

TBEV-infektion serologinen tunnistaminen: NS1- ja E- proteiinien hyödyntäminen ELISA-testissä

Biokemia / Bioteknologian laitos

Pro gradu -tutkielma

Nenna Tanskanen

30.4.2026

Turku

Pro gradu -tutkielma

Koulutusohjelma, oppiaine: Biokemia

Tekijä: Nenna Tanskanen

Otsikko: TBEV-infektion serologinen tunnistaminen: NS1- ja E-proteiinien hyödyntäminen ELISA-testissä

Ohjaajat: Dosentti Pekka Kolehmainen, Dosentti Laura Kakkola

Sivumäärä: 64 sivua

Päivämäärä: 30.4.2026

Puutiaisaivotulehdusvirus (engl. tick-borne encephalitis virus, TBEV) aiheuttaa ihmiselle yleensä lievän kuumeisen infektion. Osa potilaista saa keskushermosto-oireisen vakavan aivotulehduksen. Flaviviruksiin kuuluvalla TBE-viruksella on kolme alatyyppeä: eurooppalainen, siperialainen ja kaukoitainen. Suomessa esiintyy eurooppalaista ja siperialaista alatyyppeä. TBE-virusta vastaan on rokote, jossa inaktivoitunut TBE-virus saavat aikaan immuunireaktion viruksen E (envelope)-proteiinia vastaan. TBEV:n ei-rakenneproteiini 1 (engl. non-structural 1, NS1) erittyy verenkiertoon virusinfektion aikana aiheuttaen kuoriproteiini (engl. envelope, E) -immunitetin lisäksi NS1-immunivasteen infektoituneilla henkilöillä. Puutiaiset levittävät TBE-virusta, joka on endeeminen 27 Euroopan maassa, ja ilmastonmuutoksen myötä puutiaiset ja TBEV leviävät uusille alueille. Suomessa TBEV-tapaukset ovat lähes kolminkertaistuneet verrattuna vuoteen 2015, myös rokotetuilla esiintyvät läpäisyinfektiot ovat lisääntyneet. Rokotekattavuuden lisääntyessä olisi tärkeää pystyä erottamaan infektoituneet henkilöt rokotetuista.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa TBEV-proteiineja ja pystyttää niiden avulla serologiset menetelmät TBEV-infektion ja -rokotteiden aikaansaamien immuunivasteiden analysoimista varten. Tutkimuksessa käytettiin Expi293-suspensiosolujärjestelmää NS1-proteiinien tuottoon. E-proteiini tuotto oli tehty aiemmin yhteistyötahon toimesta. Tuotettujen proteiinien puhtaus ja koko määritettiin SDS-PAGE- ja immunoblottausmenetelmillä. NS1- ja E-proteiinien immunogeenisuus ja vasta-aineiden esiintyvyys seeruminäytteissä määritettiin ELISA-testillä. Kontrollivasta-aineita varten immunisoitiin yksi kani NS1-proteiinilla ja toinen kani kaupallisella TBEV-rokotteella.

CD33-sekreetiosignaalin avulla NS1-proteiini saatiin tuotettua liukoisena, mikä mahdollisti proteiinien puhdistamisen. NS1- ja E-proteiiniin pohjautuen pystytettiin ELISA-määritykset proteiini-spesifisten vasta-ainevasteiden tunnistamiseksi. Kahden ELISA-määrityksen yhdistelmä mahdollisti infektoituneiden ja rokotettujen serologisen erottelun. Kanien immunisaatiossa tuotetut anti-TBEV-rokote ja anti-NS1 antiseerumit tunnistavat spesifisti kohdeproteiiniensa ja osoittautuivat siten sopiviksi kontrollireagensseiksi.

Avainsanat: TBEV, serologia, NS1, puutiaisaivotulehdusvirus, vasta-aineet

Sisällysluettelo

1	Lyhenteet	5
2	Johdanto	7
2.1	Puutiaisaivotulehdusvirus (tick-borne encephalitis virus, TBEV)	7
2.2	TBE-viruksen rakenne	8
2.2.1	TBE- viruksen proteiinien tehtävät	9
2.3	TBE-virusinfektion taudinkuva	11
2.4	TBE-viruksen alatyypit	12
2.5	TBE-viruksen vektori	12
2.6	TBEV:n patogeneesi ja elimistön immuunireaktio	14
2.7	Nykytilanne TBEV:n diagnostiikassa	15
2.8	TBEV-rokotteet	17
2.9	Läpimurtoinfektiot	18
3	Tavoitteet	20
4	Materiaalit ja menetelmät	21
4.1	Tutkimuslupa	21
4.2	Potilasnäytteet	21
4.3	InFusion kloonaus	21
4.4	Proteiinituotanto nisäkässolussa	24
4.5	Proteiinien puhdistus	25
4.6	SDS-PAGE	26
4.7	Immunofluoresenssimääritys	26
4.8	Immunoblottaus	27
4.9	Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA)	28
4.10	Kani-immunisaatio	29
5	Tulokset	30
5.1	Sekretiosignaalin kloonaus	31

5.2	Proteiinituotto	32
5.2.1	Sekretiosignaalien testaus HEK293-soluissa	32
5.2.2	Transfektioagenssin testaus	33
5.2.3	NS1-proteiinituoton optimointi HEK293-soluissa	34
5.2.4	NS1-proteiinin tuotto Expi293-tuottosysteemissä	35
5.3	NS1-proteiinin ja E-proteiinin III-domeenin puhdistus	36
5.3.1	Spinnikolumni	36
5.3.2	Pakattu kromatografiakolumni	37
5.4	ELISA-testin pystyttäminen	41
5.4.1	NS1-proteiiniin perustuvan ELISA:n pystyttäminen	41
5.4.2	E-proteiiniin perustuvan ELISA:n pystyttäminen	44
5.4.3	Seerumiaineiston analyysi NS1-ELISA:lla	46
5.4.4	Immunisoitujen kaniin antiseerumien testaus	48
6	Tulosten tarkastelu	52
6.1.1	NS1-proteiinin ja E-proteiinin III-domeenin tuotanto	52
6.1.2	NS1-serologisen ELISA-testin pystyttäminen	54
6.1.3	E-proteiinin III-domeenin antigeenisuuden testaaminen	55
6.1.4	Potilasnäytesarjan analysoiminen NS1-serologisella testillä	56
6.1.5	TBEV-infektion tunnistaminen immunisoitujen kaniin seerumeilla	57
7	Päätelmät	59
	Lähteet	60

1 Lyhenteet

AS03	rokotteen tehosteaine eli adjuvantti 03
A549	alveoliepiteelisolujen adenokarsinoma-alatyypin solulinja
bp	emäspari
BSL-3	turvataso 3 laboratorio
CAP	RNA:n päähän liitettävä erikoisrakenne
CD33	Cluster of differentiation 33-sekreetiosignaali
CO₂	hiilidioksidi
DAPI	4',6-diamidino-2-fenyyliindoli
dsRNA	kaksijuosteiset RNA
E	envelope
ECDC	Euroopan tautiehkäisy- ja valvontakeskus
EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
ELISA	entsyymiperusteinen immunomääritys
ER	endoplastinen retikulumi
Eur	eurooppalainen
Expi293	HEK293-soluista muokattu suspensiosolulinja
FA	formaldehydi
FBS	sikiövasikan seerumi
FE	kaukoitainen
GAPDH	glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi
HA-tag	hemagglutiniinitagi
HEK293	ihmisen sikiön munuaissolulinja
His-tag	polyhistidiinitagi
HRP	piparjuuriperoksidaasi
HSA	ihmisen seerumin albumiinin sekreetiosignaali
HUH7	ihmisen maksasyövänsolulinja
H₂SO₄	rikkihappo
IgG	immunoglobuliini G
IgM	immunoglobuliini M
inf.	infektoitunut

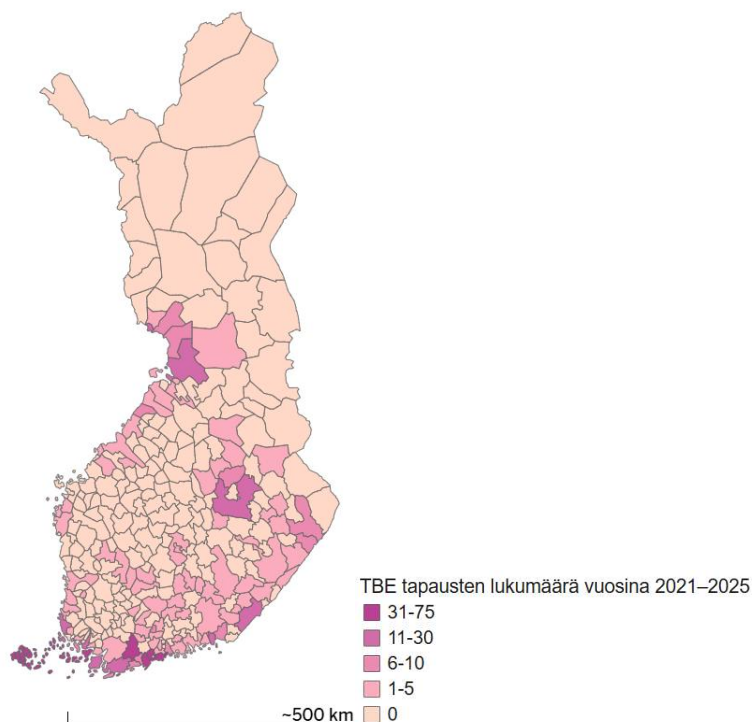
LB	Luria-Broth
NaCl	natriumkloridi
Ni-NTA	nikkeli-nitrilotrietikkahappo
NP-40	Nonidet P-40
NS-proteiini	ei-rakenne-proteiini
OD	optinen tiheys
PBS	fosfattipuskuroitu suolaliuos
PCR	polymeraasiketjureaktio
prM	pre-membraani
PVDF	polyvinyylideenifluoridi
RU/ml	suhteellinen yksikkö millilitraa kohden
S1	piikkiproteiini 1
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
Sib	siperialainen
SOC	superoptimaalinen kasvatusliuos
TBE	puutiaisaivotulehdus
TBEV	puutiaisaivotulehdusvirus
TAE	Tris-asettaatti-EDTA
TBST	Tris-puskuroitu saliini-Tween 20
TGS	Tris-glysiini-SDS
TMB	3,3',5,5'-tetrametyyllibentsidiini
Tris-HCl	Tris-hydrokloridi
UTR	koodaamaton alue
UV	ultraviolettisäteily
vac	rokotettu
VeroE6	afrikkalaisen vihreän apinan munuaisen epiteelisoluja
WNV	Länsi-Niilin virus

2 Johdanto

Virukset ovat solunsisäisiä loisia, jotka ovat täysin riippuvaisia solunsisäisestä ympäristöstä uusien tarttuvien viruspartikkelien muodostamiseksi (Louten 2016). Viruksien geneettinen materiaali muodostuu joko DNA:sta tai RNA:sta. Virukset infektoivat ihmisiä ja aiheuttavat erilaisia tauteja. Zoonooseiksi kutsutaan taudinaiheuttajia, jotka siirtyvät selkärangkaisista eläimistä ihmiseen (Rosenberg 2015). Niveljalkaisten välittämiä viruksia kutsutaan arboviruksiksi (Shope ja Meegan 1997). Esimerkiksi hyttysset, punkit ja sääsket levittävät näitä viruksia. Kaikki arbovirukset ovat zoonooseja, mihin kuuluu esimerkiksi flavivirukset ja togavirukset.

2.1 Puutiaisivotulehdusvirus (tick-borne encephalitis virus, TBEV)

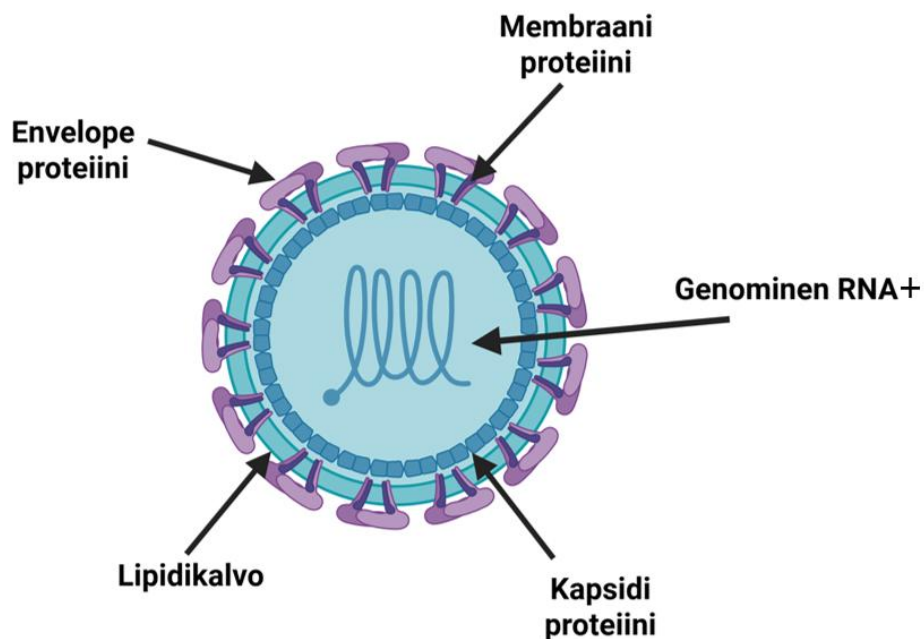
Puutiaisivotulehdusvirus eli TBEV aiheuttaa ihmiselle yleensä lievän infektion, johon liittyy kuumeilua ja päänsärkyä. Infektio voi kuitenkin levitä aivoihin ja aiheuttaa vakavan aivotulehduksen (Chiffi ja muut 2023). TBE-virus kuuluu flaviviruksiin esimerkiksi keltakuumeviruksen, Länsi-Niilin viruksen ja dengueviruksen kanssa. TBE-viruksella on kolme alatyyppeä, jotka ovat eurooppalainen, siperialainen ja kaukoitainen (Kunze ja muut 2022). Suomessa näistä esiintyy eurooppalaista ja siperialaista alatyyppeä (Bogovic ja Strle 2015). Puutiaiset levittävät TBE-virusta, joka on endeeminen 27 Euroopan maassa (Kunze ja muut 2022). Tautitapaukset lisääntyvät ja niitä raportoidaan uusilta alueilta, minkä takia TBEV:n aiheuttama tautitaakka on huomioon otettava (Aregay ja muut 2024). Suomessa TBEV-tapaukset ovat lähes kolminkertaistuneet verrattuna vuoteen 2015 (”Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta—Tapaukset—THL kuutio- ja tiivistekäyttöliittymä” ei pvm.). Tautitapauksien ilmeneminen uusilta alueilta voisi kertoa TBEV:tä kantavien puutiaisten leviämisestä. Suomessa diagnosoituja TBEV-tapauksia raportoi Terveyden ja Hyvinvoinninlaitos (THL). Kuvassa 1 nähdään kuntakohtaiset TBEV-tapaukset. Tapauksia raportoidaan eniten rannikkoalueilta erityisesti Lounais- ja Etelä-Suomen rannikoilta. TBEV-tapaus paikannetaan alueelle, josta henkilö on punkin saanut.



Kuva 1. TBEV-tapaukset kunnittain Suomessa vuosina 2021–2025. Suomessa TBEV-tapaukset painottuvat rannikkoseuduille: Lounais-Suomeen, Ahvenanmaalle ja Etelä-Suomeen ("Workbook: TBE-rokotusohjelma" ei pvm., THL).

2.2 TBE-viruksen rakenne

TBE-viruksen genomi on yksijuosteinen positiivinen RNA (Lindenbach ja Rice 2003). Se koodaa rakenneproteiineja ja ei-rakenneproteiineja. Rakenneproteiinit kuoriproteiini (E), membraaniproteiini (M) ja kapsidiproteiini (C) koostavat viruspartikkelin (kuva 2.). Rakenneproteiinit ja ei-rakenneproteiinit tuotetaan aluksi polyproteiinina (kuva 3.) (Camarão ja muut 2023). Polyproteiinista pilkkotaan toiminnallisiksi proteiineiksi kolme rakenneproteiinia ja seitsemän ei-rakenneproteiinia (NS-proteiinit, engl. non-structural proteins: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B ja NS5). NS-proteiinit toimivat viruksen replikaatiossa, patogeenisissä ja isännän immuunipuolustuksen väistämässä.



Kuva 2. TBE-viruksen rakenne. TBEV partikkeli koostuu rakenneproteiineista, joita ovat envelope-, membraani-, kapsidiproteiini. Memraani- ja envelope-proteiinit ovat kiinnittyneet lipidikalvoon, jonka sisäpuolella kapsiproteiinit muodostavat kapsidin. Kapsidin suojaa sisällään viruksen perimäainesta, joka on +RNA:ta. (Kuva tehty Biorenderillä)

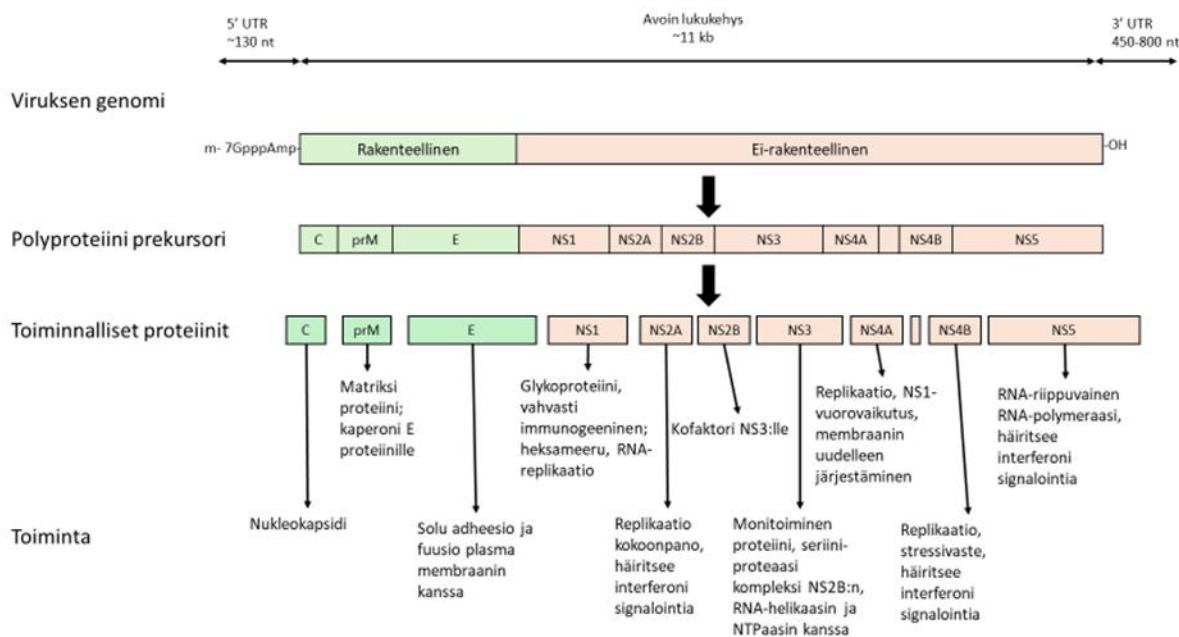
2.2.1 TBE- viruksen proteiinien tehtävät

C-proteiini on polyproteiinin aminoterminalisessa päässä (Růžek ja muut 2020). Näin ollen se tuotetaan ensimmäisenä. Viruksen rakenteessa C-proteiini on vuorovaikutuksessa RNA-genomin kanssa. Infektoituneessa solussa C-proteiinia kerääntyy endoplasmiseen retikulumiin (ER) lipidipisaroiden pintaan.

PrM glykoproteiini on M-proteiinin prekursori (Růžek ja muut 2020). Sen tärkein tehtävä on kaperoniaktiivisuus. PrM tukee E-proteiinin laskostumista ja kypsymistä. PrM ja E muodostavat heterodimeerin, joka suojelee E-proteiinia fuusiolta ennen kypsymistä. PrM pilkotaan ennen solusta poistumista, minkä jälkeen E-proteiini nousee viruspartikkelin pinnalle. E-proteiini sitoutuu kohdesolujen pintareseptoreihin ja aikaansaa tunkeutumisen isäntäsoluun. Nämä ominaisuudet mahdollistavat TBE-viruksen virulenssin. Lisäksi viruspartikkelin pinnalla oleva E-proteiini on tärkein kohde immuunireaktion seurauksena syntyville vasta-aineille.

NS1 on glykoproteiini, joka on kiinnittyneenä solukalvoon, mutta infektoitunut solu erittää sitä myös solun ulkopuolelle (Lindenbach ja Rice 2003). NS1 muodostaa NS4A:n

ja NS4B:n sekä viruksen replikaatiossa syntyvän kaksijuosteisen RNA:n (dsRNA) kanssa flaviviruksille ominaisen replikaatiokompleksin (Muller ja Young 2013). NS1-proteiini eritetään liukoisena lipoproteiinina solun ulkoiseen tilaan, jossa se muokkaa isäntäeliön immuunivastetta ja verisuonten läpäisevyyttä (Puerta-Guardo ja muut 2016). NS2A on hydrofobinen transmembraaniproteiini, jonka uskotaan olevan yhteydessä viruksen RNA:n 3'-päähän proteiinia koodaamattomaan alueeseen (3' UTR), kuten myös C-prM-E ja NS2B-NS3-komplekseihin (Barnard ja muut 2021). Nämä vuorovaikutukset kuuluvat viruksen kokoamisprosessiin (Zhang ja muut 2016). NS2B toimii kofaktorina seriiniproteaasi NS3:lle ja ankkuroi transmembraaniproteiinina NS3:n ER-kalvolle. NS3 on entsyymi, joka katalysoi monenlaisia reaktioita (Luo ja muut 2008). NS3:n tehtäviin kuuluvat viruksen polyproteiiniprekursorin katkaiseminen, toimiminen helikaasina kaksijuosteiselle RNA:lle ennen replikaatiota ja RNA 5'-trifosfataasi aktiivisuus RNA:n 5'-päähän defosforylaatiota varten. Lisäksi NS3 toimii RNA-stimuloituna nukleosiditrifosfataasina. NS4A on transmembraaniproteiini, jolla on keskeinen rooli ER-kalvoston muokkauksessa ja sitä kautta replikaatiokompleksin muodostuksessa (Klaitong ja Smith 2021). NS4B kuuluu replikaatiokompleksiin ja on vuorovaikutuksessa NS1:n, NS2B:n ja NS4A:n kanssa (Li ja Kang 2022). NS4B:n tärkeä tehtävä on tuoda NS3 ja NS5 kontaktiin virus-RNA:n kanssa. NS4A ja NS4B ovat mukana autofagosytoosissa ja solun säätelyn muokkauksessa kuten solukuoleman estämisessä ja virusinfektion edistämässä (Liang ja muut 2016). NS5 toimii polymeraasina, metyyli transferaasina ja on vastuussa CAP-pään liittämisestä virus-RNA:n päähän sekä virus-RNA:n replikaatiosta (Klema ja muut 2015). Lisäksi se inhiboi isäntäsolun interferonien välittämää signaalointia (Grant ja muut 2016).



Kuva 3. TBE-viruksen proteiinit ja niiden toiminta. TBE-virusta koodaava genomi koostuu rakenteellisia proteiineja koodaavasta osasta ja ei-rakenteellisia proteiineja koodaavasta osasta (Chiffi ja muut 2023; Pustijanac ja muut 2023). TBE-viruksen genomien pituus on yksitoistatuhatta emäsparia (11 kb). Rakenteelliset ja ei-rakenteelliset proteiinit muodostavat polyproteiinin prekursorin, joka pilkotaan toiminnallisiksi proteiineiksi. Proteiinien tehtävät viruksen elinkierrossa on mainittu kuvassa.

2.3 TBE-virusinfektion taudinkuva

Ihmisellä TBEV-infektion aiheuttama taudinkuva on kaksivaiheinen (Duodecim, Terveyskirjasto). Ensin oireet alkavat kuumeiluna, epämääräisinä pahan olon ja sairauden tuntemuksina. Tauti on kuitenkin useimmiten lieväoireinen ja toisen vaiheen keskushermosto-oireet kehittyvät vain osalle potilaista (n. 20–30 %). Aivotulehduksessa esiintyy neurologisia oireita, joita ovat kouristukset, tajunnanhäiriöt ja halvausoireet. Lisäksi voi olla kuumetta, päänsärkyä, pahoinvointia ja niskajäykkyyttä. Suomessa TBE-tapauksia on raportoitu yhteensä 1840 seurantavuosina 1995–2025 (”Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta—Tapaukset—THL kuutio- ja tiivistekäyttöliittymä” 13.11.25.). Näiden vuosien aikana tapauksien määrä on kasvanut. Vuonna 2015 tapauksia oli 68, kun taas vuonna 2024 tapauksia oli 196. Vuonna 2025 tapauksia oli jo 225 marraskuun alkuun mennessä.

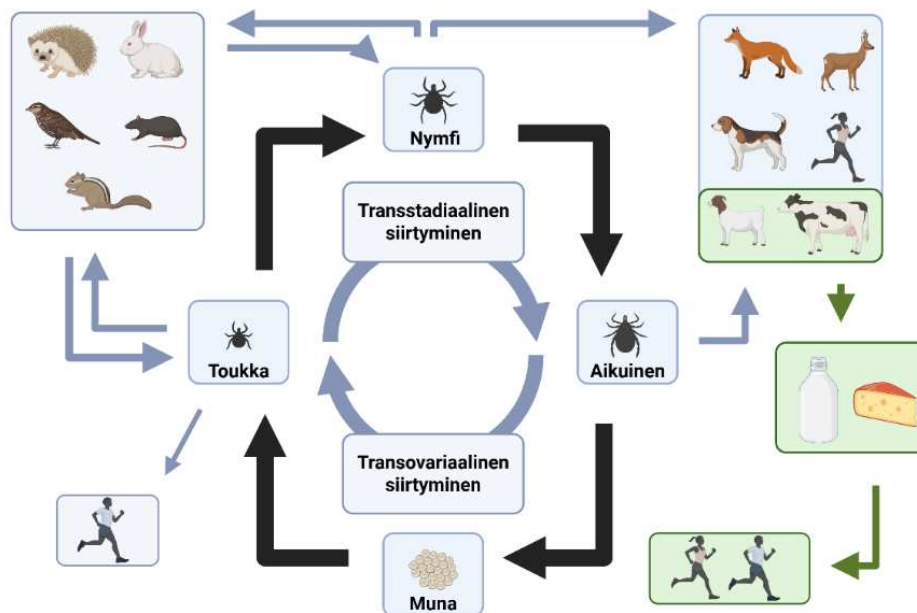
2.4 TBE-viruksen alatyypit

TBE-viruksen alatyypit ovat eurooppalainen, siperialainen ja kaukoitainen (Duodecim, Terveyskirjasto). Eurooppalainen alatyypin (TBEV-Eur) on yleinen läpi Euroopan ja myös Venäjän Eurooppaan kuuluvissa osissa (Gritsun, Frolova, ja muut 2003; Gritsun, Lashkevich, ja muut 2003). Siperialaista (TBEV-Sib) ja kaukoitaista (TBEV-FE) tyyppiä tavataan pääasiassa Aasiassa. Esiintymisalueet risteävät jonkin verran. Esimerkiksi Baltian maissa ja Suomessa esiintyy sekä eurooppalaista että siperialaista alatyypin. Alatyypeistä TBEV-FE aiheuttaa todennäköisimmin vakavan infektion. TBEV-Sib ja TBEV-Eur aiheuttavat tavallisesti lievän tautimuodon. TBEV-Sib-alatyypin on havaittu aiheuttavan joissakin tapauksissa myös pitkittyneen puutiaisaivotulehduksen, joka johtuu kroonisesta virusinfektiosta. Vaikka todennäköisyys vakavaan infektiin eroaa eri alatyypeillä, kaikilla alatyypeillä infektiot voivat johtaa myös vakavaan tautimuotoon (Kaiser 2012). Tämän takia alatyypin määrittämisellä ei voida ennustaa infektion vakavuutta. TBEV-infektioita määrää on ollut selvässä kasvussa vuosina 2015–2020 ympäri Eurooppaa (Kunze ja muut 2022). Tapauksia on raportoitu myös alueilta, joiden on aiemmin ajateltu olevan vapaita TBE-viruksesta. Suomessa 2010-luvulta lähtien tapauksia on raportoitu enenemässä määrin uusilta alueilta (”Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta—Tapaukset—THL kuutio- ja tiivistekäyttöliittymä” 13.11.25.). Todennäköisiä tekijöitä tähän ovat muutokset ihmisten tavoissa, kuten lisääntynyt luonnossa liikkuminen, TBE-viruksen kehittynyt diagnostiikka, muutokset puutiaisten elinympäristöissä ja ilmastonmuutoksen aiheuttamat vaikutukset, kuten ilmaston lämpeneminen (Kunze ja muut 2022). Lisäksi TBE:n tiedostaminen on lisääntynyt, näin ollen hoitohenkilökunta tunnistaa taudinkuvan paremmin.

2.5 TBE-viruksen vektori

TBE-viruksen tärkein vektori eli levittäjä on nimen mukaisesti puutiainen (*Ixodes ricinus* ja *Ixodes persulcatus*) (Duodecim, Terveyskirjasto). Molemmat puutiaislajit kantavat TBEV-Eur:ta ja TBEV-Sib:ta (Jääskeläinen ja muut 2006). *I. ricinus* on kuitenkin eurooppalaisen alatyypin päävektori ja *I. persulcatus* siperialaisen. Puutiaisen elämänsykli koostuu neljästä vaiheesta: muna, toukka, nymfi ja aikuinen (Chiffi ja

muut 2023). Kun toukka kuoriutuu munasta, se tarvitsee veriaterian siirtyäkseen seuraavaan kehitysvaiheeseen. Myös nymfistä aikuiseksi kehittyminen vaatii veriaterian. Puutiainen voi saada TBE-viruksen kuoriutumisen jälkeen missä kehitysvaiheessa tahansa. Virus pysyy jakaantumiskelpoisena kehitysvaiheiden läpi ja kulkee myös aikuiselta puutiaiselta muniin (kuva 4.). Pienet nisäkkäät saavat TBEV-tartunnan syömällä virusta kantavia toukkia ja nymfejä. Nämä nisäkkäät levittävät virusta uusille puutiaisille, jotka ruokailevat kyseisestä nisäkkästä. Vaikka nisäkäs ei olisi vielä vireeminen, puutiainen voi saada siltä tartunnan, jos isännällä ruokailee samaan aikaan tartunnan saanut puutiainen. Puutiaisia ja niiden mukana TBEV:tä levittävät myös linnut (Mikryukova ja muut 2014). Puutiaiset voivat ruokailla myös isommista eläimistä kuten lehmistä, mutta niillä tartunta on lievä ja näin ollen niiden kautta TBE-viruksen leviäminen on vähäistä (Chiffi ja muut 2023). Virus voi kuitenkin siirtyä lehmän tai vuohen verenkierrosta maitorauhaseen ja mahdollisesti infektoida ihmisen, joka juo pastöroimatonta maitoa (Ruzek ja muut 2019). Ihminen voi saada puutiaisen puremasta tartunnan ja taudin, mutta viruksen elinkierrossa ihminen ei enää levitä sitä eteenpäin.



Kuva 4. TBE-viruksen elinkierto luonnossa. Puutiainen toimii TBE-viruksen levittäjänä (Chiffi ja muut 2023). Puutiainen voi saada virustartunnan kolmessa kehitysvaiheessa ja virus kulkee puutiaisessa transstadiaalisena siirtymisenä eli kehitysvaiheesta toiseen. Transovariaalisesti aikuiselta tartunta siirtyy sen munimiin muniin. Puutiaiset tartuttavat pieniä nisäkkäitä, jotka voivat infektoida uusia puutiaisia. Ihmiseen päätyvän viruksen kierto ei jatku ihmisestä eteenpäin. (Kuva tehty Biorenderillä perustana Chiffi ja muut 2023)

2.6 TBEV:n patogeenesi ja elimistön immuunireaktio

TBE-viruksen on väistettävä monta puolustusjärjestelmää ennen kuin se aiheuttaa infektion ihmiskehossa (Wikel 2013). Ensimmäinen elimistön puolustusjärjestelmän este on iho, jonka virus ohittaa suoraan puutiaisen puremassa. Purema aiheuttaa ihonalaisen injektion, jossa viruspartikkelit kulkevat punkin syljen mukana. Puutiaisen syljessä on molekyyliä, jotka säätelevät ihmisen puolustusjärjestelmää ja -reaktiota. Esimerkiksi ne säätelevät kipuaistimusta, kutinaa, tulehdusta ja hankittua immunitteettia. Ihonalaisessa kudoksessa virus aiheuttaa synnynnäisen immuunivasteen aktivoitumisen (Stibraniova ja muut 2025) ja infektoi paikallisesti Langerhanssin soluja ja valkosoluja (Labuda ja muut 1996). Näiden solujen mukana TBEV kulkeutuu imusolmukkeisiin. Siellä viruksen jakautuminen jatkuu ja virus leviää verenkiertoon, mikä aiheuttaa primäärisen viremian (Camarão ja muut 2023).

Viruksen on selvittävä ihmisen immuunipuolustuksen pyrkimyksestä neutraloida ja eliminoida viruspartikkeli (Camarão ja muut 2023). NS1-proteiini kiertää verenkierrossa

akuutin infektion aikana. NS1-proteiini on mukana monessa mekanismissa, joilla virus väistää immuunijärjestelmän ja tunkeutuu keskushermostoon. Esimerkiksi näihin mekanismeihin kuuluu komplementti reaktion estäminen ja Toll-like-reseptorivälitteisen signaalin estäminen.

Immuunijärjestelmän solut havaitsevat NS1-proteiinin, mikä aiheuttaa elimistössä NS1-proteiinin kohdistuvan B-soluvasteen, jonka seurauksena muodostuu viruksen tunnistavia vasta-aineita (Aregay ja muut 2024). Vasta-ainetuotannon lisäksi virusaiheuttaa soluvälitteisiä puolustusvasteita, joihin kuuluu T-soluvasteiden aktivoituminen (Stibraniova ja muut 2025). Naiivit T-solut aktivoituvat ja erilaistuvat T-auttaja-, -tappaja- ja -muistisoluiksi. T-auttajasolu tunnistaa infektoituneen solun ja houkuttelee paikalle tuhoajasoluja. T-tappajasolut tunnistavat infektoituneen solun ja tuhoavat sen. T-muistisolut säilyvät elimistössä pitkään ja aiheuttavat nopean puolustusreaktion seuraavan kerran, kun tunnistavat viruspartikkelin osia. NS1-proteiineja eritetään hexameereinä ja proteiinin määrä seerumissa on yhteydessä taudin vakavuuteen (Aregay ja muut 2024). TBEV-infektiossa elimistön B-solut tuottavat vasta-aineita NS1-proteiinin lisäksi E-proteiinia vastaan (Stibraniova ja muut 2025).

Jos virus pystyy väistämään immuunijärjestelmää, infektio leviää perifeeraalisiin kudoksiin ja elimiin aiheuttaen sekundaarisen infektion (Prokopowicz ja muut 1995). Tässä kohtaa TBEV voi ylittää kolmannen suojajärjestelmän, joka on veriaivoeste (Palus ja muut 2017). Veriaivoeste suojaa keskushermostoa erottaen aivojen välitilan verenkierrosta. Veriaivoesteen ylitys on kriittinen vaihe aivotulehduksen kehittymiselle ja etenemiselle. Keskushermostossa TBEV alkaa infektoimaan hermosoluja.

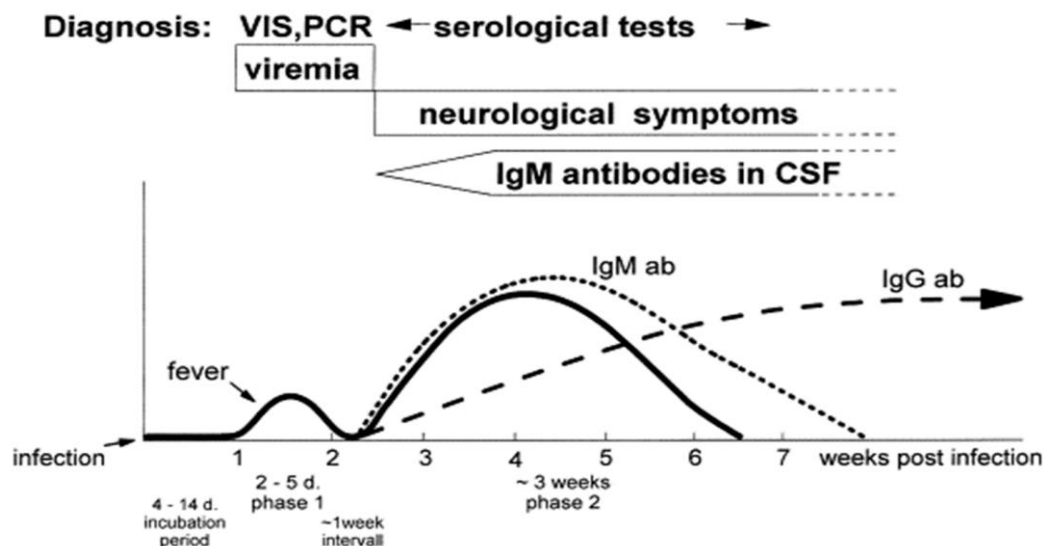
2.7 Nykytilanne TBEV:n diagnostiikassa

Virusdiagnostiikka perustuu viruksen nukleiinihappojen määrittämiseen, virusantigeenien tai virusvasta-aineiden tunnistamiseen seerumi- tai selkäydinnestestä ("Mitä lääkärin on hyvä tietää virusdiagnostiikasta", Aikakausikirja Duodecim 23.4.2026.). PCR-menetelmällä voidaan määrittää viruksen nukleiinihappoja, pikatestien avulla voidaan tunnistaa viruksen antigeenejä ja virusvasta-aineita voi tunnistaa ELISA- ja neutralisaatiomenetelmällä.

Suomessa TBEV-infektio diagnosoidaan pääasiassa verinäytteestä tai harvoin aivo-selkäydin nesteestä tutkittujen vasta-aineiden perusteella (”Puutiaisaiivokuumeen ja borrelioosin laboratoriolöydökset” 2021, Duodecim Terveyskirjasto). Vuonna 1956 on vahvistettu ensimmäinen puutiaisvälitteinen aivotulehdus Suomessa (S. Rytty 2024).

TBE-tapauksien määritelmät vaihtelevat maan mukaan (Kunze ja muut 2022). Euroopan tautienehkäisy ja -valvontakeskus (ECDC) on määritellyt, että TBE:n varmistaminen vaatii oireita keskushermoston tulehduksesta. Tämä ilmenee vain taudin toisessa vaiheessa, jolloin lievemmät tautimuodot voivat jäädä kokonaan diagnosoimatta tai johtavat väärään diagnoosiin. Koska lievempi muoto ei täytä ECDC:n määritelmää, niitä ei kaikissa maissa ilmoiteta TBE-tapauksina. Tämä johtaa TBE:n aliraportointiin. Erityisesti lapsilla tauti on monesti lievä ja näin ollen suurin osa lapsien TBE-taudeista jää huomaamatta (M. E. A. Hansson ja muut 2011).

ELISA-testi on eniten käytetty menetelmä TBE-viruksen diagnostiikassa. Sillä havaitaan vasta-aineet TBE-virusta vastaan. ELISA-testi on käytettävissä ympäri Eurooppaa (Prevention ja Control 2012). PCR-testit ja neutralisaatiotestit ovat myös mahdollisia, mutta PCR-testin herkkyys on huono ja neutralisaatiotesti vaatii turvalaboratoriotilat (BSL-3). PCR-testi rajoittuu lyhyeen ikkunaan viremian aikana (kuva 5.). Sitä käytetään erityisesti immunosuppressiopotilailla, joilla vasta-aineiden tuotanto on heikkoa. Neutralisaatiotesti on käytössä pääasiassa tutkimuksessa. TBE:n aikaisessa vaiheessa TBEV-RNA voidaan havaita verestä (Erber ja muut 2019). Tällöin ei ole vielä vasta-aineet TBE-virusta vastaan. Kun vasta-aineita muodostuu, virus-RNA:n havaitseminen ei usein ole enää mahdollista perusterveillä potilailla.



Kuva 5. TBEV-infektion kaksivaiheinen kulku. Lyhyen inkubaation jälkeen TBEV-aiheuttaa kuumeinfektion, jonka aikana TBEV voidaan havaita PCR-diagnostiikan avulla (Holzmann 2003). Taudin toisessa vaiheessa potilaalle tulee keskushermosto-oireita, jolloin diagnosointi tehdään serologisten testien avulla.

Aliraportointia voi tapahtua myös TBE-viruksen ja Länsi-Niilin viruksen (West Nile virus, WNV) ristireagoinnin takia (Kunze ja muut 2022), koska alueilla, joissa sekä TBEV että WNV ovat endeemisiä, vasta-aineet ristireagoivat ELISA-testissä. Ristireagointi on mahdollista myös muiden flavivirusten kanssa. Tämä voi johtaa TBE:n väärään diagnoosiin.

Myös TBEV-olatyyppien aikaansaamassa immuunivasteessa on eroja. Kun TBEV-Eur infektioissa vasta-aineita syntyy pian infektion jälkeen, TBEV-Sib- ja TBEV-Fe-infektioissa (Erber ja muut 2019) sekä läpäisyinfektioissa (Aregay ja muut 2024) potilaalla ei välttämättä ole vielä vasta-aineita virusta vastaan, kun hän joutuu sairaalaan. Tämä voi johtaa väärään diagnoosiin maissa, joissa esiintyy näitä alatyyppisiä.

2.8 TBEV-rokotteet

Joitakin virusinfektioita vastaan on kehitetty rokotteita, joissa ihmiseen yleisimmin injektoidaan heikennetty virus tai viruksen osia (Kayser ja Ramzan 2021). Elimistössä vieraat viruspartikkelit aiheuttavat immuunipuolustusreaktion, jonka seurauksena elimistössä muodostuu vasta-aineita virusta vastaan. Kun elimistö kohtaa seuravan

kerran viruksen, immuunipuolustus reagoi virukseen nopeammin ja tehokkaammin, mikä voi estää infektion tai estää vakavan tautimuodon.

Euroopassa on saatavilla kaksi rokotetta TBE-virusta vastaan (Slon Campos ja muut 2018). Molemmissa rokotteissa inaktivoitunut TBE-virus aiheuttavat immunisaation ihmisen immuunijärjestelmässä. Rokotteet aikaansaavat vasta-aineiden kehittymisen pääasiassa viruksen E-proteiinia vastaan ja näin saatu immuunivaste toimii kaikkia kolmea alatyyppeä vastaan (Duodecim, Terveyskirjasto). Rokotteiden on raportoitu muodostavan vasta-aineita mahdollisesti myös NS1-proteiinia vastaan, varsinkin useampien tehosterokotteiden jälkeen, vaikka rokotteissa on käytetty vain viruspartikkelin proteiineja (Ackermann-Gäumann ja muut 2023).

TBEV-rokotukseen kuuluu kolme pistosta ensimmäisen vuoden aikana ja sen jälkeen tehosterokotuksia kolmen ja viiden vuoden päästä (Chiffi ja muut 2023). Useamman tutkimuksen mukaan molempien rokotteiden serokonversioaste on 92–100 %, mitattuna ELISA:lla tai neutralisaatiotestillä (Kunze ja muut 2022). Rokotus on edelleen tehokkain tapa suojautua TBE-viruksen aiheuttamalta taudilta. Rokotussuositukset vaihtelevat eri maiden välillä, mutta myös maiden sisällä eri alueiden välillä. Suomessa kansallisen rokotusohjelman mukaan ilmaista rokotusta suositellaan lounaisrannikolla, Ahvenanmaalla, Turun saaristossa ja tietyillä alueilla Kaakkois-Suomessa asuville. Näillä alueilla TBEV:n riski on korkea, ja muualla asuville suositellaan omakustannerokotetta, jos liikkuu paljon riskialueen luonnossa tai asuu näillä alueilla väliaikaisesti (Terveystieteiden tutkimuskeskus, THL). Tämä on seurausta TBE-viruksen vaihtelevasta endeemisyydestä eri alueilla (Kunze ja muut 2022). Rokotekattavuus vaihtelee todella paljon Euroopan eri maissa ja monessa maassa kattavuutta ei ole tutkittu.

2.9 Lämpimurtoinfektiot

Vaikka TBEV-rokotteiden tehokkuus on tutkitusti yli 90 % kaiken ikäisillä, läpimurtoinfektioita on raportoitu ympäri Eurooppaa (Kunze ja muut 2022). Maailmalla on raportoitu noin 15 000 kliinistä TBE-virus tapaus, joista osa on ollut rokotetuilla (K. E. Hansson ja muut 2020; Wagner ja muut 2020). Näistä rokotettujen läpimurtoinfektioista suurin osa on ollut vakavia tautitapauksia. Lämpimurtoinfektioissa

kohtalainen tai vakava tauti alkaa jo varhaisessa vaiheessa ja on suurempi todennäköisyys vakavien neurologisten oireiden kehittymiselle kuin primaarisessa infektiossa (Aregay ja muut 2024). Läpimurtoinfektioiden piirteitä ovat myöhässä kehittyvä IgM-vaste ja TBEV-vasta-aineet selkäydinnäytteessä (Morgardt ja muut 2026). Vakavissa läpimurtotapauksissa havaittiin matalammat NS1-spesifiset vasta-ainetasot kuin infektioiden ilman rokotuksia (Aregay ja muut 2024).

3 Tavoitteet

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa TBEV:n proteiineja, joiden avulla voitiin erottaa ja analysoida TBEV-infektion ja -rokotteen aikaansaamat immuunivasteet henkilöissä, jotka ovat sairaalahoidossa puutiaisen pureman jälkeisten neurologisten oireiden takia (projekti Tick-borne diseases in central nervous system, TBD-in-CNS, tutkimusyhteistyö professori Jukka Hytösen kanssa, Turun yliopisto ja Varha).

Tutkimalla terveiden henkilöiden (FinnHealth 2017) TBEV:lle altistuminen ja TBEV-rokotusten aikaansaaman immuunivasteen selvitimme, kuinka suuri osuus otannasta on mahdollisesti rokotettuja ja kuinka suurella osuudella on joskus ollut TBEV-infektio. Kliinisen haasteen tällä hetkellä tuo infektion erottaminen rokotettujen immuunivasteesta, joten tavoitteemme oli pystyttää toimiva nisäkässolutuottojärjestelmä, jolla TBEV:n NS1-proteiini saadaan tuotettua. Tämän proteiinin onnistuneella tuotolla mahdollistettiin sen käyttö vasta-ainetesteissä. E-proteiini saatiin yhteistyökumppanilta (professori. Olli Ritvos, Helsingin yliopisto) ja koko viruksen osalta käytössämme oli kaupallinen diagnostinen kitti (EUROIMMUNE).

Tuotetuilla proteiineilla pystytettiin ELISA-menetelmä, jolla voi todeta ihmisseerumeista TBEV-vasta-aineet ja erottaa infektoituneet henkilöt (E- ja NS1-proteiinin tunnistavia vasta-aineita) vain rokotetuista henkilöistä (vain E-proteiinin tunnistavia vasta-aineita).

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Tutkimuslupa

Potilasnäytteiden keräämiseen ja tutkimiseen haettiin tutkimuslupaa Varsinais-Suomen hyvinvointilaitokselta (VARHA). Lupahakemusta varten valmisteltiin tutkimussuunnitelma näytteiden tutkimiselle. Lupa haettiin osana tutkimusryhmän TBEV-projektia, jonka osana graduprojekti toteutettiin. TBEV-projektia varten kolmen vuoden ajalta (elokuu 2025 - heinäkuu 2028) on kerätty ja kerätään seeruminäytteitä potilailta, jotka ovat tulleet keskushermosto-oireiden takia sairaalaan. Lupa haettiin 100 TBEV-positiiviselle ja 100 negatiiviselle näytteelle. Tässä tutkimuksessa etuliitteellä inf. ja vac merkityt näytteet ovat tämän luvan alla. Tutkimuksessa käytettiin myös THL:n Finnterveys kohortin näytteitä (108 näytettä), jotka on merkitty tutkimuksessa näytenumeroin.

4.2 Potilasnäytteet

Kliiniseltä mikrobiologialta saatuja anonyymejä iän ja sukupuolen mukaan sovitettuja seeruminäytteitä keskushermosto-oireisista TBEV-positiivisista ja TBEV-negatiivisista potilaista käytettiin menetelmien kehittämiseen. Kontrollinäytteinä käytettiin TBEV-negatiivisia seeruminäytteitä. Näytteiden mukana tullutta tietoa TBEV-rokotustaustasta käytettiin, jos sellainen oli merkitty. Näytteet tulivat anonyymeinä ilman potilastietoja.

Terveyden- ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) kanssa yhteistyöstä saatiin käyttöön seeruminäytteitä terveiltä henkilöiltä. Vuonna 2017 kerättyä tuhatta seeruminäytettä (Lamppu ja muut 2025) testattiin kaupallisella (Anti-TBE Virus ELISA 2.0 (IgG), EUROIMMUN) TBE-kokovirus testillä ja pystytetyllä NS1-ELISA-testillä (108 näytettä).

4.3 InFusion kloonaus

Proteiinituotantoa varten TBEV:n eurooppalaisen alatyypin NS1-geeni (TBEV-Eur-NS1) kloonattiin tuottovektoriin pcDNA 3.1-His. Alukkeen avulla NS1-geenin N-terminaaliseen päähän lisättiin sekreetiosignaaliptidi ja C-terminaaliseen päähän

His-tagin sekvenssi puhdistusta varten. Sekreetiosignaaleja testattiin kahta erilaista: CD33 (engl. cluster of differentiation 33) ja HSA (engl. human serum albumin). Sekreetiosignaalipeptidi ohjaa proteiinin solun eritysjärjestelmään. E-proteiinin III-domeenin geeni kloonattiin samalla protokollalla pcDNA3.1-vektoriin kuin NS1-proteiinin geeni ja tuottovektoriin kloonattiin myös CD33-sekreetiosignaalipeptidi. PcDNA3.1-His vektori linearisoitiin BamH1-katkaisuentsyymillä (Thermo Scientific) avulla kahdesta plasmidista, joissa oli SARS-CoV-2 tai MERS-CoV S1-proteiinin geeni. FastAP reagenssin (Thermo Scientific) avulla defosforyloitiin linearisoidun vektorin päät. Reaktiossa käytettiin Fast Digest -puskuria ja 5µg sirkulaarista pcDNA 3.1-His plasmidia. Reaktioseosta inkuboitiin 10 min 37°C ja 15 min 65°C, jonka jälkeen seos siirrettiin jälle. Linearisoitu vektori ajettiin agarosigeelialektroforeesilla 1 %:lle geelille TAE-puskurissa ja geelin väriaineena käytettiin Midori Greeniä (NIPPON Genetics EUROPE).

Linearisoitu vektori leikattiin geeliltä ja puhdistettiin Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitin avulla. NS1-insertti amplifioitiin PCR-menetelmällä. PCR-reaktioseos sisälsi CloneAmp Hifi PCR Premix, 5'pään ja 3'pään alukkeita 0.25µM (NS1-inserttien alukkeet CD33-signaalin kanssa taulukossa 1, HSA-signaalin kanssa taulukossa 2 ja E-proteiinin III-domeenin alukkeet CD33-signaalin kanssa taulukossa 3), TBEV-Eur-NS1-pcDNA3.1 90ng ja nukleaasi-vapaata vettä 25µl asti. PCR-reaktio (Taulukko 4) ajettiin T100 Thermal Cycler-laitteella (Biorad).

Taulukko 1. TBEV-Eur-NS1-CD33-His-vektorin kloonausalukkeet.

Vektorin ylijäämä, signaali, His-tag, insertin ylijäämä

5' pään aluke:	5' <u>CACACTGGACTAGTATGGAGCTCCTGCTCCTCATC</u> <u>CTGGCCGCTGCTGCTGGCCTGCCGCTGGC</u> <u>AGCCGCCGGATCCACCATGGAC</u>	Pituus: 86bp, T _m :84°C, GC:66 %, T _m (insertin ylijäämä): 45 °C
3' pään aluke:	5' GAGCTCGGATCCTCA <u>ATGATGATGATGATGA</u> <u>TGGGCCACCACCATG</u>	Pituus: 46bp, T _m :72°C, GC:52 %, T _m (insertin ylijäämä): 44 °C

Taulukko 2. TBEV-Eur-NS1-HSA-His-vektorin kloonausalukkeet

Vektorin ylijäämä, signaali, His-tag, insertin ylijäämä

5' pään aluke:	5' <u>CACACTGGACTAGTATGAAGTGGGT</u> <u>AACCTTTATTTCCCTTCTTTTTCTTTAGCTCGGCTTATTCCAGGG</u> <u>GTGTGTTTCGTGAGGATCCACCATGGAC</u>	Pituus:101bp, T _m :77, GC:47 %, T _m (insertin ylijäämä): 45
3' pään aluke:	5' <u>GAGCTCGGATCCTCAATGATGATGATGA</u> <u>TGATGGGCCACCACCATG</u>	Pituus: 46bp, T _m :72, GC:52 %, T _m (insertin ylijäämä): 44

Taulukko 3. TBEV-Eur-E-DIII-CD33-His-vektorin kloonausalukkeet

Vektorin ylijäämä, signaali, His-tag, insertin ylijäämä

5' pään aluke:	5' <u>TGGACTAGTGGATCCATGGAGCTCCTGCTCCT</u> <u>CATCCTGGCCGCTGCTGCTGGCCTGCCGCTGGCA</u> <u>GCCGCCAAGGGCCTGACCTAC</u>	Pituus: 87bp, T _m :85°C, GC:67 %, T _m (insertin ylijäämä): 49 °C
3' pään aluke:	5' <u>GAGCTCGGATCCTCAGCTCAGTGATGATGA</u> <u>TGGTGTGGTGATGGGATCC</u>	Pituus: 50bp, T _m :74°C, GC:56 %, T _m (insertin ylijäämä): 49 °C

Taulukko 4. PCR-reaktion kulku.

Lämpötila (°C)	Aika (s)	Lämpötila (°C)	Aika (s)
98	10	98	10
45	10	60	10
72	6	72	6
Syklit	x10		x24

PCR-reaktion tuote ajettiin agarosigeelielektroforeesilla (1 % agarosigeeli, Midori Green) 1 tunti 110 V:n virralla. Näyte ladattiin geelille latauspuskurin kanssa (Loading buffer, Thermo Scientific). Molekyylipainon standardina käytettiin GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). PCR-fragmentti leikattiin UV-pöydän päällä ja DNA

puhdistettiin leikatusta agarosigeelin palasta Macherey-Nagel NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitin avulla.

Kloonausreaktiossa käytetään 200ng puhdistettua PCR fragmenttia ja 50ng linearisoitua vektoria sekä InFusion Entsyymi premixiä (TAKARA). Reaktioseosta inkuboitii 15 minuuttia 50°C:ssa ja siirrettiin sitten jäälle, minkä jälkeen reaktioseosta yhdistettiin sulatettujen kompetenttien Stellar-solujen kanssa, jotka ovat *E. coli* HST08 -linjan soluja. Näillä soluilla on korkea transformaatio tehokkuus. Liuosta inkuboitii jäällä 30 minuuttia. Soluille aiheutettiin lämpöshokki 42°C vesihauteessa 45 sekuntia, jonka aikana bakteerisolut ottavat plasmidit sisäänsä. Sen jälkeen solut jäähdytettiin jäällä ennen kuin ne siirrettiin SOC-mediumiin ja inkubaattoriin tunniksi (37°C). Solukasvatus levitettiin lopuksi luria broth (LB)-maljalle (ampisilliini 100ug/ml) yön yli (37°C).

Seuraavana päivänä kolme pesäkettä poimittiin erikseen 10 ml:n LB-kasvatusliuokseen (ampisilliini 100ug/ml), jossa solujen annettiin jakaantua yön yli (37°C). Kasvatuksesta puhdistettiin plasmidit Miniprep kitillä (Thermo Scientific). Puhdistetuista plasmideista lähetettiin näyte sekvensointiin (Eurofins). Sekvensoinnilla oikeaksi varmistettua NS1-insertin sisältävää plasmidia monistettiin *E. coli* -kasvatuksessa (200 ml LB-mediumia, ampisilliini 100ug/ml), josta se puhdistettiin Endofree maxiprep kitillä (Qiagen). Plasmidien pitoisuudet puhdistetuista näytteistä mitattiin spektrofotometrillä (DeNovix).

4.4 Proteiinituotanto nisäkässolussa

Proteiinituotto suoritettiin Expi293 expressio systeemillä (Thermo Scientific). Siinä Expi293 solut transfektoitiin ExpiFectamine 293 transfektiokitillä seerumivapaassa mediumissa (Gibco™ Expi293™ Expression medium). Expi293 soluihin transfektoitiin TBEV-Eur-NS1-pcDNA3.1(-) myc-His plasmidia. NS1-proteiinien tuottumista liukoiseen muotoon mahdollistettiin liittämällä CD33- tai HSA-sekreetiosignaali NS1-geenin N-terminaaliseen päähän. Expi293-soluihin transfektoitiin myös TBEV-Eur-E-DIII-CD33-pcDNA3.1(-) myc-His plasmidia, joten tuottoja tehtiin kokonaisuudessaan kolmella erilaisella plasmidilla.

Edellisenä päivänä ennen transfektiota solut jaettiin 3×10^6 eläviä soluja/ml ja seuraavana päivänä ennen transfektiota solut jaettiin uudelleen 3×10^6 eläviä soluja/ml. Transfektoitava plasmidi DNA (1 µg 25µl:ssa) laimennettiin Opti-MEM™ I mediumiin ja

erillään laimennettiin ExpiFectamiini™ 293 reagenssi Opti-MEM™ mediumiin. Sitten laimennoksia inkuboitiin 5 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen ne yhdistettiin ja inkuboitiin 10 min. Tämän jälkeen yhdistetty liuos lisättiin soluille. Soluja inkuboitiin 37°C ja 8 % CO₂ tasosekoittajassa. Transfektoiduille soluille lisättiin tehosteet (ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 1 ja ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 2) seuraavana päivänä. Tämä tehosteet tukevat transfektiota ja maksimaallista proteiinisaantoa. Solut kerättiin 4–5 päivän kuluttua transfektiosta, ja kasvatusta sentrifugoitiin 500 x g, 5 min, +4°C:ssa. Tästä saatu nestemäinen osa eli mediumi sentrifugoitiin vielä toisen kerran (1000 x g, 10 min, +4°C) jonka jälkeen mediumi filtteriöitiin ruiskufiltterillä (0.22µm). Solupelletti ja filtteriöity mediumi varastoitiin -20°C tai jatkettiin suoraan proteiinin puhdistukseen. Molempia proteiineja puhdistettiin mediumista sekä soluista, jotka hajotettiin lisäämällä lysispuskuria (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1 % NP-40, 5 mM EDTA, proteaasi-inhibiittori (Roche cOmplete), Pierce Universal -nukleaasi; 1 ml lysispuskuria per 5,5 miljoonaa solua) ja inkuboimalla 1 h jäällä. Lysaatti sentrifugoitiin (3200 x g, 30min, huoneenlämmössä) ja supernatantti filtteriöitiin ruiskufiltterillä (0.22µm). Proteiini puhdistettiin lysaatin supernatantista ilman välipakastusta.

4.5 Proteiinien puhdistus

Tuotetut proteiinit puhdistettiin HisPur Ni-NTA kromatografiakolumnilla (Thermo scientific). Puskurin virtaus kolumniin tuotettiin peristalttisella pumpulla. Ensin kolumni tasapainotettiin sitoutumispuskurilla (50mM NaHCO₃, 300mM NaCl, 2.5mM imidatsoli, pH 7,5). Filtteriöity mediumi ja lysaatti laimennettiin 1:1 sitoutumispuskuriin niin, että lopullinen imidatsolin pitoisuus oli 2.5mM. Laimennettu NS1-proteiinia sisältävä mediumi ja lysaatin supernatantti ajettiin kolumnin läpi. E-proteiinin III-domeenin puhdistuksessa mediumi ja lysaatti puhdistettiin erikseen. Ajonopeus oli 1ml/min. Yhdessä puhdistuksessa läpivietyyn mediumiin liuotettiin ureaa aggregoituneiden proteiinien denaturoimiseksi ja liukoistamiseksi, minkä jälkeen liuos ajettiin kolumnin läpi. Kolumni pestiin 10 x täytevolumilla pesupuskuria (50mM NaHCO₃, 300mM NaCl, 20mM imidatsoli, pH 8,0). Kolumniin sitoutunut proteiini eluoitiin kolmeen 1 ml

fraktioon eluutiopuskurin avulla (50mM NaHCO₃, 300mM NaCl, 300mM imidatsoli, pH 8,0).

Kerättyjen NS1-proteiinifraktioiden eluutiopuskuri vaihdettiin fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen (engl. phosphate buffered saline, PBS). PBS:ään Vivaspin 2 sentrifugaalisella ultrafiltterillä (30K, Sartorius). Ensin proteiinin sisältävä fraktio ajettiin filtterin läpi (3200 x g, 15min, 22°C), jonka jälkeen filtteriin jäänyt proteiini pestiin PBS:llä kolme kertaa (3 x 1 ml, 3200 x g, 15 min, 22°C). Proteiini kerättiin filtteristä 0,5 ml PBS:ään (3200 x g, 5 min, HL). E-III domeenin eluutiosta ensimmäisen fraktion puskuri vaihdettiin 0,5 ml sentrifugaalisella filtterillä (3k, Amicon) valmistajan ohjeen mukaan. Tuotetun proteiinin pitoisuus määritettiin Bradfordin menetelmällä (Bio-rad) valmistajan ohjeen mukaan. Standardisuoran pitoisuudet olivat 1,0 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,03125 mg/ml ja 0 mg/ml.

4.6 SDS-PAGE

Proteiinien puhtauden määrittämiseksi näytteet ajettiin SDS-PAGE-geelille (10 % Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels, Biorad). Puhdistuksen vaiheista eli filtteröidystä mediumista, kolumnin läpi tulleesta supernatantista, pesusta ja eluutiosta otettiin 20 µl näyte geeliä varten. Näytteisiin lisättiin 1:5 latauspuskuri (0.05M Tris-HCl, pH 6.8, 3 % SDS, 10 % glycerol, 5 % β-mercaptoethanol, 0,002 % bromophenol blue) ja näytettä kuumennettiin 98°C:ssa 5 min:a. Näytteet ajettiin SDS-PAGE-geelille 15 min 120V ja 30 min 180V TGS-ajopuskurissa (25 mM Tris, 192mM glysiini, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8.3, Biorad). Molekyylipainon standardina käytettiin Chameleon Duo (Li-COR). Ajon jälkeen geeli värjättiin PageBlue-proteiinivärjäysliuoksella (Thermo Scientific) yön yli keinutuksessa. Ylimääräinen väri pestiin geeliltä vedellä seuraavana päivänä.

4.7 Immunofluoresenssimääritys

Immunofluoresenssimäärityksessä (engl. immunofluorescence assay) transfektoitiin 100ng TBEV-Eur-NS1-CD33-His-pcDNA3.1, TBEV-Eur-NS1-His-pcDNA3.1 ja SARS-CoV-S1-His-pcDNA3.1 plasmidia per kuoppa 96-kuoppalevyille HUH-7-soluihin (ihmisen maksasyövän solulinja), jotka oli kasvatettu Dulbecco's Modified Eagle Mediumissa (DMEM), johon lisätty 10 % naudan sikiön seerumia (Fetal bovine serum, FBS), 100U/ml

PenisilliiniStreptomysiiniä ja 2mM L-glutamiinia, yön yli. Plasmidia inkuboitii Opti-MEM™-mediumissa (Gibco) Trans-IT LT1 (Mirus Bio) reagenssin (0,003µl/ng plasmidia) kanssa 30 min. Sen jälkeen seos siirrettiin soluille, joita inkuboitii yön yli 37°C, 5 % CO₂. Seuraavana päivänä solut kiinnitettiin 4 % formaldehydillä inkuboimalla 20 min. Solut säilöttiin PBS:ään +4°C:een.

Leimaamista varten solukalvojen läpäisevyyttä parannettiin 0,1 % Triton-X-100:lla (Alfa Aesar) PBS:ssä inkuboimalla 5 min. Primaarinen vasta-aine (kanin seerumi, anti-His-tag mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology)) laimennettiin 3 % Bovine serum albumin (BSA, ThermoFisher)/PBS liuokseen ja inkuboitii soluilla 1 h, minkä jälkeen solut pestiin kolme kertaa 0,5 % BSA/PBS:llä. Sekundäärisenä vasta-aineena käytettiin goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 IgG:tä ja goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG:tä (Invitrogen), jotka laimennettiin 1:1000 3 % BSA/PBS liuokseen, johon lisättiin myös 1:2500 4', 6-diamidino-2-fenyyliindoli (DAPI, Invitrogen). Tätä liuosta inkuboitii soluilla 45 min pimeässä, minkä jälkeen solut pestiin kolme kertaa 0,5 % BSA/PBS:llä. Solut jätettiin viimeiseen pesuliuokseen ja kuvattiin EVOS FL (Life Technologies) fluoresenssimikroskoopilla.

4.8 Immunoblottaus

TBEV-Eur-NS1-CD33-His-pcDNA3.1, TBEV-Eur-NS1-HSA-His-pcDNA3.1 ja TBEV-Eur-NS1-His-pcDNA3.1 plasmideita transfektoitiin HEK293 soluihin (ihmisen alkion munuaissolulinja). Kontrolleiksi HEK293-soluihin transfektoitiin joko SARS-CoV-S1-His-pcDNA3.1- tai SARS-CoV-N-His-pcDNA3.1-plasmidia. Transfektio suoritettiin samalla tavalla kuin immunofluoresenssimäärityksessä, mutta 6-kuoppalevyille. Seuraavana päivänä transfektiosta solut hajotettiin lysispuskurilla (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1 % NP-40, 5 mM EDTA, proteaasi inhibiittori (Roche cOmplete), Pierce Universal Nukleaasi). Proteiinipitoisuus mitattiin lyaatista Bradford-menetelmällä (Bio-rad). Näytteisiin lisättiin 1:5 latauspuskuria (0.05M Tris-HCl, pH 6.8, 3 % SDS, 10 % glycerol, 5 % β-mercaptoethanol, 0,002 % bromophenol blue). Seuraavaksi lyaatti ladattiin SDS-PAGE-geelille, jota ajettiin 30 min 80V ja 1,5 h 120V ajopuskurissa (25 mM Tris, 192mM glysiini, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8.3, Biorad). Geeli siirrettiin siirrospuskuriin (25 mM Tris, 192mM glysiini, 20 % (w/v) metanoli, pH 8.3) ja polyvinyylifluoridi eli PVDF-membraani

(Thermo Scientific) aktivoitiin 99 % metanolilla ja huuhdeltiin vedellä. Geeli ja membraani kasattiin siirrostustelineeseen, joka oli läpikasteltu siirrostuspuskurilla. Proteiinien siirrostus geeliltä membraanille suoritettiin täydessä tankissa (Mini-PROTEAN® Tetra-Verycal, Bio-rad) jäällä yön yli 20V:ssa.

Seuraavana päivänä membraani blokattiin 5 % rasvaton maito (Valio)/tris-buffered saline with Tween-20 (TBST) liuoksella 1 h, minkä jälkeen membraani pestiin kerran TBST:llä. Primaarivasta-aine (anti-His-tag hiiren monoklonaalinen IgG ja anti-glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi (GAPDH) hiiren monoklonaalinen IgG, Santa Cruz Biotechnology) laimennettiin 1:1000 5 % maito/TBST:n ja inkuboitiin membraanilla 1 h. Membraani pestiin kaksi kertaa TBST:llä. Sekundäärivasta-aine (IRDye®800CW Goat anti-mouse, Li-Cor) laimennettiin 1:15 000 5 % maito/TBST:n ja inkuboitiin 45 min pimeässä. Membraani pestiin kaksi kertaa TBST:llä ennen kuvantamista Odyssey-fluoresenssimikroskoopilla (Li-Cor).

4.9 Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (ELISA)

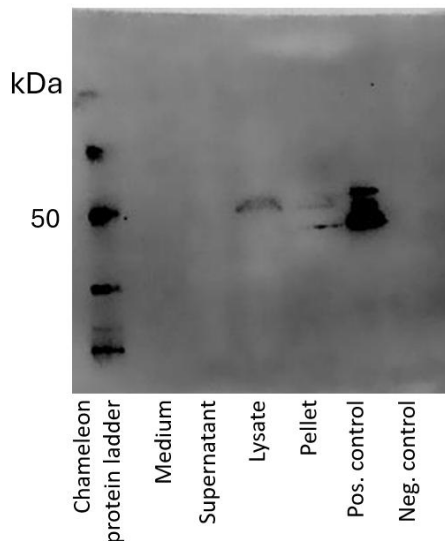
Kaupallista NS1-proteiinia (Native Antigen) kiinnitettiin 96-kuoppalevyille (Maxisorp. Thermo Fisher) kaivoon 25ng (0,5µg/ml), oman tuotannon NS1-proteiinia 30ng (0,6µg/ml), E-proteiinia 200ng (4µg/ml) ja E-III domeenia 200ng (4µg/ml) PBS:ssä. Pesupuskurina käytettiin PBS-0,05 %Tween-20-liuosta (Fisher bioreagents). Näytepuskurina käytettiin 5 % sian seerumia (EuroClone) ja 0,1 % Tween-20 PBS:ssä. Seeruminäyte laimennettiin 1:300 näytepuskurin kanssa ja inkuboitiin +37°C 2 tuntia kaivoissa. Levyt pestiin levypesurilla 3 x 400µl pesupuskuria per kaivo. Konjugaatista eli IgG:hen sitoutuvasta leimatusta vasta-aineesta (polyklonaalinen rabbit Anti-Human IgG/HRP, Agilent Technologies Singapore) valmistettiin 1:8000 laimennos, joka lisättiin pestylle levyille. Konjugaattia inkuboitiin +37°C:ssa yksi tunti. Levy pestiin ja levyille lisättiin substraattia (TMB ONE Ready-to-use substraatti, 4380 Kem-En-Tech). Levyä inkuboitiin 20 minuuttia pimeässä, minkä jälkeen lisättiin pysäytysliuos, jona toimii 0,2 N-sulfaatti happo (0,1 M H₂SO₄). Kaivojen absorbanssit mitattiin Victor Nivo (Perking Elmer) spektrofotometrillä 450 nm aallonpituudella.

4.10 Kani-immunisaatio

Kaksi kania immunisoitiin yhteistyössä Turun yliopiston koe-eläinkeskuksen (engl. the University of Turku Central Animal Laboratory) kanssa. Tämän immunisaation tutkimusprotokollan ja -menetelmät on tarkastanut ja hyväksynyt Suomen eläinkokeiden arviointilautakunta (lupnumero ESAVI/20869/2020). Kanien immunisaation toteutti Turun yliopiston koe-eläinkeskus. Immunisaatiolla tuotettiin TBEV:n proteiineja vastaan vasta-aineita sisältävää seerumia. Immunisaatiot tehtiin TBEV-rokotteella (Ticovac, Pfizer) ja tässä työssä tuotetulla TBEV-Eur-NS1-His proteiinilla. Kaniin injektoidiin kolme kertaa 20 µg TBEV-Eur-NS1-proteiinia + AS03-adjuvantti (GlaxoSmithKlunen) tai kaupallista TBEV-rokotetta ihmisen rokoteannoksen verran kahden viikon intervallilla. Immunisaation lopuksi, 12 päivän kuluttua viimeisestä immunisaatiosta, kaneilta kerättiin veret sydänpunktiolla anestesiassa Vacuette 4 ml CAR Serum Clot Activator-putkiin (ref. 4542004). Seerumi erotettiin verestä ensin huoneenlämmössä 30–60 min seisottamalla, minkä jälkeen sentrifugoimalla (10 min, 2000 x g, 22°C). Seerumi säilöttiin -20°C:n. Immunisaation onnistuminen todennettiin immunofluoresenssianalyysillä.

5 Tulokset

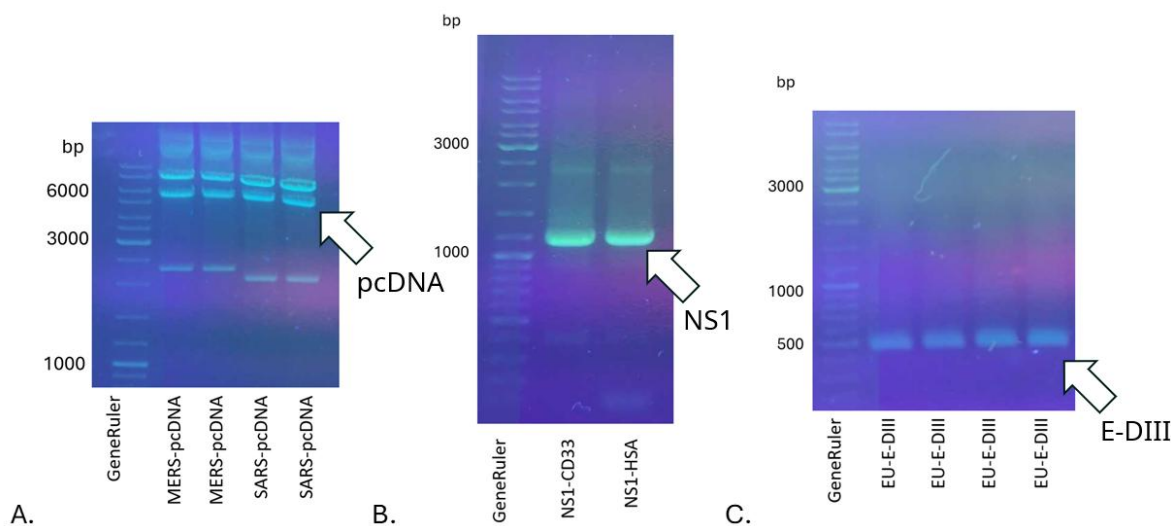
Eurooppalaisen TBEV:n NS1-proteiinin tuottamiseksi NS1-geeni kloonattiin pcDNA3.1-tuottovektoriin ja transfektoitiin Expi293-suspensiosolulinjaan. Solut kerättiin kolme päivää transfektion jälkeen. Kasvatuksesta otettiin näytteet solujenkeräyksen ja lyyssauksen yhteydessä. Solulysaatista erotettiin sentrifugoimalla liukoiset proteiinit ja solumassa. Nämä näytteet analysoitiin immunoblottausmenetelmällä proteiinien tunnistamiseksi (kuva 6.). Positiivisena kontrollina käytettiin SARS-CoV-2-viruksen nukleokapsidi (N)-proteiinia ja negatiivisena kontrollina HEK293 -solulysaattia. SARS-CoV-2-viruksen N-proteiini on 45–46 kDa ja tuottui HEK293-soluissa vahvasti, joten kasvu olosuhteissa ei ollut ongelmia. HEK293-solulysaatissa ei havaittu proteiinia, joten vasta-aineilla ei ole epäspesifistä sitoutumista. TBEV-NS1-proteiini on kooltaan 50–56 kDa. NS1-proteiinia havaittiin lyyssaattissa ja solumassassa (Pellet). Koska NS1-proteiinia ei havaittu Expi293-solukasvatuksen mediumissa tai supernatantissa, todettiin että NS1-proteiini ei tuotu liukoiseen muotoon.



Kuva 6. Immunoblottausanalyysi Expi293-kasvatukselle. TBEV-Eur-NS1-His-pcDNA3.1-plasmidi transfektoitiin Expi293 soluihin ja kasvatus kerättiin 3 päivää transfektion jälkeen. Näytteet analyysia varten kerättiin solukasvatuksen mediumista (Medium), lyyssatuista soluista (Lysate), sentrifugoidun lyyssatin supernatantista (Supernatant) ja pelletistä (Pellet). NS1-proteiini on 50-56kDa. Positiivisena kontrollina (Pos. control) toimi SARS—CoV-2 S1 -proteiini ja negatiivisena kontrollina (Neg. control) HEK293-solulysaatti.

5.1 Sekretiosignaalin kloonaus

Jotta NS1-proteiinin puhdistus olisi mahdollista, piti proteiini saada liukoiseen muotoon. Tästä syystä NS1-geenin N-terminaaliseen päähän kloonattiin sekretiosignaali. Kloonattiin kaksi eri tuottovektoria, joista toiseen kloonattiin CD33-sekretiosignaali ja toiseen HSA-sekretiosignaali. Ensin tuottovektoria linearisoitiin BamH1-restriktioentsyymillä ja vektori eristettiin agarosigeeliltä (kuva 7 A.). Geelillä erottui vektorista irrotettu geeni (SARS tai MERS) ja linearisoitu vektori, mutta geelillä näkyi myös muita, molekyylipainoltaan suurempia vektorin osia. PCR:llä tuotettiin kahta inserttiä, joissa NS1-geenin lisäksi on sekretiosignaalina CD33 tai HSA. Tämän tuotteen koko on geelillä 1200bp (kuva 7.B.). Lisäksi tuotettiin insertti, jossa on E-proteiinin III-domeeni CD33-sekretiosignaalin kanssa. Tämän tuotteen koko on geelillä 457 bp (kuva 7.C.). PCR-tuotteet eristettiin geeliltä ja inserttiä CD33-signaalin kanssa saatiin 245 ng/ μ l (10 μ l), inserttiä HSA-signaalin kanssa 195 ng/ μ l (10 μ l) ja E-DII inserttiä 123 ng/ μ l (10 μ l). Insertit kloonattiin pcDNATM3.1 (+) nisäkäsexpressio vektoreihin (Thermo Scientific) InFusion kloonauksysteemillä.



Kuva 7. TBEV-Eur-NS1-CD33, TBEV-Eur-NS1-HSA ja TBEV-Eur-E-DIII-CD33 PCR-tuotteet ja linearisoitu vektori InFusion kloonauksista varten. A. *Bam*H1-restriktioentsyymillä linearisoitu pcDNATM3.1 (+) nisäkäsexpressiovektori on 5428bp. DNA osat noin 2000 bp kohdalla on irti leikatut MERS-CoV ja SAR-CoV 2 S1-geenit. B. PCR-tuote NS1-insertin monistamisesta CD33- ja HSA-sekretiosignaalin kanssa (1200bp). C. PCR-tuote E-III domeenin monistamisesta (460bp). GeneRuler on kaupallinen kokostandardi.

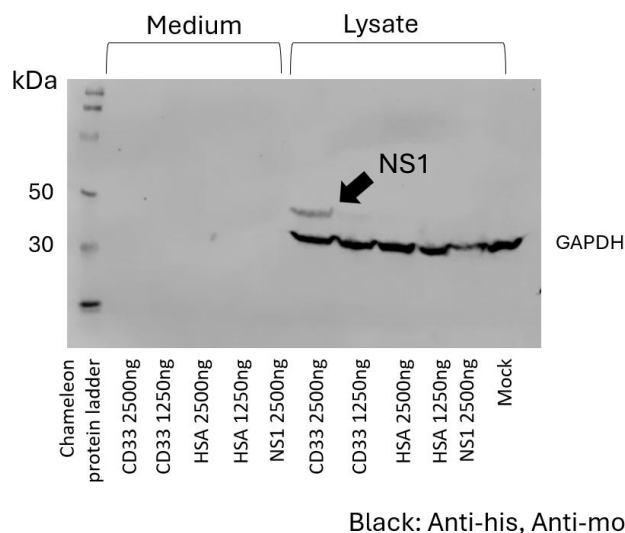
Kloonausreaktion jälkeen plasmidit transformoitiin *E. coli* -bakteereihin, joissa niitä monistettiin proteiinin tuottoa varten. Puhdistettua TBEV-Eur-NS1-pcDNA3.1 plasmidia

saatiin CD33-signaalilla 457 ng/ μ l (25 μ l) ja HSA-signaalilla 301 ng/ μ l (25 μ l).
Plasmidinäytteet lähetettiin sekvensointiin.

5.2 Proteiinituotto

5.2.1 Sekreetiosignaalien testaus HEK293-soluissa

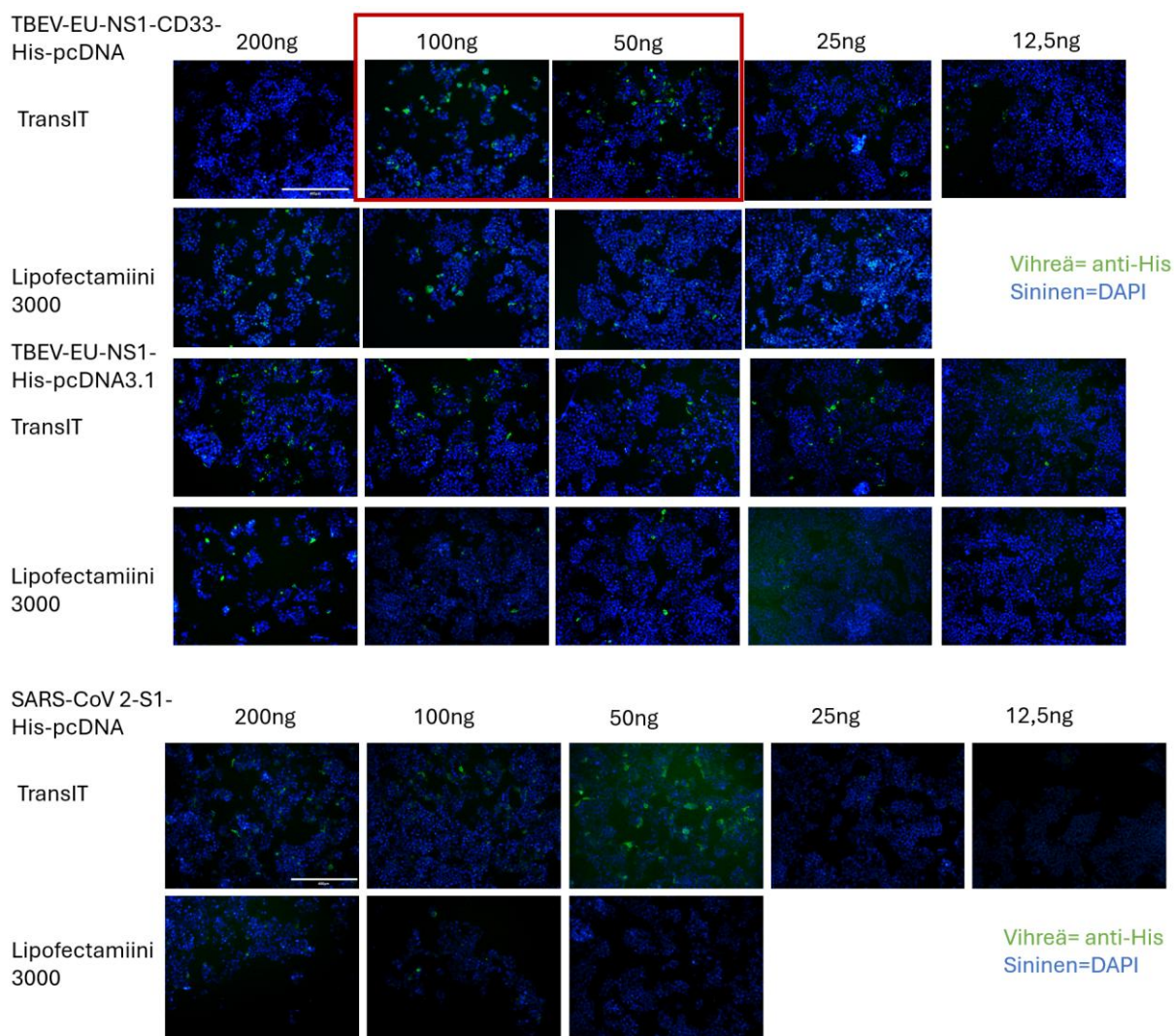
NS1-proteiinia CD33- tai HSA-sekreetiosignaalien kanssa tuottavat plasmidit transfektoitiin HEK293 soluihin. Haluttiin selvittää, tuottuuko NS1-proteiinia sekreetiosignaalien kanssa ja tuottuuko se liukoisena ennen kuin tuottovektori viedään proteiinituottoon Expi293-solulinjalla. Haluttiin myös selvittää, kumpi signaali toimii paremmin, ja jatkaa vain sillä proteiinituottoon. Plasmideja transfektoitiin HEK293-soluihin 2500ng ja 1250ng, koska jos 2500ng on liikaa, 1250ng:lla transfektio voisi onnistua ja jos 1250ng on liian vähän 2500ng voisi olla tarpeeksi. Tavoitteena oli selvittää voiko solu tuottaa proteiinia sekreetiosignaalin kanssa liukoisena. Solukasvatuksien medium-näytteissä ei ole NS1-proteiinia (kuva 8.). HSA-sekreetiosignaalin kanssa NS1-proteiini ei havaittu myöskään lysaatissa. CD33-sekreetiosignaalin kanssa, kun plasmidia oli transfektoitu 2500ng, NS1-proteiinia tuottuu lysaattiin eli solun sisälle (nuoli kuvassa 6).



Kuva 8. NS1-proteiinin tuoton testaus HEK293-soluissa. HEK293-soluihin transfektoitiin eri pitoisuuksilla (2500ng tai 1250ng) TBEV-EU-NS1-pcDNA3.1 tuottovektoria CD33- ja HSA-sekreetiosignaalien kanssa. NS1-proteiinin tuotto analysoitiin sekä mediumista että lysaatista. Latauskontrollina käytettiin GAPDH:ta, jonka koko on 36–37 kDa ja NS1-proteiini on noin 50kDa kokoinen. Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

5.2.2 Transfektioagenssin testaus

Sekretiosignaaleista vain CD33:n kanssa proteiini tuottui HEK293-solulinjassa (kuva 8.), joten sen valittiin jatkotutkimuksiin. TBEV-Eur-NS1-CD33-pcDNA3.1-plasmidin transfektion tehokkuutta testattiin vertailemalla TransIT-reagenssia ja Lipofectamiini[®]3000 eri plasmidipitoisuuksilla (kuva 9.). Transfektio optimoitiin mahdollisimman korkean transfektiotehokkuuden saavuttamiseksi, jotta proteiinintuottoon osallistuisi mahdollisimman suuri osa soluista. NS1-proteiinia sekretiosignaalilla ja ilman signaalia tuottavia plasmideja transfektoitiin HEK293-soluihin. Solut analysoitiin immunofluoresenssimenetelmällä, jossa värjätyt solut mikroskoipoitiin ja noin 30 000 solusta arvoitiin transfektoituneiden solujen määrä. NS1-proteiini sekä sekretiosignaalilla että ilman tuottui paremmin TransIT:llä kuin Lipofectamiini 3000:lla. Suurin transfektiotehokkuus TBEV-Eur-NS1-CD33-plasmidilla saavutettiin TransIT-reagenssilla, kun käytettiin 50-100ng plasmidia (merkitty punaisella ruudulla kuvassa 9). Silloinkin vain kymmeniä soluja oli transfektoitunut, mutta Lipofectamiini 3000:lla transfektoituneita soluja oli vain yksittäisiä. Kun käytettiin plasmidia ilman sekretiosignaalia paras transfektiotehokkuus saavutettiin 100-200ng plasmidia. Positiivisena kontrollina toiminut SARS-CoV-S1-pcDNA3.1 transfektoitui myös paremmin TransIT reagenssilla kuin Lipofectamiini 3000:lla.

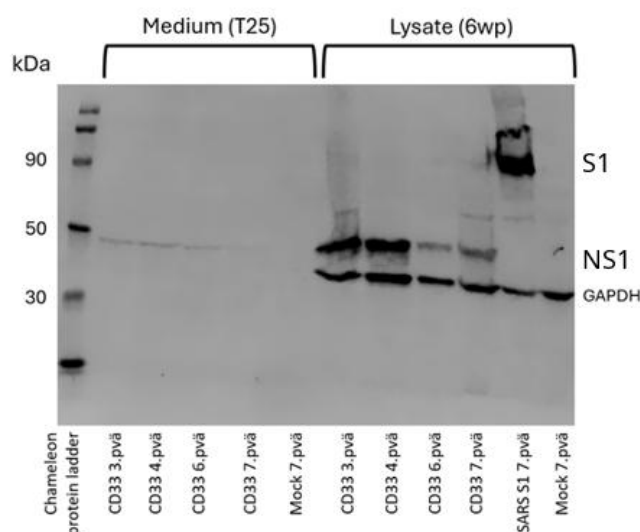


Kuva 9. Transfektioareagensien testaus. HEK293-soluihin transfektoitiin eri määriä (200ng, 100ng, 50ng, 25ng ja 12,5ng) TBEV-Eur-NS1-plasmidia sekä CD33- sekreetiosignaalin kanssa että ilman. Positiivisena kontrollina käytettiin SARS- CoV-2 S1-proteiinia tuottavaa plasmidia. Analyysissä solujen tumat värjättiin siniseksi DAPI:lla ja NS1-proteiini His-tagin tunnistavalla immunofluoresenssimenetelmällä vihreäksi. Kuvat otettiin EVOS fluoresenssimikroskoopilla (Life technologies) x10 suurennuksella. Vasemman yläkulman kuvassa näkyvä mittakaava on 400µm.

5.2.3 NS1-proteiinituoton optimointi HEK293-soluissa

NS1-proteiinin tuotto CD33-sekreetiosignaalin kanssa valittiin jatkokokeisiin ja NS1-proteiinin tuottoa pyrittiin lisäämään selvittämällä optimaalinen keräyspäivä. TBEV-EU-NS1-CD33-His-pcDNA3.1 transfektoitiin HEK293-soluihin 25-solukasvatuspulloissa ja kasvatusmediumia kerättiin 3., 4., 6., 7. päivänä. Lisäksi TBEV-EU-NS1-CD33-His-pcDNA3.1-transfektioituja soluja kerättiin yksi kuoppa per päivä 6-kuoppalevyiltä. Kerätyistä näytteistä analysoitiin NS1-proteiinin tuotto immunoblotilla (kuva 10.).

Positiivisena kontrollina käytettiin SARS-CoV-2 S1-proteiinia tuottavaa plasmidia ja negatiivisena kontrollina transfektoimattomia HEK-soluja. SARS-CoV-2 S1-proteiini tuottui hyvin solunsisäpuolelle. HEK-solu lyaatissa ei ollut polyhistidiiniä sisältäviä proteiineja, mikä vahvisti, että transfektoitujen solujen näytteissä oli NS1-proteiinia. Tulosten perusteella NS1-proteiini tuottuu CD33-sekreetiosignaalin kanssa mediumiin. NS1-proteiinia tuottuu kuitenkin huomattavasti enemmän solulysaattiin. NS1-proteiinia oli eniten näytteessä, joka oli kerätty neljä päivää transfektion jälkeen. Myöhemmin kerätyissä näytteissä NS1-proteiinin määrä oli pienempi.

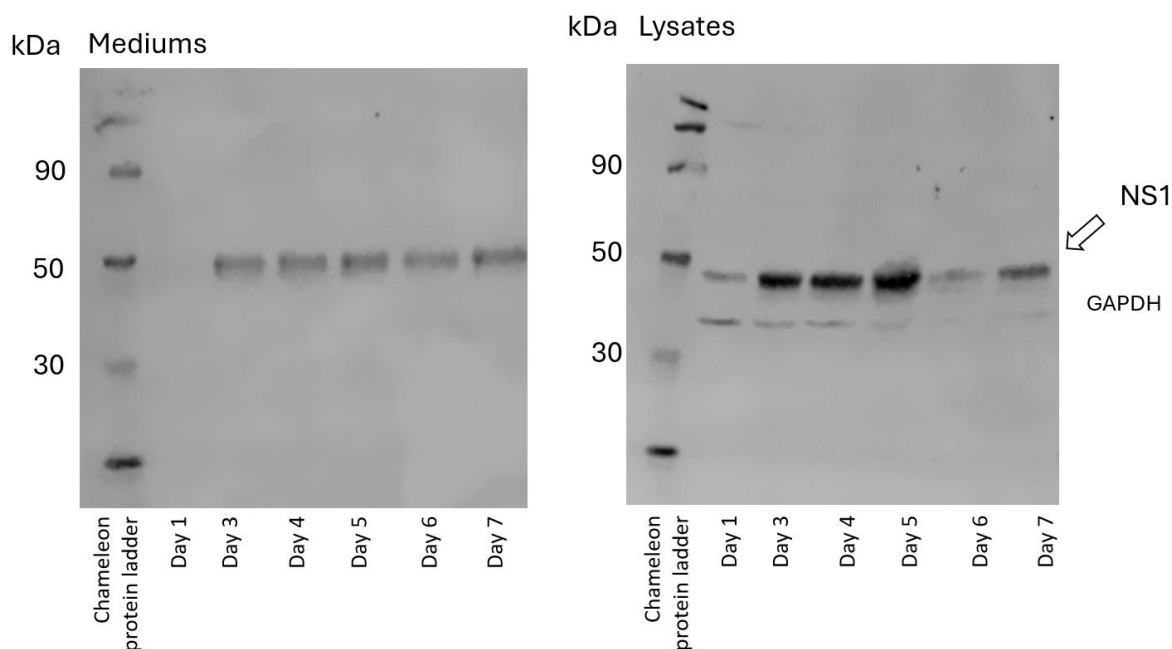


Kuva 10. NS1-proteiinituotannon testaus HEK293-soluilla. HEK293-soluissa tuotettiin NS1-proteiinia CD33-sekreetiosignaalin kanssa. T25-pullon kasvatuksesta kerättiin mediuminäytteitä ja 6-kuoppalevytä solulysaattinäytteitä eri aikapisteistä (3., 4., 6., 7.pvä). NS1-proteiini on noin 50kDa. Latauskontrollina toimii GAPDH (36–37 kDa), positiivisena kontrollina SARS-CoV-2 S1 proteiini (100–130 kDa) ja negatiivisena HEK-solulysaatti. Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

5.2.4 NS1-proteiinin tuotto Expi293-tuottosysteemissä

Serologisia menetelmiä varten tarvitaan suuria määriä puhdistettua NS1-proteiinia. Tulokset osoittivat, että TBEV-EU-NS1-CD33-plasmidista NS1-proteiinia tuottuu HEK293-soluissa myös mediumiin, joten seuraavaksi TBEV-EU-NS1-CD33-plasmidi transfektoitiin Expi293-solulinjaan. Tämä tuottosysteemi on optimoitu proteiinien suuren määrän tuottamiseen. TBEV-EU-NS1-CD33-plasmidilla transfektoituja Expi293-soluja ja mediumia kerättiin kolmannesta päivästä eteenpäin tuoton seuraamiseksi. Suurin osa kasvatuksesta kerättiin viisi päivää transfektion jälkeen (HEK293-kasvatuksen perusteella) ja pieni osuus jätettiin vielä kasvamaan seitsemänteen

päivään asti. Jokaisen päivän näytteet analysoitiin immunoblotilla (kuva 11.). Transfektiojälkeisenä päivänä (Day1) mediumissa ei havaittu NS1-proteiinia, mutta lysaatissa NS1-proteiinia oli havaittavissa (nuoli kuvassa 11). NS1-proteiinia tuottui päivästä kolme alkaen mediumiin, mutta proteiinin määrä ei kasvanut tuotannon edetessä kolmannesta päivästä eteenpäin. Lysaatissa proteiinin määrä kasvoi viidenteen päivään asti, kunnes se laski huomattavasti. Membraanilta värjättiin myös GAPDH, joka toimi latauskontrollina. Mediuminäytteissä ei ollut GAPDH:ta, koska se on solunsisäinen entsyymi eikä erity ulkopuolelle. Lysaattinäytteissä GAPDH näkyi odotetusti. Näiden tulosten perusteella myöhemmissä tuotoissa solut ja medium kerätään viisi päivää transfektiojälkeen.



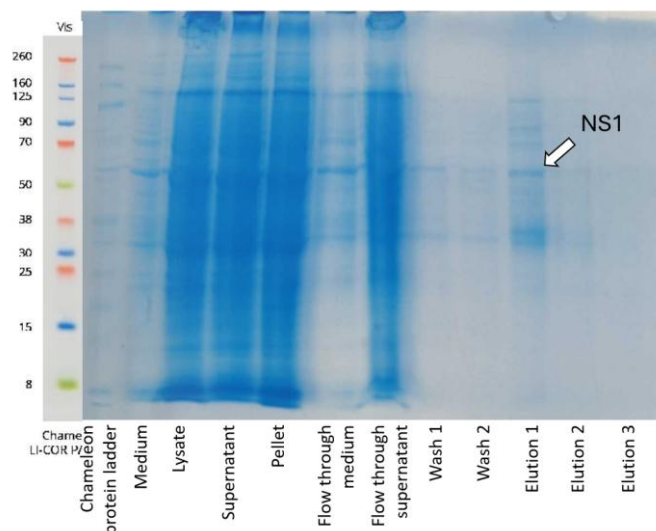
Kuva 11. NS1-proteiinin tuotto Expi293-soluissa ja tuoton optimointi. Expi293-soluihin transfektoitiin TBEV-Eur-NS1-CD33-pcDNA3.1 tuottovektori. Kasvatuksesta otettiin näytteet ensimmäisenä päivänä ja 3–7 päivää transfektioista. NS1-proteiini on noin 50kDa. Latauskontrollina GAPDH (36-37kDa). Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

5.3 NS1-proteiinin ja E-proteiinin III-domeenin puhdistus

5.3.1 Spinnikolumni

Expi293-tuotosta puhdistettiin NS1-proteiineja spinnattavan anti-His-kolumnin avulla. Puhdistuksen arviointia varten prosessin erivaiheista otettiin näytteitä, joita analysoitiin SDS-PAGE-geelillä (kuva 12.). Tässä puhdistuksessa kolumnin läpi vietiin sekä mediumi että supernatantti lysaatista. Kuvaan nuolella merkitty NS1-proteiini havaittiin

puhdistuksen jokaisessa vaiheessa. NS1-proteiinia tuli kolumnista ulos läpivirtaavan medium (Flow through kuvassa 12) mukana ja pesujen (Wash kuvassa 12) yhteydessä. Eluutiosta (Elution 1–3 kuvassa 12) havaittiin myös monia muita proteiineja NS1-proteiinin lisäksi. Tulosten perusteella NS1-proteiini ei sitoudu tehokkaasti kolumniin.

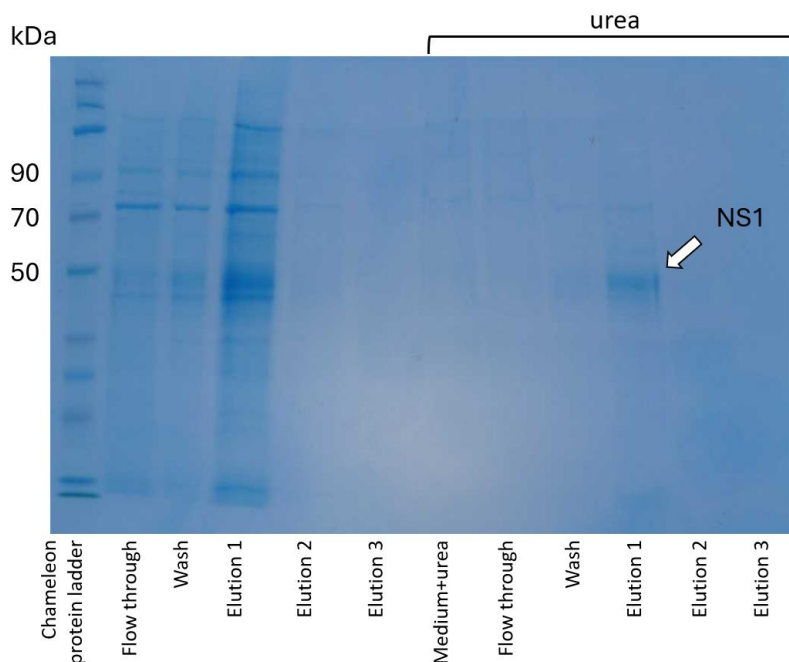


Kuva 12. NS1-proteiinin puhdistus kasvatusmediumista ja Expi293-solulysaatista. NS1-proteiinia puhdistettiin His-tagin perustuvalla nikkeli-spinkolumnilla. Kasvatuksen keräyksen yhteydessä otettiin näytteet solujen kasvatusmediumista (Medium), lyaatista (Lysate), lyaatin nestefaasista (Supernatant) ja kiinteästä faasista (Pellet). Näytteitä otettiin puhdistuksen eri vaiheista: kolumnin läpiviety medium (Flow through medium) ja lyaatin nestefaasi (Flow through supernatant), kolumnin pesut (Wash 1 ja 2) ja eluoidut fraktionäytteet (Elution 1–3). NS1-proteiini on noin 50 kDa. Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

5.3.2 Pakattu kromatografiakolumni

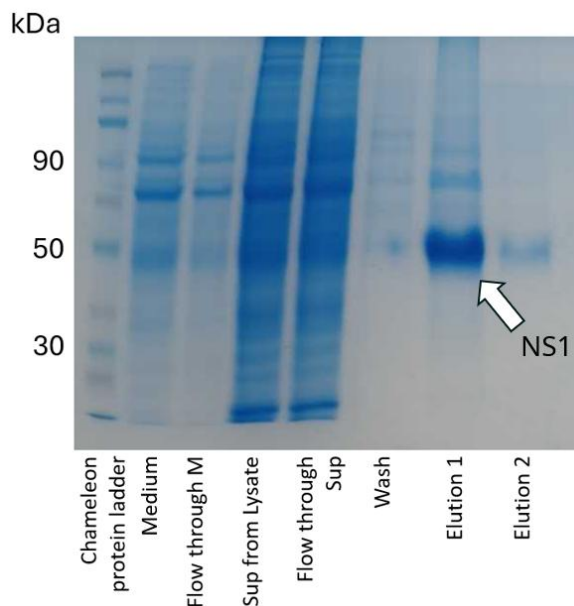
Jotta NS1-proteiini ei tulisi kolumnista mediumin mukana ulos, vaihdettiin puhdistukseen pakattu anti-His kromatografiakolumni. Medium pumpattiin peristalttisella pumpulla kolumnin läpi. Pumpaamisella hidastettiin liuoksen läpivirtausnopeutta verrattuna spinnikolumniin. Hitaammalla virtauksella pyrittiin parantamaan NS1-proteiinin sitoutumista kolumniin. Samalla testattiin parantaako urean lisääminen näytteeseen NS1-proteiinin sitoutumista kolumniin. Puhdistuksen eri vaiheiden näytteet analysoitiin SDS-PAGE-geelillä (kuva 13.). Tuloksista voitiin havaita, että läpivietyyn mediumiin (Flow through kuvassa 13) ja pesuun (Wash kuvassa 13) jäi edelleen NS1-proteiinia, mutta suurin osa proteiinista kuitenkin irtosi kolumnista vasta eluutioon (Elution 1–3). Urean lisättiin läpivietyyn mediumiin (Flow through+ urea= Medium+urea kuvassa 13) ja ajettiin uudelleen kolumnin läpi. NS1-proteiinin saanto jäi

niin matalaksi, että sitä ei voinut määrittää. NS1-proteiinin saanto oli ilman ureaa 75 µg kolmen päivän kasvatuksesta, jonka alussa soluja oli 75 miljoonaa.



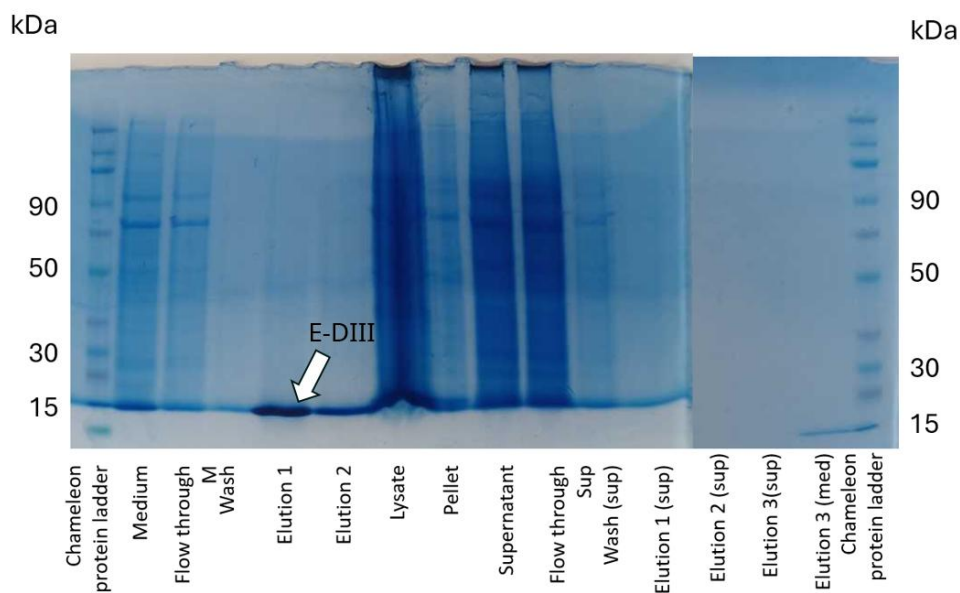
Kuva 13. NS1-proteiinin puhdistus pakatulla kromatografiakolumnilla. NS1-proteiinia puhdistettiin kasvatusmediumista urean kanssa ja ilman. Näytteitä otettiin puhdistuksen eri vaiheista: kolumnin läpiviety medium (Flow through), kolumnin pesu (Wash) ja eluoidut fraktionäytteet (Elution 1–3). NS1-proteiini on noin 50 kDa (merkitty kuvaan nuolella). Ureaa sisältävät näytteet merkattu kuvan yläpuolelle. Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

Seuraavassa NS1-proteiinin tuotossa proteiinia puhdistettiin sekä mediumista että lyaatista. Tällä tavoin saatiin NS1-proteiinia 0,155 mg kolmen päivän kasvatuksesta, jonka alussa soluja oli 75 miljoonaa. Kuten kuvasta 14 voi havaita, NS1-proteiini eluoitui suoraan ensimmäiseen fraktioon (Elution 1 kuvassa 14) ja vain pieni osa proteiinia jäi läpivietyyn mediumiin (Flow through M kuvassa 14), supernatanttiin (Flow through Sup) tai pesuliukokseen (Wash kuvassa 14).



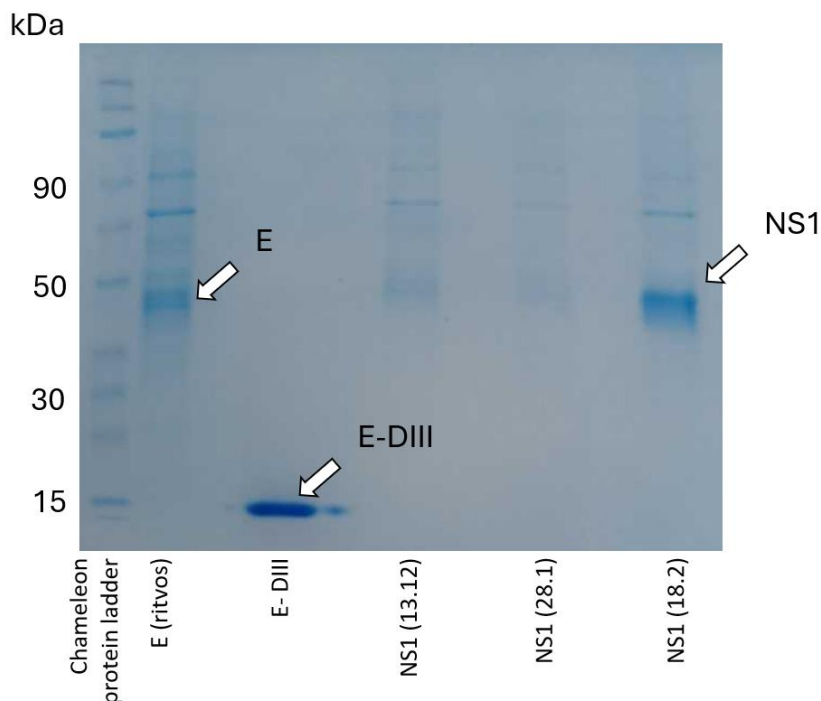
Kuva 14. NS1-proteiinin puhdistus mediumista ja lysaatista. NS1-proteiinituoton keräyksen yhteydessä otettiin näytteet solujen kasvatusmediumista (Medium), lysaatin nestefaasista (Sup from Lysate). Näytteitä otettiin puhdistuksen eri vaiheista: kolumnin läpiviety medium (Flow through M) ja lysaatin nestefaasi (Flow through Sup), kolumnin pesu (Wash) ja eluoidut fraktionäytteet (Elution 1 ja 2). Puhdistuksen eri vaiheista otetut näytteet ajettiin SDS-PAGE-geelille. NS1-proteiini on noin 50 kDa. Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

ELISA-testiä varten tuotettiin E-proteiini III-domeeni, johon rokotuksen ja infektion aikaan saamat vasta-aineet E-proteiinia vastaan voisivat sitoutua. E-proteiinista tuotettiin vain III-domeeni, koska koko viruksen tuotannossa on ollut aiemmin haasteita ja sen saanto on jäänyt alhaiseksi yhteistyökumppaneillamme. E-proteiinin III-domeenin geenin sisältävä tuottovektori CD33-signaalin kanssa transfektoitiin Expi293-soluihin. Tuotto suoritettiin NS1-proteiinille optimoidulla protokollalla. Kuvasta 15 voitiin havaita, että III-domeeni (12kDa) tuottui lähinnä mediumiin (medium kuvassa 15). Lisäksi eluutiosta (Elution 1 kuvassa 15) ei näkynyt suurempia epäpuhtauksia, kun puhdistus tehtiin pakatulla anti-His kromatografiakolumnilla samalla tavoin kuin NS1-puhdistus. E-proteiinin III-domeenia saatiin tuotettua 0,225 mg 75 miljoonalla solulla.



Kuva 15. E-proteiinin III-domeenin puhdistus pakatulla anti-His-kolumnilla. E-proteiinin III-domeenia puhdistettiin erikseen kasvatusmediumista (Medium), lysaatista (Lysate). Geelillä analysoitiin myös lysaatin nestefaasi (Supernatant) ja kiinteäfaasi (Pellet). Näytteitä otettiin puhdistuksen eri vaiheista: kolumnin läpiviety medium (Flow through M) ja lysaatin nestefaasi (Flow through Sup), kolumnin pesut (Wash/ Wash(sup)) ja eluoidut fraktionäytteet (Elution 1–3/ Elution 1–3 (sup)). E-proteiinin III-domeeni on 12 kDa kokoinen. Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

Tuotettujen NS1-proteiinin ja E-proteiinin III-domeenin puhtautta arvioitiin ajamalla sama määrä kaikkia tuotettuja proteiineja (13.12, 18.2 kerätyt NS1-proteiinit ja tuotettu E-proteiinin III-domeeni 2 μ g, (pl. NS1 28.1 1 μ g)) SDS-PAGE-geelille. Lisäksi mukana oli E-proteiini, joka saatiin yhteistyöstä professori Olli Ritvoksen kanssa (Helsingin yliopisto) (E (Ritvos) kuvassa 16). Kuvasta voitiin havaita, että aikaisemmin tuotettujen NS1-proteiinien määrät olivat vähäisempiä kuin uusimman tuoton. E-proteiini III-domeenin näytteessä ei havaittu epäpuhtauksia ja proteiinia oli lähes yhtä paljon kuin puhdistuksen jälkeen (Kuva 16.). E-proteiinin (53–60 kDa) näytteessä havaittiin samankokoisia epäpuhtauksia kuin NS1-proteiineilla. Geelille ladattavan proteiinin määrä laskettiin puhdistuksen jälkeen mitatun pitoisuuden perusteella. Tuotetuilla proteiineilla päätettiin jatkaa ELISA-testien pystyttämiseen.



Kuva 16. Tuotettujen proteiininen puhtauden arviointi. Yhteistyöstä saatua kokonaista E-proteiinia, tuotettua E-proteiinin III-domeenia ja kolmen NS1-tuoton proteiineja ajettiin SDS-PAGE-geelille. Muita proteiineja ajettiin 2 μ g (E (Ritvos), E-DIII, NS1(13.12), NS1(18.2) paitsi NS1(28.1) ajettiin 1 μ g. Ladattava proteiinimäärä laskettiin pitoisuuksista, jotka oli määritetty heti proteiinin puhdistuksen jälkeen. Chameleon protein ladder toimii kokostandardina.

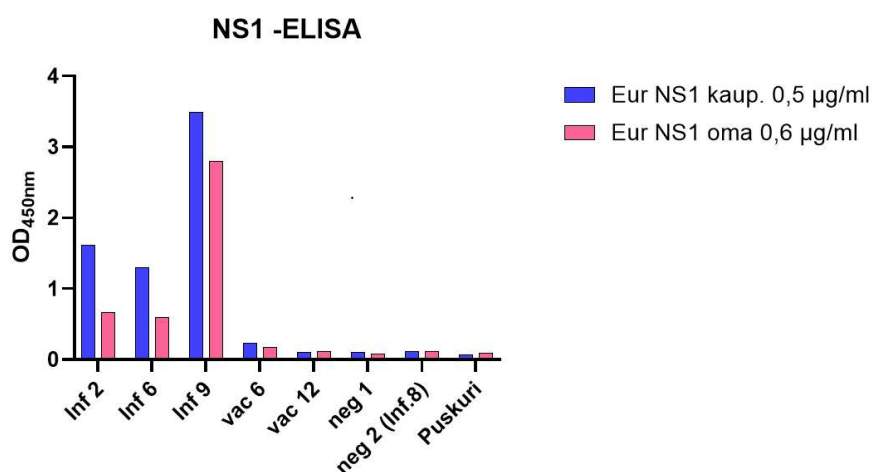
5.4 ELISA-testin pystyttäminen

ELISA-testissä potilasseerumin TBEV:n E- ja NS1-proteiineja tunnistavat vasta-aineet sitoutuvat testilevyjen kaivojen pohjaan kiinnitettyihin tuottamiimme E- ja NS1-proteiineihin. TBEV-rokote aiheuttaa vasta-aineita erityisesti E-proteiinia vastaan, joten rokotettujen seerumit erotetaan ELISA:ssa testaamalla vasta-aineiden sitoutumista E-proteiiniin. TBEV:n infektio puolestaan aiheuttaa vasta-aineita sekä E- että NS1-proteiinia vastaan, joten infektoituneiden henkilöiden seeruminäytteet erotetaan testaamalla ELISA:ssa vasta-aineiden sitoutuminen E-proteiinin lisäksi NS1-proteiiniin.

5.4.1 NS1-proteiiniin perustuvan ELISA:n pystyttäminen

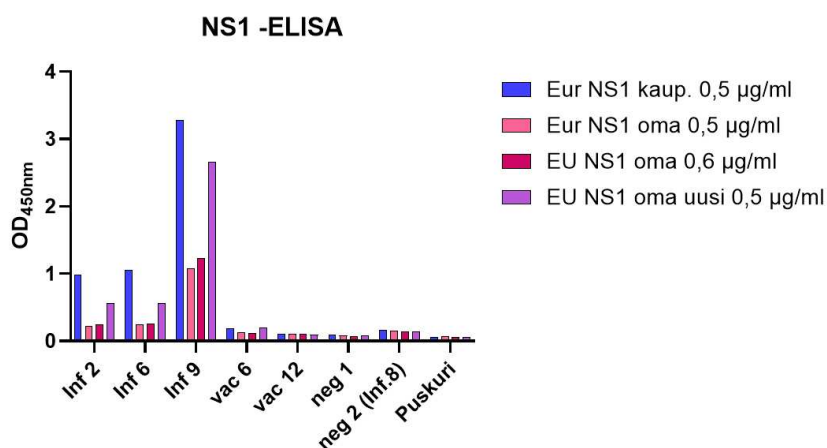
Puhdistetun NS1-proteiinin toimivuutta ELISA-testissä mitattiin vertaamalla omaa tuotettua NS1-proteiinia kaupalliseen NS1-proteiiniin (kuva 17). Testissä käytettiin TBEV-infektoituneiden seerumeita, jotka saatiin Turun yliopistollisen keskussairaalan (TYKS) klinisen mikrobiologian diagnostiikasta. Potilasseerumit oli diagnosoitu TBEV positiivisiksi Euroimmun ELISA-testillä. Aikaisemmin tehdyn kaupalliseen NS1-

proteiiniin perustuvan ELISA-testauksen perusteella valittiin yksi vahvasti NS1-vasta-aine positiivinen ja kaksi matalampaa positiivista seeruminäytettä. Kontrollina käytettiin TBEV-rokotettujen henkilöiden näytteitä, joissa ei ollut aiemmin havaittu NS1-vastetta sekä TBEV:n osalta negatiivisia näytteitä. Kaupallista NS1-proteiinia kiinnitettiin ELISA-levyn kaivoihin aikaisemmin optimoidun pitoisuuden verran (0,5 µg/ml). Tuotettua NS1-proteiinia kiinnitettiin 20 % enemmän (0,6 µg/ml), koska proteiininäytteessä havaittiin epäpuhtauksia ja pyrittiin saamaan NS1-vasta-aineiden absorbanssiarvot samalle tasolle kuin käytettäessä puhdasta kaupallista NS1-proteiinia. Tuloksien perusteella puskuria tai TBEV-negatiivisia seeruminäytteitä (neg1 ja neg2 kuvassa 17) käytettäessä NS1-antigeeniin ei sitoutunut vasta-aineita. Tämä testin tausta osoittautui yhtä matalaksi käytettäessä antigeeninä tuotettua ja kaupallista NS1-proteiinia. Positiivisten potilasnäytteiden (Inf2, Inf6 ja Inf9 kuvassa 17) absorbanssiarvot erottuivat selvästi negatiivisten arvoista, kun seerumien vasta-aineiden sitoutumista tutkittiin kaupalliseen NS1-proteiiniin. Kun NS1-vasta-aineiden sitoutumista tutkittiin itse tuotettuun NS1-proteiiniin, absorbanssiarvot olivat matalammat kuin kaupallisen, mutta erottuivat negatiivisten näytteiden tuloksista. Infektoituneen, näytenumerolla 9, absorbanssiarvot olivat selvästi korkeammat kuin muilla infektoituneilla. Tulos erottui selvästi sekä kaupallisen että oman NS1-proteiinin kanssa tehdyistä analyyseistä.



Kuva 17. Tuotetun NS1-proteiinin testaus ELISA:ssa kaupallisen proteiinin rinnalla. TBEV-infektoituneiden seeruminäytteiden (Inf 2, 6, 9) vasta-aineiden sitoutumista testattiin kaupalliseen ja itse tuotettuun NS1-proteiiniin. Lisäksi testattiin rokotettujen henkilöiden (vac 6 ja 12) vasta-aineiden sitoutumista NS1-proteiineihin. Negatiivisina kontrolleina käytettiin (neg 1 ja 2) kokonaan TBEV-negatiivisia seeruminäytteitä.

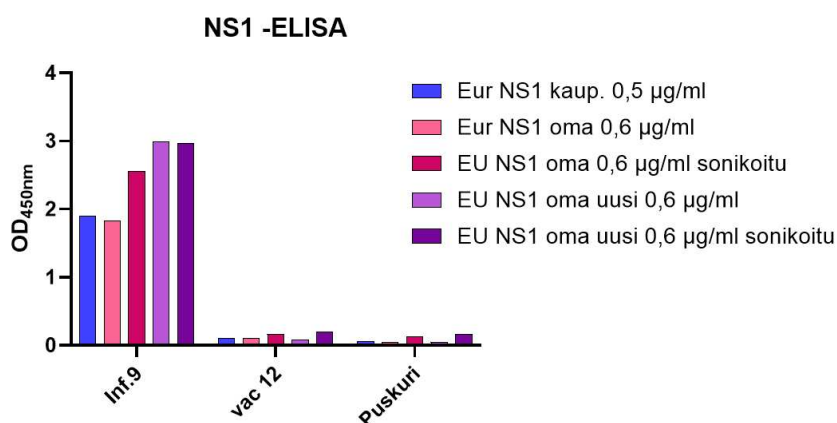
NS1-proteiinia tuotettiin lisää jatkoanalyysia varten ja uutta proteiinia testattiin ELISA-menetelmällä aikaisempien tuottojen rinnalla (kuva 18). NS1-vasta-ainepositiviset näytteet antoivat huomattavasti alhaisemmat absorbanssiarvot, kun antigeeninä käytettiin ensimmäisen tuoton NS1-proteiinia. Absorbanssiarvot pysyivät matalina huolimatta NS1-antigeenin määrän kasvattamisesta 0,5µg:sta 0,6µg:aan. Absorbanssiarvot olivat korkeammat, kun antigeeninä käytettiin uutta tuotettua NS1-proteiinia, mutta ne eivät yllä samalle tasolle kuin kaupallista NS1-proteiinia käytettäessä. Absorbanssiarvot olivat myös huomattavasti alhaisemmat kuin aiemmin tehdyssä analyysissä (kuva 17.) samalla proteiinilla. Absorbanssiarvot laskivat yli 2,5:stä noin yhteen (OD_{450nm}). Absorbanssiarvot uuden tuoton NS1-proteiinia käytettäessä oli yli 2,5 (OD_{450nm}), kuten vanhemman tuoton NS1-proteiini absorbanssiarvot arvot edellisessä ELISA-analyysissä.



Kuva 18. NS1-ELISA:ssa uuden NS1-tuoton proteiinin testaus. Ensimmäisen tuoton NS1-proteiineja käytettiin kahdella eri pitoisuudella ja uutta NS1-proteiinia verrattiin kaupalliseen ja ensimmäisen tuoton proteiineihin. TBEV-infektioituneiden seeruminäytteiden (Inf 2, 6, 9) vasta-ainesten sitoutumista testattiin kaupalliseen ja itse tuotettuun NS1-proteiiniin. Lisäksi testattiin rokotettujen henkilöiden (vac 6 ja 12) vasta-ainesten sitoutumista NS1-proteiiniin. Negatiivisina kontrolleina käytettiin (neg 1 ja 2) kokonaan TBEV-negatiivisia seeruminäytteitä.

NS1-proteiinin antigeenisuuden palauttamiseksi proteiininäytettä sonikoitiin ennen kiinnittämistä ELISA-levyn kaivoon. Sonikoidut ja sonikoimattomat NS1-proteiinit testattiin rinnan ELISA:ssa kahdella seeruminäytteellä, joista toinen oli vahva NS1-vasta-ainepositivinen ja toinen NS1-vasta-ainenegatiivinen (kuva 19.). Uudesta tuotosta puhdistetun pakastamattoman proteiinin kanssa absorbanssiarvossa ei havaittu muutosta verrattuna sonikoituun saman tuoton proteiinin absorbanssiarvoon.

Ensimmäisen tuoton proteiinilla absorbanssiarvot olivat 2 (OD_{450nm}) molemmin puolin, mikä erottui selvästi negatiivisista absorbanssiarvoista (vac 12 kuvassa 19) ja taustasta (Puskuri kuvassa 19). Proteiinilla saatiin korkeampi absorbanssiarvo sonikoidusta näytteestä verrattuna sonikoimattomaan (noin 2 \rightarrow 2,5 OD_{450nm}), mutta ero ei ole merkittävä. Kaupallisen NS1-proteiinin kanssa absorbanssiarvo jäi alle kahden, vaikka aikaisemmissa samalla protokollalla tehdyissä analyyseissä arvo oli noin 3,5 (kuva 18 ja 17). Itse tuotettu NS1-proteiinia voi käyttää ELISA-testissä, koska infektoituneiden potilasseerumien NS1-vasta-aineet tunnistavat sen. NS1-proteiinin varastointi ongelman vuoksi itse tuotettua proteiinia tulee käyttää heti puhdistuksen jälkeen ilman pakastamista. Itse tuottamalla NS1-proteiineilla voidaan tutkia NS1-vasta-ainestatuksen osalta tuntemattomia näytteitä jatkossa, koska sillä NS1-ELISA-testissä saadaan negatiivisista tuloksista selvästi eroavat absorbanssiarvot.

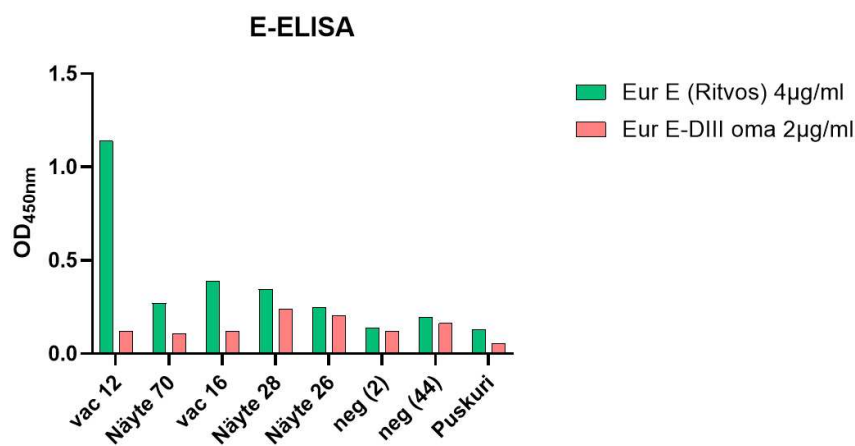


Kuva 19. Sonikoinnin vaikutus NS1-proteiinin toimintaan ELISA:ssa. Ensimmäisen tuoton NS1-proteiinia ja toisen tuoton NS1-proteiinia verrattiin sonikoituna ja sonikoimattomana kaupalliseen NS1-proteiiniin. Vasta-aineena käytettiin vahvasti NS1-vasta-ainepositiivisen potilaan seeruminäytettä (Inf.9). Lisäksi testattiin rokotetun henkilön (vac 12) vasta-aineiden sitoutumista NS1-proteiiniin.

5.4.2 E-proteiiniin perustuvan ELISA:n pystyttäminen

E-proteiiniin sitoutuvien vasta-aineiden sitoutumista tutkittiin E-proteiinin III-domeeniin. ELISA-analyysi tehtiin, jotta saatiin selville, sitoutuvatko koko E-proteiinin tunnistavat vasta-aineet itse tuotettuun III-domeeniin ja voiko III-domeenia käyttää koko proteiinin sijaan potilasnäytteiden analysoimiseen. Tuotettua E-proteiinin III-domeenia testattiin ELISA:ssa kokonaisen E-proteiinin rinnalla (kuva 20). Analyysiin valittiin aikaisempien

testien perusteella E-proteiinia vahvasti, keskivahvasti ja heikosti tunnistavia seeruminäytteitä. Kontrollina käytettiin seeruminäytteitä, joissa ei ole E-vasta-aineita. E-proteiinin III-domeenia kiinnitettiin ELISA-levyn kaivoihin pienemmällä pitoisuudella kuin kokonaista E-proteiinia, koska se on kooltaan kokonaista paljon pienempi. Vahvasta positiivisesta näytteestä absorbanssiarvo oli vain 1 (OD_{450nm}) tasolla kokonaisella E-proteiinilla, mikä oli ollut aiemmissa tutkimuksissa korkeampi. Muutkin positiiviset näytteet (Näyte 70, vac 16, Näyte 28 ja Näyte 26 kuvassa 20) antoivat vain alle 0,5 (OD_{450nm}) arvoja koko E-proteiinin kanssa. Positiivisilla näytteillä III-domeenin absorbanssiarvot olivat negatiivisten näytteiden tasolla (neg 2 ja 44 kuvassa 20).

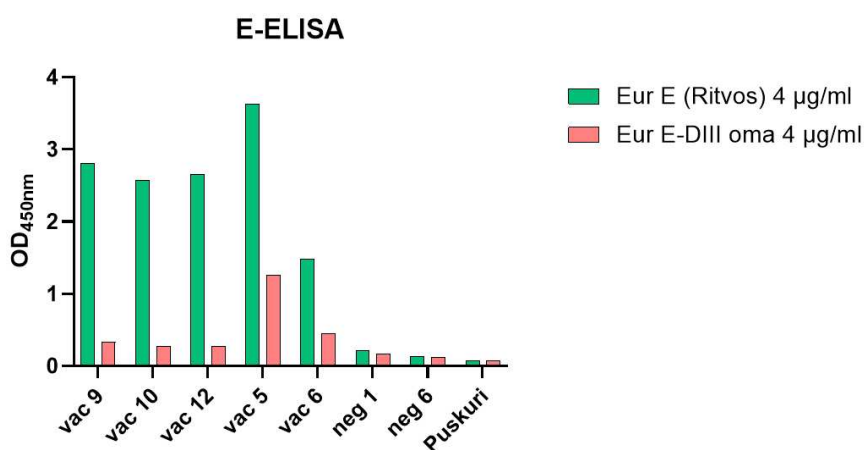


Kuva 20. E-proteiinin III-domeenin vertailu koko E-proteiiniin ELISA-testissä. Tuotettu E-proteiinin III-domeenin testaus rokotettujen potilaiden seeruminäytteiden kanssa ELISA-testissä. E-proteiini vasta-aineita sisältävät näytteet vac 12, näyte 70, vac16, näyte 28 ja näyte 26. Negatiivisia näytteitä ovat neg 2 ja neg 44, jotka ovat kokonaan TBEV-negatiivisia.

Analyysi toistettiin useammalla E-proteiinia vahvasti tunnistavalla seeruminäytteellä (kuva 21). Lisäksi E-proteiinin III-domeenia kiinnitettiin kaivoihin sama pitoisuus kuin kokonaista E-proteiinia. III-Domeeni kanssa vahvat anti-E-vasta-aine-positiiviset (va9, vac10, vac12, vac5 ja vac6 kuvassa 21) näytteet saivat saman tasoisia absorbanssiarvoja negatiivisten näytteiden (neg 1 ja neg 6 kuvassa 21) kanssa. Vac 5 näytteen kohonneen absorbanssiarvon uskottiin tulevan proteiinin epäpuhtauksista. Tulos oli samanlainen kuin aikaisemmassa ELISA-analysissä (kuva 20). Kokonaisen E-proteiini kanssa korkein absorbanssiarvo oli noin 3,5 (OD_{450nm}) ja muut positiiviset olivat vähän alle 3 (OD_{450nm}) vahvoilla positiivisilla rokotettujen potilaiden näytteillä (vac

kuvassa 21). Vac 12 (kuva 21) näytteen absorbanssiarvo olivat puolet korkeampi kuin edellisessä E-proteiini-ELISA:ssa (kuva 20). Koska E-proteiinivasta-aineet eivät sitoudu irralliseen III-domeeniin, ELISA-testissä III-domeenia ei voi käyttää antigeeninä.

Rokotettujen henkilöiden E-proteiini vasta-aineet sitoutuvat yhteistyökumppaniemme tuottamaan kokonaiseen E-proteiiniin, joten sitä voidaan käyttää ELISA-testissä.



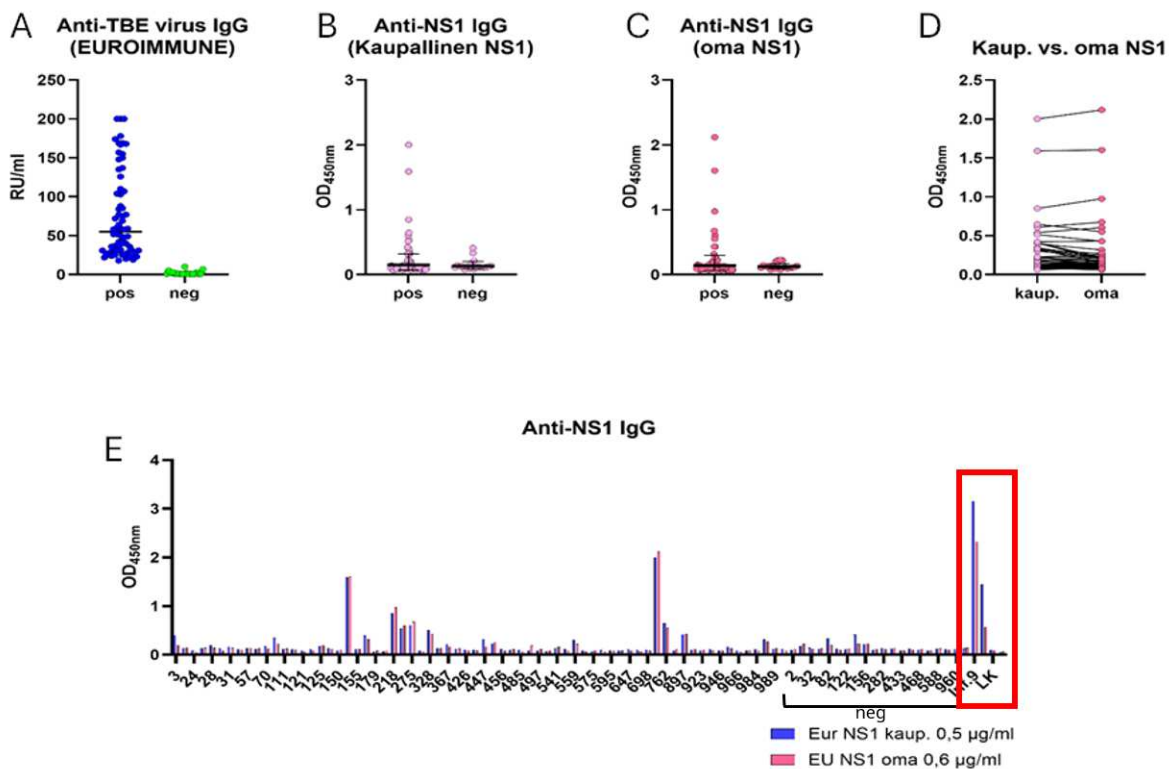
Kuva 21. E-proteiinin III-domeenin testaus ELISA-testissä koko E-proteiinin rinnalla. E-proteiinin III-domeenin kiinnityspitoisuutta kasvatettiin edelliseen ELISA-testiin verrattuna. Näytteinä käytettiin paljon E-proteiinia tunnistavia vasta-aineita sisältäviä seerumeita (vac 5, 6, 9, 10 ja 12). Negatiivisina kontrolleina käytettiin (neg 1 ja 6) kokonaan TBEV-negatiivisia seeruminäytteitä.

5.4.3 Seerumiaineiston analyysi NS1-ELISA:lla

Terveiden henkilöiden seeruminäytesarjasta haluttiin selvittää mahdolliset infektoituneiden seeruminäytteet. Seeruminäytteet analysoitiin ensin koko virukseen sitoutuvien vasta-aineiden varalta aineiston rajaamiseksi rokotettuihin tai infektoituneisiin ja TBEV-negatiivisiin. Seeruminen vasta-aineet koko virusta vastaan tukittiin TYKS:n klinisen mikrobiologian käyttämällä ELISA-testillä. Näytteistä 10 % oli positiivisia koko viruksen suhteen (99/1000). Koko virukselle vasta-aineita sisältävistä seeruminäytteistä valittiin 68 ja negatiivisista valittiin 40 (EUROIMMUNE kuvassa 22 A.). EUROIMMUNE-testillä yli mittausasteikon menevien tulosten arvoksi asetettiin 200 RU/ml ja alle mittausasteikon jääville näytteille annettiin arvoksi 1 RU/ml graafisen esityksen muodistamiseksi.

Koko virus ELISA:n jälkeen analysoitiin valituista näytteistä vasta-ainepositiivisuutta NS1-proteiinille eli erotettiin infektoituneiden näytteet vain rokotettujen näytteistä tässä työssä pystytetyllä NS1-ELISA-testillä. Testissä seeruminäytteet analysoitiin rinnakkain

kaupallisen ja itse tuotetun NS1-proteiinin kanssa. Kaupallisen NS1-proteiinin kanssa kaksi seeruminäytettä saivat selvästi muita korkeammat absorbanssiarvot ja viiden näytteen tulokset olivat negatiivisiin absorbanssiarvoihin verrattuna korkeampia (Anti-NS1 IgG (Kaupallinen NS1) kuvassa 22 B.). Itse tuotetun NS1-proteiinin kanssa myös kaksi seeruminäytettä saivat selvästi korkeimmat absorbanssiarvot ja viiden näytteet arvot erottuivat negatiivisten näytteiden tuloksista (Anti-NS1 IgG (oma NS1) kuvassa 22 C). Kun verrattiin absorbanssiarvoja kaupallisen ja oman NS1-proteiinin välillä, huomattiin, että samalla seeruminäytteellä tulokset ovat suhteellisen samantasoisia kummallakin proteiinilla (kaup. vs. oma NS1 kuvassa 22 D.) Seeruminäytteiden tuloksia verrattiin myös kontrollinäytteisiin, joita oli TBEV-infektoituneiden korkea NS1-positiivinen näyte ja matalampi NS1-positiivinen näyte sekä rokotetun NS1-negatiivinen näyte (merkattu punaisella laatikolla kuvassa 22 E.). Verrattuna positiivisiin kontroleihin kaupallisen ja itse tuotetun NS1-proteiinin kanssa korkean tuloksen saaneiden näytteiden absorbanssiarvot jäivät korkean ja matalamman positiivisen kontrollin tulosten väliin. Viisi seeruminäytteen tulokset olivat lähes matalamman positiivisen kontrollin absorbanssiarvojen tasolla. Näiden havaintojen perusteella koko TBEV-positiivisista näytteitä 10 %:a oli NS1-positiivisia (7/68) ja koko seeruminäytesarjaan suhteutettuna NS1-positiivisia oli 0,7 % (7/1000). NS1-antigeeniin perustuvan tässä työssä pystytetyn ELISA-menetelmän avulla NS1-vasta-aineita pystytään tunnistamaan.

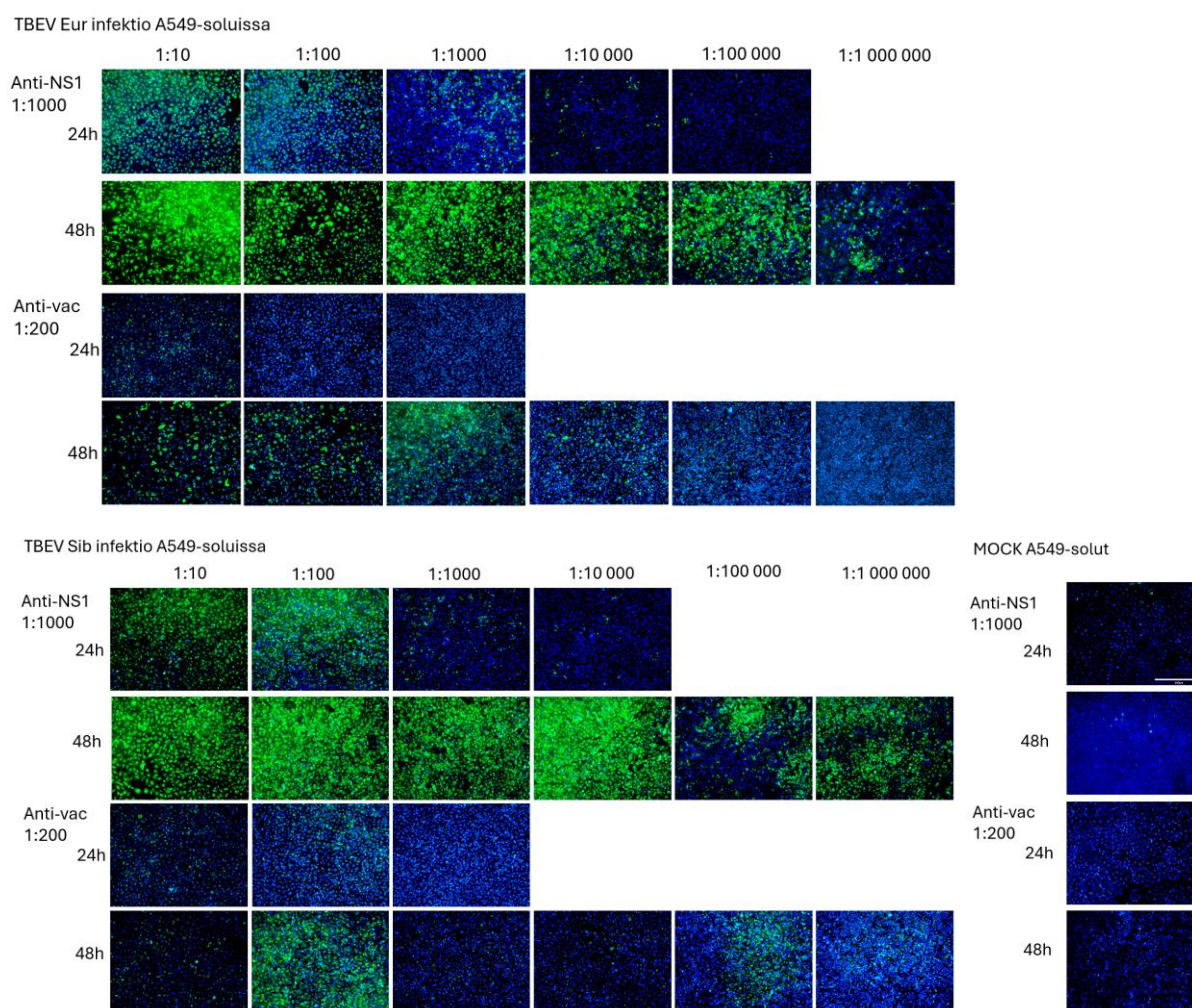


Kuva 22. NS1-serologinen testaus Finnterveys -näytesarjan seeruminäytteille. Vuonna 2017 kerätystä seerumiaineistosta käytettiin 68 TBEV-positiivista ja 40 TBEV-negatiivista näytettä (A.). Ne analysoitiin NS1-ELISA:ssa käyttäen tuotettua ja kaupallista NS1-proteiinia antigeenina. NS1-proteiini tulokset eroteltiin sen perusteella, onko ne koko TBEV-positiivisia (pos) vai negatiivisia (neg) (B. ja C). Samasta potilasnäytteestä saatujen absorbanssiarvojen vertaaminen itse tuotetulla ja kaupallisella NS1-proteiinilla (D.). NS1-kuvattiin myös samassa kuvaajassa verrattuna korkean positiiviseen kontrolliin, keskipitkään positiiviseen kontrolliin ja negatiiviseen kontrolliin (E).

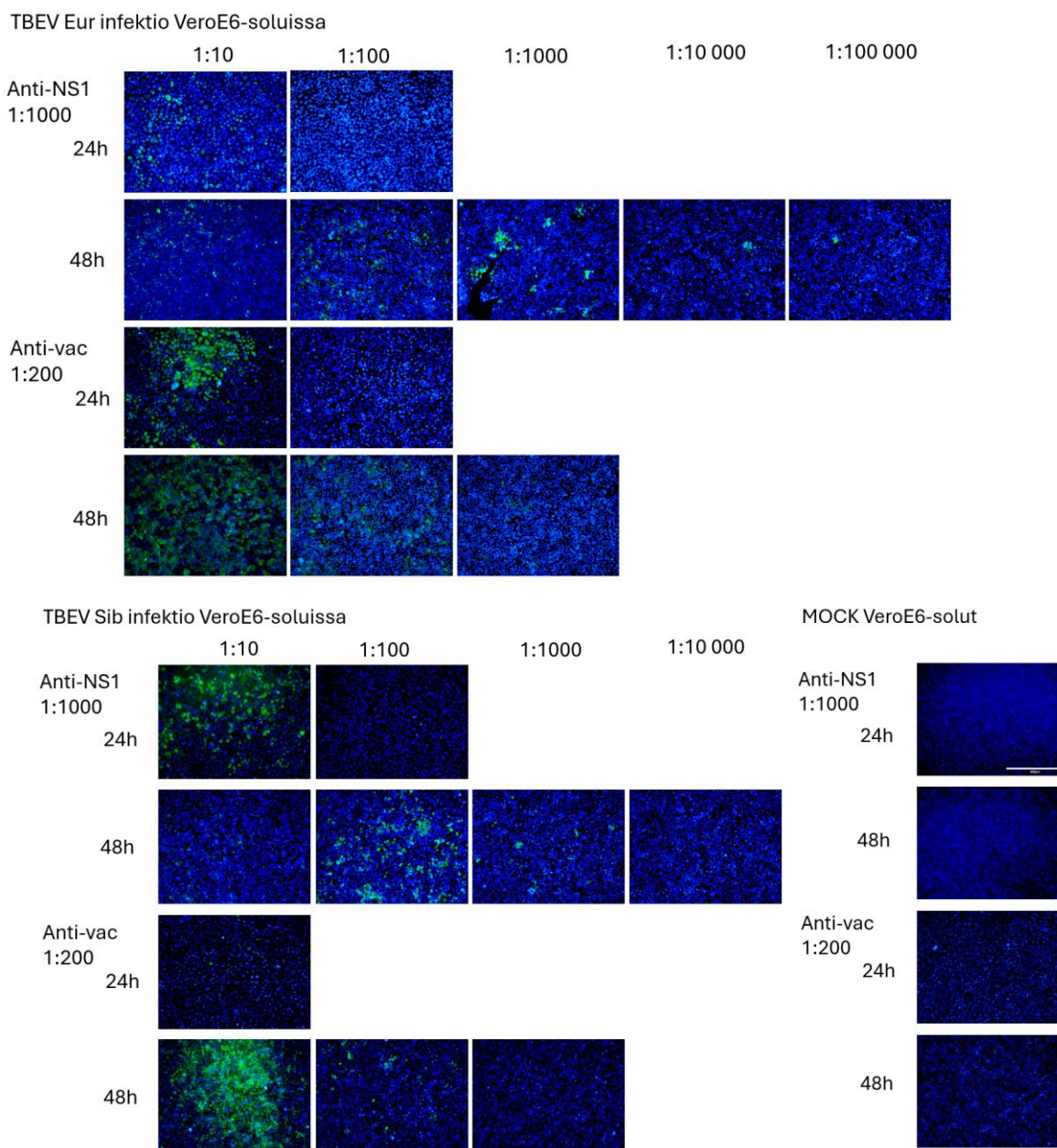
5.4.4 Immunisoitujen kanien antiseerumien testaus

TBE-virusinfektioiden tunnistamiseksi eri analyseissä haluttiin viruksen ja NS1-proteiinin tunnistavia vasta-aineita. Niiden tuottamiseksi yksi kani immunisoitiin ihmisen TBEV-rokotteella ja yksi eurooppalaiselle NS1-proteiinilla. Immunisoitujen kani seerumeita analysoitiin immunofluoresenssimäärityksellä seerumien verifiointiksi. Tavoite oli tutkia tunnistavatko kani seerumien vasta-aineet TBEV:lla infektoidut solut. TBEV on luokan 3 patogeeni ja sen kanssa työskentely vaatii bioturvallisuustason 3 (BSL 3) laboratorion. Infektiot suoritettiin muun henkilöstön toimesta ja tässä työssä käytettiin infektioituja soluja, jotka oli inaktivoitu fiksaamalla formaldehydillä. A549- ja Vero-solut infektioitiin TBEV:n eurooppalaisella ja siperialaisella alatyyppillä eri pitoisuuksilla 24 h ja 48 h ajan (kuva 23–24.). Vaikka kani immunisoitiin eurooppalaisen TBEV:n NS1-proteiinilla, kani seerumin vasta-aineet

tunnistavat sekä eurooppalaisella että siperialaisella TBEV:llä infektoidut solut. Anti-NS1-seerumi tunnisti infektion huomattavasti paremmin kuin anti-rokote-seerumi, jolla käytettiin paljon vahvempaa laimennosta (1:200 vs. 1:1000). TBEV infektoi A549-solut tehokkaammin kuin VeroE6-solut mikä oli selkeästi nähtävissä 48 tunnin kohdalla: A549-soluissa TBE-viruksen laimennos 1:1000000 sai aikaan lähes täyden infektion, kun taas VeroE6-soluissa vastaavassa aikapisteessä solut infektoituivat ainoastaan 1:10 viruslaimennoksella. TBEV:n siperialainen alatyppi infektoi molempia solutyyppiä tehokkaammin kuin eurooppalainen.



Kuva 23. NS1- ja TBEV-rokoteimmunisoitujen kaniin seerumien analysointi TBEV-infektoiduilla A549-soluilla. Kani immunisoitiin eurooppalaisella NS1-proteiinilla ja toinen kaupallisella Ticovac-rokotteella. Anti-NS1-seerumia testattiin 1:1000 laimennoksella ja anti-rokote-seerumia 1:200 TBEV:n siperialaisella tai eurooppalaisella alatyypillä infektoituihin soluihin (viruslaimennokset 1:10–1:1000000). Vasta-aineiden havaitsemiseen käytettiin immunofluoresenssimääritystä. Kuvat otettiin EVOS fluoresenssimikroskoopilla (Life technologies) x10 suurennuksella. Ensimmäisessä MOCK kuvassa näkyvä mittakaava on 400µm.



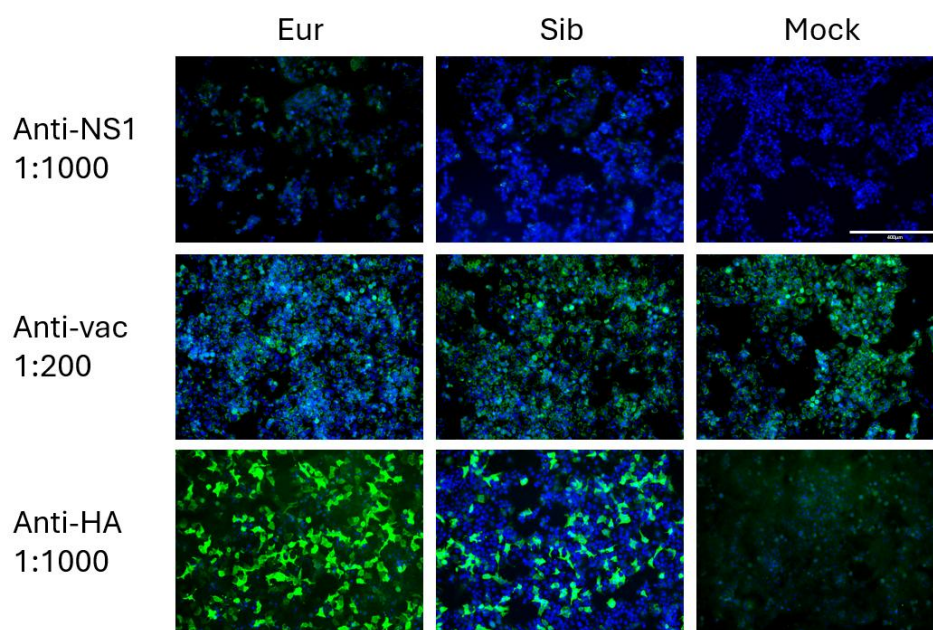
Kuva 24. NS1- ja TBEV-rokoteimmunisoitujen kaneista saadut seerumien analysointi TBEV-infektoiduilla VeroE6-soluilla. Kani immunisoitiin eurooppalaisella NS1-proteiinilla ja toinen kaupallisella Ticovac-rokotteella. Anti-NS1-seerumia testattiin 1:1000 laimennoksella ja anti-rokote-seerumia 1:200 TBEV:n siperialaisella tai eurooppalaisella alatyypillä infektioituihin soluihin (viruslaimennokset 1:10–1:1000000). Vasta-aineiden havaitsemiseen käytettiin immunofluoresenssimääritystä. Kuvat otettiin EVOS fluoresenssimikroskoopilla (Life technologies) x10 suurennuksella. Ensimmäisessä MOCK kuvassa näkyvä mittakaava on 400µm.

Lisäksi tutkittiin tunnistavatko kaneista saadut seerumit NS1-proteiinin sitä ekspressoivissa HUH7-soluista (kuva 25.). NS1-vasta-aineita sisältävän kaniseerumin värjäyksestä havaittiin vain muutama värjäytynyt solu. Minkä takia todettiin, että anti-NS1-seerumi tunnistaa heikosti HUH7-soluissa ekspressoitua NS1-proteiinia. Kun Anti-

rokote-seerumin värjäyksestä havaittiin, että transfektoimattomien solujen perusteella taustaa oli paljon eikä siitä NS1-spesifisyyttä erotu. Transfekoimattoman kuvan solujen epäiltiin kuitenkin transfektoituneen vahingossa, koska kuvassa havaittiin spesifistä sitoutumista. HA-tagin avulla värjäytyistä soluista havaittiin, että HA-tägäty NS1-proteiini oli tuottunut HUH7-soluissa ja transfektiotehokkuus oli arviolta 30–40 %. HA-värjäyksen perusteella muissakin näytteissä oli transfektoituneita soluja, mutta vasta-aineet eivät sitoudu NS1-proteiiniin.

Kanien immunisaatiosta saatiin seerumeita, jotka tunnistavat TBEV-infektion A549- ja VeroE9-soluissa. Sekä rokotevasta-aineita että NS1-vasta-aineita sisältävä seerumeita voidaan käyttää infektion tunnistavina reagensseina tulevilla analyysillä.

TBEV NS1 transfektoitu Huh7-soluihin



Kuva 25. NS1- ja TBEV-rokoteimmunisoitujen kanien seerumien analysointi TBEV NS1-proteiinia ilmentävillä HUH7-soluilla. Kani immunisoitiin eurooppalaisella NS1-proteiinilla ja toinen kaupallisella Ticovac-rokotteella. Anti-NS1-seerumia testattiin 1:1000 laimennoksella ja anti-rokote-seerumia 1:200 laimennoksella. Transfektion positiivisena kontrollina käytettiin anti-HA-vasta-ainetta. Vasta-aineet havaittiin immunofluoresenssimäärityksellä. Kuvat otettiin EVOS fluoresenssimikroskoopilla (Life technologies) x10 suurennuksella. Oikean yläkulman kuvassa näkyvä mittakaava on 400µm.

6 Tulosten tarkastelu

Työn tarkoitus oli pystyttää NS1-proteiiniin perustuva ELISA-testi, jonka avulla voidaan erottaa TBEV-infektion aiheuttava immuunivaste rokotteen aiheuttamasta vasteesta. Työssä saatiin tuotettua NS1-proteiinia nisäkässolujärjestelmässä. Puhdistetun proteiinin avulla immunisoitiin kani, josta saatiin TBEV-infektion tunnistavia vasta-aineita jatkotutkimuksia varten. Puhdistetulla proteiinilla saatiin pystytettyä ELISA-testi, joka tunnistaa infektoidun henkilön NS1-vasta-aineet.

6.1.1 NS1-proteiinin ja E-proteiinin III-domeenin tuotanto

Expi293-soluilla NS1-proteiinin ensimmäinen tuotto tehtiin pcDNA3.1 vektorissa. NS1-geenin C-terminaaliseen päähän kloonattiin His-tagin puhdistusta varten. Kerätyn solukasvatuksen analyysistä selvisi, että solut ovat tuottaneet NS1-proteiinia. Solu ei eritä NS1-proteiinia solun ulkopuolelle, eikä NS1-proteiini tuotu liukoiseen muotoon solun sisälle vaan sitoutuu solun rakenteisiin. Vaikkakin on osoitettu, että NS1-proteiini erittyy elimistössä verenkiertoon, tuottosolu ei eritä NS1-proteiinia (Camarão ja muut 2023). Proteiinituotannossa käytetyt HEK293-solut ovat munuaissoluista johdettuja ja TBEV infektoi ihonalaiskudoksessa soluja, joista NS1-proteiinia erittyy. Näiden solujen erot voivat selittää, miksi HEK293-solut eivät eritä NS1-proteiinia.

Flavivirusten rekombinanttien NS1-proteiinin tuottaminen liukoiseen muotoon vaatii sekreetiosignaalin ja kirjallisuuden mukaan siihen on käytetty CD33- ja HSA-sekreetiosignaalipeptidiä (Camarão ja muut 2023). Nämä molemmat signaalisekvenssit kloonattiin NS1-geeniin N-terminaaliseen päähän. Signaalipeptidien toimivuutta kokeiltiin HEK293-soluissa. Solut eivät tuota kummallakaan sekreetiosignaalilla proteiinia solun ulkopuolelle mediumiin. Kuitenkin CD33-signaalilla solu tuottaa NS1-proteiinia solun sisälle.

Proteiinituotannon tehostamiseksi testasimme myös toista transfektioreagenssia. Tähän asti käytimme TransIT-reagenssia, mutta kokeilimme transfektiotehokkuutta myös Lipofectamiinilla, kun plasmidi pitoisuutta muutettiin. Korkein transfektiotehokkuus saavutettiin, kun TransIT-reagenssin kanssa 10 000 solulle transfektoitiin 100ng plasmidia. Skaalattuna sama määrä isompiin tuottoihin tarkoittaisi

10µg per miljoonaa solua. Optimoitu transfektio mahdollistaa suuremman proteiinisaannon tuotannosta, kun suurempi osuus soluista tuottaa haluttua proteiinia. Transfektion optimointi ei vaikuta yksittäisen solun proteiinituotantoon. Optimoitu transfektio pitoisuus otettiin käyttöön, kun TBEV-Eur-NS1-CD33-pcDNA3.1 transfektoitiin uudelleen HEK293-soluihin.

Seuraavassa HEK293-solutuotannossa testattiin tuotannon optimaalisen tuottopituuden vaikutusta NS1-proteiini eritykseen. Solu tuottaa NS1-proteiinia mediumiin, mutta proteiinin määrä ei kasva mediumissa kolmannesta päivästä eteenpäin. Aikaisempaan tuottoon verrattuna mediumit kerättiin T25-pullon solukasvatuksesta, kun aikaisemmin näytteet olivat 6-kuoppalevyiltä kerätty. NS1-proteiini on voinut tuottua mediumiin myös aikaisemmassa tuotossa, mutta 6-kuoppalevyllä mediumiin tuottuu NS1-proteiinia niin vähän, että sitä ei havaita immunoblotanalyyseissä. Solut eivät eritä NS1-proteiini kolmannen päivän jälkeen, mutta sitä tuottuu solun sisälle vielä neljäntenä päivänä. Kuudennesta päivästä eteenpäin NS1-proteiinin määrä laskee solun sisällä eli solu alkaa hajottaa NS1-proteiinia. Solu tuottaa ulkopuolelle huomattavasti vähemmän proteiinia kuin solun sisälle ja erittäminen loppuu ja suuremmat määrät proteiinia jäävät solun sisälle. Tämän voisi selittää NS1-proteiinin eritysureitin saturoituminen, kun proteiinin pitoisuus solussa kasvaa erityksen säätely estää reitin toiminnan.

Samalla tavoin Expi293-solutuotannossa kuin HEK293-soluilla mediumiin erittyi kolmanteen päivään mennessä proteiinia, ja sen jälkeen proteiinin määrä ei kasva mediumissa. Expi293-solujärjestelmän valmistajan (Thermo Fisher Scientific) mukaan suurella tuotantotasolla erityseritti voi saturoitua monimutkaisten proteiinien tai vasta-aineiden tuotannossa tai jos käyttää aineenvaihduntaa tehostavia aineita. Solun sisälle tuottuvan liukoisen proteiinin määrän perusteella viisi päivää on optimaalinen proteiinituoton pituus Expi293-soluilla.

Tulosten perusteella proteiinituoton alussa solu tuottaa NS1-proteiinia mediumiin, mutta myöhemmin vaikka solun sisäpuolella proteiinin määrä kasvaa, solu ei enää eritä proteiinia. Tämän takia NS1-proteiinia puhdistettiin myös lyaatista, jolloin kohdeproteiini täytyy puhdistaa kaikkien solun proteiinien seasta ja epäpuhtauksien

mahdollisuus on todennäköisempää. NS1-proteiini saatiin kuitenkin tarpeeksi puhtaaksi ELISA-testiä varten. Proteiininpuhdistuksessa NS1-proteiini ei sitoutunut kunnolla ensin kokeiltuun spinkolumniin. Tulosten perusteella suurin osa NS1-proteiinista tuli mediumin mukana suoraan kolumnin läpi ja lisää irtosi pesuliuoksen mukana. Pakatulla kromatografiakolumnilla proteiinista saatiin suurempi osuus kiinnittymään kolumniin niin, että se irtosi vasta eluutiossa. Pakatulla kromatografia kolumnilla mediumi pumpattiin peristaattisella pumpulla kolumniin, jolloin mediumin läpikulku nopeus oli paljon hitaampi kuin spinnikolumnilla ja proteiinilla oli enemmän aikaa sitoutua kolumniin. Myös sitoutumispuskuri matalampi imidatsolipitoisuus edesauttaa proteiini sitoutumista, koska imidatsoli kilpailee kolumniin sitoutumisesta His-tagin kanssa (Crowe ja muut 1996). Pesupuskurin imidatsolipitoisuutta myös laskettiin, jotta pesupuskuri ei irrota NS1-proteiinia kolumnista. Tämä kuitenkin sillä riskillä, että proteiini ei puhdistu optimaalisesti. Imidatsoli on hellävaraisempi kolumnin puhdistamiseen ja eluointiin kuin pH:n muutos, koska jälkimmäinen voi vahingoittaa proteiinia (Crowe ja muut 1994). Mediumista proteiinin puhdistaminen olisi helpompaa ja tuote puhtaampaa, koska mediumissa on vähemmän mahdollisia epäpuhtauksia, mutta NS1-proteiinin saanto jäi matalaksi pelkästä mediumista.

6.1.2 NS1-serologisen ELISA-testin pystyttäminen

NS1-ELISA-testissä kaupallista NS1-proteiinia verrattiin itse tuotettuun NS1-proteiiniin. Itse tuotetun NS1-proteiini kanssa absorbanssiarvojen erot eri seeruminäytteiden välillä on yhtä suuret kuin kaupallisella proteiinilla. Positiivisilla seeruminäytteillä kaupallista proteiinia käyttäen absorbanssiarvot ovat korkeampia, vaikka proteiinin kiinnityspitoisuus oli 20 % pienempi itse tuotetulla proteiinilla. Itse tuotetussa NS1-proteiinissa epäpuhtaudet laskevat NS1-proteiinin todellista pitoisuutta. Itse tuotettu NS1-proteiini voi myös laskostua epäsuosiollisesti tuottojärjestelmässä, mikä voisi laskea anti-NS1-vasta-aineiden aviditeettia proteiinia kohtaan. Esimerkiksi His-tag tai sekretiosignaaliptidi saattavat häiritä proteiinin laskostumista, mikä voi laskea vasta-aineiden sitoutumistehokkuutta.

Kahta eri NS1-proteiini tuotantoerää testattiin rinnakkain ELISA-testissä, jotta tuottokertojen tasalaatuisuus voitaisiin varmistaa. Vaikka testi suoritettiin samoilla

seeruminäytteillä kuin edellinen NS1-ELISA, vanhan tuoton proteiinit antoivat huomattavasti matalampia tuloksia, kun taas uuden tuotannon proteiinit antoivat samantasoisia tuloksia kuin vanhemmat NS1-proteiinit edellisessä ELISA-testauksessa. Kuten aikaisempi SDS-PAGE-geeli kaikista proteiinituotoista, ELISA-testin tulos viittaa siihen, että proteiini joko hajoaa tai aggregoituu pakastuksen aikana. Aggregaattien purkamiseksi kokeiltiin proteiinin sonikointia. Testauksessa sonikoitiin näytteet sekä uudesta NS1-tuotannosta että vanhemmasta tuotosta. Uuden tuotannon proteiineilla sonikoinnilla ei absorbanssiarvoihin ollut juuri vaikutusta, koska proteiini analysoitiin heti puhdistuksen jälkeen eikä proteiinit ole vielä hajonneet tai aggregoituneet. Vanhemman NS1-proteiinin sonikoiminen nosti absorbanssiarvoa vähän, mutta ei merkittävästi. Tulos viittaisi siihen, että aggregoitumista ei juuri tapahdu, vaan proteiini hajoaa pakastuksessa. Yksi ratkaisu proteiinin säilyvyyden parantamiseen on proteiininäytteen jakaminen pienempiin eriin ennen pakastusta, jotta näytteelle ei tule useampaa sulatusta ja pakastusta, mikä vielä edesauttaisi proteiinien hajoamista.

6.1.3 E-proteiinin III-domeenin antigeenisuuden testaaminen

E-proteiinin III-domeenia tuotettiin, jotta se voisi toimia antigeeninä anti-E-vasta-aineiden tunnistamisessa koko E-proteiinin sijaan. E-proteiinista tuotettiin vain III-domeeni, koska sitä vastaa muodostuu vasta-aineita sekä infektiossa että rokotuksessa (Aregay ja muut 2024). Tämä tehtiin mahdollisena ratkaisuna E-proteiinin tuotto-ongelmiin. Lisäksi III-domeenin avulla voisi olla mahdollista erottaa TBEV-alaluokkien muodostamat vasta-aineet. Lisäksi E-proteiinin III-domeeni tuottui suurimmaksi osaksi mediumiin ja puhdistuu paremmin kuin NS1-proteiini.

E-proteiinin III-domeenia testattiin ELISA:ssa verraten kokonaiseen E-proteiiniin. III-domeenia käytettäessä positiivisten näytteiden antamat absorbanssiarvot olivat samalla tasolla negatiivisten näytteiden kanssa. Tämä viittaisi siihen, että anti-E-vasta-aineet eivät sitoudu III-domeeniin ELISA-testissä. III-domeeni on vain 12kDa, minkä takia vasta-aine ei välttämättä pääse sitoutumaan kuopan pohjaan kiinnitettyyn proteiiniin. Pieniä proteiineja kiinnittyy kuopanpohjalle määrällisesti enemmän kuin isoja, koska proteiinia kiinnitetään massan perusteella. Pieniä proteiineja voi olla niin tiiviisti, että suhteessa paljon isommat vasta-aineet eivät mahdu sitoutumaan

antigeeninä toimivaan proteiiniin. III-domeeni voi myös laskostua eri tavalla itseksensä kuin koko E-proteiinissa, minkä takia vasta-aineet eivät ole enää sitoudu spesifisesti proteiiniin. Tähän ratkaisuna voisi olla alustaproteiini, joka esittelisi III-domeenia vasta-aineille. Könenkamp ja muut 2022 tutkimuksessa E-proteiinin III-domeenia on käytetty antigeeninä lusiferaasi-immunopresipitaatiojärjestelmässä lusiferaasin kanssa fuusioproteiinina. Tutkimuksessa Beck ja muut 2015 E-proteiinin III-domeeni on tuotettu rekombinanttina stabiloivan SNAP-tagin (Covalys BioSciences AG) kanssa ja todettu toimivaksi antigeeniksi esimerkiksi neutralisaatiotestissä ja ELISA:ssa. E-proteiinin III-domeeni on tuotettu myös rekombinanttina NusA-tagin kanssa, mutta analyyseissä on havaittu reaktiivisuutta NusA-tagia kohtaan (Ikawa-Yoshida ja muut 2011). Näiden tutkimuksien perusteella alustaproteiini tulee testata myös erikseen, jotta testistä saadaan vain oikeita positiivisia tuloksia. ELISA:ssa alustaproteiinina voisi toimia myös esimerkiksi His-tagin sitova vasta-aine, joka on kiinnitetty kuopan pohjaan. Jokin näistä vaihtoehdoista voisi mahdollistaa vasta-aineiden sitoutumisen E-proteiinin III-domeeniin.

6.1.4 Potilasnäytesarjan analysoiminen NS1-serologisella testillä

THL:n aineistosta testattiin 68 TBEV-positiivista seeruminäytettä NS1-ELISA-testillä. Kahdesta näytteestä löytyi selvästi NS1-vasta-aineita ja viiden näytteen tulos erosi negatiivisista näytteistä. Kokovirukselle positiiviset, mutta NS1-negatiiviset näytteet, ovat mahdollisesti rokotettujen henkilöiden seeruminäytteitä, koska näytteet on kerätty vuonna 2017, jolloin Suomessa on ollut rokotusohjelma TBEV:tä vastaan. Seitsemän NS1-positiivista näytettä ovat mahdollisesti infektoituneiden henkilöiden seeruminäytteitä. Tämän perusteella 10 % kokoviruspositiivisista on infektoituneita ja 0,7 % infektoituneita 1000 terveen henkilön otannasta. NS1-seroprevalenssi tulokset ovat samalla tasolla kuin esimerkiksi tutkimuksessa Brêchet ja muut 2025. Läpimurtoinfektioita ei pystytä havaitsemaan pystytetyllä NS1-serologisella testillä, koska läpimurtoinfektion vaste antaa saman tuloksen testissä kuin vain infektoituneen vaste (E- ja NS1-positiivinen). Kuitenkin TBEV-rokotustietojen ja NS1-serologisen-testin avulla voisi tunnistaa läpimurtoinfektion. Kaupallisen ja oman NS1-proteiinin vertailun perusteella itse tuotettu NS1-proteiini on yhtä hyvä NS1-vasta-aineiden testaukseen

kuin kaupallinen NS1-proteiini. Lisäksi NS1-proteiinin kiinnittämispitoisuuden optimoinnilla voidaan säätää tulosten tasoa taustasignaalin rajoissa niin, että positiiviset eroavat mahdollisimman selkeästi negatiivisista.

NS1-serologisen testin optimointia varten tarvittaisiin testausta suuremmalla positiivisten seeruminäytteiden paneelilla, jonka avulla voisi määrittää testille raja-arvot. Tämä kuitenkin sen rajoissa, että taustan absorbanssiarvot pysyvät alhaisina. Kuten tutkimuksessa Grl ja muut 2020, NS1-serologiselle testille pitää tehdä sensitiivisyys- ja spesifisyysmääritykset ennen kuin se saadaan kliiniseen käyttöön. Grl ja muut 2020 tutkimuksessa NS1 IgG ELISA-testille sensitiivisyydeksi saatiin 98,53 % ja spesifisyydeksi 93,81 %. Tutkimuksessa päädyttiin siihen, että testi on epidemiologinen työkalu, koska tuloksiin ei vaikuta TBEV-rokotus. Sensitiivisyyden ja spesifisyyden lisäksi tarvitaan tutkimuksia siitä, kuinka kauan NS1-proteiiniin sitoutuvat vasta-aineet säilyvät infektion jälkeen. Lisäksi suuren näytemäärän kanssa tulisi testata testin ristireaktiivisuutta muiden flavivirusten kanssa (Aregay ja muut 2024).

Pystyttämämme NS1-serologisen testin periaate on tehty sille pohjalle, että TBEV-rokotukset eivät aiheuta NS1-vastetta vaan ainoastaan E-proteiinivastetta. Rokotuksissa käytetään inaktivoituja viruspartikkeleita, jotka on inaktivoitu esimerkiksi formalehydillä, kuten Ticovac-rokotteessa (Pfizer). Inaktivoitu viruspartikkeli ei infektoi soluja, joten NS1-proteiinia ei eritetä verenkiertoon. Jos rokotteeseen on jäänyt infektoivia viruksia, tai jos rokoteviruksen kasvatuksesta on rokotteeseen päätynyt NS1-proteiineja, silloin NS1-vaste on mahdollinen. Ruotsalaisessa tutkimuksessa 50 rokotetun seurantanäytteistä (Albinsson ja muut 2018) kolme oli positiivisia toisen ja kolmannen rokotuksen jälkeen. Tässä on mahdollisuus, että henkilö on saanut infektion kesken rokotussarjan, mutta NS1-serologinentulos on todella maltillinen. Artikkelissa on kuitenkin tultu päätelmään, että rokote ei aiheuta NS1-vastetta, koska epäillään altistumista virukselle kesken rokotusohjelman.

6.1.5 TBEV-infektion tunnistaminen immunisoitujen kaniin seerumeilla

Kaniin immunisaatiosta saadut antiseerumit tunnistavat TBEV-infektion, sekä Sib että Eur. Immunisaatiossa käytettiin Eur-proteiineja, mutta antiseerumit tunnistavat myös TBEV:n siperialaisen alatyyppin viruksella infektoidut solut. Tämän perusteella ainakin

osa epitoopeista, joita vastaan vasta-aineita syntyy, ovat TBEV:n eurooppalaisen ja siperialaisen alatyypin virukselle yhteisiä. Levanov ja muut 2015 tutkimuksessa siperialaisen ja eurooppalaisen TBEV:n infektiota pystyttiin erottamaan serologisella testillä, joka perustui IgM-vasteeseen. Siinä pääteltiin, että erottelu perustuu todennäköisesti siihen, että IgM-epitootit ovat eri tavoin esillä eri alatyypin viruksilla. Freimane ja muut 2025 tutkimuksessa alatyypit erotellaan eri tasoisen anti-NS1-vasteen avulla.

Immunofluoresenssitutkimusten tuloksien perusteella A549-solut infektoituvat TBEV:llä paremmin kuin VeroE6-solut, joten A549-soluja on parempi käyttää tulevaisuudessa esimerkiksi neutralisaatiotestissä tai TBEV-infektiokokeissa viruksen replikaation kuvaamiseen. Anti-NS1-seerumi toimii paremmin kuin anti-rokote-seerumi infektion tunnistamiseen ja sitä voidaan käyttää myös neutralisaation tunnistamiseen immunofluoresenssimäärityksellä.

7 Päätelmät

Tutkimuksessa pystytettiin liukoisten TBEV-NS1- ja E-DIII-proteiinien tuottojärjestelmä onnistuneesti. Tuotettuihin rekombinanttiproteiineihin perustuva ELISA-testi pystytettiin tunnistamaan TBEV-infektion immuunivaste. E-proteiinin III-domeeni ei sellaisenaan toimi antigeeninä ELISA-testissä, koska anti-E-vasta-aineet eivät sitoudu siihen, joten sen käyttö vaatii edelleen kehittämistä. Itse tuotetun NS1-ELISA-testiä verrattiin referenssimateriaalin ja testi todettiin yhtä toimivaksi. Itse-tuotetun NS1-proteiinin säilytysaasteen ratkaisu mahdollistaisi testin tehokkaamman käytön. Näiden lisäksi, työssä testattiin kaneissa tuotettuja antiseerumeita NS1-proteiinia ja TBEV-rokotetta vastaan, jotka toimivat referenssimateriaalina ja työkaluna TBEV-tutkimukseen ja serologisten testien pystyttämiseen. Antiseerumeilla voidaan tunnistaa sekä TBEV:n eurooppalaisen että siperialaisen alatyypin viruksen antigeenejä.

TBEV-NS1-serologinen menetelmä vaatii optimointia ja spesifisyyden sekä sensitiivisyyden tutkimuksia. Diagnostiikassa menetelmä tukisi nykyisiä diagnostisia menetelmiä, uudessa kliinisessä tilanteessa endeemisillä alueilla, joissa suuri osa väestöstä on rokotettu. Kliinisessä käytössä ELISA-testillä pystyisi tukemaan TBEV-infektiodiagnoosia TBEV-rokotetulla potilaalla. Infektoituneen ihmisseerumin vasta-aineiden odotetaan sitoutuvan sekä E-proteiiniin, että NS1 proteiiniin. Potilaiden seeruminäytteiden avulla optimoidulla ELISA-testillä voisi tunnistaa potilaista rokotetut ja infektoituneet.

Lähteet

- Ackermann-Gäumann, R., Brêchet, A., Smetana, J., Salát, J., Lienhard, R., Croxatto, A., ... Růžek, D. (2023) Vaccination against tick-borne encephalitis elicits a detectable NS1 IgG antibody response. *J Virol Methods* 322:114831.
- Albinsson, B., Vene, S., Rombo, L., Blomberg, J., Lundkvist, Å. & Rönnerberg, B. (2018) Distinction between serological responses following tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection vs vaccination, Sweden 2017. *Euro Surveill* **23**.
- Aregay, A., Slunečko, J., Korva, M., Bogovic, P., Resman Rus, K., Knap, N., ... Rimmelzwaan, G. F. (2024) Tick-borne encephalitis vaccine breakthrough infections induce aberrant T cell and antibody responses to non-structural proteins. *NPJ Vaccines* 9:141.
- Barnard, T. R., Abram, Q. H., Lin, Q. F., Wang, A. B. & Sagan, S. M. (2021) Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. *Trends Biochem Sci* 46:378–390.
- Beck, C., Desprès, P., Paulous, S., Vanhomwegen, J., Lowenski, S., Nowotny, N., ... Lecollinet, S. (2015) A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. *Biomed Res Int* **2015**:678084.
- Bogovic, P. & Strle, F. (2015) Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* 3:430–441.
- Brêchet, A., Kohler, P., Dörr, T., Grässli, F., Vock, M., Salát, J., ... Ackermann-Gäumann, R. (2025) Tick-borne encephalitis virus seroprevalence and infection incidence in Switzerland, 2020–2021. *Sci Rep* **15**:8346.
- Camarão, A. A. R., Gern, O. L., Stegmann, F., Mulenge, F., Costa, B., Saremi, B., ... Steffen, I. (2023) Secreted NS1 proteins of tick-borne encephalitis virus and West Nile virus block dendritic cell activation and effector functions. *Microbiol Spectr* 11:e0219223.
- Chiffi, G., Grandgirard, D., Leib, S. L., Chrdle, A. & Růžek, D. (2023) Tick-borne encephalitis: A comprehensive review of the epidemiology, virology, and clinical picture. *Rev Med Virol* 33:e2470.
- Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stiiber, D. & Henco, K. (1994) 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. Teoksessa A. J. Harwood (Toim.), *Protocols for Gene Analysis* (s. 371–387). Totowa, NJ: Humana Press.
- Crowe, J., Masone, B. S. & Ribbe, J. (1996) One-Step Purification of Recombinant Proteins with the 6xHis Tag and Ni-NTA Resin. Teoksessa A. J. Harwood (Toim.), *Basic DNA and RNA Protocols* (s. 491–510). Totowa, NJ: Humana Press.
- Erber, W., Schmitt, H., Vukovic, J., Dobler, G. & Broker, M. (2019) The TBE Book. Chapter 12a: TBE-Epidemiology by Country—An Overview,.

- Freimane, Z., Dobler, G., Chitimia-Dobler, L., Karelis, G., Gírl, P., Kuzmane, S., ... Zavadská, D. (2025) Development and validation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for the differentiation of tick-borne encephalitis infections caused by different virus subtypes. *Infection* **53**:297–306.
- Gírl, P., Bestehorn-Willmann, M., Zange, S., Borde, J. P., Dobler, G. & von Buttlar, H. (2020) Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses. *J Clin Microbiol* **58**.
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., ... García-Sastre, A. (2016) Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* **19**:882–890.
- Gritsun, T., Frolova, T., Zhankov, A., Armesto, M., Turner, S., Frolova, M., ... Gould, E. (2003) Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *Journal of virology* **77**:25–36.
- Gritsun, T., Lashkevich, V. & Gould, E. (2003) Tick-borne encephalitis. *Antiviral research* **57**:129–146.
- Hansson, K. E., Rosdahl, A., Insulander, M., Vene, S., Lindquist, L., Gredmark-Russ, S. & Askling, H. H. (2020) Tick-borne Encephalitis Vaccine Failures: A 10-year Retrospective Study Supporting the Rationale for Adding an Extra Priming Dose in Individuals Starting at Age 50 Years. *Clin Infect Dis* **70**:245–251.
- Hansson, M. E. A., Orvell, C., Engman, M.-L., Wide, K., Lindquist, L., Liddefelt, K.-J. & Sundin, M. (2011) Tick-borne encephalitis in childhood: Rare or missed? *Pediatr Infect Dis J* **30**:355–357.
- Holzmann, H. (2003) Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* **21 Suppl 1**:S36-40.
- Ikawa-Yoshida, A., Yoshii, K., Kuwahara, K., Obara, M., Kariwa, H. & Takashima, I. (2011) Development of an ELISA system for tick-borne encephalitis virus infection in rodents. *Microbiology and Immunology* **55**:100–107.
- Kayser, V. & Ramzan, I. (2021) Vaccines and vaccination: History and emerging issues. *Hum Vaccin Immunother* **17**:5255–5268.
- Jääskeläinen, A. E., Tikkakoski, T., Uzcátegui, N. Y., Alekseev, A. N., Vaheeri, A. & Vapalahti, O. (2006) Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerg Infect Dis* **12**:1568–1571.
- Kaiser, R. (2012) Tick-borne encephalitis: Clinical findings and prognosis in adults. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **162**:239–243.
- Kayser, V. & Ramzan, I. (2021) Vaccines and vaccination: History and emerging issues. *Hum Vaccin Immunother* **17**:5255–5268.

Klaitong, P. & Smith, D. R. (2021) Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection. *Viruses* 13.

Klema, V. J., Padmanabhan, R. & Choi, K. H. (2015) Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses* 7:4640–4656.

Kunze, M., Banović, P., Bogovič, P., Briciu, V., Čivljak, R., Dobler, G., ... Erber, W. (2022) Recommendations to Improve Tick-Borne Encephalitis Surveillance and Vaccine Uptake in Europe. *Microorganisms* 10.

Könenkamp, L., Ziegler, U., Naucke, T., Groschup, M. H. & Steffen, I. (2022) Antibody ratios against NS1 antigens of tick-borne encephalitis and West Nile viruses support differential flavivirus serology in dogs. *Transbound Emerg Dis* 69:e2789–e2799.

Labuda, M., Austyn, J. M., Zuffova, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J. & NUTTALL, P. A. (1996) Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219:357–366.

Lamppu, M., Klemola, T., Vesterinen, E., Dub, T., Pietikäinen, A. & Hytönen, J. (2025) Repeated cross-sectional surveys show a decreasing trend in *Borrelia burgdorferi sensu lato* seroprevalence over a 50-year period, Finland, 1966 to 2017. *Euro Surveill* 30.

Levanov, L., Jääskeläinen, A. & Vapalahti, O. (2015) Test based on subtype-specific μ -capture IgM immunoassay can distinguish between infections of European and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Clinical Virology* 73:81–83.

Li, Q. & Kang, C. (2022) Dengue virus NS4B protein as a target for developing antivirals. *Front Cell Infect Microbiol* 12:959727.

Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S.-S., Lee, S.-A., ... Jung, J. U. (2016) Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Dereulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 19:663–671.

Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2003) Molecular biology of flaviviruses. Teoksessa *Advances in Virus Research* (Vol. 59, s. 23–61). Academic Press.

Louten, J. (2016) Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology* 19–29.

Luo, D., Xu, T., Watson, R. P., Scherer-Becker, D., Sampath, A., Jahnke, W., ... Lescar, J. (2008) Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *EMBO J* 27:3209–3219.

Mikryukova, T. P., Moskvitina, N. S., Kononova, Y. V., Korobitsyn, I. G., Kartashov, M. Y., Tyuten'kov, O. Y., ... Loktev, V. B. (2014) Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia). *Ticks and Tick-borne Diseases* 5:145–151.

Mitä lääkärin on hyvä tietää virusdiagnostiikasta. <https://www.duodecimlehti.fi/duo91263>
(Luettu 23.4.2026)

- Morgardt, S., Veje, M., Bergström, T., Ivarsson, L. & Studahl, M. (2026) A rare case of breakthrough tick-borne encephalitis in early adolescence after vaccination with four doses of TBE vaccine. *New Microbes New Infect* **70**:101720.
- Muller, D. A. & Young, P. R. (2013) The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* **98**:192–208.
- Palus, M., Vancova, M., Sirmarova, J., Elsterova, J., Perner, J. & Ruzek, D. (2017) Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity. *Virology* **507**:110–122.
- Prevention, E. C. for D. & Control (2012) Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. ECDC.
- Prokopowicz, D., Bobrowska, E., Bobrowski, M. & Grzeszczuk, A. (1995) Prevalence of antibodies against tick-borne encephalitis among residents of north-eastern Poland. *Scandinavian journal of infectious diseases* **27**:15–16.
- Puerta-Guardo, H., Glasner, D. R. & Harris, E. (2016) Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog* **12**:e1005738.
- Pustijanac, E., Buršić, M., Talapko, J., Škrlec, I., Meštović, T. & Lišnjic, D. (2023) Tick-Borne Encephalitis Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Prevention. *Microorganisms* **11**.
- Puutiaisaivokuumeen ja borreliosisin laboratoriolöydökset (2021, syyskuuta 6).
<https://www.terveyskirjasto.fi/kpp00006> (Luettu 23.4.2026)
- Rosenberg, R. (2015) Detecting the emergence of novel, zoonotic viruses pathogenic to humans. *Cell Mol Life Sci* **72**:1115–1125.
- Růužek, D., Yoshii, K., Bloom, M. & Gould, E. (2020) *The TBE Book*.
- Ruzek, D., Avšič Županc, T., Borde, J., Chrdle, A., Eyer, L., Karganova, G., ... Zajkowska, J. (2019) Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res* **164**:23–51.
- Shope, R. E. & Meegan, J. M. (1997) Arboviruses. Teoksessa A. S. Evans & R. A. Kaslow (Toim.), *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control* (s. 151–183). Boston, MA: Springer US.
- Stibraniova, I., Bartikova, P. & Dzubara, J. (2025) Response of host immune system to tick borne encephalitis virus. *Acta Virologica* **Volume 68-2024**.
- Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J. & Sreaton, G. R. (2018) The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol* **19**:1189–1198.
- Stibraniova, I., Bartikova, P. & Dzubara, J. (2025) Response of host immune system to tick borne encephalitis virus. *Acta Virologica* **Volume 68-2024**.

sutury (2024) Kun puutiaisesta tuli pahis – Lastuja Suomen historiasta.

<https://blogit.utu.fi/suomenhistoria/kun-puutiaisesta-tuli-pahis/> (Luettu 23.4.2026)

Tartuntatautirekisterin tilastotietokanta—Tapaukset—THL kuutio- ja tiivistekäyttöliittymä.

https://sampo.thl.fi/pivot/prod/fi/ttr/cases/fact_ttr_cases?row=wscmunicipality2022-877686&column=yearmonth-878344&filter=nidreportgroup-877823 (Luettu 30.9.2025)

Wagner, J. N., Sonnberger, M., Troescher, A., Krehan, I., Hauser, A., Panholzer, J. & von Oertzen, T. J. (2020) Patients with breakthrough tick-borne encephalitis suffer a more severe clinical course and display extensive magnetic resonance imaging changes. *Eur J Neurol* 27:1201–1209.

Wikel, S. (2013) Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: Host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in microbiology* 4:337.

Workbook: TBE-rokotosohjelma. <https://raportointi.thl.fi/t/public/views/TBE->

[rokotosohjelma/Tapaukset?%3Aembed=y&%3AisGuestRedirectFromVizportal=y](https://raportointi.thl.fi/t/public/views/TBE-rokotosohjelma/Tapaukset?%3Aembed=y&%3AisGuestRedirectFromVizportal=y) (Luettu 21.4.2026)

Zhang, Z., Li, Y., Loh, Y. R., Phoo, W. W., Hung, A. W., Kang, C. & Luo, D. (2016) Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. *Science* 354:1597–1600.