

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Jenny Tukiainen

COXSACKIEVIRUS A9 -INFEKTIO RD- JA A549- SOLUISSA

– Viruksen muuntuminen ja RGD-alueen rooli
infektiossa



OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Marraskuu 2011 | Sivumäärä: 40

FT Petri Susi, FM Kari Haajanen

Jenny Tukiainen

COXSACKIEVIRUS A9-INFEKTIO A549- JA RD-SOLUISSA

Tämän opinnäytetyön tavoitteena on tarkastella RGD-alueen merkitystä pikornavirus CAV9:ssä.

Coxsackievirus A9 on pieni, yksisäikeinen RNA-virus, jonka genomia ympäröi proteiinihuori, joka koostuu yhteensä kuudestakymmenestä VP1-, VP2-, VP3- ja VP4-proteiinialayksiköstä. CAV9:n pintarakenteen VP1-proteiinissa sijaitseva RGD-alue on kolmen aminohapon muodostama ketju, jonka avulla virus oletettavasti sitoutuu solupinnan α V-integriineihin. Geneettisesti muokattu virus, CAV9-RGDdel, josta RGD-alue puuttuu, ei sitoudu α V-integriineihin *in vitro*, eikä siten infektoi mm. ihmisen keuhkoepiteelisoluja (A549), mutta kykenee silti infektoimaan mm. RD-soluja ilman integriini-välitteistä sitoutumista.

RNA-viruksille on tyypillistä, että ne muuntuvat pistemutaatioiden kautta nopeasti, ja tämä muuntumiskyky mahdollistaa viruspopulaation säilymisen eri olosuhteissa. Infektion aikaansaanut virus luo uuden populaation, minkä takia virus pitää määritellä virusjoukkona, jossa kullakin viruksella on hiukan toisistaan poikkeavat genomit. RNA-polymeraasi on luonnostaan sopivan epätarkka syntetisoidessaan uusia genomeja. Tästä syystä tarkastelun kohteeksi on valittu myös virusgenomin ei-rakenteellinen alue 3D, jossa sijaitsee RNA-polymeraasia koodaava geenialue.

Opinnäytetyössä tarkasteltiin sekä CAV9- että CAV9-RGDdel-virusten lisääntymistä A549- ja RD-soluissa. Tutkimuksessa havaittiin hieman yllättäen, että CAV9-RGDdel infektoi A549-soluja ja alkoi lisääntyä pasasoinnin edetessä yhä nopeammin. Infektionopeuden lisääntymistä havainnointiin mm. tarkastelemalla sekvenssitason muutoksia VP1- ja 3D-alueissa ja kuvantamalla virusinfektiota soluviljelmissä. Tämän lisäksi tehtiin ns. integriini-sitoutumiskoe.

Työ suoritettiin Turun yliopistolla, Virusopilla, ja tutkimusmenetelminä käytettiin mm. soluviljelyä, virus-RNA:n eristystä, RT-PCR:ää, AGEa ja immunosytokemiaa. Lähes kaikki kerätyt näytteet saatiin valmiiksi sekvensointia varten, mutta sekvensointia ei aikataulullisista syistä ehditty tehdä. *In vitro* integriini-sitoutumiskokeella osoitettiin, että CAV9-RGDdel-virus oli säilynyt RGD-alueen suhteen ennallaan. Alustavissa kuvantamiskokeissa havaittiin, että infektiivisyys on varhaisissa pasaaseissa matalampi kuin myöhäisemmissä pasaaseissa.

ASIASANAT:

CAV9, pikornavirus, RGD-alue, soluviljely, virukset, VP1-alue, A549-solut, RD-solut

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

November 2011 | Total number of pages: 40

Petri Susi, Ph.D. Kari Haajanen, M.Sc.

Jenny Tukiainen

THE INFECTION OF COXSACKIEVIRUS A9 IN A549 AND RD CELLS

The purpose of this thesis was to study the role of the RGD motif in the picornavirus CAV9.

Coxsackievirus A9 is a small, single-stranded RNA virus whose genome is surrounded by a protein capsid consisting of sixty VP1, VP2, VP3, and VP4 protein units. The VP1 surface protein of CAV9 contains the RGD motif, a chain of three amino acids, which the virus supposedly uses to bind to the extracellular domain of α V integrins. The genetically modified strain of CAV9, CAV9-RGDdel, lacks the RGD motif and cannot bind to α V integrins *in vitro* but is still able to infect some human cell lines, such as RD cells without integrin-mediated binding.

RNA viruses typically transform through frequently occurring point mutations, due to which it is possible for a viral population to survive in various conditions. Because each infecting virus creates a new viral population, viruses must be defined as viral groups, in which every virus has a slightly differing genome. RNA polymerase is inherently inaccurate and creates divergent copies of the viral genome. For this reason it was also chosen to study the non-structural 3D area of the virus genome, which contains the RNA polymerase gene.

The main goal of this bachelor's thesis was to study the growth of CAV9 and CAV9-RGDdel viruses in A549 and RD cells. Surprisingly, our research revealed that CAV9-RGDdel infected A549 cells and began to proliferate faster when passaged. The speed of infection rate was demonstrated by examining changes in the VP1 and 3D sequences and by imaging viral infections in cell cultures. Additionally, an integrin binding test was performed.

This thesis was carried out in the Department of Virology at the University of Turku. The research methods included, among others, viral isolation, RT-PCR, AGE, and immunocytochemistry. Almost all samples were prepared for sequencing but due to limited time the sequencing could not be performed. The Integrin binding test indicated that the RGD motif of the CAV9-RGDdel virus remained the same. In the preliminary imaging tests it was discerned that infectivity is lower in the earlier passages than in the later passages.

KEYWORDS:

CAV9, cell culture, pikornavirus, RGD motif, Virus, VP1, A549 cells, RD cells

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
2 VIRUKSET	9
2.1 Pikornavirukset	11
2.1.1 Coxsackievirus A9	13
2.2 RNA-virusten muuntuminen	14
2.3 Aiemmat tutkimukset	15
3 TUTKIMUSMENETELMÄT	16
3.1 Soluviljely	16
3.1.1 Solulinjat A549 ja RD	16
3.2 Virus-RNA:n eristys	17
3.3 RT-polymeraasiketjureaktio	18
3.4 RNA:n puhdistus	19
3.5 Agaroosigeelielektroforeesi	20
3.6 Immunosytokemia	21
4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	23
4.1 Soluviljely	24
4.2 End-point-virustitraus	24
4.3 Virus-RNA:n eristys	25
4.4 RT-PCR	25
4.5 PCR-tuotteiden puhdistus	28
4.6 Agaroosigeelielektroforeesi	28
4.7 Virusten sitoutumiskoe	28
4.8 Infektion kiinnitys ja kuvaus	29
5 TULOKSET JA ARVIOINTI	30
5.1 Pasasointinäytteet	30
5.2 RNA:n eristys, RT-PCR ja AGE-analyysi	31
5.3 Integriini-sitoutumiskoe	33
5.4 Virustitraus ja immunofluoresenssi	34
6 PÄÄTELMÄT	37

LIITTEET

- Liite 1. 6X DNA Loading Dye
Liite 2. GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder
Liite 3. Integriinien sitoutumiskokeen tulokset

KUVAT

Kuvat 1 ja 2. Tyypilliset A549-solut.	17
Kuva 3. Tyypilliset RD-solut.	17
Kuva 4. Kuvaesimerkki agarosigeelijaosta.	31
Kuva 5. Immunofluoresenssikuvat.	36

KUVIOT

Kuvio 1. Viruksen lisääntyminen solussa.	11
Kuvio 2. Pikornaviruksen rakenteellisten proteiinien asettuminen.	12
Kuvio 3. Coxsackievirus A9:n genomi.	13
Kuvio 4. Tyypillinen nukleiinihappojen puhdistus silikamenetelmällä.	20
Kuvio 5. a) Primäärin vastaa-aineen sitoutuminen. b) Sekundäärin vastaa-aineen sitoutuminen.	22
Kuvio 6. Tutkimuksen eteneminen.	23
Kuvio 7. Alukkeiden sijainnit ja suunnat CAV9:n genomirakenteessa.	27
Kuvio 8. Integriinien sitoutumiskoe.	33

TAULUKOT

Taulukko 1. cDNA:n tekemiseen tarvittava seos.	26
Taulukko 2. PCR-reaktion seos.	26
Taulukko 3. 3Dpol- ja VP1-alukkeiden sekvenssit.	27
Taulukko 4. PCR-ajo-olosuhteet.	27
Taulukko 5. Merkkien selitykset.	30
Taulukko 6. Tutkimusnäytteet.	32
Taulukko 7. Näytteiden titraustulokset.	35

KÄYTETTY SANASTO

A549	Ihmisen keuhkoepiteelikarsinomasolulinja
AGE	Agaroosigeelielektroforeesi
BSA	Bovine serum albumin (naudan seerumin albumiini)
CAV9	Coxsackievirus A9
cDNA	Yksisäikeinen DNA-jakso, josta puuttuu intronit
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
FA	Formaliini PBS:ssä
FCS	Fetal calf serum (naudan sikiön seerumi)
Nukleotidi	DNA:n ja RNA:n rakenneyksikkö
PBS	Phosphate buffered saline (fosfaattipuskuroitu suolaliuos)
Proteaasi	Entsyymi, joka hajottaa proteiineja
RD	Ihmisen lihassolulinja
RNA	Ribonukleiinihappo
RNAasi-inhibiittori	Proteiini, joka estää ribonukleasien toimintaa
RT-PCR	Käänteistranskriptio-polymeraasiketjureaktio (eng. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)

1 JOHDANTO

Pikornavirukset ovat pieniä, halkaisijaltaan 18–30 nm:n kokoisia yksisäikeisiä RNA-viruksia, joiden genomia ympäröi proteiinkuori. Kuori koostuu kuudesta-kymmenestä VP1-, VP2-, VP3- ja VP4-proteiinalayksiköstä. VP-proteiinit muodostavat yhtenäisen alayksikön siten, että kolme ensimmäistä sijaitsevat viruspartikkelin pinnalla ja VP4 kuoren sisäpuolella. Lisäksi viruksen genomiin kuuluu seitsemän ei-rakenteellista proteiinia (2A–3D). Näistä 3D koodaa RNA-polymeraasia, jota virus tarvitsee lisääntymiseen. (Airaksinen, 2000; Filman ym., 1998; Hedman ym., 2010.)

Coxsackievirus A9 eli CAV9 kuuluu enterovirusten sukuun ja pikornavirusten heimoon. Se on merkittävä taudinaiheuttaja aina perinteisestä flunssasta kuoletaviin keskushermostoinfektoihin. CAV9:n pintarakenteen VP1-proteiinissa sijaitsee RGD-motiivi eli kolmen aminohapon muodostama ketju, jonka avulla virus oletettavasti sitoutuu solupinnan integriineihin. Geneettisesti muokattu virus CAV9-RGDdel, jolta RGD-motiivi puuttuu, kykenee kuitenkin infektoimaan joitakin solulinjoja ilman integriinivälitteistä sitoutumista. (Hedman ym., 2010; Heikkilä ym., 2009.)

RNA-viruksille, kuten CAV9:lle, on tyypillistä muuntua pistemutaatioiden kautta. Tämä ominaisuus varmistaa viruspopulaation säilymisen erilaisissa tilanteissa. Käsite ”quasispecies” tarkoittaa sitä, että virus pitää määritellä virusjoukkona, jossa kullakin viruksella on hieman toisistaan poikkeava genomi. Infektion aikaansaanut virus luo uuden ”quasispecies”-populaation, sillä RNA-polymeraasi on luonnostaan epätarkka syntetisoidessaan genomien kopioita. (Lauring A. & Andiano R., 2010.)

Aiemmat tutkimukset osoittavat, että CAV9 infektoi tehokkaasti keuhkoepiteeli-karsinoma- eli A549-soluja, kun taas CAV9-RGDdel-infektio tapahtuu hitaasti ja pienellä tehokkuudella. Sen sijaan ihmisen lihas- eli RD-solut infektoituvat tehokkaasti riippumatta siitä kummalla viruksella ne on infektoitu. Infektiovisyys selittyy osittain integriineillä: A549-solut ekspressoivat $\alpha V\beta 3$ - ja $\alpha V\beta 6$ -

integriinejä, kun taas RD-solut ekspressoivat ainoastaan $\alpha V\beta 3$ -integriinejä. CAV9-viruksen on aiemmin osoitettu suosivan $\alpha V\beta 6$ -integriiniä, mutta tällä integriinillä ei näytä olevan merkitystä RD-soluihin tunkeutumisessa eli infektoituminen tapahtuu ilman integriinejä. (Heikkilä ym., 2009.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on selvittää, millaisia sekvenssitason muutoksia CAV9:ssä ja CAV9-RGDdelissä tapahtuu, kun niitä pasasoidaan A549- ja RD-soluissa valmistamalla puhdistetut PCR-tuotteet sekvenssintia varten. Sekvenssitarkastelun kohteena ovat VP1- ja 3D-alue. Lisäksi mitataan kummankin viruksen infektiivisyyttä A549- ja RD-solulinjoissa, kuvataan infektoita immuno fluoresenssilla ja tehdään integriinisitoutumiskoe.

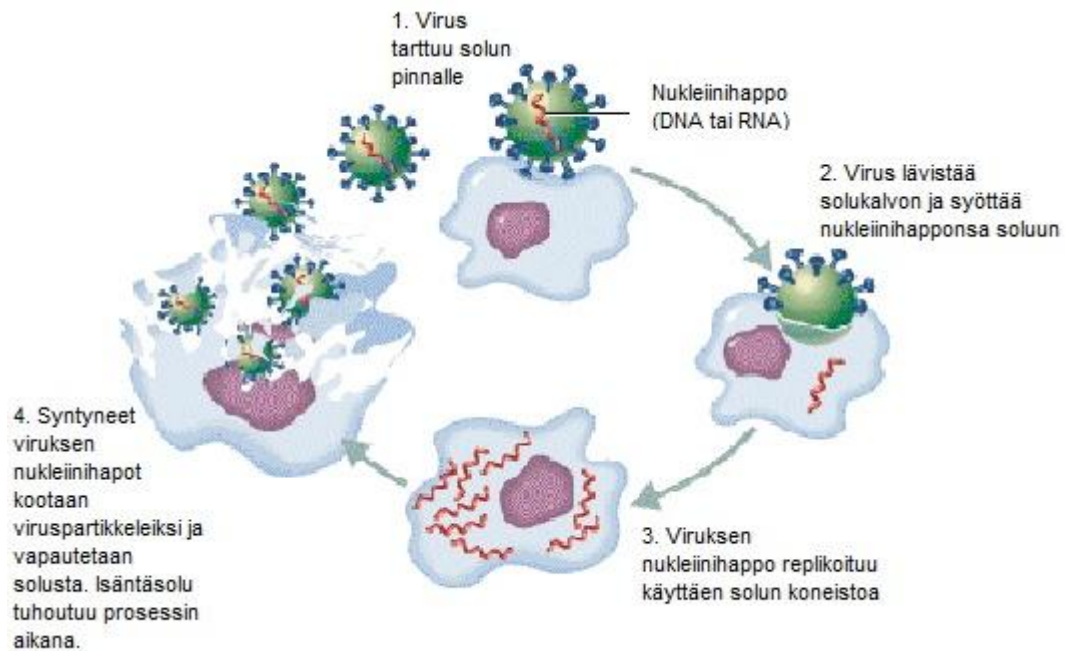
2 VIRUKSET

Virukset ovat solunsisäisiä parasiittejä, jotka eivät kykene lisääntymään tai toimimaan ilman isäntäorganismia. Solun ulkopuolella ollessaan, ne voidaan luokitella elottomiksi partikkeleiksi, joilla ei ole omaa aineenvaihduntaa tai kykyä reagoida ärsykkeisiin. Virusten genomi on yksi- tai kaksisäikeistä DNA:ta tai RNA:ta. Tämä on ominaisuus, joilla virukset eroavat muista organismeista, sillä niiden genomi koostuu kaksisäikeisestä DNA:sta. Virukset ovat halkaisijaltaan 25–1000 nm ja niiden muoto vaihtelee suuresti. Geenien määrä vaihtelee neljästä satoihin ja genomi voi olla jakautunut yhteen tai useampaan osaan kapsidin sisällä. RNA-virukset ovat kooltaan pienempiä kuin DNA-virukset ja, niiden genomien pituus ja geenien lukumäärä ovat alhaisempia. Virusgenomin muoto on joko lineaarinen tai rengasmainen. (Collier & Oxford, 2006; Hedman ym., 2010; Heino & Vuento, 2010.)

Viruspartikkelin eli virionin rakenne koostuu yksinkertaisimmillaan genomia ympäröivästä proteiinikapsidista. Monilla viruksilla on lisäksi lipidimembraanista ja siinä olevista proteiineista koostuva vaippa (eng. *envelope*), joka ympäröi proteiinikapsidia. Kapsidi on yhden tai useamman proteiinilajin muodostama kuori, jonka tehtävänä on suojata sen sisässä sijaitsevia nukleiinihappoja ulkoisilta tekijöiltä, kuten nukleaaseilta, ja kiinnittää virus isäntäsoluun infektion aikaansaamiseksi. Kapsidissa proteiinit ovat liittyneet toisiinsa muodostaen symmetrisen kuoren, joka on joko helikaalinen (eli sauvamainen) tai ikosahedraalinen (eli pallomainen). Kuten muutkin organismit, virukset jaotellaan taksonomisesti lajeihin, sukuihin, heimoihin ja lahkoihin. Tämän lisäksi viruksilla on usein lajimääritelmän alapuolella tyyppikantoja ja niitä vastaavia kliinisiä isolaatteja. Taksonomia perustuu mm. rakenteeseen, genomiin, isäntälajiin, solu- ja kudoshakuisuuteen sekä patogeenisyyteen. Genomirakenne on nykyisin keskeinen taksonominen määrittelijä. (Hedman ym., 2010; Heino & Vuento, 2010; Solunetti, 2006.)

Virukset hyödyntävät tehokkaasti isäntäorganismiensa fysiologiaa sekä rakenteita. Tästä hyvänä esimerkkinä on isäntäsolun valmiin proteiinisynteesikoneiston käyttö. Lisäksi virukset ovat kehittyneet käyttämään samoja sisäänmenoreittejä kuin solu itse käyttää molekyylien kuljetuksessa. Näin ollen virukset kykenevät kulkemaan solukalvojen lävitse ja kuljettamaan genominsa isäntäsolun sytoplasmaan. Solujen sisään ne pääsevät tunnistamalla sen pinnalla olevan molekyylin eli reseptorin, joita voi viruksesta riippuen olla useita. Reseptorit ovat solukalvojen normaaleja rakenneosia, kuten glykoproteiineja, lipidejä sekä hiilihydraatteja ja ne osallistuvat muihinkin tehtäviin kuten immuunimodulaatioihin, viestin välitykseen ja solun kiinnittymiseen. (Baranowski ym., 2001; Marsh & Helenius, 2006; Solunetti, 2006.)

Virukset käyttävät sisäänmenomekanismina solun omaa endosytoosikoneistoa, johon vaikuttavat hyvin monet tekijät sekä solun pinnalla, plasmamembraanilla että sytoplasmassa. Vaikka tässä yhteydessä on tunnistettu tiettyjä solu- ja vesikkeliproteiineja, joiden avulla on sisäänmenoreiteille voitu antaa tunnistettava nimi, kuten klatriini-välitteinen endosytoosi, on tällä hetkellä selvää, että virukset käyttävät soluproteiineja hyvin eri tavoin hyväkseen, minkä johdosta on parempi lähinnä kuvailla ne tekijät (proteiinit), jotka liittyvät virusinfektioon. On kuitenkin selvää, että virusinfektio voidaan jaotella muutamiin keskeisiin vaiheisiin. Viruksen pintaproteiinin tai -proteiinien on kyettävä kiinnittymään solupinnan reseptoreihin, jotta virusinfektio voi alkaa. Tällöin käynnistyy monivaiheinen signaalinvälitysketju, jolloin solukalvo päästää viruksen sisäänsä. Viruksen kapsidi hajoaa ja genomi vapautuu. Jotta virus kykenee infektoimaan solun, tarvitaan myös muita solun makromolekyylejä, jotka mm. kuljettavat nukleiinihappoja. Tavallisesti DNA-virusten nukleiinihapot kulkeutuvat tumaan, kun taas RNA-virusten perimä vapautuu suoraan sytoplasmaan. Replikaation alkaessa geenit ilmentyvät ja uusien virusten kokoaminen alkaa. Lopulta virukset maturoituvat eli kypsyvät ja ne vapautuvat solusta infektoiden muita soluja. Yhdestä solusta vapautuu tuhansia viruksia, jotka infektoivat jälleen uuden isäntäsolun ja sykli alkaa alusta. Yksinkertaistettu kuva viruksen lisääntymiskierrosta on esitetty kuviossa 1. (Hedman ym., 2010; Heino & Vuento, 2010; Marsh & Helenius, 2006; Solunetti, 2006.)



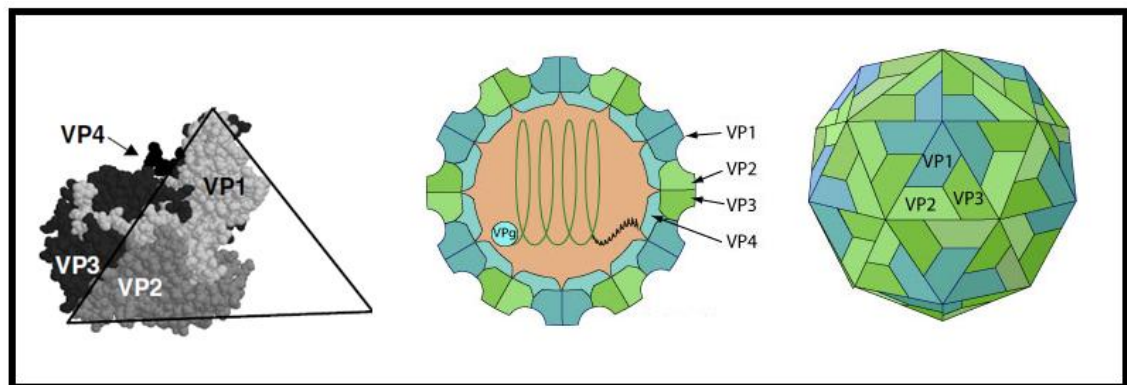
Kuvio 1. Viruksen lisääntyminen solussa. (Muokattu PB Learning)

2.1 Pikornavirukset

Pikornavirukset käsittävät 12 sukua, joista tärkeimmät ihmisiä infektioivat virukset ovat nimeltään entero-, rino- ja parechovirusia. Nykyisen taksonomisen jaottelun mukaan enterovirukset käsittävät myös rinovirukset suku-tasolla, mutta rinovirus-nimi esiintyy edelleen laji-tasolla. Enterovirukset jaetaan useisiin lajeihin, joista ihmisen enterovirus B -laji sisältää kymmeniä merkittäviä viruksia, jotka aiheuttavat mm. aivokalvon- ja sydäntulehdusta. Rinovirukset puolestaan ovat yleisiä hengitystieinfektioiden aiheuttajia. Tunnetuimpia pikornavirusten aiheuttamia tauteja lienevät poliomyeliitti (poliovirus), aivokalvontulehdus (enterovirus) ja tavallinen flunssa (rinovirus). Pikornavirukset sietävät hyvin pH:n vaihteluita, joten ne kykenevät infektoimaan hengityselinten lisäksi myös ruansulatuselimistön kautta. Pikornavirusten (sero)tyyppejä tunnetaan yhteensä yli 300. (Collier & Oxford, 2006; Hedman ym., 2010; Picornavirus Home.)

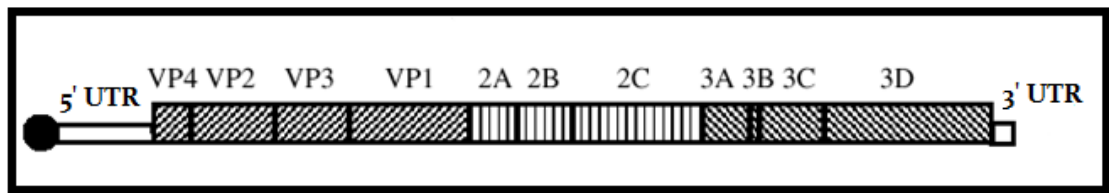
Pikornavirukset ovat pienikokoisia, vaipattomia RNA-virusia, jotka ovat halkaisijaltaan noin 18–30 nm. Viruksen RNA-perimää suojaa tiivis ikosahedraali-

nen kapsidi, joka muodostuu 60 samanlaisesta yksiköstä. Yhdessä rakenneyksikössä on aina neljä erilaista rakenneproteiinia: VP1, VP2, VP3 ja VP4. Näistä kolme ensimmäistä muodostavat viruksen kuoren ulkopinnan ja VP4 on tämän kuoren sisäpinnalla. Selkeyttävä kuva rakenneproteiinien asettumisesta on esitetty kuviossa 2. Lisäksi pikornaviruksilla on seitsemän ei-rakenteellista proteiinia 2A-3D, joiden sijainti näkyy coxsackievirus A9:ää kuvaavassa kuviossa 3. (Airaksinen, 2000; Filman ym., 1998; ViralZone, 2011.)



Kuvio 2. Pikornaviruksen rakenteellisten proteiinien asettuminen. (Muokattu Airaksinen, 2000; ViralZone, 2011.)

Pikornaviruksen genomi on yksisäikeinen RNA-molekyyli, joka koostuu suunnilleen 7500 emäksestä. Koska juoste on jo yksisäikeinen, se kykenee toimimaan suoraan lähetti-RNA:na, joka koodittaa polyproteiinin tuoton. Polyproteiini puolestaan pilkkoutuu edelleen toimintakykyisiksi proteiineiksi viruksen omien entsyymien kautta. Samanaikaisesti pikornavirukset häiritsevät solun omaa aineenvaihduntaa genomien 2A-alueella sijaitsevalla proteaasilla. Kokonaisuudessaan pikornavirukset kykenevät siis valjastamaan solun omaksi virustehtaan. 3D-alueella sijaitseva RNA-polymeraasi tuottaa genomien kopioita, mutta tekee myös virheitä, jolloin jokainen virusgenomi poikkeaa alkuperäisestä. Niistä valikoituvat parhaiten lisääntyvät. (Hedman ym., 2010.)



Kuvio 3. Coxsackievirus A9:n genomi. (Muokattu Airaksinen, 2000.)

2.1.1 Coxsackievirus A9

Coxsackievirukset jaetaan A- ja B-tyyppeihin ja ne kuuluvat pikornavirusheimoon, enterovirusten sukuun ja ihmisen enterovirus A–D-lajeihin genomista riippuen. A-serotyyppejä (CAV) on tunnistettu 23 kpl ja B-tyyppejä (CBV) 6 kpl. CAV9 on ihmispatogeeni aiheuttaen oireita aina flunssasta kuolettaviin keskushermostoinfektioihin. Tutkittava coxsackievirus A9 on kuitenkin geneettisesti lähempänä CBV:tä kuin muita CAV-viruksia. CAV9 on siitä erityinen pikornavirus, että sen pintarakenteen VP1-proteiinin C-terminaaliosassa on RGD-motiivi. Tämä alue sitoutuu solupinnan integriineihin $\alpha_v\beta_3$ ja $\alpha_v\beta_6$, jotka ovat primäärisiä reseptoreja soluun kiinnittymisessä. Kuva CAV9:n genomirakenteesta on esitetty kuviossa 3. (Heikkilä ym., 2009; Hendry ym., 1999.)

Integriinit ovat glykoproteiineja, jotka lävistävät solukalvon. Ne koostuvat 18 erilaisesta alfa- ja kahdeksasta beta-alayksiköistä. Integriinit vuorovaikuttavat yhdessä solukalvon kanssa soluadheesiossa ja migraatiossa. Virukset käyttävät solun integriinejä päästäkseen isäntäorganismiin sisään. (Karttunen, 2010.)

RGD-alue on kolmen aminohapon arginiinin-glysiinin-aspargiinin (Arg-Gly-Asp) muodostama ketju. Geneettisesti muokattu virus CAV9-RGDdel, jolta RGD-motiivi puuttuu, kykenee myös infektoimaan joitakin solulinjoja, kuten RD-soluja, oletettavasti ilman integriinivälitteistä sitoutumista. Tämä todistaa, että kyseisellä viruksella on erilaisia tapoja sitoutua ja infektoida soluja. CAV9-virusinfektiota välittävät integriinien lisäksi ainakin beta2-mikroglobuliini- ja GRP78-proteiini. (Buttinelli ym., 2003; Heikkilä ym., 2009; Hendry ym., 1999.)

2.2 RNA-virusten muuntuminen

Virukset kehittyvät jatkuvasti, jotta ne kykenisivät heikentämään isäntäsolun puolustuskykyä ja infektoimaan tehokkaammin. Virusten muuntautuminen on jatkuvaa, joten solujen mahdollisuudet puolustautua näitä muutoksia vastaan eivät ole yhtä tehokkaita. Mutaatiotaajuus on RNA-viruksilla erityisen suuri, sillä viruksilta puuttuu kyky oikolukea genomia replikaation aikana. (Santti ym., 2000; Duodecim, 2000.)

Pistemutaatio tarkoittaa yhden emäksen muuttumista DNA- tai RNA-jaksossa. Yhdenkin emäksen muuntuminen tai poisjääminen saattaa vaikuttaa suuresti viruksen toimintaan. Tavallisesti muutokset perimässä syntyvät pintaproteiineja koodaavaan alueeseen, sillä niissä sijaitsee viruksen isäntään sitoutumiseen ja replikaatioon vaikuttavat proteiinit. Yksittäinen pistemutaatio viruskapsidia koodaavassa geenissä voi johtaa siihen, että virus ei kykene tunnistamaan perinteistä reseptoriaan tai vaihtoehtoisesti voi sitoutua uuteen reseptoriin. (Lauring & Andiano, 2010; Duodecim, 2000.)

Useimmat RNA-virukset replikoituvat erittäin suurella nopeudella ja epätarkasti, joten ne myös ilmentävät merkittävää geneettistä moninaisuutta. Tästä johtuen viruspopulaatio adaptoituu muuttuvaan ympäristöön ja kehittää vastustuskyvyn esim. rokotteille. Käsite "quasispecies" tarkoittaa virusjoukkoa, jossa kullakin viruksella on hieman toisistaan eroava genomi. Nämä virukset kuitenkin luokitellaan samaksi virukseksi ja ne yhteisesti vaikuttavat viruksen ominaisuuksiin. Infektion aikaansaanut virus luo uuden quasispecies-populaation. RNA-polymeraasin epätarkkuuden vuoksi viruksella on käytössään enemmän vaihtoehtoja mm. virusreseptoreiksi infektioprosessin aikana. Tällaiset virusmuunnokset syntyvät täysin sattumanvaraisesti, ja niiden elinkelpoisuus selviää elimistössä. Parhaiten infektoivat virusmuodot menestyvät ja muut karsiutuvat. (Lauring & Andiana, 2010; Duodecim, 2000.)

Virusviljelyprosessia, jossa virusta lisätään solulinjoissa, kutsutaan pasasointiksi. Kun pasasointia jatketaan toistuvasti samassa solulinjassa, virus tavallisesti adaptoituu eli muuntuu ja sopeutuu ympäristöönsä. Erityisesti RNA-

virusten perimässä tapahtuu sekvenssimuutoksia, jotka sopeuttavat virusta infektoimaan paremmin verrattuna alkuperäiseen viruskantaan. Nämä muutokset määrittävät viruksen tropismin eli niiden solujen kirjon, jotka virus kykenee infektoimaan (tunkeutumaan solun sisään ja replikoitumaan). Tämä määrittää siten myös viruksen patogeenisyyden. (Solunetti, 2006.)

2.3 Aiemmat tutkimukset

Aiemmissä tutkimuksissa on todistettu, että CAV9 infektoi tehokkaasti A549-soluja, kun taas CAV9-RGDdel-virus ei kykene infektoimaan tai infektoi heikosti samoja soluja. RD-solut sen sijaan infektoivat hyvin, riippumatta siitä, kummas-ta viruksesta on kyse. Syy selittyy osittain erilaisella ei-integriinivälitteisellä soluuntunkeutumismekanismilla. (Heikkilä ym., 2009.)

A549-soluissa esiintyy sekä $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ - että $\alpha\text{V}\beta\text{6}$ -integriinejä, kun taas RD-soluissa esiintyy vain $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -integriinejä. Näitä integriinejä CAV9 käyttää infektoidessaan isäntäsolun RGD-alueensa avulla. Aikaisemmassa tutkimuksessa on käynyt ilmi, että CAV9 sitoutuu tehokkaammin $\alpha\text{V}\beta\text{6}$ -integriiniin kuin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -integriiniin. Tämän vuoksi työssä on keskitytty enemmän $\alpha\text{V}\beta\text{6}$ -integriiniin. CAV9 ja CAV9-RGDdel kykenevät infektoimaan RD-soluja tehokkaasti ilman näitä integriinejä. (Heikkilä ym., 2009.)

Opinnäytetyössä selvitetään, millaisia sekvenssimuutoksia virusten genomeissa tapahtuu, kun niitä pasasoidaan samassa solulinjassa toistuvasti useita kertoja, ja verrataan näitä muutoksia A549- ja RD-solulinjoissa pasasoitujen CAV9- ja CAV9-RGDdel-virusten välillä.

3 TUTKIMUSMENETELMÄT

3.1 Soluviljely

Soluviljely tarkoittaa erilaisten eläin- ja kasvisolujen kasvattamista laboratorioolosuhteissa *in vitro*. Laboratoriossa kasvatettavat solut vaativat kasvaakseen tarkoin määritellyt olosuhteet ympäristön mm. ravinteiden, lämpötilan ja pH-arvon suhteen. Soluja voidaan kasvattaa sekä kiinteällä alustalla että suspensiossa, mutta useimmat eläinsolut vaativat kiinteään kasvupinnan. Tällaiset solut kasvavat yksisolukerroksina (eng. *monolayer*) esim. T-pullon pinnalla. (Tuomi, 2011.)

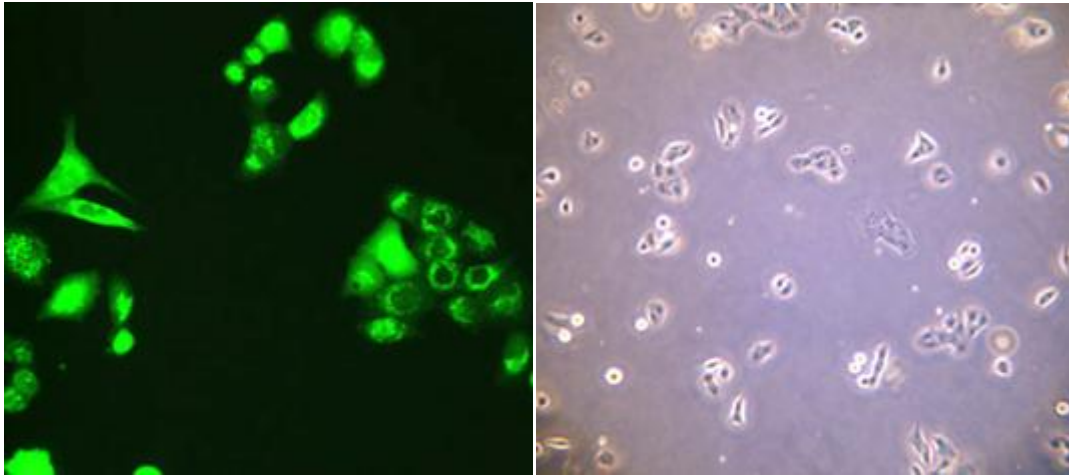
Jotta soluja voidaan jatkuvasti käyttää, tarvitsee niitä jakaa tarvittaessa ja säännöllisin väliajoin. Soluviljelmän kasvu pysähtyy sen joutuessa konfluenssiin eli kontakti-inhibitioon, jolloin naapurisolut tulevat kosketuksiin toistensa kanssa ja koko kasvualusta on solujen peitossa. Normaalista kudoksesta eristetyt solut eivät kuitenkaan jakaannu loputtomasti, vaan pasasoinnin edetessä pitkälle ne vanhenevat, eivätkä jaksa lisääntyä enää aiempaan tapaan. Syöpäsolulinjoilla sen sijaan on usein häiriintynyt solusykli, joten ne kykenevät jakaantumaan loputtomasti. (Tuomi, 2011.)

Kun soluja infektoidaan viruksilla, viljelmälle aiheutuu viruksen lisääntymisestä johtuvia muutoksia. Sytopaattinen vaikutus eli CPE (eng. *cytopathic effect*) tarkoittaa virusinfektion aiheuttamia morfologisia muutoksia soluviljelmälle, kuten pyöritymistä ja irtoamista.

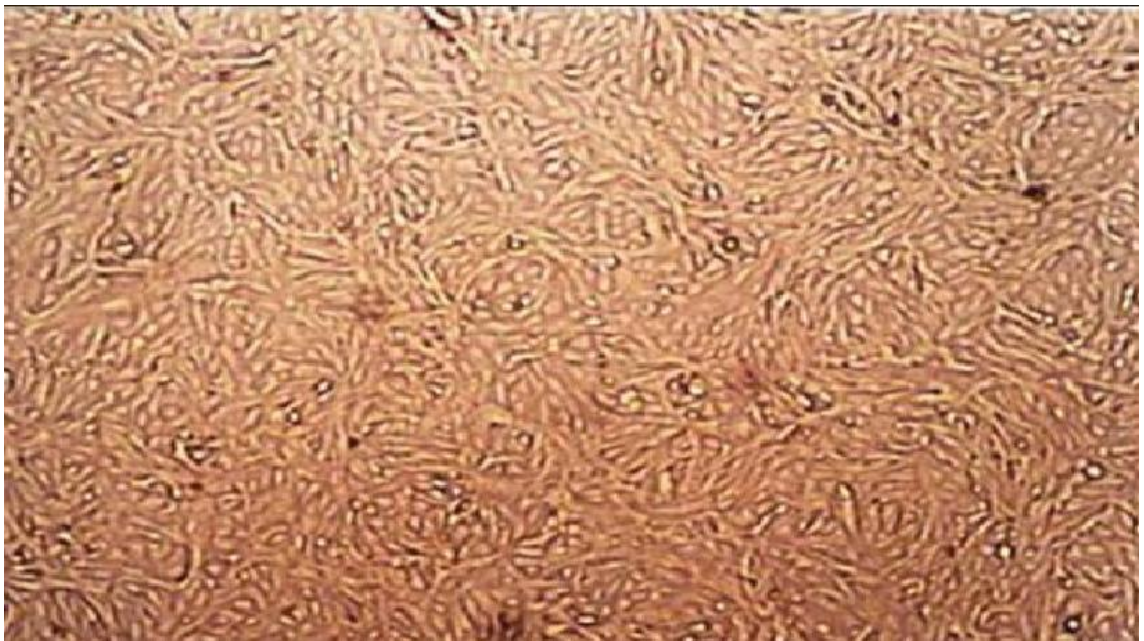
3.1.1 Solulinjat A549 ja RD

Tutkimuksessa käytettiin kahta solulinjaa: ihmisen lihassyöpäsoluja (rhabdomyosarkooma) eli RD-soluja ja keuhkoepiteelikarsinoomasoluja eli A549-soluja. Molemmat solulinjat ovat eläinsolulinjoja ja kasvavat siis yksisolukerroksina. Tyypillisiä A549-soluja on esitetty kuvissa 1 ja 2. RD-solut ovat värttinänmuotoi-

sia ja suuria monitumaisia soluja. RD-soluja on kuvattu kuvassa 3. (LGC Standards, 2011; A549.com.)



Kuvat 1 ja 2. Tyypilliset A549-solut. (A549.com.)



Kuva 3. Tyypilliset RD-solut. (Muokattu Jaianand ym., 2011.)

3.2 Virus-RNA:n eristys

Jotta viruksen genomia voitaisiin käsitellä, se täytyy ensin eristää viruksen muista osista sekä puhdistaa. Nukleiinihapot voidaan eristää kudoksista tai so-

luviljelmistä. Ensimmäisenä solut hajotetaan, ja tämä vaihe voidaan edelleen jakaa mekaaniseen, kemialliseen ja entsyymattiseen vaiheeseen. Seuraavaksi inaktivoidaan solujen nukleiinihappoja hajottavat nukleasaat. Lopuksi virus-RNA tai -DNA eristetään suodattamalla tai saostamalla. RNA:ta eristettäessä on syytä käyttää RNAasi-inhibiittoreita, jotteivät ribonukleasaat hajota RNA:ta. Ennen PCR:ää on RNA käänteistranskriptoitava DNA:ksi, jotta sen monistus onnistuisi polymeerasiketjureaktiolla. (Solunetti, 2006; Suominen ym., 2010.)

3.3 RT-polymeerasiketjureaktio

Polymeerasiketjureaktiolla eli PCR:llä tarkoitetaan DNA-jaksojen monistamista eksponentiaalisesti korkeassa lämpötilassa käyttämällä polymeerasientsyymiä. Menetelmällä voidaan monistaa DNA:ta mistä tahansa lähteestä: bakteereista, viruksista, kasveista tai eläimistä. PCR:llä monistetaan DNA-jaksoja, joita rajaa kummastakin päästä tunnetut sekvenssit, alukkeet. Monistettavan DNA-jakson sekvenssiä ei sen sijaan tarvitse tuntea. DNA-polymeerasin on oltava kestävä ja stabiili korkeassakin lämpötilassa. Lisäksi PCR:ssä tarvitaan malli-DNA:ta eli templaattia ja DNA:n rakenneosia, nukleotideja. (Champe ym., 2008; Suominen ym., 2010; Ulmanen ym., 2004.)

Alukkeet ovat lyhyitä, nukleotidisekvenssiltään tunnettuja yksinauhaisia DNA-jaksoja, joiden pituus on noin 20–35 nukleotidia. Kaksi erilaista aluketta kiinnittyy monistettavan DNA-jakson vastakkaisiin päihin, jolloin alukkeiden väliin jäävä jakso monistuu. RT-PCR (eng. *reverse transcriptase-PCR*) on PCR:n sovellus, jossa RNA täytyy ensin kääntää yksinauhaiseksi cDNA:ksi (eng. *complementary DNA*), jotta se voi toimia templaattina. cDNA:n ensimmäinen yksijuosteinen nauha täytyy ensin syntetisoida käänteiskopioijaentsyymillä (RT-entsyymillä), jotta nauha monistuisi PCR:llä ja syntyisi kaksinauhaista cDNA:ta. (Alberts ym., 2004; Champe ym., 2008; Suominen ym., 2010.)

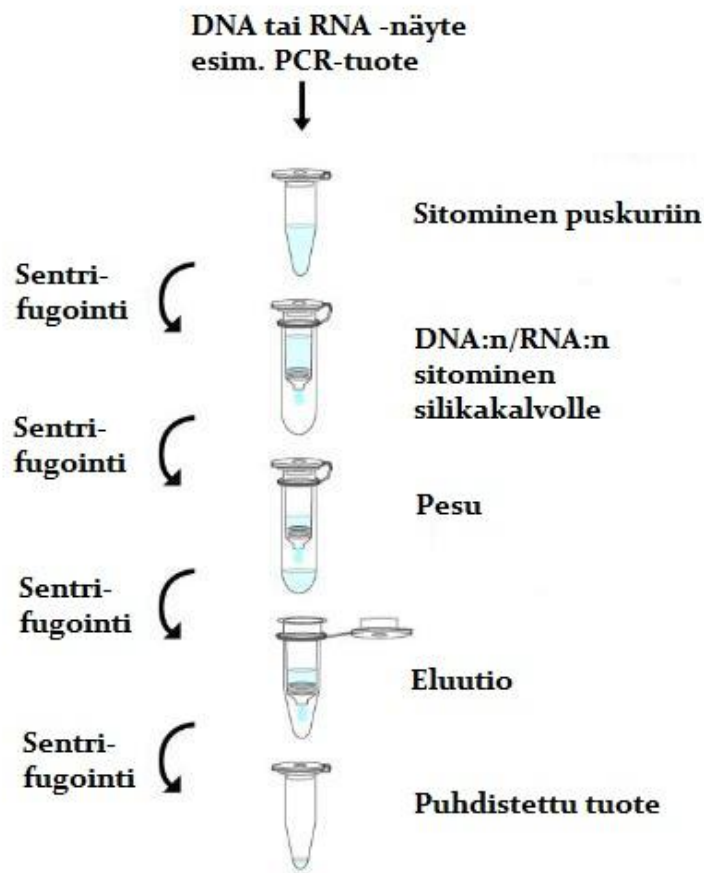
PCR koostuu sykleistä, joissa on kolme vaihetta: denaturointi, annealing ja pidentysreaktio. Alussa templaatti denaturoidaan eli kaksinauhaisesta DNA:sta tehdään yksijuosteista erottamalla juosteet toisistaan kuumennuskäsittelyllä.

Tämän jälkeen alkaa annealing, jossa lämpötilaa lasketaan, jotta alukkeet pysyvät kiinnittymään templaattiin. Tämän jälkeen lämpötilaa nostetaan jälleen eli alkaa pidennysreaktio, jolloin DNA-polymeraasi alkaa koota nukleotideja templaatin mukaisesti lähtien 3'-päästä. Kun nauhan synteesi on valmis, alkaa jälleen denaturointi. Syklejä on tavallisesti 15–40. (Champe ym., 2008; Suominen ym., 2010.)

3.4 RNA:n puhdistus

Nukleiinihappojen puhdistukseen käytetään usein kaupallisia kittejä. Nukleiinihappoissa on epäpuhtautena tavallisesti proteiineja. Puhdistusmenetelmiä on useita, joista parhaiten soveltuva(t) valitaan tutkimukseen. Uttaminen ja saostaminen, kromatografia, elektroforeesi ja dialyysi ovat yleisiä puhdistustapoja. (Solunetti, 2006.)

Tässä opinnäytetyössä puhdistamiseen valittiin Macherey-Nagelin Nucleospin® Extract II –kitti, jossa käytetään spin-kolonneihin sidottua silikakalvoa. Menetelmä perustuu nukleiinihappojen sitoutumiseen silikaan kaotroopin läsnä ollessa korkeassa ionikonsentraatiossa. PCR:ssä monistettu tai geeliltä leikattu DNA-vyöhyke liuotetaan puskuriin ja siirretään pylvääseen. Liuosta sentrifugoidaan ja silikakalvoon tarttumaton aines valuu pylvään pohjalle DNA:n sitoutuessa silikaan. Seuraavaksi kalvoa pestään etanolia sisältävällä puskurilla, jolloin epäpuhtauksista päästään eroon. Lopuksi nukleiinihapot irrotetaan eluutiopuskurilla sentrifugoimalla pieneen tilavuuteen steriiliin putkeen. Tyypillinen nukleiinihappojen puhdistus silikamenetelmällä on esitetty kuviossa 4. (Macherey-Nagel, 2008; Suominen ym., 2010.)



Kuvio 4. Tyypillinen nukleiinihappojen puhdistus silikakalvomenetelmällä. (Muokattu Favorgen, 2011.)

3.5 Agarosigeelielektroforeesi

Agarosigeelielektroforeesilla eli AGElla analysoidaan DNA:n kokoa. Parhaiten AGE soveltuu keskikokoisille fragmenteille eli noin 0,1-50 kb:n kokoisille DNA-paloille. Agarosi on polysakkaridi, jota eristetään merileivistä. Agarosi liuotetaan veteen kiehauttamalla ja jäähtyessään alle 45 °C:n se jähmettyy geeliksi. DNA:t ladataan geelin toiseen päähän ja sähkövirta asetetaan kulkemaan geelilaatalla. DNA-fragmenttien kulkeutuminen AGEssa perustuu sähkövarauseroihin. DNA ja RNA ovat negatiivisesti varautuneita johtuen happamista fosfaattiryhmistä eli ne kulkeutuvat sähkövirrassa positiivista napaa kohti. Nukleiinihapot erottuvat toisistaan geelillä, jonka verkkomainen rakenne päästää pienikokoiset

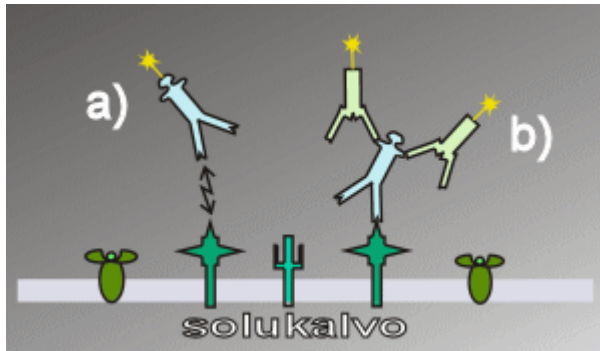
fragmentit kulkeutumaan sähkövirrassa pidemmälle. Ajon aikana nukleiinihap-pofragmentit erottuvat omiksi vyöhykkeikseen ajettaessa ominaisella sähkövir-ralla. (Alberts ym., 2004; Suominen ym., 2010; Ulmanen ym., 2004.)

DNA-vyöhykkeet ovat näkymättömiä, jos niitä ei värjätä tai leimata jotenkin. Usein geelin lisätään esimerkiksi etidiumbromidia, joka tunkeutuu nukleiinihap-pojen emästen väliin ja UV-valossa emäkset absorboivat ultraviolettisäteitä. Kun etidiumbromidi saa emäskompleksilta energiaa, se fluoresoi oranssinpunaisena. (Alberts ym., 2004; Suominen ym., 2010.)

3.6 Immunosytokemia

Immunosytokemialla tarkoitetaan sellaisia tekniikoita, joiden avulla havaitaan merkattuja molekyyliä vasta-aineita käyttämällä, ja jotka hyödyntävät valo- tai elektronimikroskooppia. Antigeeniin sitoutuu spesifisesti vasta-aine, joka visu-alisoidaan merkkiaineella. Vasta-aineet ovat proteiineja, joita selkärankaisten elimistö tuottaa infektioita vastaan. Ne sitoutuvat kohdemolekyyliihinsä, kuten myrkkyyihin, viruksiin ja bakteerien pintarakenteisiin. (Alberts ym., 2002; Heino & Vuento, 2010; Solunetti, 2006.)

Vasta-ainevärjäys voidaan tehdä suoralla eli primäärisellä menetelmällä tai epäsuoralla eli sekundäärisellä menetelmällä. Suorassa värjäyksessä vasta-aine on jo valmiiksi leimattu, joten haluttu antigeeni voidaan visualisoida jo yh-dellä käsittelykerralla. Epäsuorassa värjäyksessä puolestaan käytetään kahta merkkiainetta, joista ensimmäinen ei sisällä leimaa, vaan se sitoutuu ainoastaan spesifisesti antigeeniinsä. Toisessa värjäyksessä lisätään leiman sisältävä se-kundäärinen vasta-aine, joka sitoutuu primääriseen vasta-aineeseen ja näin visualisoi kohteen. Kumpikin värjäysperiaate on esitetty kuviossa 5. Epäsuoran värjäyksen etuna on vahvempi signaali ja intensiivisempi värjäystulos. (Alberts ym., 2002; Collier & Oxford, 2006; Solunetti, 2006.)

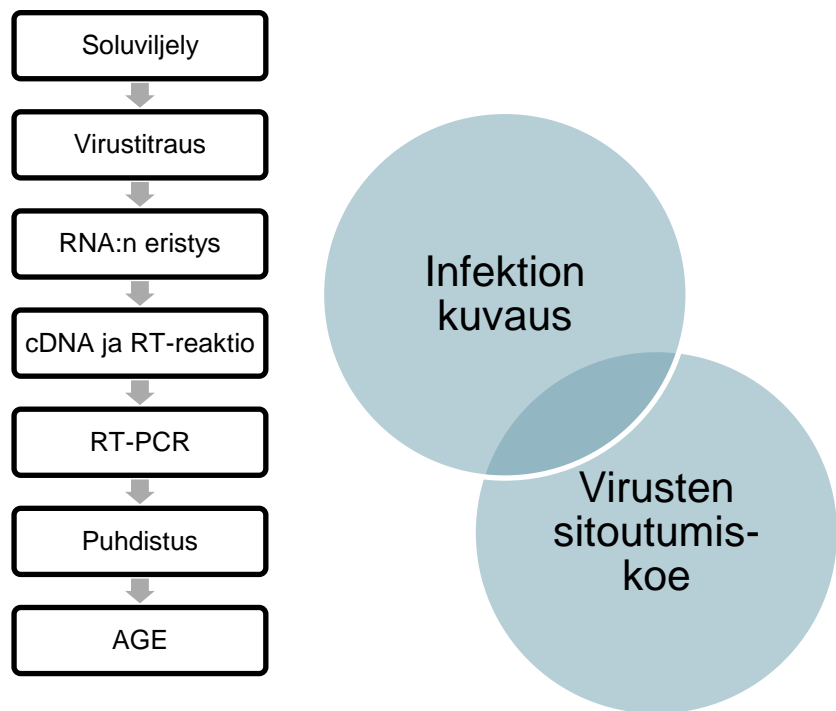


Kuvio 5. a) Primäärisen vasta-aineen sitoutuminen. b) Sekundäärisen vasta-aineen sitoutuminen. (Solunetti, 2006.)

Tarvittaessa voidaan käyttää myös vasta-aineita, joissa on fluoresoivia merkkiaineita eli fluorokromeja. Sama näyte voidaan käsitellä usealla eri (värisellä) fluorokromilla, jolloin voidaan visualisoida useampia antigeenejä käyttämällä erilaisia suodattimia. (Heino & Vuento, 2010; Solunetti, 2006.)

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Tutkimustyö alkoi RD- ja A549-solujen viljelystä sekä CAV9:n ja CAV9-RGDdelin virustitrauksista kyseisillä soluilla. Seuraavana vuorossa oli RNA:n eristäminen, cDNA:n valmistus ja RT-reaktiot, RT-PCR, tuotteiden puhdistus kaupallisella kitillä sekä agarosigeelielektroforeesiajo. Työvaiheiden järjestys on esitetty kuviossa 6. Näiden lisäksi tehtiin integriinien sitoutumiskoe ja infekti-
on kuvaus immunofluoresenssimikroskopiolla.



Kuvio 6. Tutkimuksen eteneminen.

4.1 Soluviljely

Työssä viljeltiin kahta eri solulinjaa RD- ja A549-soluja. Kumpaakin kasvatettiin inkubaattorissa +37 °C:ssa alhaisessa CO₂-pitoisuudessa T75-pulloissa ja kuoppalevyissä sekä jaettiin aina tarvittaessa solujen kasvettua konfluenssiin noin kaksi kertaa viikossa. Soluja kasvatettiin DMEM-mediumissa (Dulbecco's modified Eagle's medium), johon lisättiin 10 % FCS:ää, 2 mM glutamiinia ja gentamysiiniä. Solut jaettiin suhteessa 1:10 (2 ml soluja ja 20 ml mediumia), jolloin medium imettiin pois, soluja huuhdeltiin pienellä määrällä PBS:ää ja irrotettiin trypsiinillä. Trypsiinin peitossa olevia soluja inkuboitiin, kunnes solut näkyivät mikroskoopissa pyöreinä ja irronneina. Lopuksi soluja purskuteltiin mediumilla, jotta solut olisivat varmasti irronneita. Solutiheys laskettiin Bürker-kammion avulla valomikroskoopilla sekoittamalla soluja ja väriainetta, jolloin kuolleet solut värjäytyivät tummiksi ja elävät pysyivät haaleina seuraavalla kaavalla:

$$\text{Solutiheys} = \text{Solumäärä (keskiarvo/ruutu)} \times \text{Laimennoskerroin} \times 10^4$$

Solut jaettiin uusiin T75-pulloihin sekä 96-kuoppalevyihin siten, että konsentraatioksi saatiin 200 000 solua/ml.

4.2 End-point-virustitraus

Työvaiheen tarkoituksena oli verrata A549- ja RD-soluissa kasvaneiden ja passoitujen CAV9- ja CAV9-RGDdel-kantojen infektiivisyyttä.

Solut jaettiin 96-kuoppalevyille ja annettiin kasvaa konfluenssiin. Vanha medium poistettiin ja uutta mediumia (DMEM + 7 % FCS + gentamysiini) pipetoitiin 90 µl jokaiseen kuoppaan. 10 µl virusnäytettä pipetoitiin 1. sarakkeen kaivoihin A-H eli ykköskaivoihin. Viruksia pipetoitiin edellisestä kaivosta aina seuraavaan kai-

voon 10 µl. Näin saatiin viruslaimennossarja 10^{-1} – 10^{-12} . Viruksia inkuboitiin tunti $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa alhaisessa CO_2 -pitoisuudessa, jonka jälkeen virusmedium poistettiin. A549-solut huuhdeltiin PBS:llä 3 kertaa ja DMEMiä lisättiin 200 µl/kaivo, RD-soluihin lisättiin suoraan DMEMiä 200 µl/kaivo. Soluja viljeltiin 48 h ja CPE:t laskettiin valomikroskoopilla silmämääräisesti.

4.3 Virus-RNA:n eristys

RNA eristettiin E.Z.N.A.™-kitillä (Omega bio-tek, 2007) ohjeen mukaisesti. 150 µl virusnäytettä pipetoitiin 500 µl:aan QVL-carrier RNA -liuosta ja sekoitettiin vorteksoimalla 30 s. Tämän jälkeen lisättiin 350 µl absoluuttista etanolia ja vorteksoitiin uudelleen. Näyte siirrettiin HiBind RNA -kolonniin, jota sentrifugoitiin, kunnes näyte oli imeytynyt siihen. Kolonnia pestiin etanolilla laimennetulla RWB-puskurilla ja sentrifugoitiin kuivaksi. RNA eluointiin irti käyttämällä 50 µl DEPC-käsiteltyä vettä. Eristettyjä RNA-näytteitä säilytettiin $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. (E.Z.N.A., 2007.)

4.4 RT-PCR

Viruksista eristettiin RNA, jota käytetään cDNA:n tekemiseen RT-reaktiossa. Pipetointivaiheet on esitetty taulukossa 1. RT-reaktion aikaansaamiseksi cDNA:t asetettiin lämpöblokkiin $+42\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen 60 min ja jatkettiin suoraan PCR-reaktioon. Mikäli työtä ei jatkettu suoraan eteenpäin, näytteet pakastettiin ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Taulukko 1. cDNA:n tekemiseen tarvittava seos.

Reagenssi	Tilavuus μl (suluissa lopullinen konsentraatio)
5 x ImProm II –puskuri	2 (1 x)
25 mM MgCl_2	1 (2,5 mM)
10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
RNAasi-inhibiittori	0,5
RT-entsyymi: ImProm II	0,5
Primeri 10 μM OAS/IAS	1 (1 μm)
RNA	4,5
Yhteensä	10

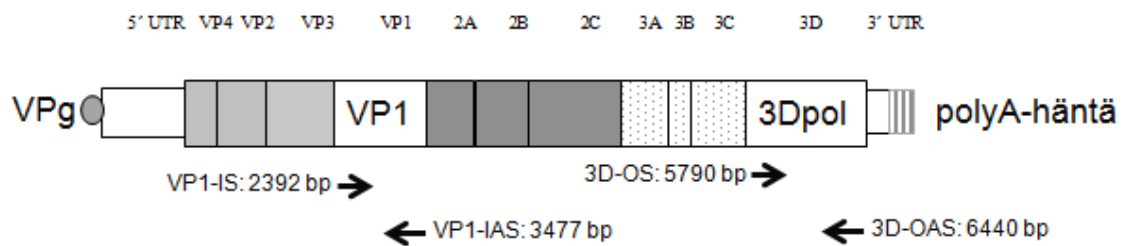
RT-reaktion jälkeen työtä jatkettiin pipetoimalla näytteet PCR-reaktio-seokseen. Pipetointivaiheet on esitetty taulukossa 2. Yhdestä RT-tuotteesta syntyi aina 2 PCR-näytettä, sillä reaktiossa käytettiin sekä 3D- että VP1-alueille suunnattuja alukkeita. 3D-alueille käytettiin OS/OAS- (outer sense/outer antisense) alukkeita ja VP1-alueille IS/IAS- (inner sense/inner antisense) alukkeita, joiden sekvenssit ovat taulukossa 3. Lisäksi näiden alukkeiden sijainnit ja suunnat genomissa on esitetty kuviossa 7. PCR-ajoissa oli mukana myös negatiivinen kontrolli.

Taulukko 2. PCR-reaktion seos.

Reagenssi	Määrä (μl)
RT-reaktiosta	5
ddH ₂ O	11,75
10 x puskuuri	2,5
10 mM dNTP	0,5
10 μM 5'-aluke	2,5
10 μM 3'-aluke	2,5
Dynazyme	0,25
Yhteensä	25

Taulukko 3. 3Dpol- ja VP1-alukkeiden sekvenssit. (Muokattu McWilliam Leitch ym., 2009).

Orientaatio	Sijainti	Sekvenssi
3Dpol OS	5790 bp	GGY GGY ACH CCC CAN AAR AGA ATG CT
3Dpol OAS	6440 bp	TCR TCY TTB ACR TAD GTY ACC ATT GG
VP1 IS	2392 bp	CTT GTG CTT TGT GTC GGC RTG YAA YGA YTT YTC WG
VP1 IAS	3477 bp	TCA TCC CAC ACR CAV TTY TGC CAR TC



Kuvio 7. Alukkeiden sijainnit ja suunnat CAV9:n genomirakenteessa.

PCR-reaktion valmistuttua jatkettiin suoraan PCR-ajoon PCR-laitteella (GeneAmp® PCR System 9700) seuraavalla ohjelmalla (taulukko 4):

Taulukko 4. PCR-ajo-olosuhteet.

PCR-ajo-olosuhteet		
Lämpötila	Aika	Sykli
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	x 40
50 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Ajon jälkeen näytteet pakastettiin (-20 °C), mikäli ei jatkettu suoraan puhdistukseen.

4.5 PCR-tuotteiden puhdistus

PCR-tuotteet puhdistettiin käyttämällä DNA NucleoSpin –kittiä. PCR-näyte sekoitettiin NT-puskuriin ja ladattiin kolonniin sentrifugoimalla. Kolonnin silikakalvoon kiinnittynyttä PCR-tuotetta pestiin NT3-puskurilla ja lopuksi kuivattiin sentrifugoimalla. DNA eluoiitiin irti puhtaaseen eppendorf-putkeen eluutiopuskurilla, inkuboimalla huoneenlämmössä sekä sentrifugoimalla. (Macherey-Nagel, 2008)

4.6 Agaroosigeelielektroforeesi

Puhdistetuista PCR-tuotteista 5 µl ajettiin 1-prosenttiselle agaroosigeelille. Geeli valmistettiin punnitsemalla 1,0 g agaroosia ja lisäämällä se 100 ml:aan 1 x TAE-puskuria. Liuosta kuumennettiin mikrossa sekoittamalla välillä, kunnes agaroosi oli liennut puskuuriin ja väri oli täysin kirkas. Liuosta jäähdytettiin noin +50 °C:seen ja siihen lisättiin 5 µl etidiumbromidia (10 mg/ml). Sekoituksen jälkeen liuos kaadettiin ajo-altaaseen, geeliin asetettiin tarvittava määrä kampoja ja geelin annettiin jähmettyä vähintään 30 min.

Ajoa varten näytteet värjättiin 6 x latauspuskurilla (liitteessä 1), sekoittamalla 5 µl:aan näytettä 1 µl puskuuria ja vorteksoimalla. Markkeriksi valittiin GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (liitteessä 2). Geeliä ajettiin noin 100 V jännitteellä vähintään tunti, jonka jälkeen geeli kuvattiin UV-valossa. Markkerin vyöhykkeitä verrattiin näytteistä saatuihin vyöhykkeisiin ja näin saatiin selville, mitkä näytteistä olivat monistuneet ja puhdistuneet. Näytteet säilöttiin -20 °C:seen odottamaan sekvensointia.

4.7 Virusten sitoutumiskoe

Sitoutumiskokeessa testattiin A549-soluissa pasasoitujen CAV9-RGDdel-virusten sitoutumista integriineihin. Kontrollina käytettiin villityypin CAV9:ää.

Tutkimuksessa käytettiin mikrotiitterilevyjä, jotka oli päällystetty $\alpha\beta 6$ -integriinillä käyttäen BSA:ta kontrollina. Levyjä inkuboitiin yön yli +4 °C:ssa.

Tämän jälkeen kuoppia pestiin kolme kertaa PBS + 1 mM MgCl₂, lisättiin 1 % BSA PBS:ssä, jossa oli mukana 1 mM MgCl₂ ja inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä. Kuopat pestiin jälleen PBS + 1mM MgCl₂. Viruksia lisättiin kahdessa eri konsentraatiossa 1:50 ja 1:10, inkuboitiin 1h +37 °C:ssa ja pestiin kuopat. Seuraavaksi lisättiin virusspesifistä monoklonaalista hiiri-antiseerumia (CAV9-K6) laimennettuna 1:500 ja inkuboitiin 1 h +37 °C:ssa. Kuopat pestiin jälleen ja lisättiin peroksidaasikonjugoitua (HRP) anti-hiirivasta-ainetta laimennettuna 1:10 000 ja inkuboitiin 1 h huoneenlämmössä. Kuopat pestiin, lisättiin TMB-substraattipuskuria ja inkuboitiin 15 min valolta suojattuna. Lopuksi reaktio pysäytettiin 0,45 M H₂SO₄ ja mitattiin OD_{450nm}.

4.8 Infektion kiinnitys ja kuvaus

Työssä kuvattiin infektion etenemistä A549-soluissa.

Mustaan kuoppalevyyn jaettiin A549-soluja ja inkuboitiin, kunnes ne olivat vähintään 50 %:sesti konfluentteja. Kuoppien pesuun käytettiin solumediumia, jossa oli 1 % FCS + gentamysiini. Viruslaimennukset tehtiin samaan mediumiin, jonka jälkeen levyjä inkuboitiin jäällä, jotta virus tarttuisi solun pintaan. Viruksen poiston jälkeen lisättiin esilämmitettyä solumediumia ja inkuboitiin 6 h +37 °C:ssa. Aikapisteet tehtiin pesemällä PBS:llä ja kiinnittämällä 4 % FA:lla ja 0,2 % Triton X-100:llä. Käsitellyt kuoppia säilytettiin PBS:ssä ja levy asetettiin jääkaappiin värjäystä varten.

Hoechst- ja vasta-ainelaimennokset tehtiin steriilisuodatettuun PBS-liuokseen, jossa oli 3 % BSA. Kuopista poistettiin säilytysliuoksena ollut PBS ja lisättiin primääriset vasta-aineet (CAV9-K6) laimennettuna 1:500. Levyä inkuboitiin 1 h, pestiin kuopat PBS:llä ja lisättiin sekundäärinen vasta-aine (Alexa-488) laimennettuna 1:500, joka näkyy kuvissa vihreänä. Inkuboinnin jälkeen pestiin PBS:llä, lisättiin Hoechst-tumaväri laimennettuna 1:2000 (näkyy kuvissa sinisenä), pestiin ja säilytettiin PBS:ssä pimeässä, folioon käärittynä jääkaapissa.

Infektiot kuvattiin Turun yliopiston Biotekniikan keskuksen Zeiss AxioVert – fluoresenssimikroskoopilla suurennuskertoimella 40.

5 TULOKSET JA ARVIOINTI

Opinnäytetyössä tarkasteltiin, miten CAV9 ja geneettisesti modifioitu CAV9-RGDdel infektoivat RD- ja A549-soluja. Koska virusinfektio A549-soluissa tapahtuu integriinivälitteisesti ja RD-soluissa puolestaan ilman integriinejä, oli mahdollista seurata muutoksia myös reseptorikäytössä.

5.1 Pasasointinäytteet

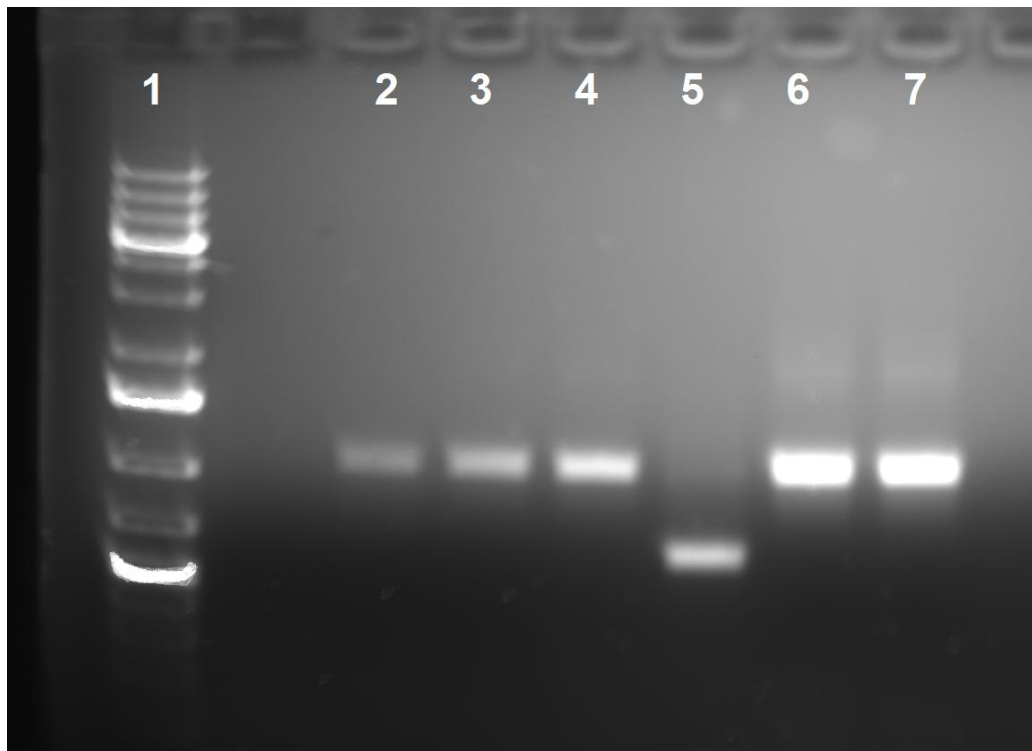
Työssä käytettiin CAV9- ja CAV9-RGDdel-virusnäytteitä, jotka olivat kahtena eri vuonna kerättyinä pasasointisarjoina. Merkkien selitykset on esitetty taulukossa 5. Pasasoinnissa virusta oli infektoitu solulinjaan. Infektion tapahduttua (1 h pipetoinnista), kuoppa pestiin PBS:llä pipetoidun viruksen poistamiseksi ja infektiota seurattiin valomikroskoopilla, kunnes näkyvä virusinfektio oli havaittavissa. Tämän jälkeen muodostunut virus-solunäyte kerättiin kuopasta ja laimennettiin 1:10 000 ja infektoitiin uuteen solukuoppaan. Tätä jatkettiin vähintään 12 kertaa (kuoppaa).

Taulukko 5. Merkkien selitykset.

Merkkien selitykset	
08/09	Keräysvuosi
RCAV	CAV9 RD:ssä
RRGD	CAV9-RGDdel RD:ssä
ACAV	CAV9 A549:ssä
ARGD	CAV9-RGDdel A549:ssä
1/2/3/4/5/6/8/9/10/12	Pasasointinumero

5.2 RNA:n eristys, RT-PCR ja AGE-analyysi

Virusnäytteistä eristettiin RNA, tuotettiin RT-PCR:llä 3D- ja VP1-alueista PCR-tuotteet, jotka puhdistettiin kitillä ja analysoitiin lopuksi agarosigeelielektroforeesilla. Näytteitä oli yhteensä 128 kpl, joista saatiin tuotettua ja puhdistettua yhteensä 126 kpl VP1- ja 3Dpol-PCR-tuotetta sekvensointia varten (Taulukko 6). Virusten pasasointisarjoista tutkimukseen valittiin pasaasit 1, 2, 3, 4/5, 6, 8/9, 10, 12 käsiteltäviksi näytteiksi, sillä kaikkien näytteiden tutkiminen ei aikatauluun olisi mahtunut. Kuvaesimerkki agarosigeelielektroforeesijosta on esitetty kuvassa 4. Kuvan geelillä on ajettu vuoden 2009 sarjoista kuusi eri näytettä (ARGD, RRGD, RCAV) ja vasemmassa laidassa on GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (liite 1), joiden avulla näytteiden kokoa voidaan arvioida.

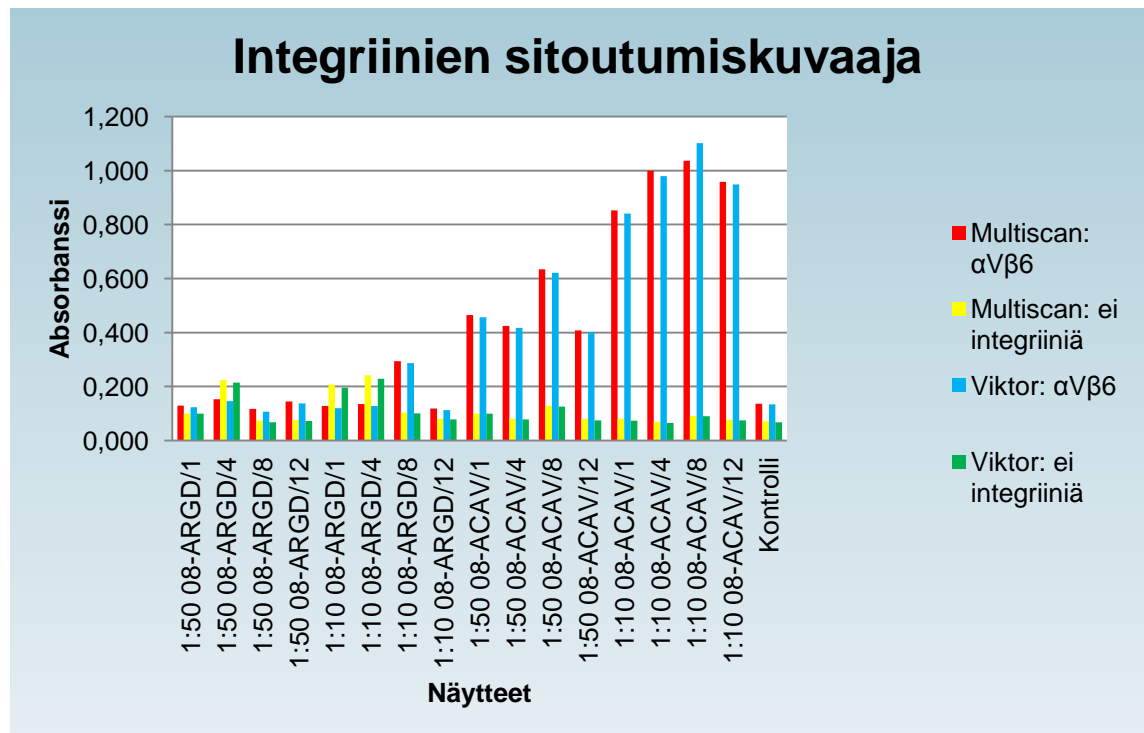


Kuva 4. Kuvaesimerkki agarosigeelijaosta. 1. 1 kb DNA Ladder, 2. 09-ARGD/2 VP1, 3. 09-ARGD/3 VP1, 4. 09-ARGD/6 VP1, 5. 09-RCAV/12 3, 6. 09-RRGD/10 VP1, 7. 09-RRGD/12 VP1.

Taulukko 6. Tutkimusnäytteet.

<u>VIRUS</u>	<u>VALMIIT TUOTTEET</u>	<u>VIRUS</u>	<u>VALMIIT TUOTTEET</u>
09-RCAV/1	3D + VP1	08-RCAV/1	3D + VP1
09-RCAV/2	3D + VP1	08-RCAV/2	3D + VP1
09-RCAV/3	3D + VP1	08-RCAV/3	3D + VP1
09-RCAV/4	3D + VP1	08-RCAV/4	3D + VP1
09-RCAV/6	3D + VP1	08-RCAV/6	3D + VP1
09-RCAV/8	3D + VP1	08-RCAV/8	3D + VP1
08-RCAV/10	3D + VP1	08-RCAV/10	3D + VP1
09-RCAV/12	3D + VP1	08-RCAV/12	3D + VP1
09-RRGD/1	3D + VP1	08-RRGD/1	3D + VP1
09-RRGD/2	3D + VP1	08-RRGD/2	3D + VP1
09-RRGD/3	3D + VP1	08-RRGD/3	3D + VP1
09-RRGD/4	3D + VP1	08-RRGD/4	3D + VP1
09-RRGD/6	3D + VP1	08-RRGD/6	3D + VP1
09-RRGD/8	3D + VP1	08-RRGD/8	3D + VP1
09-RRGD/10	3D + VP1	08-RRGD/10	3D + VP1
09-RRGD/12	3D + VP1	08-RRGD/12	3D + VP1
09-ACAV/1	3D + VP1	08-ACAV/1	3D + VP1
09-ACAV/2	3D + VP1	08-ACAV/2	3D + VP1
09-ACAV/3	3D + VP1	08-ACAV/3	3D + VP1
09-ACAV/4	3D + VP1	08-ACAV/4	3D + VP1
09-ACAV/6	3D + VP1	08-ACAV/6	3D + VP1
09-ACAV/9	3D + VP1	08-ACAV/9	3D + VP1
09-ACAV/10	3D + VP1	08-ACAV/10	3D + VP1
09-ACAV/12	3D + VP1	08-ACAV/12	3D + VP1
09-ARGD/1	Molemmat puuttuvat!	08-ARGD/1	3D + VP1
09-ARGD/2	3D + VP1	08-ARGD/2	3D + VP1
09-ARGD/3	3D + VP1	08-ARGD/3	3D + VP1
09-ARGD/5	3D + VP1	08-ARGD/5	3D + VP1
09-ARGD/6	3D + VP1	08-ARGD/6	3D + VP1
09-ARGD/8	3D + VP1	08-ARGD/8	3D + VP1
09-ARGD/10	3D + VP1	08-ARGD/10	3D + VP1
09-ARGD/12	3D + VP1	08-ARGD/12	3D + VP1

5.3 Integriinien sitoutumiskoe



Kuvio 8. Integriinien sitoutumiskoe.

Aiemmin on osoitettu, että CAV9-RGDdel ei kykene tarttumaan $\alpha V\beta 3$ - ja $\alpha V\beta 6$ -integriineihin *in vitro* ja A549-infektiokokeissa virus ei ole kasvanut ollenkaan tai ainakaan samalla tavalla kuin natiivi CAV9-virus. Viruspasasoinnin aikana tehtiin havainto, että CAV9-RGDdel viruksen kasvunopeus kuitenkin lisääntyi pasasointien edetessä A549-soluissa saavuttaen natiivin viruksen lisääntymistason hyvin nopeasti. Jotta voitiin olla varmoja, ettei lisääntynyt infektiivisyys johdunut viruksen muuntumisesta siihen suuntaan, että se kykenisi sitoutumaan integriineihin, RGD-alueen puuttumisesta huolimatta, virusta testattiin integriinien sitoutumiskokeessa. $\alpha V\beta 6$ -integriini sitoutettiin kuoppalevyn pohjaan ja virus- ta inkuboitii kuopassa. Sitoutuminen mitattiin Victor- ja Multiscan-laitteilla perustuen leimattujen vasta-aineiden sitoutumisesta aiheutuvaan fluoresenssiin. Integriinien sitoutumiskokeessa ei havaittu RGDdel-viruksen (ARGD) sitoutumista riippumatta pasaasinumerosta (Kuvio 8). Sitoutumisen puute näkyi alhaisena absorbanssina, joka on jopa kontrollin tasolla joissakin näytteissä. Sen

sijaan natiivi virus (ACAV) A549-soluissa kykenee heti kasvavassa määrin sitoutumaan integriiniin pasaasin noustessa.

Laimennos 1:10 antoi hieman suuremman absorbanssin kuin 1:50 laimennos, mikä kertoo siitä, että pienemmässä laimennoksessa on enemmän integriineihin sitoutunutta virusta eli koe toimii odotetusti. Pienet erot selittyvät eri virusmäärillä (infektiivisyyserolla) näytteissä ja epätarkalla pipetoinnilla. Koe osoitti siis selvästi, ettei pasasoitu RGDdel-virus edelleenkään sitoudu $\alpha\beta6$ -integriineihin. Tämä tulos tullaan myöhemmin varmentamaan sekvensoimalla VP1-geenin RGD-alue ja odotuksena on, että sekvenssistä puuttuu RGD. Mittaustulokset löytyvät liitteestä 3.

5.4 Virustitraus ja immunofluoresenssi

Kaikkien pasasoitujen virusnäytteiden infektiivisyys mitattiin infektoimalla niillä RD-soluihin eli tehtiin ns. end-point-titraus. Tämä tehtiin siksi, että RD-soluissa oletuksena oli, että virukset infektoivat hyvin, kun taas A549-soluissa havaittiin eroja infektiivisyydessä. Tällöin RD-infektiivisyyttä voidaan käyttää mittaamaan virusten suhteellista, keskinäistä infektiivisyyttä, jotta A549-infektiossa infektiivisen viruksen määrä on sama. Titraustulokset on esitetty taulukossa 7. Tähdellä (*) merkityt on titrattu A549-soluissa, kaikki muut RD-soluissa. Taulukosta huomataan, että RD-soluissa viljellyt CAV9- ja CAV9-RGDdel-virukset (RCAV ja RRGD) kasvavat lähes yhtä hyvin, mikä tukee aiemmista tutkimuksissa vahvistunutta olettamusta, että CAV9-infektio RD-soluissa on riippumaton RGD-alueesta ja siten viruksen kyvystä sitoutua integriineihin. A549-soluissa kasvatetut virukset (ACAV ja ARGD) sen sijaan eivät kasvaneet yhtä hyvin kuin RD-soluissa kasvatetut. Näillä soluilla alhaisilla pasaaseilla sytopaattinen efekti ei etene kovinkaan pitkälle, mutta pasaasinumeron kasvaessa infektiivisyys kasvaa huomattavasti alkutilanteeseen verrattuna. Tämä todistaa, että virukset sopeutuvat ympäristöönsä, kun niitä pasasoidaan samassa solulinjassa. Virusten genomissa on siis tapahtunut muutoksia, jonka vuoksi infektiivisyys on myöhemmissä pasaaseissa korkeampi.

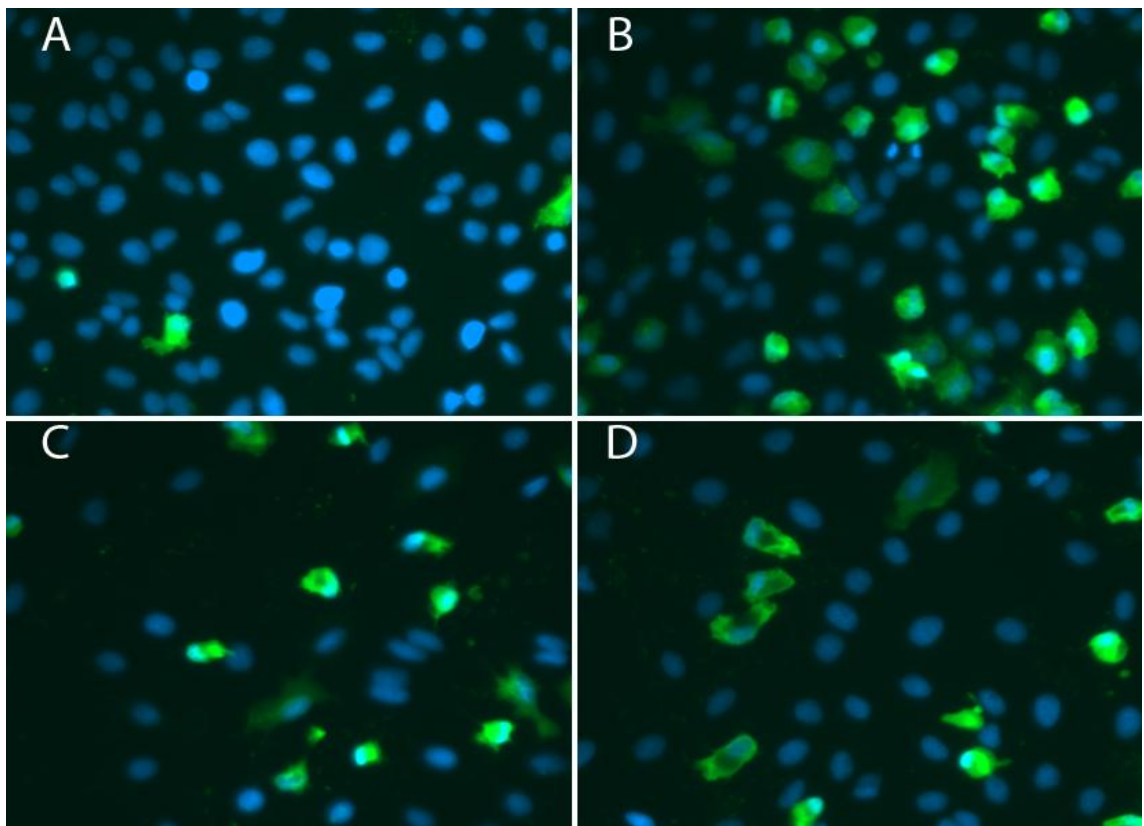
Taulukko 7. Näytteiden titraustulokset.

Näyte	CPE (viimeinen kaivo)	Näyte	CPE (viimeinen kaivo)
08-RRGD/1	10	09-RRGD/1	>12
08-RRGD/2	9	09-RRGD/2	>12
08-RRGD/3	7	09-RRGD/3	10
08-RRGD/4	6	09-RRGD/4	>12
08-RRGD/6	10	09-RRGD/6	>12
08-RRGD/8	9	09-RRGD/8	>12
08-RRGD/10	>12	09-RRGD/10	>12
08-RRGD/12	>12	09-RRGD/12	11
08-RCAV/1	12	09-RCAV/1	9
08-RCAV/2	>12	09-RCAV/2	>12
08-RCAV/3	>12	09-RCAV/3	10
08-RCAV/4	>12	09-RCAV/4	>12
08-RCAV/6	>12	09-RCAV/6	>12
08-RCAV/8	12	09-RCAV/8	>12
08-RCAV/10	>12	08-RCAV/10	<12
08-RCAV/12	>12	09-RCAV/12	>12
08-ACAV/1	5	09-ACAV/1	5, 5*
08-ACAV/2	6	09-ACAV/2	8, 6*
08-ACAV/3	8	09-ACAV/3	10, 6*
08-ACAV/4	8	09-ACAV/4	10, 7*
08-ACAV/6	7	09-ACAV/6	6, 6*
08-ACAV/9	7	09-ACAV/9	6, 6*
08-ACAV/10	10	09-ACAV/10	8, 7*
08-ACAV/12	10	09-ACAV/12	8, 6*
08-ARGD/1	3	09-ARGD/1	5, 4*
08-ARGD/2	6	09-ARGD/2	5, 5*
08-ARGD/3	6	09-ARGD/3	5, 5*
08-ARGD/5	8	09-ARGD/5	8, 8*
08-ARGD/6	8	09-ARGD/6	6, 6*
08-ARGD/8	8	09-ARGD/8	12, 8*
08-ARGD/10	8	09-ARGD/10	7, 4*
08-ARGD/12	10	09-ARGD/12	11, 8*

Titraustuloksen avulla oli siis mahdollista määrittää infektiivisen viruksen määrä siten, että se on sama eri pasasointinäytteiden välillä.

Virusten muuntunut kasvunopeus haluttiin esittää myös kuvantamalla ja tämän vuoksi näytteitä kuvattiin immunofluoresenssimikroskoopiilla. Kuvasarja on esitetty kuvassa 6. Kuvassa siniset ovat tumia ja vihreät ovat viruksia, jotka ovat infektoineet soluja. Mielenkiintoista oli, että ARGD/2-viruksella infektoituja soluja

havaittiin jo 6 tuntia infektiosta, vaikka infektionopeus oli alhaisilla pasaaseilla todella hidas. Sen sijaan myöhäisempi pasaasi (ARGD/10; Kuva 6. B.) oli 6 tunnin kohdalla hyvin infektiivinen. Koska molempia viruksia oli kokeessa käytetty sellainen määrä, että niiden infektiivisyys oli sama RD-soluissa, oli tämä merkki siitä, että viruksen infektionopeus oli muuttunut. Kontrollina käytetyt RD-virukset infektoivat samalla tavalla pasaasinumerosta riippumatta (kuva 6. C ja D.). Tämän perusteella CAV9-RGDdel-virus muuntuu pasasoinnin edetessä, mutta muuntuminen ei perustu lisääntyneeseen kykyyn sitoutua integriineihin vaan johonkin muuhun tekijään.



Kuva 5. Immunofluoresenssikuvasarja. A. ARGD/2, B. ARGD/10, C. RCAV/2, D. RCAV/10.

Sitoutumiskokeen, virustitrauksen ja immunofluoresenssikuvien tulokset ovat siten yhdenmukaiset.

6 PÄÄTELMÄT

Työssä onnistuttiin hyvin. Lähes kaikki näytteet saatiin valmiiksi sekvensointia varten. Ainoastaan 09-ARGD/1:stä ei saatu 3D- tai VP1-alueista tuotettua PCR-tuotetta useista yrityksistä huolimatta. Pipetointivirhe tms. on todennäköisesti tapahtunut virus-RNA:n eristysvaiheessa, vaikka tämäkin toistettiin kahdesti. Reagensseissa ei ollut vikaa, sillä käytössä oli koko ajan samat reagenssit, joilla muut näytteet saatiin onnistumaan. Kyseisen näytteen infektiivisyys on kuitenkin jopa paremmalla tasolla, kuin rinnakkaisella 08-näytteellä, joten virusta näytteessä on riittämiin.

Seuraavaksi työssä on vuorossa valmistuneiden PCR-tuotteiden, 126 kpl, sekvensointi, jota ei rajallisen ajan puitteissa ehditty tehdä. Kun näytteet saadaan sekvensoitua, voidaan tarkastella mahdollisia muutoksia genomissa ja niiden laajuutta. Mielenkiintoisinta on tietää, miten laajoja muutoksia ovat ja sijaitsevatko ne sellaisella alueella, joka vaikuttaa lisääntymiseen. Jatkotutkimuksissa voidaan tarkemmin selvittää, mitä muuta infektiomekanismia (reseptoria) CAV9 kykenee käyttämään.

Kaikki 3D-alueet on monistettu OS/OAS-kohdistuneilla alukkeilla, kun taas VP1-alueissa on käytetty IS/IAS-kohdistuneita alukkeita. Tämä johtuu siitä, että ensimmäisissä PCR-tuotteissa ainoastaan 3D-alue monistui uloimmilla alukkeilla, jolloin VP1-alueeseen täytyi kokeilla sisempää aluketta. Alkuperäisenä ideana oli monistaa kumpikin alue ulommalla alukkeella pidemmän sekvenssin vuoksi, mutta koska nämä alukkeet ovat erittäin lähellä toisiaan (kuvio 7), ei sisemmän alukkeen käytöllä ole käytännössä merkitystä sekvensointia ajatellen.

Agaroosigeelielektroforeesin avulla nähtiin, mitkä näytteet olivat syntetisoituneet ja puhdistuneet kitillä. PCR-tuotteet olivat onnistuneesti syntetisoituneet, kun 3D-alueen koko on noin 600 bp ja VP1-alueen noin 1200 bp.

Titraustulokset osoittavat kaikkien näytteiden olevan infektiivisiä. Lisäksi niistä huomattiin, että CAV9-RGDdel-virukset A549-soluissa (ARGD) eivät alhaisilla

pasaasinumeroilla infektoineet kovinkaan tehokkaasti, mutta pasaasiluvun noustessa kohosi myös infektiivisyys. Tämä todistaa, että viruksessa täytyy tapahtua sellaisia sekvenssimuutoksia, jotka vaikeuttavat infektiivisyyteen.

Sitoutumiskokeen tulokset osoittavat että, CAV9 kykenee infektoimaan myös ilman primääristä $\alpha V\beta 6$ -integroiniään, kuten olettamus oli.

Tutkimustulosten perusteella coxsackievirus A9 kykenee muuntumaan tilanteessa, missä se ei voi käyttää primaarista integriini-reseptoriaan infektoidakseen kohdesolun. Koska CAV9-RGDdel on geneettisesti muokattu virus, jota ei löydy luonnosta, on mahdollista, että luonnollisissa kohde-eläimissään, virus ei kykene lisääntymään tehokkaasti. Tätä voidaan testata esimerkiksi koe-eläimissä (hiirissä), joita on käytetty eläinmallina CAV9-infektiossa.

LÄHTEET

A549.com. Saatavissa: <http://a549.com/> Viitattu 26.7.2011.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. 2004. *Essential cell biology*. Garland Science. USA. 2. painos.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*. USA. 4. painos.

Buttinelli G., Donati V., Ruggeri F., Joki-Korpela P., Hyypia T. & Fiore L. 2003. Antigenic sites of coxsackie A9 virus inducing neutralizing monoclonal antibodies protective in mice. *Virology* 312: 74-83.

Champe P., Harvey R. & Ferrier D. 2008. *Biochemistry*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 4.painos.

Collier L. & Oxford J. 2006. *Human Virology*. Oxford University Press Inc. USA. 3. painos.

Duodecim. Lääketieteellinen Aikakauskirja. 2000. Miten virukset välttävät isännän puolustuksen? Aimo A. Salmi. 116(1):88-93.

E.Z.N.A.™ Viral RNA Kit Manual, 2007.

Favorgen. Saatavissa: http://www.favorgen.us/Products/Plasmid_mini.html Viitattu 27.7.2011.

Filman D. J., Wien M. W., Cunningham J. A., Bergelson J. M. & Hogle J. M. 1998. Structure determination of echovirus 1. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54:1261-1272.

Hedman K., Heikkinen T., Huovinen P., Järvinen A., Meri S. & Vaara M. 2010. *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet*. Kustannus Oy Duodecim.

Heikkilä O., Susi P., Stanway G. & Hyypiä T. 2009. Integrin α V β 6 is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9. *Journal of General Virology* 90; 197-204.

Heino J. & Vuento M. 2010. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. WSOY. Porvoo. 2.painos.

Hendry E., Hatanaka H., Fry E., Smyth M., Tate J., Stanway G., Santti J., Maaronen M., Hyypiä T. & Stuart D. 1999. The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. *Structure* December 1999, 7:1527-1538.

Jaianand K., Saravan N., Gunasekaran P. & Sheriff AK. 2011. Development of a new method for diagnosis of Group B Coxsackie genome by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 29:2; 110-117.

Karttunen, Åse. 2010. The Role of Integrins in enterovirus infections and in metastasis of cancer. *Turun yliopisto*.

Lauring A. & Andiano R. 2010. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens*, Vol 6: issue 7.

LGC Standards. 2011. Saatavilla: <http://lgcstandards-atcc.org/Default.aspx?base> Viitattu 26.7.2011.

Macherey-Nagel. 2008. PCR clean-up, Gel extraction. User Manual NucleoSpin® Extract II.

Marsh M. & Helenius A. 2006. *Virus Entry: Open Sesame*. Cell 124; 729-740.

McWilliam Leitch, E.C., Harvala H., Robertson I., Ubillos I., Templeton K. & Simmonds P. 2009. Direct identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and sequencing of the VP1 region. *Journal of Clinical Virology* 44 (2009) 119-124.

PB Learning. Saatavissa: <http://classworkprojects.blogspot.com/2008/11/human-viruses.html> Viitattu 20.7.2011.

Picornaviridae Home. Saatavissa: <http://www.picornaviridae.com> Viitattu 20.7.2011.

RT PCR. Saatavilla: <http://www.rtpcr.co.uk/rt-pcr.html> Viitattu 26.7.2011.

Solunetti. 2006. Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/> Viitattu 20.5.2011.

Suominen I., Pärssinen R., Haajanen K. & Pelkonen J. 2010. *Geenitekniikka*. Turun ammatti-korkeakoulu. Saarijärvi.

Tuomi, Heidi. 2011. *Soluviljely*. Luentomateriaali.

Ulmanen I., Tenhunen J. & Yläne J. 2004. *Geeni ja biotekniikka*. WSOY. Porvoo. 6. painos.

Viral Zone. Saatavissa: http://www.expasy.org/viralzone/all_by_species/33.html Viitattu 24.5.2011.

6X DNA Loading Dye



CERTIFICATE OF ANALYSIS

6X DNA Loading Dye

#R0611 5 x 1 ml

Lot:

Store: at room temperature or at 4°C for periods up to 12 months. For longer periods, store at -20°C.

In total 5 vials.

ISO | ISO
9001 | 14001
www.fermentas.com

Description

6X DNA Loading Dye is used for loading DNA markers and samples on agarose or polyacrylamide gels. It contains two dyes, bromophenol blue and xylene cyanol FF, for easy visual tracking of DNA migration during electrophoresis.

Composition

10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol 60 mM EDTA.

Note

- In 1% agarose gels bromophenol blue comigrates with ~300 bp fragment and xylene cyanol FF – with ~4000 bp fragment.
- Add 1/6 volume of 6X DNA Loading Dye to your DNA sample.

Quality authorized by:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jurgita Zilinskiene".

Jurgita Zilinskiene

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.fermentas.com for Material Safety Data Sheet of the product.

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder



CERTIFICATE OF ANALYSIS

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus

#SM1332 1250 (25x50)µg

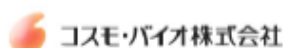
(for 2500 applications)

Lot:

Concentration: 0.5µg/µl
Supplied with: 10x1ml 6X Loading Dye Solution

Store at -20°C.

In total 35 vials.



Description

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus is designed for the sizing and quantification of DNA fragments in agarose gels.

The Ladder is composed of fifteen chromatography-purified individual DNA fragments (in base pairs): 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 75. It contains three reference bands (5000, 1500 and 500 bp) for easy orientation.

The Ladder is dissolved in TE buffer.

Storage Buffer (TE buffer)

10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1mM EDTA.

6X Loading Dye Solution

10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60mM EDTA.

QUALITY CONTROL ASSAY DATA

Well-defined bands are formed during agarose gel electrophoresis.

The absence of nucleases is confirmed by a direct nuclease activity assay.

Quality authorized by:

Jurgita Zilinskiene

Protocol For Loading

Prepare a loading mixture for the 5mm agarose gel lane*:

DNA Ladder	1µl
6X Loading Dye Solution	1µl
Deionized water	4µl
	6µl

Step 1: Mix gently

Step 2: Load on the gel

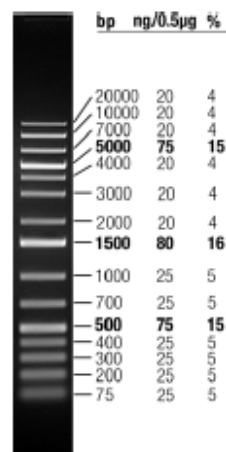
*For gels with other lane widths, the components of the mixture should be scaled either up or down. Use 0.2µl (0.1µg) of DNA Ladder per 1mm of lane.

Recommendations

- Do not heat before loading.
- Dilute your DNA sample with the 6X Loading Dye Solution (#R0611, supplied with the Ladder): mix 1 volume of the dye solution with 5 volumes of the DNA sample;
- Load the same volumes of the DNA sample and the DNA Ladder;
- For quantification, adjust the concentration of the sample to equalize it approximately with the amount of DNA in the nearest band of the Ladder.
- Visualize DNA by staining with ethidium bromide or with SYBR® Green I.



GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus



1% TopVision™ LE GQ Agarose (#R0491),
0.5µg/lane, 8cm length gel, 1X TAE, 7V/cm, 45min

Note. Formation of diffused bands of small DNA fragments is a feature of agarose gel electrophoresis.

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

Please refer to www.fermentas.com for Material Safety Data Sheet of the product.

(1) Revised 10.11.2006

Integriinien sitoutumiskokeen tulokset

Multiscan			Viktor	
Näyte	$\alpha V\beta 6$	ei integriiniä	$\alpha V\beta 6$	ei integriiniä
1:50 08-ARGD/1	0,129	0,101	0,123	0,100
1:50 08-ARGD/4	0,153	0,224	0,146	0,214
1:50 08-ARGD/8	0,117	0,073	0,107	0,068
1:50 08-ARGD/12	0,145	0,076	0,137	0,072
1:10 08-ARGD/1	0,128	0,208	0,120	0,195
1:10 08-ARGD/4	0,135	0,242	0,128	0,229
1:10 08-ARGD/8	0,294	0,103	0,287	0,101
1:10 08-ARGD/12	0,119	0,081	0,113	0,078
1:50 08-ACAV/1	0,465	0,104	0,456	0,102
1:50 08-ACAV/4	0,425	0,081	0,417	0,078
1:50 08-ACAV/8	0,634	0,128	0,621	0,125
1:50 08-ACAV/12	0,408	0,081	0,401	0,075
1:10 08-ACAV/1	0,853	0,080	0,841	0,073
1:10 08-ACAV/4	1,000	0,069	0,980	0,065
1:10 08-ACAV/8	1,037	0,091	1,102	0,090
1:10 08-ACAV/12	0,958	0,077	0,949	0,074
Kontrolli	0,136	0,071	0,134	0,068