



**TURUN
YLIOPISTO**

Keltakuumeviruksen B-solureseptorivälitteinen internalisaatio

Fysiologia ja genetiikka / Biologia

Pro gradu -tutkielma

Julia Rantala

26.02.2026

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

Koulutusohjelma, oppiaine: Biologia, Fysiologia ja genetiikka

Tekijä: Julia Rantala

Otsikko: Keltakuumeviruksen B-solureseptorivälitteinen internalisaatio

Ohjaajat: Pieta Mattila, Pinja Jalkanen, Tiina Henttinen

Sivumäärä: 68 sivua

Päivämäärä: 26.02.2026

Keltakuumevirus on flaviviruksiin kuuluva patogeeni, joka leviää ihmiseen hyttysenpiston välityksellä. Arvioiden mukaan noin puolet maapallon väestöstä altistuu jatkuvasti riskille sairastua flavivirusten levittämiin tauteihin, kuten zika, dengue- ja keltakuumeeseen. Ilmastonmuutoksen seurauksena flavivirusten levittämät taudit uhkaavat muodostua yhä merkittävämmäksi globaaliksi terveysongelmaksi niitä levittävien hyttysten levittäytyessä yhä laajemmille alueille. Flaviviruksia vastaan ei ole toistaiseksi olemassa antiviraalista hoitokeinoa, ja tartuntojen leviämisen ehkäisemiseksi tehokkain tämänhetkinen keino on rokotteet. Flaviviruksia vastaan on markkinoilla kuitenkin vain muutamia rokotteita, ja niiden käyttöön liittyy erilaisia haasteita. Keltakuumevirusrokote 17D on yksi tehokkaimmista ja turvallisimmista tähän mennessä kehitetyistä rokotteista, mutta ymmärrys siitä, mihin sen tehokkuus perustuu ja kuinka se muodostaa pitkäaikaisen immuunivasteen, on edelleen heikko. 17D-keltakuumevirusrokote sisältää elävää heikennettyä keltakuumevirusta, joka aktivoi immuunivasteen aiheuttamatta kuitenkaan itse keltakuumeautia. Immuunijärjestelmän altistuessa vieraalle virusantigeenille, B-solut alkavat muutaman päivän kuluessa tuottamaan vasta-aineita virusantigeneja vastaan. Osa B-soluista erilaistuu vasta-aineita tuottaviksi plasmasoluiksi ja osa muistisoluiksi, jotka muodostavat immunologisen muistin. Kohdatessaan saman patogeenin uudelleen, immuunijärjestelmä käynnistyy muistisolujen ansiosta nopeasti, mikä selittää rokotteiden antaman pitkäaikaisen suojan taudinaiheuttajaa vastaan. Tutkimus on osana EU:n rahoittamaa Yellow4Flavi-projektia, jonka tavoitteena on tehokkaampien rokotteiden kehittäminen flaviviruksia vastaan. 17D-keltakuumerokote on yksi tehokkaimmista rokotteista, minkä vuoksi sen toimintamekanismin ymmärtäminen on avainasemassa tehokkaampien rokotteiden kehittämiseksi tulevaisuudessa.

B-solujen aktivaatio on olennainen osa hyvän rokotevasteen aikaansaamiseksi. B-solut tunnistavat virusantigeenin B-solureseptoreilla ja ottavat antigeenin sisäänsä. B-solut prosessoivat virusantigeenit endosomeissa ja esittelevät pilkotut antigeenit T-solulle, mikä saa aikaan T-solujen aktivoitumisen ja sytokiinerityksen, joka edistää B-solujen erilaistumista korkea- affiniteettisia vasta-aineita tuottaviksi plasmasoluiksi. Tutkimuksen tavoitteena on ymmärtää, kuinka B-solut aktivoituvat kohdatessaan keltakuumerokoteviruksen ja tutkia keltakuumevirusrokotekannan solunsisäistä liikennöintiä B-solujen endosomaalisessa verkostossa. Viruksen internalisaation tutkimiseksi valmistettiin surrogaattiantigeeni-kompleksi, jolla voidaan seurata viruksen internalisaatiota ja solun sisäistä kuljetusta B-soluissa. Surrogaattiantigeeni-kompleksi koostuu useista osista, joten sen toimivuuden varmistamiseksi kompleksin eri osien testaaminen ja optimointi oli oleellista ennen kokonaisen kompleksin käyttöä. Viruskasvatukset ja surrogaattiantigeeni-kompleksin optimointi onnistuivat, mutta valmiin kompleksin tai sen osien havaittiin kuitenkin muodostavan suuria aggregaatteja solujen ympärille, eikä kompleksi internalisoitunut soluihin odotetusti. Aggregoituminen on voinut tapahtua jo viruksen puhdistusvaiheessa, tai myös anti-keltakuumevirusvasta-aineen neutraloivasta vaikutuksesta. Surrogaattiantigeeni-kompleksin optimointi osoittautui odotettua haastavammaksi, minkä vuoksi viruksen internalisaatiota ei päästy tutkimaan tarkemmin.

Avainsanat: B-solut, hankittu immunitaetti, rokotteet, keltakuume, flavivirukset

Sisällysluettelo

1	JOHDANTO	1
1.1	Immuunijärjestelmän B-solut	1
1.1.1	B-solureseptori ja vasta-aineet	1
1.1.2	Antigeenin tunnistus.....	4
1.2	B-soluvälitteisen immuunivasteen muodostuminen.....	6
1.2.1	Antigeenin internalisaatio, prosessointi ja esittely	7
1.2.2	Yhteistyö auttaja-T-solujen kanssa	9
1.2.3	Hankitun immunitetin hyödyntäminen rokotekehityksessä	12
1.3	Keltakuumevirus.....	12
1.3.1	Keltakuumeviruksen rakenne	13
1.3.2	Viruksen elinkierto	14
1.4	17D-keltakuumevirusrokote	15
1.4.1	Ristireagoivat vasta-aineet	18
1.5	Työn tarkoitus.....	19
2	AINEISTO JA MENETELMÄT	20
2.1	Solut ja kasvatus	20
2.2	17D-keltakuumeviruksen kasvatus ja puhdistus.....	20
2.3	Plakkititraus	23
2.4	Infektiokokeet.....	24
2.4.1	Immunofluoresenssivärijäys ja konfokaalimikroskopia.....	25
2.5	17D-surrogaattiantigeeni-kompleksin valmistaminen.....	26
2.5.1	Vasta-ainetestti	28
2.5.2	Vasta-aineen biotinylaatio ja sen toimivuuden testaus	28
2.5.3	B-solujen aktivaatiotesti	29
2.5.4	Endosomivärijäys	30
2.6	Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutuminen B-solureseptoriin ja sen internalisaatio.....	31
2.7	SDS-PAGE	32

3	TULOKSET	33
3.1	Viruskasvatusten titteri	33
3.2	17D-keltakuumevirus ei infektoi B-soluja	34
3.3	Anti-keltakuumevirusvasta-aineet 5A ja 2D12 tunnistavat keltakuumeviruksen	36
3.4	2D12-vasta-aineen biotinylaatio ei vaikuta keltakuumeviruksen tunnistamiseen.....	37
3.5	B-solut internalisoivat streptavidiiniin konjugoidun anti-IgM:n.....	40
3.6	B-solujen endosomivärjäykset.....	41
3.7	Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutuminen B-solureseptoriin ja viruksen internalisaatio.....	42
3.8	SDS-PAGE	44
4	TULOSTEN TARKASTELU.....	46
4.1	Viruksen kasvatus ja puhdistus.....	46
4.2	17D-keltakuumevirus ei infektoi B-soluja	47
4.3	Biotinylaation vaikutus vasta-aineen toimintaan.....	48
4.4	Anti-IgM-kompleksin internalisaatio	49
4.5	Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutuminen ja internalisaatio	50
4.6	Viruksen E-proteiinimääritys ja biotinylaatio	52
4.7	Jatkotutkimusmahdollisuudet	53
	KIITOKSET	55
	LÄHTEET.....	56

1 JOHDANTO

1.1 Immuunijärjestelmän B-solut

Immuunijärjestelmä on monimutkainen ja tarkasti säädelty puolustusjärjestelmä, joka suojaa elimistöä erilaisilta taudinaiheuttajilta. Immuunijärjestelmä jaetaan luontaiseen ja hankittuun immuniteettiin, jotka toimivat tiiviissä vuorovaikutuksessa keskenään. Elimistön kohdatessa patogeenin käynnistyy ensimmäisenä luontainen eli synnynnäinen immuniteetti, joka aiheuttaa nopean, mutta epäspesifisen puolustusreaktion taudinaiheuttajaa vastaan. Hankittu eli adaptiivinen immuniteetti, joka toimii aina spesifisesti tiettyä vierasta rakennetta vastaan, kehittyy elämän aikana sitä mukaan, kun elimistö kohtaa erilaisia taudinaiheuttajia tai vieraita molekyyliä. Hankitun immuniteetin toiminta perustuu B- ja T-lymfosyytteihin ja niiden pitkäkestoiseen muistijälkeen kohdatusta taudinaiheuttajasta.

Hankittu immuniteetti jaetaan humoraaliseen eli vasta-ainevälitteiseen immuniteettiin ja soluvälitteiseen immuniteettiin. B-solut vastaavat humoraalisesta immuniteetista tuottamalla vasta-aineita eli immunoglobuliineja, ja soluvälitteinen immuniteetti puolestaan perustuu pääosin T-solujen toimintaan, joilla on tärkeä merkitys erityisesti infektoituneiden solujen tuhoamisessa ja muiden immuunisolujen toiminnan tehostamisessa. B-solujen tuottamat vasta-aineet voivat myös aktivoida komplementtijärjestelmän, jonka tärkeä tehtävä on edistää tulehdusreaktiota ja immuunijärjestelmän käynnistymistä (Dunkelberger & Song, 2010).

1.1.1 B-solureseptori ja vasta-aineet

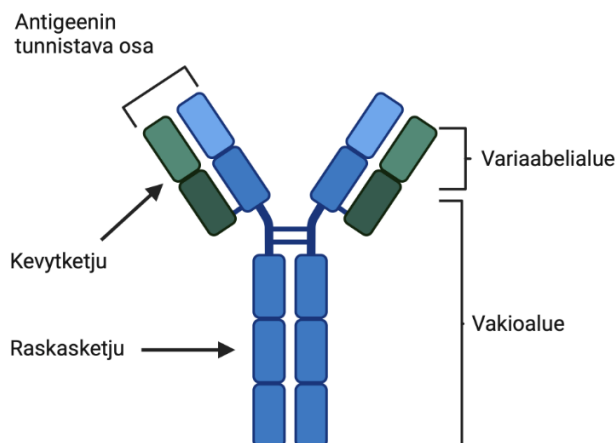
B-solut kehittyvät luuytimen hematopoieettisista kantasoluista ja ne myös kypsyvät luuytimessä ennen siirtymistä imusuonia pitkin verenkiertoon ja sekundaarisiin imukudoksiin, kuten esimerkiksi imusolmukkeisiin ja pernaan, joissa solut aktivoituvat kohdatessaan antigeenin. Kulkeutumista imusolmukkeisiin ohjaa kemokiinigradietti, minkä seurauksena B-solut kulkeutuvat imusolmukkeen ulompaan kuorikerrokseen, jossa ne järjestäytyvät follikkeleiksi (Cyster, 2010).

B-solujen kypsyminen luuytimessä sisältää monimutkaisen geneettisen prosessin, somaattisen rekombinaation, joka mahdollistaa kehon kyvyn tunnistaa lähes rajattoman määrän erilaisia taudinaiheuttajia (Petrova ym., 2018). Rekombinaatiossa B-solureseptorin (engl. B cell receptor, BCR) raskas- ja kevytketjujen geenisegmentit (V, D ja J) yhdistyvät satunnaisesti,

mikä mahdollistaa reseptorin valtavan monimuotoisuuden ja mikä on edellytys B-solujen spesifille antigeenitunnistukselle (Petrova ym., 2018). Jokainen B-solu tuottaa geneettisen muokkauksen ansiosta ainutlaatuisen reseptorin, joka tunnistaa vain tietyn antigeenin, johon B-solun pinnalla olevat B-solureseptorit eli vasta-aineet sitoutuvat. Kehittyvän B-solun reseptorin affiniteetti eli sitoutumisvoimakkuus testataan luuytimessä. Jos reseptori sitoutuu voimakkaasti elimistön omiin antigeeneihin, BCR:ää editoidaan uudelleen geneettisessä rekombinaatiossa, jossa omiin antigeeneihin sitoutuva kevytketju korvataan uudella versiolla. Jos uusi reseptori ei enää tunnista omia kudoksia, solu siirtyy verenkiertoon ja kypsyy valmiiksi B-soluksi. Jos BCR tunnistaa omia rakenteita, nämä autoreaktiiviset solut ohjataan apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan.

Aktivoituaan B-solut erilaistuvat vasta-aineita tuottaviksi plasmasoluiksi ja muistisoluiksi, jotka muodostavat niin sanotun immunologisen muistin, mikä mahdollistaa immuunivasteen nopean ja tehokkaan käynnistymisen elimistön kohdatessa saman taudinaiheuttajan uudelleen (Bonilla & Oettgen, 2010). B-solun tuottamat liukoiset vasta-aineet tunnistavat saman antigeenin B-solureseptorin kanssa. Tuotettujen vasta-aineiden affiniteetin eli sitoutumisvoimakkuuden kehittyminen edellyttää B-solujen aktivoitumista B-solufollikkeleissa, joissa käynnistyy B-solujen jakautumiseen ja erilaistumiseen johtava itukeskusreaktio (Stebegg ym., 2018).

Vasta-aineet koostuvat kahdesta identtisestä raskasketjusta ja kevytketjusta, jotka muodostavat Y-kirjaimen muotoisen antigeeneja tunnistavan rakenteen (kuva 1). Yhdessä vasta-aineessa on kaksi raskaan ja kaksi kevyen ketjun muodostamaa polysakkaridirunkoa, jotka ovat kiinni toisissaan rikkisilloilla. Raskas- ja kevytketjut voidaan edelleen jakaa variaabeli- ja vakioalueisiin. Kevytketju koostuu yhdestä variaabelialueesta ja yhdestä vakioalueesta, kun taas raskasketju koostuu yhden variaabelialueen lisäksi kolmesta tai neljästä vakioalueesta (Chiu ym., 2019). Raskasketjun vakioalueet muodostavat keskenään vasta-aineen rungon, joka määrää vasta-aineen luokan. Kevytketjun ja raskasketjun variaabelialueet puolestaan vastaavat antigeenin tunnistuksesta (Sela-Culang ym., 2013).



Kuva 1. Vasta-aineen rakenne. Vasta-aine koostuu kahdesta identtisestä raskasketjusta ja kevytketjusta, jotka ovat liittyneet toisiinsa rikkisilloilla. Raskasketjun vakioalue määrää vasta-aineen luokan, ja variaabelialueet vastaavat antigeenin tunnistuksesta. Kuva on tehty BioRenderillä (biorender.com).

Vasta-aineiden spesifisyys perustuu B-solujen kypsyemisvaiheessa kevyt- ja raskasketjuja koodaavissa geneeissä tapahtuvaan geneettiseen rekombinaatioon ja myöhemmin solujen aktivoituessa somaattisiin hypermutaatioihin, joiden seurauksena muodostuu laaja kirjo erilaisia antigeeneja tunnistavia vasta-aineita. Kevyt- ja raskasketjun variaabelialuetta koodaavat geenit sijaitsevat kolmessa eri kromosomissa, joiden eri geenisegmentit yhdistyvät somaattisessa rekombinaatiossa. Raskasketjun variaabelialue muodostuu V- D- ja J-geenisegmentistä, jotka muodostavat VDJ-kompleksin B-solun kehittyessä pro-B-solusta pre-B-soluksi (Lutz ym., 2011). Ennen geenialueiden yhteen liittymistä DNA-juoste katkaistaan RAG-proteiinien toimesta (engl. recombination activating genes, RAG) ja geenisegmentit liitetään yhteen NHEJ-korjauksella (engl. non-homologous end joining, NHEJ) (Carmona & Schatz, 2017). Liitosalueelle syntyy herkemmin mutaatioita nukleotidien satunnaisten lisäysten tai deleetioiden johdosta, mikä lisää vasta-aineiden geneettistä vaihtelua entisestään (Lu ym., 2007).

Kevytketjun variaabelialue puolestaan koostuu ainoastaan V- ja J-geenisegmenteistä, ja näiden geenisegmenttien uudelleenjärjestäytyminen tapahtuu raskasketjun VDJ-geenisegmenttien rekombinaation jälkeen. Kevytketju voi olla joko kappa- tai lambdatyyppinen, mikä myös lisää vasta-aineiden geneettistä diversiteettiä, sillä kappa- ja lambdaketjua koodaavat geenit sijaitsevat eri kromosomeissa. Kevytketju muodostuu ensin kappatyyppiseksi, joka voi rekombinaation epäonnistuessa vaihtua lambdatyyppiseksi kevytketjuksi (Smith ym., 2016).

Kypsät B-solut ilmentävät pinnallaan IgM- ja IgD-luokan vasta-aineita, mutta voivat aktivoituessaan muuttaa raskasketjun vakioalueissa tapahtuvan geneettisen rekombinaation seurauksena vasta-aineluokkaansa korkea-affiniteetiseksi IgG-, IgA- ja IgE-luokan vasta-aineeksi. Luokanvaihto edellyttää B-solujen ilmentämää AID-entsyymiä (engl. activation-induced cytidine deaminase, AID), joka mahdollistaa geneettisen rekombinaation B-solureseptorin raskasketjun vakioaluetta koodaavassa geenissä, minkä seurauksena vasta-aineen isotyypin muuttuu. Lisäksi luokanvaihtoa ohjaavat myös auttaja-T-solujen erittämät sytokiinit (Stavnezer & Schrader, 2014). Immunoglobuliinin luokanvaihdon seurauksena B-solun kyky tunnistaa sama antigeeni säilyy, koska antigeenin tunnistava osa reseptorista on pysynyt ennallaan, mutta B-solu kykenee sitomaan antigeeneja tehokkaammin ja tuottamaan korkea-affiinisia vasta-aineita.

Vasta-aineen luokalla on merkitystä komplementtijärjestelmän ja fagosyyttien aktivaatiossa. Komplementtijärjestelmän klassinen tie aktivoituu komplementtiproteiinien sitoutuessa vasta-aineilla opsonoituihin vieraisiin rakenteisiin, erityisesti IgG-luokan IgG1- ja IgG3-alaluokan vasta-aineilla päällystettyihin rakenteisiin (Goldberg & Ackerman, 2020). Fagosyytit puolestaan voivat sitoutua Fc-reseptoreillaan vasta-aineilla päällystettyihin rakenteisiin sekä komplementtiproteiineihin, mikä auttaa niitä mikrobien tunnistuksessa ja tuhoamisessa (Boero ym., 2023).

1.1.2 Antigeenin tunnistus

Lymfosyytit tunnistavat reseptoreillaan spesifisesti vieraita rakenteita, joita kutsutaan antigeeneiksi. Lymfosyytit tunnistavat aina vain tietyn antigeenin, mihin hankitun immuniteetin monimuotoisuus ja spesifisyys perustuu. Antigeenin tunnistus on välttämätöntä lymfosyyttien aktivoitumiselle, jonka seurauksena ne jakautuvat ja erilaistuvat. B-solut tunnistavat antigeenin B-solureseptorillaan sekä liukoisessa muodossa että antigeenia esittelevän solun pinnalta (Avalos & Ploegh, 2014; Frauwirth & Thompson, 2002). Liukoiset antigeenit kulkeutuvat verenkierron mukana pernaan tai imusuonia pitkin imusolmukkeisiin, jossa naiivit B-solut tunnistavat ne. Liukoisten antigeenien on kuitenkin oltava tarpeeksi pieniä päästääkseen imusolmukkeisiin (Nolte ym., 2003).

Antigeenit voivat saapua imusolmukkeisiin myös antigeenia esittelevien solujen mukana (Hughes ym., 2016). Dendriittisolut ovat keskeisimpiä antigeenin kuljettajia ja esittelijöitä naiiveille lymfosyyteille. Imusolmukkeissa B-solujen aktivaation kannalta erityisen tärkeitä

ovat follikulaariset dendriittisolut. Lisäksi imusolmukkeen subkapsulaarisen sinuksen makrofagit kuljettavat ja esittelevät antigeeneja B-soluille joko suoraan tai follikulaaristen dendriittisolujen välityksellä (Heath ym., 2019). *In vivo* B-solut tunnistavat antigeeneja ensisijaisesti antigeeneja esittelevien solujen pinnalta. Kwak ym. (2023) osoittivat, että antigeeneja esittelevien solujen pinnalle sitoutuneet antigeenit aktivoivat B-soluissa mekanosensitiivisen Piezo1-kalsiumkanavan, mikä käynnistää B-solujen aktivaatiolle välttämättömän kalsiumionien virtauksen. He havaitsivat, että Piezo1-ionikanavan toiminnan estäminen heikensi merkittävästi B-solujen aktivaatiota. Havainnot viittaavat siihen, että B-solun aktivaatioon vaikuttaa antigeenin spesifisyyden ja affiniteetin lisäksi merkittävästi myös antigeenin esittelyn välittämät mekaaniset voimat.

B-solujen tunnistamat antigeenit voivat olla rakenteeltaan joko monovalentteja tai multivalentteja. Monovalentit antigeenit sisältävät vain yhdenlaisen epitoopin, johon B-solureseptori voi sitoutua, kun taas multivalentit antigeenit koostuvat useista epitoopeista, ja ne voivat samanaikaisesti sitoutua useisiin B-solureseptoreihin. Antigeenin valenssin kokonaisvaltaista vaikutusta B solujen aktivaatioon ei vielä täysin tunneta, mutta tutkimukset ovat osoittaneet, että alhaisen valenssin antigeenit saavat usein aikaan heikomman B-soluaktivaation korkean valenssin antigeeneihin verrattuna (Degn & Tolar, 2025; Kato ym., 2020). Multivalentin antigeenin sitoutuminen edistää B-solureseptorien yhteen kerääntymistä ja signalointia, sekä myös edesauttaa B-solureseptori-antigeenikompleksin internalisaatiossa (Bennett ym., 2015). Lisääntyneen internalisaation seurauksena B-solut kykenevät esittelemään antigeeneja tehokkaammin auttaja-T-soluille, mikä tehostaa edelleen pitkäkestoisen immuniteetin muodostumista.

Antigeeni sitoutuu B-solureseptoriin joko liukoisessa muodossa tai antigeenia esittelevän solun pinnalta, mikä saa aikaan B-solun aktiinitukirangan uudelleenjärjestäytymisen. Liu ym. (2012) vertailivat antigeenia esittelevien solujen tai liukoisten antigeenien aikaansaamaa aktiinitukirangan polymerisaatiota B-solureseptorin aktivoituessa. He osoittivat, että sekä solun pinnalla esiteltävä että liukoinen antigeeni saavat aikaan aktiinitukirangan polymerisaation, mutta solun pinnalla esiteltävä antigeeni indusoi aktiinitukirangan polymerisaatiota tehokkaammin ja johti parempaan B-soluaktivaatioon kuin liukoinen antigeeni. Aktiinitukirangan uudelleenjärjestäytymisen on myös osoitettu olevan välttämätöntä antigeeni-reseptorikompleksin internalisaatiossa, ja sen inhiboinnin on todettu heikentävän antigeeni-reseptorikompleksin kulkeutumista varhaisista endosomeista myöhäisiin endosomeihin ja lysosomeihin (Brown & Song, 2001).

B-solun aktiinitukirangan uudelleenjärjestäytyminen on välttämätöntä immunologisen synapsin muodostumiselle (Arana ym., 2008; Batista ym., 2001). Immunologinen synapsi on liitoskohta, joka muodostuu antigeeneja esittelevän solun ja lymfosyytin välille, ja sen muodostuminen tehostaa lymfosyyttien aktivoitumista (Grakoui ym., 1999). B-solureseptorit hyödyntävät myosiini-moottoriproteiineja immunologisen synapsin rakenteellisessa järjestäytymisessä ja antigeenien keräämisessä. Myosiini ja aktiini muodostavat dynaamisen verkoston, joka kuljettaa B-solureseptorit kohti synapsin keskustaa. Tämä keskittäminen on edellytys korkea-affiniteettisten B-solureseptorimikroklustereiden endosytoosille (Natkanski ym., 2013). Yuseff ym. (2011) osoittivat, että lysosomien fuusioituminen ja niiden sisältämien happamien hydrolaasien vapautuminen immunologiseen synapsiin saa aikaan antigeenin irtoamisen antigeenia esittelevän solun pinnalta, mikä mahdollistaa myös antigeenien internalisaation.

1.2 B-soluvälitteisen immuunivasteen muodostuminen

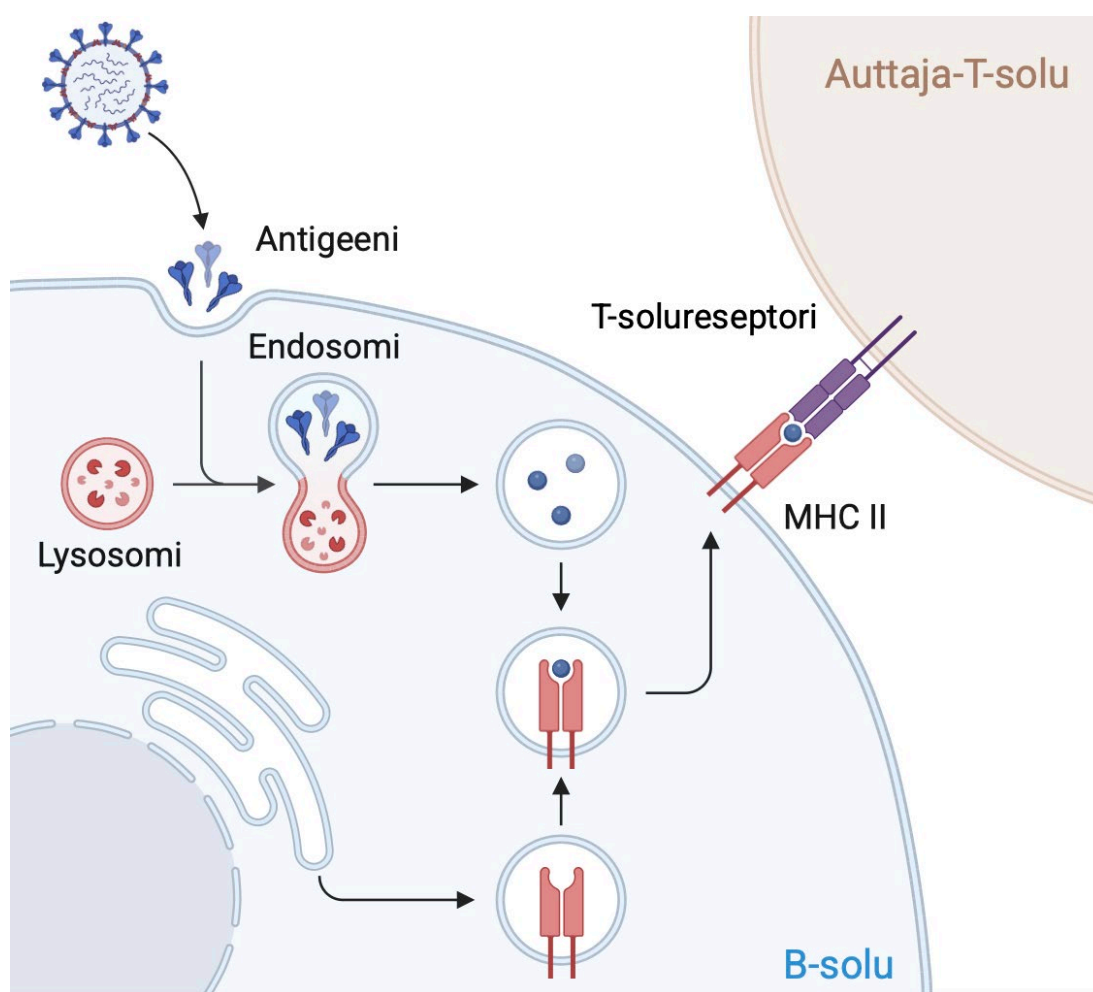
B-solut kiertävät jatkuvasti verenkierron ja imunestekierron välillä. Kun B-solureseptoriin sitoutuu sille spesifinen antigeeni imusolmukkeessa, käynnistyy monivaiheinen solunsisäinen signaalikaskadi, joka johtaa B-solun aktivoitumiseen ja vasta-aineiden tuotantoon. Tämä prosessi tapahtuu pääasiassa imusolmukkeen follikkelialueella, jossa naiivit B-solut kohtaavat antigeeneja ja vastaanottavat auttaja-T-soluilta jakautumista ja erilaistumista sääteleviä signaaleja (Notario & Kwak, 2022).

B-solureseptorin kalvoon sitoutunut immunoglobuliini-molekyyli on sitoutunut eikovalenttisesti CD79a ja CD79b transmembraanisista signaalintialayksiköistä koostuvaan CD79-heterodimeeriin, joka vastaa solunsisäisen signaalinnin aloituksesta (Sanchez ym., 1993; Tkachenko ym., 2024). Lyn-kinaasi fosforyloi heterodimeerin sytoplasmisissa hännissä olevat ITAM-motiivit (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif), minkä jälkeen Syk-kinaasi tunnistaa ne, aktivoituu ja muodostaa useiden muiden kinaasien ja adaptoriproteiinien kanssa signalosomin (Wang ym., 2014). Signalosomi on välttämätön solun vasteiden kannalta, sillä se mahdollistaa muun muassa fosfolipaasi C γ 2 (PLC γ 2), fosfatidyyli-inositoli-3-kinaasi (PI3K), mitogeenia aktivoiva proteiinikinaasi (MAPK) ja tumatekijä kappa B (NF- κ B) -signaalintireitit. Näiden reittien aktivoimat transkriptiotekijät säätelevät B-solujen selviytymistä ja proliferaatiota, sekä MHC II-molekyylien, kostimulatoristen molekylien ja kemokiinien ilmentymistä, minkä seurauksena

B- ja T-solujen välinen vuorovaikutus lisääntyy (Pal Singh ym., 2018; Wen ym., 2019; Baumgarth, 2021).

1.2.1 Antigeenin internalisaatio, prosessointi ja esittely

Antigeenin sitouduttua B-solureseptoriin B-solut aktivoituvat ja ottavat vieraan rakenteen sisäänsä. B-solut pilkkovat antigeenin peptideiksi endosomeissa, ja liittävät ne osaksi MHC-proteiinikomplekseja (engl. major histocompatibility complex, MHC), jotka esitellään CD4-positiivisille auttaja-T-soluille (kuva 2) (Rastogi ym., 2022).



Kuva 2. Antigeenin prosessointi ja esittely MHC II-kompleksissa. B-solut internalisoivat antigeenin endosomeihin ja prosessoivat ne pienemmiksi peptideiksi. Peptidit ladataan MHC II-komplekseihin, jotka kuljetetaan solukalvolle ja esitellään auttaja-T-soluille. Kuva on tehty BioRenderillä (biorender.com).

Kirjallisuudessa parhaiten kuvattu mekanismi liukoisten antigeenien internalisaatioon on klatriinivälitteinen endosytoosi (Malinova ym., 2021; McShane & Malinova, 2022). Antigeenin sitoutuessa B-solureseptoriin reseptori aktivoituu ja reseptorin sytoplasmisen osan ITAM-motiiviin sitoutuu adaptoriproteiini, joka sitoo klatriinia (Busman-Sahay ym., 2013). Src-perheen tyrosiinikinaasit fosforyloivat klatriinin raskasketjun, mikä johtaa klatriinipäällysteisten kuroumien syntymiseen (Stoddart ym., 2002). Klatriinien fosforylaatio on tärkeä klatriinin kerääntymiselle solukalvon niille alueille, joissa aktivoituneet reseptorit sijaitsevat. Dynamiini GTPaasi irrottaa klatriinipäällysteiset kuroumat solukalvosta ja lopulta klatriinipäällyste irtoaa vesikkelin fuusioituessa solun sisäisten endosomien kanssa.

Perinteisen näkemyksen mukaan antigeeni internalisoidaan aluksi aikaisiin endosomeihin, jotka kypsyvät myöhäisiksi endosomeiksi ja voivat edelleen fuusioitua lysosomien kanssa (Hämälistö ym., 2024). Myöhäisissä endosomeissa ja lysosomeissa pH:n lasku saa aikaan antigeenin pilkkoutumisen pienemmiksi peptideiksi (Roche & Furuta, 2015). Pilkotut peptidit liitetään osaksi MHC II-proteiinikomplekseja (engl. major histocompatibility complex, MHC) vesikkeleissä, joita kutsutaan MIIC-lokeroiksi (engl. MHC Class II Compartment). MHC II-kompleksit ohjautuvat synteesinsä jälkeen solulimakalvostolle, jossa kompleksiin sitoutuu invariantti ketjuproteiini Ii, joka estää muiden peptidien ennaaikaisen sitoutumisen kompleksiin sekä ohjaa MHC II-komplekseja solulimakalvostolta kohti endosomaalisia ja lysosomaalisia vesikkeleitä (Anderson & Roche, 2015; Cresswell, 1996).

Endosomien liikennöintiä solussa säätelevät Rab-perheen pienet GTPaasit, jotka toimivat samalla myös markkerina endosomeille. Eri Rab-proteiinit paikantuvat spesifisesti tiettyihin kalvorakenteisiin, kuten esimerkiksi Rab5-proteiinit varhaisiin endosomeihin ja Rab9-proteiinit lokalisoituvat myöhäisiin endosomeihin (Langemeyer ym., 2018). Lysosomit puolestaan ilmentävät Rab-proteiinien lisäksi LAMP1- ja LAMP2-kalvoproteiineja, jotka suojaavat lysosomeja niiden hajottavilta entsyymeiltä ja toimivat samalla lysosomien tyypillisinä markkereina (Zhang ym., 2023).

Solulimakalvostolla syntetisoidut MHC II-molekyylit kuljetetaan myös MIIC-lokeroihin, jotka sijaitsevat yleensä lähellä tumaa. Osa näistä lokeroista sijaitsee kuitenkin lähellä solukalvoa, ja niitä kutsutaan varhaisiksi MIIC-lokeroiksi (Hernández-Pérez ym., 2020). Varhaiset MIIC-lokerot sisältävät sekä aikaisten että myöhäisten vesikkelien tunnuspiirteitä, ja niissä on tarvittavat entsyymit antigeenien prosessointiin ja pilkottujen peptidien lataamiseen suoraan MHC II-molekyyleihin (Hernández-Pérez ym., 2020). Hernández-Pérez ym. (2020) havaitsivat, että B-solun pinnalla olevat MHC II-molekyylit voidaan internalisoida samanaikaisesti

antigeenin kanssa varhaisiin MIIC-lokeroihin ja näin MHC II-molekyylejä voidaan kierrättää solun pinnalta, mikä mahdollistaa antigeenin nopean esittelyn auttaja-T-soluille.

Anderson ym. (2000) osoittivat, että auttaja-T-solujen tunnistamassa antigeenin MHC II-kompleksissa, MHC II-kompleksit kerääntyvät lipidilauttoihin, mikä edistää antigeenin esittelyä T-soluille. He myös havaitsivat, että lipidilauttojen muodostumisen estäminen antigeenia esittelevän solun pinnalla inhiboi antigeenin esittelyä MHC II-komplekseissa. MHC-kompleksien lisäksi lukuisten signaalimolekyylin kerääntyminen lipidilauttoihin auttaa antigeenia esittelevää B-solua saamaan aktivoitumiseensa välttämättömiä signaaleja auttaja-T-solulta (Guo ym., 2003).

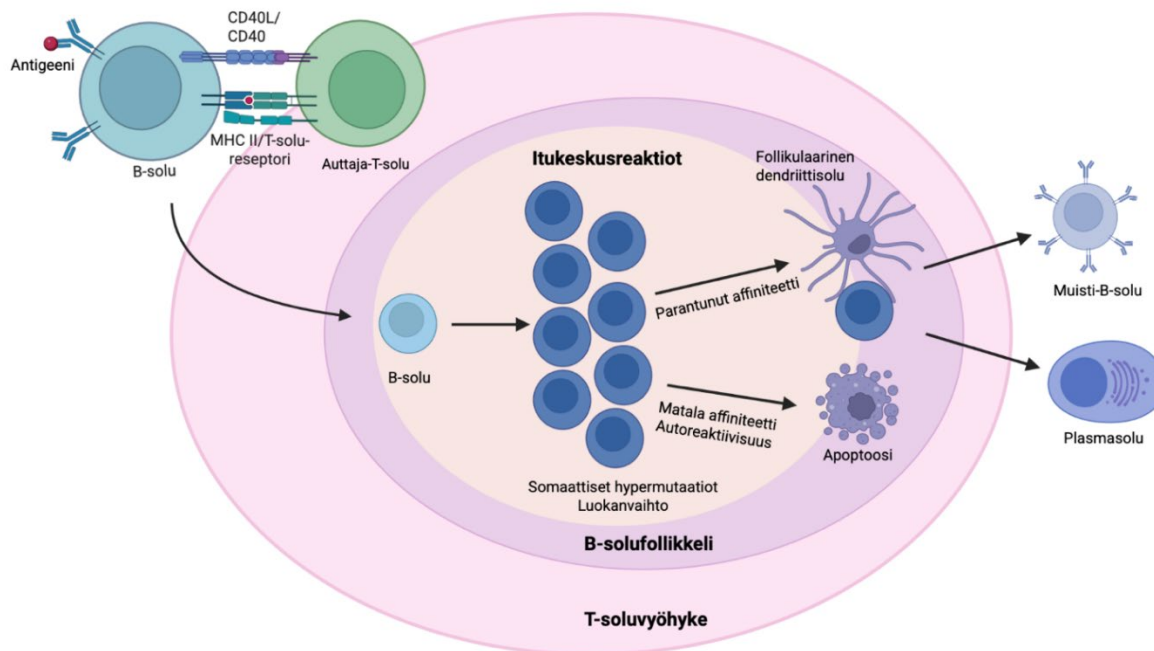
Osa aktivoituneista B-soluista siirtyy seuraavien päivien aikana takaisin follikkeleihin, joissa ne muodostavat itukeskuksia ja käyvät läpi somaattisia hypermutaatioita, luokanvaihtoa ja parantavat affiniteettiaan. Itukeskuksissa B-solut erilaistuvat pitkäikäisiksi plasmasoluiksi ja muistisoluiksi, jotka mahdollistavat nopean sekundaarivasteen elimistön kohdatessa saman taudinaiheuttajan uudelleen. Lisäksi osa B-soluista erilaistuu jo varhaisessa vaiheessa lyhytikäisiksi plasmablasteiksi, jotka tuottavat nopeasti suuria määriä vasta-aineita vierasta antigeenia vastaan (Carter ym., 2017).

1.2.2 Yhteistyö auttaja-T-solujen kanssa

Auttaja-T-solut tunnistavat MHC II-komplekseihin liitetyt peptidiantigeenit ja erittävät aktivoituessaan sytokiineja, jotka aktivoivat muita immuunijärjestelmän soluja, kuten B-soluja ja CD8-positiivisia tappaja-T-soluja, joiden tärkeä tehtävä on infektoituneiden solujen tuhoaminen (Davis & Bjorkman, 1988). Auttaja-T-solujen on myös osoitettu aktivoivan dendriittisoluja ja tehostavan niiden sytokiinituotantoa (Schulz ym., 2000).

Sekundaarisissa imukudoksissa follikulaariset B-solut tarvitsevat auttaja-T-soluja aktivoituaan ja tuottaakseen tehokkaan immuunivasteen. Auttaja-T-solut ovat kerääntyneet B-solufollikkeleihin T-soluvyöhykkeiden läheisyyteen, mikä mahdollistaa tehokkaan yhteistyön B-solujen kanssa (Pillai & Cariappa, 2009). Follikkelissa B-solun on esiteltävä MHC II-kompleksissaan sama antigeeni auttaja-T-solulle kuin imusolmukkeeseen saapunut dendriittisolu, joka on aiemmin aktivoinut naiivin T-solun (Heath ym., 2019). B-solut ilmentävät pinnallaan muun muassa CD40-reseptoreja ja B7-ligandeja, jotka välittävät kostimulatorisia signaaleja, jotka voimistavat T-solun aktivoitumista B-solun antigeeniesittelyn toimesta. CD40-reseptori ja B7-ligandi sitoutuvat auttaja-T-solun pinnan

CD40-ligandeihin ja CD28-reseptoreihin (Howland ym., 2000), minkä seurauksena auttaja-T-solut alkavat erittämään sytokiinejä, jotka edesauttavat B-solujen kerääntymistä follikkeleihin ja itukeskusten muodostumista (kuva 3) (Abos ym., 2020; Zotos ym., 2010).



Kuva 3. Itukeskusreaktiot. Sekundaarisissa imukudoksissa osa antigeenin tunnistaneista B-soluista siirtyvät itukeskuksiin, joissa ne käyvät läpi somaattisia hypermutaatiota ja luokanvaihtorekombinaatioita, minkä seurauksena niiden affiniteetti antigeenia kohtaan voi joko parantua tai heikentyä. Parhaan affiniteetin omaavat B-solut saavat eniten selviytymissignaaleja ja erilaistuvat muistisoluiksi ja plasmasoluiksi. Kuva on tehty BioRenderillä (biorender.com).

Antigeenin esittely auttaja-T-solulle on välttämätöntä korkea-affiniteettisten vasta-aineiden tuottamiseksi (Yuseff ym., 2013). Auttaja-T-solujen välittämät kostimulatoriset signaalit ja sytokiinit, kuten IL-21 ja IL-4, edistävät itukeskusten muodostumista ja vasta-aineiden luokanvaihtoa, ja ne ovat usein välttämättömiä B-solujen täydelliselle aktivoitumiselle (Shlomchik ym., 2019). Kun B-solu on saanut voimakkaan aktivaatiosignaalin, joka vaatii yleensä auttaja-T-solun apua (erityisesti CD40-ligandin kautta), B-solut alkavat ilmentämään AID-entsyymiä, joka muuttaa DNA:n sytosiineja urasiileiksi. AID-entsyymin ilmentyminen käynnistää itukeskuksessa somaattisen hypermutaation sekä vasta-aineluokan vaihdon, minkä seurauksena osa B-soluista erilaistuu tuottamaan korkean affiniteetin vasta-aineita tiettyä antigeenia vastaan (Martin & Scharff, 2002). Vasta-aineiden antigeenin tunnistavaa aluetta koodaavissa variaabelialueen geneeissä tapahtuvien somaattisten hypermutaatioiden

seurauksena osa B-soluista tunnistaa itukeskuksissa sijaitsevien follikulaaristen dedriittisolujen esittelemät antigeenin tehokkaammin, ja kykenevät siten endosytoimaan, prosessoimaan ja esittelemään sen paremmin T-soluille (De Silva & Klein, 2015).

Korkea-affiniteettisten vasta-aineiden tuotto on seurausta sattumanvaraisesta rekombinaatiosta sekä auttaja-T-solujen signaalien johdosta tapahtuvasta positiivisesta valinnasta, minkä seurauksena korkea-affiniteettisiä vasta-aineita tuottavat B-solut jakautuvat nopeammin samalla kun heikomman affiniteetin vasta-aineita tuottavat B-solut karsiutuvat (Shlomchik ym., 2019). Positiivisen valintapaineen seurauksena vain parhaiten antigeeneja tunnistavat ja sitovat B-solut selviävät ja jakautuvat muistisoluiksi ja plasmasoluiksi. Somaattisten hypermutaatioiden seurauksena syntyneet elimistön omia antigeeneja tunnistavat B-solut ohjataan negatiivisella selektiolla apoptoosiin tai vaihtoehtoisesti B-solut ohjataan uudelleen somaattiseen rekombinaation (Sandel & Monroe, 1999). Mikäli B-solun vasta-ainereseptori ei ole uudelleenmuokkauksen jälkeen enää autoreaktiivinen, solu välttää apoptoosin.

Sekundaaristen imukudosten marginaalivyöhykkeellä on erikoistunut B-solupopulaatio, joka reagoi nopeasti verenkierron antigeeneihin ja aktivoituu usein ilman T-solujen apua, mikä mahdollistaa nopean immuunivasteen (Cerutti ym., 2013; Racine & Winslow, 2009). Tämä tapahtuu esimerkiksi silloin, kun B-solureseptorit tunnistavat mikrobien toistuvia rakenteita, kuten bakteerien polysakkarideja (Lesinski & Westerink, 2001). Polysakkaridirakenteet voivat kuitenkin opsonoitua komplementtiproteiinien toimesta, mikä helpottaa B-soluja niiden tunnistamisessa ja siten edesauttaa B-solujen aktivaatiota (Breukels ym., 2005). Ilman T-solujen yhteistyötä B-soluaktivaatiosta seuraa yleensä vain heikkoaffiniteettisten IgM-vasta-aineiden tuotanto, joka on kuitenkin oleellista vieraiden mikrobien neutralisoinnissa (Ehrenstein & Notley, 2010).

1.2.3 Hankitun immunitietin hyödyntäminen rokotekehityksessä

Hankittu immunitetti eli elimistön kyky tunnistaa ja muistaa tiettyjä taudinaiheuttajia on keskeisessä asemassa rokotekehityksessä. Rokottamisessa on kyse aktiivisesta immunisaatiosta, jossa elimistössä käynnistetään B-solujen vasta-ainetuotanto tietyn taudinaiheuttajan antigeeneja vastaan. Rokotteena voidaan käyttää esimerkiksi heikennettyä tai inaktivoitua taudinaiheuttajaa, johon on voitu lisätä adjuvantti, joka voimistaa antigeenin aiheuttamaa immuunivastetta. Rokotteen sisältämä antigeeni aktivoi B-solut, mikä johtaa itukeskusreaktioiden muodostumiseen. Rokotuksen tavoitteena ei ole vain vasta-aineiden tuottaminen, vaan pitkäkestoisen immunologisen muistin ja laajavaikutteisten vasta-aineiden aikaansaaminen, jolloin elimistö reagoi nopeasti ja tehokkaasti, jos se kohtaa saman taudinaiheuttajan uudelleen (Kräutler ym., 2017). B-solujen toiminnan ymmärtäminen molekyyllitasolla on välttämätöntä, sillä se mahdollistaa yksilöllisempien ja tehokkaampien rokotteiden suunnittelun. Tavoitteena on kehittää rokotteita, jotka tarjoavat erittäin kestävän suojan ja jotka tunnistavat tehokkaasti myös muuntuvia viruksia.

Uusien rokotteiden kehittämisen ohella rokotekehitystyön tavoitteena voi olla myös olemassa olevan rokotteen parantaminen. Esimerkiksi vaikka perinteinen keltakuumevirusrokote YF-17D on erittäin tehokas, tutkijat kehittävät uusia inaktivoituja ja eläviä heikennettyjä ehdokkaita. Viimeaikaiset tutkimukset osoittavat, että uudet ehdokkaat (kuten vYF-247) tarjoavat vastaavan suojan kuin perinteinen rokote, mutta mahdollisesti modernimmalla valmistustekniikalla ja paremmalla turvallisuusprofiililla (Esson ym., 2022). Uudet rokotteet voivat siten vähentää entisestään erittäin harvinaisia keltakuumerokotteeseen liittyviä vakavia haittavaikutuksia.

1.3 Keltakuumevirus

Keltakuumevirus on RNA-virus, joka kuuluu flaviviruksiin. Flaviviruksiin kuuluu merkittävä joukko erilaisia taudinaiheuttajia, kuten dengue-, zika-, Länsi-Niilin- ja Japanin aivotulehdusvirus sekä puutiaisaivokuumevirus. Keltakuumevirus kiertää luonnossa hyttysten ja kädellisten, erityisesti apinoiden välityksellä, ja ihmiseen virus leviää tavallisimmin *Aedes aegypti* suvun hyttysenpiston välityksellä. Keltakuumevirusta esiintyy endeemisenä Afrikassa ja Etelä-Amerikassa trooppisilla ja subtrooppisilla alueilla (Figueiredo ym., 2020). Viime vuosina epidemioita on kuitenkin esiintynyt myös ei-endeemisillä alueilla, sekä alueilla, joilla

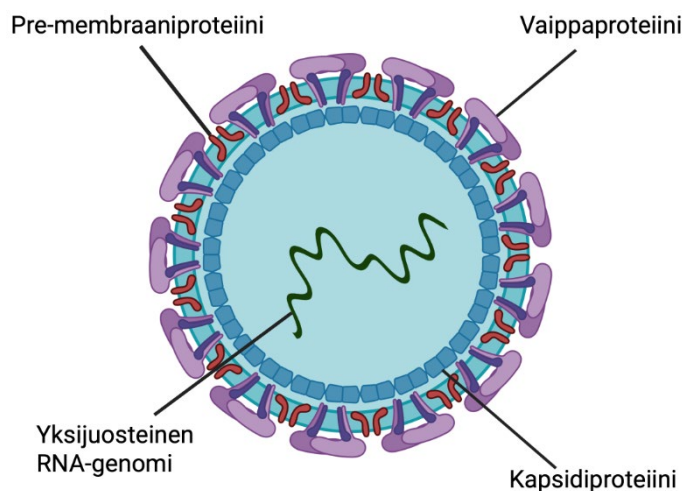
virusta ei ollut aiemmin esiintynyt vuosikymmeniin. Vuosina 2016–2019 virus levisi Brasiliassa useisiin kaupunkeihin aiheuttaen alueella historian suurimman keltakuumevirusepidemian. Epidemia herätti huolta erityisesti viruksen siirtymisestä sylvaattisesta eli luonnonvaraisesta kierrosta kaupunkiympäristöön, jolloin virus voisi levitä ihmisiin urbaanikierron kautta entistä tehokkaammin (Figueiredo ym., 2020). Lisäksi ilmaston lämpenemisen seurauksena keltakuumevirus uhkaa levitä yhä pohjoisemmille alueille virusta levittävien hyttysten levittäytyessä yhä laajemmille alueille (Liu-Helmersson ym., 2019). Arvioiden mukaan keltakuumevirukseen sairastuu vakavasti vuosittain 67 000–173 000 ihmistä ja 31 000–82 000 sairastumisista johtaa kuolemaan (Gaythorpe ym., 2021).

Suurin osa keltakuumevirustartunnoista paranee itsestään ja aiheuttaa muutaman päivän jälkeen infektiosta ainoastaan lieviä flunssan kaltaisia oireita, kuten kuumetta, päänsärkyä, pahoinvointia ja väsymystä. Osa tartunnoista voi kuitenkin kehittyä taudin vakavammaksi muodoksi, jolloin oireina voi esiintyä korkea kuumetta, ihon ja silmien keltaisuutta, verenvuotoa sekä elinvarioita (Servadio ym., 2021). Keltakuumevirus infektoi erityisesti maksasoluja, jolloin taudin vakavammassa muodossa seurauksena voi olla hengenvaarallinen maksan vajaatoiminta, mistä myös taudinkuvaan kuuluva keltaisuus johtuu (Pierson & Diamond, 2020). Keltakuumeeseen ei ole olemassa antiviraalista hoitokeinoa, minkä vuoksi tärkein tämänhetkinen keino ehkäistä tartuntoja on rokote (Bifani ym., 2023). Vaikka keltakuumevirusrokote 17D on yksi tehokkaimmista ja turvallisimmista tähän mennessä kehitetyistä rokotteista, rokotteen tehokkuuteen vaikuttavat molekulaariset mekanismit tunnetaan huonosti (Bonaldo ym., 2014).

1.3.1 Keltakuumeviruksen rakenne

Flavivirukset ovat ryhmä vaipallisia viruksia, joiden genomi koostuu yksijuosteisesta RNA:sta (kuva 4). Flavivirusten rakenne on hyvin konservoitunut, ja niiden yksijuosteinen RNA-genomi koodaa noin 3500 aminohapon mittaista prekursoripolypeptidiketjua, joka pilkotaan kymmeneksi osaksi. Polypeptidiketju pilkotaan kolmeksi rakenneproteiiniksi, joita ovat kapsidiproteiini (engl. capsid protein, C-proteiini), vaippaproteiini (engl. envelope protein, E-proteiini) ja pre-membraaniproteiini (engl. pre-membrane protein, prM-proteiini), ja seitsemäksi ei-rakenteelliseksi proteiiniksi (Slon Campos ym., 2018). C-proteiini osallistuu viruksen nukleokapsidin muodostamiseen ja suojaa viruksen genomia. prM-proteiinin tehtävä puolestaan on estää epäkypsan viruksen ennen aikainen fuusioituminen ja suojata E-proteiinia. (Slon Campos ym., 2018; Zhao ym., 2021). Ei-rakenteelliset proteiinit osallistuvat muun

muassa viruksen replikaatioon, ja virionien kokoamiseen ja isäntäsolun immuunijärjestelmän väistämiseen (Dutta & Langenburg, 2023).



Kuva 4. Keltakuumeviruksen rakenne. Keltakuumevirus koostuu kolmesta rakenneproteiinista. Vaippaproteiini ja pre-membraariproteiini sijaitsevat viruksen pinnalla, ja kapsidiproteiini ympäröi ja suojaa viruksen yksijuosteista RNA-genomia. Kuva on tehty BioRenderillä (biorender.com).

E-proteiini on viruksen tärkein pintaproteiini, joka vastaa viruksen sitoutumisesta isäntäsoluun sekä pääasiassa immuunivasteen muodostumisesta. E-proteiinilla on kolme rakenteellista domeenia (EDI, EDII, EDIII), joista EDI vastaa E-proteiinin stabiilisuudesta, EDII viruksen membraanifuusiosta fuusioluupin avulla ja EDIII viruksen kiinnittymisestä isäntäsoluun (Zhang ym., 2017). E-proteiinit ovat järjestäytyneet epäkypsän viruksen pinnalle trimeerirakenteiksi, jotka muuttavat konformaatiotaan dimeereiksi viruksen kypsyessä ja happamuuden laskiessa solun endosomaalisessa verkostossa (Pierson & Kielian, 2013).

1.3.2 Viruksen elinkierto

Virus tarttuu isäntäsolun pintaan ja internalisoituu soluun reseptorivälitteisellä endosytoosilla (Zhang ym., 2017). Aikaisten endosomien happamuus saa aikaan viruksen E-proteiinien dimeerirakenteen hajoamisen ja uudelleenjärjestäytymisen trimeereiksi, jolloin viruksen fuusioluuppi paljastuu mahdollistaen viruksen fuusioitumisen endosomin membraanin kanssa (Allison ym., 1995). Fusion seurauksena viruksen nukleokapsidi vapautuu solulimaan, jossa viruksen genomi transloidaan ja virusproteiinien tuotanto käynnistyy endoplasmakalvostolla. Epäkypsät viruspartikkelit kootaan endoplasmakalvostolla ja kuljetetaan transgolgista kohti solukalvoa. Golgin alhainen pH saa aikaan epäkypsien viruspartikkelien kypsymisen

infektiivisiksi. Epäkypsässä viruksessa E-proteiinit ovat järjestäytyneet viruksen pinnalle heterodimeereiksi, joihin on kiinnittyneenä prM-proteiini. PrM-proteiini estää viruksen ennen aikaisen fuusion peittämällä viruksen fuusioluupin. Viruksen kypsyessä prM-proteiini pilkotaan happamassa ympäristössä furiinin toimesta pr- ja M-proteiiniksi, mikä sallii E-proteiinien järjestäytymisen dimeereiksi ja viruksen muuttumisen infektiiviseksi (Stadler ym., 1997). Kypsät ja infektiiviset viruspartikkelit kuljetetaan solusta ulos eksosytoosilla.

1.4 17D-keltakuumevirusrokote

17D-keltakuumevirusrokote sisältää elävää heikennettyä keltakuumevirusta, joka aktivoi immuunivasteen aiheuttamatta itse keltakuumeautia. 1930-luvulla Max Theiler onnistui viljelemään vuonna 1927 eristettyä villityypin Asibi-keltakuumeviruskantaan kanan ja hiiren alkioissa, jonka jälkeen yli 850 miljoonaa 17D-keltakuumerokoteannosta on annettu maailmanlaajuisesti (Giancetti ym., 2022). Yhden rokoteannoksen seurauksena 95 % rokotetuista muodostaa immuniteetin keltakuumevirusta vastaan noin kymmenen päivän kuluessa (Barrett & Teuwen, 2009).

Rokote aktivoi immuunijärjestelmän tehokkaasti ja indusoi pitkäkestoisen neutraloivien vasta-aineiden tuotannon, joten se antaa pitkäkestoisen ja voimakkaan suojan (Wieten ym., 2016). Viimeaikaiset tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, ettei rokote tehoa yhtä hyvin kaikkia viruskantoja vastaan (Bibby ym., 2025). Rokotteen sisältämät vasta-aineet eivät esimerkiksi tunnista uuden Brasiliassa leviävän uuden keltakuumeviruskannan E-proteiinia yhtä tehokkaasti kuin muiden kantojen, minkä uskotaan johtuvan mutaatioista viruksen E-proteiinissa (Haslwanter ym., 2022). Vaikka 17D-keltakuumevirusrokote on yksi tehokkaimmista ja turvallisimmista tähän mennessä kehitetyistä rokotteista, nykyinen rokote ei enää välttämättä suojaa yhtä tehokkaasti kaikkia kiertäviä kantoja vastaan. Lisäksi ymmärrys siitä, mihin rokotteen tehokkuus perustuu ja kuinka pitkäaikainen immuunivaste muodostuu, on edelleen heikko (Bonaldo ym., 2014).

17D-keltakuumerokotteen tehokkuus perustuu sen kykyyn aktivoida tehokkaasti sekä synnynnäinen että hankittu immuniteetti. Heikennetty keltakuumerokotevirus pystyy replikoitumaan isäntäsoluissa, kuten makrofageissa ja dendriittisoluissa, jotka esittelevät virusantigeneja lymfosyyteille. Dendriittisolut esittelevät prosessoimiaan virusantigeneja erityisesti auttaja-T-soluille, jotka puolestaan auttavat aktivoituneita B-soluja erilaistumaan ja jakautumaan plasmakomplekseiksi ja muistisolukomplekseiksi (Heath ym., 2019). Cong ym. (2016) huomasi,

että villityypin virus ja rokotevirus saavat aikaan erilaiset sytokiinivasteet infektoidessa makrofageja ja dendriittisoluja, ja että ainoastaan 17D-keltakuumeviruksen infektoimat dendriittisolut pystyivät aktivoimaan auttaja-T-soluja *in vitro*. Auttaja-T-solujen aktivaation seurauksena B-solut aktivoituvat tehokkaammin ja tuottavat siten paremman vasta-ainevälitteisen immuniteetin virusta vastaan.

17D-keltakuumevirusrokotus saa aikaan neutraloivien vasta-aineiden tuoton, mikä estää viruksen pääsyn soluihin. Neutraloivat vasta-aineet kohdistuvat erityisesti viruksen E-proteiinin EDIII-domeeniin, jolloin sitoutuvat vasta-aineet estävät viruksen kiinnittymisen isäntäsoluun (Zhang ym., 2017). EDII-domeeniin sitoutuvat vasta-aineet puolestaan voivat estävät viruksen fuusioitumisen endosomeihin, mutta tähän domeeniin kohdistuu myös suurin osa ristireagoivista ja heikommin neutraloivista vasta-aineista (Deng ym., 2011).

Verenkierrossa havaitaan plasmablastien lisääntyminen noin 7–14 vuorokauden kuluttua rokoteannoksen saamisesta. B-muistisolut havaitaan noin 14 vuorokauden jälkeen, ja niiden määrä saavuttaa huippunsa noin 3–6 kuukauden kuluttua rokotuksesta (Wec ym., 2020). Aluksi B-solut tuottavat IgM-vasta-aineita, jotka voidaan havaita verestä jo muutaman päivän kuluttua rokotteesta. Tyypillisesti heikko-affiiniset IgM-vasta-aineet saavuttavat huippunsa noin kahden viikon jälkeen, jonka jälkeen niiden pitoisuus veressä laskee. Itukeskusreaktioiden myötä muodostuvat neutraloivat IgG-vasta-aineet puolestaan ovat havaittavissa noin viikon jälkeen rokotuksesta, ja ne voivat säilyä veressä ainakin 45 vuotta (Barrett & Teuwen, 2009), mikä tarjoaa pitkäkestoisen suojan virusta vastaan. Toisaalta Santos-Peral ym. (2024) havaitsivat, että myös IgM-vasta-aineet voivat säilyä verenkierrossa useita vuosia rokotuksen jälkeen. IgM-vasta-aineet on aiemmin yhdistetty ensisijaisesti varhaiseen immuunivasteeseen, mutta viimeaikaiset havainnot viittaavat siihen, että IgM-vasta-aineilla voi olla aiemmin oletettua merkittävämpi rooli pitkäaikaisen vasta-ainevälitteisen immuniteetin ylläpidossa (Jacob-Nascimento ym., 2025; Santos-Peral ym., 2024).

17D-keltakuumeviruksen ja villityypin keltakuumeviruksen välillä on havaittu geneettisiä ja rakenteellisia eroja, joilla on merkittävä vaikutus viruksen aikaansaamassa immuunivasteessa. Villityypin keltakuumeviruksen replikoituessa syntyy herkästi virheitä, sillä keltakuumeviruksen RNA-polymeraasilta puuttuu oikolukutoiminto (Collins ym., 2018). Viimeaikaisten sekvenssitutkimusten mukaan 17D-keltakuumerokotevirus on kuitenkin geneettisesti villityyppiä huomattavasti homogeenisempi, ja rokoteviruksen replikaation on osoitettu olevan huomattavasti tarkempaa, minkä arvellaan vaikuttavan rokotteen tehokkuuteen

ja turvallisuuteen (Collins ym., 2018; Davis ym., 2019) Villityypin virukseen verrattuna 17D-keltakuumeviruksen E-proteiiniin on kertynyt kahdeksan mutaatiota, jotka muuttavat viruksen pintarakennetta (Fernandez-Garcia ym., 2016). Näiden rakenteellisten erojen myötä 17D-keltakuumeviruksen fuusioluuppi ei myöskään paljastu yhtä herkästi kuin villityypin viruksessa. Tämä tekee rokoteviruksesta stabiilimman ja vähentää fuusioluoppiin kohdistuvien, heikosti neutraloivien ja ristireagoivien vasta-aineiden muodostumista sekä sitoutumista virukseen (Bibby ym., 2025).

Flavivirukset internalisoituvat soluun pääsääntöisesti klatriinivälitteisellä endosytoosilla. Fernandez-Garcia ym. (2016) kuitenkin havaitsivat, että 17D-keltakuumevirus käyttää internalisaatiossa klatriinista riippumatonta reittiä. He osoittivat, että viruksen kyky tunkeutua isäntäsoluun oli muuttunut normaalista poikkeavaksi viruksen perimään tulleiden muutosten vuoksi. Nämä mutaatiot olivat seurausta rokoteviruksen heikentämisestä. Fernandez-Garcia ym. arvelivat poikkeavan internalisaatiomekanismin vaikuttavan rokotteen poikkeuksellisen hyvään tehokkuuteen. Klatriinista riippumattoman internalisaation uskotaan johtavan viruksen tehokkaampaan kuljetukseen endosomaalisessa verkostossa, ja myös suojaavan virioneita hajoamiselta enemmän kuin klatriinivälitteinen reitti. Lisäksi tutkimuksessa osoitettiin, että 17D-keltakuumevirus sitoutuu ja internalisoituu kohdesoluihin tehokkaammin kuin villityypin keltakuumevirus. Tehokkaamman internalisaation uskotaan olevan yhteydessä myös 17D-keltakuumeviruksen indusoimaan voimakkaampaan sytokiini- ja interferonivasteeseen villityypin virukseen verrattuna.

Fernandez-Garcia ym. (2016) selvittivät myös 17D-keltakuumeviruksen ja villityypin viruksen kulkeutumista endosomeissa. He havaitsivat, että sekä rokotevirus että villityypin virus kulkeutuvat aikaisissa ja kierrättävissä endosomeissa ja säilyttivät tehokkaan infektiokyvyn. Näiden endosomien normaalin toiminnan estäminen heikensi merkittävästi viruksen fuusiota ja infektiivisyyttä, kun taas myöhäisten vesikkelien toiminnan estämisellä ei ollut vaikutusta. Tämä viittaa siihen, että viruksen fuusioituminen tapahtuu jo aikaisissa tai kierrättävissä endosomeissa, eikä virus vaadi kulkeutumista myöhäisiin endosomeihin. On kuitenkin edelleen epäselvää, miten viruksen fuusio tarkalleen tapahtuu. Jotta viruksen fuusioluuppi paljastuu ja virus fuusioituu soluun, tulee ympäristön olla hapan. Fernandez-Garcia ym. (2016) selvittivät happamuuden merkitystä viruskantojen fuusioitumiseen ja infektiivisyyteen estämällä ATPaasi-protonipumpun toiminnan. Protonipumpun normaali toiminta on välttämätöntä aikaisten endosomien sisällön happamoittamiseksi. Kun pumpun toiminta estettiin, molempien

viruskantojen fuusioituminen ja infektiivisyys väheni merkittävästi. Tutkimus osoittaa, että viruksen fuusiolle välttämätön matala pH saavutetaan jo aikaisissa endosomeissa.

1.4.1 Ristireagoivat vasta-aineet

Flavivirukset ovat rakenteeltaan hyvin samankaltaisia, minkä vuoksi aiemmin muodostunut immuunivaste tiettyä flavivirusta vastaan voi vaikuttaa myöhempään flavivirusinfektioon joko vahvistamalla tai heikentämällä immuunivastetta (Santos-Peral ym., 2024). Suurin osa neutraloivista vasta-aineista tunnistaa viruksen E-proteiinin, jonka useat epitootit ovat hyvin konservoituneita eri flaviviruksilla (Zhang ym., 2017; Zhao ym., 2021). Ensimmäisessä infektiossa elimistö tuottaa vasta-aineita tiettyä flavivirusta vastaan ja toisessa infektiossa, jos henkilö saa tartunnan toisesta, samaa sukua olevasta viruksesta, ensimmäisessä infektiossa syntyneet vasta-aineet tunnistavat uuden viruksen, mutta ne sitoutuvat siihen heikosti eivätkä pysty neutraloimaan sitä tehokkaasti (Kulkarni, 2020). Heikko neutralointi voi tehostaa viruksen pääsyä soluihin Fcy-reseptorivälitteisellä fagosytoosilla. Tätä ilmiötä kutsutaan vasta-aineriippuvaiseksi infektion voimistumiseksi (engl. antibody dependent enhancement, ADE), jossa ristireagoivat vasta-aineet helpottavat viruksen pääsyä soluihin ja pahentavat infektiota (Mok & Chan, 2020). Jossain tapauksissa ADE-ilmiö voi myös tehostaa immuunivastetta, sillä ristireagoivien vasta-aineiden muodostamat immunokompleksit voivat lisätä viruksen sisäänottoa antigeenia esitteleviin soluihin kuten dendriittisoluihin ja makrofageihin, minkä seurauksena antigeenin esittely lymfosyyteille tehostuu (Mok & Chan, 2020). Chan ym. (2016) osoittivat, että aiemmin annettu Japanin aivotulehdusrokote voi tehostaa 17D-keltakuumevirusrokotteen aikaansaamaa immuunivastetta muodostuneiden ristireagoivien vasta-aineiden ansiosta. Toisaalta aiemmin saadun TBE-rokotuksen (engl. Tick-Borne Encephalitis, puutiaisaivokuumerokote) on osoitettu heikentävän YFV-rokotuksesta syntyvää vasta-ainevastetta heikosti neutraloivien ja ristireagoivien vasta-aineiden muodostumisen seurauksena (Santos-Peral ym., 2024).

17D-keltakuumerokote antaa nopean ja vahvan, jopa elinikäisen suojan keltakuumeesta vastaan, mutta rokotteen taustalla olevia solu- ja molekyyli-tason mekanismeja ei kuitenkaan vielä tunneta tarkasti. Erityisesti keltakuumevirusrokotteen indusoima B-soluaktivaatio ja sen seurauksena käynnistyvän vasta-ainevälitteisen immuniteetin muodostuminen on vielä puutteellisesti ymmärrettyä (Sandberg ym., 2021). B-soluaktivaation taustalla olevien mekanismien ymmärtäminen on avainasemassa uusien ja tehokkaampien rokotteiden

kehittämiseksi tulevaisuudessa, minkä vuoksi B-soluaktivaation tutkiminen on erityisen tärkeää.

1.5 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena on ymmärtää, kuinka B-solut aktivoituvat keltakuumerokoteviruksella ja tutkia keltakuumerokoteviruksen solunsisäistä liikennöintiä B-solujen endosomaalisessa verkostossa. Viruksen endosytoosia varten pystytetään menetelmä, jonka avulla voidaan seurata viruspartikkelien internalisaatiota. Viruspartikkelit sidotaan B-solureseptorille spesifisiin vasta-aineisiin, joiden sitoutuminen saa B-solut aktivoitumaan ja ottamaan viruksen sisäänsä B-solureseptorivälitteisesti. Koska tutkimuksessa ei ollut mahdollista käyttää transgeenistä YFV-spesifistä B-solulinjaa eikä potilasnäytteitä keltakuumeen sairastaneilta tai 17D-rokotetuilta henkilöiltä, viruksen sitoutumista B-solureseptoriin ja sen internalisaatiota soluissa päädyttiin selvittämään surrogaattiantigeeni-kompleksilla. Tarkoituksena on ymmärtää, kuinka keltakuumerokotevirus internalisoidaan ja prosessoidaan B-soluissa, ja kuinka tämä vaikuttaa virusantigeenin esittelyyn auttaja-T-soluille. B-soluaktivaatio on keskeistä pitkäaikaisen immuunisuojan muodostumiselle, minkä vuoksi B-solujen toiminnan ymmärtäminen on tärkeää tehokkaiden rokotteiden kehittämisessä.

Surrogaattiantigeeni-kompleksi koostuu usein useista osista, kuten varsinaisesta antigeenistä ja siihen liitetystä merkkiaineesta ja ankkurimolekyylistä. Koska surrogaattiantigeeni-kompleksi on monimutkainen biologinen kompleksi, osien erillinen testaaminen ja optimointi oli oleellista ennen kokonaisen kompleksin käyttöä internalisaatiotutkimuksissa. Näin voidaan varmistua kunkin osan toimivuudesta.

Aktivoidut B-solut fiksataan eri aikapisteissä ja inaktivoidut virukset sekä endosomaaliset osastot värjätään spesifeillä markkereilla leimatuilla vasta-aineilla. Värjääminen mahdollistaa yksittäisten viruspartikkelien jäljittämisen, ja markkerien avulla voidaan identifioida, millä endosomaalisella osastolla virusantigeenien prosessointi ja lataaminen antigeeniä esitteleviin luokan II MHC-komplekseihin tapahtuu. Tulevaisuudessa tarkoitus on verrata B-solureseptorivälitteistä rokoteviruksen ja villityypin viruksen internalisaatiota ja antigeenien prosessointia ja esittelemistä T-soluille, ja ymmärtää paremmin, miten virusantigeenien rakenne vaikuttaa antigeenin prosessointiin ja antigeeniesittelyyn B-soluissa. Tutkimus on osana EU:n rahoittamaa Yellow4Flavi-projektia, jonka tavoitteena on tehokkaampien rokotteiden kehittäminen flaviviruksia vastaan.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 *Solut ja kasvatus*

Tutkimuksessa käytettiin ihmisen lymfoomasta peräisin olevia Raji- ja Ramos-B-solulinjoja, jotka kasvavat suspensiona kasvatusmediumissa. Raji-soluista käytettiin sekä villityypin (wt) linjaa (DSMZ) että Raji D1.3-solulinjaa (saatu Facundo Batistalta, Ragon Institute, Yhdysvallat), joka ilmentää transgeenistä HEL-spesifistä B-solureseptoria (engl. hen egg lysozyme, HEL). HEL-spesifinen B-solureseptori mahdollistaa antigeenispesifisen B-solujen aktivaation. Soluja kasvatettiin RPMI 1640-kasvatusmediumissa (Gibco), johon oli lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (engl. fetal calf serum, FCS; Biowest), 2 mM L-glutamiinia (Gibco), sekä 1x penisilliini/streptomysiini (100x, Euroclone). Soluja kasvatettiin T25-kasvatuspulloissa noin $0,4 - 1,0 \times 10^6$ /ml tiheydessä ja ylläpidettiin +37 °C:ssa 5 % CO₂ inkubaattorissa.

17D-virusinfektioissa ja viruskasvatuksissa käytettiin VeroE6-solulinjaa (ATCC) ja SW13-solulinjaa (saatu Anne Krugiltä, Ludwig Maximilians University, Saksa), jotka kasvavat adherentteina eli kasvualustaansa kiinnittyneinä. VeroE6-solut ovat peräisin afrikkalaisen vihermarakatin munuaisepiteelistä ja SW13-solut ovat ihmisen lisämunuaisen kuorikerroksen karsinoomasoluja. VeroE6-soluja kasvatettiin DMEM-kasvatusmediumissa (Euroclone), johon oli lisätty 10 % FCS, 2 mM L-glutamiinia sekä 1x penisilliini/streptomysiini. SW13-soluja kasvatettiin MEM-kasvatusmediumissa (Gibco), johon oli lisätty 10 % FCS, 1 % NEAA (engl. non-essential amino acids, ei-välttämättömät aminohapot; Gibco), 1 % SP (engl. sodium pyruvate, natriumpyruvaatti; Gibco) ja 1x penisilliini/streptomysiini. Soluja kasvatettiin T75- ja T175-kasvatuspulloissa noin 1×10^6 /ml tiheydessä ja ylläpidettiin +37 °C:ssa 5 % CO₂ inkubaattorissa.

2.2 *17D-keltakuumeviruksen kasvatus ja puhdistus*

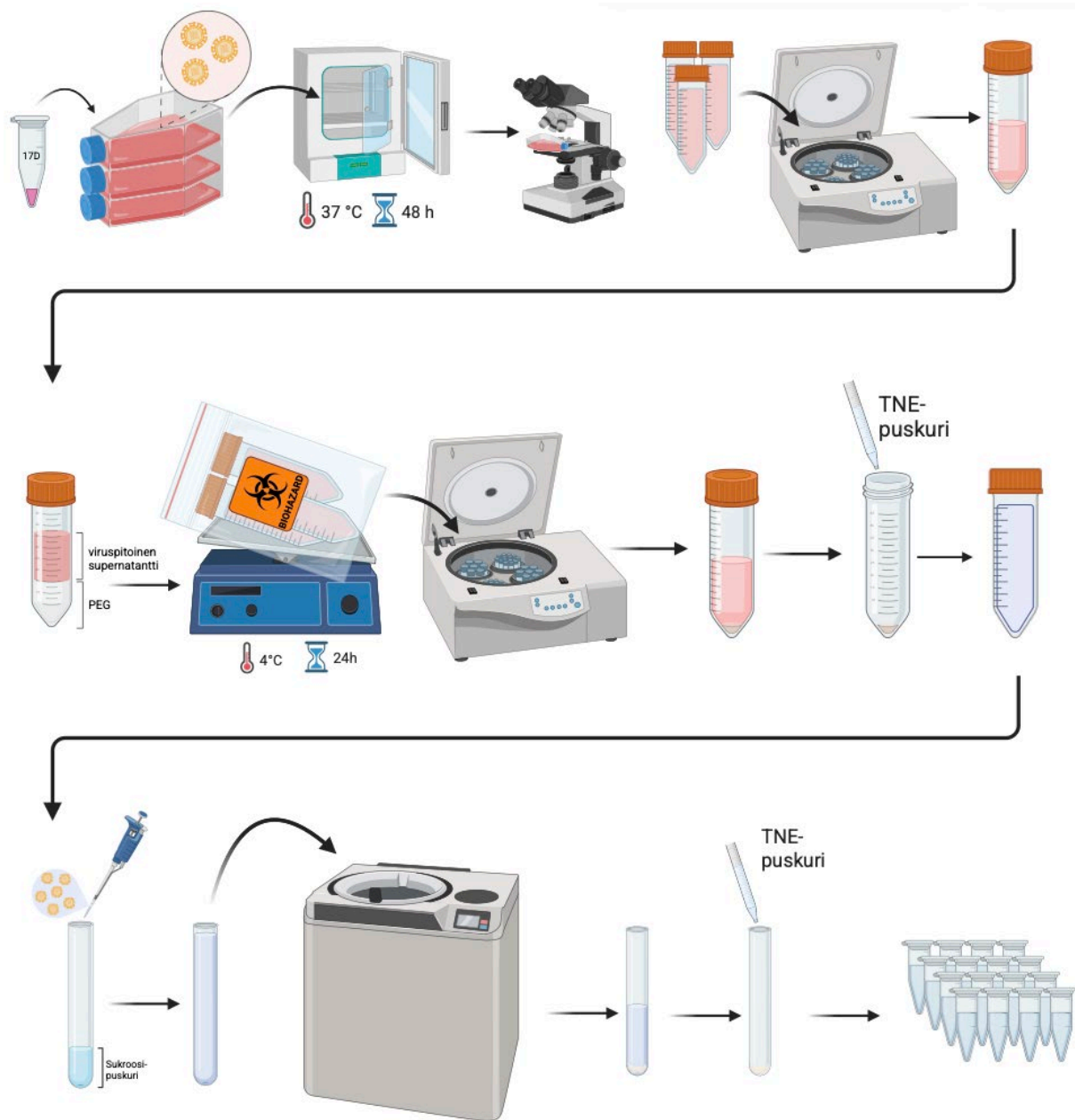
Tutkimuksessa käytettiin 17D-keltakuumerokoteviruskantaa (engl. 17D yellow fever vaccine, 17D-YFV), joka saatiin Giovanna Barba-Spaethilta (Pasteur Instituutti, Pariisi, Ranska) ($1,3 \times 10^8$ pfu/ml). Alkuperäisestä p1 (engl. passage, p1) -viruserästä kasvatettiin omat viruserät VeroE6- ja SW13-soluissa. Ennen työn aloitusta perehdyttiin keltakuumeviruksen riskinarvioon ja suoritettiin koulutus bioturvallisuustason 2-laboratoriossa työskentelyyn (engl. biosafety laboratory 2, BSL2), sillä BSL2-tason laboratorio vaaditaan 17D-YFV:llä

työskentelyyn. Keltakuumerokotevirusta käsiteltäessä käytettiin asianmukaisia suojarusteita ja näytteet inaktivoitiin aina ennen siirtämistä ulos BSL2-laboratoriosta.

17D-keltakuumeviruksen kasvatusta varten VeroE6-solut jaettiin T75-kasvatuspulloon ja soluja kasvatettiin yön yli noin 70 % konfluenssiin (5×10^6 solua/plo). Kasvatusmedium poistettiin ja soluille lisättiin 4 ml DMEM-infektiomediumia (DMEM, 2 % FCS, 2 mM L-glutamiini, 1x penisilliini/streptomysiini). Solut infektoitiin 0,01 infektiokertoimella (eng. multiplicity of infection, MOI) eli infektiivien virusten määrän suhde kohdesoluihin oli 1:100. Viruksen annettiin kiinnittyä soluihin 1 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa, minkä jälkeen soluille lisättiin 6 ml infektiomediumia ja inkubaatiota jatkettiin vielä 72 h. Virusinfektion aiheuttamia rakenteellisia muutoksia eli sytopaattisia vaikutuksia (engl. cytopathic effect, CPE) soluihin arvioitiin tarkastelemalla soluja mikroskoopilla. Solujen kasvatusmedium kerättiin, sentrifugoitiin (500 x g 5 min) ja virukset sisältävä supernatantti otettiin talteen. Virusten pitoisuus selvitettiin titraamalla ja laskemalla viruspesäkkeiden määrä laimennossarjasta (katso luku 2.3).

Viruksen puhdistamista varten virusta kasvatettiin myös SW13-soluissa, joiden tiedetään infektoituvan keltakuumeviruksella. Viruksen p2-kasvatusta varten SW13-solut siirrettiin kasvamaan infektiota edeltävänä päivänä T75-pulloon ja solujen annettiin kasvaa yön yli noin 70 % konfluenssiin (5×10^6 solua/plo). Solujen kasvatusmediumin tilalle vaihdettiin MEM-infektiomediumiin (2 % FCS, 1 % NEAA, 1 % SP, 1x penisilliini/streptomysiini) alkuperäisestä p1-viruskasvatuksesta valmistettu viruslaimennos (MOI 0,1) ja soluja inkuboitiin 43 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa. Inkubaation jälkeen sytopaattinen vaikutus havainnoitiin mikroskoopilla ja solujen kasvatusmedium kerättiin, sentrifugoitiin (1000 x g 10 min) ja virukset sisältävä supernatantti kerättiin talteen. Virusten pitoisuus selvitettiin titraamalla (luku 2.3).

Jotta virusta saatiin riittävästi puhdistamista ja jatkotutkimuksia varten, SW13-soluissa kasvatetulla p2-viruserällä ($4,5 \times 10^6$ pfu/ml) infektoitiin suuri määrä SW13-soluja (12 kpl T175-kasvatuspulloa) ja soluissa tuotettu virus konsentroidiin mahdollisimman korkean viruspitoisuuden saavuttamiseksi (kuva 5). Infektiota edeltävänä päivänä SW13-solut jaettiin T175-pulloihin (5×10^6 solua/pullo, 12 pulloa) ja annettiin kasvaa yön yli noin 60 % konfluenssiin. Kasvatusmedium poistettiin ja solut infektoitiin SW13-infektiomediumiin valmistetulla viruslaimennoksella (MOI 0,01). Soluja inkuboitiin 48 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa, minkä jälkeen sytopaattinen vaikutus havainnointiin mikroskoopilla.



Kuva 5. 17D-keltakuumeviruksen kasvatuksen ja puhdistuksen vaiheet. Korkean viruskonsentraation saamiseksi SW13-solut infektoitiin 17D-keltakuumeviruksella ja viruspitoinen supernatantti kerättiin talteen. Virus konsentroidiin PEG-saostuksella ja puhdistettiin 20 % sukroosin läpi. Kuva on tehty BioRenderillä (biorender.com).

Kasvatusmedium kerättiin kun 50 % soluista ilmensi tyypillisiä virusinfektion aiheuttamia mikroskooppisia muutoksia tai vaurioita. Medium sentrifugoitiin (3000 x g 10 min +4 °C) ja virusta sisältävä supernatantti pipetoitiin falcon-putkiin, joihin lisättiin TNE-puskuriin (20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8, ultrapuhdas H₂O) valmistettua 30 % PEG (engl. polyethyleneglycol, PEG) -liuosta siten, että lopullinen PEG-pitoisuus putkissa oli 5 %. Putket

olivat ravistelijassa yön yli +4 °C:ssa, minkä jälkeen putket sentrifugoitiin (4122 x g 2 h +4 °C). Viruspelletit resuspensoitiin kylmään TNE-puskuriin ja suspensiot kerättiin yhteen putkeen (lopputilavuus 12 ml). Virukset puhdistettiin ultrasentrifugaatiolla. Ultrasentrifuugiputkiin lisättiin 0,5 ml 20 % sukroosi-liuosta (TNE-puskurissa), minkä päälle pipetoitiin varovasti 4 ml virussuspensiota. Putkien täyttämiseksi ja tasapainottamiseksi putkiin lisättiin vielä noin 0,5 ml TNE-puskuria ja putket tasapainotettiin 0,01 g tarkkuudella, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin 2 h 35 000 rpm +4 °C:ssa (maksimikiihdytys, ei jarrutusta). Fuugauksen jälkeen supernatantti pipetoitiin varovasti pois ja viruspelletti resuspensoitiin TNE-puskuriin (100 µl). Puhdistetun viruksen titteri määritettiin plakkititrauksella (luku 2.3).

2.3 Plakkititraus

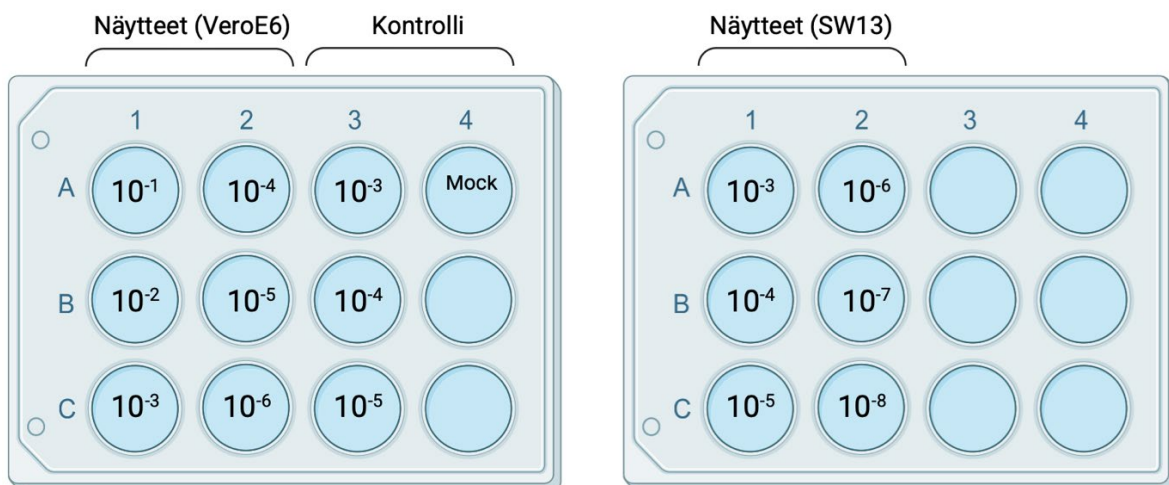
VeroE6- ja SW13-soluissa tuotettujen virusten pitoisuus eli titteri selvitettiin plakkititrauksella. Plakkititraus perustuu viruksen kykyyn infektoida solut ja muodostaa näkyviä, paljaita kohtia eli plakkeja konfluenttiin solukerrokseen. Virusinfektio johtaa isäntäsolun hajoamiseen eli llyysiin ja solusta vapautuvat virukset infektoivat myös viereisiä soluja muodostaen tiiviiseen solumattoon reiän eli plakin. Jokaisen plakin oletetaan olevan peräisin yhdestä alkuperäisestä infektiivisestä viruspartikkelista, koska käytetty karboksyyylimetyyliselluloosaseos, Avicel, rajoittaa viruksen leviämistä mediumin välityksellä, joten isäntäsolun hajoamisen jälkeen virus voi levitä vain lähimpiin soluihin, mikä johtaa selkeiden pyöreiden plakkien muodostumiseen. Plakit visualisoidaan yleensä värjäämällä elävät solut esimerkiksi kristallivioletilla, jolloin kuolleet solualueet eli plakit erottuvat kirkkaina kohtina. Plakkien määrä lasketaan ja näytteen viruskonsentraatio määritetään seuraavalla kaavalla:

$$\text{PFU/ml} = \frac{\text{plakkien lukumäärä}}{\text{Laimennoskerroin} \times \text{soluille lisätyn virusliuoksen määrä (ml)}} \quad (\text{Kaava 1})$$

Viruksen pitoisuus ilmoitetaan yksikkönä PFU/ml (engl. plaque forming units per milliliter).

Titrauksessa isäntäsoluina käytettiin VeroE6-soluja, jotka jaettiin titrausta edeltävänä päivänä 12-kuoppalevyille (450 000 solua/kuoppa). Tutkittavasta 17D-keltakuumevirusnäytteestä tehtiin DMEM-infektiomediumiin useita kymmenkertaisia laimennoksia, joita lisättiin soluille 100 tai 200 µl, ja virusten annettiin kiinnittyä soluihin ja infektoida ne (kuva 6). Koska SW13-soluissa kasvatetun viruksen ja puhdistetun viruksen titterin odotettiin olevan korkea, viruserästä tehtiin 10⁻¹- 10⁻⁸ laimennossarja. VeroE6-soluissa kasvatetusta viruksesta tehtiin 10⁻¹-

¹- 10⁻⁶ laimennokset. Ennen viruslaimennosten lisäämistä VeroE6-solujen kasvatusmedium poistettiin kuopilta. Kontrollina käytettiin 17D-viruserää (10⁻³- 10⁻⁵ laimennokset), jonka pitoisuus tunnettiin. Soluja inkuboitiin 1 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa, jonka aikana kuoppalevyä käännettiin varovasti muutaman kerran solujen kuivumisen estämiseksi. Inkubaation jälkeen soluille lisättiin 1 ml 2,4 % Avicel (Avicel® RC-591, FMC BioPolymer) - MEM (1:1) -liuosta, jossa oli 2 % FCS. Soluja inkuboitiin 5 päivää +37 °C:ssa ja 5 % CO₂ pitoisuudessa, minkä jälkeen solut fiksattiin 8 % formaldehydillä 30 minuuttia. Kuopat tyhjennettiin, pohjassa kiinni olevat solut pestiin PBS:llä ja solut värjättiin 1-2 min kristallivioletilla (4 % formaldehydi, 1 % MeOH, 20 % EtOH, 0,1 % kristallivioletti (Sigma)). Kristallivioletti poistettiin ja solut huuhdottiin vedellä ja annettiin kuivua ennen plakkien manuaalista laskemista.



Kuva 6. VeroE6- ja SW13-soluissa kasvatettujen viruserien plakkititraatio VeroE6-soluissa. Viruseristä valmistettiin useita kymmenkertaisia laimennoksia. Kontrollina käytettiin 17D-viruserää, josta tehtiin 10⁻³ -10⁻⁵ laimennokset ja jonka pitoisuus tunnettiin, sekä pelkkää infektiomediumia (mock). Kuva on tehty BioRenderillä (biorender.com).

2.4 Infektiokokeet

Ennen varsinaisia surrogaattiantigeeni-kompleksilla tehtäviä internalisaatiotutkimuksia varmistettiin, etteivät B-solut infektoidu pelkällä 17D-keltakuumeviruksella. Infektioissa käytettiin VeroE6-soluissa kasvatettua virusta (katso luku 2.2), josta tehtiin 1 x 10⁶ pfu/ml viruslaimennos RPMI 1640- ja DMEM-infektiomediumiin (RPMI 1640/DMEM, 2 % FCS, 2 mM L-glutamiini, 1x penisilliini/streptomysiini). Raji D1.3- ja Ramos-solut (600 000 solua/näyte) resuspensoitiin 600 µl RPMI 1640-mediumiin tehtyyn viruslaimennokseen (MOI 1). Osa soluista resuspensoitiin pelkkään RPMI 1640-infektiomediumiin (mock kontrolli).

Positiivisena kontrollina käytettiin VeroE6-soluja, joiden tiedetään infektoituvan hyvin 17D-keltakuumeviruksella. VeroE6-soluille, jotka oli infektiota edeltävänä päivänä jaettu 24-kuoppalevyille laitettun peitinlasin (13 mm) päälle (125 000 solua/kuoppa), lisättiin 150 µl DMEM-infektiomediumiin tehtyä viruslaimennosta (MOI 1) tai pelkkää DMEM-infektiomediumia (mock kontrolli).

Viruksen annettiin kiinnittyä soluihin 1 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa, minkä jälkeen supernatantti (ns. inputmedium) kerättiin talteen sekä B-soluista että VeroE6-soluista. Kerätyt supernatantit puhdistettiin (450 x g 5 min) ja näytteet pakastettiin -80°C:een. B-solut pestiin PBS:llä (engl. phosphate buffered saline, fosfaattipuskuroitu suolaliuos), sentrifugoitiin (450 x g 5 min) ja resuspensoitiin 400 µl RPMI-infektiomediumia, minkä jälkeen solut jaettiin 24-kuoppalevyille (100 µl/kuoppa) ja niille lisättiin RPMI-infektiomediumia (400 µl/kuoppa). Myös VeroE6-solut pestiin PBS:llä, jonka jälkeen soluille lisättiin 500 µl DMEM-infektiomediumia. Soluja inkuboitiin 24 h, 48 h ja 96 h. Supernatantit kerättiin talteen kustakin aikapisteestä, ja niiden viruskonsentraatio määritettiin plakkititrauksella (luku 2.3). Aikapisteistä 48 h ja 96 h valmistettiin myös näytteet immunofluoresenssivärjäystä varten, mikä on kuvattu seuraavassa luvussa.

2.4.1 Immunofluoresenssivärjäys ja konfokaalimikroskopia

Ennen värjäystä infektiokokeen solut pestiin PBS:llä. B-solut resuspensoitiin 0.5% FCS-PBS:ään (1 x 10⁶ solua/ml) ja lisättiin naudan plasman fibronektiinillä (4 µg/ml, Sigma) päällystettyyn soluviljelykammioon (12-kuoppainen mikroskooppilasi, Fisher Scientific) 25 000 solua/kuoppa. Solujen annettiin kiinnittyä fibronektiiniin 30 min +37 °C:ssa. Kammiot oli aikaisemmin käsitelty fibronektiinilaimennoksella (4 µg/ml PBS:ssä, 20 µl/kuoppa), jonka annettiin kiinnittyä lasiin 45 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen kuopat pestiin kaksi kertaa PBS:llä.

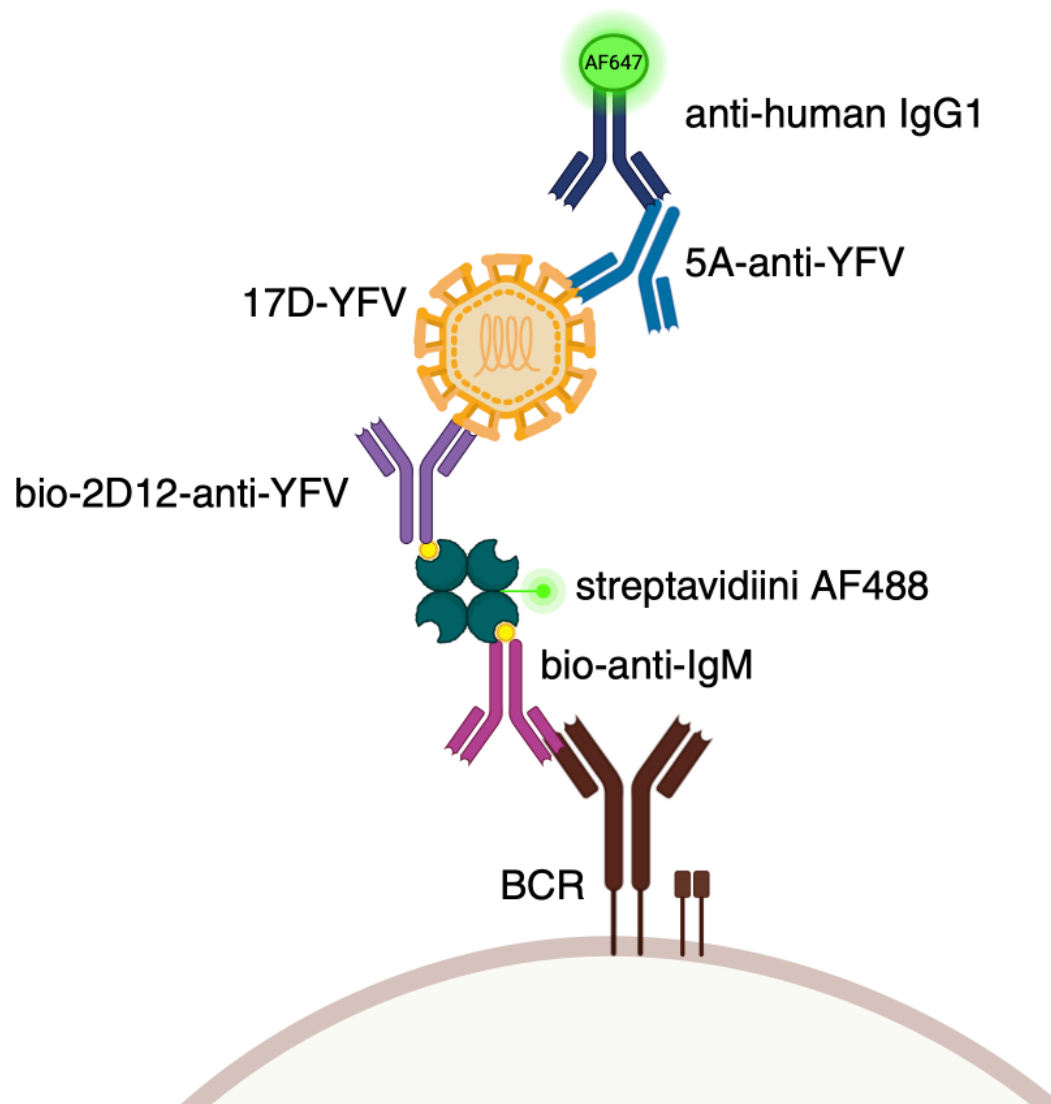
B-solut ja 24-kuoppalevyllä peitinlasilla kasvaneet VeroE6-solut fiksattiin 4 % paraformaldehydillä 30 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen solut pestiin PBS:llä ja permeabilisoitiin 30 min huoneenlämmössä 0,1 % saponiinilla (Calbiochem), joka oli valmistettu 2 % naudan seerumista eristettyyn albumiiniin (engl. bovine serum albumin, BSA). Solut värjättiin human-anti-YFV primaarivasta-aineella (5A, 3 µg/ml permeabilisaatiopuskurissa) (saatu Anne Krugiltä, Ludwig Maximilians University, Saksa), jonka annettiin sitoutua yön yli +4 °C:ssa valolta suojattuna. Reagoimaton primaarivasta-aine

pestiin pois permeabilisaatiopuskurilla. Primaarivasta-aine tunnistettiin anti-human IgG1 Alexa Fluor 647 sekundaarivasta-aineella (1:200 permeabilisaatiopuskurissa) (Invitrogen) ja solujen aktiinisäikeet värjättiin Alexa Fluor 555 Phalloidinilla (1:200) (Life Technologies A34055). Sekundaarivasta-aineen ja falloidiinin annettiin sitoutua 1 h huoneenlämmössä, minkä jälkeen sitoutumaton sekundaarivasta-aine ja falloidiini pestiin pois permeabilisaatiopuskurilla kahdesti. Kammiolasin (B-solut) ja peitinlasin (VeroE6-solut) reunat kuivattiin kevyesti käsipaperilla, minkä jälkeen petausaine (Fluoromount-G with DAPI, Invitrogen) pipetoitiin solujen päälle ja peitinlasi asetettiin varovasti kammiolasin päälle ja peitinlasi käännettiin mikroskooppilasin (Superfrost Plus Microscope Slides, Fisher Scientific) päälle. Näytteiden annettiin kuivua huoneenlämmössä 2 h, minkä jälkeen ne säilytettiin +4 °C:ssa.

Solut kuvattiin Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla 63X/1.40 öljyobjektiivilla Power HyD-detektorilla (Leica Microsystems). Fluoroforit viritettiin 405 nm diodilaserilla sekä valkoisen valon laserilla, joka oli viritetty aallonpituuksille 553 nm ja 653 nm. Kuvat käsiteltiin ImageJ2-ohjelmalla (NIH).

2.5 17D-surrogaattiantigeeni-kompleksin valmistaminen

Koska 17D-keltakuumevirus ei pysty infektoimaan Raji tai Ramos B-soluja, viruksen sitoutumisen ja internalisaation tutkimiseksi valmistettiin surrogaattiantigeeni-kompleksi, jonka B-solut kykenevät tunnistamaan B-solureseptorilla (kuva 7) ja mahdollisesti internalisoimaan. Kompleksi rakentuu useasta eri osasta, minkä vuoksi osien erillinen testaaminen ja optimointi oli oleellista ennen kokonaisen kompleksin käyttöä.



Kuva 7. Surrogaattiantigeeni-kompleksi B-solureseptoriin kiinnittyneenä. Viruksen internalisaation tutkimiseksi valmistettiin surrogaattiantigeeni-kompleksi, jolla voidaan seurata viruksen internalisaatiota ja solun sisäistä kuljetusta B-soluissa. B-solureseptoriin (BCR) kiinnittynyt biotinyloitu anti-IgM-vasta-aine (bio-anti-IgM) sitoutuu spesifisesti BCR:ään ja aktivoi B-solun. Biotiiniin sidottiin Alexa Fluor 488-fluoresenssileimattu streptavidiini (streptavidiini AF488), joka liittää yhteen bio-anti-IgM-vasta-aineen ja biotinyloidun 2D12-anti-keltakuumevirusvasta-aineen (bio-2D12-anti-YFV). 2D12-vasta-aineen lisäksi kompleksiin liitettiin 5A-anti-keltakuumevirusvasta-aine (5A-anti-YFV), jonka havaitsemiseen käytettiin fluoresenssileimattua sekundaarivasta-ainetta (anti-human IgG1), jonka avulla viruskompleksi pystytään paikantamaan soluissa. Kuva on tehty BioRenderillä (biorender.com).

2.5.1 Vasta-ainetesti

Kahden keltakuumevirusvasta-aineen (human anti-YFV 5A ja mouse anti-YFV 2D12 (Biorad)) kykyä tunnistaa ja sitoutua 17D-keltakuumevirukseen testattiin värjäämällä infektoidut VeroE6-solut. 5A-vasta-aineen toimivuus testattiin jo infektiokokeissa, joten sitä käytettiin kontrollina 2D12-vasta-aineen testauksessa. Solut oli jaettu infektiota edeltävänä päivänä 24-kuoppalevyllä oleville peitinlaseille ($0,8 \times 10^5$ solua/kuoppa) (13mm). VeroE6-solut infektoitiin VeroE6-soluissa aiemmin kasvatetulla viruksella (katso kohta 2.2). DMEM-infektiomediumiin valmistettiin $0,5 \times 10^6$ pfu/ml viruslaimennos ja puolet soluista infektoitiin 200 μ l viruslaimennosta (MOI 1). Osalle soluista lisättiin pelkästään infektiomediumia (mock kontrolli). Viruksen annettiin kiinnittyä 1 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa, minkä jälkeen solut pestiin PBS:llä. Soluille lisättiin infektiomediumia (500 μ l) ja soluja kasvatettiin 48 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa. Solut pestiin PBS:llä ja näytteet värjättiin kuten aikaisemmin esitetty luvussa 2.4.1.

5A-anti-YFV vasta-ainevärjäys tehtiin kuten 2.4.1 osiossa kerrottu. 2D12-primaarivasta-aine (3 μ g/ml permeabilisaatiopuskurissa (Bio-Rad, 9801-8006)) tunnistettiin goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 546 (1:500) (Invitrogen, A-11030) sekundaarivasta-aineella ja solujen aktiinisäikeet värjättiin Alexa Fluor 647 Phalloidiinilla (1:100) (Life Technologies A34055). Solut kuvattiin Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla 63X/1.40 öljyobjektiivilla Power HyD-detektorilla (Leica Microsystems). Fluoroforit viritettiin 405 nm diodilaserilla sekä valkoisen valon laserilla, joka oli viritetty aallonpituuksille 491 nm, 553 nm ja 653 nm. Kuvat käsiteltiin ImageJ2-ohjelmalla (NIH).

2.5.2 Vasta-aineen biotinylaatio ja sen toimivuuden testaus

Jotta keltakuumeviruksen tunnistava vasta-aine saatiin osaksi surrogaattiantigeeni-kompleksia, eli sitoutumaan streptavidiniin, se piti biotinyloida. 2D12-vasta-aine biotinyloitiin kaupallisella Ez-link-Sulfo-NHS-LC-LC-biotinylaatiokitillä (Thermo Scientific) valmistajan ohjeen mukaan. 2D12-vasta-aine (25 μ l (0,5 mg)) liuotettiin PBS:ään (471,7 μ l) ja liuokseen lisättiin 10mM (3,3 μ l) biotiinia 10-kertainen molaarinen ylimäärä. Seosta inkuboitiin 30 min huoneenlämmössä. Reagoimaton biotiini poistettiin Zeba™ Spin Desalting pylväällä (2 ml, Thermo Scientific). Biotinyloidun vasta-aineen konsentraatio mitattiin absorbanssiin perustuvalla BCA Protein Assay Kitillä (Thermo Scientific, 23227) valmistajan ohjeen

mukaisesti. Biotinyloidun 2D12-vasta-aineen sitoutuminen virukseen varmistettiin värjäämällä infektoidut VeroE6-solut biotinyloidulla vasta-aineella kuten osiossa 2.5.1.

Biotinyloidun 2D12-vasta-aineen sitoutuminen streptavidiniin varmistettiin streptavidiinilla päällystetyillä helmillä (4.95 μm , Immuno Diagnostics/Bangs Lab, CP01006) ja virtaussytometrillä. V-pohjaiselle 96-kuoppalevyllä pipetoitiin 1 μl helmiä (139 000 helmeä) ja 100 μl biotinyloitua 2D12-vasta-ainelaimennosta (0,1-10 $\mu\text{g/ml}$), ja vasta-aineen annettiin sitoutua helmiin 30 min huoneenlämmössä. Sitoutumaton vasta-aine pestiin pois PBS:llä, johon oli lisätty 2 % BSA ja näytteet sentrifugoitiin (1000 x g 3 min) ennen värjäystä. Helmet värjättiin 20 min valolta suojattuna fluoresenssileimatulla Alexa Fluor 488 streptavidiinilla (1:1000) (Invitrogen, S32354) ja 2D12-vasta-aineen tunnistavalla anti-mouse IgG Alexa Fluor 546 sekundaarivasta-aineella (1:200) (Invitrogen, A11030). Helmet pestiin kahdesti 2 % BSA/PBS:llä (1000 x g 3 min) ja resuspensoitiin 120 μl PBS:ää. Näytteet ajettiin LSRFortessa-virtaussytometrillä (BD Bioscience) ja data analysoitiin FlowJo-ohjelmalla (versio 10, BD Bioscience).

2.5.3 B-solujen aktivaatiotesti

Surrogaattiantigeeni-kompleksin B-solureseptoriin sitoutuvan biotinyloidun anti-IgM-vasta-aineen toiminnallisuus testattiin aktivaatiotestillä. Biotinyloitu anti-IgM-vasta-aine sitoutuu B-solureseptoriin ja aktivoi B-solun internalisoimaan B-solureseptoriin kiinnittyneen anti-IgM-vasta-aineen. Ennen reseptoriin sitoutumista, anti-IgM-vasta-aineeseen liitettiin fluoresenssileimattu streptavidini, jotta voitiin seurata, miten vasta-aine siirtyy solun pinnalta sen sisälle.

Raji D1.3-solut ($1,2 \times 10^5$ solua) aktivoitiin 10 $\mu\text{g/ml}$ goat full IgG anti-human IgM-BIOT-vasta-aineella (SouthernBiotech) ja vasta-aineen annettiin sitoutua jäällä 10 min. Inkubaatio jäällä esti anti-IgM:n ennenaikaisen internalisaation ennen streptavidinin sitoutumista. Inkubaation jälkeen sitoutumaton vasta-aine pestiin jääkylmällä PBS:llä. Solut resuspensoitiin 100 μl (1 $\mu\text{g/ml}$) Alexa Fluor 488 streptavidinia (Invitrogen, S32354) ja inkuboitiin jäällä 10 min. Reagoimaton streptavidini pestiin pois PBS:llä. Solut resuspensoitiin 80 μl 0.5 % FCS/PBS:ään ja suspensiota (30 000 solua/20 μl kuoppa) pipetoitiin fibronektiinillä (4 $\mu\text{g/ml}$ PBS:ssä) päällystetyille mikroskooppilasille. Anti-IgM:n annettiin internalisoitua 10 min ja 45 min +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa. Osa soluista jätettiin aktivoimatta ja näitä soluja käytettiin kontrollisoluina.

Solut fiksattiin 4 % paraformaldehydillä 15 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen solut pestiin PBS:llä ja permeabilisoitiin 30 min huoneenlämmössä 0,1 % saponiinilla (Calbiochem), joka oli valmistettu 2 % BSA:han. Solut värjättiin rabbit anti-LAMP1 primaarivasta-aineella (1:200 permeabilisaatiopuskurissa) (Lysosome Marker, Abcam 1089375-7), jonka annettiin sitoutua yön yli +4 °C:ssa valolta suojattuna. Reagoimaton primaarivasta-aine pestiin pois permeabilisaatiopuskurilla. Primaarivasta-aine tunnistettiin donkey-anti-rabbit AF555 IgG sekundaarivasta-aineella (1:500 permeabilisaatiopuskurissa) (Invitrogen, A31572). Sekundaarivasta-ainetta inkuboitiin näytteillä 1 h huoneenlämmössä, minkä jälkeen sitoutumaton sekundaarivasta-aine pestiin pois permeabilisaatiopuskurilla (kaksi kertaa). Mikroskooppilasien reunat kuivattiin kevyesti käsipaperilla, minkä jälkeen petausaine (Fluoromount-G with DAPI, Invitrogen) pipetoitiin solujen päälle ja peitinlasi laitettiin varovasti näytteen päälle. Näytteiden annettiin kuivua huoneenlämmössä 2 h ja siirrettiin +4 °C. Näytteet kuvattiin kuten osiossa 2.5.1. Fluoroforit viritettiin 405 nm diodilaserilla sekä valkoisen valon laserilla, joka oli viritetty aallonpituuksille 491 nm ja 553 nm.

2.5.4 Endosomivärjäys

Surrogaattiantigeeni-kompleksin internalisaatiota oli tarkoitus seurata aikaisiin ja myöhäisiin vesikkeleihin sekä lysosomeihin sitoutuvilla vasta-aineilla (taulukko 1). Vasta-aineiden toimivuus testattiin Raji-soluissa (wt). Solut resuspensoitiin 0.5 % FCS/PBS:ään ja pipetoitiin fibronektiinillä (4 µg/ml PBS:ssä) päällystetyille mikroskooppilasille (30 000 solua/20 µl kuoppa) ja annettiin kiinnittyä 30 min +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa. Solut fiksattiin 4 % PFA:lla ja inkuboitiin 15 min huoneenlämmössä. Solut pestiin PBS:llä ja permeabilisoitiin permeabilisaatiopuskurilla 30 min huoneenlämmössä. Vesikkelit värjättiin primaarivasta-aineilla (taulukko 1), joiden annettiin sitoutua yön yli +4 °C valolta suojattuna. Sitoutumaton primaarivasta-aine pestiin pois ja solut värjättiin fluoresenssileimatulla sekundaarivasta-aineella (taulukko 1) ja Alexa Fluor 555 Phalloidiinilla (Life Technologies A34055) (1:200) 1 h huoneenlämmössä. Sitoutumaton sekundaarivasta-aine ja falloidiini pestiin pois permeabilisaatiopuskurilla kahdesti. Mikroskooppilasien reunat kuivattiin kevyesti käsipaperilla, minkä jälkeen petausaine (Fluoromount-G with DAPI, Invitrogen) pipetoitiin solujen päälle ja peitinlasi laitettiin varovasti näytteen päälle. Näytteiden annettiin kuivua huoneenlämmössä 2 h, minkä jälkeen ne säilytettiin +4 °C:ssa. Näytteet kuvattiin kuten osiossa 2.5.1. Fluoroforit viritettiin 405 nm diodilaserilla sekä valkoisen valon laserilla, joka oli viritetty aallonpituuksille 553 nm ja 653 nm.

Taulukko 1. Endosomivärjäyksissä käytetyt vasta-aineet

Primaarivasta-aine	Laimennos	Sekundaarivasta-aine	Laimennos
Early rabbit anti-Rab5 (C8B1), #3547, CellSig Tech	1:200	goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 647, Thermo, 2mg/ml	1:500
Late rabbit anti-Rab9, (D22A6), #5133, CellSig Tech	1:200	goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 647, Thermo, 2mg/ml	1:500
Lysosomal rabbit anti-LAMP1 Lysosomal Marker, Abcam	1:200	goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 647, Thermo, 2mg/ml	1:500

2.6 Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutuminen B-solureseptoriin ja sen internalisaatio

Surrogaattiantigeeni-kompleksin (kuva 7) sitoutumista B-solureseptoriin tutkittiin lisäämällä Raji D1.3-soluille ensin biotinyloitu anti-IgM-vasta-aine ja fluoresenssileimattu streptavidini kuten esitetty edellä osiossa 2.5.3. Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutumisen tutkimisessa käytettiin alkuperäistä p1 17D-keltakuumeviruskantaa ($1,3 \times 10^8$ pfu/ml). Streptavidinin sitoutumisen jälkeen solut pestiin PBS:llä ja ne resuspensoitiin biotinyloituun 2D12-vasta-ainelaimennokseen (Bio-2D12) (1 µg), jota oli inkuboitu 17D-YFV:n (400,000 pfu) kanssa 1 h +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa. Soluja inkuboitin Bio-2D12-17D-YFV liuoksessa (MOI 10) 30 min jäällä. Osalle soluista lisättiin pelkästään biotinyloitu 2D12-vasta-aine ilman virusta, ja näitä soluja käytettiin kontrollisoluina. Inkubaation jälkeen solut pestiin ja resuspensoitiin 0,5 % FCS/PBS:ään ja pipetoitiin fibronektiinillä (4 µg/ml PBS:ssä) päällystetyille mikroskooppilasille (20 000 solua/20 µl kuoppa) ja annettiin kiinnittyä 30 min jäällä. Solut pestiin PBS:llä ja näytteet värjättiin human 5A-anti-YFV-primaarivasta-aineella ja anti-human IgG1 Alexa Fluor 647 sekundaarivasta-aineella sekä Alexa Fluor 555 Phalloidiinilla kuten 2.4.1 osiossa kerrottu. Näytteet kuvattiin kuten osiossa 2.5.1.

Viruksen internalisaation tutkimiseksi testattiin myös biotinyloidun 2D12-vasta-aineen lisäämistä soluille ennen viruksen lisäämistä. Viruksen internalisaation tutkimisessa käytettiin SW13-soluista aiemmin eristettyä ja puhdistettua viruserää (1×10^9 pfu/ml). Raji D1.3-soluille lisättiin ensin biotinyloitu anti-IgM-vasta-aine ja fluoresenssileimattu streptavidini kuten esitetty edellä osiossa 2.5.3, minkä jälkeen solut resuspensoitiin Bio-2D12-vasta-

ainelaimennokseen (10 µg/ml), ja vasta-aineen annettiin sitoutua soluihin 10 min jäillä. Inkubaation jälkeen solut pestiin PBS:llä ja resuspensoitettiin 0,5 % FCS/PBS:ään valmistettuun viruslaimennokseen (MOI 50). Viruksen annettiin sitoutua soluihin jäillä 1 h. Inkubaation jälkeen solut pestiin PBS:llä ja resuspensoitettiin 0,5 % FCS/PBS:ään ja pipetoitiin fibronektiinillä (4 µg/ml PBS:ssä) päällystetyille mikroskooppilasille (25 000 solua/20 µl kuoppa). Soluja inkuboitettiin 10 min ja 45 min +37 °C:ssa 5 % CO₂ pitoisuudessa, jonka jälkeen solut fiksattiin 30 min 4 % PFA:lla. Solut pestiin PBS:llä ja näytteet värjättiin 5A-anti-YFV-primaarivasta-aineella ja anti-human IgG1 Alexa Fluor 647 sekundaarivasta-aineella kuten edellä. Solut kuvattiin Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla 63X/1.40 öljyobjektiivilla (Leica Microsystems) kuten osiossa 2.5.1. Kuvat käsiteltiin ImageJ2-ohjelmalla (NIH).

2.7 SDS-PAGE

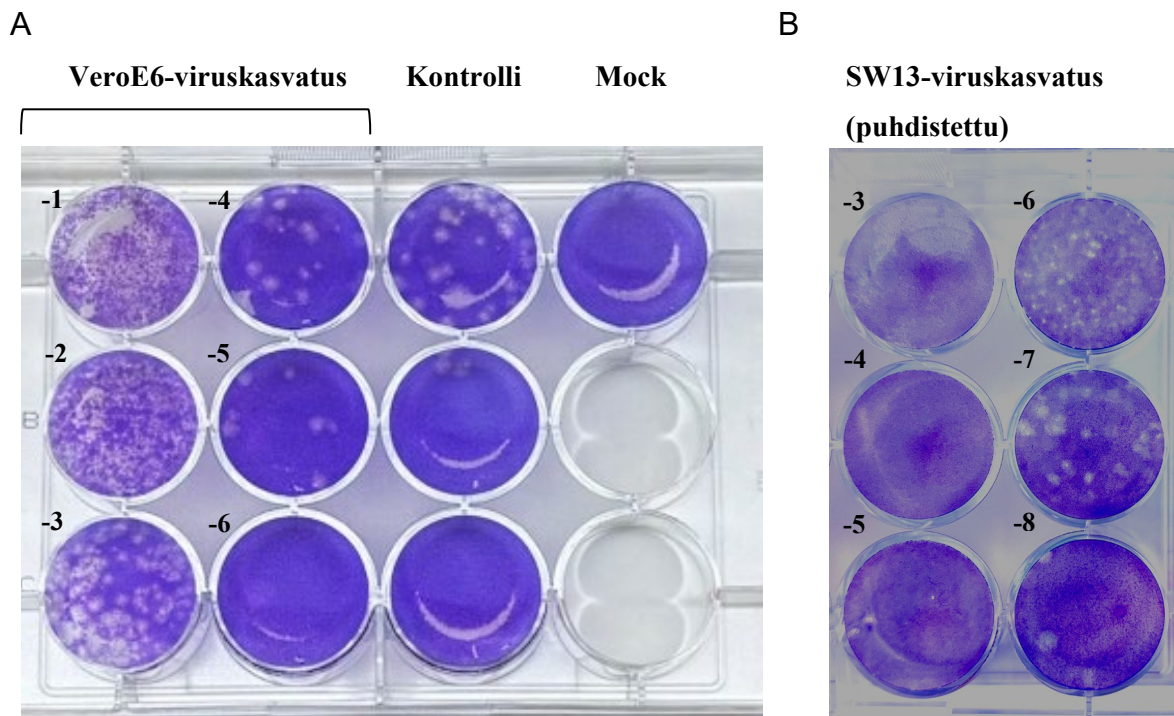
Viruksen internalisaatiota päätettiin kokeilla myös yksinkertaistamalla surrogaattiantigeeni-kompleksi jättämällä biotinyloitu 2D12-vasta-aine pois kompleksista ja biotinyloimalla 17D-keltakuumevirus, jolloin se sitoutuisi surrogaattiantigeeni-kompleksissa suoraan streptavidiniin. Virus biotinyloitiin viruksen E-proteiinin määrän perusteella.

Viruksen E-proteiinin määrä selvitettiin SDS-PAGE-geelielektroforeesilla. SW13-soluissa kasvatettu ja puhdistettu 17D-keltakuumevirus laimennettiin Laemmli-puskuriin (Biorad) (6,8 x 10⁸ pfu/ml) ja pelkistettiin joko 50 mM ditioreitolilla (DTT) (Thermo Scientific) tai 5 % β-merkaptoletanolilla (Thermo Scientific). Virusproteiinit denaturoitiin kuumentamalla näytteitä +95 °C:ssa 5 min, minkä jälkeen näytteet sonikoitiin ammesokinaattorilla (Bioruptor[®] Plus) korkeataajuisilla frekvensseillä (5 kertaa, 30 sek/kerta). Virusnäytteet (10 µl, 5 µl, 2,5 µl per kaivo), BSA-standardit (0,8 µg, 0,4 µg, 0,2 µg per kaivo) ja molekyylipainomarkkeri (ProteinTech PL00001) (3 µl/kaivo) pipetoitiin 10 % Mini-PROTEAN TGX SDS-PAGE-geeliin (Bio-Rad) ja näytteitä ajettiin geelillä Laemmli-puskurissa 10 min 100 V ja 30 min 150 V jännitteellä. Ajon jälkeen geeli värjättiin PageBlue-värillä (Thermo Scientific). Ennen PageBlue-väriliuoksen lisäämistä geeli huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä. Geeli inkuboitettiin väriliuoksessa yön yli huoneenlämmössä, huuhdeltiin ultrapuhtaalla vedellä ja kuvattiin ChemiDoc-laitteella (Biorad). E-proteiinin pitoisuus määritettiin geeliltä näytteiden intensiteetin perusteella (ImageJ2, versio 2.9.0).

3 TULOKSET

3.1 Viruskasvatusten titteri

Työssä kasvatettiin 17D-YFV-viruserät VeroE6- ja SW13-soluissa infektiokokeita ja surrogaattiantigeeni-kompleksin kokoamista varten. Kuvassa 8 on esitetty VeroE6-soluissa kasvatetun ja SW13-soluissa kasvatetun ja puhdistetun viruksen plakkititraus eli viruksen aiheuttaman sytopaattisen efektin visuaalinen havainnointi. Plakkititrauksen perusteella VeroE6-soluissa kasvatetun viruksen konsentraatio oli $1,4 \times 10^6$ pfu/ml (kuva 8A). SW13-soluissa kasvatetun viruksen konsentraatio oli ennen puhdistusta $4,5 \times 10^6$ pfu/ml ja puhdistuksen jälkeen viruksen konsentraatio oli 1×10^9 pfu/ml (kuva 8B) eli yli 200-kertainen virustitteri verrattuna solukasvatukseen. Tulos viittaa siihen, että sekä VeroE6- että SW13-solut soveltuvat 17D-YFV-viruskannan monistamiseen, ja viruksen konsentroida onnistuu käytetyllä puhdistusprotokollalla.

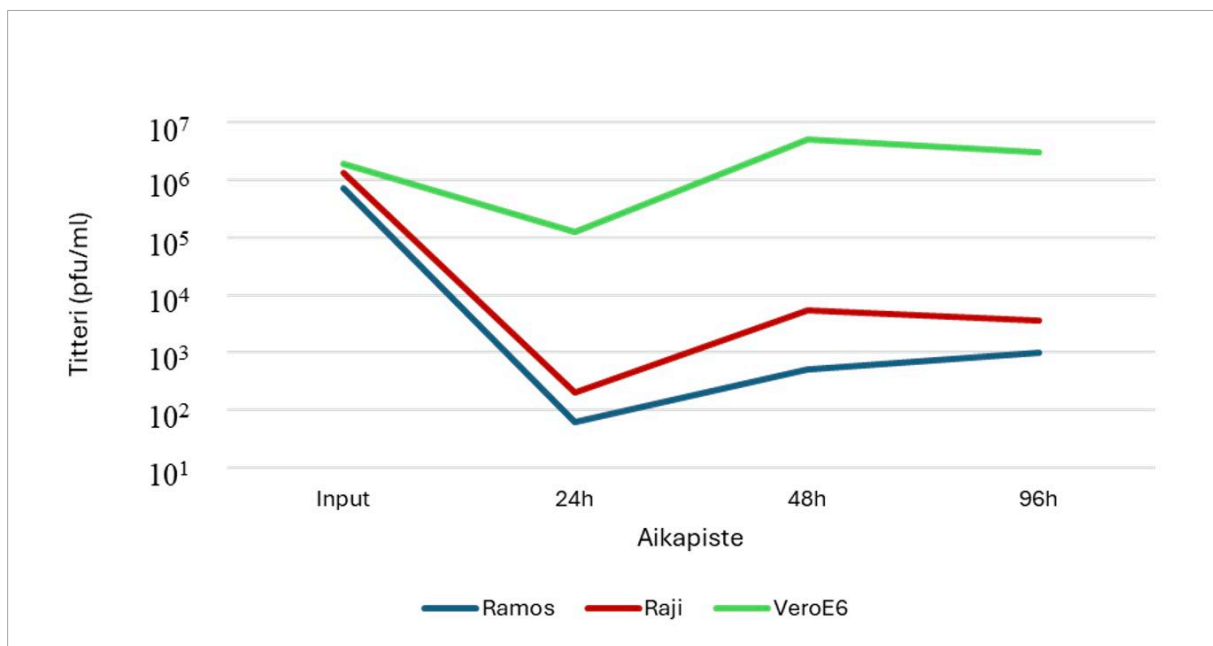


Kuva 8. VeroE6- ja SW13-soluissa kasvatetun viruksen plakkititraus. Konfluentit VeroE6-solut infektoitiin VeroE6-soluissa (vasemmalla) kasvatetulla ja SW13-soluissa (oikealla) kasvatetulla ja puhdistetulla viruserällä ja värjättiin kristallivioletilla. Viruksen muodostamat plakit laskettiin laimennoksista, joissa plakkien määrä oli luotettavasti laskettavissa (VeroE6-viruskasvatus: 10^{-4} -laimennos; SW13-viruskasvatus: 10^{-7} -laimennos) ja viruksen konsentraatio laskettiin sivulla 23 esitetyllä kaavalla. VeroE6-soluissa kasvatetun viruksen konsentraatio oli $1,4 \times 10^6$ pfu/ml ja SW13-soluissa kasvatetun ja puhdistetun viruksen 1×10^9 pfu/ml.

3.2 17D-keltakuumevirus ei infektoi B-soluja

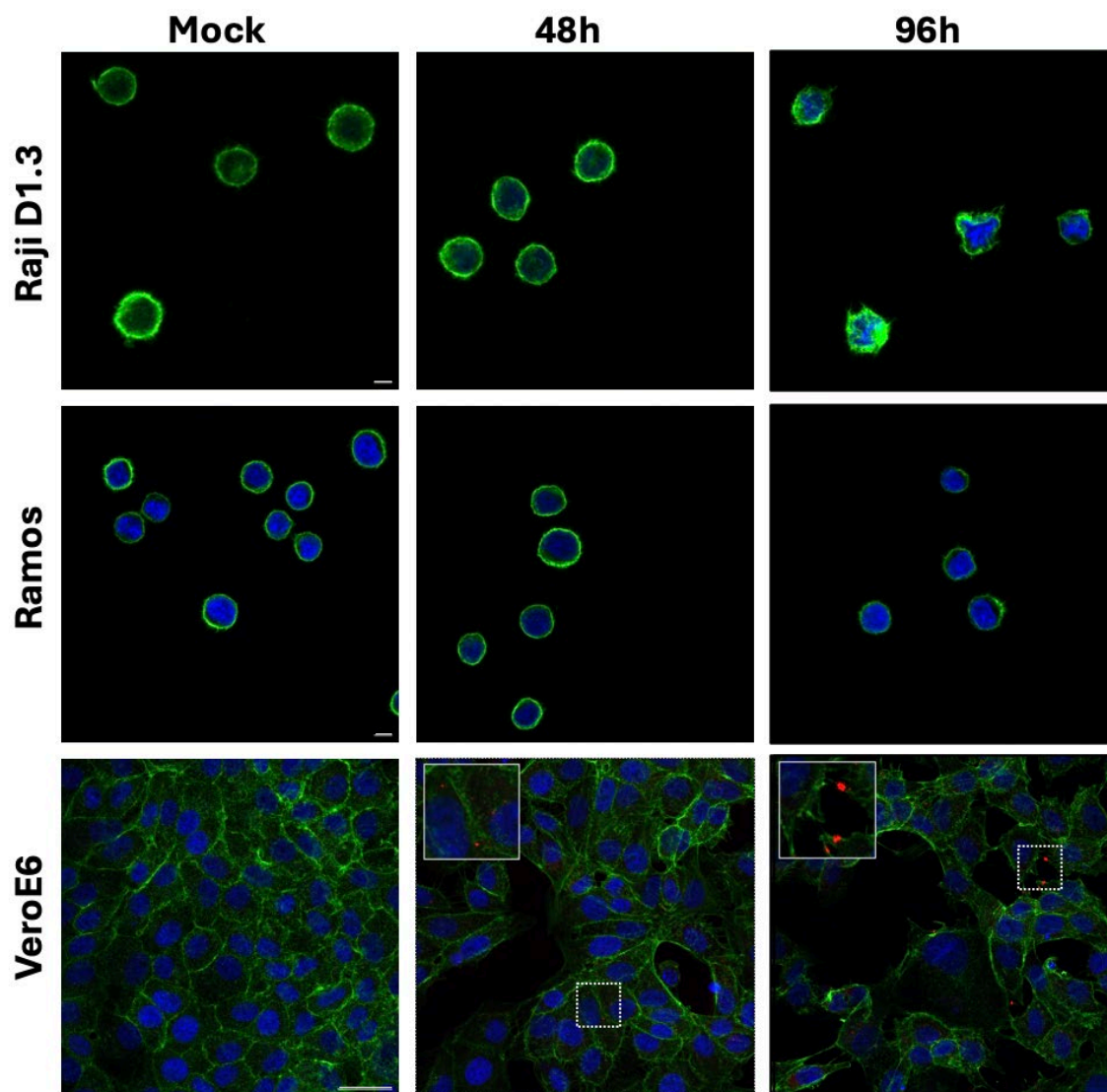
Ennen surrogaattiantigeeni-kompleksilla tehtäviä kokeita haluttiin varmistaa, ettei B-solut infektoidu 17D-YFV:llä. Raji D1.3, Ramos ja VeroE6 (positiivinen kontrolli) soluviljelmistä kerättiin 24, 48 ja 96 tunnin kuluttua 17D-keltakuumevirusinfektiosta supernatantit, jotka mahdollisesti sisälsivät infektiivisiä viruspartikkeleita. Näitä supernatantteja käytettiin VeroE6-soluilla tehdyssä plakkititrauksessa.

VeroE6-soluilla tehdyssä virustitterianalysissä B-soluilta kerättyjen kasvatusmediumien (24-96 h) virustitteri oli huomattavasti alhaisempi kuin VeroE6-solujen titteri, mikä viittaa siihen, ettei 17D-YFV-rokotekanta ollut replikoitunut tehokkaasti Raji- tai Ramos-soluissa (kuva 9). Titraustulokset ovat vertailukelpoisia, sillä kuvassa esitettyssä input-aikapisteessä titrauksessa käytetyille VeroE6-soluille lisätyn viruksen pitoisuus on kaikissa solulinjoissa lähes sama.



Kuva 9. Raji D1.3- Ramos- ja VeroE6-soluilta kerättyjen kasvatusmediumien virustitterin muutos ajan funktiona. 17D-keltakuumeviruksella infektoiduilta soluilta kerättyjen kasvatusmediumien (24-96 h) infektiivisen viruksen määrä määritettiin plakkititrauksella. B-soluilta kerättyjen kasvatusmediumien titteri oli huomattavasti alhaisempi VeroE6-soluihin verrattuna.

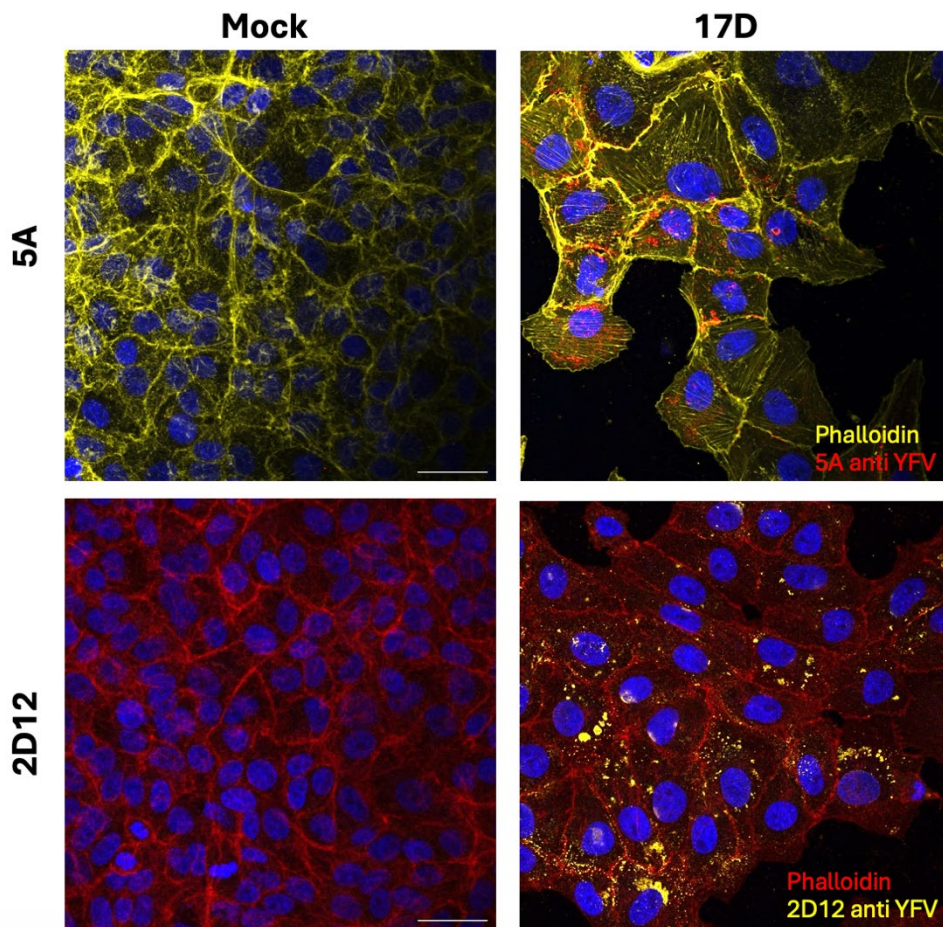
Titraustulos varmistettiin lisäksi immunofluoresenssimikroskopiolla värjäämällä infektoidut solut (48 ja 96 tunnin jälkeen infektiosta) 5A-keltakuumevirusvasta-aineella. Kuvasta 10 nähdään, ettei virus ole infektoinut B-soluja. VeroE6-soluissa (positiivinen kontrolli) puolestaan odotetusti havaittiin 5A-anti-keltakuumevirusvasta-aineen (punainen) sitoutuminen 17D-keltakuumevirukseen. Vasemmalla esitetyt infektoimattomat solut (mock) eivät sitoneet vasta-ainetta. Immunofluoresenssivärjäyksellä saadut tulokset tukevat näkemystä siitä, etteivät Raji D1.3 ja Ramos-solut infektoitu herkästi 17D-YFV:llä ainakaan käytetyllä virusmäärällä.



Kuva 10. Raji D1.3-, Ramos- ja VeroE6-solujen värjäys virusvasta-aineella 48 ja 96 tuntia 17D-YFV-infektion jälkeen. Solut infektoitiin 17D-keltakuumeviruksella (MOI 1) ja värjättiin YFV:n tunnistavalla 5A-vasta-aineella ja AF647-fluoresenssileimatulla sekundaarivasta-aineella (punainen). Vasta-aineen sitoutuminen virukseen havaitaan VeroE6-soluissa molemmissa aikapisteissä, kun taas Raji- ja Ramos-soluissa sitoutumista ei havaita. Solujen aktiivisäikeet värjättiin Phalloidin AF555:lla (vihreä) ja tumat DAPI:lla (sininen). Kuvat on otettu monitasoskannauksena (Z-stack) Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla. Mittakaavajana 10 μm .

3.3 Anti-keltakuumevirusvasta-aineet 5A ja 2D12 tunnistavat keltakuumeviruksen

5A- ja 2D12-anti-keltakuumevirusvasta-aineiden kykyä tunnistaa ja sitoutua 17D-keltakuumevirukseen testattiin värjäämällä infektoidut VeroE6-solut vasta-aineilla. Kuvasta 11 nähdään, että molemmat virusvasta-aineet tunnistavat 17D-keltakuumeviruksen. Virukset ovat lokalisoituneet VeroE6-solujen sytoplasmaan ja perinukleaariseen alueelle, jossa virukset replikoituvat. Infektoiduissa soluissa havaitaan myös virusinfektoille tyypillinen sytopaattinen efekti, minkä seurauksena solut ovat pyörityneet ja osittain irronneet.

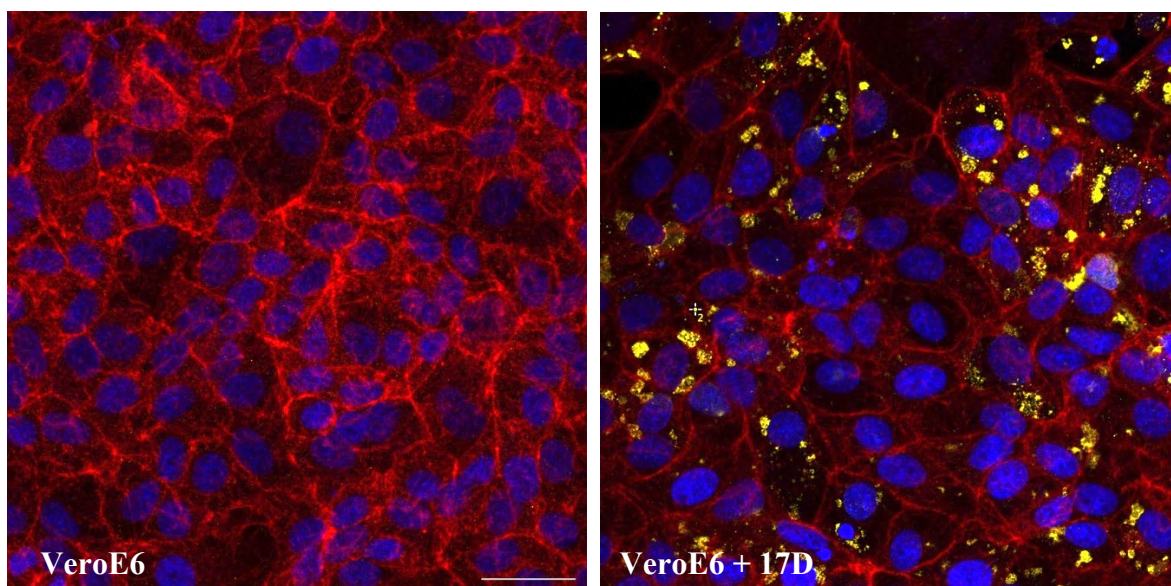


Kuva 11. 5A- ja 2D12-vasta-aineet sitoutuvat 17D-YFV:llä infektoiduihin VeroE6-soluihin. VeroE6-solut infektoitiin 17D-keltakuumeviruksella (oikealla) ja värjättiin 5A-vasta-aineella ja anti-human AF647 sekundaarivasta-aineella (ylempi, punainen), sekä 2D12-vasta-aineella ja anti-mouse AF546 sekundaarivasta-aineella (alempi, keltainen). Molempien vasta-aineiden sitoutuminen virukseen havaitaan infektoiduissa VeroE6-soluissa. Vasemmalla infektoimattomat VeroE6-solut, joissa ei nähdä vasta-aineiden sitoutumista. 5A-vasta-aineella värjättyjen solujen aktiinisäikeet värjättiin Phalloidin AF555:lla (keltainen) ja 2D12-vasta-aineella värjättyjen solujen aktiinisäikeet Phalloidin AF647:lla (punainen). Tumat värjättiin DAPI:lla (sininen). Kuvat on otettu monitasokannauksena (Z-stack) Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla. Mittakaavajana 30µm.

3.4 2D12-vasta-aineen biotinylaatio ei vaikuta keltakuumeviruksen tunnistamiseen

Vasta-aineen biotinylaatio voi vaikuttaa negatiivisesti vasta-aineen toimintaan, kuten esimerkiksi estää vasta-aineen sitoutumisen epitooppiin. Varmistaaksemme ettei biotinylaatio vaikuta 2D12-vasta-aineen kykyyn tunnistaa 17D-keltakuumevirusta, sen toimivuus testattiin värjäämällä infektoidut VeroE6-solut biotinyloidulla vasta-aineella. Ennen värjäystä biotinyloidun 2D12-vasta-aineen pitoisuus määritettiin BCA-menetelmällä. Näytteiden absorbanssi mitattiin 562 nm aallonpituudella, ja standardisuoran ja biotinyloidun 2D12-vasta-aineen absorbanssin perusteella pitoisuudeksi saatiin 1,14 mg/ml.

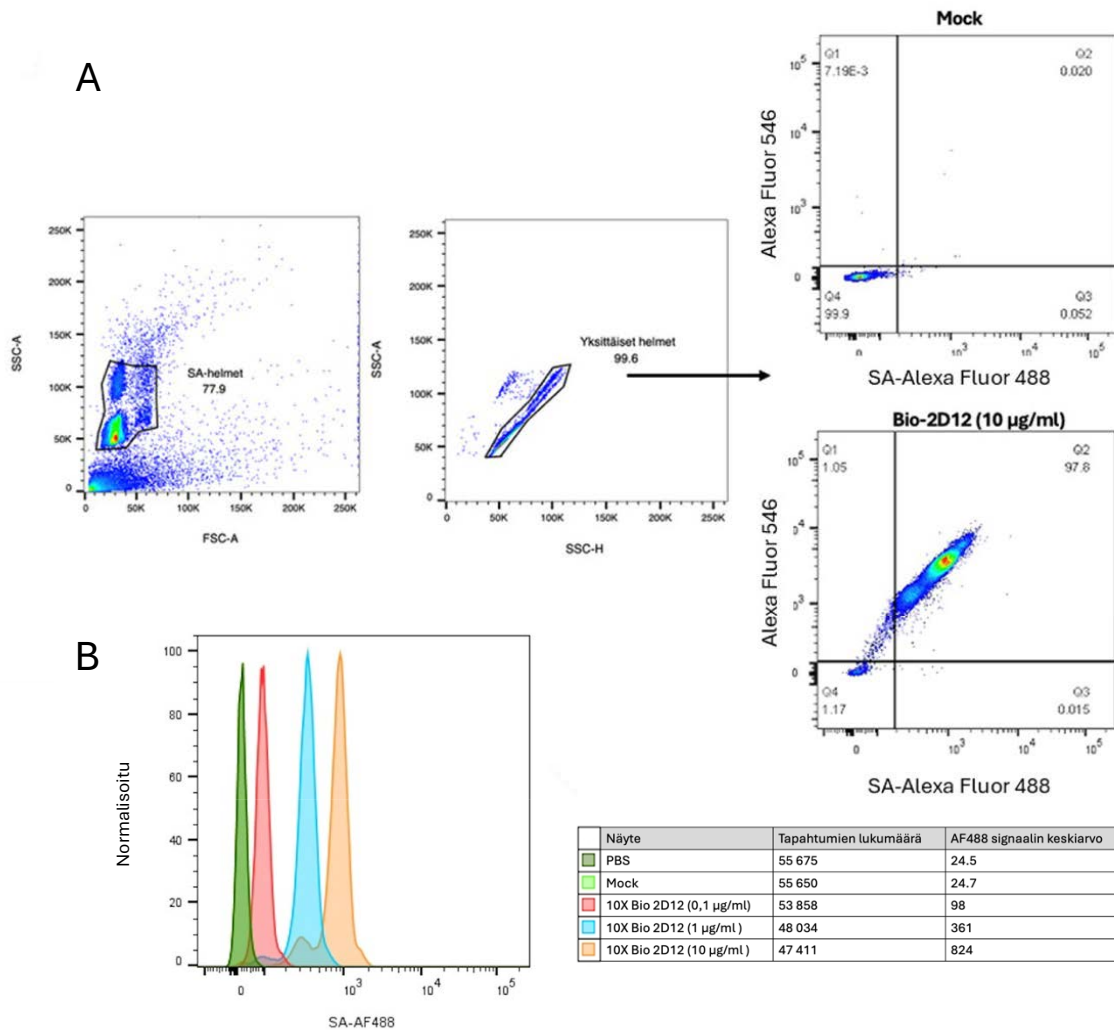
Kuvassa 12 nähdään, ettei biotinylaatio vaikuta vasta-aineen kykyyn tunnistaa 17D-keltakuumevirusta. Biotinyloitu 2D12-vasta-aine sitoutuu 17D-keltakuumevirukseen ja 2D12-vasta-aineelle spesifi fluoresenssileimattu sekundaarivasta-aine tunnistaa myös biotinyloidun ja virukseen sitoutuneen 2D12-vasta-aineen.



Kuva 12. 10x Bio-2D12-vasta-aine sitoutuu 17D-keltakuumeviruksella infektoiduihin VeroE6-soluihin. Infektoimattomat ja 17D-keltakuumeviruksella infektoidut VeroE6-solut värjättiin 10x biotinyloidulla 2D12-vasta-aineella ja AF546-fluoresenssileimatulla anti-mouse sekundaarivasta-aineella. Infektoituneissa soluissa havaitaan biotinyloidun 2D12-vasta-aineen sitoutuminen 17D-keltakuumevirukseen (keltainen). Solujen aktiinisäikeet värjättiin Phalloidin AF647:lla (punainen) ja tumat DAPI:lla (sininen). Kuvat on otettu monitasokannauksena (Z-stack) Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla. Mittakaavajana 30µm.

Lisäksi varmistettiin virtausytometrillä, että 2D12-vasta-aine todella on biotinyloitunut ja se sitoutuu tehokkaasti streptavidiiniiin, jotta vasta-ainetta voidaan käyttää osana surrogaattiantigeeni-kompleksia. Vasta-aineesta tehtiin 0,1, 1 ja 10 µg/ml laimennokset, ja vasta-aineen annettiin sitoutua streptavidiinilla päällystettyihin helmiin. Biotinyloitu 2D12-vasta-aine värjättiin sekä Alexa Fluor 488-leimatulla streptavidiinilla (SA-Alexa Fluor 488) että Alexa Fluor 546-leimatulla sekundaarivasta-aineella. Kuvassa 13A on esitetty rajausstrategia ja biotinyloidun 2D12-vasta-aineen (10µg/ml) sitoutuminen streptavidiinilla päällystettyihin helmiin. Kuvasta nähdään, että lähes kaikkiin streptavidiinilla päällystettyihin helmiin oli sitoutunut biotinyloitu 2D12-vasta-aine ja biotinyloituun 2D12-vasta-aineeseen oli sitoutunut sekä fluoresenssileimattu sekundaarivasta-aine että streptavidiinii (Q2 alueella 97,8 % helmistä), mikä osoittaa, että vasta-aineeseen on konjugoitunut useampi aktiivinen biotiinimolekyyli. Kontrollinäytteenä oli pelkkä PBS sekä myös PBS:ää, johon oli lisätty sama määrä biotiinia kuin biotinyloituun vasta-aineeseen ja joka oli puhdistettu samalla tavalla kuin biotinyloitu vasta-aine (mock). Kontrolleissa ei havaittu epäspesifistä streptavidiiniiin sitoutumista, mikä viittaa siihen, että biotinylaatioreaktiossa reagoimaton biotiini oli saatu onnistuneesti poistettua näytteistä käytetyillä resiniinipylväillä.

Histogrammista (kuva 13B) nähdään, että biotinyloitua vasta-ainetta sitoutuu SA-helmiin sitä enemmän, mitä suurempi vasta-aineen pitoisuus on. PBS-kontrollin sekä resiniinikolumnilla suodatetun mock-näytteen fluoresenssin intensiteetit olivat samat, minkä vuoksi niiden käyrät ovat kuvaajassa päällekkäin.

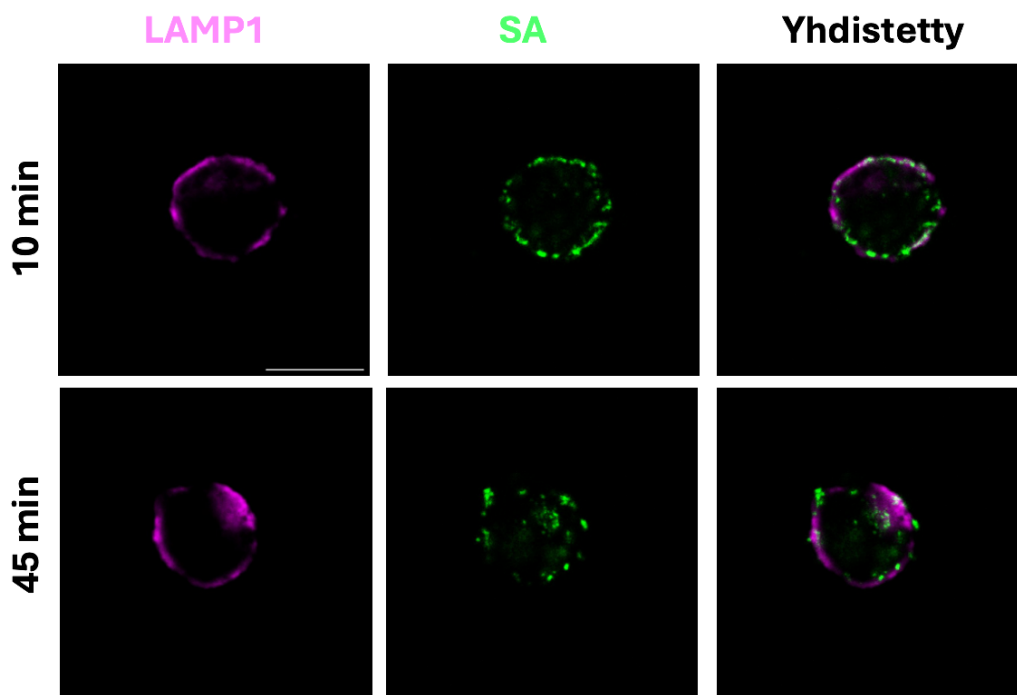


Kuva 13. Biotinyloitu 2D12-vasta-aine sitoutuu streptavidiniin. Biotinyloidun 2D12-vasta-aineen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) annettiin sitoutua streptavidiinilla päällystettyihin helmiin, minkä jälkeen ne värjättiin 2D12-vasta-aineen tunnistavalla anti-mouse AF546-fluoresenssileimatulla sekundaarivasta-aineella ja AF488-fluoresenssileimatulla streptavidiinilla (SA-Alexa Fluor 488). Kuvassa A on esitetty rajausstrategia, jossa ensin tarkasteluun rajattiin streptavidiinilla päällystetyt helmet (SA-helmet), minkä jälkeen rajattiin yksittäiset helmet. Kontrollina (mock) käytettiin streptavidinihelmiä, joihin lisättiin resinikolumneilla suodatettu PBS, johon oli ennen suodattamista lisätty sama määrä biotiinia kuin biotinyloituun vasta-aineeseen. Kuvassa B on esitetty streptavidinin sitoutuminen näytteisiin. Tulokset on normalisoitu tapahtumien määrällä jokaisessa näytteessä.

3.5 B-solut internalisoivat streptavidiniin konjugoidun anti-IgM:n

Ennen surrogaattiantigeeni-kompleksikokeita Raji D1.3-soluissa testattiin miten B-solureseptorille spesifinen biotinyloitu anti-IgM-vasta-aine ja siihen sitoutuva streptavidini internalisoituvat ja kulkeutuivat solussa. Biotinyloidun anti-IgM-vasta-aineen ja siihen sitoutuvan fluoresenssileimatun Alexa Fluor 488 streptavidiniin annettiin internalisoitua, minkä jälkeen solut fiksattiin ja värjättiin lysosomin pintaproteiinin LAMP1 tunnistavalla vasta-aineella ja fluoresenssileimatulla Alexa Fluor 647 sekundaarivasta-aineella.

Kuvasta 14 havaitaan, että 10 min jälkeen anti-IgM-streptavidini-kompleksit klusteroituivat Raji D1.3-solun pinnalle, ja 45 min jälkeen kompleksit olivat internalisoituneet soluihin. Anti-IgM-streptavidini-kompleksien kolokalisaatiota lysosomien kanssa ei kuitenkaan voitu luotettavasti todentaa, sillä lysosomimarkkeri LAMP1:n värjäys ei toiminut odotetusti. LAMP1-signaali paikallistui lysosomien pistemäisen, vesikkelimäisen rakenteen sijasta pääosin solujen reunoille, minkä vuoksi havaitun kolokalisaation puuttumisen perusteella ei voida tehdä johtopäätöksiä kompleksien kulkeutumisesta lysosomeihin.

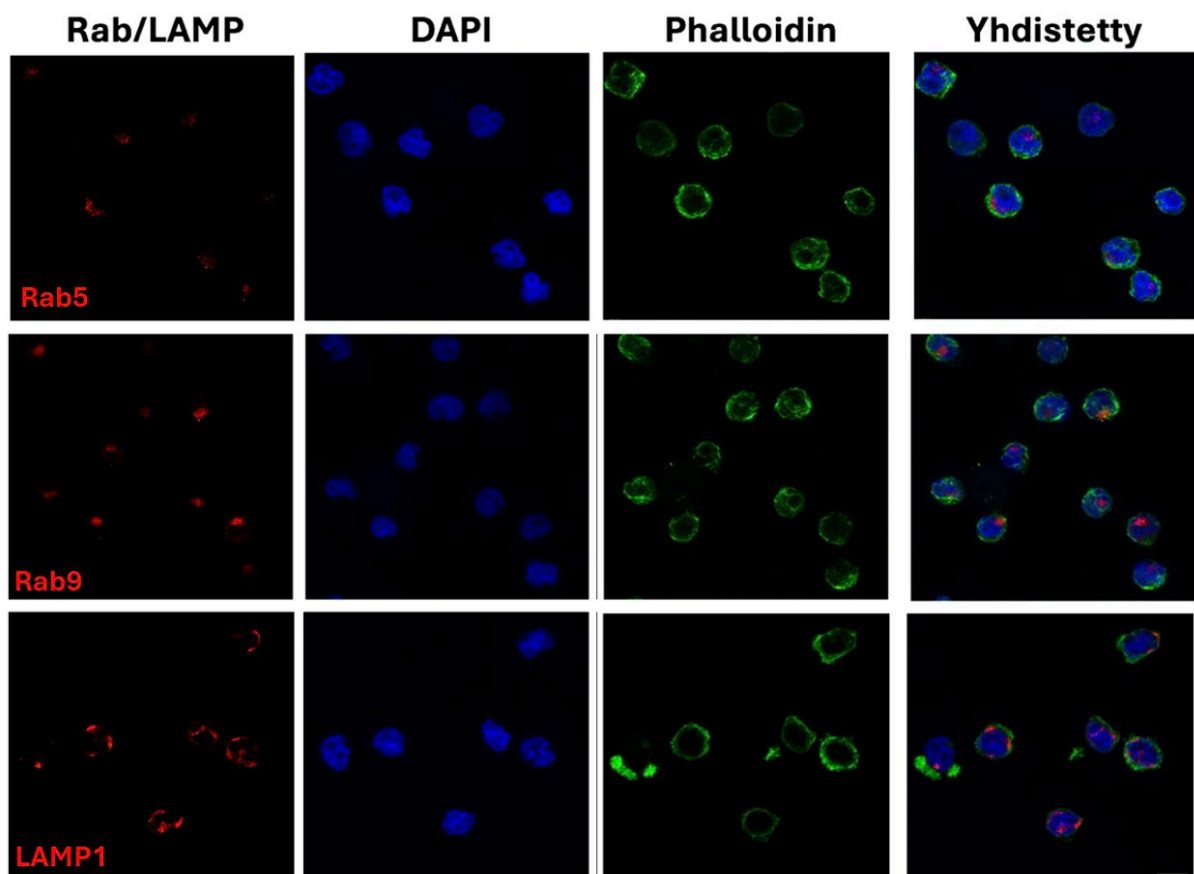


Kuva 14. Anti-IgM-vasta-aine saa aikaan B-solun aktivaation ja anti-IgM-streptavidini-kompleksin internalisaation. Raji D1.3-solut aktivoitiin biotinyloidulla SA-AF488 konjugoituneella anti-IgM-vasta-aineella (vihreä) ja anti-IgM:n annettiin internalisoitua 10 ja 45 minuuttia. Solut värjättiin lysosomaalisella LAMP1-markkerilla ja fluoresenssileimatulla anti-rabbit sekundaarivasta-aineella (violetti). Kuvasta nähdään anti-IgM-streptavidini-kompleksin internalisaation eteneminen 10 min ja 45 min aikapisteissä. Kuvat on otettu solun keskitasosta Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla. Mittakaavajana 10 μ m.

3.6 B-solujen endosomivärjäykset

Viruksen internalisaation tutkiminen solussa perustuu viruksen ja solun endosomaalisten rakenteiden samanaikaiseen visualisointiin. Endosomeilla on tärkeä merkitys internalisoitujen molekyylien lajittelussa, kuljetuksessa ja prosessoinnissa, joten B-solujen endosomaalisen reitin ja surrogaattiantigeeni-kompleksin kuljetuksen tarkempaan analysointiin oli tarkoitus käyttää varhaisten endosomien ja myöhäisten endosomien markkereita, sekä lysosomaalista LAMP1-värjäystä. Endosomien havainnointiin käytettiin Rab5 (aikaiset endosomit) ja Rab9 (myöhäiset endosomit) spesifisiä vasta-aineita, joiden toimivuus testattiin Raji-soluissa (wt).

Kuvasta 15 nähdään, että endosomaaliset markkerit Rab5 ja Rab9 lokalisoituvat vain tietyille alueille B-soluissa. Lysosomaalinen markkeri LAMP1 puolestaan lokalisoitui tasaisemmin koko solun alueelle, mutta kuitenkin lähelle solun pintaa.

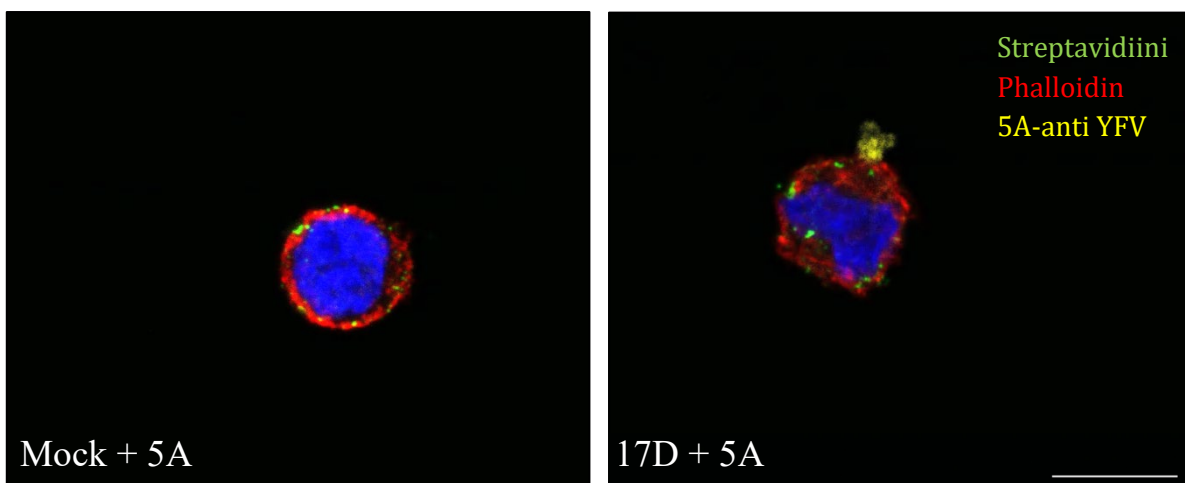


Kuva 15. Rab5-, Rab9- ja LAMP1-markkerien lokalisaatio villityypin (wt) Raji-soluissa. Varhaiset endosomit (Rab5), myöhäiset endosomit (Rab9) ja lysosomit (LAMP1) värjättiin AF647-fluoresenssileimatulla sekundaarivasta-aineella (punainen). Solujen aktiinisäikeet värjättiin Phalloidin AF555:lla (vihreä) ja tumat DAPI:lla (sininen). Kuvat on otettu solun keskitasosta Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla. Mittakaavajana 10µm.

3.7 Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutuminen B-solureseptoriin ja viruksen internalisaatio

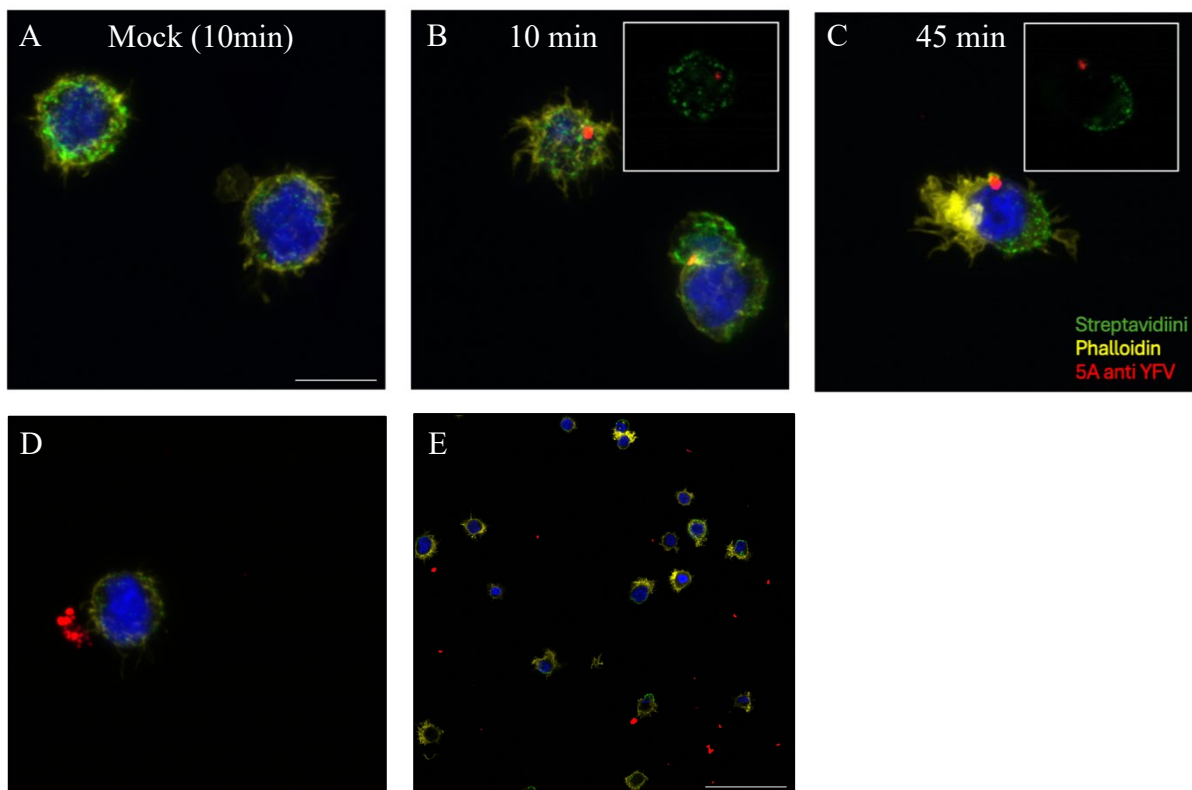
17D-keltakuumeviruksen sitoutumista B-solureseptoriin tutkittiin surrogaattiantigeeni-kompleksilla. Raji D1.3-soluja inkuboitii biotinyloidun anti-IgM-vasta-aineen ja siihen sitoutuvan fluoresenssileimatun Alexa Fluor 488 streptavidiinin sekä etukäteen yhdistetyn biotinyloidun 2D12-vasta-aineen ja 17D-keltakuumeviruksen kanssa. Kontrollisolut (mock) käsiteltiin muuten samalla tavalla, mutta surrogaattiantigeeni-kompleksiin ei laitettu ollenkaan virusta. B-soluun sitoutunut virus havainnoitiin 5A-anti-YFV ja Alexa Fluor 647 sekundaarivasta-aineella.

Kuten aikaisemmissa testeissä anti-IgM-streptavidiini-kompleksi sitoutui solun pintaan (vihreä signaali) sekä kontrollisoluissa että viruksella käsitellyissä soluissa (kuva 16). Suurimmassa osassa soluista ei sen sijaan havaittu viruksen sitoutumista ollenkaan ja soluissa, joissa virusta oli solun pinnalla (keltainen signaali), virus oli muodostanut suuria aggregaatteja (kuva 16). Tämä voi johtua 2D12-vasta-aineen ja viruksen inkuboinnista keskenään ennen soluille lisäämistä, minkä aikana neutraloiva 2D12-vasta-aine on aggregoinut viruksen. Kuvassa 16 on esitetty solu, johon virusta on sitoutunut.



Kuva 16. 17D- keltakuumeviruksen sitoutuminen B-solureseptoriin. Raji D1.3-solut aktivoitiin biotinylodulla anti-IgM-vasta-aineella ja värjättiin fluoresenssileimatulla streptavidiinilla (AF488, Invitrogen). Soluille lisättiin biotinyloidun 2D12-vasta-aineen kanssa inkuboitu 17D-keltakuumevirus ja solut värjättiin 5A-vasta-aineella ja fluoresenssileimatulla anti-human-sekundaarivasta-aineella. Fluoresenssileimatuu sekundaarivasta-aine (keltainen) osoittaa viruksen sitoutumisen B-soluun. Vasemmalla on esitetty solu (mock), jolle on lisätty pelkkä biotinyloitu 2D12-vasta-aine ilman virusta. Solujen aktiinisäikeet värjättiin Phalloidin AF555:lla (punainen) ja tumat DAPI:lla (sininen). Kuvat on otettu monitasoskannauksena (Z-stack) Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla. Mittakaavajana 10µm.

17D-keltakuumeviruksen internalisaatiota Raji D1.3-soluihin tutkittiin kuten edellä, mutta aggregaattien vähentämiseksi biotinyloitu 2D12-vasta-aine lisättiin soluille ennen surrogaattiantigeeni-kompleksiin liitettyä virusta. Viruksen lisäämisen jälkeen surrogaattiantigeeni-kompleksin annettiin internalisoitua 10 ja 45 minuutin ajan (kuva 17, B-C). Kuvasta 17B nähdään, että 10 minuutin jälkeen 5A-anti-YFV:hen sitoutuvan fluoresenssileimatun sekundaarivasta-aineen (punainen) ja anti-IgM-streptavidiini-kompleksin (vihreä) signaalit lokalisoituvat solun sisälle, mikä viittaa siihen, että virus on sitoutuneena surrogaattiantigeeni-kompleksiin ja internalisoitunut anti-IgM-streptavidiini-kompleksiin kiinnittyneenä (katso luku 3.5). Myöhemmässä aikapisteessä (Kuva 17C) signaaleja ei havaita samasta lokaatiosta, mikä viittaa siihen, ettei virus ole internalisoitunut. Suurimmassa osassa soluja viruksen sitoutumista ei havaittu ollenkaan, vaan solujen ympärillä oli kompleksista tai sen osista muodostuneita aggregaatteja (Kuvat 17D ja E). Anti-IgM-streptavidiini-kompleksista tuleva signaali ei kolokalisoidu aggregaatteihin, joten muodostuneet aggregaatit koostuvat todennäköisesti pelkästä viruksesta tai 2D12-vasta-aineesta ja viruksesta. Kuvassa 17A on esitetty kontrollisolut (Mock), joille oli lisätty biotinyloitu 2D12-vasta-aine ilman virusta.



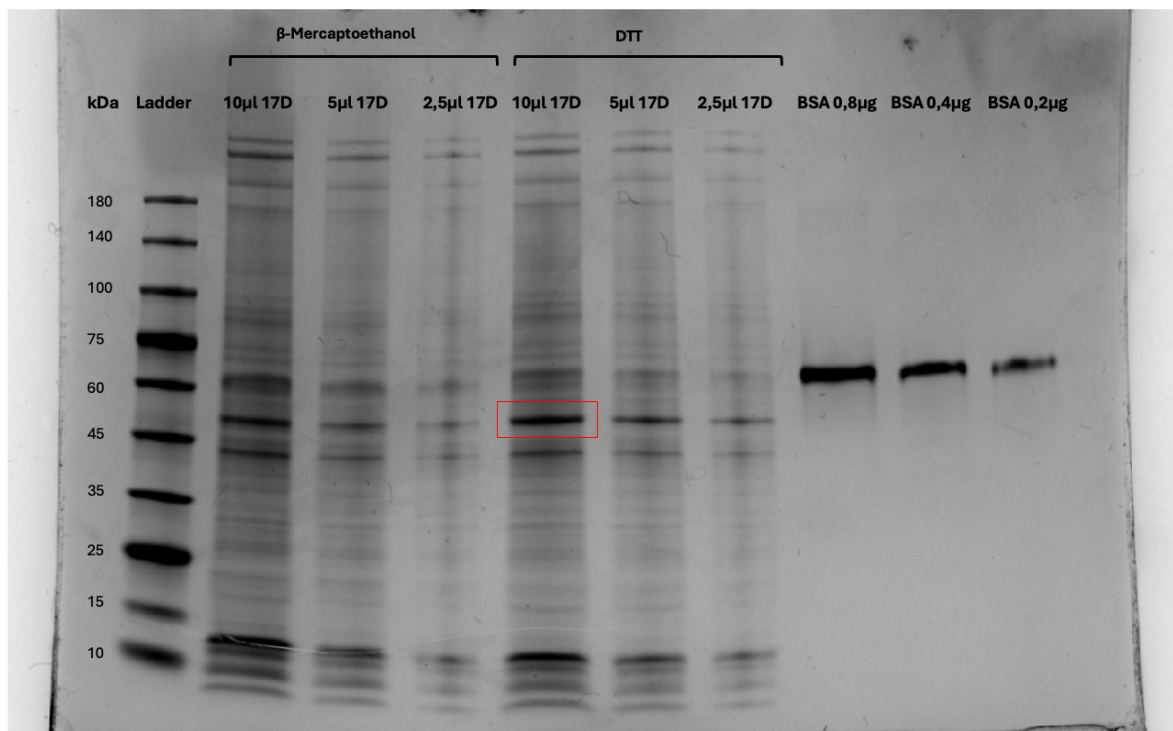
Kuva 17. 17D-keltakuumeviruksen internalisaatio (A-C) ja surrogaattiantigeeni-kompleksin aggregoituminen Raji D1.3-soluissa (D ja E). Solut aktivoitiin biotinylodulla anti-IgM-vasta-aineella ja värjättiin fluoresenssileimatulla streptavidiinilla (AF488, Invitrogen). Soluille lisättiin biotinyloitu 2D12-vasta-aine ja 17D-keltakuumevirus ja solut

värjättiin 5A-vasta-aineella ja fluoresenssileimatulla anti-human-sekundaarivasta-aineella. Fluoresenssileimattu sekundaarivasta-aine (punainen) osoittaa surrogaattiantigeeni-kompleksin sijainnin solussa. **(A)** Kontrollisolut (mock (10 min)), joille lisättiin pelkkä biotinyloitu 2D12-vasta-aine ilman virusta. **(B ja C)** 17D-keltakuumeviruksen internalisaatio 10 ja 45 minuutin aikapisteissä. Kuvissa on esitetty myös solun keskiosa yhdestä tasosta (neliö). **(D ja E)** Fluoresenssileimattu sekundaarivasta-aine (punainen) osoittaa surrogaattiantigeeni-kompleksin aggregoitumisen Raji D1.3-solujen ympärille. Kaikissa kuvissa solujen aktiinisäikeet on esitetty keltaisella (Phalloidin AF555) ja tumat sinisellä (DAPI). Kuvat on otettu monitasokannauksena (Z-stack) Leica Stellaris konfokaalimikroskoopilla. Mittakaavajana 10 μm (A-D) ja 50 μm (E).

3.8 SDS-PAGE

Koska alkuperäisen surrogaattiantigeeni-kompleksin ei havaittu toimivan odotetusti, kompleksin rakennetta päätettiin yksinkertaistaa. Virus päätettiin biotinyloida suoraan, jolloin biotinyloitu 2D12-vasta-aine voidaan jättää kokonaan pois kompleksista. Biotinylaatiota varten 17D-keltakuumeviruksen E-proteiinin pitoisuus määritettiin SDS-PAGE geeliltä (kuva 18). Virusnäytteiden pelkistyksessä käytettiin kahta eri pelkistintä, β -merkaptotolanolia ja DTT:tä. Koska DTT:llä pelkistettyjen virusproteiinien (kaivot 5-7) intensiteetti oli huomattavasti selkeämpi kuin β -merkaptotanolilla pelkistetyissä näytteissä (kaivot 2-4), E-proteiinin (noin 50 kDa) määrä analysoitiin DTT:llä pelkistetyistä virusnäytteistä vertaamalla näytteitä BSA-standardien (66 kDa) intensiteettiin (kaivot 8-10). Viruksen E-proteiinikonsentraatioksi saatiin 41,5 $\mu\text{g/ml}$. Geeliltä havaitaan myös muita virusproteiineja, kuten pre-membraaniproteiini (14 kDa), kapsidiproteiini (12 kDa) ja jonkin verran viruskasvatuksesta puhdistuneita muita proteiineja.

Biotinylaation optimointi ja biotinyloidun viruksen liittäminen osaksi surrogaattiantigeeni-kompleksia olisi edellyttänyt lisääntynyttä lisäaikaa, jota ei tässä pro gradu -työssä ollut käytettävissä. Tämän vuoksi biotinyloitua virusta ei ehditty testaamaan internalisaatiokokeissa.



Kuva 18. SDS-PAGE-geeli 17D-YFV:n E-proteiinin pitoisuuden määrittämiseksi. 10% SDS-PAGE geeli ajettiin ja värjättiin PageBlue-värillä proteiinien visualisoimiseksi. Ensimmäisessä näytekaivossa (Ladder) on värjätty molekyylipainomarkkeri (ProteinTech PL00001), jonka koot on merkitty kilodaltoneina (kDa) vasempaan reunaan. Kaivot 2-4: β -merkaptotoetanolilla pelkistetyt virusnäytteet (10 μ l, 5 μ l, 2,5 μ l). Kaivot 5-7: DTT:llä pelkistetyt virusnäytteet (10 μ l, 5 μ l, 2,5 μ l). Kaivot 8-10: BSA-strandardit (0,8 μ g, 0,4 μ g, 0,2 μ g). E-proteiinin pitoisuuden määrittämiseen käytetty proteiiniaraita on rajattu punaisella.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää 17D-keltakuumeviruksen internalisaatiota ja kulkeutumista B-soluissa. Internalisaation tutkimiseksi koottiin surrogaattiantigeeni-kompleksi, sillä käytössä ei ollut potilasnäytteitä tai sopivaa B-solulinjaa, jolla olisi ollut keltakuumevirukselle spesifinen B-solureseptori. B-solujen tiedetään aktivoituvan viruspartikkeleilla, jotka on kytketty B-solureseptorille spesifisiin vasta-aineisiin. Tämän vuoksi kompleksin sitoutumisen B-solureseptoreihin odotettiin johtavan B-solujen aktivoitumiseen ja viruksen B-solureseptorivälitteiseen internalisaatioon.

Ennen kokonaisen kompleksin käyttöä sen osat testattiin erikseen. Näin haluttiin varmistaa, että B-solun aktivoituminen ja antigeenin otto solun sisälle johtuivat nimenomaan koko kompleksista, eikä sen yksittäisten osien mahdollisista poikkeavuuksista tai toimintahäiriöistä.

Valmiin surrogaatti-antigeenikompleksin tai sen osien havaittiin kuitenkin muodostavan suuria aggregaatteja solujen ympärille, eikä kompleksi sitoutunut tai internalisoitunut soluihin odotetusti. Lisäksi viruksen kasvatus sekä surrogaattiantigeeni-kompleksin eri osien toiminnan optimointi osoittautui odotettua työläämmäksi ja haastavammaksi, minkä vuoksi viruksen internalisaatiota ja prosessointia soluissa ei päästy tutkimaan tarkemmin.

4.1 *Viruksen kasvatus ja puhdistus*

Surrogaattiantigeeni-kompleksin kokoamista varten keltakuumeviruksesta kasvatettiin omat viruserät VeroE6- ja SW13-soluissa, jotka ovat yleisesti käytettyjä keltakuumeviruksen kasvatuksessa ja plakkititrauksissa ja jotka infektoituvat tehokkaasti keltakuumeviruksella. Keltakuumevirus aiheuttaa Vero-soluissa voimakkaan sytopaattisen efektin, minkä vuoksi ne sopivat hyvin käytettäviksi plakkititrauksissa (Beasley ym., 2013). Lisäksi Vero-solut eivät tuota interferoni-betaa (IFN- β), minkä johdosta ne eivät kykene tehokkaasti estämään viruksen monistumista, mikä mahdollistaa korkeiden titterien saavuttamisen viruskasvatuksissa (Sène ym., 2022).

Tuoreessa tutkimuksessa osoitettiin, että SW13- ja VeroE6-solut ilmentävät pinnallaan LDLR-reseptoreja, jotka toimivat keltakuumeviruksen sisäänpääsyreseptoreina (Chong ym., 2026). Aiemmassa tutkimuksessa (Xu ym. 2024) osoittivat Krimin-Kongon verenvuotokuumeviruksella (engl. Crimean–Congo hemorrhagic fever, CCHF), että LDLR-reseptorin määrä solun pinnalla korreloi suoraan viruksen kykyyn tunkeutua soluun. Erityisesti

SW13-solut, jotka ovat ihmisen lisämunuaiskuoren karsinoomasoluja, ilmentävät LDLR:ää erittäin runsaasti, mikä tekee niistä erittäin alttiita infektioille (Xu ym., 2024). Koska CCHF ja keltakuumevirus hyödyntävät samoja reseptoreita päästäkseen solun sisään, LDLR-reseptorien ilmentymistaso todennäköisesti korreloi myös keltakuumeviruksen infektiotehokkuuteen SW13- ja VeroE6-soluissa.

Korkean titterin saavuttamiseksi SW13-solut, joiden tiedetään infektoituvan hyvin myös korkeilla viruspitoisuuksilla, infektoitiin keltakuumeviruksella ja virus saostettiin PEG:llä, puhdistettiin ja konsentroitettiin sukroosipedin läpi. Puhdistetun viruksen tiedetään muodostavan herkästi aggregaatteja (Pradhan ym., 2022), joten virus resuspensoitiin TNE-puskuriin, jossa viruksen rakenteen tiedetään säilyvän hyvin. Koska aggregoituminen voi johtaa viruksen tartuntakyvyn laskuun tai muuttaa sen käyttäytymistä, sitä pyrittiin välttämään optimoimalla puhdistusprosessin olosuhteita. Puhdistuksen jälkeen saavutettiin korkea virustitteri, mutta myöhemmin huomattiin, että puhdistettu virus muodosti aggregaatteja surrogaattiantigeeni-kompleksissa. Aggregaatit saattoivat johtua tutkimuksessa käytetystä PEG-saostusmenetelmästä. PEG:n etuna on se, että se nostaa viruspartikkelien pitoisuuden erittäin korkeaksi, mutta toisaalta se lisää aggregaattien muodostumista (Pons Royo & Jungbauer, 2025).

4.2 17D-keltakuumevirus ei infektoi B-soluja

Koska tavoitteena oli seurata surrogaattiantigeeni-kompleksin indusoimia tapahtumia B-soluissa, tuli varmistua siitä, etteivät B-solut infektoitu pelkällä keltakuumeviruksella. Aiempi tutkimustieto nimenomaan viittaa siihen, että B-solut (kuten Raji- tai Ramos-solut) eivät ole alttiita virusinfektioille, ei edes suurillakaan viruspitoisuuksilla (Perera-Lecoin ym., 2013; Gebo ym., 2024). Esimerkiksi Raji-soluilla on tehokkaat antiviraaliset solunsisäiset puolustusmekanismit, mikä tekee niistä vaikeasti infektoituvia (Lam ym., 2020). Tämän pro gradu -työn havainnot vahvistavat tätä oletusta, sillä infektiokokeen tulokset viittasivat siihen, etteivät Raji D1.3- eivätkä Ramos-B-solut infektoitu keltakuumeviruksellakaan. Vaikkakin infektiokokeessa titteri nousi hieman B-soluissa 96 tuntia infektiosta, nousu oli marginaalinen verrattuna kontroleina käytettyihin VeroE6-soluihin. B-soluilta kerättyjen kasvatusmediumien titteri kasvoi aikapisteiden välillä vain noin satoja viruspartikkeleja, mikä voi johtua myös soluihin kiinnittyneistä viruksista, jotka solujen hajotessa vapautuivat kasvatusmediumiin. VeroE6-soluilta kerättyjen kasvatusmediumien titteri oli jokaisessa aikapisteessä B-soluihin

verrattuna noin 1000-kertainen, mikä viittaa viruksen tehokkaaseen replikaatioon ainoastaan VeroE6-soluissa.

Infektiokokeiden ja viruskasvatusten titterit määritettiin plakkititrauksella, joka on yleisesti käytetty menetelmä infektiivisten viruspartikkelien määrän mittaamiseen. Menetelmä perustuu viruksen kykyyn infektoida soluja ja muodostaa solukerrokseen näkyviä plakkeja, joiden perusteella voidaan määrittää viruksen pitoisuus näytteessä. Plakkititraus on luotettava, mutta hidas menetelmä, sillä näkyvien plakkien muodostuminen vie päiviä. Vaikka esimerkiksi infektiokokeessa plakkititrauksista ei tehty replikaatteja, tulosta voidaan silti pitää luotettavana, sillä plakkititraus on vakiintunut menetelmä ja tulokset tukivat johdonmukaisesti aiempia tutkimushavaintoja B-solujen heikosta infektoituvuudesta.

4.3 Biotinylaation vaikutus vasta-aineen toimintaan

Surrogaattiantigeeni-kompleksi koostui useista eri vasta-aineista. Näistä kaksi, 5A- ja 2D12 olivat monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat keltakuumeviruksen E-proteiinin. 2D12-vasta-aine, jota käytettiin surrogaattiantigeeni-kompleksissa yhdistämään B-solureseptoriin sitoutuva anti-IgM ja virus (kuva 7), biotinyloitiin. Biotinylaatio voi muuttaa vasta-aineen rakennetta tai biotiini voi kiinnittyä vasta-aineen antigeenin tunnistavaan osaan eli paratooppiin, jolloin antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen voi estyä. Lisäksi biotinylaatio voi vaikuttaa vasta-aineen sitoutumisaffiniteettiin ja heikentää sen sitoutumisvoimakkuutta, vaikka spesifisyys säilyisikin ennallaan (Coêlho ym., 2019). Sitoutumiskyky voi myös muuttua niin, ettei vasta-aine tunnistaa antigeenia enää yhtä tarkasti, tai vaihtoehtoisesti vasta-aine voi ristireagoida toisten samankaltaisten molekyylien kanssa. 2D12-vasta-aine biotinyloitiin NHS-biotiinilla, jonka on raportoitu vaikuttavan vasta-aineen spesifisyyteen (Panyutich ym., 1993). Panyutich ym. osoittivat, että erityisesti NHS-biotinylaation seurauksena vasta-aineen spesifisyys voi muuttua ja se voi ristireagoida samankaltaisten molekyylien kanssa.

Koska biotiini voi vaikuttaa vasta-aineen kykyyn sitoutua antigeeniin, biotinyloidun 2D12-vasta-aineen toiminnallisuus varmistettiin infektoiduilla VeroE6-soluilla immunofluoresenssivärjäyksellä ja virtausytometrialla. Immunofluoresenssivärjäys osoitti, että biotinyloitu 2D12-vasta-aine tunnisti viruksen tehokkaasti myös biotinylaation jälkeen, eikä biotinylointi heikentänyt sekundaarivasta-aineen kykyä tunnistaa 2D12-vasta-ainetta. Lisäksi virtausytometria-analyysi varmisti, että streptavidiini sitoutui tehokkaasti biotinyloituun 2D12-vasta-aineeseen.

4.4 *Anti-IgM-kompleksin internalisaatio*

B-solureseptoriin sitoutuvat anti-IgM-vasta-aineet ovat keskeisiä työkaluja B-solututkimuksessa, sillä ne simuloivat B-solujen aktivointia ilman varsinaista tautia aiheuttavaa antigeeniä. Anti-IgM sitoutuu useaan B-solureseptoriin samanaikaisesti ja muodostaa ristisidoksia, minkä seurauksena B-solut aktivoituvat voimakkaasti (Packard & Cambier, 2013; Reth & Wienands, 1997). Ristisidoksia muodostavat IgM-kompleksit internalisoituvat myös nopeammin kuin monovalentit ligandit, mutta toisaalta liian suuret kompleksit voivat jäädä solun pinnalle tai ohjautua solussa tavanomaisista poikkeaviin endosytoosireitteihin (Roberts ym., 2020). Biotinyloitu anti-IgM-vasta-aine ja siihen liitetty streptavidiini voivat myös muodostaa suuria komplekseja, mikä heikentää IgM:n kykyä sitoutua B-solureseptoriin, minkä seurauksena kompleksin endosytoosi soluun voi hidastua. Aikaisemmat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että biotinyloidun anti-IgM-vasta-aineen ja streptavidiinin muodostama multimeerinen kompleksi indusoi solussa voimakkaamman B-solureseptorivälitteisen signaloinnin ja B-soluaktivaation liukoisiin vasta-aineisiin verrattuna (Pone ym., 2022).

Ennen kokonaisen surrogaattiantigeeni-kompleksin internalisaatiokokeita testattiin miten B-solureseptorille spesifinen biotinyloitu anti-IgM-vasta-aine ja siihen sitoutuva streptavidiini internalisoituvat ja kulkeutuvat solussa. B-solut värjättiin lysosomin pintaproteiinin tunnistavalla LAMP1-markkerilla, jotta konfokaalimikroskopialla voitiin seurata, kulkeutuuko biotinyloitu anti-IgM ja streptavidiini lysosomeihin. Mikroskopia-analyysi osoitti, että alussa (10 minuutin aikapisteessä) kompleksit olivat vielä pääsääntöisesti klusteroituneet solun pinnalle, mikä voi viitata siihen, että kompleksi sitoutui spesifisti solun pinnan reseptoreihin ennen sisäänottoa. Myöhemmässä aikapisteessä (45 min) kompleksit olivat internalisoituneet, mutta analyysissä ei havaittu LAMP1-signaalin ja kompleksin päällekkäisyyttä, mikä viittaisi siihen, etteivät kompleksit kulkeutuneet lysosomeihin. Kompleksin kolokalisaatiota lysosomien kanssa ei voida kuitenkaan luotettavasti todentaa LAMP1-värjäyksen perusteella, sillä LAMP1-signaali ei selkeästi kolokalisoitunut lysosomeihin.

Normaalisti B-solureseptoriin sitoutunut antigeeni kulkeutuu ensin aikaisiin endosomeihin, jotka myöhemmin kypsyvät myöhäisiksi endosomeiksi, ja fuusioituvat lysosomien kanssa. Internalisaatio aikaisiin endosomeihin tapahtuu yleensä nopeasti, jopa minuuteissa (Lloyd ym., 2017), mutta vesikkelien kypsyminen vaatii kuitenkin pidemmän ajan (Vire ym., 2011). Vire ym. havaitsivat, että 45 minuuttia internalisaatiosta suurin osa IgM-komplekseista oli

lokalisoitunut aikaisiin endosomeihin ja vasta 60 minuutin jälkeen suurin osa IgM:stä oli lokalisoitunut lysosomeihin, mikä voi selittää sen, ettei tässä tutkimuksessa kolokalisaatiota havaittu vielä varhaisessa vaiheessa.

Huomionarvoista on, että mikroskopia-analyysi osoitti LAMP1-signaalin lokalisoituvan poikkeuksellisesti solujen reunoille, kun taas tyypillisesti lysosomit keskittyvät perinukleaarisesti tuman läheisyyteen. Koska lysosomimarkkerin lokalisaatio poikkesi odotetusta, internalisoituneiden anti-IgM-kompleksien ja lysosomien välisen kolokalisaation puuttumista 45 minuutin kohdalla on tulkittava varovasti. On mahdollista, että LAMP1-signaali edustaa epäspesifistä sitoutumista solukalvolle tai puutteellista permeabilisaatiota värjäysprosessin aikana, mikä vaikeuttaa varman johtopäätöksen tekemistä kompleksien todellisesta lokaatiosta.

Yhteenvedona voidaan todeta, että jos signaali on todellinen, kolokalisaation puute viittaa siihen, että kompleksit sijaitsevat vielä muissa solunsisäisissä vesikkeleissä, kuten varhaisissa tai myöhäisissä endosomeissa. Tämä olisi linjassa Viren ym. (2011) havainnon kanssa, että IgM-kompleksin kulkeutuminen lysosomien entsyymaattiseen ympäristöön saattaa vaatia pidemmän seuranta-ajan. Mikäli signaali edustaa virheellistä värjäystä, on mahdollista, että anti-IgM-kompleksit ovat todellisuudessa edenneet lysosomeihin, mutta niitä ei voitu havaita markkerin toimimattomuuden vuoksi.

4.5 Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutuminen ja internalisaatio

Tutkimuksessa käytettiin surrogaattiantigeeni-kompleksia simuloimaan keltakuumerokoteviruksen solunsisäistä liikennöintiä B-solujen endosomaalisessa verkostossa. Tavoitteena oli selvittää, miten virus internalisoidaan ja prosessoidaan antigeenin esittelyä varten. Anti-IgM:n sitoutuminen B-solureseptoriin tulisi käynnistää surrogaattiantigeeni-kompleksin nopean internalisaation, josta seuraa antigeenin prosessointi ja esittely auttaja-T-soluille, mikä on välttämätöntä adaptiivisen immuunivasteen käynnistymiselle eli tehokkaan B-soluaktivaation ja rokotevasteen muodostumiselle. Internalisaation jälkeen antigeeni pilkotaan lysosomeissa pienemmiksi peptideiksi, minkä jälkeen peptidit esitellään MHC II-komplekseissa auttaja-T-soluille. Antigeenin internalisaatio ja kulkeutuminen lysosomeihin on erityisen kriittistä rokotteen tehon kannalta, sillä antigeenin pilkkoutuminen lysosomeissa mahdollistaa antigeenin esittelyn auttaja-T-soluille, mikä on välttämätöntä pitkäkestoisen immunologisen muistin muodostumiselle (Martínez-Riaño ym., 2018). Mikäli antigeenin

kulkeutuminen lysosomeihin häiriintyy tai antigeeni poistuu lysosomeista ennenaikaisesti, antigeenin esittely auttaja-T-soluille voi heikentyä ja rokotteen kokonaisteho voi laskea.

Surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutumista B-solureseptoriin ja kompleksin internalisaatiota tutkittaessa havaittiin, että kompleksi tai sen osat aggregoituvat solujen pinnalle. Valtaosassa soluista ei havaittu lainkaan spesifistä sitoutumista. Soluissa, joissa sitoutumista havaittiin, viruskompleksi oli muodostanut suuria aggregaatteja, eivätkä biotinyloituun IgM:ään sitoutuneesta streptavidiini-AF488:sta ja 5A-vasta-aineeseen sitoutuvasta sekundaarivasta-aineesta (AF647-IgG) havaitut spesifiset signaalit lokalisoituneet samaan kohtaan. On mahdollista, että virukseen sitoutuva biotinyloitu 2D12-vasta-aine ei sitoutunut tehokkaasti B-solureseptoriin sitoutuvaan anti-IgM-streptavidiini-kompleksiin, eikä surrogaattiantigeeni-kompleksi siten rakentunut oikealla tavalla.

Tämä on kuitenkin ristiriidassa virtausytometri-analyysin kanssa, joka osoitti, että biotinyloitu 2D12-vasta-aine sitoutui tehokkaasti streptavidiinilla päällystettyihin helmiin. Tiedetään kuitenkin, että vaikka streptavidiini-biotiini-vuorovaikutus on erittäin vahva, sen toiminta elävissä soluissa on herkkä häiriöille, joten biotinyloidun 2D12-vasta-aineen ja anti-IgM-streptavidiini-kompleksin heikko sitoutuminen soluissa voi johtua menetelmällisten ongelmien lisäksi myös biologisista tekijöistä.

Viruksen aggregoituminen ja se, että surrogaattiantigeeni-kompleksi ei rakentunut oikealla tavalla voi johtua useasta eri tekijästä. Ensinnäkin internalisaatiossa käytettiin puhdistettua virusta. Virusten puhdistusprosessit, kuten ultrasentrifugointi, altistavat viruspartikkelit mekaaniselle stressille, mikä voi johtaa virusten aggregoitumiseen jo ennen niiden joutumista kosketuksiin solujen kanssa. Myös puhdistuksessa käytetyt puskurit tai jäämät voivat muuttaa viruksen pintavarausta, mikä edistää aggregoitumista. Toiseksi kompleksin kokoamisen aikana solut ovat pitkiä aikoja jäällä, mikä voi heikentää solujen viabiliteettia ja kykyä internalisoida kompleksia. Kompleksin kokoamista olisi mielenkiintoista testata koeputkessa, jolloin valmis kompleksi voitaisiin antaa soluille kerralla, jolloin inkubaatioajat ja pesuvaiheet vähenisivät, eikä solujen viabiliteetti heikentyisi. Tätä hankaloitti kuitenkin työskentely BSL2-tason laboratoriossa, sillä virusnäytteet oli fiksattava aina ennen siirtymistä muihin tiloihin, eikä kaikkia reagensseja ja laitteita voitu siirtää laboratorioden välillä. Kolmanneksi näytteet fiksattiin 4 % PFA:lla, joka on yleisesti käytetty fiksatiivi immunofluoresenssiväryksissä, mutta sen on raportoitu aiheuttavan ongelmia vasta-aineiden sitoutumisessa sekä muutoksia solun morfologiassa (Richter ym., 2018). Fiksaus voi peittää tai muuttaa vasta-aineiden tunnistamia epitooppeja, jolloin vasta-aineen sitoutuminen antigeeniin heikkenee ja

immunofluoresenssivärjäyksissä havaittava signaali voi heikentyä. Toisaalta soluja fiksattiin enintään 30 minuuttia, eikä näin lyhyen fiksaation ole tutkimusten mukaan havaittu heikentävän vasta-ainesignaalin voimakkuutta (Richter ym., 2018).

Kompleksin aggregoituminen voi myös johtua vasta-aineen neutraloivasta vaikutuksesta. Käyttämämme 2D12-vasta-aine tunnistaa keltakuumeviruksen E-proteiinin, ja sillä on todettu olevan neutraloiva vaikutus virusta vastaan (Schlesinger ym., 1984). Neutraloiva vasta-aine voi aggregoida viruspartikkeleita, jolloin viruksen kiinnittyminen soluihin voi estyä (Burton, 2023). Neutralisaation seurauksena aggregoitunut virus ei pysty sitoutumaan B-solureseptoriin yhtä tehokkaasti, mikä voi selittää viruksen vähäisen sitoutumisen soluihin.

Näyttäisi siltä, että anti-IgM-streptavidiini-kompleksi on pääosin sitoutunut solun pintaan, joten aggregaatio-ongelma ei koske koko surrogaattikompleksia, vaan todennäköisesti virusta ja vasta-aineita. Antigeenin ja vasta-aineen suhdetta on vaikea optimoida niin, ettei synny hallitsemattoman suuria aggregaatteja. Vaikka surrogaattiantigeeni-kompleksi olisi saatu koottua oikealla tavalla, se on varsin suuri soluille internalisoitavaksi. Toisaalta B-solujen tiedetään kykenevän internalisoimaan suuriakin rakenteita IgM-reseptorin välityksellä (Verstegen ym., 2019). Kaiken kaikkiaan pro gradu -työ osoittaa sen, että kompleksin osien erillinen optimointi ei takaa kokonaisen kompleksin toimivuutta. Puhdistetun viruksen ja muiden surrogaattiantigeeni-kompleksin osien välinen dynaaminen vuorovaikutus on kriittinen vaihe, joka tulisi varmistaa ennen varsinaisia solukokeita, jotta vältytään vääriä johtopäätöksiltä.

4.6 Viruksen E-proteiinimääritys ja biotinylaatio

Koska surrogaattiantigeeni-kompleksi ei toiminut odotetusti, päätimme yksinkertaistaa kompleksin rakennetta. Tarkoituksena oli biotinyloid virus, jolloin se sitoutuisi suoraan streptavidiiniin, eikä 2D12-vasta-ainetta ei tarvittaisi ollenkaan. Biotinylaatiota varten viruksen E-proteiinin määrä määritettiin SDS-PAGE-geeliltä. E-proteiinin lisäksi geeliltä havaittiin kuitenkin useita muitakin proteiineja, jotka ovat peräisin viruksesta tai viruskasvatuksen aikana hajonneista soluista (kuva 18). Biotinylaatioissa tulisi ottaa huomioon myös muiden proteiinien määrä, ja laskea sopiva biotinylaatioaste virukselle. Tässä pro gradu -työssä viruksen biotinylaatiota ei kuitenkaan ehditty ajanpuutteen vuoksi optimoimaan, eikä yksinkertaistetun kompleksin sitoutumista ja internalisaatiota ehditty testaamaan B-soluissa.

4.7 *Jatkotutkimusmahdollisuudet*

Jotta välttyään vääriltä johtopäätöksiltä, surrogaattiantigeeni-kompleksin muodostumista ja sen laatua on analysoitava huolellisesti. Viruksen aggregoituminen on voinut tapahtua jo viruksen puhdistuksen aikana, mikä on voinut vaikuttaa ratkaisevasti kompleksin muodostumiseen. Viruksen puhdistamista eri PEG- tai sukroosipitoisuuksilla olisi mielenkiintoista kokeilla uudelleen, jotta nähtäisiin, onko näiden reagenssien pitoisuuksilla vaikutusta viruksen aggregoitumiseen. Esimerkiksi PEG:n liian korkea pitoisuus pakottaa viruspartikkelit lähemmäs toisiaan, mikä voi johtaa viruspartikkelien pysyvään aggregoitumiseen (Wälchli ym., 2020). Korkea pitoisuus saostaa myös näytteen epäpuhtauksia, kuten isäntäsolun proteiineja, jotka voivat yhdistää viruspartikkelit toisiinsa pysyviksi aggregaateiksi. Virusten puhdistamisessa voisi käyttää myös sukroosigradienttia, jolloin virus puhdistuu kahden sukroosipitoisuuden rajapintaan ja suurin osa epäpuhtauksista ajautuu gradientissa eri kohtaan. Pro gradu -työssä yritettiin myös yksinkertaistaa kompleksin rakennetta biotinyloimalla virus ja poistamalla rakenteesta 2D12-vasta-aine. Ajanpuutteen vuoksi tätä prosessia ei kuitenkaan ehditty optimoimaan. Jatkossa olisi mielenkiintoista testata miten pienempi kompleksin käyttäytyisi sitoutumis- ja internalisaatiokokeissa. Yksinkertaisempi rakenne ei ole kuitenkaan ongelmaton, sillä NHS-menetelmällä biotiini kiinnittyy usein viruksen pinnan lysiini-aminohappoihin, mikä poistaa positiivisia varauksia ja voi aiheuttaa spontaania aggregoitumista (Duran-Meza ym., 2021).

B-solujen aktivoitumista surrogaattiantigeeni-kompleksin sitoutumisen seurauksena voitaisiin tutkia myös mittaamalla B-solureseptorin välittämien signaaliteiden fosforylaatiokaskadeja Western blot -menetelmällä. Lisäksi B-solujen aktivaatiota voitaisiin tutkia mittaamalla solujen sisäistä kalsiumvirtausta virtaussytometrialla. Tutkimuksessa oli tarkoitus myös verrata viruksen internalisaation jälkeistä prosessointia ja esittelyä rokoteviruksen ja villityypin viruksen välillä, mutta tässä pro-gradu -tutkielmassa se ei ollut mahdollista, sillä villityypin keltakuumeviruksella työskentely vaatisi BSL3-tason laboratorion.

Tutkimuksessa käytetyn 17D-keltakuumeviruksen kasvatus ja surrogaattiantigeeni-kompleksin optimointi osoittautui odotettua haastavammaksi, mikä rajoitti mahdollisuuksia tutkia viruksen solunsisäistä kulkeutumista yksityiskohtaisesti. Seuraavaksi olisi mielenkiintoista selvittää, miten B-solut prosessoivat ja esittelevät 17D-keltakuumevirusta auttaja-T-soluille, kunhan kompleksin muodostuminen ja sen sitoutuminen ja internalisaatio saadaan optimoitua. Tämä on immunologisesti mielenkiintoista, koska 17D-keltakuumevirusrokote on yksi maailman

tehokkaimmista rokotteista, ja sen kyky aktivoida auttaja-T-soluja on avainasemassa pitkäkestoisen suojan luomisessa.

KIITOKSET

Haluan esittää kiitokset kaikille ohjaajilleni, jotka tukivat minua graduprosessin ajan. Kiitos erityisesti Pinja Jalkaselle, jonka kanssa pääsin syventymään keltakuumeviruksen kanssa työskentelyyn, ja joka sai minut innostumaan virologiasta. Kiitos Pieta Mattilalle, joka otti minut osaksi hänen upeaa tutkimusryhmäänsä, sekä kaikille tutkimusryhmän jäsenille, joiden kanssa vietettiin aikaa niin kahvihuoneessa kuin labrankin puolella. Kiitos myös parhaille toimistokavereille, Diogolle ja Mahnille, joiden kanssa oli aina mukava viettää aikaa ja tehdä gradua eteenpäin. Kiitos biologian laitoksen ohjaajalle Tiina Henttiselle, joka on ollut tukena niin graduprosessin kuin myös koko yliopisto-opintojen aikana. Oli mahtava saada graduohjaajaksi Tiina, sillä hänen kursseiltansa alkujaan kiinnostuin solubiologiasta. Kiitos myös kaikille läheisilleni, jotka ovat tukeneet minua gradun kirjoittamisen ja koko yliopisto-opintojen ajan.

LÄHTEET

- Abos, B., Wang, T., Secombes, C. J., & Tafalla, C. (2020). Distinct modes of action of CD40L and adaptive cytokines IL-2, IL-4/13, IL-10 and IL-21 on rainbow trout IgM+ B cells. *Developmental and Comparative Immunology*, *111*.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103752>
- Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology*, *69*(2), 695–700. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.2.695-700.1995>
- Anderson, H. A., Hiltbold, E. M., & Roche, P. A. (2000). Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nature Immunology*, *1*(2), 156–162. <https://doi.org/10.1038/77842>
- Anderson, H. A., & Roche, P. A. (2015). MHC class II association with lipid rafts on the antigen presenting cell surface. Teoksessa *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vsk. 1853, Numero 4, ss. 775–780). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.019>
- Arana, E., Vehlow, A., Harwood, N. E., Vigorito, E., Henderson, R., Turner, M., Tybulewicz, V. L. J., & Batista, F. D. (2008). Activation of the Small GTPase Rac2 via the B Cell Receptor Regulates B Cell Adhesion and Immunological-Synapse Formation. *Immunity*, *28*(1), 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.12.003>
- Avalos, A. M., & Ploegh, H. L. (2014). Early BCR events and antigen capture, processing, and loading on MHC class II on B cells. Teoksessa *Frontiers in Immunology* (Vsk. 5, Numero MAR). Frontiers Research Foundation.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00092>
- Barrett, A. D., & Teuwen, D. E. (2009). Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? Teoksessa *Current Opinion in Immunology* (Vsk. 21, Numero 3, ss. 308–313). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.018>
- Batista, F. D., Iber, D., & Neuberger, M. S. (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*, *411*(6836), 489–494. <https://doi.org/10.1038/35078099>
- Baumgarth, N. (2021). The Shaping of a B Cell Pool Maximally Responsive to Infections. *Annual Review of Immunology*, *39*(1), 103–129. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718-041238>
- Beasley, D. W. C., Morin, M., Lamb, A. R., Hayman, E., Watts, D. M., Lee, C. K., Trent, D. W., & Monath, T. P. (2013). Adaptation of yellow fever virus 17D to Vero cells is associated with mutations in structural and non-structural protein genes. *Virus Research*, *176*(1–2), 280–284. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.04.003>

- Bennett, N. R., Zwick, D. B., Courtney, A. H., & Kiessling, L. L. (2015). Multivalent Antigens for Promoting B and T Cell Activation. *ACS Chemical Biology*, *10*(8), 1817–1824. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00239>
- Bibby, S., Jung, J., Low, Y. S., Amarilla, A. A., Newton, N. D., Scott, C. A. P., Balk, J., Ting, Y. T., Freney, M. E., Liang, B., Grant, T., Coulibaly, F., Young, P., Hall, R. A., Hobson-Peters, J., Modhiran, N., & Watterson, D. (2025). A single residue in the yellow fever virus envelope protein modulates virion architecture and antigenicity (Nature Communications, (2025), 16, 1, (8449), 10.1038/s41467-025-63038-5). Teoksessa *Nature Communications* (Vsk. 16, Numero 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-65890-x>
- Bifani, A. M., Chan, K. W. K., Borrenberghs, D., Tan, M. J. A., Phoo, W. W., Watanabe, S., Goethals, O., Vasudevan, S. G., & Choy, M. M. (2023). Therapeutics for flaviviral infections. *Antiviral Research*, *210*. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105517>
- Boero, E., Gorham, R. D., Francis, E. A., Brand, J., Teng, L. H., Doorduyn, D. J., Ruyken, M., Muts, R. M., Lehmann, C., Verschoor, A., van Kessel, K. P. M., Heinrich, V., & Rooijackers, S. H. M. (2023). Purified complement C3b triggers phagocytosis and activation of human neutrophils via complement receptor 1. *Scientific Reports*, *13*(1), 274. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27279-4>
- Bonaldo, M. C., Sequeira, P. C., & Galler, R. (2014). The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. Teoksessa *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (Vsk. 10, Numero 5, ss. 1256–1265). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/hv.28117>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2 SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Breukels, M. A., Zandvoort, A., Rijkers, G. T., Lodewijk, M. E., Klok, P. A., Harms, G., & Timens, W. (2005). Complement Dependency of Splenic Localization of Pneumococcal Polysaccharide and Conjugate Vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology*, *61*(4), 322–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01584.x>
- Brown, B. K., & Song, W. (2001). The Actin Cytoskeleton is Required for the Trafficking of the B Cell Antigen Receptor to the Late Endosomes. *Traffic*, *2*(6), 414–427. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.002006414.x>
- Burton, D. R. (2023). Antiviral neutralizing antibodies: from in vitro to in vivo activity. *Nature Reviews Immunology*, *23*(11), 720–734. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00858-w>
- Busman-Sahay, K., Drake, L., Sitaram, A., Marks, M., & Drake, J. R. (2013). Cis and Trans Regulatory Mechanisms Control AP2-Mediated B Cell Receptor Endocytosis via Select Tyrosine-Based Motifs. *PLoS ONE*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054938>

- Carmona, L. M., & Schatz, D. G. (2017). New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination. *Teoksessa FEBS Journal* (Vsk. 284, Numero 11, ss. 1590–1605). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.13990>
- Carter, M. J., Mitchell, R. M., Sauteur, P. M. M., Kelly, D. F., & Trück, J. (2017). The antibody-secreting cell response to infection: Kinetics and clinical applications. *Teoksessa Frontiers in Immunology* (Vsk. 8, Numero JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00630>
- Cerutti, A., Cols, M., & Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Teoksessa Nature Reviews Immunology* (Vsk. 13, Numero 2, ss. 118–132). <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Chan, K. R., Wang, X., Saron, W. A. A., Gan, E. S., Tan, H. C., Mok, D. Z. L., Zhang, S. L. X., Lee, Y. H., Liang, C., Wijaya, L., Ghosh, S., Cheung, Y. B., Tannenbaum, S. R., Abraham, S. N., St John, A. L., Low, J. G. H., & Ooi, E. E. (2016). Cross-reactive antibodies enhance live attenuated virus infection for increased immunogenicity. *Nature Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.164>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. *Teoksessa Antibodies* (Vsk. 8, Numero 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>
- Chong, Z., Hui, S., Qiu, X., Palakurty, S., Sariol, A., Kaszuba, T., Nguyen, M. N., Li, P., Raju, S., Hall, P. D., Nelson, C. A., Baltazar-Perez, I., Price, D. A., Rothlauf, P. W., Crowe, J. E., Whelan, S. P. J., Leung, D. W., Amarasinghe, G. K., Bailey, A. L., ... Diamond, M. S. (2026). Multiple LDLR family members act as entry receptors for yellow fever virus. *Nature*, 649(8095), 173–182. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09689-2>
- Coêlho, D. F., Ferraz, M. V. F., Marques, E. T. A., Lins, R. D., & Viana, I. F. T. (2019). The influence of biotinylation on the ability of a computer designed protein to detect B-cells producing anti-HIV-1 2F5 antibodies. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.jmkgm.2019.107442>
- Collins, N. D., Beck, A. S., Widen, S. G., Wood, T. G., Higgs, S., & Barrett, A. D. T. (2018). Structural and nonstructural genes contribute to the genetic diversity of RNA viruses. *mBio*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mbio.01871-18>
- Cong, Y., McArthur, M. A., Cohen, M., Jahrling, P. B., Janosko, K. B., Josleyn, N., Kang, K., Zhang, T., & Holbrook, M. R. (2016). Characterization of Yellow Fever Virus Infection of Human and Non-human Primate Antigen Presenting Cells and Their Interaction with CD4+T Cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004709>

- Cresswell, P. (1996). Invariant Chain Structure and MHC Class II Function. *Cell*, 84(4), 505–507. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81025-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81025-9)
- Cyster, J. G. (2010). B cell follicles and antigen encounters of the third kind. Teoksessa *Nature Immunology* (Vsk. 11, Numero 11, ss. 989–996). <https://doi.org/10.1038/ni.1946>
- Davis, E. H., Beck, A. S., Strother, A. E., Thompson, J. K., Widen, S. G., Higgs, S., Wood, T. G., & Barrett, A. D. T. (2019). Attenuation of live-attenuated yellow fever 17D vaccine virus is localized to a high-fidelity replication complex. *mBio*, 10(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02294-19>
- Davis, M. M., & Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334(6181), 395–402. <https://doi.org/10.1038/334395a0>
- De Silva, N. S., & Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology*, 15(3), 137–148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>
- Degn, S. E., & Tolar, P. (2025). Towards a unifying model for B-cell receptor triggering. *Nature Reviews Immunology*, 25(2), 77–91. <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01073-x>
- Deng, Y. Q., Dai, J. X., Ji, G. H., Jiang, T., Wang, H. J., Yang, H. ou, Tan, W. L., Liu, R., Yu, M., Ge, B. X., Zhu, Q. Y., Qin, E. De, Guo, Y. J., & Qin, C. F. (2011). A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of e protein. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016059>
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Duran-Meza, A. L., Villagrana-Escareño, M. V., Ruiz-García, J., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2021). Controlling the surface charge of simple viruses. *PLoS ONE*, 16(9 September). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255820>
- Dutta, S. K., & Langenburg, T. (2023). A Perspective on Current Flavivirus Vaccine Development: A Brief Review. Teoksessa *Viruses* (Vsk. 15, Numero 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v15040860>
- Ehrenstein, M. R., & Notley, C. A. (2010). The importance of natural IgM: Scavenger, protector and regulator. Teoksessa *Nature Reviews Immunology* (Vsk. 10, Numero 11, ss. 778–786). <https://doi.org/10.1038/nri2849>
- Esson, R., Rodrigues De Sousa, E., Benair, L., Devard, N., Soulet, D., Gillet, A., Bassard, I., Falque, S., Chareyre, A., Marmin, M., Girerd-Chambaz, Y., Logvinoff, C., & Navarro Sanchez, M. E. (2022). Phenotypic and genetic characterization of a next generation live-attenuated yellow fever vaccine candidate. *Vaccine*, 40(38), 5641–5650. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.07.043>

- Fernandez-Garcia, M. D., Meertens, L., Chazal, M., Hafirassou, M. L., Dejarnac, O., Zamborlini, A., Despres, P., Sauvonnnet, N., Arenzana-Seisdedos, F., Jouvenet, N., & Amara, A. (2016). Vaccine and wild-type strains of yellow fever virus engage distinct entry mechanisms and differentially stimulate antiviral immune responses. *mBio*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.01956-15>
- Figueiredo, P. de O., Stoffella-Dutra, A. G., Costa, G. B., de Oliveira, J. S., Amaral, C. D., Santos, J. D., Rocha, K. L. S., Júnior, J. P. A., Nogueira, M. L., Borges, M. A. Z., Paglia, A. P., Labeaud, A. D., Abrahão, J. S., Kroon, E. G., de Oliveira, D. B., Drumond, B. P., & Trindade, G. de S. (2020). Re-emergence of yellow fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, lessons learned, and perspectives. *Teoksessa Viruses* (Vsk. 12, Numero 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12111233>
- Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *Journal of Clinical Investigation*, 109(3), 295–299. <https://doi.org/10.1172/jci14941>
- Gaythorpe, K. A. M., Hamlet, A., Jean, K., Ramos, D. G., Cibrelus, L., Garske, T., & Ferguson, N. (2021). The global burden of yellow fever. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.64670>
- Gebo, C., Hardy, C. S. C., McElvany, B. D., Graham, N. R., Lu, J. Q., Moradpour, S., Currier, J. R., Friberg, H., Gromowski, G. D., Thomas, S. J., Chan, G. C., Diehl, S. A., & Waickman, A. T. (2024). B cell receptor dependent enhancement of dengue virus infection. *PLoS Pathogens*, 20(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012683>
- Giancchetti, E., Cianchi, V., Torelli, A., & Montomoli, E. (2022). Yellow Fever: Origin, Epidemiology, Preventive Strategies and Future Prospects. *Teoksessa Vaccines* (Vsk. 10, Numero 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030372>
- Goldberg, B. S., & Ackerman, M. E. (2020). Antibody-mediated complement activation in pathology and protection. *Teoksessa Immunology and Cell Biology* (Vsk. 98, Numero 4, ss. 305–317). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/imcb.12324>
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., & Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285(5425), 221–227. <https://doi.org/10.1126/science.285.5425.221>
- Guo, W., Castaigne, J. G., Mooney, N., Charron, D., & Al-Daccak, R. (2003). Signaling through HLA-DR induces PKC β -dependent B cell death outside rafts. *European Journal of Immunology*, 33(4), 928–938. <https://doi.org/10.1002/eji.200323351>
- Haslwanter, D., Lasso, G., Wec, A. Z., Furtado, N. D., Raphael, L. M. S., Tse, A. L., Sun, Y., Stransky, S., Pedreño-Lopez, N., Correia, C. A., Bornholdt, Z. A., Sakharkar, M., Avelino-Silva, V. I., Moyer, C. L., Watkins, D. I., Kallas, E. G., Sidoli, S., Walker, L. M., Bonaldo, M. C., & Chandran, K. (2022). Genotype-specific features reduce the

- susceptibility of South American yellow fever virus strains to vaccine-induced antibodies. *Cell Host and Microbe*, 30(2), 248-259.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.12.009>
- Heath, W. R., Kato, Y., Steiner, T. M., & Caminschi, I. (2019). Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. Teoksessa *Current Opinion in Immunology* (Vsk. 58, ss. 44–52). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.04.003>
- Hernández-Pérez, S., Vainio, M., Kuokkanen, E., Šuštar, V., Petrov, P., Forstén, S., Paavola, V., Rajala, J., Awoniyi, L. O., Sarapulov, A. V., Vihinen, H., Jokitalo, E., Bruckbauer, A., & Mattila, P. K. (2020). B cells rapidly target antigen and surface-derived MHCII into peripheral degradative compartments. *Journal of Cell Science*, 133(5).
<https://doi.org/10.1242/JCS.235192>
- Howland, K. C., Ausubel, L. J., London, C. A., & Abbas, A. K. (2000). The Roles of CD28 and CD40 Ligand in T Cell Activation and Tolerance. *The Journal of Immunology*, 164(9), 4465–4470. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4465>
- Hughes, C. E., Benson, R. A., Bedaj, M., & Maffia, P. (2016). Antigen-presenting cells and antigen presentation in tertiary lymphoid organs. Teoksessa *Frontiers in Immunology* (Vsk. 7, Numero NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00481>
- Hämälistö, S., Del Valle Batalla, F., Yuseff, M. I., & Mattila, P. K. (2024). Endolysosomal vesicles at the center of B cell activation. *Journal of Cell Biology*, 223(3).
<https://doi.org/10.1083/jcb.202307047>
- Jacob-Nascimento, L. C., Anjos, R. O., Portilho, M. M., Cavalcanti, V. M., Paz, A. S., Santos, L. G., Sousa, M. S., Costa, J. G., Silva, M. R., Moreira, P. S. S., Kitron, U., Weaver, S. C., Santiago, M. B., Reis, M. G., & Ribeiro, G. S. (2025). Long-term persistence of serum IgM antibodies against chikungunya virus in patients with chronic arthralgia. *Virology Journal*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12985-025-02721-x>
- Kato, Y., Abbott, R. K., Freeman, B. L., Haupt, S., Groschel, B., Silva, M., Menis, S., Irvine, D. J., Schief, W. R., & Crotty, S. (2020). Multifaceted Effects of Antigen Valency on B Cell Response Composition and Differentiation In Vivo. *Immunity*, 53(3), 548-563.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.08.001>
- Kräutler, N. J., Suan, D., Butt, D., Bourne, K., Hermes, J. R., Chan, T. D., Sundling, C., Kaplan, W., Schofield, P., Jackson, J., Basten, A., Christ, D., & Brink, R. (2017). Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1259–1267. <https://doi.org/10.1084/jem.20161533>
- Kulkarni, R. (2020). Antibody-dependent enhancement of viral infections. Teoksessa *Dynamics of Immune Activation in Viral Diseases* (ss. 9–41). Springer Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-1045-8_2

- Kwak, K., Sohn, H., George, R., Torgbor, C., Manzella-Lapeira, J., Brzostowski, J., & Pierce, S. K. (2023). B cell responses to membrane-presented antigens require the function of the mechanosensitive cation channel Piezo1. *Science Signaling*, *16*(804). <https://doi.org/10.1126/scisignal.abq5096>
- Lam, J. H., Smith, F. L., & Baumgarth, N. (2020). B Cell Activation and Response Regulation during Viral Infections. *Viral Immunology*, *33*(4), 294–306. <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0207>
- Langemeyer, L., Fröhlich, F., & Ungermann, C. (2018). Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. *Trends in Cell Biology*, *28*(11), 957–970. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.06.007>
- Lesinski, G. B., & Westerink, M. A. J. (2001). Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *Teoksessa Journal of Microbiological Methods* (Vsk. 47, Numero 2, ss. 135–149). [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00290-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00290-1)
- Liu, C., Miller, H., Orłowski, G., Hang, H., Upadhyaya, A., & Song, W. (2012). Actin Reorganization Is Required for the Formation of Polarized B Cell Receptor Signalingosomes in Response to Both Soluble and Membrane-Associated Antigens. *The Journal of Immunology*, *188*(7), 3237–3246. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103065>
- Liu-Helmersson, J., Rocklöv, J., Sewe, M., & Brännström, Å. (2019). Climate change may enable *Aedes aegypti* infestation in major European cities by 2100. *Environmental Research*, *172*, 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.026>
- Lloyd, K. A., Wang, J., Urban, B. C., Czajkowsky, D. M., & Pleass, R. J. (2017). Glycan-independent binding and internalization of human IgM to FCMR, its cognate cellular receptor. *Scientific Reports*, *7*. <https://doi.org/10.1038/srep42989>
- Lu, H., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2007). Extent to which hairpin opening by the Artemis: DNA-PKcs complex can contribute to junctional diversity in V(D)J recombination. *Nucleic Acids Research*, *35*(20), 6917–6923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm823>
- Lutz, J., Heideman, M. R., Roth, E., Van Den Berk, P., Müller, W., Raman, C., Wabl, M., Jacobs, H., & Jäck, H. M. (2011). Pro-B cells sense productive immunoglobulin heavy chain rearrangement irrespective of polypeptide production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(26), 10644–10649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019224108>
- Malinova, D., Wasim, L., Newman, R., Martínez-Riaño, A., Engels, N., & Tolar, P. (2021). Endophilin A2 regulates B-cell endocytosis and is required for germinal center and humoral responses. *EMBO reports*, *22*(9). <https://doi.org/10.15252/embr.202051328>

- Martin, A., & Scharff, M. D. (2002). Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12304–12308. <https://doi.org/10.1073/pnas.192442899>
- Martínez-Riaño, A., Bovolenta, E. R., Mendoza, P., Oeste, C. L., Martín-Bermejo, M. J., Bovolenta, P., Turner, M., Martínez-Martín, N., & Alarcón, B. (2018). Antigen phagocytosis by B cells is required for a potent humoral response. *EMBO reports*, 19(9). <https://doi.org/10.15252/embr.201846016>
- McShane, A. N., & Malinova, D. (2022). The Ins and Outs of Antigen Uptake in B cells. Teoksessa *Frontiers in Immunology* (Vsk. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.892169>
- Mok, D. Z. L., & Chan, K. R. (2020). The effects of pre-existing antibodies on live-attenuated viral vaccines. Teoksessa *Viruses* (Vsk. 12, Numero 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12050520>
- Natkanski, E., Lee, W. Y., Mistry, B., Casal, A., Molloy, J. E., & Tolar, P. (2013). B cells use mechanical energy to discriminate antigen affinities. *Science*, 340(6140), 1587–1590. <https://doi.org/10.1126/science.1237572>
- Nolte, M. A., Beliën, J. A. M., Schadee-Eestermans, I., Jansen, W., Unger, W. W. J., Van Rooijen, N., Kraal, G., & Mebius, R. E. (2003). A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *Journal of Experimental Medicine*, 198(3), 505–512. <https://doi.org/10.1084/jem.20021801>
- Notario, G. R., & Kwak, K. (2022). Increased B Cell Understanding Puts Improved Vaccine Platforms Just Over the Horizon. Teoksessa *Immune Network* (Vsk. 22, Numero 6). Korean Association of Immunologists. <https://doi.org/10.4110/in.2022.22.e47>
- Packard, T. A., & Cambier, J. C. (2013). B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Reports*, 5. <https://doi.org/10.12703/P5-40>
- Pal Singh, S., Dammeijer, F., & Hendriks, R. W. (2018). Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. Teoksessa *Molecular Cancer* (Vsk. 17, Numero 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0779-z>
- Panyutich, A. V., Baturevich, E. A., Kolesnikova, T. S., & Ganz, T. (1993). The effect of biotinylation on the antigenic specificity of anti-defensin monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 158(2), 237–242. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90219-W](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90219-W)
- Perera-Lecoin, M., Meertens, L., Carnec, X., & Amara, A. (2013). Flavivirus entry receptors: An update. Teoksessa *Viruses* (Vsk. 6, Numero 1, ss. 69–88). <https://doi.org/10.3390/v6010069>

- Petrova, V. N., Muir, L., McKay, P. F., Vassiliou, G. S., Smith, K. G. C., Lyons, P. A., Russell, C. A., Anderson, C. A., Kellam, P., & Bashford-Rogers, R. J. M. (2018). Combined influence of B-cell receptor rearrangement and somatic hypermutation on B-cell class-switch fate in health and in chronic lymphocytic leukemia. *Frontiers in Immunology*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01784>
- Pierson, T. C., & Diamond, M. S. (2020). The continued threat of emerging flaviviruses. Teoksessa *Nature Microbiology* (Vsk. 5, Numero 6, ss. 796–812). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Pierson, T. C., & Kielian, M. (2013). Flaviviruses: Braking the entering. Teoksessa *Current Opinion in Virology* (Vsk. 3, Numero 1, ss. 3–12). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.12.001>
- Pillai, S., & Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. Teoksessa *Nature Reviews Immunology* (Vsk. 9, Numero 11, ss. 767–777). <https://doi.org/10.1038/nri2656>
- Pone, E. J., Hernandez-Davies, J. E., Jan, S., Silzel, E., Felgner, P. L., & Davies, D. H. (2022). Multimericity Amplifies the Synergy of BCR and TLR4 for B Cell Activation and Antibody Class Switching. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.882502>
- Pons Royo, M. del C., & Jungbauer, A. (2025). Polyethylene glycol precipitation: fundamentals and recent advances. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 55(8), 935–954. <https://doi.org/10.1080/10826068.2025.2470220>
- Pradhan, S., Varsani, A., Leff, C., Swanson, C. J., & Hariadi, R. F. (2022). Viral Aggregation: The Knowns and Unknowns. Teoksessa *Viruses* (Vsk. 14, Numero 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v14020438>
- Racine, R., & Winslow, G. M. (2009). IgM in microbial infections: Taken for granted? Teoksessa *Immunology Letters* (Vsk. 125, Numero 2, ss. 79–85). <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.06.003>
- Rastogi, I., Jeon, D., Moseman, J. E., Muralidhar, A., Potluri, H. K., & McNeel, D. G. (2022). Role of B cells as antigen presenting cells. Teoksessa *Frontiers in Immunology* (Vsk. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.954936>
- Reth, M., & Wienands, J. (1997). INITIATION AND PROCESSING OF SIGNALS FROM THE B CELL ANTIGEN RECEPTOR. *Annual Review of Immunology*, 15(1), 453–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.453>
- Richter, K. N., Revelo, N. H., Seitz, K. J., Helm, M. S., Sarkar, D., Saleeb, R. S., D'Este, E., Eberle, J., Wagner, E., Vogl, C., Lazaro, D. F., Richter, F., Coy-Vergara, J., Coceano, G., Boyden, E. S., Duncan, R. R., Hell, S. W., Lauterbach, M. A., Lehnart, S. E., ...

- Rizzoli, S. O. (2018). Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. *The EMBO Journal*, *37*(1), 139–159. <https://doi.org/10.15252/embj.201695709>
- Roberts, A. D., Davenport, T. M., Dickey, A. M., Ahn, R., Sochacki, K. A., & Taraska, J. W. (2020). Structurally distinct endocytic pathways for B cell receptors in B lymphocytes. *Molecular Biology of the Cell*, *31*(25), 2826–2840. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-08-0532>
- Roche, P. A., & Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. Teoksessa *Nature Reviews Immunology* (Vsk. 15, Numero 4, ss. 203–216). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3818>
- Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A. L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R., Bolen, J. B., & Nussenzweig, M. (1993). Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta. *The Journal of experimental medicine*, *178*(3), 1049–1055. <https://doi.org/10.1084/jem.178.3.1049>
- Sandberg, J. T., Ols, S., Löfling, M., Varnaité, R., Lindgren, G., Nilsson, O., Rombo, L., Kalén, M., Loré, K., Blom, K., & Ljunggren, H.-G. (2021). Activation and Kinetics of Circulating T Follicular Helper Cells, Specific Plasmablast Response, and Development of Neutralizing Antibodies following Yellow Fever Virus Vaccination. *The Journal of Immunology*, *207*(4), 1033–1043. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001381>
- Sandel, P. C., & Monroe, J. G. (1999). Negative Selection of Immature B Cells by Receptor Editing or Deletion Is Determined by Site of Antigen Encounter. *Immunity*, *10*(3), 289–299. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80029-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80029-1)
- Santos-Peral, A., Lupp, F., Goresch, S., Nikolova, E., Zaucha, M., Lehmann, L., Dahlstroem, F., Karimzadeh, H., Thorn-Seshold, J., Winheim, E., Schuster, E. M., Dobler, G., Hoelscher, M., Kümmerer, B. M., Endres, S., Schober, K., Krug, A. B., Pritsch, M., Barba-Spaeth, G., & Rothenfusser, S. (2024). Prior flavivirus immunity skews the yellow fever vaccine response to cross-reactive antibodies with potential to enhance dengue virus infection. *Nature Communications*, *15*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45806-x>
- Schlesinger, J. J., Walsh, E. E., & Brandriss, M. W. (1984). Analysis of 17D yellow fever virus envelope protein epitopes using monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, *65*(10), 1637–1644. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-10-1637>
- Schulz, O., Edwards, A. D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., & Reis e Sousa, C. (2000). CD40 Triggering of Heterodimeric IL-12 p70 Production by Dendritic Cells In Vivo Requires a Microbial Priming Signal. *Immunity*, *13*(4), 453–462. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00045-5)

- Sela-Culang, I., Kunik, V., & Ofran, Y. (2013). The structural basis of antibody-antigen recognition. *Frontiers in Immunology*, 4(OCT).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>
- Sène, M. A., Xia, Y., & Kamen, A. A. (2022). Overview of recent advances in Vero cells genomic characterization and engineering for high-throughput vaccine manufacturing. Teoksessa *Clinical and Translational Discovery* (Vsk. 2, Numero 2). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/ctd2.40>
- Servadio, J. L., Muñoz-Zanzi, C., & Convertino, M. (2021). Estimating case fatality risk of severe Yellow Fever cases: systematic literature review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06535-4>
- Shlomchik, M. J., Luo, W., & Weisel, F. (2019). Linking signaling and selection in the germinal center. Teoksessa *Immunological Reviews* (Vsk. 288, Numero 1, ss. 49–63). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imr.12744>
- Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. R. (2018). The immune response against flaviviruses. Teoksessa *Nature Immunology* (Vsk. 19, Numero 11, ss. 1189–1198). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>
- Smith, K., Shah, H., Muther, J. J., Duke, A. L., Haley, K., & James, J. A. (2016). Antigen nature and complexity influence human antibody light chain usage and specificity. *Vaccine*, 34(25), 2813–2820. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.040>
- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J., & Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*, 71(11), 8475–8481.
<https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8475-8481.1997>
- Stavnezer, J., & Schrader, C. E. (2014). IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *The Journal of Immunology*, 193(11), 5370–5378.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401849>
- Stebegg, M., Kumar, S. D., Silva-Cayetano, A., Fonseca, V. R., Linterman, M. A., & Graca, L. (2018). Regulation of the germinal center response. Teoksessa *Frontiers in Immunology* (Vsk. 9, Numero OCT). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- Stoddart, A., Dykstra, M. L., Brown, B. K., Song, W., Pierce, S. K., & Brodsky, F. M. (2002). Lipid Rafts Unite Signaling Cascades with Clathrin to Regulate BCR Internalization. *Immunity*, 17(4), 451–462. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00416-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00416-8)
- Tkachenko, A., Kupcova, K., & Havranek, O. (2024). B-Cell Receptor Signaling and Beyond: The Role of Igα (CD79a)/Igβ (CD79b) in Normal and Malignant B Cells. Teoksessa *International Journal of Molecular Sciences* (Vsk. 25, Numero 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25010010>

- Verstegen, N. J. M., Unger, P. P. A., Walker, J. Z., Nicolet, B. P., Jorritsma, T., Van Rijssel, J., Spaapen, R. M., De Wit, J., Van Buul, J. D., Ten Brinke, A., & Van Ham, S. M. (2019). Human B cells engage the Nck/PI3K/Rac1 axis to internalize large particles via the IgM-BCR. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00415>
- Vire, B., David, A., & Wiestner, A. (2011). TOSO, the Fc μ Receptor, Is Highly Expressed on Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells, Internalizes upon IgM Binding, Shuttles to the Lysosome, and Is Downregulated in Response to TLR Activation. *The Journal of Immunology*, *187*(8), 4040–4050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100532>
- Wang, J., Sohn, H., Sun, G., Milner, J. D., & Pierce, S. K. (2014). The autoinhibitory C-terminal SH2 domain of phospholipase C- γ 2 stabilizes B cell receptor signalosome assembly. *Science Signaling*, *7*(343). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005392>
- Wec, A. Z., Haslwanter, D., Abdiche, Y. N., Shehata, L., Pedreño-Lopez, N., Moyer, C. L., Bornholdt, Z. A., Lilov, A., Nett, J. H., Jangra, R. K., Brown, M., Watkins, D. I., Ahlm, C., Forsell, M. N., Rey, F. A., Barba-Spaeth, G., Chandran, K., & Walker, L. M. (2020). Longitudinal dynamics of the human B cell response to the yellow fever 17D vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(12), 6675–6685. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921388117>
- Wen, Y., Jing, Y., Yang, L., Kang, D., Jiang, P., Li, N., Cheng, J., Li, J., Li, X., Peng, Z., Sun, X., Miller, H., Sui, Z., Gong, Q., Ren, B., Yin, W., & Liu, C. (2019). The regulators of BCR signaling during B cell activation. *Teoksessa Blood Science* (Vsk. 1, Numero 2, ss. 119–129). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/BS9.0000000000000026>
- Wieten, R. W., Jonker, E. F. F., Van Leeuwen, E. M. M., Remmerswaal, E. B. M., Ten Berge, I. J. M., De Visser, A. W., Van Genderen, P. J. J., Goorhuis, A., Visser, L. G., Grobusch, M. P., & De Bree, G. J. (2016). A single 17D yellow fever vaccination provides lifelong immunity; characterization of yellow-fever-specific neutralizing antibody and T-cell responses after vaccination. *PLoS ONE*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149871>
- Wälchli, R., Fanizzi, F., Massant, J., & Arosio, P. (2020). Relationship of PEG-induced precipitation with protein-protein interactions and aggregation rates of high concentration mAb formulations at 5 °C. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *151*, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.03.011>
- Xu, Z.-S., Du, W.-T., Wang, S.-Y., Wang, M.-Y., Yang, Y.-N., Li, Y.-H., Li, Z.-Q., Zhao, L.-X., Yang, Y., Luo, W.-W., & Wang, Y.-Y. (2024). LDLR is an entry receptor for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Cell Research*, *34*(2), 140–150. <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00917-w>

- Yuseff, M. I., Pierobon, P., Reversat, A., & Lennon-Duménil, A. M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: A crucial role for cell polarity. Teoksessa *Nature Reviews Immunology* (Vsk. 13, Numero 7, ss. 475–486). <https://doi.org/10.1038/nri3469>
- Yuseff, M.-I., Reversat, A., Lankar, D., Diaz, J., Fanget, I., Pierobon, P., Randrian, V., Larochette, N., Vascotto, F., Desdouets, C., Jauffred, B., Bellaiche, Y., Gasman, S., Darchen, F., Desnos, C., & Lennon-Duménil, A.-M. (2011). Polarized Secretion of Lysosomes at the B Cell Synapse Couples Antigen Extraction to Processing and Presentation. *Immunity*, 35(3), 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.008>
- Zhang, J., Zeng, W., Han, Y., Lee, W. R., Liou, J., & Jiang, Y. (2023). Lysosomal LAMP proteins regulate lysosomal pH by direct inhibition of the TMEM175 channel. *Molecular Cell*, 83(14), 2524-2539.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.06.004>
- Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2017). Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. Teoksessa *Viruses* (Vsk. 9, Numero 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v9110338>
- Zhao, R., Wang, M., Cao, J., Shen, J., Zhou, X., Wang, D., & Cao, J. (2021). Flavivirus: From structure to therapeutics development. Teoksessa *Life* (Vsk. 11, Numero 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11070615>
- Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L. M., Godfrey, D. I., Toellner, K. M., Smyth, M. J., Nutt, S. L., & Tarlinton, D. M. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *Journal of Experimental Medicine*, 207(2), 365–378. <https://doi.org/10.1084/jem.20091777>