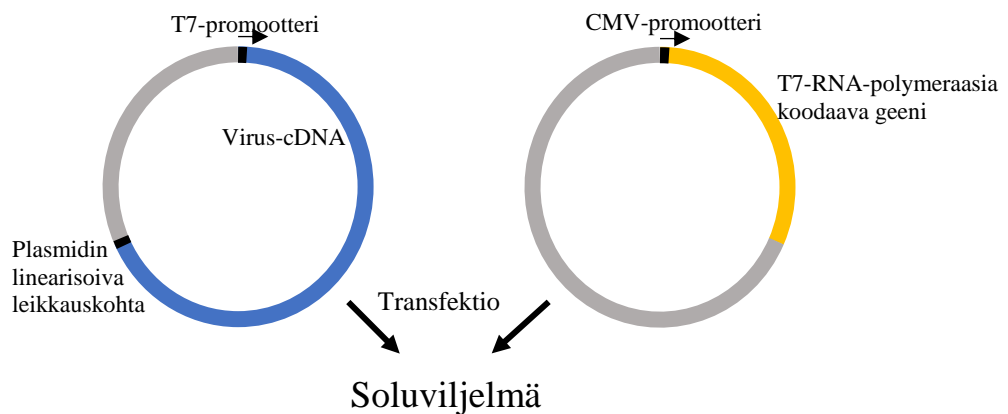
Perinteisessä virustutkimuksessa virusten ominaisuuksia on tutkittu muokkaamalla viruksen genomia erilaisin menetelmin. Monista enterovirusista on tuotettu infektiivisiä cDNA-klooneja, joiden avulla on tutkittu eri virusgeenien toimintaa (Yang ja muut 2015). Ensimmäisen eläinperäisen RNA-viruksen infektiivinen cDNA-kloonit tehtiin polioviruksesta (Racaniello ja Baltimore 1981). Monien virusten infektiiviset cDNA-kloonit antavat hyvän alustan virusten geenien muokkaamiselle, mikä antaa mahdollisuuden viruksen molekylaarisen biologian tutkimiselle, replikaation ja rakenteen tutkimiselle sekä rokotteiden kehittämiseksi (Hou ja muut 2015). Näitä rakennettuja ja muokattuja cDNA-klooneja voidaan käyttää lähtömateriaalina viruspartikkelien tuottamiseksi erilaisin transfektiomenetelmin. Esimerkiksi plasmidi, jossa virusgenomi on cDNA-muodossa, voidaan linearisoida genomien 3'-päästä restriktioentsyymillä, minkä jälkeen lineaarista plasmidia voidaan käyttää templaattina *in vitro* -transkriptioreaktiolle, jolla tuotetaan virusgenomin sisältävää *in vitro* -transkriptoitua RNA:ta (IVT-RNA). IVT-RNA voidaan transfektoida soluun, mikä mahdollistaa viruksen replikaatiosyklin ja uusien viruspartikkelien muodostumisen. (Heikkilä ja muut 2011; Poirier ja muut 2012.) cDNA-kloonista voidaan tuottaa myös koko genomien mittainen PCR-amplikoni, joka transfektoidaan soluille viruspartikkelien muodostamiseksi. Virusgenomin eteen voidaan suunnitella tietyn RNA-polymeraasin promootterialue, esimerkiksi suunnittelemalla alukkeeseen T7-RNA-polymeraasin promootterisekvenssi. Transfektoimalla pitkää PCR-amplikonia tietyille T7-RNA-polymeraasia tuottaville soluille, solu alkaa transkriptioimaan T7-RNA-polymeraasin avulla PCR-amplikonista virus-RNA:ta, mikä mahdollistaa virusgenomin transloimisen ja sitä kautta replikaatiosyklin aloittamisen solussa. (Heikkilä ja muut 2011.)

Virusta voidaan tuottaa myös soluissa, jotka eivät ekspressoi tarvittavaa RNA-polymeraasia, tekemällä ko-transfektio. Ko-transfektiossa cDNA-kloonin lisäksi soluihin transfektoidaan toinen plasmidi, joka ekspressoi haluttua polymeraasia, esimerkiksi T7-RNA-polymeraasia, jolloin solu tuottaa tarvittavaa T7-RNA-polymeraasia. Tuotettu T7-RNA-polymeraasi kiinnittyy taas cDNA-plasmidin T7-promootterialueeseen, mikä aloittaa cDNA-kloonissa olevan virusgenomin transkription (Hou ja muut 2015; Yang ja muut 2015). Jotta apuplasmidi voi tuottaa T7-RNA-polymeraasia, siinä on oltava jonkun muun polymeraasin promootteri, jonka kohdesolu tunnistaa. Tämä promootteri on usein CMV-promootteri (human cytomegalovirus, CMV), koska monet soluviljelyssä käytetyt nisäkässolulinjat tuottavat CMV-promootteriin kiinnittyvää polymeraasia. Kuvassa 4. on havainnollistettu edellä esitetyt viruspartikkelien tuottomenetelmät kaaviomuodossa.

Jotta cDNA-klooneja voidaan rakentaa, tarvitaan aluksi virus-RNA:ta (vRNA), joka voidaan eristää esimerkiksi potilasnäytteestä (Hou ja muut 2015). vRNA:n määrää voidaan lisätä transfektoimalla eristettyä vRNA:ta nisäkässoluviljelmään. Eristetty vRNA voidaan käänteiskopioida cDNA:ksi (Yang ja muut 2015). cDNA-klooneja voidaan rakentaa eri tavoin. Aiemmin cDNA-klooneja valmistettiin osakloonausmenetelmillä, joissa viruksen RNA-genomi PCR-amplifikoitiin useina eri palana ja kloonattiin vaiheittain nisäkässoluperäisiin ekspresiovektoreihin. Genomin 3'-pään perään suunniteltiin spesifinen leikkauskohta, jonka avulla vektori saatiin linearisoitua. Linearisoidusta vektorista voitiin tuottaa *in vitro* -transkriptoitua RNA:ta (IVT-RNA), joka transfektoidaan nisäkässoluihin, joissa kehittyy lopulta viruspartikkeleita. (Hughes ja muut 1995; Heikkilä ja muut 2011.) Nämä osakloonausmenetelmät on kuitenkin korvattu osittain nopeammilla menetelmillä, joissa esimerkiksi soluviljelmällä tuotetusta viruksesta eristetään vRNA, joka käänteistranskriptoidaan suoraan cDNA:ksi. cDNA:ta voidaan käyttää templaattina koko genomin mittaisessa PCR-amplifikaatiossa. PCR-amplikonit kiinnitetään lopulta plasmidiin ligaatiolla, jossa viruksen genomia pystytään muokkaamaan mutageneesillä. (Yang ja muut 2015.)



Polymeraasia ja virus-cDNA:ta koodaavien plasmidien transfektio (ko-transfektio)



Kuva 5. Vaihtoehtoisia menetelmiä viruspartikkelien tuottamiseksi. Kuvassa on esitetty kaavioina tekstissä mainitut transfektio menetelmät. Yllä on kuvattu plasmideista tuotetun PCR-amplikonin ja *in vitro*-transkriptoidun RNA:n transfektiot ja alhaalla kahden erillisen plasmidin ko-transfektio.

Rakennetulle cDNA-kloonille tehtävä mutageneesi oli ennen monivaiheinen ja hyvin aikaa vievä menetelmä, jossa kohdegeeni kloonattiin muokkausplasmidiin, minkä jälkeen se PCR-amplifioitiin mutageneettisillä alukkeilla. Tämän jälkeen mutatoitu geeni kloonattiin takaisin cDNA-runkoon (Hughes ja muut 1995). Näiden perinteisten aikaa vievien cDNA:n valmistus- ja muokkausmenetelmien tilalle on kehitetty uusia tapoja, esimerkiksi kaupallisia kittejä, joilla voi tehdä paikkaspesifisiä mutaatioita esimerkiksi

nukleotidin poistamisen ja lisäämisen muodossa. Vaikka paikkaspesifisille mutaatioille onkin nykyään saatavilla kaupallisia kittejä, pikornavirussekvenssin pituus ja sopivien kloonauskohtien vähyys virus-cDNA:ssa tekevät genomien muokkaamisesta vaikeaa. Heikkilä työryhmineen (2011) esittääkin tavan, jossa cDNA-kloonin virusgenomin tiettyyn kohtaan tehdään restriktiokohta, joka mahdollistaa uusien geenisekvenssien esimerkiksi GFP-geenin kloonauksen virusgenomiin. Kyseinen kloonin voidaan rakentaa tuottamalla viruksen cDNA-kloonista koko virusgenomin mittainen PCR-amplikoni, jossa käytetään mutageneettistä aluketta, johon on suunniteltu kyseinen restriktiokohta. Tämän lisäksi 5'-pään alukkeeseen voidaan suunnitella virusgenomin 5'-pään eteen T7-promootterialue, joka mahdollistaa viruspartikkelien tuottamisen T7-polymeraasia tuottavissa soluissa. Liitettäessä uutta geeniä kyseistä restriktiokohtaa käyttäen, tulee geenin päissä olla myös samat restriktiokohdat tunnistavat sekvenssit, jotta geeni saadaan kloonattua plasmidiin. Kyseisellä menetelmällä voidaan siis nopeuttaa selvästi cDNA-kloonin tehtäviä muutoksia. Esimerkiksi eGFP-geenin lisäys mahdollistaa viruksen havaitsemisen soluissa fluoresenssimikroskoopilla, koska viruksen infektoidessa solun, solu alkaa tuottaa eGFP:tä. (Heikkilä ja muut 2011.)

Erilaisia virusten ominaisuuksia voidaan tutkia myös muokkaamalla genomia siten, että viruksen kapsidiproteiinien rakenteeseen pyritään vaikuttamaan. Esimerkiksi viruksen kiinnittymistä solureseptoriin voidaan tutkia poistamalla tai muokkaamalla jotain tiettyä kapsidiproteiinia tai sen osaa koodaavaa geeniä. Viruspartikkelista voidaan poistaa jokin pintaproteiinin osa ja tutkia sen jälkeen, oliko poistolla vaikutusta solun kiinnittymisessä isäntäsoluun. Esimerkiksi CV-A9- ja HPeV-1-virusten kapsidissa oleva RGD-alue koodaava geeni voidaan poistaa kokonaan tai muokata, jolloin RGD-alueen vaikutusta viruksen infektiokykyyn voidaan arvioida vertaamalla villityypin ja RDG-muokatun mutanttivirusen infektiokykyjä toisiinsa. (Hughes ja muut 1995; Boonyakiat ja muut 2001.)

2.7 Pikornavirusten nopea muuntuminen

Pikornavirustyyppien määrä kasvaa jatkuvasti viruksen nopean muuntumisen takia. Pikornavirusten nopean muuntumisen syitä ovat lähinnä RNA-polymeraasin virheherkkyys sekä virheet korjausmekanismien toiminnassa. RNA-riippuvaisella RNA-polymeraasilla on suuri taipumus virheisiin ja se tuottaakin karkeasti noin yhden

substituution kopioitua genomia kohden. Näiden mutaatioiden uskotaan olevan useimmiten nukleotidipoistoja, jotka korjataan lopulta toiminnallisiksi genomeiksi rekombinaation avulla. (Lukashev 2010; Zell ja muut 2017.) Pikornavirusten oletetaan käyttävän kahta eri rekombinaatiomekanismia. Toinen on klassinen kopion-valintamalli, jossa rekombinaatio tapahtuu virus-RNA-polymeraasin vaihtaessa templaattinauhaansa syntetisoidessaan negatiivista RNA-nauhaa kahden eri viruksen replikoituessa samaan aikaan samassa solussa (Lukashev 2010). Toinen rekombinaatiotapa taas ei ole yhteydessä replikaatioon ja siinä kaksi RNA-fragmenttia, joiden syntetisointi on jäänyt kesken RNA-polymeraasin toimesta, kiinnitetään toisiinsa rekombinaatiossa (Gmyl ja muut 2003). Pikornaviruksilla tapahtuu luonnollista rekombinaatiota erittäin usein, mikä näkyy viime vuosien aikana esitettyjen useiden uusien patogeenisten pikornavirussukujen muodossa. Se kumpaa rekombinaatiomuotoa esiintyy luonnossa enemmän, on tällä hetkellä vaikea sanoa (Gmyl ja muut 2003; Lukashev 2010).

Oli rekombinaatio sitten replikaatioon liittyvää tai replikaatiosta riippumatonta, virus-RNA-segmenttien liikkumisella eri lähteiden välillä, esimerkiksi kahden toisistaan eroavan viruksen tai isännän välillä, on suuri merkitys RNA-virusten evoluutiossa. Toisaalta rekombinaatio stabiloi genomia ja antaa viruksille mahdollisuuden hankkiutua eroon haitallisista mutaatioista, joita RNA-riippuvaiset RNA-polymeraasit aiheuttavat. (Gmyl ja muut 2003.) Replikaatiosta riippumaton luonnollinen rekombinaatio voikin olla tärkeässä roolissa geneettisen materiaalin horisontaalisessa siirtämisessä kokonaan eri tyyppisten tai vähän toisiinsa liittyvien virusten välillä, kuten myös isännän ja viruksen RNA-genomien välillä (Charini ja muut 1994; Becher ja muut 2001; Gmyl ja muut 2003).

Virusten evoluution nopeutta ja eristettyjen kantojen alkuperää voidaan selvittää vertailemalla eri viruskantojen nukleotidisekvenssejä toisiinsa. Enterovirustyyppien evoluutiota on tutkittu vertaamalla sen VP1-proteiinin (891 nukleotidiä) nukleotidisekvenssejä toisiinsa. Brown työryhmineen (1999) vertasi kaikkiaan 113 eri enterovirus A71 (EV-A71) -kannan nukleotidisekvenssejä toisiinsa. Kannoista tehtiin fylogeneettinen puu, jonka perusteella enterovirus 71 jaettiin genotyyppiensä perusteella kolmeen eri linjaan A, B ja C. Eri kantojen VP1-proteiinin sekvenssien välillä ei löydetty merkittävää yhteistä tekijää epidemioita aiheuttavien kantojen välillä. Evoluutionopeudeksi enterovirus 71:lle saatiin laskennallisesti noin $1,35 \times 10^{-2}$ ei-vaikuttavaa mutaatiota / vuosi / nukleotidi. Laskettaessa kaikilla nukleotideilla nopeus on selvästi alhaisempi $3,71 \times 10^{-3}$ mutaatiota / vuosi / nukleotidi. (Brown ja muut 1999.)

2.8 Pikornavirukset patogeeneinä ja virustautien ehkäiseminen rokotteilla

Pikornavirusten aiheuttama infektio on useimmiten täysin oireeton. Pikornavirukset voivat kuitenkin aiheuttaa taudin, jonka oireet vaihtelevat lievistä oireista aina harvinaisempiin vakaviin tautitiloihin kuten polioon, aivokalvontulehdukseen ja velttohalvaukseen. (Hogle ja muut 1985; Rossmann ja muut 1985.) Viruksen patogeenisuuteen vaikuttavat useat tekijät. Virukset kiinnittyvät rakenteellisilla proteiineilla solun reseptoriin ja rakenteelliset proteiinit vaikuttavatkin siihen, mihin soluihin virus pääsee tunkeutumaan. Jo yhden aminohapon muutos epitoopissa saattaa vaikuttaa merkittävästi viruksen patogeenisyyteen. Esimerkiksi HPeV-1-viruksen RGD-alueessa jo yhden aminohapon muutos vaikuttaa viruksen infektiivisyyteen. (Boonyakiat ja muut 2001.) Viruksen replikaatioon ja leviämiseen solukossa vaikuttavat reseptorisitoutumisen lisäksi myös ei-rakenteellisten proteiinien ja ei-koodaavien alueiden toiminta.

Yleisin tapa torjua virusten etenemistä on käyttää rokotteita, mutta rokotteita on kehitetty vain muutamaa eri pikornavirustyyppiä vastaan. Yksi tunnetuimpia rokotteita on *Enterovirus*-sukuun kuuluvalla poliovirukselle kehitetyt rokotteet. Poliovirus on ollut yksi maailman tappavimmista viruksista historian aikana. Poliovirusrokotteita on kahta tyyppiä: suun kautta otettavat OPV-rokotteet (eng. oral poliovirus vaccine), joita kutsutaan myös kehittäjänsä mukaan Sabin-rokotteiksi, sekä injektiona annetut IPV-rokotteet (eng. inactivated polio vaccine), joita kutsutaan kehittäjänsä nimen mukaisesti Salk-rokotteiksi. (Minor 1992; Kew ja muut 2005; Fahmy ja muut 2017.) OPV-rokote sisältää kaikkia kolmea tunnettua poliovirustyyppiä, joiden virulenssia on heikennetty muuntamalla villityyppien viljelyolosuhteita ja aiheuttamalla näin virulenssia heikentäviä mutaatioita (Minor 1992). IPV-rokotteet koostuvat niin ikään kaikkien kolmen tyyppin viruksesta, mutta IPV:ssä virukset on inaktivoitu formaliinilla. IPV-rokotteita käytetään lähinnä teollistuneissa maissa, kun taas OPV-rokotteita käytetään kehittyvissä maissa. Molemmat, niin eläviä viruksia sisältävä OPV-rokote, kuin neutralisoitu IPV-rokote antavat lähes 100 % suojan infektiota vastaan ja niiden teho perustuu humoraalisen immuunivasteen kehittymiseen rokotetussa. OPV-rokotteiden heikkoutena verrattuna IPV-rokotteeseen on, että rokotteen on todettu aiheuttavan yksittäisiä polioinfektioita lähinnä huonon hygienian alueilla, koska elävä virus pystyy leviämään ulosteiden välityksellä ja replikoituessaan viruksissa saattaa tapahtua mutaatioita, jonka seurauksena

virus voi kehittyä virulentiksi. Kew ja muut (2005) ovat koonneet edellä mainituista poliovirusrokotteista ja polion erradikoimisesta kertovan kattavan kokoelmaartikkelin.

Kiinassa kehitetty EV-A71-rokote sai vuonna 2015 myyntiluvan Kiinan ruoka- ja lääkeviranomaisilta (FDA, eng. food and drug administration). EV-A71:n aiheuttama enterorokko on johtanut Kiinassa vielä viime vuosinakin useisiin kuolemiin. Eniten enterorokosta johtuvia kuolemia tapahtuu alle viisivuotiaiden lasten keskuudessa. Tämän vuoksi EV-A71-rokotteen kehittämiseksi on käytetty paljon resursseja ja erilaisia rokotteita kehitettiin erilaisia menetelmiä käyttäen, kuten esimerkiksi viruksen inaktivaatiota, heikentämistä, alayksiköiden rekombinaatiota, kehittämällä viruksen kaltaisia partikkeleita ja DNA-rokotteita. Kerätyn materiaalin perusteella inaktivoitu rokote on osoittautunut tehokkaimmaksi ja turvallisimmaksi vaihtoehdoksi. Rokotteita käytettäessä rokotteen kattavuus eri kantojen välillä on hyvin tärkeää. Tällä hetkellä tutkitaan, millä viruskannalla saataisiin mahdollisimman hyvä neutralisaatiokyky mahdollisimman monelle kannalle. (Yang ja muut 2017.)

Tietyillä pikornaviruksilla on havaittu yhteys myös erilaisiin kroonisiin sairauksiin. Enterovirukset on yhdistetty tyyppiin 1 diabetekseen (T1D). Erityisesti coxsackievirus B4:n on tutkittu olevan yhteydessä T1D:n patogeneesissä. (Jaïdane ja muut 2009; Hyöty 2016.) Mekanismia, jolla enterovirusinfektio aiheuttaa T1D:n ei vielä tunneta, mutta tämän hetkinen hypoteesi on, että enterovirusinfektio etenee aluksi haimaan aiheuttaen vahvan tulehdusvasteen ja henkilöillä, joilla viruksen neutralisointi ei onnistu tehokkaasti, virus jatkaa hitaasti replikoitumistaan haiman β -soluissa tuottaen virus-RNA:ta ja -proteiineja, jotka stimuloivat luonnollista immuniteettia ja edistävät tulehdusta ja autoimmunitteettia (Hyöty 2016). Hyöty (2016) ehdottaa tulevaisuuden mahdolliseksi T1D:n ehkäisykeinoksi enterovirusrokotetta, joka kattaisi sairauden kehittymiseen liittyvät enterovirustyyppit. Kyseisen rokotteen kehittäminen aloitetaan lähiaikoina Tampereläisen Vactech Oy:n toimesta ja kehitystyötä rahoittaa Provention Bio (vactech.fi [www], viitattu 15.12.2017; Drug delivery business news [www], viitattu 15.12.2017).

Enterovirus-sukuun kuuluvat rinovirukset ovat maailman yleisimpiä nuhakuumeautien aiheuttajia ihmisissä. Rinovirusten aiheuttama tauti, jonka oireena on vinkuva hengitys, on raportoitu olevan yhteydessä kroonisen astman kehittymisessä. Etenkin nuorilla lapsilla, joilla on ollut rinoviruksen aiheuttama vinkuva hengitys, on havaittu selvästi korkeampi riski sairastua astmaan. (Jartti ja Gern 2017.) Tällä hetkellä rinoviruksille ei

ole lääkettä, mutta antiviraalisia lääkkeitä ja rokotteita on parhaillaan kehityksessä (Edwards ja muut 2017).

Pikornaviruksille ei ole markkinoilla myyntiluvallisia antiviraalisia lääkeaineita, mutta pikornavirusinfektion torjumiseen on kehitetty toimiva lääke, pleconaril, jonka on havaittu heikentävän ja lyhentävän nuhataudin kestoja ja jota on käytetty äärimmäisen vaikeissa infektioissa. Pleconaril kiinnittyy viruksen VP1-proteiiniin, mikä estää viruksen kiinnittymisen solun pinnalle tai viruksen kapsidin poistamiseen. Pleconaril poistettiin kuitenkin markkinoilta havaittujen haitallisten vaikutusten seurauksena. Pleconarilin lisäksi kehitteillä on muutamia muita lääkkeitä, joiden toiminta perustuu samankaltaisiin periaatteisiin. Yleisesti antiviraalisten lääkeaineiden toiminta virusinfektioiden torjumisessa voi perustua seuraavien toimintojen estämiseen: viruksen isäntäsolun sisäänmenon inhiboimiseen, viruksen replikaation estämiseen solun sisällä esimerkiksi inhiboimalla virus-entsyymien toimintaa sekä inhiboimalla virusten vapautumista infektoiduista soluista. (Edwards ja muut 2017.)

2.9 Pikornavirusvektorit terapeuttisessa käytössä

Viruksilla on ominaisuuksia, joita voidaan hyödyntää tautien hoidossa ja ehkäisyssä, kunhan viruksen patogeneisuustekijät on ensin poistettu. Virusvektorit nähdäänkin potentiaalisina työkaluina geeniterapiassa, esimerkiksi syövän ja neurologisten sairauksien hoidossa, sekä virusrokotteiden kehittämisessä esimerkiksi HI-virusta (eng. human immunodeficiency virus) vastaan (Gu ja muut 2012; Ojala ja muut 2014; Chira ja muut 2015). Virusvektoreista on äskettäin kirjoitettu erinomainen katsausartikkeli (Chira ja muut (2015).

Kuten aiemmin on esitetty, pikornavirukset kiinnittyvät tietyillä kapsidiproteiinin osillaan laajaan kirjoon erilaisia solureseptoreita. Monet eri proteiinireseptorit esiintyvät yliekspressoituneina syöpäsolujen pinnalla, mikä tekeekin pikornaviruksista, erityisesti enteroviruksista, potentiaalisia työkaluja onkolyttisessä virusterapiassa. Enteroviraalisten cDNA-kloonien rakentaminen on mahdollistanut virusten muokkauksen lisäksi myös niiden kehittämisen ja käytön geeniterapiassa. Enterovirukset, etenkin poliovirus 1 ja coxsackievirus A21, ovat ominaisuuksiltaan hyviä vektorikäyttöön, koska ne eivät integroidu ihmisen genomiin, ne replikoituvat osittain eijakautuvissa soluissa, niillä on suuri solutropismi sekä niistä on tarjolla infektiivisiä

cDNA-klooneja ja hiirimalleja, joita voidaan käyttää virustutkimuksessa ja geeniterapiavektorien kehittämisessä. (Ylä-Pelto ja muut 2016.)

Esimerkkinä rokotustutkimukseen käytetystä virusvektorista voidaan pitää poliovirusta sen pitkän tutkimushistorian takia. Polioviruksen VP1-kapsidiproteiinia on muokattu insertoimalla pienikokoisia toisen viruksen antigeeni-epitoppeja. Esimerkiksi HI-viruksen tietty epitooppi-proteiini on insertoitu heikennetyn Sabin-polioviruksen VP1-proteiiniin osaksi, mikä on mahdollistanut heikennetyn polioviruksen käytön HIV-1-virusta neutralisoivien vasta-aineiden tuottamisessa soluissa. (Evans ja muut 1989.)

3 Työn tavoitteet

Työssä oli kolme eri tutkimushaaraa. Ensimmäinen tavoite oli tutkia, mikä on paras tapa tuottaa CV-A9-eGFP:tä käyttäen plasmidia, johon on kloonattu CV-A9-eGFP:n genomi. CV-A9:n genomi transfektoitiin nisäkässoluihin neljässä eri muodossa: rengasmaisena plasmidina, linearisoituna plasmidina, IVT-RNA:na sekä PCR-amplikonina. Näitä transfektoitiin soluihin yhtä monta kopiota, minkä jälkeen transfektiotehokkuuksia verrattiin toisiinsa. cDNA-kloonien säätelyalueiden vaikutuksesta viruspartikkelien muodostumisessa haluttiin saada myös lisää tietoa. Tämä toteutettiin käyttämällä koko virusgenomin monistavaa PCR-menetelmää, jossa alukkeisiin oli suunniteltu erilaiset säätelyalueet virusgenomin eteen, sekä Zero Blunt -kloonausmenetelmää, jossa PCR-amplikonit kloonattiin plasmidiin.

Toisena tavoitteena oli tutkia HPeV-1:n pintaproteiinissa sijaitsevan RGD-alueen vaikutusta viruksen ja isäntäsolun väliseen vuorovaikutukseen. Tämä tehtiin infektoimalla nisäkässoluihin sekä HPeV-1:tä että HPeV-1-RGDdel-mutanttivirusta, josta oli poistettu RGD-alue. Hypoteesina aikaisempien tutkimusten perusteella oli, että HPeV-1 ei pysty infektoimaan soluja ilman RGD-aluetta, eli HPeV-1-RGDdel:n ei pitäisi infektoida soluja, kun taas villityypin tulisi infektoida solut.

Kolmantena tavoitteena oli kuvata CV-A9-eGFP:n etenemistä nisäkässolukossa reaaliaikaisesti EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla. CV-A9-eGFP on CV-A9:n muokattu muoto, jossa viruksen genomiin on lisätty eGFP-proteiinia eli vihreää fluoresoivaa proteiinia tuottava geeni. Tämän viruksen käyttö mahdollisti viruksen etenemisen seuraamisen reaaliaikaisesti, koska viruksen ilmentämän eGFP:n fluoresenssi mahdollisti viruksen havaitsemisen solukosta ilman erillistä vasta-ainevärjäystä.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Käytetyt plasmidit

Työssä käytetyt virusplasmidit olivat peräisin eri lähteistä ja kaikki vektorirungon ominaisuudet eivät olleet tiedossa. Vektorirungon koko oli noin 2500 bp. Virusplasmidit oli tuotettu *Escherichia coli* (*E. coli*) -bakteereissa ja ne olivat nimeltään: pHPeV-1 (ihmisen parechovirus 1, Harris-kanta, 7339 nt), pHPeV-1-RGDdel (HPeV-1:n mutanttimuoto, jossa viruksen VP1-pintaproteiinista oli poistettu RGD-osa, 7330 nt), pCV-A9 (coxsackievirus A9 Griggs-kanta, 7452 nt) ja pCV-A9-eGFP (CV-A9:n genomiin oli lisätty eGFP:tä koodaava geeni, 8152 nt).

4.2 Plasmidien linearisointi

Plasmidit linearisoitiin virusgenomin 3'-päästä restriktioentsyymeillä. pCV-A9-plasmidit digestoititiin ClaI-restriktioentsyymillä (Promega, R655A), kun taas pHPeV-1-plasmidit MluI-FastDigest-entsyymillä (Thermo Fisher, FD0564). MluI-digestioissa reaktiutilavuuksina käytettiin 100 µl, jossa plasmidin konsentraatio oli noin 50 µg/ml, entsyymiä käytettiin 5 µl, Fast digest -puskuria 1 x pitoisuudessa ja loput reaktiutilavuudesta täytettiin steriilillä vedellä. ClaI-digestioissa reaktiutilavuutena käytettiin 100 µl, jossa plasmidin konsentraatio oli noin 50 µg/ml, asetyloidun BSA:n (Promega, R396D) konsentraatio 100 µg/ml, Multicore-puskuria (Promega, R999A) 1 x konsentraatiossa ja loput tilavuudesta täytettiin steriilillä vedellä. Digestoidut plasmidit analysoitiin 0,8 %:lla agarosigeelillä, joka tehtiin 1 x TAE-puskuriin, jossa oli 0,5 µg/ml etidiumbromidia DNA-vyöhykkeiden havaitsemiseksi UV-valolla. Digestion reaktioliuos puhdistettiin lopuksi GeneJET PCR-purification Kitillä (Thermo Fisher, K0702) ylimääräisten komponenttien poistamiseksi. Linearisoituja plasmideja käytettiin sekä transfektiossa että templaattina IVT-RNA-tuottoreaktioissa.

4.3 *In vitro* -transkriptoidun RNA:n valmistus

IVT-RNA-transkriptia tuotettiin käyttämällä MEGAScript IVT-RNA:n tuotokittää (Ambion, AM1330). IVT-RNA-reaktiossa käytettiin templaattina linearisoituja

virusplasmideja. Reaktioseoksessa oli plasmidia 0,5-1 µg, NTP-liuosta (ATP, UTP, GTP, CTP), 10 x -reaktiopuskuria sekä enzyme mix -liuosta 1 x loppupitoisuuteen. Transkriptioreaktion jälkeen, IVT-RNA:t puhdistettiin MEGAClear-puhdistuskitillä (Ambion, AM1908). Tuotettujen IVT-RNA:iden konsentraatiot mitattiin DeNovix DS11 -spektrofotometrillä (DeNovix Inc., Wilmington, USA). Puhdistetut IVT-RNA:t säilytettiin MEGAClear-kitin eluutiopuskurissa -80 °C:eessa. IVT-RNA:iden eheyttä analysoitiin RT-qPCR:llä, jossa tuotetun RNA:n eheyttä analysoitiin kvantitatiivisesti käyttämällä molemmille viruksille spesifisiä alukkeita, joista HPeV-1:n alukkeet olivat: forward: 5'-CTT ATG CYC ACA CAG CCA TCC ja reverse: 5'-GGT ACC TTC TGG GCA TCC TTC ja CV-A9-virusten alukkeet olivat: forward (Enri3+): 5'-CGG CCC CTG AAT GCG GCTAA ja reverse (Enri4-): 5'-GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA.

RT-qPCR-reaktioissa käytettiin QuantiNova SYBR Green RT-PCR -reagenssikittiä (Qiagen, 205410), jossa IVT-RNA:n cDNA:ksi kääntävä käänteistranskriptaasi oli samassa entsymiseoksessa muiden amplifikaatiosta vastaavien PCR-entsyymien kanssa. Kunkin reaktion näytetilavuutena käytettiin 20 µl ja alukekonsentraatioina 0,5 µM (forward ja reverse). Templaattia laimennettiin siten, että reaktiossa oli laskennallisesti noin 10³-10⁵ kopiota, joka saatiin laskettua mitatun IVT-RNA:n konsentraation ja sen nukleotidisekvenssin pituuden avulla. RT-qPCR-ajossa käytettiin Rotor-Gene Q -laitetta (Qiagen) ja ajo-ohjelma oli seuraava: **1.** 10 minuutin pitovaihe 50 °C:eessa, jossa RT-entsyymi aktivoitui, **2.** kahden minuutin pitovaihe 95 °C:eessa, jossa PCR-entsyymi aktivoitui, **3.** sykli vaihe, jonka ensimmäinen osa oli 10 s 95 °C:eessa, toinen osa 30 sekunnin alukkeiden kiinnittymisvaihe, jossa lämpötila laskettiin 65 °C:eesta 55 °C:eseen ensimmäisen 10 syklin aikana, ja kolmas osa 20 s 72 °C:eessa, jossa mitattiin vihreän fluoresenssin kehittymistä FAM-kanavalla ja **4.** viimeinen sulamisvaihe, jossa lämpötila nostettiin 72 °C:eesta 95 °C:seen 1°C/min nopeudella. RT-qPCR-ajosta tehtiin kvantitaatio- ja sulamispisteanalyysi.

RT-qPCR:n lisäksi IVT-RNA:t analysoitiin 0,8 % agarosigeelillä, joka tehtiin TAE-puskuriin, jossa oli 0,5 µg/ml etidiumbromidia. Näytteet laimennettiin ennen geelille lataamista RNA:n denaturoivaan Gel loading buffer II -puskuriin, joka kuului edellä mainittuun MEGAClear puhdistuskittiin. Geeli ajettiin 80 V -jännitteellä 1 x TAE -puskurissa ja RNA-vyöhykkeet havaittiin UV-lampun avulla. Tuotettuja ja puhdistettuja IVT-RNA-tuotteita käytettiin myöhemmin solutransfektioissa viruspartikkelien tuottamiseksi ja transfektiotehokkuuksien vertailemiseksi.

4.4 T7-PCR-tuotteiden amplifikointi LR-PCR:llä

LR-PCR (eng. long-range PCR) tarkoittaa, että PCR-amplifikaatio suoritettiin käyttämällä reaktioasetelmaa, jolla voitiin tuottaa koko virusgenomin mittainen PCR-amplikoni. Alukkeisiin oli suunniteltu T7-RNA-polymeraasin promootterialue virusgenomin 5'-päähän eteen. T7-PCR-tuotteita valmistettiin kaikista neljästä cDNA-kloonista. PCR-reaktiokittinä käytettiin Q5 HotStart High-Fidelity DNA -polymeraasikittiä (New England Biolabs, M0493). Reaktiutilavuutena käytettiin 25 µl, jossa oli templaattia 10^8 -kopiota, Q5-HotStart-polymeraasia 0,02 U/µl, dNTP-liuosta 200 µM kutakin, 1 x reaktiopuskuria, sekä 0,75 µM virusspesifisiä alukkeita. Käytetyt virusspesifiset alukkeet olivat parechovirusille: HPeV-1_Harris-T7 forward: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT TTG AAA GGG GTC TCC TAG AGAG ja reverse: 5'-TTT TTT TTT TTG TCA TGT CCA ATG TTCC. Coxsackievirusten alukkeet olivat: CV-A9gen1 forward: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT TTA AAA CAG CCT GTG GGT TGT TCCC ja reverse: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC CTC CGC ACC GAA TGC GG. LR-PCR:ssä käytettiin ajo-ohjelmana: **1.** Alkudenaturaatio 30 s 95 °C, **2.** sykli vaihe jossa ensimmäinen osa oli denaturaatio 20 s 95 °C, toinen osa alukkeiden kiinnittyminen 30 s 65 °C ja kolmas osa pidennys 3 min 30 s 72 °C, **3.** loppupidennysvaihe 7 min 72 °C (1 min / kb).

PCR-amplifikaation jälkeen osa PCR-tuotteesta (2 µl) laimennettiin 6 x loading dye -puskuriin ja analysoitiin 0,8 % agarosigeelillä, joka tehtiin 1 x TAE -puskuriin jossa oli 0,5 µg/ml etidiumbromidia. Geelillä käytettiin kokostandardina 1 kb DNA ladder -markkeria (Thermo Fisher, #SM1331). DNA-vyöhykkeet visualisoitiin geeliltä UV-valossa. Loput noin 23 µl PCR-tuotteesta puhdistettiin GeneJET PCR purification Kitillä. Puhdistettujen PCR-tuotteiden konsentraatiot mitattiin DeNovix DS-11 -spektrofotometrillä. PCR-tuotteet säilytettiin -20 °C:ssä puhdistuskitin eluutioliuoksessa. T7-PCR-tuotteita käytettiin myöhemmin sekä transfektiotehokkuustutkimuksissa että cDNA-kloonien säätelyalueiden tutkimisessa.

4.5 Transfektioit nisäkässoluihin ja transfektiotehokkuuden määrittäminen

Työssä virusten genomit transfektoitiin nisäkässoluihin neljässä eri muodossa: rengasmaisena plasmidina, lineaarisena plasmidina, IVT-RNA:na sekä T7-PCR-tuotteena.

Transfektioita tehtiin kahden eri solulinjan soluihin: T7-BSR-soluihin (baby hamster kidney cells = vauvahamsterin munuaissolut) sekä A549-soluihin (ihmisen keuhkokarsinomasolut). Transfektioireaktiot tehtiin aina samalla Lipofectamine 2000 -reagenssilla (Thermo Fisher, 11668027), mutta reaktioilavuudet ja kuoppalevykoot vaihtelivat tilanteesta riippuen. Transfektion aloitustilanteessa soluilla oli aina seerumitonta Gibco OptiMEM-mediumia (Thermo Fisher, 31985070), jota käytettiin myös transfektionäytteiden valmistelussa. Tutkittaessa transfektiotehokkuuksia edellä mainituilla neljällä eri muodolla, transfektioit tehtiin 96-kuoppalevyille käyttäen CV-A9 ja CV-A9-eGFP:ta. 96-kuoppalevyjen kuoppiin pipetoitiin T7-BSR-soluja noin 35 000 solua/kuoppa, joita kasvatettiin yön yli +37 °C:essa ja 5 % CO₂:ssa noin 70 - 90 % konfluenssiin Gibco HEPES DMEM-mediumissa (Thermo Fisher, 31600-083), jossa oli 5 % lämpökäsittelyllä inaktivoitua FBS-seerumia (eng. Fetal Bovine Serum) (Biowest, S1810-100), 10 µg/ml gentamysiini-antibioottia (Biological Industries, 03-035-1B) sekä 200 µg/ml Gibco Genetisiini-antibioottia (Thermo Fisher, 10131035). Kutakin muotoa, eli plasmideja, IVT-RNA:ta ja T7-PCR-tuotetta, transfektoitiin soluille 10¹¹-kopiota ja kolme rinnakkaista kuoppalevyn kuoppaa. Transfektiossa DNA- tai RNA-lipidiseos muodostettiin Lipofectamine 2000 -reagenssin ohjeiden mukaisesti käyttäen näytetilavuutena 50 µl, jossa oli 1,5 µl Lipofectamine 2000 -reagenssia ja 10¹¹-kopiota näytettä, jotka laimennettiin seerumivapaaseen OptiMEM-mediumiin. Ennen transfektoitavan näyteseoksen pipetoimista soluille, solujen kasvatusmediumi vaihdettiin 50 µl:ksi seerumitonta OptiMEM-mediumia. Lopputilavuudeksi kuopan reaktiossa tuli siis 100 µl.

Transfektion jälkeen soluille tehtiin kuvantamista varten immunofluoresenssivärjäys (IFA), jossa infektoituneet solut tunnistetaan ja värjätään virusspesifisillä vasta-aineilla. IFA:ssa solut kiinnitettiin ensin kuoppalevyn pohjaan sekä 6 h että 24 h jälkeen transfektioista pipetoimalla soluille 100 µl 4 %:sta formaldehydiä ja antamalla sen vaikuttaa 15 min huoneenlämmössä. Tämän jälkeen kuopat pestiin kahteen kertaan 100 µl:lla PBS-liuosta, minkä jälkeen solut permeabilisoitiin eli solukalvoon tehtiin huokosia,

joista viruksen tunnistavat vasta-aineet ja tumaväri pääsevät solun sisään, pipetoimalla kuoppiin 100 µl 0,2 %:sta Triton X-100 -liuosta, jonka annettiin vaikuttaa 5-15 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen solut pestiin vielä kahteen kertaan PBS:llä. Permeabilisoinnin jälkeen solut värjättiin vasta-aineilla. Ensin soluille lisättiin 60 µl CV-A9:n tunnistavaa kanissa tuotettua primaarivasta-ainetta, joka oli laimennettu 1/300-suhteessa 3 % BSA-PBS-liuokseen, minkä jälkeen levyä pidettiin huoneenlämmössä hitaassa heilutuksessa 1-1,5 h. Kuopat pestiin kolmeen kertaan 100 µl PBS:llä, minkä jälkeen soluille lisättiin 60 µl 1/400-suhteessa 4 %:seen BSA-PBS-liuokseen laimennettua Alexa Fluor 568 goat Anti-Rabbit IgG (H+L) -sekundaarivasta-ainetta (Invitrogen, ref#A11011), minkä jälkeen kuoppalevyä pidettiin foliolla pimennettynä hitaassa heilutuksessa huoneenlämmössä tunnin ajan. Solut pestiin neljään kertaan PBS:llä, minkä jälkeen solujen tumat värjättiin 60 µl:lla DAPI-liuosta, joka oli laimennettu 4 %:seen BSA-PBS-liuokseen, ja ravisteltiin huoneenlämmössä pimeässä 10 min. Kuopat pestiin lopuksi vielä kahdesti PBS:llä.

Värjäyksen jälkeen solut kuvattiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla (Invitrogen, Thermo Fisher, AMAFD1000). Kuopat kuvattiin kolmella eri kanavalla: sinisen valon kanavalla kuvattiin solujen tumat, punaisella kanavalla kuvattiin Alexa Fluor 568 -vasta-aineella värjäytyt infektoituneet solut, sekä vain CV-A9-eGFP:llä transfektoidut solut kuvattiin vielä vihreällä kanavalla viruksen tuottaman eGFP:n takia.

4.6 LR-PCR-tuotteiden kloonaukseen Zero Blunt -PCR-kloonauksitilla

Työssä tehtiin koko genomin mittaista LR-PCR:ää käyttäen erilaisia alukkeita, jotka erosivat toisistaan niiden sisältämien säätelyalueiden ja niiden sijaintien osalta. Tämä toteutettiin vain CV-A9-eGFP:llä. Erilaisten säätelyalueiden vaikutuksista virusten tuottamiseksi solutransfektiossa haluttiin saada lisää tietoa. Työssä amplifikoitiin koko virusgenomin pituista tuotetta cDNA-muodossa, jossa templaattina käytettiin siis pCV-A9-eGFP-plasmidia ja käyttäen erilaisia alukkeita. PCR-reaktioissa käytettiin yhteensä yhdeksää eri alukeparia, joissa virusgenomin 5'-pään edessä ja 3'-pään perässä olevat säätelyalueet vaihtelivat. 5'-pään eteen suunniteltuja forward-alukkeita oli kolme erilaista, joissa T7-alueen sijainti vaihteli tai virussekvenssin eteen tuli ribotsyymialue, jossa sekvenssi leikkautuu täsmällisesti ennen virussekvenssiä. Myös virussekvenssin 3'-pään perään oli kolme erilaista reverse-aluketta, joissa oli erilaiset terminaatiosekvenssit. Näitä

kolmea eri aluketta testattiin ristiin toistensa kanssa, jolloin tuli siis yhdeksän erilaista PCR-reaktiota. PCR:ssä käytetyt alukkeet olivat:

- CAV9gen1-Forward (alkuperäinen toimiva aluke, positiivinen kontrolli):
TAATACGACTCACTATAGGGTTTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCC
- CAV9gen1-Reverse (alkuperäinen toimiva aluke, positiivinen kontrolli):
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCCGCACCGAATGCGG
- CV-A9-Griggs-FL-F: tässä ei ole T7-aluetta:
TTTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCC
- CAV9gen1-R_T7-T^{orig}:
TGCAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCCGCACCGAATGCGG,

jossa T7^{orig}-sekvenssi on:
5'-AACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCU-3'
- CAV9gen1-R_T7-T^{synt}:
AGCAAAAACCCCGCGAGACCCCGAAGAGGCCCGCGGGGTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTCCGCACCGAATGCGG,

jossa T7^{synt}-sekvenssi on:
5'-AACCCCGCGGGGCCTCTTCGGGGGTCTCGCGGGGTTTTTTGCT-3'
- T7-CV-A9-R-Rz(active)-CV-A9-Griggs-FL-F:
TAATACGACTCACTATAGGGTGTTTTAAACTGATGAGGCCGAAAGGC
CGAAAACCCGGTATCCCGGGTTCTTTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTC
CC

PCR-reaktiot tehtiin samalla tavoin kuin aiemmin käyttäen Q5 Hot Start PCR-entsyymikittiä ja 25 µl:n reaktiutilavuutta. Templaattina käytettiin pCV-A9-eGFP-plasmidia 10⁸-kopiota. Kloonauksen positiivisena kontrollina käytettiin Zero Blunt Kitin (Thermo Fisher, K2700-20) mukana tulleita kontrollitemplaattia, kontrollialukkeita, puskuria, dNTP-liuosta ja polymeraasia kitin ohjeiden mukaisesti, paitsi säätämällä reaktiutilavuus 25 µl:aan, ja käyttäen kitin ohjeista poiketen samaa ajo-ohjelmaa kuin muilla PCR-näytteillä. PCR-amplifikoinnin jälkeen, 5 µl:n osa reaktioseoksista analysoitiin AGE:lla käyttäen TAE-puskuriin tehtyä 0,8 % agarosigeeliä, jossa oli etidiumibromidia 50 µg/ml ja käyttäen 60 - 90 V jännitettä. Kokostandardina käytettiin 1 kb DNA ladder -standardia (Thermo Fisher, SM0311). DNA-vyöhykkeet havaittiin ja valokuvattiin geeliltä UV-valolevyä käyttäen. Jäljelle jääneet noin 20 µl PCR-reaktiota puhdistettiin GeneJET PCR purification Kitillä ohjeiden mukaisesti, minkä jälkeen

puhdistettujen PCR-tuotteiden konsentraatiot mitattiin DeNovix DS-11 -spektrofotometrillä käyttäen taustana puhdistuskitin eluutiopuskuria.

Onnistuneilla PCR-tuotteilla jatkettiin Zero Blunt -kloonaukseen, jossa puhdistetut PCR-tuotteet kloonattiin Zero Blunt PCR Cloning Kitin vektoriin. Ennen kloonaukseen laskettiin paljonko inserttiä eli PCR-tuotetta tarvitaan kloonauksessa. Insertin määrä laskettiin Zero Blunt -kitin mukana tullutta kaavaa käyttäen:

$$x \text{ ng inserttiä} = \frac{(10) * (y \text{ bp PCR-tuotetta}) * (25 \text{ ng linearisoitua pCR}^{\text{®}}\text{-Blunt})}{(3500 \text{ bp pCR}^{\text{®}}\text{-Blunt})}$$

$$x \text{ ng inserttiä} = \frac{(10) * (8200 \text{ bp CV-A9-eGFP Griggs}) * (25 \text{ ng linearisoitua pCR}^{\text{®}}\text{-Blunt})}{(3500 \text{ bp pCR}^{\text{®}}\text{-Blunt})},$$

jolloin $x = 586$ ng, eli inserttiä tulisi käyttää kloonaukseen noin 600 ng. Toisaalta ohjeen mukaan ligaatioseoksessa tulisi käyttää vain noin 10 pg – 100 ng inserttiä, joten inserttiä käytettiin lopulta noin 250 - 350 ng, eli vähemmän kuin laskennallisesti olisi tarvittu.

PCR-tuote kloonattiin pCR[®]-Blunt-vektoriin kitin ohjeiden mukaisesti. Ensimmäisessä ligaatiovaiheessa reaktiivilavuutena oli 10 µl, jossa oli pCR[®]-Blunt-vektoria 25 ng, tasapäästä PCR-tuotetta 5 µl per reaktio (noin 250-350 ng), 5X ExpressLink™ T4 DNA Ligase Buffer -puskuria, steriiliä vettä yhdeksään mikrolitraan, minkä jälkeen viimeisenä lisättiin 1 µl (5 Unit) ExpressLink™ T4 DNA Ligaasia. Reaktioseosta inkuboitiin huoneenlämmössä noin 30 min, ohjeen ilmoittaessa minimiajaksi 5 min ja siitä ylöspäin menevän ajan vain lisäävän kloonauksetehokkuutta.

Ligaation jälkeen vektorit kloonattiin kemiallisella One Shot[®] -transformaatiolla käyttäen kitin One Shot TOP10 *E. coli* -soluja. Ensimmäisenä solut sulatettiin jäähähteessä. Soluja oli mikroputkessa 50 µl, josta otettiin 25 µl toiseen kylmään mikroputkeen, jolloin yhdestä putkesta saatiin tehtyä kaksi erillistä reaktiota. Kuhunkin 25 µl:n soluputkeen pipetoitiin 2 µl ligaatioseosta ja sekoitettiin hellästi pipetin kärjellä. Putkia inkuboitiin jäässä 30 min, jonka jälkeen soluille tehtiin 45 s lämpöshokki +42 °C:essä lämpöblokillä ravistelematta putkia. Soluille lisättiin 250 µl kitin mukana tullutta S.O.C-mediumia, minkä jälkeen soluja kasvatettiin 225 rpm:n ravistelussa +37 °C:essä tunnin ajan. Kutakin transformaatioliuosta pipetoitiin rinnakkaisina 20 µl ja 70 µl alhaisen suolan LB-Agar-maljoille, joissa oli 25 µg/ml Zeosiini-antibioottia selektiota varten. Maljoja inkuboitiin yön yli + 37 °C:essä. Seuraavana päivänä kustakin maljasta valittiin kolme kloonaa, joita kasvatettiin yön yli 6 ml:ssa alhaisen suolan LB + 25 µg/ml Zeosiini -

mediumia. Kasvatetuista solususpensioista tehtiin 1 ml:n glyserolivarastot, joissa oli 15 % glyserolipitoisuus. Lopuista noin 5 ml:n suspensioista eristettiin plasmidit GeneJET Plasmid Miniprep -kitillä (Thermo Fisher, K0502) ohjeiden mukaisesti. Eluutio tehtiin 35 μ l:lla eluutiopuskuria. Eristetyistä plasmideista mitattiin vielä konsentraatiot DeNovix-spektrofotometrilla.

Eristetyt plasmidit analysoitiin TAE-puskuriin tehdyllä 0,8 % agarosigeelillä käyttäen näytetilavuutena 12 μ l, jossa oli plasmidia noin 350 ng laimennettuna steriiliin veteen ja 6 x Loading Dye -liuokseen (Thermo Scientific). Kokostandardina geelillä käytettiin GeneRuler DNA ladder Mix -standardia (Thermo Scientific, SM0334).

4.7 HPeV-1- ja HPeV-1-RGDdel-virusten infektiivisyyden tutkiminen

HPeV-1- ja HPeV-1-RGDdel-virusia tuotettiin solutransfektioilla 6-kuoppalevyllä viruksen infektiivisyyden tutkimista varten. Virusia tuotettiin transfektoimalla sekä IVT-RNA-tuotetta että rengasmaista plasmidia T7-BSR-soluihin. Soluja pipetoitiin 6-kuoppalevyille noin 400 000 solua per kuoppa DMEM-mediumissa jossa oli 5 % FBS-seerumi, ja inkuboitiin yön yli +37 °C:essä ja 5 % CO₂:ssa noin 80 - 90 % konfluenssiin. Seuraavana päivänä ennen transfektioiden aloittamista, solujen kasvatusmediumiksi vaihdettiin 1,5 ml OptiMEM-mediumia. Transfektiossa käytettiin samaa Lipofectamine 2000 -reagenssia kuin aiemmin, mutta näytetilavuutena oli 300 μ l, jossa IVT-RNA:ta tai plasmidia oli noin 4,4 μ g ja 9 μ l Lipofectamine 2000 -reagenssia laimennettuna OptiMEM-mediumiin. Transfektioäytteet pipetoitiin soluille ja inkuboitiin 1-2 h, minkä jälkeen kuopat pestiin 8 kertaa PBS-liuoksella, jotta ylimääräiset soluihin sisäänmenemättömät transfektiolipidit saatiin pestyä kuopista pois häiritsemästä jatkoanalyysia. Kuoppiin lisättiin 1 ml DMEM, 5 % FBS, 10 μ g/ml Gentamysiini + 200 μ g/ml Genetisiini -liuosta, minkä jälkeen soluja inkuboitiin vielä 6 h eli noin yhden replikaatiosyklin verran. Solut kerättiin raaputtamalla ne kuoppien pohjista irti ja suspensoimalla soluliuosta pipetillä, minkä jälkeen suspensio kerättiin mikroputkiin. Tämän jälkeen osasta (150 μ l) suspensiota eristettiin vRNA. Loput n. 800 μ l jäljelle jääneestä suspensiota jäädytettiin ja sulatettiin kolmeen kertaan -80 °C:een ja jäähauteen välillä, jotta solut saatiin hajotettua ja viruspartikkelit vapautettua liuokseen. Lysaattia selkeytettiin sentrifugoimalla mikroputkia 3500 rpm:ssä 10 min +4 °C:essä, jolloin soluroskat saatiin putken pohjalle ja supernatantti otettiin talteen uusiin putkiin ja

säilytettiin -80 °C:eessa. Kerättyä viruslysaattia käytettiin myöhemmissä biologisissa tutkimuksissa.

vRNA eristettiin 150 µl:sta suspensiota käyttäen E.Z.N.A vRNA-eristyskittiä (Omega Bio-tek). Eristykseen käytettiin siis 150 µl virussuspensiota ja eristys tehtiin kitin ohjeiden mukaisesti. Eluutiiovaihe suoritettiin 30 µl:lla DEPC-vettä. Eristetyt vRNA-konsentraatit mitattiin DeNovix DS-11 -spektrofometrillä ja säilytettiin -80 °C:eessa. Eristettyjen vRNA:iden eheyttä arvioitiin suorittamalla diagnostinen RT-qPCR, sekä tekemällä uudelleen transfektio A549-soluihin, jotta transfektiossa tuotetut virukset saatiin osoitettua replikaatiokykyisiksi. RT-qPCR tehtiin samoin kuin aiemmin käyttämällä parechoviruksille suunniteltuja alukkeita. Uusintatransfektio tehtiin 96-kuoppalevyllä muutoin samoin kuin aiemmin, mutta käyttäen 1000 ng eristettyä vRNA:ta ja soluina A549-soluja. A549-soluja pipetoitiin 20 000 - 30 000 solua/kuoppa DMEM + 10 % FBS + 10 µg/ml Gentamysiini -liuoksessa ja inkuboitiin noin 70 - 90 % konfluenssiin. Aikapisteinä transfektiossa käytettiin 6 h ja 12 h, minkä jälkeen solut kiinnitettiin kuoppalevyn pohjaan, permeabilisoitiin ja värjättiin kuten aiemmin käyttäen vain vihreää fluoresoivaa Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit IgG -sekundaarivasta-ainetta (Invitrogen, ref. A11008). Värjäyksen jälkeen solut kuvattiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla.

Replikaatiokyvyn todistamisen lisäksi HPeV-1:llä ja HPeV-1-RGDdel:llä tehtiin infektiot A549-soluille. Infektioissa käytettiin edellä mainittuja kerättyjä ja sulatusjäädytettyjä viruslysaatteja. Infektiot tehtiin 96-kuoppalevyllä oleville A549-soluille, jotka oli kasvatettu noin 90 % konfluenssiin. HPeV-1- ja HPeV-1-RGDdel-lysaatteja pipetoitiin kuoppiin siten, että kuoppien virus-medium-suhteiksi saatiin 1/1, 1/3, 1/5 ja 1/25. Soluja inkuboitiin kuusi tuntia +37 °C:eessa ja 5 % CO₂:ssa, minkä jälkeen soluille tehtiin IFA käyttäen sekundaarivasta-aineena vihreää fluoresoivaa Alexa Fluor 488 goat Anti-Rabbit IgG:tä. Värjätyt solut kuvattiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla.

4.8 Infektion etenemisen kuvaaminen reaaliaikaisesti

Virusinfektion etenemistä nisäkässoluilla kuvannettiin reaaliaikaisesti käyttämällä EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopin time-lapse-kuvantamisohjelmaa. Infektion etenemistä tutkittiin CV-A9-eGFP ja CV-A9 villityypin viruksilla, joita tuotettiin

transfektoimalla molempien virusten IVT-RNA:ta ja T7-PCR-tuotetta. Transfektiot tehtiin 6-kuoppalevyille, jossa oli kasvatettu 300 000 - 400 000 T7-BSR-solua 2 ml:ssa kasvatusmediumia per kuoppa yön yli noin 90 % konfluenssiin. Transfektiot tehtiin 6-kuoppalevyllä samoin kuin HPeV-1:n tapauksessa, eli käyttäen suurempaa 300 µl:n näytetilavuutta, jossa IVT-RNA:ta tai T7-PCR-tuotetta oli 4,5 µg ja Lipofectamine 2000 -reagenssia 9 µl laimennettuna OptiMEM-mediumiin. Kuoppien kasvatusmediumi vaihdettiin 1 ml:ksi OptiMEM-mediumia ennen transfektioiden aloittamista. 1 - 2 tuntia transfektion jälkeen kasvatusmediumi vaihdettiin takaisin 1 ml:ksi seerumia sisältäväksi DMEM + 5 % FBS + 10 µg/ml Gentamysiini + 200 µg/ml Genetisiini -liuokseksi. Infektion annettiin edetä yön yli, minkä jälkeen infektio oli havaittavissa EVOS FL AUTO -mikroskoopin vihreällä kanavalla eGFP-ekspression ansiosta, mikä oli merkki infektion etenemisestä. Tämän jälkeen solut raaputettiin irti kuoppien pohjasta, suspensoitiin kasvatusmediumiin ja kerättiin mikroputkiin. Solut jäädytettiin ja sulatettiin kolmeen kertaan, minkä jälkeen suspensio selkeytettiin sentrifugoimalla 3500 rpm:ssä 10 min +4 °C:essa. Supernatantti, jossa viruspartikkelit olivat, siirrettiin uusiin mikroputkiin ja säilytettiin -80 °C:essa.

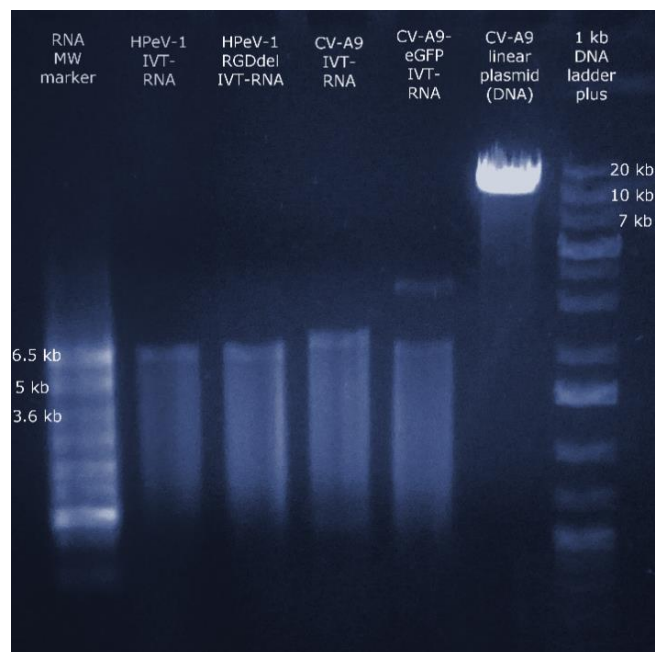
Infektiot tehtiin reaaliaikaisessa kuvantamisessa A549- ja GMK-soluille. Molempia soluja pipetoitiin noin 60 000 - 80 000 solua per kuoppa 24-kuoppalevyille ja inkuboitiin yhden tai kahden yön yli noin 70 % konfluenssiin, minkä jälkeen solujen kasvatusmediumi vaihdettiin uudeksi. Infektioita testattiin käyttämällä eri määriä tuotettuja CV-A9-eGFP- ja CV-A9-lysaatteja ja lopulta CV-A9-eGFP:n tapauksessa 300 µl per kuoppa osoittautui hyväksi, kun taas CV-A9:n tapauksessa jo noin 100 µl osoittautui sopivaksi. Infektion aloituksen jälkeen kuoppalevyä inkuboitiin noin kuusi tuntia +37 °C:essa ja 5 % CO₂:ssa, minkä jälkeen time-lapse-kuvantaminen aloitettiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla. Time-lapse-kuvantamisessa kuoppalevy laitettiin mikroskoopin environmental chamber -kammioon, jonka olosuhteiksi säädettiin +37 °C, 5 % CO₂, minkä lisäksi ilman kosteuden säätö otettiin käyttöön. Objektiiviksi valittiin joko 4 x tai 10 x riippuen kuinka läheltä infektiota haluttiin seurata. Valon suodattimiksi valittiin sekä vihreän valon aallonpituuden kanava (GFP:n havaitseva kanava) että koko normaalin valospektrin kattava kanava (trans-phase-kanava). Tämän jälkeen kuoppalevyn kuopista etsittiin sellaisia kuvantamispisteitä, joissa infektion etenemistä haluttiin seurata. CV-A9-eGFP:n kuopista etsittiin siis vihreää kanavaa käyttäen sellaiset kohdat, joissa alkanut infektio oli havaittavissa soluissa GFP:n avulla.

CV-A9-kontrollikuopissa etsittiin taas normaalin valon kanavalla sellaiset kohdat, joissa CPE oli havaittavissa. Kun kuoppien kuvantamispisteet oli valittu, asetettiin kuvantamisen kokonaisajaksi 48 h ja kuvausintervalliksi 15 min, eli mikroskooppi otti kuvat asetetuista kuvauspisteistä 15 minuutin välein 48 tunnin aikana molemmilla kanavilla. Kuvantamisen jälkeen saman kuvantamispisteen molempien kanavien kuvat avattiin ImageJ -ohjelmalla, jonka avulla kuvat asetettiin päällekkäin ja eri aikapisteiden kuvista tehtiin nopeutettu videotiedosto (esim. 12:sta aikapisteen kuvat näytetään sekunnissa), jossa infektion etenemistä solukossa saatiin visuaalisesti seurattua CV-A9-eGFP:lla infektoidujen solujen tuottaman eGFP:n avulla.

5 Tulokset

5.1 IVT-RNA:n ja T7-PCR-amplikonien tuottaminen

Työssä tuotettiin kaikilla neljällä virusplasmidilla sekä IVT-RNA-tuotetta että T7-PCR-amplikonina. IVT-RNA-tuotteiden eheyttä arvioitiin analysoimalla tuotteet RT-qPCR:llä ja AGE:lla. RT-qPCR antoi kaikilla neljällä (CV-A9, CV-A9-eGFP, HPeV-1 ja HPeV-1-RGDdel) näytteellä positiivisen tuloksen, mikä kertoi IVT-RNA-tuotteiden olleen ainakin virusgenomin 5'-päästä kunnossa. Myös kuvassa 6. esitetty AGE-geeli osoitti IVT-RNA-tuotteiden olleen kunnossa, koska IVT-RNA-tuotteiden bändi oli kokostandardiin verrattuna hieman 6,5 kb:n bändin yläpuolella. Virusgenomien pituuksien tiedettiin olevan cDNA-klooneissa noin 7 - 7,5 kb, mikä kertoo siis geelillä esitettyjen näytteiden olleen kunnossa. Lisäksi myös myöhemmin IVT-RNA:lla tehdyt solutransfektiot osoittivat lopullisesti IVT-RNA:iden olevan kunnossa, koska solutransfektioilla saatiin tuotettua infektiivisiä viruspartikkeleita.



Kuva 6. AGE-geeli. Tuotetut IVT-RNA:t ovat jonoissa 2-5. Ensimmäisessä jonossa on RNA-kokostandardi, jonka ylin vyöhyke on 6,5 kb kokoinen. IVT-RNA-näytteiden ylimmät paksuimmat bändit ovat suunnilleen standardin ylimmän bändin kohdalla, mikä kertoo IVT-RNA-transkriptien olleen kunnossa. Kuvan jonot 6-7 ovat DNA-standardeina vertailun avuksi.

RT-qPCR-analyysissä käytettiin molemmille viruksille (HPeV-1 ja CV-A9) spesifisiä alukkeita. IVT-RNA-tuotteiden konsentraatiot mitattiin, jonka jälkeen näytteiden teoreettiset kopiolukumäärät laskettiin käyttämällä näytteen konsentraatiota ja tiedetyn nukleotidisekvenssin pituutta. Näytteiden kopiolukumäärät laskettiin käyttäen kaavaa:

$$\frac{x \text{ g}/\mu\text{l}}{(\text{transkriptin pituus nt} - \text{määränä} * 340 \text{ Da})} * 6,022 \times 10^{23} = y \text{ molekyyliä}/\mu\text{l}$$

Esimerkkilaskuna voidaan esittää työssä tuotetun HPeV-1-IVT-RNA:n kopiolukumäärä:

$$\frac{1100 * 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{l}}{(7339 \text{ nt} * 340 \text{ Da})} * 6,022 \times 10^{23} = 2,66 * 10^{11} \text{ molekyyliä}/\mu\text{l}$$

IVT-RNA-näytteet laimennettiin RT-qPCR-ajoa varten useaan kopioluviultaan erilaisiin laimennoksiin. RT-qPCR-ajon jälkeen eri näytteiden kvantitaatiokäyriille asetettiin kynnysarvoksi raja, jossa näytteiden fluoresenssi alkoi kasvaa lineaarisesti. Tämän kynnysarvon avulla, näytteille saatiin määritettyä ct-arvot, joka kuvaa qPCR-ajossa sitä sykliä, jossa näytteen amplifikaation osoittava fluoresenssikäyrä ylittää sille asetetun kynnysarvon. Mitä alhaisempi ct-arvo on, sitä enemmän RNA-templaattia näytteessä alun perin oli. RT-qPCR-ajossa käytettiin 45 amplikaatiosyklin ohjelmaa. Analyysissä saatujen näytteiden ct-arvot on kuvattu seuraavassa taulukossa 2.

Taulukko 2. RT-qPCR-ajossa analysoitujen IVT-RNA-näytteiden näytelaimennokset ja ct-arvot.

Näyte	Näytteen kopiololuku*	Ct-arvo
HPeV-1 IVT-RNA	10 ³	34,8
HPeV-1-RGDdel IVT-RNA	10 ³	28,3
CV-A9 IVT-RNA	10 ³	31,1
CV-A9-eGFP IVT-RNA	10 ³	29,5

* Näytteen kopiolukumäärä on laskennallinen arvio.

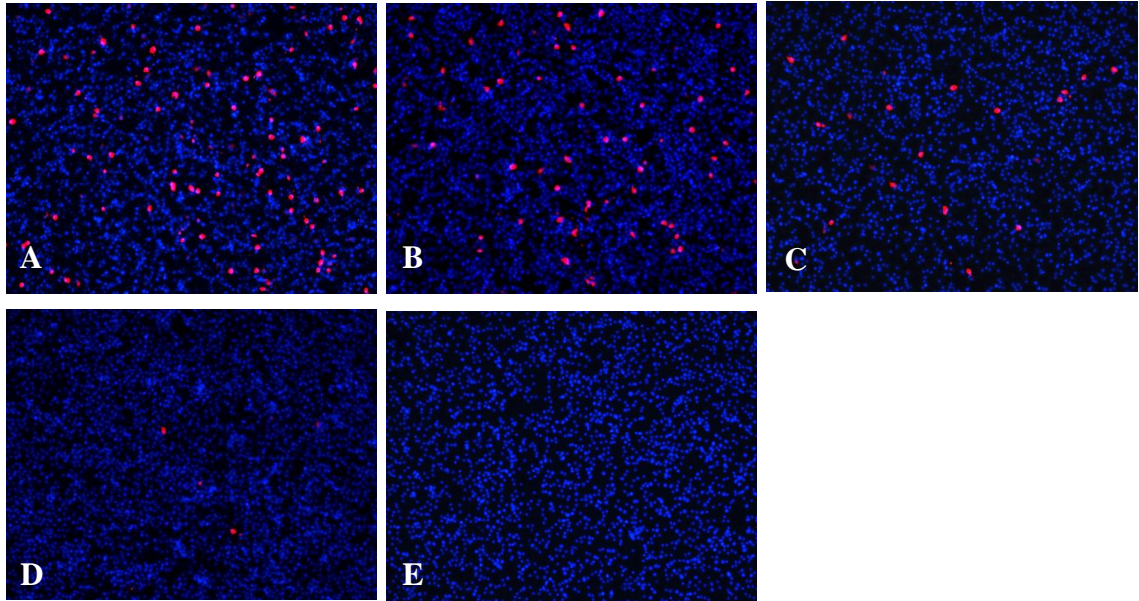
Taulukosta 2. voidaan todeta, että kaikilla näytteillä saatiin jo hyvin alhaisilla, noin 10³-kopiota per näyte -laimennoksilla selkeästi positiiviset tulokset. Lähtönäytteiden kopiomäärät olivat 5*10¹⁰ molekyyliä / μl ja 3,02 * 10¹¹ molekyyliä / μl välillä, eli näytteitä oli laimennettu useampi 1000-kertaisesti.

T7-PCR-tuotteita valmistettiin LR-PCR:llä, jossa plasmideista tuotettiin spesifisillä alukkeilla koko virusgenomin mittaista cDNA-muodossa olevaa PCR-tuotetta, jossa T7-promootterialue on suunniteltu forward-alukkeeseen genomin 5'-pään eteen. PCR-tuotteet analysoitiin AGE:lla (dataa ei ole esitetty). T7-PCR-tuotetta saatiin tuotettua

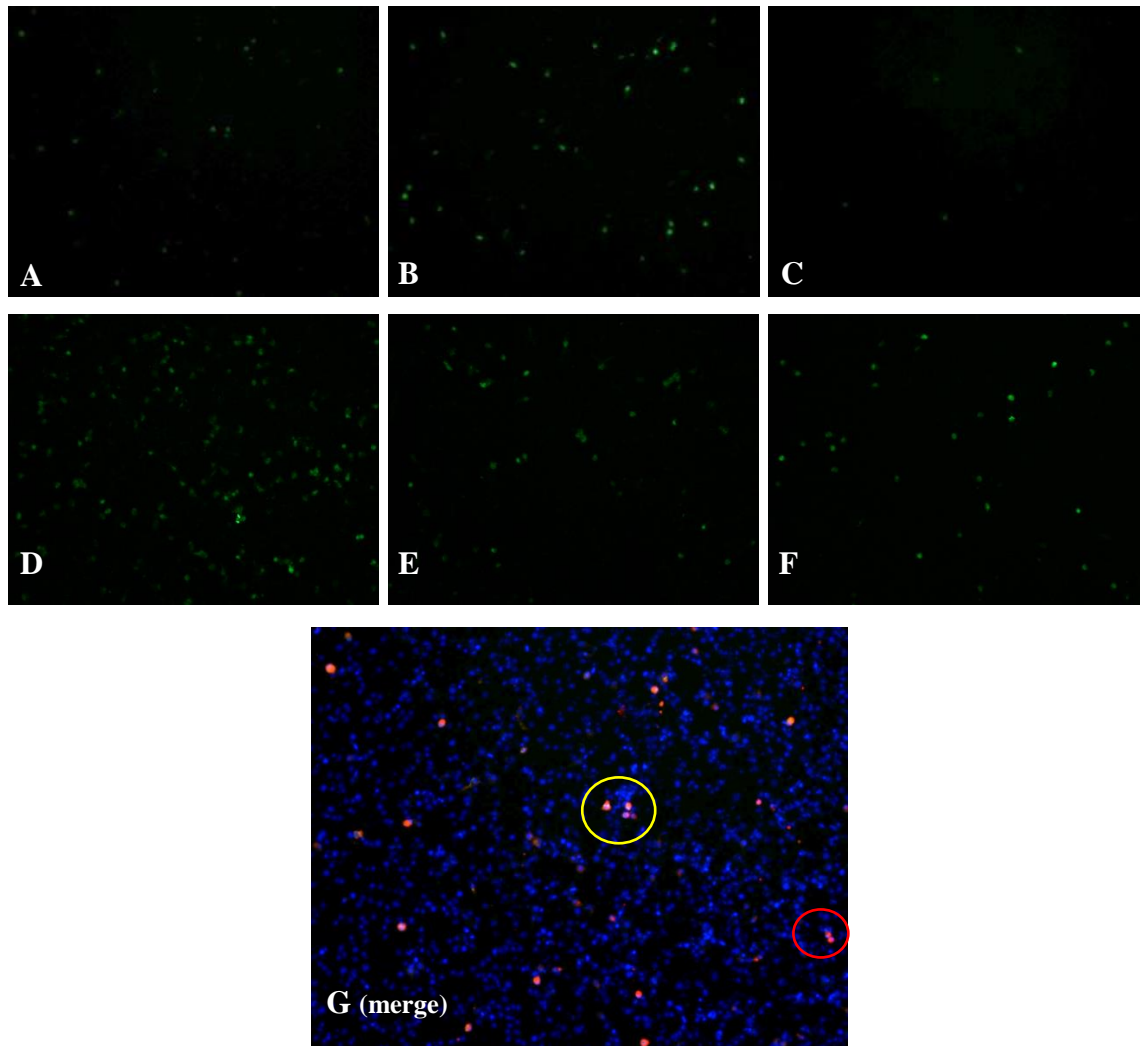
onnistuneesti kaikilla neljällä plasmidilla, kun templaattina käytettiin 10^8 -kopiota. T7-PCR-tuotteet transfektoitiin myöhemmin soluille, minkä seurauksena saatiin tuotettua viruspartikkeleja, mikä lopulta todisti T7-PCR-tuotteiden eheyden AGE:n lisäksi.

5.2 Transfektiotehokkuuden määrittäminen

Transfektiotehokkuuden tutkimisessa käytettiin CV-A9:n ja CV-A9-eGFP:n neljää eri muotoa: rengasmaista plasmidia, lineaarista plasmidia, IVT-RNA:ta ja T7-PCR-tuotetta. Kutakin muotoa transfektoitiin kopioluvultaan sama, 10^{11} -kopion määrä. Transfektion jälkeen T7-BSR-solut värjättiin ja infektoituneet solut tunnistettiin leimattujen vasta-aineiden avulla, tai CV-A9-eGFP:n tapauksessa lisäksi myös infektoituneen solun tuottaman eGFP:n avulla. Transfektioissa oli kaksi eri aikapistettä: 6 h ja 24 h. Värjättyt solut kuvattiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla. Transfektiotehokkuus saatiin laskettua vertaamalla mikroskooppikuvassa esiintyvien leimatuilla vasta-aineilla värjättyjen infektoituneiden solujen määrää kuvassa esiintyvien kaikkien solujen (tumavärjätty) lukumäärällä. Transfektiotehokkuus laskettiin kaavalla: $\text{transfektiotehokkuus} = (\text{infektoituneet solut} / \text{kaikki solut}) * 100$. Kuvassa 7. värjättyt infektoituneet solut näkyvät punaisina ja tumavärjättyt solut sinisinä. Kuvassa 8. on taas kuvattu CV-A9-eGFP:llä transfektoituneet solut niiden tuottaman eGFP:n vihreän fluoresenssin avulla aikapisteissä 6 h ja 24 h. CV-A9-eGFP-tapauksessa solut kuvattiin mikroskoopin kolmella eri kanavalla: sinisellä DAPI-kanavalla tumien havaitsemiseksi, vihreällä GFP-kanavalla CV-A9-eGFP-virusten havaitsemiseksi, sekä punaisella RFP-kanavalla (eng. red fluorescent protein), jolla havaittiin myös ne solut, joissa eGFP-geeni on mahdollisesti poistettu rekombinaatiolla viruksen genomista virusten tuottovaiheessa replikaatiosyklien määrän kasvaessa.



Kuva 7. Transfektoidun CV-A9-plasmidin kuvantaminen EVOS FL AUTO - fluoresenssimikroskoopilla. A: rengasmaisen plasmidin, B: lineaarisen plasmidin, C: IVT-RNA, D: T7-PCR-tuotteen ja E: solukontrollin. Punaiset solut kuvaavat vasta-ainevärjättyjä infektoituneita soluja ja siniset solut kuvaavat kaikkia (tumavärjättyjä) soluja kuvassa. Transfektioita tehtiin T7-BSR-soluihin, minkä jälkeen soluille tehtiin IFA. Kuvat otettiin DAPI:n ja RFP:n kanavilla ja kuvat asetettiin päällekkäin. Kuvaus on tehty 6 h kuluttua transfektioista.

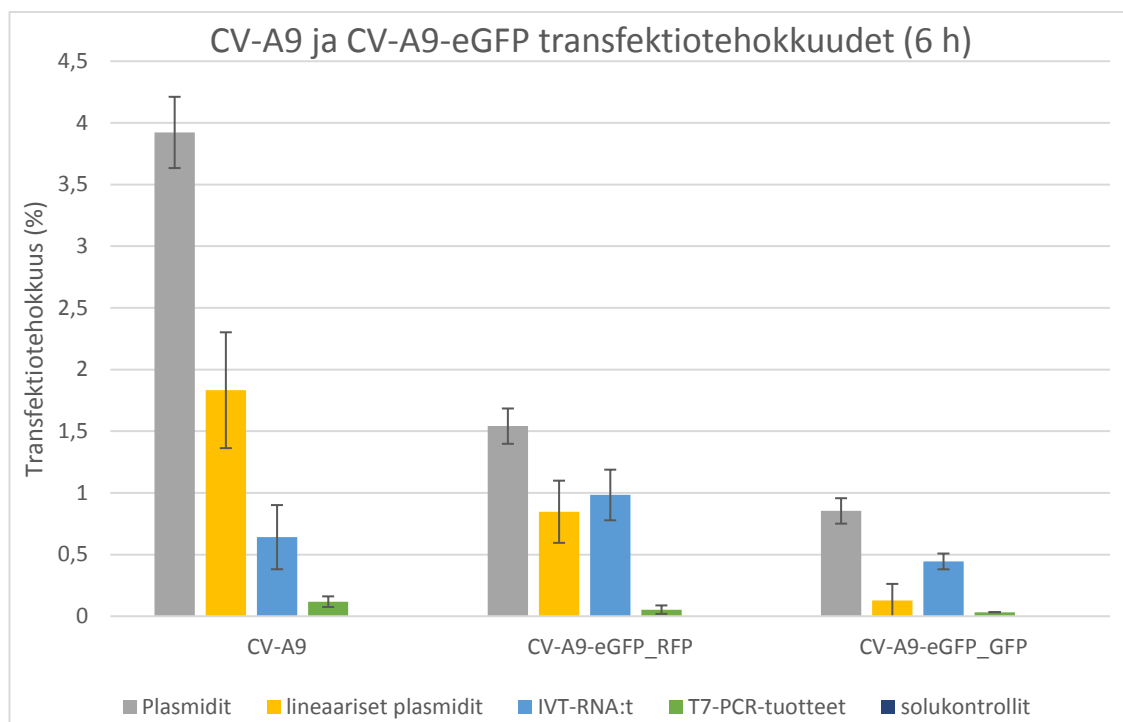


Kuva 8. CV-A9-eGFP-transfektioiden jälkeiset EVOS FL AUTO - fluoresenssimikroskooppikuvat. Kuvassa on esitetty CV-A9-eGFP:n eri muodoilla tehdyt transfektiot T7-BSR-soluihin 6 tunnin ja 24 tunnin jälkeen seuraavasti: **A:** rengasmaisen plasmidi 6 h, **B:** IVT-RNA 6 h, **C:** T7-PCR-tuote 6 h, **D:** rengasmaisen plasmidi 24 h, **E:** IVT-RNA 24 h, **F:** T7-PCR-tuote 24 h ja **G:** Sama tilanne kuin A-kohdassa, mutta kuvassa on esitetty kaikkien kanavien (DAPI, GFP, RFP) kuvat päällekkäin aseteltuna (merge). Kuvissa A-F on esitetty pelkästään mikroskoopin GFP-kanavalla otetut kuvat selkeyden vuoksi ja vihreät solut kuvaavat infektoituneita soluja, jotka ovat tuottaneet eGFP:tä. Vihreän kanavan kuvien lisäksi solut kuvattiin myös RFP- ja DAPI-kanavilla, josta on esimerkkinä kuva G. G-kuvan tilanteessa pelkällä punaisella vasta-aineelle (RFP) infektoituneet solut ovat selvästi punaisia (esimerkkisolut punaisen ympyrän sisällä), kun taas kellertävissä soluissa (esimerkki keltaisen ympyrän sisällä) sekä GFP että RFP-värjäys ovat selkeitä. Solujen tumat näkyvät sinisinä (DAPI).

Kuvista 7. ja 8. voidaan todeta, että CV-A9 ja CV-A9-eGFP:n kaikki neljä transfektio- muotoa tuottivat viruspartikkeleita. Rengasmaisella plasmidilla oli suurin transfektio- tehokkuus sekä CV-A9 ja CV-A9-eGFP:n tapauksissa.

Transfektioissa oli kolme rinnakkaista näytettä kustakin muodosta, paitsi CV-A9-eGFP:n lineaarisesta plasmidista ei transfektoitu 24 tunnin aikapisteessä, koska plasmidia ei ollut riittävästi. Kustakin transfektoidusta kuopasta otettiin EVOS FL AUTO -mikroskoopilla

kuva, josta laskettiin transfektiotehokkuus. Eri näytteiden transfektiotehokkuuksia verrataan havainnollisemmin toisiinsa kuvan 9. pylväsdiagrammissa.



Kuva 9. Transfektioitehokkuudet CV-A9 ja CV-A9-eGFP:n neljällä eri muodolla kuuden tunnin transfektiossa. Vasemman puolen CV-A9-pylväät kuvaavat CV-A9-muotojen transfektioitehokkuuksia, kun on laskettu punaista fluoresoivalla vasta-aineella värjäytyt solut. Kuvan keskimmäisten CV-A9-eGFP_RFP-pylväiden ja oikeanpuoleisten CV-A9-eGFP_GFP-pylväiden transfektioitehokkuudet on laskettu samasta kohdasta kuoppalevyn kuoppaa samalla hetkellä, mutta kuvat on otettu joko punaisen fluoresenssin RFP-kanavalla tai vihreän fluoresenssin GFP-kanavalla. RFP-pylväät kuvaavat transfektioitehokkuuksia, kun on laskettu punaista fluoresoivalla vasta-aineella värjäytyt solut, kun taas oikealla olevat GFP-pylväissä tehokkuus on laskettu laskemalla GFP:tä tuottaneet solut. Mustat janat pylväiden päässä kuvaavat rinnakkaisten näytteiden välistä keskihajontaa.

Kuvasta 9. huomattiin, että kuuden tunnin transfektion jälkeen kaikilla neljällä elementillä oli muodostunut infektoituneita soluja. Tuloksista voitiin huomata, että transfektoimalla jo pelkkä käsittelemätön rengasmaisen cDNA-plasmidi, saatiin molemmilla CV-A9 ja CV-A9-eGFP:llä selvästi paras tehokkuus. CV-A9:llä saatiin lineaarisella plasmidilla toiseksi paras tehokkuus, kun taas CV-A9-eGFP:llä IVT-RNA oli toiseksi tehokkain. T7-PCR-tuotteilla saatiin selvästi heikoimmat transfektioitehokkuudet molemmilla viruksilla. Kaikkien tutkittavien näytteiden transfektioitehokkuudet ja keskihajonnat on esitetty vielä taulukossa 3.

Taulukko 3. Transfektiotehokkuudet 6 h ja 24 h aikapisteissä.

CV-A9, 6 h		CV-A9-eGFP, 6 h	
	Transfektiotehokkuus (%)	Transfektiotehokkuus (%) (GFP)	Transfektiotehokkuus (%) (RFP)
Plasmidi	3,9 +/- 0,29 Std	0,9 +/- 0,10 Std	1,5 +/- 0,14 Std
Lineaarinen plasmidi	1,8 +/- 0,47 Std	0,1 +/- 0,13 Std	0,8 +/- 0,25 Std
IVT-RNA	0,6 +/- 0,26 Std	0,4 +/- 0,06 Std	1,0 +/- 0,21 Std
T7-PCR-tuote	0,1 +/- 0,04 Std	0,0 +/- 0,00 Std	0,1 +/- 0,03 Std
Lipof. ctrl.	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std
Solu ctrl.	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std

CV-A9, 24 h		CV-A9-eGFP, 24h	
	Transfektiotehokkuus (%)	Transfektiotehokkuus (%) (GFP)	Transfektiotehokkuus (%) (RFP)
Plasmidi	19,3 +/- 1,69 Std	3,1 +/- 1,79 Std	9,0 +/- 2,89 Std
IVT-RNA	10,9 +/- 5,73 Std	5,4 +/- 1,46 Std	7,3 +/- 0,92 Std
T7-PCR-tuote	4,6 +/- 2,51 Std	0,8 +/- 0,37 Std	1,7 +/- 0,41 Std
Lipof. ctrl.	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std
Solu ctrl.	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std	0,0 +/- 0 Std

Taulukossa 3. on esitetty CV-A9:n ja CV-A9-eGFP:n transfektiotehokkuudet 6 h ja 24 h transfektioilla. Vasemman reunan sarakkeessa on nimetty käytetty transfektioelementti. Kahden alimmaisena rivinä (lipof. ctrl. ja solu ctrl.) arvot kuvaavat Lipofectamine- ja solukontrollien arvoja, joissa ei siis ollut mitään viruselementtiä mukana. Transfektiotehokkuusarvot kuvaavat kunkin transfektion kolmen rinnakkaisnäytteen keskiarvoa. Std-arvot (+/- Std) tehokkuusarvojen (lihavoidut arvot) perässä kuvaavat rinnakkaisten näytteiden välistä keskihajontaa. CV-A9-eGFP:n tapauksessa on esitetty kaksi eri transfektiotehokkuutta, GFP ja RFP. GFP-sarakkeen arvot kuvaavat mikroskoopin GFP-kanavalla otetun kuvan transfektiotehokkuuksia, eli infektoituneet solut laskettiin niiden tuottaman GFP:n avulla. RFP-sarakkeiden arvot kuvaavat taas RFP-kanavalla otetun kuvan transfektiotehokkuuksia, jossa laskettiin taas vasta-aineilla värjätty infektoituneet solut.

5.3 T7-PCR-tuotteiden kloonaukseen Zero Blunt -vektoriin

CV-A9-eGFP-plasmidista tuotettiin T7-PCR-tuotetta käyttäen erilaisia alukkeita. PCR-reaktioissa käytettiin yhdeksää eri alukeparia, joissa vaihtelivat virusgenomin 5'-pään perässä olevat säätelyalueet ja 3'-pään perässä olevat terminaatioalueet. 5'-pään eteen suunniteltuja forward-alukkeita oli kolme erilaista: T7-alue on suoraan virussekvenssin edessä, T7-alue tulee noin 40 nukleotidin päähän virussekvenssistä tai virussekvenssin eteen tulee ribosyymialue, jossa sekvenssi leikkautuu täsmällisesti ennen virussekvenssiä. Myös virussekvenssin 3'-pään perään oli kolme erilaista reverse-aluketta, joissa oli toisistaan eroavat terminaatiosekvenssit. LR-PCR-ajoissa käytettiin seuraavia alukeparien yhdistelmiä:

Primeripareissa 1. - 3. T7-alue on virussekvenssin edessä

1. CAV9gen1-F + CAV9gen1-R (tämä on siis alkuperäinen toimiva ”kontrolli”).
2. CAV9gen1-F + CAV9gen1-R_T7-T^{orig}
3. CAV9gen1-F + CAV9gen1-R_T7-T^{synt}

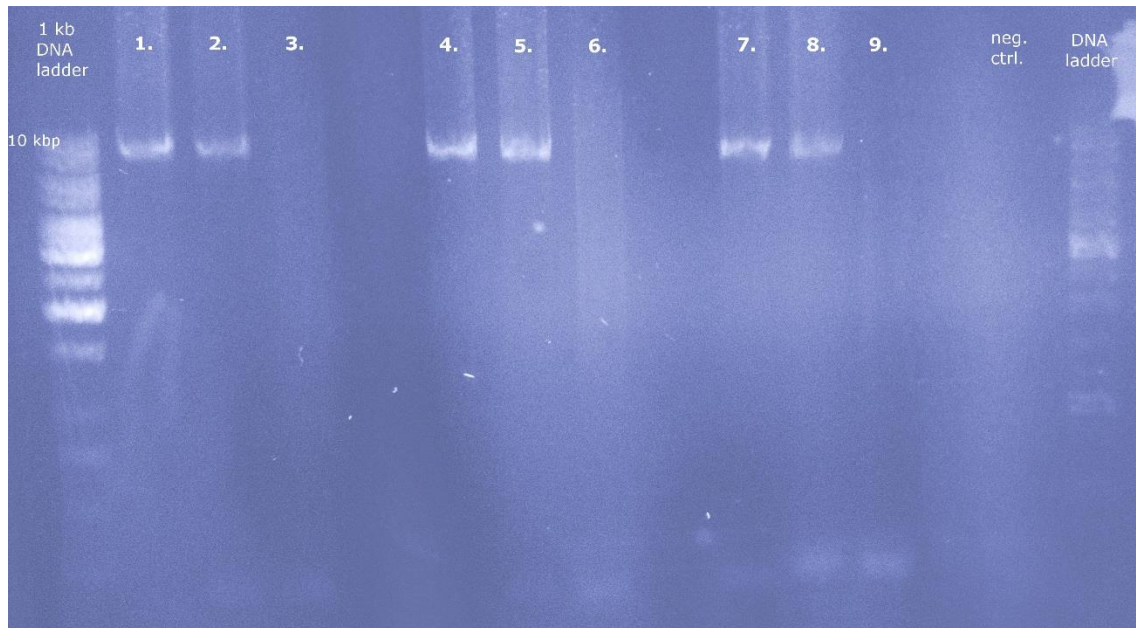
Primeripareissa 4. - 6. T7-alue tulee vektorista n. 40 nt ennen virussekvenssiä

4. CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R
5. CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R_T7-T^{orig}
6. CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R_T7-T^{synt}

Primeripareissa 7.-9. Virussekvenssit edessä on Rz-alue, eli sekvenssi leikkautuu täsmällisesti ennen virussekvenssiä.

7. T7-CV-A9-reverse-comp-Rz(active)-CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R
8. T7-CV-A9-reverse-comp-Rz(active)-CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R_T7-T^{orig}
9. T7-CV-A9-reverse-comp-Rz(active)-CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R_T7-T^{synt}

Erilaisia PCR-reaktioita tuli siis kaikkiaan 9 kappaletta, minkä lisäksi oli vielä yksi Zero Blunt -kloonaukseen positiivinen kontrolli sekä negatiivinen vesikontrolli. PCR-reaktioiden onnistumista analysoitiin kuvan 10. AGE:lla.



Kuva 10. AGE-geelin kuva PCR-tuotteista eri alukkeilla. Näytteiden numerot 1 - 9 kuvaavat PCR-reaktioita eri alukepareilla, jotka on kuvailtu tekstissä kuvan yläpuolella. Templaattina kaikissa oli pCV-A9-eGFP 10^8 -kopiota. Kokostandardin ylin bändi on noin 10 kbp-kokoinen.

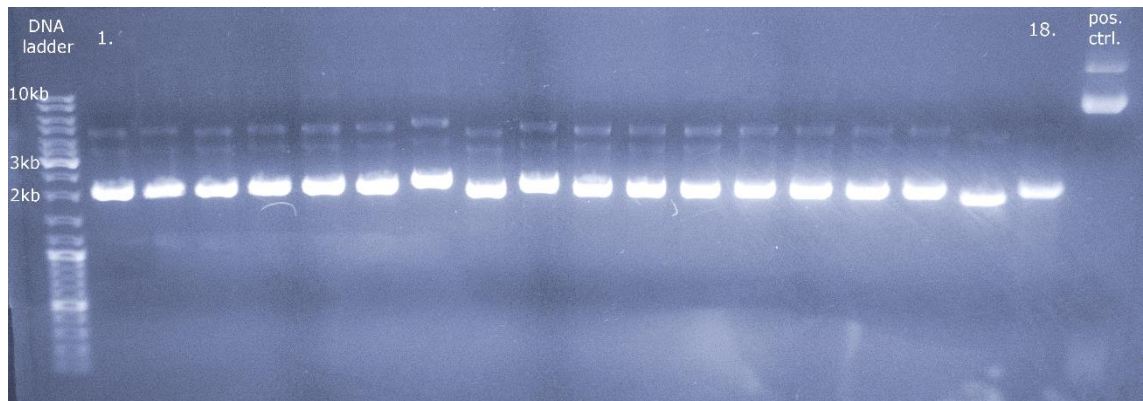
PCR-reaktiot onnistuivat kaikilla muilla alukepareilla lukuun ottamatta niitä, joissa reverse-alukkeena oli CAV9gen1-R_ T7-T^{synt}-aluke. Kuvan geelissä ei ole esitetty positiivista Zero Blunt Kitin kontrollia, vaan se analysoitiin toisella geelillä, josta sille saatiin kuitenkin positiivinen tulos. PCR-ajojen tulokset ja puhdistettujen tuotteiden konsentraatiot on esitetty vielä selkeästi seuraavassa taulukossa 4.

Taulukko 4. PCR-tuotteiden konsentraatiot ja AGE:n tulokset taulukoituna.

	Näyte:	Kons. (ng/ul)	AGE-tulos:*
1.	CAV9gen1-F + CAV9gen1-R	50	+
2.	CAV9gen1-F + CAV9gen1-R_ T7-T ^{orig}	55	+
3.	CAV9gen1-F + CAV9gen1-R_ T7-T ^{synt}	45	-
4.	CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R	50	+
5.	CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R_ T7-T ^{orig}	50	+
6.	CV-A9-Griggs-FL-F + CAV9gen1-R_ T7-T ^{synt}	45	-
7.	T7-CV-A9-reverse-comp-Rz(active)-CV-A9-Griggs-FL-F CAV9gen1-R	+ 66	+
8.	T7-CV-A9-reverse-comp-Rz(active)-CV-A9-Griggs-FL-F CAV9gen1-R_ T7-T ^{orig}	+ 69	+
9.	T7-CV-A9-reverse-comp-Rz(active)-CV-A9-Griggs-FL-F CAV9gen1-R_ T7-T ^{synt}	+ 61	-
10.	Vesikontrolli (1. kohdan alukkeilla)	20	-
11.	Zero blunt positiivinen kontrolli	84	+

*AGE-tulos sarakkeessa plusmerkki (+) tarkoittaa että PCR-tuotteen bändi on havaittavissa geelillä ja miinusmerkki (-) tarkoittaa että bändiä ei ole.

Onnistuneesti tuotetuilla PCR-amplikoneilla jatkettiin Zero Blunt -kloonaukseen. PCR-tuotteet ligoitiin ensin Zero Blunt -vektoriin, minkä jälkeen vektorit siirrettiin TOP10-soluihin transformaation avulla. Pesäkkeitä muodostui maljoille 3-15 kpl riippuen näytteestä. Jokaisesta maljasta valittiin kolme kloonaa, joista tehtiin 6 ml:n yön yli kasvatukset. Soluista eristettiin plasmidit, joissa PCR-tuotteen piti olla. Eristetyillä plasmideilla tehtiin AGE ja solutransfektio. Kuvassa 11. esitetystä AGE-geelistä voitiin kuitenkin todeta, että tavoitellut eli noin 10 kbp:n bändit näkyvät hyvin heikosti, jos lainkaan. Geelillä näytteiden intensiivisimmät bändit olivat noin 2000 bp:n kohdalla kokostandardiin verrattuna, joka oli todennäköisesti vain Zero Blunt -vektorin runko ilman inserttiä. PCR-tuotteiden solutransfektioilla ei saatu positiivisia tuloksia, mikä ei ollut suuri yllätys AGE-tuloksien perusteella heikon 10 kb-bändin takia. Täten kloonauksen voitiin todeta epäonnistuneen.

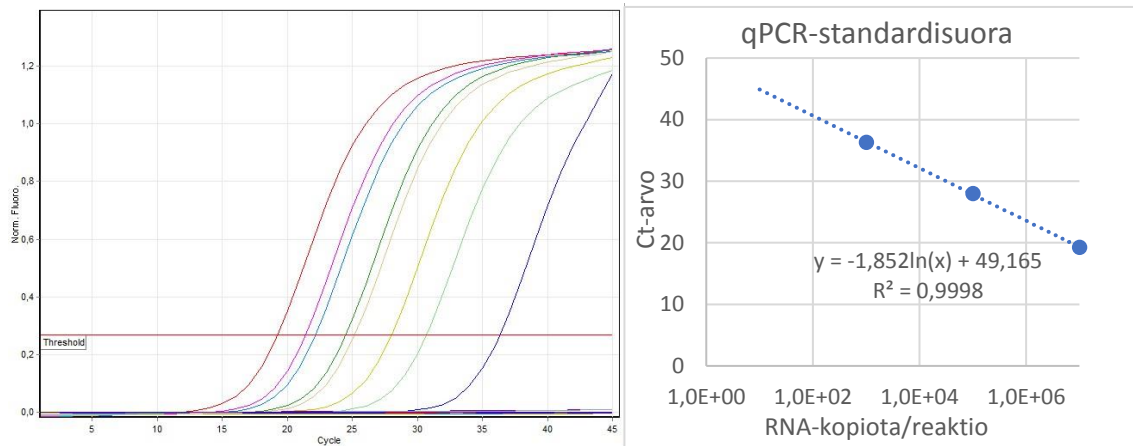


Kuva 11. Transfektioissa käytettyjen plasmidien AGE-kuva. Geelin ensimmäisessä jonossa on kokostandardi, jonka muutamien bändien koko on esitetty vasemmalla esim. ylin bändi on 10 kb kokoinen. Jonot 1-18 kuvaavat eri klooneista tuotettujen ja eristettyjen plasmidien bändit, jotka ovat noin 2 kb kokoisia. Viimeisessä jonossa on positiivisena kontrollina alkuperäinen CV-A9-eGFP-plasmidi, joka toimii myös LR-PCR-reaktioiden templaattina.

5.4 RGD-alueen vaikutus HPeV-1:n infektiokykyyn

HPeV-1:n kuoriproteiinissa olevan RGD-alueen vaikutusta viruksen ja solun välisessä vuorovaikutuksessa tutkittiin vertaamalla tuotettujen HPeV-1-villityypin ja HPeV-1-RGDdel:n aiheuttamaa infektiota A549-soluille. Aluksi HPeV-1:tä ja HPeV-1-RGDdel:a tuotettiin transfektoimalla T7-BSR-solut ja keräämällä infektoituneet solut vuorokautta myöhemmin. Osasta solususpensiota eristettiin vRNA, jolla tehtiin sekä kvantitatiivinen RT-qPCR, että uudelleen transfektiot A549-soluille, jotta tuotetut virukset saatiin osoitettua replikaatiokykyisiksi. RT-qPCR:llä saatiin molempien viruksien vRNA:lla

selkeät positiiviset tulokset. RT-qPCR-ajossa käytettiin tuntemattomista näytteistä kahta eri laimennosta (1/100 ja 1/10 000) sekä kopioluvuiltaan tunnettuja standardeja, jolloin näytteiden kopiolumäärä saatiin selville. RT-qPCR-analyysin kvantitaatiokäyrät sekä standardinäytteistä tehty standardisuora on esitetty kuvassa 12.



Kuva 12. RT-qPCR-ajon kvantitaatiokäyrät sekä standardisuora. Vasemmalla on kuvattu RT-qPCR-ajon kvantitaatioanalyysi, jossa y-akselissa on fluoresenssi ja x-akselissa syklinumero. Punainen vaakasuora kuvaa kynnyksarvon rajaa, jolla näytteiden ct-arvot on määritetty. Oikealla kuvattu standardisuora on tehty RT-qPCR-ajon standardinäytteistä, joiden kopioluku on tiedetty. Standardisuoran yhtälöllä saadaan laskettua tuntemattomien näytteiden kopioluku niiden ct-arvojen perusteella sijoittamalla y:n paikalle näytteen ct-arvo.

Kuvassa 12. vasemmalla puolella on esitetty RT-qPCR-analyysin eri näytteiden kvantitaatiokäyrät ja niiden ct-arvon osoittavan kynnyksarvon viiva (punainen vaakasuora viiva). Standardinäytteiden kvantitaatiokäyrien ct-arvojen avulla tehtiin kuvan oikeanpuoleinen standardisuora, jonka suoran yhtälöä käyttämällä saatiin laskettua tuntemattomien näytteiden kopiolumäärät. Standardisuora tehtiin asettamalla y-akselille standardinäytteen ct-arvo, joka on otettu kuvassa näkyvän punaisen vaakasuoran viivan ja kyseisen standardinäytteen käyrän leikkauskohdasta, kun taas x-akselille laitettiin standardin kopiolumäärä. X-akseli on kuvassa logaritmisessa muodossa. Tuntemattomien näytteiden kopiolumäärä saatiin sijoittamalla yhtälön y:n paikalle näytteen ct-arvo. RT-qPCR-analyysin standardinäytteiden ja tuntemattomien näytteiden ct-arvot ja RNA-kopiolumäärät on esitetty seuraavassa taulukossa 5.

Taulukko 5. RT-qPCR-ajon näytteiden ct-arvot ja kopiolukumäärät.

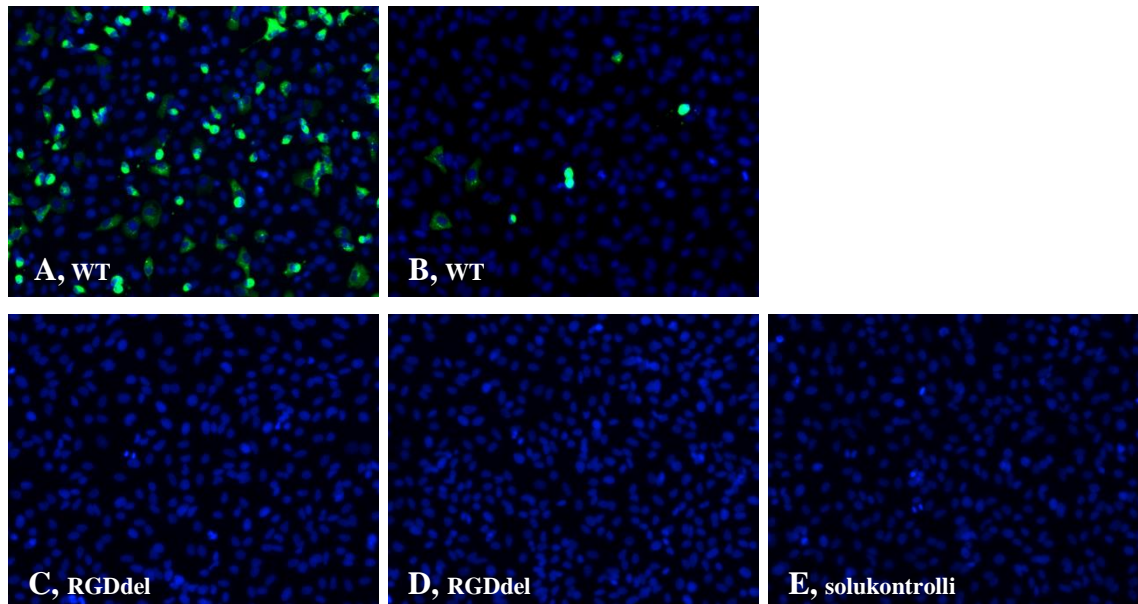
Näyte	Ct-arvo	Kopiolukumäärä / μ l
HPeV-1 IVT-RNA, standardi	19,2	10^7
HPeV-1 IVT-RNA, standardi	28,0	10^5
HPeV-1 IVT-RNA, standardi	36,3	10^3
HPeV-1 IVT-RNA, standardi	ei arvoa	10^2
HPeV-1 vRNA 1/100 (IVT-RNA*)	22,2	2,14E+06
HPeV-1 vRNA 1/100 (plasmidi*)	17,5	2,62E+07
HPeV-1-RGDdel 1/100 vRNA (IVT-RNA)	21,4	3,24E+06
HPeV-1-RGDdel vRNA 1/100 (plasmidi)	17,5	2,61E+07
Solukontrolli vRNA 1/100	36,2	1,11E+03
Negatiivinen kontrolli (vesi)	ei arvoa	0

*Näytteiden nimen perässä on kuvattu suluissa käytetty transfektiomuoto, joka oli joko IVT-RNA tai rengasmaisen plasmidi.

Taulukossa 5. kuvattujen tuntemattomien näytteiden laimennokset ennen RT-qPCR:ää olivat 1/100, eli taulukon kopiolukumäärä laimentamattomassa näytteessä oli noin 100-kertainen. Taulukosta voidaan huomata, että kaikilla tuntemattomilla näytteillä oli jo 1/100 laimennettuna selkeät positiiviset tulokset. Myös solukontrollista eristetty vRNA antoi positiivisen tuloksen, mikä kertoo solukontrollin mahdollisesti kontaminoituneen transfektiotilanteessa tai vRNA:n eristyksessä.

RT-qPCR-analyysin lisäksi eristetyt vRNA:t uudelleen transfektoitiin A549-soluille viruksen replikaatiokyvyn osoittamiseksi. vRNA:n transfektiot tehtiin 6 h aikapisteellä, minkä jälkeen solut värjättiin IFA:lla ja kuvattiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla. Uudelleen transfektiolla ei saatu kuitenkaan selvää positiivista tulosta kummallakaan viruksella eli solut kuopista ei ollut aivan selkeästi havaittavissa värjäytyneitä soluja (dataa ei ole esitetty).

Replikaatiokyvyn todistamisen jälkeen tuotetuilla HPeV-1 ja HPeV-1-RGDdel:lla tehtiin infektiot A549-soluille. Infektiossa kerättyjä viruslysateja pipetoitiin soluille ja infektiota annettiin vaikuttaa noin kuusi tuntia, minkä jälkeen solut värjättiin IFA:lla ja kuvattiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla. Infektioista on esitetty seuraavassa kuvassa 13.



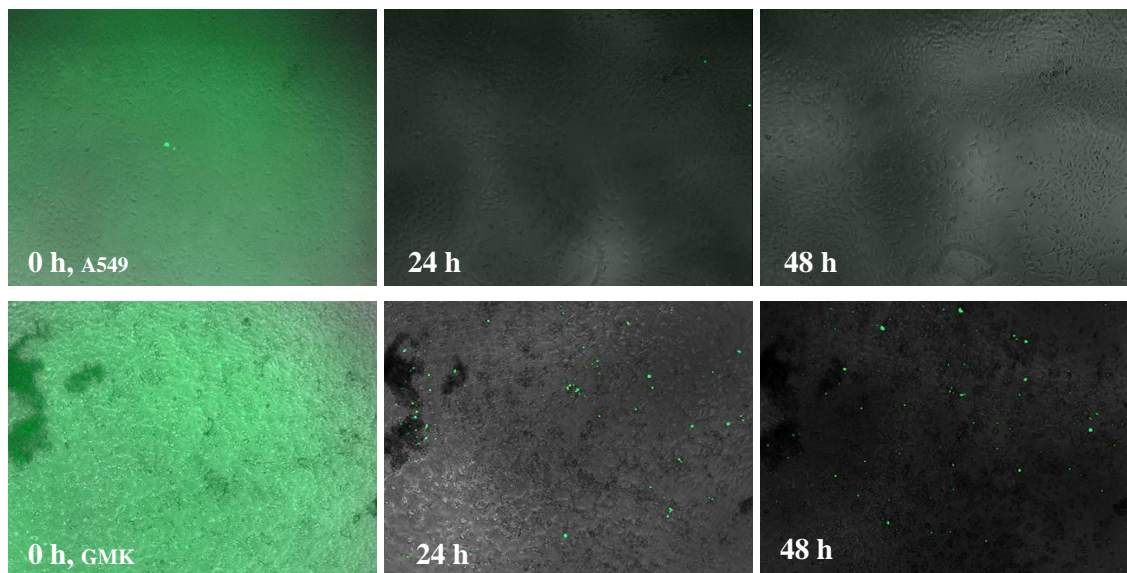
Kuva 13. HPeV-1- ja HPeV-1-RGDdel-virusinfektioiden IFA-kuvat. Paneelissa on esitetty HPeV-1-villityypin (WT) ja HPeV-1-RGDdel:lla tehdyt infektiot seuraavasti: **A:** HPeV-1 (IVT-RNA), **B:** HPeV-1 (rengasmainen plasmidi), **C:** HPeV-1-RGDdel (IVT-RNA), **D:** HPeV-1-RGDdel (rengasmainen plasmidi) ja **E:** solukontrolli. Edellä sulkeissa on mainittu virusten tuottoon käytetty transfektiomenetelmä. Vihreät solut kuvaavat infektoituneita A549-soluja, jotka on värjätty vihreää fluoresoivalla vasta-aineella. Siniset solut kuvaavat kuopan kaikkia (tumavärjättyt) soluja. Kuvien infektiot on tehty 96-kuoppalevyllä suhteessa 1/2, jossa 100 µl viruslysaattia pipetoitiin kuoppaan, jossa oli 100 µl kasvatusmediumia.

Kuva 13. osoitti selkeästi, että HPeV-1-villityypin virus infektoi A549-solut. Etenkin IVT-RNA-transfeksiolla tuotettu virus infektoi solut myös alhaisissa pitoisuuksissa aina 1/25 laimennokseen asti, mitä ei ole kuitenkaan näytetty kuvassa. IFA-kuvien perusteella HPeV-1-RGDdel-virukset taas eivät infektoineet soluja kuvassa esitetyllä 1/2 -laimennoksella, eikä myöskään odotetusti suuremmissa laimennoksissakaan, joita ei ole esitetä kuvassa.

5.5 Infektion etenemisen tutkiminen reaaliajassa CV-A9-eGFP-viruksella

Työssä tutkittiin viruksen etenemistä solukossa reaaliaikaisesti käyttäen CV-A9-eGFP-mutantinvirusta. Viruksen eteneminen havaittiin viruksen infektoiman solun tuottaman eGFP-proteiinin avulla. Infektion etenemistä tutkittiin sekä A549- että GMK-soluissa. Solut infektoitiin solutransfeksiolla tuotetulla CV-A9-eGFP-viruksella. Virusta tuotettiin transfektoimalla CV-A9-eGFP IVT-RNA:ta 6-kuoppalevyllä kasvatettuihin T7-BSR-soluihin. Kuvantaminen tehtiin EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopin time-lapse-ohjelmalla 48 h ajan käyttäen 15 minuutin intervallia. Ennen kuvaamisen aloitusta, infektiot aloitettiin ja annettiin vaikuttaa 6 h, minkä jälkeen kuoppalevy vietiin

mikroskoopille. Time-laps-kuvat otettiin sekä GFP:n että näkyvän spektrin kanavalla, jolloin GFP:n kanavalla nähtiin infektoituneet solut ja normaalin spektrin Trans-Phase-kanavalla nähtiin kuopan kaikki solut valomikroskoopin tapaan. Saman kuvauspisteen eri kanavan kuvat asetettiin päällekkäin ImageJ -tietokoneohjelmalla ja eri aikapisteiden kuvista tehtiin video 12 fps (frames per second) nopeudella, jolloin 48 h kuvantamisesta 15 min intervalleilla tehdyistä saatiin noin 16 sekunnin mittaisia videoita. Videoista voitiin seurata, kuinka infektio etenee ajan mittaan testatuilla soluilla ja miten esim. ympäröivät solut käyttäytyvät infektion edetessä. Seuraavassa kuvassa 14. esitetään kahdesta eri videosta tehdyt kuvapaneelit. Kuvan ylempi paneeli kuvaa CV-A9-eGFP-infektion etenemistä A549-soluissa alemman paneelin kuvatessa sen etenemistä GMK-soluissa.



Kuva 14. CV-A9-eGFP infektion etenemisen kuvaaminen reaaliaikaisesti sekä A549- että GMK-soluilla. Ylempi paneeli kuvaa CV-A9-eGFP:n etenemistä A549-soluilla, kun taas alempi paneeli kuvaa sen etenemistä GMK-soluissa. Kuviin on kirjoitettu kyseisen kuvan aikapiste time-lapse-kuvantamisen aloitushetkestä.

Kuvassa 14. rivien ensimmäinen kuva on time-laps-kuvantamisen aloituskuva, jota on edeltänyt kuuden tunnin infektio, jotta kuvannettavat infektofokukset voidaan havaita ja valita kuvauspisteiksi time-laps-kuvantamista aloitettaessa. keskimääräinen kuva esittää 24 tunnin kohdalta otettua kuvaa samasta kuvauspisteestä, ja oikealla oleva kuva esittää viimeistä 48 tunnin kohdalla otettua kuvaa infektiosta. Kuvasta voitiin huomata, että A549-soluilla infektio ei edennyt yhtä selkeästi kuin GMK-soluilla. Kuvapaneelissa esitettyjen kuvien lisäksi, rinnalla kuvattiin myös molemmilla solulinjoilla kontrolleina sekä CV-A9:n infektiota, että pelkkää solukontrollia. Näissä kontrolleissa ei esiintynyt

eGFP-kanavalla mitään infektoituneita soluja. Toisaalta CV-A9-villityypin infektoimissa soluissa oli havaittavissa selkeästi suurempi CPE, kuin CV-A9-eGFP:llä.

6 Tulosten tarkastelu

6.1 Transfektiokokeet

Transfektiotehokkuuksia määritettäessä voitiin huomata, että kuuden tunnin transfektioissa tehokkuudet olivat selvästi alhaisemmat kuin 24 tunnin transfektioissa. Pikornaviruksen infektiocykli kestää noin 7-10 tuntia, joten transfektiotehokkuutta määritettäessä on järkevämpää tarkastella kuuden tunnin aikana eli yhdessä infektiocyklissä saatuja tuloksia ja kuvassa 9. onkin esitetty vain kuuden tunnin transfektiotehokkuudet. Suurin ero 24 h jälkeen otetuissa mikroskooppikuviissa oli, että soluja oli infektoitunut selvästi enemmän sekundaari-infektoiden kautta, missä viruspartikkelit vapautuvat infektoituneesta solusta infektoiden uusia soluja. Sekundaari-infektio selittävät siis 24 h transfektioiden suuremmat laskennalliset transfektiotehokkuudet. Toinen merkittävä havainto oli, että T7-PCR-tuotteen aiheuttamaa infektiota ei ollut havaittavissa kovinkaan selkeästi vielä kuuden tunnin kuluttua, mutta 24 h jälkeen infektoituneita soluja oli selvästi enemmän, mikä osoittaa lopulta transfektion onnistumisen (kuva 3.).

Tarkasteltaessa CV-A9-eGFP:n transfektiotehokkuuksia taulukosta 3. ja kuvasta 9. käy selvästi ilmi että, transfektiotehokkuudeksi saadaan laskennallisesti selvästi suurempi arvo, kun lasketaan vasta-aineella (RFP) värjätyt solut kuin laskettaessa infektoidut solut niiden tuottaman eGFP:n avulla. Esimerkiksi kuuden tunnin CV-A9-eGFP:n rengasmaisella plasmidilla tehdyssä transfektiossa, transfektoituneiden solujen määrä verrattuna kokonaissolumäärään oli RFP-kanavan kuvassa (vasta-ainevärjätyt solut) 1,5 % ja GFP-kanavan kuvassa taas 0,9 %, eli värjäytyjä infektoituneita soluja oli noin 1,5-kertainen määrä verrattuna eGFP:tä ekspressoivien solujen määrään. Muilla muodoilla, eli lineaarisella plasmidilla, IVT-RNA:lla ja T7-PCR-tuotteella tehdyissä transfektioissa erot olivat vielä selvästi suurempia. Erot voivat johtua siitä että, eGFP:n ilmentävä geeni on poistunut viruksen genomista. Vaihtoehtoisesti CV-A9-eGFP:n infektoima solu ei ole vielä kuudessa tunnissa ehtinyt ilmentää riittävästi eGFP:tä, jotta infektio havaittaisiin fluoresenssimikroskoopilla, vaikka sama solu on selvästi infektoitunut kuvattaessa mikroskoopin RFP-kanavalla.

Transfektiotehokkuuksia vertailtaessa voitiin huomata, että rengasmaisella plasmidilla saatiin paras tehokkuus. Tulos oli yllätys, koska plasmidissa viruksen genomi ei ollut sen

luonnollisessa RNA-muodossa, vaan komplementaarisessa DNA-muodossa. Plasmidirungon sisältöä eli virusgenomin ulkopuolella olevia säätelyalueita ja niiden sijainteja ei tiedetty tarkkaan, mutta tuloksista voitiin päätellä, että plasmidissa virusgenomin edessä oli todennäköisesti T7-promootterialue, koska T7-BSR-solujen tuottama T7-RNA-polymeraasi transkriptoi plasmidissa olevan virusgenomin T7-RNA-polymeraasin promootterikohdasta aloittaen ja jatkaen virusgenomia pitkin tuottaen vRNA:n replikaatiosyklin aloittamiseksi. Kun solu on tuottanut cDNA:sta infektiivisen vRNA:n, voidaan RNA:sta transloida polyproteiini, josta tuotetaan lopulta autokatalyyttisesti viruksen rakenteellisia ja replikaatioon osallistuvia proteiineja, kuten kirjallisuuskatsauksen kohdassa 2.6 on kuvattu tarkemmin. T7-RNA-polymeraasipromootterikohdan lisäksi cDNA-kloonin virusgenomin 3'-pään perässä on todennäköisesti jokin toimiva terminaatiosekvenssi, koska transfektiotehokkuus oli niin korkea. Jos transkriptoidun virusgenomin perässä olisi paljon ylimääräistä siihen kuulumatonta sekvenssiä, viruspartikkeleita ei kehittyisi näin tehokkaasti. Näihin säätelyalueisiin liittyvissä kysymyksiin voitaisiin saada vastaus esimerkiksi sekvensoimalla cDNA-kloonin virusgenomin molemmista eli 5'- ja 3'-päistä pois päin, jolloin sekvenssianalysoinnilla saataisiin parempi selvyys mahdollisista säätelyalueista ja terminaatioalueista virusgenomin ulkopuolella.

Yllätyksellisen tuloksesta teki etenkin se, että lineaarisella plasmidilla saatiin alhaisemmat transfektiotehokkuudet kuin rengasmaisella plasmidilla, vaikka plasmidin ollessa lineaarisessa muodossa solun luulisi pystyvän käsittelemään sen helpommin. Rengasmaisen ja lineaarisen plasmidin transfektiotehokkuuksien välillä oli selkeät erot sekä CV-A9:llä että CV-A9-eGFP:llä. CV-A9:n kuuden tunnin transfektioissa rengasmaisella plasmidilla oli noin 100 % parempi tehokkuus kuin lineaarisella plasmidilla ja CV-A9-eGFP:llä ero oli vielä suurempi rengasmaisen plasmidin hyväksi. Tämän eron selittäminen on vaikeaa, mutta osasyynä eroon voi olla laskennalliset virheet laskettaessa transfektoitavaa kopiolumäärää.

Myös T7-PCR-tuotteen transfektiolla saatiin tuotettua viruspartikkeleita, etenkin 24 tunnin transfektiolla. T7-PCR-tuote oli plasmidin tapaan komplementaarisessa kaksisäikeisessä DNA-muodossa, eli tässäkin tapauksessa transfektoidun solun täytyy käsitellä cDNA-genomi samoja mekanismeja käyttäen kuin plasmidien tapauksessa. T7-PCR-tuotteiden tapauksessa näytti siltä, että solulla kesti kauemmin viruksen genomin prosessointiin kuin muilla käytetyillä transfektiomuodoilla. T7-PCR-tuotteilla saatiinkin

selvästi suurimmat erot kuuden tunnin ja 24-tunnin transfektioiden välillä muihin muotoihin verrattuna. T7-PCR-tuotteella tehty onnistunut transfektio osoitti sen, että täyden genomin mittaisen cDNA:n amplifikointi onnistuu yhdellä PCR-vaiheella. Tämän lisäksi onnistuminen osoittaa, että PCR:ssä saavutetaan niin korkea tarkkuus, että sekvenssiin ei synny virheitä, jotka vaikuttaisivat viruksen elinkykyyn. Heikkilä työryhmineen (2011) kuvaileekin tämän mahdollistavan virusten muokkaamisen mutageenisillä alukkeilla, joissa alukkeen sekvenssiin on suunniteltu esimerkiksi tietty restriktiokohta, jota voidaan käyttää hyväksi kloonauksessa. Nopean mutageneesin mahdollistamisen lisäksi, PCR-amplikonin käyttö viruspartikkelien tuottamisessa solutransfektiossa voi säästää myös paljon aikaa ja rahaa, koska virusgenomia saadaan tuotettua cDNA-muodossa eksponentiaalisesti yhdellä PCR-ajolla, ilman että genomia transkriptoitaisiin ensin IVT-RNA:ksi.

IVT-RNA-transfektioilla saatiin plasmideja huonompi, mutta kuitenkin selvästi parempi transfektiotehokkuus kuin T7-PCR-tuotteella. Esimerkiksi CV-A9:n kuuden tunnin IVT-RNA-transfektioissa transfektiotehokkuudet olivat 0,6 % sen ollessa rengasmaisella plasmidilla 3,9 % ja T7-PCR-tuotteella 0,1 %. IVT-RNA:ssa virusten genomit olivat niiden luontaisessa RNA-muodossa, joten viruspartikkeleita oletettiin muodostuvan melko tehokkaasti. Se miksi IVT-RNA-transfektiot jäivät tehottomammiksi kuin plasmideja käytettäessä, voi selittyä osittain sillä, että RNA on rakenteeltaan selvästi heikompaa ja hajoavaisempaa kuin kaksinauhainen DNA, eli IVT-RNA on saattanut hajota esimerkiksi sulatettaessa sitä $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:eesta ja tehtäessä siitä erilaisia laimennoksia transfektioita varten. Ero saattoi myös johtua siitä, että transfektioissa käytetty Lipofectamine 2000 -reagenssi toimi paremmin käytettäessä DNA:ta kuin RNA:ta.

6.1.1 Plasmidin säätelyalueiden vaikutuksen tutkiminen

Plasmidien käyttö transfektioissa osoittautui odotettua tehokkaammaksi tavaksi tuottaa infektiivisiä viruspartikkeleita. Onnistumisen seurauksena pyrittiinkin selvittämään, miten virusgenomin edessä olevat säätelyalueet ja etenkin T7-promootterialueen sijainti vaikuttavat transfektion onnistumiseen. Tämä toteutettiin tuottamalla LR-PCR:llä koko genomin mittaisia amplikoneja käyttäen erilaisia alukkeita. Amplikonit kloonattiin Zero Blunt -vektoriin ja vektori liitettiin kompetenttien *E. coli* -solujen plasmidiin, jonka jälkeen maljoilta valittiin kloonit, joiden määrää lisättiin tekemällä kloonin pesäkkeestä

yön yli -kasvatukset. Kasvatetuista soluista eristettiin plasmidit, jotka analysoitiin kvalitatiivisesti AGE:lla ja transfektoitiin soluille. Työssä LR-PCR:llä saatiin onnistuneesti tuotettua PCR-tuotteita kaikilla eri alukepareilla paitsi niillä, joissa reverse-alukkeena oli CAV9gen1-R_ T7-T^{synt}-aluke. Myös kloonauksessa saatiin kaikilla tuotteilla pesäkkeitä, joissa oletettiin olevan Zero Blunt -vektori PCR-tuotteen kanssa, koska vektorissa oli selektiota varten zeosiini-resistenssigeeni ja maljoilla kasvatusmediumissa oli myös zeosiinia. Lopulta kuitenkin huomattiin, että klooneista tuotetut ja eristetyt plasmidit eivät tuottaneet solutransfektiossa lainkaan viruspartikkeleja sekä lisäksi rinnalla tehty AGE-analyysi osoitti, että yhdelläkään kloonilla ei ollut selkeää bändiä noin 10 kbp:n kohdalla, vaan bändit olivat kaikissa näytteissä noin 2 kb. PCR-tuotteiden koot olivat jo noin 7000-8000 bp, joten AGE:n bändit olivat todennäköisesti vain *E. coli* -solujen plasmideja ilman PCR-inserttiä. Näin säätelyalueiden vaikutuksista viruspartikkelien tuottamiseksi transfektiossa ei saatu tässä työssä selvyttä epäonnistuneen kloonausvaiheen takia. Mikäli kloonია ei saada tuotettua kuten tässä työssä, PCR-tuotteen voisi myös transfektoida sellaisenaan soluihin ja katsoa, muodostuisiko soluissa viruspartikkeleja.

6.2 HPeV-1:n RGD-osan vaikutus viruksen infektiokykyyn

HPeV-1:n RGD-osa sijaitsee viruksen kapsidin pinnalla VP1-proteiinin C-terminaalien läheisyydessä ja sillä tiedetään olevan joidenkin virusten ja solujen välisissä vuorovaikutuksissa tärkeä rooli. Kuvaa 12. tarkasteltaessa voitiin todeta, että HPeV-1:n RGD-alueella on selvä merkitys viruksen infektiokykyyn infektoitaessa A549-soluja. HPeV-1-RGDdel:llä tehdyissä kuuden tunnin infektioissa ei havaittu infektoituneita soluja, kun taas HPeV-1-villityyppi infektoi solut selvästi. Tuloksessa on kuitenkin yksi ongelma. Transfektioilla tuotetut HPeV-1- ja HPeV-1-RGDdel-virukset pyrittiin osoittamaan replikaatiokykyisiksi eristämällä osasta transfektion jälkeisistä viruslysaateista vRNA:t ja suorittamalla niille sekä RT-qPCR että uudelleentransfektio. RT-qPCR:ssä tuloksiksi saatiin molempien viruksien vRNA:lla selvät positiiviset tulokset. Toisaalta uudelleen transfektoitaessa eristetyt vRNA:t A549-soluille, kumpikaan ei antanut selvää positiivista tulosta, eli viruspartikkeleja ei ollut selvästi havaittavissa kummallakaan viruksella. Etenkään HPeV-1-RGDdel:n vRNA-transfektiossa ei ollut havaittavissa selvästi infektoituneita soluja vasta-ainevärjäyksen jälkeen. Tämä laskee jonkin verran replikaatiokyvyn osoittamisen luotettavuutta.

Epäonnistuneet vRNA:n uusintatransfektioit voivat selittyä esimerkiksi sillä, että eristetty vRNA:n rakenne kärsi sulatus-jäädätyksestä. Transfektioprosessi itsessään saattoi myös jostain syystä epäonnistua. Joka tapauksessa kerätty ja selkeytetty HPeV-1-lysaatti, josta myös vRNA oli eristetty, infektoi A549-solut jo melko alhaisella 1/25-laimennoksella, eli kyseinen virus oli ainakin replikaatiokykyinen, kuten RT-qPCR-tuloskin osoitti. HPeV-1-RGDdel:n tapauksessa replikaatiokykyä ei voitu todistaa infektiolla, koska HPeV-1:n ei odotettukaan infektoivan soluja ilman RGD-alueitaan, eikä HPeV-1-RGDdel infektoinutkaan niitä.

HPeV-1:n on raportoitu kiinnittyvän RGD-alueitaan käyttäen solun α V-integriinireseptoreihin. HPeV-1:n RGD-alueen merkitystä soluadheesioon on todistettu erilaisin menetelmin: solun reseptorit on peitetty RGD-alueen sisältävillä peptideillä, tekemällä viruksen RGD-alueen sekvenssiin erilaisia mutaatioita, käyttämällä solujen α V-integriinien toiminnan estäviä vasta-aineita, sekä käyttämällä poistogeenisiä soluja (eng. knock-out), joissa integriinien ekspressio on estetty (Boonyakiat ja muut 2001; Joki-Korpela ja muut 2001; Seitsonen ja muut 2010; Merilahti ja muut 2016a). Boonyakiat työryhmineen (2001) teki HPeV-1:n RGD-alueelle erilaisia pistemutaatioita, joissa havaittiin, että tietyt mutaatiot aminohapposekvenssin +1 ja +2 sijainnissa heikensivät viruksen infektiokykyä ja toiset veivät kyvyn kokonaan pois. Villityypin aminohapposekvenssi on RGD~~MAN~~, ja heikentäviä mutaatioita olivat esimerkiksi RGD~~HAN~~ ja RGD~~MYN~~, kun taas RGD~~EMAN~~ ja RGD~~PAN~~ veivät infektiokyvyn kokonaan. Tämä siis todisti, että RGD-alueella oli selvä merkitys HPeV-1:n infektiokykyyn (Boonyakiat ja muut 2001). Tässä työssä HPeV-1:sestä oli poistettu kokonaan RGD-alue, joten hypoteesi oli, että HPeV-1-RGDdel ei kykene infektoimaan A549-soluja. Työssä käytettyjen A549-solujen solukalvolla esiintyy α V-integriinireseptoreita (Merilahti ja muut 2016a) ja HPeV-1-villityyppi infektoikin solut selvästi. HPeV-1-RGDdel taas ei infektoinut soluja, joten tehdyt havainnot vahvistavat myös aikaisemmin raportoituja tuloksia, että HPeV-1:n RGD-alueella on tärkeä rooli infektiossa. Kuten sanottua, HPeV-1 tarvitsee RGD-alueitaan kiinnittyäkseen solun integriinireseptoriin, mutta tämän lisäksi on raportoitu, että pelkkä RGD-alueen ja integriiniin välinen vuorovaikutus ei välttämättä riitä viruksen sisäänmenoon, vaan HPeV-1 voi tarvita tämän lisäksi avustavaa apureseptoria, heparaanisulfaattia (Merilahti 2016b). Heparaanisulfaatti onkin yleinen eläinsolujen pinnalla esiintyvä proteoglykaani, jonka tiedetään osallistuvan monien virusten kiinnittymisessä.

Vaikka RGD-alue on osoittautunut ja osoittautui osittain myös tässä työssä HPeV-1:lle tärkeäksi solun kiinnittymisessä, asia ei ole näin kaikkien pikornaviruksien kanssa. Esimerkiksi CV-A9:n on tutkittu infektoivan soluja tehokkaasti myös ilman RGD-aluetta, vaikka se käyttää RGD-aluetta yleisesti soluun kiinnittymisessä (Hughes ja muut 1995).

Tässä työssä ei tutkittu sen tarkemmin mihin reseptoriin HPeV-1:n RGD-alue kiinnittyy infektiossa, vaan HPeV-1-villityypin ja HPeV-1-RGDdel:n aiheuttamia infektoitujen solujen määrää verrattiin yleisesti toisiinsa. RGD-alueen kiinnittymistä tiettyyn reseptoriin esim. integriiniin, voitaisiin tutkia tarkemmin käyttämällä edellä mainittuja menetelmiä, joissa solun reseptorin toiminta voidaan esimerkiksi estää eri molekyyileillä tai tekemällä muutoksia viruksen RGD-alueeseen mutageneesin avulla.

6.3 CV-A9-eGFP-viruksen etenemisen kuvantaminen reaaliaikaisesti

Viruksen etenemistä solukossa kuvattiin reaaliaikaisesti EVOS FL AUTO - fluoresenssimikroskoopin time-lapse-ohjelmalla. Etenemistä kuvattiin 48 tunnin ajan käyttäen CV-A9-eGFP-virusta sekä kontrolleina CV-A9-villityyppejä ja pelkkää solukontrollia. Työssä käytetty CV-A9-eGFP-konstruktio on tuotettu aiemmin Heikkilä ja muut (2011) julkaisun mukaisesti. CV-A9-eGFP on tuotettu cDNA-kloonista, jossa eGFP-geenin nukleotidisekvenssi on kloonattu viruksen VP1- ja 2A-proteiinin väliin mutageneettisesti tuodun NotI-restriktiokohdan avulla (Heikkilä ja muut 2011). Kyseisestä cDNA-kloonista valmistettiin IVT-RNA otsikon 4.3. mukaisesti, jota transfektoitiin soluille, minkä jälkeen lysiatti kerättiin talteen ja solut hajotettiin sulatusjäädyttämällä kolmeen kertaan viruspartikkelien vapauttamiseksi liuokseen.

Tarkasteltaessa kuvantamisesta tehtyjä videoita voitiin huomata, että infektoitaessa A549-soluja CV-A9-eGFP:llä, infektoituneita soluja ei ilmaantunut lähellekään yhtä paljon kuin GMK-solujen tapauksessa. A549-soluissa vain muutamia infektoituvia soluja oli havaittavissa koko 48 tunnin kuvantamisen ajalta, kun taas GMK-soluissa infektion määrä lisääntyi selvästi ajan edetessä. GMK-solujen infektion etenemistä oli vaikea kuvailla sen tarkemmin videon perusteella, mutta tarkasteltaessa yksittäisen infektoituneen solun vieressä olevia soluja, myös niitä alkoi infektoitua ajan edetessä. 48 tunnin kuvantamisen aikana oli havaittavissa, että infektion alkuvaiheessa eGFP:tä ekspressoineet solut eivät hohtaneet vihreinä koko 48 tuntia, vaan eGFP:n fluoresenssi hävisi näkyvistä joidenkin tuntien kuluttua (noin 5-7 h), mikä selittynee solun

hajoamisella infektion seurauksena, minkä vahvistaa myös tieto, että pikornavirusten infektiocykli kestää yleisesti noin 7-10 h. Verrattaessa CV-A9-villityypin infektioiden CV-A9-eGFP:n videoihin voitiin todeta, että villityypin kuopissa vihreitä soluja ei ollut havaittavissa, mikä vahvisti että CV-A9-eGFP:n videoiden vihreät solut eivät olleet autofluoresenssia. Toisaalta tarkasteltaessa soluja näkyvän valon kanavalla voitiin huomata, että villityypin infektio oli selvästi voimakkaampi kuin CV-A9-eGFP:n aiheuttama infektio, mikä osoittautui villityypin kuopan soluissa tapahtuvana selvästi suurempana sytopaattisena efektinä. Tämä ei selittynyt todennäköisesti pelkästään sillä, että villityypin lysaatissa olisi ollut selvästi enemmän viruspartikkeleita, koska ennen time-laps-kuvantamisten aloittamista molempia lysaatteja testattiin eri pitoisuuksilla soluille ja jo testauksissa oli selvästi havaittavissa, että villityyppi oli selvästi infektiivisempi kuin mutanttimuoto. Se miksi villityyppi osoittautui selvästi infektiivisemmäksi voi selittyä sillä, että viruksen genomissa oleva eGFP-geeni hidastaa viruksen replikaatiota ja heikentää muutenkin viruksen infektiokykyä.

Tuotettaessa CV-A9-eGFP-virusta kuvantamiseen huomattiin, että viruksen määrän lisääminen pasasoinnilla osoittautui erittäin vaikeaksi. Pasasoimisessa viruspartikkelien määrää pyritään lisäämään infektoimalla solut uudelleen kerätyllä lysaatilla ja tätä uudelleen infektoimista voidaan jatkaa, kunnes kerätyssä preparaattissa on riittävästi infektiivisiä viruspartikkeleita, mikä mahdollistaa sen tehokkaan käytön esimerkiksi biologisissa kokeissa. Yritettäessä pasasoida CV-A9-eGFP:tä havaittiin, että heti seuraavan uusintainfektion jälkeisissä soluissa ei ollut havaittavissa CPE:tä, eikä myöskään eGFP:n aiheuttamaa fluoresenssia. Yksi selitys tälle saattaa olla, että infektiocykliden kasvaessa virus poistaa vieraan eGFP-geenin genomistaan, jolloin se ei tuota enää eGFP:tä. Tämän takia kuvantamisessa käytettiin suoraan transfektion jälkeen kerättyä CV-A9-eGFP-lysaattia, jota ei siis pasasoitu.

Virusia, joiden genomiin on lisätty GFP-geeni, voidaan käyttää eri tutkimustarkoituksiin. Yksi käyttösovellus on seurata onkolyttisen viruksen etenemistä tai siirtymistä syöpäsoluun GFP:n avulla. Näillä onkolyttisillä viruksilla voi olla tulevaisuudessa monia hyviä terapeuttisia sovelluksia. Paikallista syöpäsoluihin kohdistuvaa infektiota voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti käyttää esimerkiksi siten että virus voi kuljettaa toksisen aineen syöpäkasvaimen mikroympäristöön tuhoten syöpäsolut, tai virusjohdannaista voidaan käyttää kasvaimen sisäisen esilääkkeen selektiiviseen aktivointiin (Poirier ja muut 2012). Näiden virusten kulkeutumisen

tutkimisessa genomiin linkitetty GFP mahdollistaa siis viruksen paikantamisen solukossa ilman erillistä vasta-ainevärjäyksiä tai muita solun tappavia menetelmiä.

Kuten aiemmin tuli todettua, CV-A9:n tiedetään infektoivan solun kiinnittymällä RGD-alueellaan solun integriinireseptoriin tai se voi infektoida solun myös ilman RGD:n ja integriinin välistä vuorovaikutusta (Hughes ja muut 1995; Heikkilä ja muut 2008). Katseltaessa kuvassa 14. esitetyn paneelien videoita voitiin huomata, että GMK-soluilla infektio eteni ainakin osittain yksittäisistä soluista sen ympärillä oleviin viereisiin soluihin. Virusten leviämisestä tiedetään, että ne voivat levitä solulta toiselle joko reseptorivälitteisesti solulta-solulle tai soluvapaasti solulyysiksen tai eksosomien muodossa. Soluvapaaseen solulyysikseen perustuvaan leviämiseen vaaditaan tytärtiukkien poistumista isäntäsolusta joko suurena yksittäisenä määränä tai progressiivisesti kasvavana määränä, kun taas eksosomivälitteisessä poistumisessa viruspartikkelit voivat poistua infektoituneesta solusta vesikkelien muodossa. Kyseisiä leviämismekanismia on kuvailtu tarkemmin osiossa 2.5. Työssä infektoitujen GMK-solujen tapauksessa infektio eteni todennäköisesti enemmän solulta toiselle kuin A549-solujen tapauksessa. GMK-soluissa oli havaittavissa infektioryppäitä, kun taas A549-soluilla infektoituneiden solujen välillä oli selvästi pidempi matka. Se, onko virusinfektio edennyt soluvapaasti vai soluvälitteisesti, on kuitenkin vaikea sanoa. Yakimovic työryhmineen (2012) on kehittänyt hienostuneen tietokonemallinnusmenetelmän, jonka avulla saadaan määritettyä, eteneekö virus soluvapaasti vai soluvälitteisesti ja kuinka paljon solut etenevät soluvapaasti. CV-A9-eGFP-konstruktia voitaisiinkin mahdollisesti käyttää CV-A9:n etenemistapojen tutkimiseen kehittämällä erilaisia koeasetelmia reaaliaikaiseen kuvantamista varten.

Kaiken kaikkiaan virusinfektion reaaliaikaisen kuvantamisen onnistuminen mahdollistaa jatkossa uusien sovellusmahdollisuuksien suunnittelemisen. Viruksen etenemiseen vaikuttavia tekijöitä voidaan tutkia esimerkiksi lisäämällä soluille erilaisia antiviraalisia lääkkeitä ja tutkia kuinka ne mahdollisesti vaikuttavat viruksen infektiivisyyteen sekä myös samalla solujen elinvoimaan. Viruksen etenemisen tarkemmassa tutkimisessa solujen päälle voitaisiin lisätä myös agarosia, jolloin lysiksessä tai eksosomeina vapautuvat viruspartikkelit eivät pääsisi liikkumaan yhtä vapaasti lateraalisesti kasvatusliuoksessa (Yakimovic ja muut 2012). Tämä mahdollistaisi paremman yksittäisten infektiotokosten havaitsemisen solukossa ja mahdollistaisi myös yksittäisen

infektiofokuksen eli solun etenemisen tarkkailemisen sen lähiympäristössä reaaliaikaisesti.

7 Päätelmät

Infektiivisten pikornavirusten tuottaminen onnistui kaikilla neljällä muodolla: rengasmaisella plasmidilla, lineaarisella plasmidilla, *in vitro* -transkriptoidulla RNA:lla sekä T7-PCR-tuotteella. Havainnot osoittivat, että infektiivisiä pikornaviruspartikkeleita saatiin tuotettua solutransfektioilla käyttämällä suoraan virusgenomin cDNA-muodossa sisältävää plasmidia ja se osoittautui myös kaikkein tehokkaimmaksi tavaksi. Tämä havainto oli yllätys, koska transfektoitujen solujen oletettiin joutuvan käsittelemään rengasmaista cDNA-muodossa olevaa virusgenomia enemmän kuin esimerkiksi sen ollessa linearisoidussa muodossa tai IVT-RNA muodossa.

Virustutkimuksessa virusgenomin muokkaaminen mahdollistaa viruksen patogeenisien ominaisuuksien tutkimisen lisäksi sen muokkaamisen rokotekehitystä ja lääkekehitystä varten. Havainnot, joissa plasmidilla saatiin tuotettua viruspartikkeleita, voivat jatkossa nopeuttaa virustutkimusta, jos cDNA-kloonista ei tarvitsisi ennen transfektiota tehdä IVT-RNA:ta, PCR-tuotetta, tai edes linearisoida plasmidia. Työssä pyrittiin myös selvittämään plasmidissa virusgenomin edessä olevien säätelyalueiden vaikutusta viruspartikkelien kehittymiseen transfektion kautta, mutta niiden vaikutusta ei saatu vielä selville, koska eri säätelyalueita sisältävien PCR-amplikonien kloonausprosessi ei onnistunut.

Työssä tutkitun HPeV-1:n VP1-kapsidiproteiinissa olevalla RGD-alueella osoitettiin olevan tärkeä rooli A549-solujen infektoimisessa. Tämä osoitettiin siten, että HPeV-1-villityyppi infektoi soluja, kun taas muokattu HPeV-1-RGDdel-virus ei infektoinut. Tämä tulos ei ollut yllätys, koska RGD-alueen on raportoitu olevan tärkeässä roolissa HPeV-1:n kiinnittymisessä solun reseptoriin ja samalla infektiocyklin aloittamisessa. RGD-alue ei ole kuitenkaan kaikilla pikornaviruksilla välttämätön, esimerkiksi CV-A9:n on osoitettu infektoivan soluja myös ilman RGD-alueen ja integriinireseptorin välistä kiinnittymistä. Virus-soluvuorovaikutusten tutkiminen onkin tulevaisuudessa tärkeää sekä virusinfektioiden suoran torjumisen kannalta, että virusvektoreiden terapeuttisen käytön kannalta.

CV-A9-eGFP:n etenemisen kuvantaminen reaaliaikaisesti onnistui EVOS FL AUTO -fluoresenssimikroskoopilla. Onnistuminen kuvantamisessa mahdollistaa jatkokokeiden suunnittelun. Reaaliaikainen kuvantaminen mahdollistaa esimerkiksi erilaisten

antiviraalisten lääkeaineiden kokeilemisen tai CV-A9:n leviämistapojen paremman analysoimisen solukossa parannetuilla koeasetelmilla esimerkiksi käyttämällä agaroosia viljeltyjen solujen päällä, jolloin virusinfektion etenemistä yksittäisestä solusta viereisiin soluihin voidaan seurata paremmin.

Virukset ovat olleet merkittäviä patogeenejä eri eliöille läpi historian. Vaikka virukset ovatkin aiheuttaneet ihmiskunnalle suurta kärsimystä niiden aiheuttamien vaikeiden sairauksien myötä, erilaisten terapeuttisten virusvektoreiden tuomat mahdollisuudet tulevaisuudessa, esimerkiksi syövän ja uusien rokotusten kehittämisessä, antavat tulevaisuuden virustutkimukselle hyvin positiiviset näkymät.

Lähteet:

- Avanzino, B. C., Fuchs, G. & Fraser, C. S. (2017) Cellular cap-binding protein, eIF4E, promotes picornavirus genome restructuring and translation. *PNAS*. **114**:9611-9616.
- Becher, P., Orlich, M. & Thiel, H.-J. (2001) RNA recombination between persisting pestivirus and a vaccine Strain: Generation of cythopatogenic virus and induction of lethal disease. *J. Virol.* **75**:6256-6264.
- Boonyakit, Y., Hughes, P. J., Ghazi, F. & Stanway, G. (2001) Arginine-glycine-aspartic acid motif is critical for human parechovirus 1 entry. *J. Virol.* **75**:10000-10004.
- Brown, B. A., Oberste, M. S., Alexander, J. P., Kennett, M. L. & Pallansch M. A. (1999) Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J. Virol.* **73**:9969-9975.
- Burckhardt, C. J. & Greber, U. F. (2009) Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *Plos Pathog.* **5(11)**: e1000621. doi: 10.1371/journal.ppat.1000621. [Epub.]
- Charini, W. A., Todd, S., Gutman, G. A. & Semler, B. L. (1994) Transduction of a human RNA sequence by poliovirus. *J. Virol.* **68**:6547-6552.
- Chen, Y.-H., Du, W., Hagemeyer, M. C., Takvorian, P. R., Pau, C., Cali, A., Brantner, C. A., Stempinski, E. S., Connelly, P.S., Ma, H.-C., Jiang, P., Wimmer, E., Altan-Bonnet, G. & Altan-Bonnet, N. (2015) Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses. *Cell.* **160**:619-630.
- Chira, S., Jackson, C. S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M. S., Diaconu, I., Braicu, C., Radyly, L-Z., Calin, G. A. & Berindan-Neagoe, I. B. (2015) Progress towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget.* **6**:30675-30703.
- Drug delivery business news, Provention Bio wants to stop type 1 diabetes. URL: <http://www.drugdeliverybusiness.com/provention-bio-wants-stop-type-diabetes-vaccine/>, viitattu 15.12.2017.
- Duque, H., LaRocco, M., Golde, W. T. & Baxt, B. (2004) Interactions of foot-and-mouth disease virus with soluble bovine $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 6$ integrins. *J. Virol.* **78**:9773-9781.

- Edwards, M. R., Walton, R. P., Jackson, D. J., Feleszko, W., Skevaki, C., Jartti, T., Makrinoti, H., Nikonova, A., Shilovskiy, I. P., Schwarze, J., Johnston, S. L. & Khaitov, M. R. (2017) The potential anti-infectives and immunomodulators as therapies for asthma and asthma exacerbations. *Allergy*. doi: 10.1111/all.13257. [Epub ahead of print].
- Evans, D. J., McKeating, J., Meredith, J. M., Burke, K. L., Katrak, K., John, A., Ferguson, M., Minor, P. D., Weiss, R. A. & Almond, J. W. (1989) An engineered poliovirus chimaera elicits broadly reactive HIV-1 neutralizing antibodies. *Nature*. **339**:385-388.
- Fahmy, K., Hampton, L. M., Langar, H., Patel, M., Mir, T., Soloman, C., Hasman, A., Yusuf, N. & Teleb, N. (2017) Introduction of inactivated polio vaccine, withdrawal of type 2 oral polio vaccine, and routine immunization strengthening in the eastern Mediterranean region. *J. Infect. Dis.* **216**:86-93.
- Flanegan, J. B., Pettersson, R. F., Ambros, V., Hewlett, M. J. & Baltimore, D. (1977) Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:961-965.
- Gmyl, A. P., Korshenko, S. A., Belousov, E. V., Khitrina, E. V. & Agol, V. I. (2003) Nonreplicative homologous RNA recombination: Promiscuous joining of RNA pieces. *RNA*. **9**:1221-1231.
- Gu, R., Stagnar, C., Zaichenko, L. & Ramsingh, A. I. (2012) Induction of mucosal HIV-specific B and T cell responses after oral immunization with live coxsackievirus B4 recombinants. *Vaccine*. **30**:3666-3674.
- Heikkilä, O., Susi, P., Stanway, G. & Hyypiä, T. (2008) Integrin $\alpha V\beta 6$ is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9. *J Gen Virol*. **90**:197-204.
- Heikkilä, O., Susi, P., Tevaluoto, T., Härmä, H., Marjomäki, V., Hyypiä, T. & Kiljunen, S. (2010) Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by $\beta 2$ -microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J. Virol.* **84**:3666-3681.
- Heikkilä, O., Kainulainen, M. & Susi, P. (2011) A combined method for rescue of modified enteroviruses by mutagenic primers, long PCR and T7 RNA polymerase-driven *in vivo* transcription. *J. Virol. Methods*. **171**:129-133.

- Hewat, E. A., Neumann, E., Conway, J. F., Moser, R., Ronacher, B., Marlovits, T. C. & Blaas, D. (2000) The cellular receptor to human rhinovirus 2 binds around 5-fold axis not in to canyon: a structural view. *EMBO J.* **19**:6317-6325.
- Hogle, J. M., Chow, M. & Filman, J. D. (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science.* **229**:1358-1365.
- Hou, W., Yang, L., Li, S., Yu, H., Xu, L., He, D., Chen, M., He, S., Ye, X., Que, Y., Shih, J. W. K., Chen, T. & Xia, N. (2015) Construction and characterization of an infectious cDNA clone of Echovirus 25. *Virus Research.* **205**:41-44.
- Hughes, P.J., Horsnell, C., Hyypiä, T. & Stanway, G. (1995) The coxsackievirus A9 RGD-motif is not essential for virus viability. *J. Virol.* **69**:8035-8040.
- Humphries, J. D., Byron, A. & Humphries, M. J. (2006) Integrin ligands. *J. Cell Sci.* **119**:3901-3903.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110**:673-687.
- Hyöty, H. (2016) Viruses in type 1 diabetes. *Pediatric diabetes.* **17**:56-64.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV Home. URL: www.ictvonline.org, Viitattu 23.10.2017.
- Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R. A., Blakemore, W. E., Ellard, F. M., Simmons, D. L., Newman, J. W. I., Stuart, D. I. & King, A. M. Q. (1997) Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth-disease viruses to the purified integrin $\alpha V\beta 3$ in vitro. *J. Virol.* **71**:8357-8361.
- Jäidane, H., Sauter, P., Sane, F., Goffard, A., Gharbi, J. & Hober, D. (2009) Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Rev. Med. Virol.* **20**:265-280.
- Jartti, T. & Gern, J. E. (2017) Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. *J. Allergy Clin Immunol.* **140**(4):895-906.
- Joki-Korpela, P., Marjomäki, V., Krogerus, C., Heino, J. & Hyypiä, T. (2001) Entry of human parechovirus 1. *J. Virol.* **75**:1958-1967.

- Kew, O. M., Sutter, R. W., de Gourville, E. M., Dowdle, W. R. & Pallansch, M. A. (2005) Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**:587-635.
- Lukashev, A. N. (2010) Recombination among picornaviruses. *Rev. Med. Virol.* **20**:327-337.
- Mercer, J., Schelhaas, M. & Helenius, A. (2010) Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **79**:803-833.
- Mercer, J. & Greber, U. F. (2013) Virus interactions with endocytotic pathways in macrophages and dendritic cells. *Trends Microbiol.* **21**:380-388.
- Merilahti, P., Koskinen, S., Heikkilä, O., Karelehto, E. & Susi, P. (2012) Endocytosis of integrin-binding human picornaviruses. *Adv. Virol.* [Epub.] doi:10.1155/2012/547530.
- Merilahti, P., Tauriainen, S. & Susi, P. (2016a) Human parechovirus 1 infection occurs via $\alpha V\beta 1$ integrin. *Plos One.* **11**(4): doi 10.1371. [Epub.]
- Merilahti, P., Karelehto, E. & Susi, P. (2016b) Role of heparan sulfate in cellular infection of integrin-binding coxsackievirus A9 and human parechovirus 1 isolates. *Plos One.* **11**(1): doi 10.1371. [Epub.]
- Minor, P. D. (1992) The molecular biology of polio vaccines. *J. Gen. Virol.* **73**:3065-3077.
- Mothes, W., Sherer, M. N., Jin, J. & Zhong, P. (2010) Virus cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **84**:8360-8368.
- O'Donnell, V., LaRocco, M. & Baxt, B. (2008) Heparan sulfate-binding foot-and-mouth disease virus enters cells via caveola-mediated endocytosis. *J. Virol.* **82**:9075-9085.
- Ojala, D. S., Amara, D. P. & Schaffer, D. V. (2015) Adeno-associated virus vectors and neurological gene therapy. *Neuroscientist.* **21**:84-98.
- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998) Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature.* **393**:280-284.
- Paul, A. V. & Wimmer, E. (2015) Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Res.* **206**:12-26.

- Poirier, J. T., Reddy, P. S., Idamakanti, N., Li, S. S., Stump, K. L., Burroughs, K. D., Hallenbeck, P. L. & Rudin, C. M. (2012) Characterization of a full length infectious cDNA clone and a GFP reporter derivative of the oncolytic picornavirus SVV-001. *J. Gen. Virol.* **93**:2606-2613.
- Raab-Traub, N. & Dittmer, D. P. (2017) Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**:559-572.
- Racaniello, V. R. & Baltimore, D. (1981) Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science.* **214**:916-919.
- Racaniello, V. R. (2013) Picornaviridae: The viruses and their replication. Kirjassa: Knipe, D. M. & Howley, P. M. (toim.), *Fields Virology*, 6. painos, s. 453-489. Kustantaja: Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Robinson, S. M., Tsueng, G., Sin, J., Mangale, V., Rahawi, S., McIntyre, L. L., Williams, W., Kha, N., Cruz, C., Hancock, B. M., Nguyen, D. P., Sayen, M. R., Hilton, B. J., Doran, K. S., Segall, A. M., Wolkowicz, R., Cornell, C. T., Whitton, J. L., Gottlieb, R. A. & Feuer, R. (2014) Coxsackievirus B exits the host cell in shed microvesicles displaying autophagosomal markers. *Plos Pathog.* **10**:e1004045. doi: 10.1371/journal.ppat.1004045. [Epub].
- Rossmann, M. G., Arnold, E., Erickson, J. W., Frankenberger, E. A., Griffith, J.P., Hecht, H. J., Johnson, J. E., Kamer, G., Luo, M. & Mosser, A. G. (1985) Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature.* **317**:145-153.
- Salas-Martinez, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G. & Diaz-Toledano, R. (2015) Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Res.* **206**:62-73.
- Seitsonen, J., Susi, P., Heikkilä, O., Sinkovits, R. S., Laurinmäki, P., Hyypiä, T. & Butcher, S. J. (2010) Interaction of $\alpha v\beta_3$ and $\alpha v\beta_6$ integrins with human parechovirus 1. *J. Virol.* **84**:8509-8519.
- Shafren, D. R., Dorahy, D. J., Ingham, R. A., Burns, G. F. & Barry, R. D. (1997) Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.* **71**:4736-4743.

- Shakeel, S., Seitsonen, J. J. T., Kajander, T., Laurinmäki, P., Hyypiä, T., Susi, P. & Butcher, S. J. (2013) Structural and functional analysis of coxsackievirus A9 integrin $\alpha V\beta 6$ binding and uncoating. *J. Virol.* **87**:3943-3951.
- Stanway, G. & Hyypiä, T. 1999. Parechoviruses. *J. Virol.* **73**:5249-5254.
- Tolbert, M., Morgan, C. E., Pollum, M., Crespo-Hernández, E. C., Li, M.-L., Brewer, G. & Tolbert, B. S. (2017) HnRNP A1 alters the structure of a conserved enterovirus IRES domain to stimulate viral translation. *J. Mol. Biol.* **429**:2841-2858.
- Triantafilou, K., Fradelizi, D., Wilson, K. & Triantafilou, M. (2001) GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J. Virol.* **76**:633-643.
- Tuthill, J. T., Gropelli, E., Hogle, J. M. & Rowlands, D. J. (2010) Picornaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **343**:43-89.
- Vactech Oy, type-1-diabetes preventive vaccine. URL: www.vactech.fi/en/type-1-diabetes/preventive-vaccine. Viitattu 15.12.2017.
- Wong, S.-S. & Webby, R. J. (2013) Traditional and new influenza vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(3):476-492.
- Yakimovich, A., Gumpert, H., Burckhardt, C. J., Lütsch, V. A., Jurgeit, A., Sbalzarini, I. F. & Greber U. F. (2012) Cell-free transmission of human adenovirus by passive mass transfer in cell culture simulated in a computer model. *J. Virol.* **86**:10123-10137.
- Yang, L., Li, S., Liu, Y., Hou, W., Lin, Q., Zhao, H., Xu, L., He, D., Ye, X., Zhu, H., Cheng, T. & Xia N. (2015) Construction and characterization of an infectious clone of coxsackievirus A6 that showed high virulence in neonatal mice. *Virus Research.* **210**:165-168.
- Ylä-Pelto, J., Tripathi, L. & Susi, P. (2016) Therapeutic use of native and recombinant enteroviruses. *Viruses 2016.* **8**:57.
- Zell, R. (2017) Picornaviridae – the ever-growing virus family. *Arch. Virol.* Doi 10.1007/s00705-017-3614-8 [Epub].