

Opinnäytetyö (AMK)

Biotekniikka insinööri AMK

NBIOTS13

2017

Salli Orvokki Leimu

HERPESVIRUSINFEKTIOISSA ERITTYVIEN EKSOSOMIEN PUHDISTUKSEN OPTIMOINTI JA NIIDEN KARAKTERISOINTI

Salli Orvokki Leimu

HERPESVIRUSINFEKTIOISSA ERITTYVIEN EKSOSOMIEN PUHDISTUKSEN OPTIMOINTI JA NIIDEN KARAKTERISOINTI

Eksosomit ovat solujen erittämiä kalvopäällysteisiä vesikkeleitä, jotka kuljettavat erilaisia proteiineja ulos soluista. Ne voivat kulkeutua veren mukana muualle elimistöön infektoituneelta alueelta, jolloin ne saattavat joko edistää tai hidastaa infektion leviämistä. Eksosomit saattavat antaa muille terveille soluille varoitussignaaleja reseptoriensa kautta, jolloin ne voisivat käynnistää immuunipuolustusvasteen. Jos näin olisi, eksosomit estäisivät infektion leviämistä. Toinen mahdollisuus on, että virukset kulkeutuvat eksosomien sisällä veren mukana elimistöön aiheuttaen tulehduksen muualle kudokseen. Infektion aikana erittyneet eksosomit saattavat sisältää informaatiota infektion leviämisestä kudoksessa. Niiden sisältämät proteiinit ovat peräisin infektoituneista soluista, jolloin solut ovat käyttäneet eksosomeja ”roskakuskeinaan”. Eristetyistä infektion aikana muodostuneista eksosomeista voidaan tutkia niiden roolia HSV-1-virusinfektioissa

Eksosomien ja HSV-1 eli Herpes Simplex tyypin 1 viruksien erottaminen toisistaan voimakkaan sentrifugoinnin jälkeen on haastavaa, ehkä jopa mahdotonta. Tätä tukee aikaisempi tutkimus, jossa eksosomeja ja viruksia ei aluksi saatu erilleen. Eksosomit aiheuttavat kontaminaation virusvalmisteita valmistettaessa viruspuhdistuksen yhteydessä. Viruspuhdistuksessa virukset erotetaan suodatuksilla ja sentrifugoimalla. Eksosomit ja HSV-1-virukset ovat lähes samankokoisia, jolloin ne eivät erotu kokoon perustuvassa suodatuksessa. Lisäksi molemmilla on kalvomainen ulkokuori, jolloin niiden painautuessa toisiinsa sentrifugoinnissa ne saattavat tarttua toistensa membraaneihin kiinni.

Virusvalmisteita käytetään muun muassa tutkimuskäyttöön ja niiden kontaminoituminen saattaa olla suuri riski tutkimuksen onnistumiselle. Eksosomien sisällä voi kulkeutua erilaisia proteiineja tai jopa viruksen proteiineja. Tutkimukseen kuulumattomien proteiinien vapautuminen eksosomeista saattaa antaa virheellisiä tuloksia. Varmempien tutkimustulosten, sekä virusdiagnoosiin parantamiseksi tulisi ensisijaisesti valmistaa puhtaita virusvalmisteita.

Eksosomit ja HSV-1-virukset erotettiin kasvatusmediumista, HSV-1-infektoitujen solujen päältä. Eksosomien ja HSV-1 virusten erottamiseen toisistaan kokeiltiin ensin kaupallista eksosomien eristysreagenssia. Tämä menetelmä todettiin huonoksi ja samalla huomattiin, että HSV-1-virukset ja eksosomit saattavat olla kiinni toisissaan. Menetelmää piti muuttaa niin, ettei viruksia ja eksosomeja painettaisi tiiviisti yhteen missään puhdistusvaiheessa. Puhdistusmenetelmän optimoinnin tuloksena HSV-1-virukset ja eksosomit saatiin erotettua toisistaan soveltamalla perinteistä viruspuhdistusta eksosomien erottamiseen näytteestä. Lopullisena puhdistusmenetelmänä käytettiin tiheysgradienttisentrifugointia, jolla partikkelit saatiin erotettua toisistaan kokonsa ja molekyyllipainonsa mukaan.

ASIASANAT:

Herpes simplex virus, eksosomi, tiheysgradientti, viruspuhdistus, infektiivisyys, optimointi

Salli Orvokki Leimu

PURIFICATION PROCESS OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF EXOSOMES SECRETED DURING HERPES SIMPLEX VIRUS INFECTION

Exosomes are small membrane-covered vesicles secreted by all cells. One of the most important tasks of exosomes is to transport proteins out of the cells. Exosomes can be carried elsewhere from an infected area by blood circulation in which case they either promote or slow down the spreading of the infection. Exosomes may give warning signals through their receptors to other healthy cells, thus trying to trigger an immunological antiviral response. If exosomes can do that, they could prevent the spreading of the infection efficiently. The other possibility is that the proteins of the viruses inside exosomes are conveyed to other parts of the body causing inflammation or preparing the target cells for virus infection.

Exosomes secreted during and HSV-1 virus (Herpes Simplex virus type 1) infection may contain information of the ongoing infection in the tissue. The proteins they contain are from infected cells in which case the cells have used exosomes as their refuse collectors. The role of the exosomes in HSV-1 infections can be studied using the isolated exosomes formed during an infection.

Separating exosomes and HSV-1 viruses from each other after intense centrifugation is challenging and perhaps even impossible. This problem has been discovered previously in a study of exosomes separated from viruses. Exosomes cause contamination when virus stocks are prepared using the virus preparation method. In virus preparation viruses and other particles are separated by filtrations and centrifugations. Exosomes and HSV-1 viruses are almost similar in size, which is why they are not separated by size-based filtration. Furthermore, both have a membrane-like outer covering which may cause them to adhere to each other's membranes during centrifugation.

The virus stocks are used for research purposes and contamination may seriously risk the success of the study. There are different proteins inside the exosomes, such as virus proteins, which are carried out of the cell. The liberation of proteins from the exosome may distort the results of the research. To achieve reliable results, exosome and virus detection should be performed with pure virus stocks.

The source of the HSV-1 viruses and exosomes was a growth medium of HSV-1 infected cells. Exosome separation was first attempted with a commercial reagent. This method was found to be unusable and it was also noticed that HSV-1 viruses and exosomes can attach to each other. By optimizing the purification method HSV-1 viruses and exosomes could be distinguished from each other. A density gradient method in which the particles were distinguished from each other according to their size and molecular weight was used as the final purification method.

KEYWORDS:

exosome, Herpes simplex virus, infection, infectivity, optimization, characterization, exosome isolation, density gradient method

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	8
2 EKSOSOMIT KONTAMINOIVAT VIRUSNÄYTTEEN	10
2.1 Aikaisemmat viruspuhdistusmenetelmät eivät ole tuottaneet puhtaita virusvalmisteita	10
2.2 Viruspuhdistus	11
2.3 Viruspuhdistuksen parantaminen	11
2.4 Eksosomien eristäminen	12
3 HERPES SIMPLEX-VIRUS	13
3.1 HSV-1 rakenne	13
3.2 HSV-1 viruksen elämänkaari	14
3.2.1 Latenssi	15
4 EKSOSOMI	17
4.1 Endosomien toiminta ja eksosomien muodostuminen	17
4.2 Eksosomien tehtävät	20
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	22
5.1 Laitteet ja reagenssit	22
5.1.1 BCA proteiinimääritys	22
5.1.2 Western-blot laitteet ja reagenssit:	22
5.1.3 Virusplakkititraus	24
5.2 Työn vaiheet	24
5.2.1 Solujen infektointi	24
5.2.2 Solujen käsittely	25
5.2.3 Solumediumin puhdistus	26
5.3 Virus ja eksosomipuhdistus	26
5.3.1 Konsentroidi	26
5.3.2 Tiheysgradienttimenetelmällä puhdistaminen	27
5.3.3 Eksosomien ja virusten erottaminen toisistaan	29
5.4 Tulosten karakterisointi	29
5.4.1 BCA proteiinimääritys	29

5.4.2 Western-blot geeliajomenetelmä	30
5.4.3 Virusplakkititraus	35
6 TULOKSET	37
6.1 Tiheysgradienttimenetelmä	37
6.1.1 BCA proteiinimääritys	38
6.1.2 Western-blot	39
6.1.3 Virustitraus	41
7 TARKASTELU JA LOPPUPÄÄTELMÄT	43
7.1 Mahdolliset riskit ja menetelmän parantaminen	44
8 LÄHTEET	45

LIITTEET

Liite 1. BCA proteiinimäärityksen pipetointitaulukko

KUVAT

Kuva 1 Herpes simplex virus tyypin 1 rakenne	14
Kuva 2 Eksosomien muodostuminen endosomeissa. Piirretty käyttäen apuna lähdettä (Stoorvogel 2013)	19
Kuva 3. OptiPrep-tiheysgradientin valmistusprosessi	28
Kuva 4 Tiheysgradienttimenetelmässä muodostuneet vyöhykkeet ovat silmin nähtävissä	37
Kuva 5 HSV-1 näytteiden ja fraktioiden BCA proteiinimäärityksen tulokset pylväskuvaajana. Absorbanssi 562 nm	38
Kuva 6 Infektoimattomien näytteiden ja fraktioiden BCA proteiinimäärityksen tulokset pylväskuvaajana. Absorbanssi 562 nm	39
Kuva 7 HSV-1 fraktiot ja puhdistusvaiheet Western-blot membraanikuvassa.	40
Kuva 8 HSV-1 infektoitujen fraktioiden eksosomit.	40
Kuva 9 Infektoimattomien näytteiden eksosomit Wester-blot membraanilla	41
Kuva 10 Näytteiden ja fraktioiden infektiivisyys pfu/ml pylväskuvaajana	42
Kuva 11 Plakkititraus. Virusplakit valmiina laskettavaksi	42

TAULUKOT

Taulukko 1 Konsentroinnin vaatimat sentrifugoinnit	Virhe. Kirjanmerkkiä ei ole määritetty.
Taulukko 2 HSV fraktioiden Western-blot näytteiden valmistus	32
Taulukko 3 Infektoimattomien fraktioiden näytteiden valmistus	32
Taulukko 4 BCA proteiinimäärityksen pipetointitaulukko	1

KÄYTETYT LYHENTEET

BCA= bicinchoninic acid assay, proteiniääritys

HSV-1= Herpes Simplex Virus tyyppi 1

Mock= Infektoimaton solunäyte

1 JOHDANTO

Opinnäytetyön aiheena on eksosomien ja HSV-1(Herpes Simplex Virus type 1) virusten eristäminen toisistaan solukasvatusmediumista. Aihe on saatu Turun yliopiston Biolääketieteen laitoksen virusopin yksikön tutkijatohtori Outi Heikkilältä kesällä 2016. Heikkilä työskentelee Veijo Hukkasen johtamassa Herpesvirustutkimusryhmässä ja toimi opinnäytetyön ohjaajana Turun yliopistolta. Opinnäytetyön aihe tukee virusopin yksikön herpesvirustutkimusryhmän työtä. Eksosomien epäillään kontaminoivan viruskantoja nykyisen viruspuhdistuksen tuloksena. Viruskantojen puhtaus on erittäin tärkeää, jotta niitä käyttävät tutkimukset ovat luotettavia.

Eksosomit ovat soluista ulos erittyviä kalvopäällysteisiä vesikkeleitä. Niiden tehtävä on kuljettaa soluista ulos turhia molekyylejä ja lisäksi ne toimivat solujen välisinä viestinviejinä (Théry 2011). Eksosomien ajatellaan olevan epäpuhtaus puhtaaksi tarkoitetuissa viruskannoissa, sillä ne kulkeutuvat viruspuhdistuksessa HSV-1 viruksen mukana aina valmiiseen virusnäytteeseen saakka. Viruskannan oletetaan aina olevan puhdasta virusta, mutta kannan sisältäessä eksosomeja, niiden osia tai niiden sisältämiä proteiineja, viruskanta ei ole puhdas.

Infektioissa erittyvien eksosomien eristäminen puhdistettavista viruksista antaa mahdollisuuden tutkia eksosomien roolia virusinfektioissa. Eksosomeista voidaan tutkia sisältävätkö ne mahdollisesti viruksen osia, jotka olisivat joutuneet membraanin ympäröimäksi solun sisällä, solun yrittäessä estää viruksen lisääntymistä. Tutkimuksessa selvitettiin, ovatko eksosomien sisällä mahdollisesti olevat viruksen osat infektoivia. Tästä voitiin päätellä eksosomien mahdollisuutta levittää itsessään virusta verenkierron mukana muualle elimistöön. Eristämällä tulehdusympäristössä muodostuneet eksosomit voidaan myös tutkia estävätkö eksosomit infektion leviämistä valmistamalla muut solut tulevaa virusta vastaan. Herpes Simplex Virus 1 hakeutuu latenssiin eli epäaktiiviseksi elimistön hermosolukimppujen tumiin, josta se voi ärsykkeen johdosta aktivoitua uudelleen.

Työssä tavoitteena oli saada optimoituja puhdistusmenetelmä viruksille, jossa myös eksosomit erotetaan viruksista. Mediumista eristetyt eksosomit voidaan tutkia ja selvittää niiden roolia infektiossa. Optimointi aloitettiin käyttämällä kaupallista eksosomieristysreagenssia, jolla eksosomit saataisiin eristettyä virusnäytteestä ja jäljelle jäisi vain puhdasta virusnäytettä. Eksosomieristysreagenssin käytön jälkeen näyte voitiin puhdistaa

perinteisellä viruspuhdistuksella ja eksosomit eivät enää kontaminoisi näytettä. Optimointia seurattiin ottamalla jokaisen puhdistusvaiheen jälkeen näytteitä, jotka karakterisointiin määrittämällä ensin kokonaisproteiinimäärä BCA (bicinchoninic acid assay) proteiinimäärityksellä. Määrityksen tulosten perusteella tehtiin Western blot geelielektroforeesin näytteet ja selvitettiin vasta-aineiden avulla missä näytteissä ilmeni eksosomien ja missä virusten proteiineja. Lisäksi karakterisointiin kuului infektiivisyyden mittaaminen virustitrauksella. Virustitrauksessa B-verosoluja infektoimalla selvitettiin kuinka paljon näytteissä on viruksia ja mikä on näytteen infektiivisyys. Näytteiden karakterisoinnilla nähtiin onko puhdistus onnistunut. Optimointiin kuului menetelmän muokkaaminen, mikäli se ei ole toiminut tavoitteen mukaisesti. Eksosomieristysreagenssin käyttö todettiin käyttökelvottomaksi ja protokolla muutettiin ja pyrittiin eristämään eksosomit ja HSV-1 virukset erilleen muokkaamalla alkuperäisen viruspuhdistuksen protokollaa. Aikaisemmassa tutkimuksessa on herännyt kysymys eksosomien ja virusten kiinnittäytymisestä toisiinsa voimakkaan sentrifugoinnin aikana. Protokollaa optimoidessa otetaan huomioon edellisten tutkimusten havainnot ja pyritään todistamaan havaintoja todellisiksi tai epätodellisiksi.

Käytännön työn lisäksi työssä käsitellään muun muassa eksosomien ja HSV-1 virusten muodostumista, rakennetta ja roolia elimistössä tai aiheuttamia oireita elimistöön joutuessaan. Lisäksi työssä käsitellään eksosomien erittymistä soluista ja niiden tehtäviä soluissa ja niiden ulkopuolella.

2 EKSOSOMIT KONTAMINOIVAT VIRUSNÄYTTEEN

Viruskantoja kerätään muun muassa tutkimusta varten ja osa kannoista voidaan hyväksyttää esimerkiksi rokotteiden kehittämiseen. Viruskantojen valmistuksessa puhtaat solut altistetaan virukselle, jolloin syntyy infektiio. Herpes Simplex tyypin 1 virus monistuu soluissa ja kuroutuu niistä ulos solukasvatusliuokseen. Kasvatusliuos on hyvin ravinnepitoista, jolloin siinä viihtyvät solujen lisäksi myös monet mikrobit. Tästä syystä työ tulee suorittaa aseptisesti eli niin, ettei mikään väline tai itse työ pääse kosketuksiin muiden mikrobien kanssa. Eksosomit ovat soluissa muodostuvia kalvopäälysteisiä vesikkeleitä, jotka voivat kuljettaa sisällään erilaisia proteiineja ja esimerkiksi solun tuottamaa mikroRNA:ta. Viruksen tavoin eksosomit kuroutuvat soluista kasvatusliemeen eli mediumiin.

2.1 Aikaisemmat viruspuhdistusmenetelmät eivät ole tuottaneet puhtaita virusvalmisteita

Solun erittämät eksosomit ovat kalvorakenteeltaan melko samanlaisia kuin vaippapäälysteiset herpesvirukset (Raab-Traub 2011). Viruspuhdistuksessa virukset sentrifugoidaan pelletiksi eli viruspartikkelit tiivistetään astian pohjaan ultrasentrifugilla, jolloin myös eksosomit painuvat pohjaan virusten mukana. Nämä vaippa- ja kalvopäälysteiset mediumin partikkelit, kuten Herpes Simplex Virus ja eksosomit, tarttuvat pelletoinnissa toisiinsa (Deschamps 2016). Niiden erottaminen tämän jälkeen on vaikeaa, ehkä jopa mahdotonta.

Ongelma huomattiin tutkimuksen alussa, jolloin kokeiltiin menetelmää, jossa HSV-1-virukset saataisiin erotettua eksosomeista käyttämällä kaupallista eksosomien eristysreagenssia. Eksosomien tulisi reagenssin ansiosta erottua puhdistustoimenpiteiden jälkeen muista partikkeleista ja voimakkaassa sentrifugoinnissa erottuisivat putkien pohjaan. Pellettien liuotuksen jälkeen näytteiden karakterisointivaiheessa huomattiin, että näytteet olivat erittäin infektiivisiä eli näytteet sisälsivät huomattavan määrän infektiivisiä viruksia. Infektiivisyys kasvoi sitä mukaan kuin puhdistus oli edennyt, jolloin oletettiin virusten kuleutuneen näytteisiin kiinnittymällä lipidivaipastaan eksosomien kalvorakenteeseen voimakkaan sentrifugaation aikana.

HSV-1-virusten ja eksosomien kiinnittäytyessä toisiinsa, siirryttiin etsimään toista menetelmää, jolla voitaisiin estää kiinnittyminen. Viruspuhdistuksessa viruksen puhdistukseen

käytetään tiheysgradienttimenetelmää, jota sovellettiin erottamaan samalla eksosomit. Tarkoitus oli löytää optimaalinen menetelmä erotella eksosomit ja virukset toisistaan.

2.2 Viruspuhdistus

Virusvalmistetta valmistetaan infektoimalla nopeasti kasvavia soluja, kuten syöpäsoluja, valmisteeseen haluttavalla viruksella. Infektoituneiden solujen kasvatuksen jälkeen solut ja solujen virusta täynnä oleva kasvatusmedium kerätään talteen. Solut sentrifugoidaan pohjaan ja supernatantti eli pelletin ympärille jäävä mediumi suodatetaan, jotta kaikki ylimääräinen kiintoaine saataisiin poistettua. Voimakkaalla ultrasentrifugoinnilla virukset saadaan pelletoitumaan putkien pohjalle.

Itse viruksen talteenottoon käytetään tiheysgradientti-menetelmää, jossa partikkelit erottuvat kokonsa ja painonsa perusteella.

2.3 Viruspuhdistuksen parantaminen

Työn varsinainen tavoite oli saada eksosomit puhdistettua pois virusnäytteistä, jotta viruskannat olisivat puhtaasti vain haluttua virusta. Tämä voitiin tehdä jättämällä voimakas sentrifugointi pois menetelmästä, jolloin mahdollinen eksosomien ja herpesvirusten yhteen kiinnittyminen voitaisiin estää.

Pelletoinnin pois jättäminen muodosti ongelmaksi näytteen suuren määrän. Mediumia oli tässä tapauksessa kymmeniä millilitroja, kun tiheysgradienttipuhdistukseen saadaan kerralla vain 1-3 ml. Lisäksi tässä pienessä puhdistettavassa näytteessä pitäisi olla paljon haluttua materiaalia, jotta fraktioihin tulisi runsaasti karakterisoitavaa ainesta. Viruksen ja eksosomien konsentraatiota piti siis saada kasvatettua ja tilavuutta pienennettyä.

Ratkaisu ongelmaan oli konsentroida, joka tässä tapauksessa suoritettiin käyttäen hyväksi ultrasuodatusta. Ultrasuodatuksessa tarkoituksena oli poistaa ylimääräinen medium ja konsentroida sen sisältämät virukset ja eksosomit pienempään tilavuuteen. Tärkeää oli, että medium ei mennyt kokonaan suodattimen läpi, sillä silloin suodatuskalvo

kuivuisi ja kalvopäälysteiset eksosomit ja vaipalliset virukset tarttuisivat suodatuskalvoon kiinni. Tämän estämiseksi sentrifugointi suoritettiin hellävaraisesti pieniä aikoja kerrallaan, voimakkuutta pikkuhiljaa kasvattaen. Tuloksena saatiin pieni määrä konsentroitua mediumia. Tiheysgradienttimenetelmää hyväksi käyttäen tästä pienestä määrästä konsentroitua mediumia saatiin eroteltua partikkelit niiden molekyylipainonsa ja kokonsa suhteen.

2.4 Eksosomien eristäminen

Tiheysgradienttipuhdistuksen jälkeen putken neste kerättiin talteen fraktioiksi. Fraktioiden karakterisoinnilla saatiin selvitettyä mitä näkyvät vyöhykkeet putkessa sisälsivät. Tavoitteena oli saada eksosomit ja virukset erotettua eri vyöhykkeisiin putkessa. Onnistumalla eristyksessä voidaan erotettujen eksosomien avulla edistää monia terveydenhuoltoon liittyviä tutkimuksia.

Eristämällä eksosomit viruksista voidaan tarkemmin selvittää eksosomien roolia infektioiden leviämisessä. Eksosomit ovat suuressa osassa solujen välistä kommunikointia, jolloin on myös mahdollista, että eksosomit hidastavat infektioiden leviämistä lähettämällä varoituksia muille soluille (Théry 2011). Eksosomien käyttöä biomarkkereina eli bioindikaattoreita tutkitaan tällä hetkellä runsaasti (Théry 2011; Anderson 2016; Stoorvogel 2013). Niiden spesifistä viestintää tietynlaisille soluille voitaisiin tulevaisuudessa käyttää hyödyksi muun muassa syöpäkasvaimien paikantamisessa tai lääkkeiden kuljetuksessa soluille. Lisäksi voidaan selvittää erittävätkö infektoimattomat ja infektoidut solut erilaisia eksosomeja ja millä tavalla ne eroavat toisistaan.

3 HERPES SIMPLEX-VIRUS

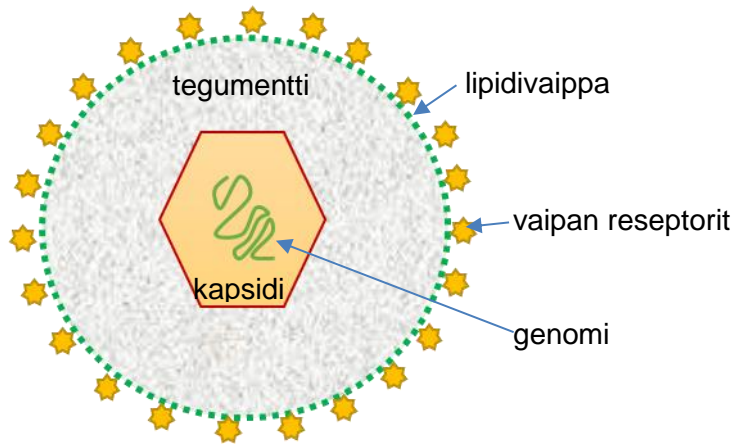
Herpes simplex virus (HSV) tyyppi 1 virus on tunnettu puhekielellä huuliherpesviruksena. Se on rakenteeltaan vaippapäälysteinen DNA-virus, jonka vaipan sisällä on kapsidirakenne. HSV-1-kantajia on noin 60% ihmisistä, osalla huomaamattomasti oireettomana tartuntana. HSV-virukset hakeutuvat latenssiin eli piilevään infektiovaiheeseen hermosolukimppujen neuronien tumaan. Hermosolukimput eli gangliot sijaitsevat ääreishermoston hermosolmuissa, josta virus voi aktivoitua uudelleen jaksollisesti esimerkiksi stressireaktion aiheuttamana aktivoitumisena. Aktivoitumisen jälkeen virus alkaa monistua sen infektoimissa soluissa ja muodostaa yleisimmin iholle ja limakalvoille punoitusta, kutinaa ja rakkulamaisia infektiopesäkkeitä. Limakalvon rakkuloita ilmenee varsinkin suun ja huulien alueella, genitaalialueiden limakalvojen oireet aiheutuvat genitaalierpeksestä HSV-2. Suomalaisen tutkimuksen mukaan HSV-1 voi kuitenkin aiheuttaa genitaalierpesinfektion (Vuorinen 2007). HSV-2 suojaa elimistöä HSV-1 virukselta siten, että HSV-2 tartunnan saanut ei suurella todennäköisyydellä voi infektoitua HSV-1 viruksella. (Välimaa 2013).

HSV tartunta ei ole vakava, mutta se saattaa olla vaarallinen harvinaisissa tapauksissa, joissa infektio pääsee keskushermostoon. Tällä hetkellä tartuntaa hoidetaan valasiklovirillä. (Välimaa 2013)

3.1 HSV-1 rakenne

Herpes Simplex-virus kuuluu alfaherpesviruksiin, sillä HSV pystyy infektoimaan monenlaisia soluja. HSV virusten replikaatiota on tutkittu pitkään erilaisissa olosuhteissa ja erilaisilla soluilla. (Hukkanen 2010)

Viruksena HSV on suurikokoinen vaippapäälysteinen virus, jolla on kooltaan noin 152260 bp:n (base pair) eli emäsparin dsDNA (double-stranded DNA) genomi eli kaksijuosteinen DNA. Genomi on kapsidin sisällä samoin kuin vaipattomilla viruksilla. Lipidi-proteiinivaipan ja viruskapsidin välistä matriksia kutsutaan tegumentiksi (katso kuva 1.). Tegumentti sisältää koodattuja proteiineja, joilla on tehtävänsä viruksen replikaatiossa. (Hukkanen 2010)



Kuva 1 Herpes simplex virus tyypin 1 rakenne

Lipidivaippa on melko samanlainen kuin solujen solukalvot, mutta fosfolipidien ja proteiinien lisäksi ne sisältävät glykoproteiineja B, C ja D. Usein virusten vaipan molekyylit ovat peräisin solusta, josta virukset replikaation jälkeen kulkeutuvat ulos eksosyytosin avulla. Glykoproteiinien avulla vaipallinen HSV virus tarttuu solukalvon reseptoreihin, jotka tunnistavat partikkelin vaarattomaksi. Sen jälkeen HSV kulkeutuu solun sisään solukalvon läpi. Kaikissa soluissa ei ole HSV:n glykoproteiineja tunnistavia reseptoreja, mutta tutkimusten mukaan suurimmassa osassa kudosten soluja on gD (glykoproteiini D) tunnistavia reseptoreja. Päästyään solun sisään HSV alkaa valmistella solua replikaatioon eli virus-DNA:n monistamiseen. (Hukkanen 2010)

Kapsidi sisältää viruksen genomien vapaana sisällään ja suojaa sitä. Herpes Simplex-viruksen kapsidi on malliltaan ikosahedraalinen eli 20-tasokas. Kapsidi rakentuu erilaisista rakenneproteiineista, jotka rakentuvat nukleinihapon ympärille. (Solunetti 2006a)

3.2 HSV-1 viruksen elämänkaari

Primaarisessa tartunnassa HSV tarttuu epiteelisolukon kautta esimerkiksi limakalvojen tai rikkoutuneen ihosolukon läpi. Virus päätyy sensorineuronisolujen aksonien pinnalle, jolloin infektiota tässä vaiheessa kutsutaan perifeeraaliseksi infektioksi. Virus kulkeutuu nopean retrogradisen aksonikuljetuksen avulla hermosolujen keskukseen. Retrogradisessa aksonikuljetuksessa virus kulkeutuu hermosolupäätteestä aksonia pitkin kohti hermosolua (Ochs 2004). Aksonit saattavat ulottua jopa useiden kymmenien senttimetrien päähän itse hermon tumasta (Solunetti 2006b). Ensitartunta johtaa lyyttiseen ja replikoi-

tuvaan infekioon sensorineuronisoluissa, jolloin kapsidin hajotessa viruksen genomi vapautuu infektoituneen solun sisään ja solu ohjataan tuottamaan lisää viruksen DNA:ta replikaatiossa (Hukkanen 2010).

Herpesvirukset ovat DNA viruksia, jolloin replikaatio tapahtuu solun tumassa. dsDNA toimii suoraan templaattina mRNA:lle, jolloin replikaatio tapahtuu solun oman DNA:n monistumisen tavoin. Virus käyttää infektoituneen solun eli isäntäsolun toimintoja hyväkseen esimerkiksi entsyymien ja rakenneproteiinien tuotossa. (Solunetti 2006c)

Solun tuotettua kaikkia viruksen tarvitsemia proteiineja, uuden viruksen kokoaminen alkaa. Kapsidiproteiinit järjestäytyvät kapsidin muotoon itseohjautuvasti. Vaipallisten virusten viimeinen kokoamisen vaihe tapahtuu solun tumän kalvoilla, josta HSV silmukoituu ulos. Silmukoituessaan HSV muodostaa itselleen vaipan, joka sisältää viruksen vaippaproteiineja kuten glykoproteiineja. Tuman solukalvon läpi silmukoitumisen jälkeen HSV siirtyy endoplasmakalvostoon (ER), josta sen vaipan kalvoon siirtyy glykoproteiineja ja vaipan sisään tegumenttiin siirtyy proteiineja. ER:stä HSV siirtyy Golgin laitteen, jossa vaipan proteiinit ja reseptoriproteiinit muokataan valmiiseen muotoonsa. Lopulta valmiit HSV-virukset poistuvat solusta eksosytoosin avulla. Tällöin virukset ovat kypsyneet eli ne ovat eksosytoosin jälkeen infektiivisiä, valmiita viruksia infektoimaan muita soluja. (Whitley, 1998)

Eksosytoosin avulla solusta poistuvat HSV virukset eivät välttämättä heti tapa isäntäsolua. Isäntäsolu tosin kärsii viruksen proteiinien tuottamisesta, mutta saattaa vielä jatkaa virusten tuottoa tuotettujen virusten poistumisen jälkeen. (Solunetti 2006d)

3.2.1 Latenssi

Ensimmäisen infektion jälkeen Herpes Simplex-virus pyrkii neuroniganglioihin eli hermosolukimppuihin latenssiin. Gangliot ovat hermosolmuja, joita on joka puolella ääreishermostossa. Latenssi tarkoittaa piilevää tartuntaa, jolloin virus ei näy ulospäin tartunnan saaneessa henkilössä. HSV kulkeutuu aksoneita pitkin tavoitteenaan saavuttaa ganglio. Ganglion tumassa sen DNA:ta monistuu usein noin 20-30 kertaa hermosolua kohden, jonka jälkeen genomi jää neuronien sisään. Genomi muodostuu ympyräakenteiseksi, histoniproteiinien ympärille kiertyen, jolloin kaksijuosteisen DNA:n päät liittyvät yhteen. HSV voi pysyä latenssissa pitkiäkin aikoja, kunnes ärsyke kuten shokki tai stressi laukaisee sen uudestaan. (Hukkanen 2010)

HSV:n uudelleen aktivoitumisen syytä ei vielä ole selvitetty, mutta esimerkiksi voimakkaat stressireaktiot, liiallinen auringonvalo tai heikentynyt immuunivaste saattavat aktivoida viruksen latenssista. Uudelleen aktivoitumista on tutkittu paljon käyttäen hyväksi hiirikokeita, mutta hiirillä spontaania uudelleen aktivoitumista tapahtuu harvemmin kuin ihmisillä (Hukkanen 2010). Spontaanilla tarkoitetaan ilman ärsykettä aktivoitunutta virusta.

4 EKSOSOMI

Solujen sisällä endosomeissa muodostuu kalvopäälysteisiä mikrovesikkeleitä ja eksosomeja. Eksosomit löydettiin ensimmäistä kertaa 30 vuotta sitten, jonka jälkeen seuraavat 10 vuotta niiden tutkiminen oli melko vähäistä. Vasta nyt 2000-luvulla kiinnostus eksosomeja kohtaan on noussut. Tutkimusten myötä eksosomien erilaisia tehtäviä on saatu selville. Eksosomit ovat suuressa roolissa solujen välisessä kommunikoinnissa ja lisäksi niiden yksi tärkeimmistä tehtävistä on kuljettaa solusta ulos tarpeettomia tai haitallisia proteiineja. Eksosomit ovat kooltaan 30-100 nm kokoisia, jolloin koko rajoittaa myös sen sisällä olevien proteiinien ja muiden solusta ulos kuljetettävien partikkelien kokoa. (Théry 2011)

Eksosomeja erittyy kaikista tutkituista elävistä soluista kuten esimerkiksi lihaskudoksen soluista, epiteelisoluista ja neuroneista. Myös immuunipuolustukseen kuuluvien solujen, kuten dendriittisolujen on havaittu erittävän eksosomeja (Anderson 2016). Soluista ulos erittyneet eksosomit voivat kiinnittyä toisiin soluihin niiden membraanien pinnalla olevien spesifisten reseptorien avulla. Eksosomit voivat myös kulkeutua verenkierron mukana elimistössä ja siksi niitä löytyykin miltei kaikista elimistön nesteistä ja eritteistä. Muun muassa verestä, syljestä, plasmasta, virtsasta, aivojen nesteestä ja seerumeista on eristetty eksosomeja. (Raab-Traub 2011)

Eksosomeja eristetään ja puhdistetaan erilaisilla menetelmillä, joita on saatavissa jo kaupallisina eristysreagensseina. Kitit eivät kuitenkaan aina sovellu tarkoitukseensa. Esimerkiksi tässä työssä eksosomieristysreagenssin käytössä vaadittavaa menetelmää ei voitu käyttää eksosomien ja HSV-1 virusten puhdistamiseen ja eristämiseen toisistaan.

4.1 Endosomien toiminta ja eksosomien muodostuminen

Solujen sisällä on soluelimiksi kutsuttuja osia, joiden avulla solu pystyy ohjaamaan toimintojaan. Endosytoosissa solu ottaa sisälleen materiaalia ulkopuolelta muodostaen solukalvoonsa solun sisäänpäin kuroutuvan kuopan. Tämä materiaalin solun sisään ottaminen voi tapahtua monella tapaa, mutta yleisimmin se tapahtuu klatriini-proteiinin

avulla. Kuopan muodostamisessa on solun sisäpuolella apuna klatriinia. Se taivuttaa solukalvoa kaarelle solun sisään ja rakkula irtoaa dynamiinin avulla solukalvosta. Klatriini jää ympäröimään rakkulaa sen pinnalle. Solun sisälle muodostuneesta rakkulasta irtoaa klatriiniproteiini ja se kierrätetään uudelleen. Tällä tavalla solu ottaa sisäänsä muun muassa kolesterolia (LDL) sekä rautaa. (Solunetti 2006e)

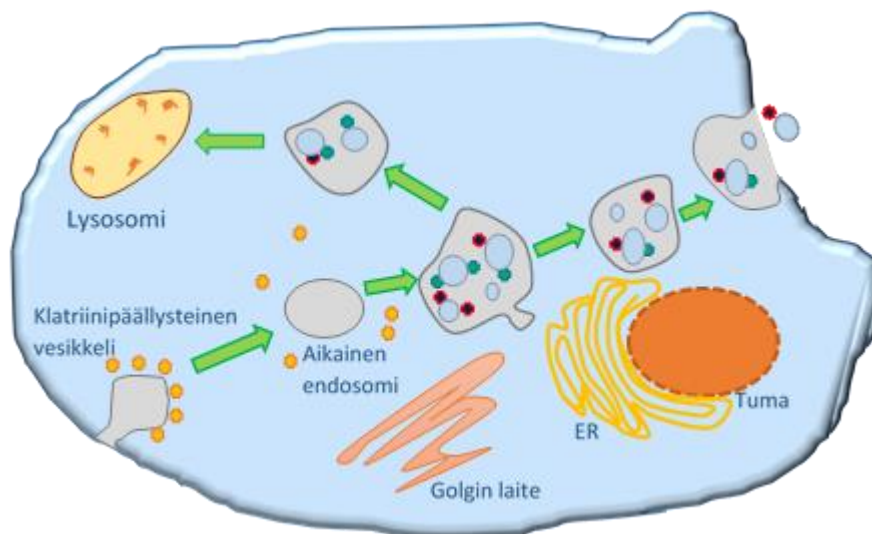
Endosytoosissa valmistuneet rakkulat eli varhaiset endosomit yhdistyvät myöhäiseksi endosomiksi, jossa eksosomit ja muut vesikkelit muodostuvat. Liittyminen myöhäisiin endosomeihin tapahtuu SNARE-proteiinien (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors) aloitteesta. SNARE-proteiinit esiintyvät kalvorakkuloissa aina pareina, joiden irrotessa muut SNARE-proteiinit voivat tarttua niin sanottuun vapaaseen proteiiniin ja rakkulat yhdistyvät. (Solunetti 2006e) Varhaisten endosomien tunnistukseen käytetään niiden sisältämää rab5 ja EEA-1 proteiinia. Varhaisten endosomien muuttuessa myöhäisiksi niiden rab5 proteiini korvautuu rab7:ksi. Rab7-proteiinia muodostuu varhaisen endosomin kalvolla. (Raab-Traub 2011) Yhdistyessään varhaiset endosomit muodostavat myöhäisten endosomien monikalvoisen rakenteen. Monikalvoista rakennetta ylläpitää myös solun mikrotubulukset. Endosomit kulkeutuvat mikrotubuluksia pitkin kohti solun tumaa. (Solunetti 2006e)

Myöhäisten endosomien pH on alhaisempi kuin varhaisten endosomien, joka aiheuttaa proteiinien reseptorien irtoamisen proteiinin saapuessa myöhäiseen endosomiin. Myöhäisessä endosomissa ulos kuroutuvista ulokkeista lähtee erillisiä rakkuloita, jotka kuljettavat proteiineja ja reseptoreita solukalvolle. Myöhäiset endosomit ovat hajottavia soluelimiä ja ne tarvitsevat molekyylien pilkkomiseen hajottavia entsyymejä. Entsyymit kulkeutuvat myöhäisiin endosomeihin Golgin laitteesta, jossa ne ovat pakattuina klatriinipääällysteisiin kuljetusrakkuloihin. Kuljetusrakkulat löytävät tiensä myöhäiselle endosomille mannoosi-6-fosfaattireseptorin (M6PR) avulla, joita voidaan käyttää myös endosomien tunnistamiseen. M6PR irtoaa yhdistyessä endosomiin ja se kierrätetään Golgin laitteessa.

Myöhäisten endosomien kalvot muodostuvat 50% LAMP-lipideistä (lysosomal associated membrane protein), jotka suojaavat sitä hajottavilta entsyymeiltä sekä pitää huolen, ettei hajottavat entsyymit pääse muualle soluun. Myöhäisten endosomien kalvoraakenne sisältää myös harvinaisempia lipidejä, lysobisfosfatidihappoja (LBPA), joita tavaataan vain jyrkästi kaareutuvilla kalvoilla (Solunetti 2006f). Endosomien sisällä olevat hajottavat entsyymit eivät pysty hajottamaan kaikkia molekyyliä eksosomien ja muiden

vesikkelien sisällä ulos kuljetettavaksi. Sen vuoksi myöhäiset endosomit yhdistyvät lysosomeihin luovuttaakseen jäljelle jääneet materiaalit hajotettavaksi. (Solunetti 2006f)

Golgin laitteen tehtävä on pakata ja muokata tuotettuja proteiineja ulosvietävään muotoon. Tumassa mRNA:n mukaan valmistuneet proteiinit matkaavat endoplasmakalvoston (ER) läpi Golgin laitteeseen. Golgin laitteessa proteiinit pakataan kalvorakkulan sisään ja rakkula matkaa kohti lysosomeja, solukalvoa tai myöhäisiin endosomeihin eritettäväksi eksosomien sisällä. Golgin laitteesta tulevat rakkulat tunnistavat myöhäiset endosomit reseptoriensa avulla ja luovuttavat sisältämänsä proteiinit endosomin sisään. Endosomissa proteiinit pakataan kalvopäällysteisien rakkuloiden, vesikkelien ja eksosomien, sisään. Valmiit eksosomit lähtevät kohti solukalvoa tai lysosomia multivesikulaaristen endosomien sisällä (eng. multivesicular endosome, MVE). Multivesikulaarinen endosomi vapauttaa mikrovesikkelit ja eksosomit eksosytoosissa ulos solukalvon läpi solumatriksiin eli väliaineeseen. (Solunetti 2006g)



Kuva 2 Eksosomien muodostuminen endosomeissa. Piirretty käyttäen apuna lähdetä (Stoorvogel 2013)

4.2 Eksosomien tehtävät

Eksosomien on aluksi luultu vain kuljettavan turhia proteiineja ulos soluista, mutta myöhemmin tutkimusten myötä on selvinnyt, että eksosomeilla on merkittävä tehtävä solujen välisessä kommunikoinnissa. Ne voivat muodostumisensa jälkeen liikkua soluvälialueissa tai kulkeutua verenkierron mukana muualle elimistöön. Eksosomeista on alettu kiinnostua muun muassa niiden mahdollisuudesta toimia bioindikaattoreina eli niiden uskotaan tulevaisuudessa osoittavan elimistössä alueet, jotka ovat esimerkiksi altistuneet jollekin vierasaineelle (Théry 2011). Lisäksi eksosomit voisivat bioindikaattoreina lisätä tietoa solujen reagoimisesta vierasaineeseen tai esimerkiksi elimistöön muodostuneeseen syöpäkasvaimeen (Deschamps 2016).

Infektoitunut solu saattaa hajottaa sisällään myös viruksen proteiineja ja vasta-aineita, jolloin ne voivat päätyä eksosomien ulos vietäviksi solusta. Soluvälitilassa eksosomit voivat päätyä muiden solujen sisään reseptoriensa ansiosta endosytoosin avulla, jolloin solu ottaa eksosomin sisäänsä kurouttamalla sen läpi solukalvosta. (Raab-Traub 2011)

Dendriittisolujen tehtävä immuunipuolustuksessa on käynnistää immuunivaste esittelemällä vieraan patogeenin antigeenejä T-soluille. Infektoidusta solusta erittynyt eksosomi saattaa sisältää viruksen antigeenejä, jolloin dendriittisolu tunnistaa vieraan antigeenin ja kiinnittyy eksosomiin. Fagosytoosilla dendriittisolu ottaa eksosomin sisälleen ja tekee tehtävänsä herättäen immuunivasteen vierasta patogeenia vastaan. (Anderson 2016) Eksosomit voivat siis toimia sikäli viruksen infektion leviämistä hidastavina tekijöinä. Eksosomien on kuitenkin todettu läpäisevän esimerkiksi veri-aivoesteen, jonka tarkoitus on suojella keskushermoston neuroneita infektioilta. Eksosomien päästessä esteen läpi se voi tarttua neuronin reseptoriensa avulla (Giebel 2012).

Solujen välinen kommunikointi on yksi eksosomien tärkeimmistä ja tällä hetkellä tutkituimmista tehtävistä. Spekulaatioita siitä, miten eksosomi välittää tietoa solulta toiselle on useita. Eksosomien fuusioituminen kohdesolun solukalvoon ja proteiinien vapauttaminen plasmakalvoon eksosomin sisältä. Kiinnittäytyminen eksosomin reseptoreilla kohdesolun solukalvoon ja solun aktivointi signaalien avulla. Solun sisään kulkeutuminen endosytoosin avulla vapauttaen eksosomin sisältämät proteiinit solun sisään. Lisäksi vapaana olevien proteaasien kyky pilkkoa eksosomien pinnalla olevia suojaamattomia proteiineja, jotka voivat irti pilkkoutumisen jälkeen kiinnittyä kohdesolun reseptoreihin ja aloittaa signaalien lähetyksen solun sisään. (Théry 2011)

Näillä keinoin eksosomien arvioidaan toimivan solujen välisessä kommunikoinnissa David G. Meckersin ja Nancy Raab-Traub in artikkelissa "Microvesicles and Viral Infections". Artikkelissa käsiteltiin mikrovesikkeleiden käyttäytymistä virusinfektioiden aikana (Raab-Traub 2011). Herpesvirusinfektioissa erittyviä eksosomeja nimitetään L-partikkeleiksi ja ne poikkeavat muista vesikkeleistä kuppimaisen muotonsa vuoksi (Dargan, 1997). HSV virukset ovat itsekin kalvopäälysteisiä, jolloin viruksen kalvon eli vaipan membraanirakenne on samankaltainen vesikkelien kalvorakenteiden kanssa. L-partikkelien uskotaan edistävän viruksen patogeeniä, sillä L-partikkelien on huomattu nostavan viruksen replikaatiota infektoidun solun sisällä. (Raab-Traub 2011)

Eksosomien liittymistä elimistön toimintoihin, kuten immuunipuolustukseen tutkitaan yhä aktiivisesti. Tulevaisuudessa eksosomeja saatetaan käyttää syöpähoidoissa muun muassa paikantamaan syöpäkasvainsoluja.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

5.1 Laitteet ja reagenssit

Sentrifuugit:

Eppendorf pöytäsentrifuugi 5415 R

Eppendorf sentrifuugi 5810 R

Ultrasentrifuugi Beckman XPN Preparative, tiheysgradientti-menetelmä: SW 41 Ti Rotor, eksosomivapaan mediumin valmistus: Type 45 Ti Rotor.

Eksosomieristys

Eksosomieristysreagenssi: Invitrogen Total Exosome Isolation #4478359

Puhdistusvaiheet

Suodatus: Nalgene Bottle-Top Filter 0,45 nm, Thermo Scientific

Konsentroidi: Tiedot ovat luottamuksellisia

5.1.1 BCA proteiinimääritys

BCA proteiinimäärityskitti : Pierce, BCA Protein Assay Kit 23227

Inkubaattori : Memmert TAMRO-APTA 90-544 011

Spektrofotometri: PerkinElmer Wallac, Victor 2 1420 Multilabel Counter

5.1.2 Western-blot laitteet ja reagenssit:

Virtalähde: Bio-Rad PowerPac Basic 1645050

Geelielektroforeesilaitte: Bio-Rad MINI-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell

Siirustuslaitte: Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Turun Yliopisto 725 31038)

Membraanin kuvaus: Li-COR Odyssey Fc Imaging System

Reagenssit:

Latauspuskuri: 4X Protein Loading Buffer: Li-COR 928-40004

Täytepuskuri: TRIS 0,5M pH 6,8

proteiinistandardi: Cameleon Duo Li-COR P/N 928-60000

Ajopuskuri geelielektroforeesissa: TRIS/Glysiini/SDS puskuri

Siirrospuskuri: TRIS/Glysiini/metanoli puskuri 700 ml MilliQ vesi, 100 ml 10xTransfer Buffer ja 200 ml metanolia.

vasta-aineet:

CD81 5A6 Santa Cruz sc-23962 Mouse monoclonal

CD63 H-193 Santa Cruz sc-15383 rabbit polyclonal IgG

HSV ICP5 Virusys Corporation HA018-100 Monoclonal

HSV-1 gD DL6 Santa Cruz sc-21719 mouse monoclonal

Alix Abcam ab117600 Monoclonal

TSG101 Abcam ab30871 rabbit polyclonal

Sekundäärivasta-aineet:

Li-COR IRDye 800CV Goat anti-Rabbit LOT: C50602-05

Li-COR IRDye 680RD Goat anti-Mouse LOT: C50408-03

Western-blot tarvikkeet:

Geelit: Bio-Rad Mini-PROTEAN TGX Gels CAT 456-9033

Membraani: GE Healthcare Life Science, Amersham Protran 0.2 μ m NC #10600001, Saksa

Siirropaperi: Bio-rad Extra thick blot paper #1703967

5.1.3 Virusplakkititraus

B-Vero-solujen infektiio- ja kasvatusmediumit:

kasvatusmediumi: DMEM+ 7% inaktivoitu FBS+ IgG

IgG: Subcuvia 160 g/l Immunoglobulin LOT:VNG1L044

infektiomediumi: RPMI +0,1 % BSA +gentamysiini (200 ppm)

5.2 Työn vaiheet

Infektioonin jälkeen solumedium ja itse solut otettiin talteen ja käsiteltiin. Eksosomien puhdistaminen viruksista suoritettiin mediumin puhdistusvaiheiden jälkeen tiheysgradienttimenetelmällä.

Koko työ suoritettiin aseptisesti työskennellen laminaarivirtauskaapissa. Ennen työn aloitusta kaappi puhdistettiin 70 % etanolilla huolellisesti pyyhkien sekä 20 minuutin ultraviolettisäteilytyksellä. Kaikki käytettävät välineet puhdistettiin etanolilla ennen kaappiin siirtämistä. Työskentelyssä otettiin huomioon, että virus on myös ihmiselle haitallinen ja noudatettiin erityistä huolellisuutta. Infektoimattomat näytteet käsiteltiin aina ensimmäiseksi, jotta näytteet eivät kontaminoi toisiaan.

5.2.1 Solujen infektointi

HaCat-solut ovat ihmisen epiteelisolukon jatkosolulinja, jota käytetään usein tutkimuksissa niiden nopean kasvun vuoksi. Myös muita solulinjoja on mahdollista käyttää kuten HeLa- tai T98G-soluja (Heikkilä 2016). HaCaT solut kasvatettiin isoissa solukasvatuspulloissa ”rollereissa”, 1 pullo puhtaille soluille ilman infektiota ja 1 pullo HSV-1 infektoiduille soluille.

Työssä käytetyt solukasvatusmediumit valmistettiin eksosomivapaiksi ultrasentrifugamalla (12 h/ 100 000 g/ +4 °C, roottorilla 45Ti) eksosomit mediuumeista pohjalle, jolloin

supernatantti oli eksosomivapaata mediumia. Eksosomivapaan mediumin käyttö varmistaa, että kaikki eksosomit näytteissä olivat peräisin käytetyistä HaCaT soluista, eivätkä mediumiin käytetystä seerumista.

Solut pestiin ensin kahdesti PBS (phosphate buffered saline) käyttöliuoksella, jotta kasvatusmedium saataisiin pois ja laitettua tilalle eksosomivapaata infektiomediumia. Pesun jälkeen HaCaT-pulloihin lisättiin 20 ml eksosomivapaata infektiomediumia (2% FBS inaktivoitu, DMEM ja gentamysiini). HSV-1 viruslaimennos valmistettiin lisäämällä 2 µl virusnäytettä, jonka infektiivisyys oli laskettu olevan 4×10^9 pfu/ml, 198 µl:aan eksosomivapaata infektiomediumia. 1:100 laimennos suspensoitiin käyttäen vortexia. Viruslaimennosta lisättiin infektoitavaan HaCaT-pulloon 16,5 µl eli tehtiin 0,01 MOI:n infektointi. Pullot vietiin +35°C huoneeseen inkuboitaviksi 1,5 tunniksi.

Inkuboinnin jälkeen pulloihin lisättiin vielä 20 ml eksosomivapaata infektiomediumia ja pullot siirrettiin +35°C huoneeseen 48 tunniksi.

5.2.2 Solujen käsittely

Solujen päältä mediumit otettiin ensin talteen. Solumatot pestiin ensin PBS-käyttöliuoksella, jonka jälkeen ne raaputettiin irti siihen tarkoitettulla välineellä. Solujen irrotuksen jälkeen ne suspensoitiin 10 ml PBS liuosta ja siirrettiin omiin "Mock"- ja "HSV"-merkatuihin 15 ml:n putkiin. Solut sentrifugoitiin pöytäsentrifuugilla 5 min/ 300 g / +4 °C. Supernatantti pipetoitiin varoen pois ja jäljelle jäi solupelletti putken pohjalle.

Solupellettiin suspensoitiin 500 µl soluhajotusmediumia eli lysis-mediumia ja siirrettiin 2 ml:n putkiin. Hajotusmediumin lisäyksen jälkeen näytteitä inkubointiin jäillä 5 min. Inkuboinnin jälkeen näytteet sentrifugoitiin 10 min/1400 g/+4 °C, jotta hajoneiden solujen osat painautuisivat putken pohjalle ja supernatanttiin jäisi tutkittavat proteiinit. Supernatantti otettiin pipetillä varovasti nestepinnasta talteen ja otettiin näyte numero 5. Näytteitä otettiin jokaisen puhdistusvaiheen jälkeen, jotta karakterisointivaiheessa näkyisi kuinka tehokkaasti puhdistusmenetelmä toimi.

5.2.3 Solumediumin puhdistus

Inkuboinnin jälkeen solumediumit kaadettiin varovasti 50 ml:n putkiin, HSV-infektoidut ja infektoimattomat mediumit erikseen. Puhdistamattomasta mediumista otettiin välissä näyte 1.

Ensimmäisessä mediumin puhdistusvaiheessa mediumit sentrifugoitiin pöytäsentrifuugilla 10 min / 300 g /+4 °C, tarkoituksena saada suuremmat partikkelit pois mediumista. Supernatantti kerättiin talteen varovasti pipetoiden, pohjalle jäi näkyvä pelletti. Tässä vaiheessa otettiin välissä näyte numero 2.

Sentrifugoidut mediumit suodatettiin 0,45 µm suodattimella (Nalgene Bottle-Top Filter, Thermo Scientific). Suodattimen huokoskoko valittiin niin, että sekä virukset että eksosomit läpäisivät suodattimen kalvon ja päätyivät suodatettuun mediumiin. Mikäli olisi käytetty 0,2 µm suodatinta, virukset ja osa eksosomeista olisivat saattaneet jäädä suodattimen kalvoon. Otettiin näyte 3.

5.3 Virus ja eksosomipuhdistus

Eksosomipuhdistus toimii pääasiassa samalla tavalla kuin viruspuhdistus, mutta sentrifugoinnilla virusten pelletointi jätettiin pois. Tilalla käytettiin konsentroitintia, jolla näytteen konsentraatio saatiin kasvamaan ilman pohjaan pelletointia. Menetelmässä oletettiin, että pelletointi estäisi eksosomien ja virusten erottamisen jälkeensä.

5.3.1 Konsentrinti

Konsentrinti tehtiin korvaamaan pohjaan sentrifugointi, jossa virusten ja eksosomien oletettiin kiinnittyvän toistensa kalvorakenteisiin. Konsentroidulla näyte saatiin pienennettyä näytteen tilavuutta ja nostettua konsentraatiota.

Konsentroidin yksityiskohdat ovat luottamuksellisia.

5.3.2 Tiheysgradienttimenetelmällä puhdistaminen

Virusten ja eksosomien eristämiseen ja erottamiseen toisistaan käytettiin tiheysgradienttimenetelmää, jossa tihein neste on gradienttiputken pohjalla ja kevyempi neste pinnalla. Tiheyden pitäisi muuttua putkessa tasaisesti, jotta erikokoiset ja painoiset partikkelit näytteessä erottuisivat tiheyksien perusteella. Näyte pipetoitiin tiheysgradienttiputken nesteen päälle ja ultrasentrifugoitiin käyttäen roottoria SW 41 Ti 1,5 h/ 21 000 rpm/ +4 °C. Ultrasentrifugoinnin aikana keskipakovoima sai näytteen partikkelit liikkumaan tiheysgradientissa niin pitkälle tiheämpään nesteeseen, että gradientin nesteen tiheys pysäyttää partikkelit. Näytteen partikkelit siis muodostavat oman, joskus jopa silmin nähtävän, vyöhykkeensä putkeen oman tiheydensä kohdalle.

Laminaarivirtauskaappi valmisteltiin gradientin valmistusta varten puhdistamalla kaikki tarvittavat laitteet ja välineet ennen laminaarivirtauskaappiin asettamista. Työhön tarvittiin pumppu ja sen lateksiset letkut, sekä magneettisekoittaja. Lisäksi käytettiin välineitä kuten 50 ml:n putkia, ultrasentrifugointiin sopivia gradienttiputkia, pipettejä ja niiden kärkeä.

Esivalmisteluihin kuului myös gradientin 10 % ja 40 % Optiprep reagenssin valmistus. Valmiista OptiPrep (iodixanol solution D1556, SIGMA-ALDRICH) tiheysgradienttimediumista valmistettiin laimennokset laimentamalla mediumia MNT puskuriin (1M MES, 5M NaCl ja 1M Tris).

10% OptiPrep: 1,35 ml OptiPrep ja 12,15 ml MNT puskuria. Kokonaistilavuus 13,5 ml.

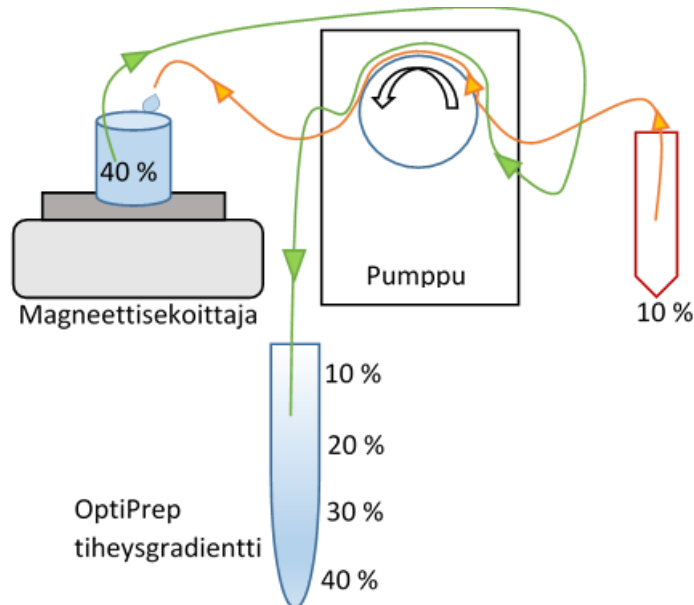
40% OptiPrep : 6,6 ml OptiPrep ja 9,9 ml MNT puskuria. Kokonaistilavuus 16,5 ml.

Yhden tiheysgradienttiputken valmistukseen kuluu 5,5 ml 40% laimennosta ja 4,5 ml 10 % laimennosta.

Laimennoksista valmistettiin yhteensä 3 tiheysgradienttia, mutta vain kaksi parhaiten onnistunutta valittiin virusten ja eksosomien erottamiseen toisistaan. Gradienttiputkien tilavuus oli 10 ml, jolloin gradientin pinnan päälle voitiin vielä pipetoida puhdistettava näyte.

Valmistuksen alettua pumpun läpi kulki kaksi letkua: letku 1 ja 2. Letku 1 toi 10 % OptiPrep-laimennosta 40 % laimennoksen sekaan, joka oli magneettisekoittajan päällä de-

kanterilasissa. Letku 2 imi 40 % laimennoksen dekanterista laimennosta valmiina olleeseen gradienttiputkeen. Kuvassa 3 on kuvattu kuinka gradientin valmistus käytännössä tehtiin.



Kuva 3. OptiPrep-tiheysgradientin valmistusprosessi

Aloittaessa letkuun 1 imettiin 10 % laimennosta niin, että letkun syöttöpäässä oli 4 cm ilman laimennosta. Pumppu pysäytettiin ja letkun 2 imupää asetettiin magneettisekoittajan päällä olleen dekanterilasien pohjalle imemään 40 % laimennosta. Pumppu käynnistettiin ja letkuun 2 kulkeutui ensin pelkkää 40 % laimennosta, joka meni pohjimmaisiksi gradienttiputken pohjalle. Letku 1 alkoi syöttää dekanteriin tasaisesti 10 % laimennosta, jolloin laimennokset sekoittuivat tasaisesti aina niin kauan, että tiheysgradientin päällimmäinen neste oli pelkkää 10 % OptiPrep laimennosta.

Työssä oli tärkeää, että letkun 2 imupää pysyi dekanterilasissa nestepinnan alapuolella ja syöttöpää tiheysgradientin nestepinnan tasassa. Mikäli letkun 2 syöttöpää olisi nestepinnan alapuolella, kerrokset saattaisivat sekoittua toisiinsa. Lisäksi oli tärkeää, että letkun 1 imupää oli koko työn ajan 10 % laimennoksen nestepinnan alapuolella ja syöttöpään tuli olla dekanterin nestepinnan yläpuolella. Valmiit tiheysgradientit pidettiin aina suorassa ja vakaasti, jotta tiheyskerrokset eivät sekoittuneet.

5.3.3 Eksosomien ja virusten erottaminen toisistaan

Valmiiden OptiPrep tiheysgradienttien nestepintojen päälle pipetoitiin varoen näytteet, Mock ja HSV näytteet omiin putkiinsa. Putket asetettiin ultrasentrifugin spin-putkiin ja korkit kiinnitettiin huolellisesti. Ennen ultrasentrifugiin asettamista putket punnittiin saman painoisiksi.

Spin putket asetettiin ultrasentrifugin niille tarkoitettuun roottoriin SW 41 Ti. Roottori asetettiin paikoilleen heiluttamatta putkia ja ultrasentrifugin kansi suljettiin.

Ultrasentrifugiin asetettiin arvot 21 000 rpm tai 54 455 g/1,5h/ 4 °C ja käynnistettiin. Ajon jälkeen tiheysgradienttiputket nostettiin varoen pois spin-sentrifugointiputkista. Muodostuneet vyöhykkeet kuvattiin käyttäen apuna mustaa taustaa sekä kohdevaloa. Gradienttiputkia käsiteltiin huolellisesti heiluttamatta putkia, jotta vyöhykkeet eivät sekoittuneet. Gradientista kerättiin fraktioita talteen 500 µl:n erissä erillisiin numeroituihin Eppendorf-putkiin 1-24. Karakterisoinnilla selvitettiin mitä proteiineja vyöhykkeissä oli ja missä fraktioissa vyöhykkeet olivat

5.4 Tulosten karakterisointi

Fraktioista erotettiin erilliset näytteet karakterisointia varten. Näytteistä selvitettiin proteiinimäärät, joiden avulla valmistettiin Western-blot menetelmän geelille ajettavat näytteet. Western-blot menetelmällä saatiin spesifisemmin paikannettua eksosomit ja virukset fraktioista vasta-aineiden avulla. Lopuksi virustitrauksella saatiin selvitettyä infektiivisyys eri fraktioissa. Kaikkein korkeimman infektiivisyyden omaavien näytteiden odotettiin sisältävän eniten infektoivia viruksia. Tulosten karakterisoinnilla saatiin selville oliko protokolla toiminut halutulla tavalla, eli olivatko eksosomit ja virukset erottuneet toisistaan puhdistuksen aikana.

5.4.1 BCA proteiinimääritys

BCA (bicinchoninic acid eli bikinkoniinihappo) proteiinimäärityksen toiminta perustuu värireaktioon, joka tapahtuu kupari-ionin sekä bikinkoniinihapon välillä. Ensimmäisessä reaktiossa kupari pelkistyy kahdenarvoisesta yhdenarvoiseksi kupariksi $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$. Pelkistynyt yhdenarvoinen kupari reagoi BCA reagenssin A sisältämän bikinkoniinihapon

kanssa aiheuttaen näytteen violetin värin, joka absorboi valoa aallonpituudella 562 nm. Proteiinin määrä näytteessä on mahdollista selvittää absorbanssin mittauksella. Värireaktion absorbanssin määrittämiseen käytettiin spektrofotometriä PerkinElmer Wallac, Victor 2 1420 Multilabel Counter. (Järvinen 2013)

BCA proteiininmääritykseen käytettiin kaksikomponenttista kaupallista kittiä, valmistaja Thermo Fisher Scientific tuotenumero 23227. Jokaisesta näytteestä otettiin 5 µl:n näytteet erillisiin 1,5 ml putkiin, jonka jälkeen näytteet laimennettiin suhteessa 1:5 eli 5 µl näytettä ja 20 µl tislattua vettä. Eksosomipuhdistuksen välivaiheiden näytteet S1-S5 laimennettiin suhteessa 1:10 eli 5 µl näytettä ja 45 µl steriiliä vettä. Standardit, joista mitattiin verrattava standardisuora, pipetoitiin 96-kuoppalevyn kuoppiin 5 µl taulukon mukaan (Liite 1).

Käyttöliuos valmistettiin BCA kitin komponenteista reagenssi A ja B. Reagenssi A sisältää bikinkoniinihappoa ja reagenssi B sisältää kuparisulfaattia. BCA reagenssi B:tä lisättiin reagenssiin A suhteessa 20 µl/ 1 ml. Työssä tarvittiin käyttöliuosta yhteensä 32,8 ml, jolloin reagenssia B lisättiin 656 µl ja käyttöliuos muuttui haalean vihreäksi. Käyttöliuosta pipetoitiin kuhunkin kuoppaan 200 µl ja näytteet siirrettiin 37 °C kaappiin inkuboitumaan 45 minuutiksi. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin absorbanssin mittaus.

5.4.2 Western-blot geelijaomenetelmä

Western-blot menetelmää käytetään proteiinien erottelamiseen ja niiden spesifiseen tunnistamiseen. Näytteet valmistetaan niiden proteiinkonsentraation perusteella ja niihin lisätään joko pelkistävää tai ei-pelkistävää latauspuskuria. Ero näiden kahden latauspuskurin välillä on β-merkaptotoetanolin, jota vain pelkistävä latauspuskuri sisältää. β-merkaptotoetanolin katkoo pelkistysreaktiolla proteiinien disulfidisillat, mikä auttaa polypeptidiketjun tunnistamisessa. (Abcam 2017)

Geelielektroforeesilla saatiin proteiininäytteestä eroteltua proteiinit molekyylipainojen mukaan. Proteiinit muodostivat geelille selkeät vyöhykkeet ajautuessaan geelissä kohti anodia eli positiivista napaa. Geelielektroforeesijon jälkeen geeliltä siirrettiin proteiinit membraanille. Geeli asetettiin membraanin päälle vaakatasoon niin, että niiden väliin ei jäänyt ilmaa. Geelin ja membraanin ylä- ja alapuolella olivat siirtopuskurilla kastellut paksut paperit. Nämä kaikki asetettiin vuoronperään oikeassa järjestyksessä anodilevyn päälle ja lopuksi katodilevy kaikkien päälle. Laitteen ollessa käynnissä proteiinit siirtyivät

kohti anodia ja jäivät membraaniin. Membraani, jolle proteiiniyöhykkeet siirrettiin, kylästettiin seuraavaksi maitoreagenssilla tai 5 % BSA liuoksella. Kyllästyksellä eli blokkauksella saatiin täytettyä membraanin tyhjät paikat ja täten vähennettyä taustaa kuvausvaiheessa.

Membraani inkuboitiin seuraavaksi proteiineille spesifisten primaaristen vasta-aineiden kanssa käyttäen kyllästysreagenssia. Vasta-aineet tarttuivat niille spesifisiin proteiineihin yön yli kestävässä inkuboinnissa. Membraani pestiin aina toimintojen välissä, jotta häiritsevä tausta olisi mahdollisimman pientä. Primaaristen vasta-aineiden tartuttua proteiineihinsa niihin kiinnitettiin leimatut sekundäärivasta-aineet. TBST puskuripesun (Tris-buffered saline, 0,1% Tween 20) jälkeen lisättiin blokkauksreagenssin sekundäärivasta-aineet, jotka mahdollistivat proteiinien visualisoinnin kuvausvaiheessa. Sekundäärivasta-aineet tarttuivat proteiineille spesifisiin primaarisiin vasta-aineisiin.

Western-blot analyysiin valmistettiin näytteet BCA proteiinimäärityksen tulosten perusteella. Mitä enemmän näyte sisälsi proteiinia, sitä vähemmän sitä tarvittiin geelielektroforeesinäytteeseen. Kummankin infektoimattoman ja HSV fraktioiden näytteet valmistettiin erikseen ja ajettiin eri aikoina. Western-blot suoritettiin kaksi kertaa kummallekin fraktioidelle, sillä ensimmäisessä ajossa tarkoituksena oli saada eksosomivyöhykkeet selkeästi näkyviin. Tämän toteutumiseksi käytettiin mahdollisimman paljon fraktionäytettä ajonäytteitä valmistaessa.

Taulukko 1 HSV fraktioiden Western-blot näytteiden valmistus

Näyte HSV	µg/geeli	V(µl) näytettä	latauspuskuri (µl)	Täytepuskuri (µl)
S1	37,5	25	7	
S2	35	25	7	
S3	35	25	7	
S5	40	4,5	5	15,5
1	40	9,5	5	10,5
2	40	9,3	5	10,7
3	40	8,2	5	11,8
4	40	8,3	5	11,7
5	40	10,8	5	9,2
6	325	25	7	
7	15	25	7	
8	10	25	7	
9	5	25	7	
10	5	25	7	
20	5	25	7	
21	5	25	7	
22	5	25	7	

Taulukko 2 Infektoimattomien fraktioiden näytteiden valmistus

Näyte puh- das	µg/µl prot./fr.	V(µl) näytettä	latauspuskuri (µl)	Täytepuskuri (µl)
S1	1,1	25	7	
S2	1,1	25	7	
S3	1	25	7	
S5	9,3	4,3	5	15,7
1	4,2	9,5	5	10,5
2	5,8	6,9	5	13,1
3	7,7	5,2	5	14,8
4	7,8	5,1	5	14,9
5	5,1	7,8	5	12,2
6	1,1	25	7	
7	0,5	25	7	
8	0,2	25	7	
9	<0,2	25	7	
10	<0,2	25	7	
20	<0,2	25	7	
21	<0,2	25	7	
22	<0,2	25	7	

Western-blot menetelmässä käytettävä latauspuskuri lisättiin näytteeseen ennen geelille pipetoimista. Täytepuskuri lisättiin vain, jos näytteen kokonaismäärä oli alle 25 µl. Kaikista näytteistä valmistettiin rinnakkaiset näytteet, jolloin Western-blot ajossa oli yhteensä 4 geeliä samaan aikaan. 1 ja 2 geeleissä käytettiin latauspuskurina ei-pelkistävää puskuria, 3 ja 4 geeleillä käytettiin pelkistävää latauspuskuria. Valmiiksi Eppendorf-putkiin pipetoidut näytteet lämpökäsiteltiin lämpöblokissa 95 °C 10 min, jonka jälkeen näytteet pipetoitiin geelien kuoppiin. Yhdelle geelille mahtui 10 näytettä, joista yksi on standardi Cameleon Duo. Standardin vyöhykkeet toimivat ajettujen geelien kokomarkkerina, jolloin näytteistä muodostuneet vyöhykkeet oli helpompi tunnistaa. Laite oli Bio-Radin Tetra-Cell ajolaite, jossa saman valmistajan virtalähde. Ajo suoritettiin asetuksilla 160 V 40 minuuttia.

Geelit 1 ja 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stand.	S1	S2	S3	S5	1	2	3	4	5

Geelit 3 ja 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stand.	6	7	8	9	10	20	21	22	-

Näytteiden ajauduttua miltei geelin pohjaan saakka, ajo pysäytettiin ja geeleiltä siirrettiin proteiinit membraanipaperille (Nitrocellulose Blotting Membrane, Amersham Protean 0.2 µm NC, GE Healthcare Life science Germany). Siirrostus tehtiin Bio-Rad Trans-blot SD Semi-DryTransfer Cell laitteella, jossa virtalähteenä Bio-Rad Power Pac Basic. Membraanit huuhdeltiin heti siirtämisen jälkeen 1xTBST puskurilla, jonka jälkeen membraanit siirrettiin maitoreagenssiblokkaukseen 50 ml:n putkiin tunnin ajaksi. Blokkauksen jälkeen maitoreagenssi (5% maitojauhetta TBST-puskurissa) vaihdettiin putkiin 5 ml/putki ja maitoon lisättiin vasta-aineet:

HSV membraaneille:

Membraanit 1 ja 2 ei-pelkistävä

- CD81 (mouse) suhteessa 1:200
- CD63 (rabbit) suhteessa 1:200

CD81 ja CD63 ovat vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä eksosomien membraanin proteiineille. Näiden vasta-aineiden avulla pystyttiin havaitsemaan mitkä fraktiot sisälsivät eksosomeja.

Membraanit 3 ja 4 pelkistävä

- HSV ICP5 eli VP5 (mouse) suhteessa 1:1000
- HSV-1 gD (mouse) suhteessa 1:1000

ICP-VP5 vasta-aine tarttuu spesifisesti Herpes Simplex viruksen kapsidin proteiineihin, joten VP5:n avulla voitiin havaita mitkä fraktiot sisälsivät HSV:tä. gD vasta-aine taas tarttuu HSV:n vaipan proteiineihin, joten se näkyi hyvin laajasti näytteissä, eikä ole yhtä tarkka kuin VP5.

Mock membraaneille:

Membraanit 1 ja 2 ei-pelkistävä

- CD81 (mouse) suhteessa 1:200
- CD63 (rabbit) suhteessa 1:200

Membraanit 3 ja 4 pelkistävä

- Alix suhteessa 1:500
- TSG101 (rabbit) suhteessa 1:500

CD81 ja CD63, sekä Alix ja TSG101 ovat kaikki eksosomeissa usein esiintyviä proteiineja. Siksi näitä käytettiin tunnistamaan eksosomit näytteistä.

Vasta-aineiden lisäyksen jälkeen membraanit inkuboitii yön yli +4 °C. Putket pidettiin pyörivässä liikkeessä, jotta membraanit pysyisivät kosteina ja vasta-aineet tarttuivat niihin paremmin.

Inkuboinnin jälkeen vasta-aineet maitoblokkausreagenssissa otettiin talteen ja pakastettiin uusiokäyttöä varten. Membraanit huuhdeltiin TBST-pesupuskurilla kolme kertaa 5 min ajan heilutellen. Pesujen jälkeen Falcon-putkiin, joissa membraanit ovat sisällä, lisättiin 5 ml maitoblokkausreagenssia. Kaikkiin membraaneihin lisättiin 1,5 µl anti-Mouse sekundäärivasta-ainetta (IRDye 680RD Goat anti-mouse, LI-COR), joka tarttui kaikkiin hiirissä tuotettuihin vasta-aineisiin. Lisäksi membraaneihin, joihin aikaisemmin lisättiin

kaneissa tuotettuja vasta-aineita, pipetoitiin 1,5 µl anti-Rabbit sekundäärivasta-ainetta (IRDye, 800CW Goat anti-rabbit, LI-COR). Sekundäärivasta-aineet olivat leimattuja fluoresoivalla IRDyes leimalla, jonka fluoresenssi havaitaan Odyssey-laitteella. Anti-Rabbit sekundäärivasta-aineen leima näkyy laitteen kanavalla 800 nm ja anti-Mousen leima näkyy kanavalla 700 nm. Usein suositellaan laittamaan samalle geelille eri lajissa tuotettuja vasta-aineita, jolloin ristiin sitoutuminen on epätodennäköisempää.

Membraaneilta poistettiin maitoreagenssi ja sekundäärivasta-aineet, jonka jälkeen ne pestiin TBST-puskurilla kolmesti 5 minuutin ajan heiluttaen. Pesujen jälkeen 50 ml:n putkiin jätettiin pesupuskuria noin 5 ml, jotta membraanit eivät kuivuisi missään välissä.

5.4.3 Virusplakkititraus

Plakkititrauksella selvitettiin fraktioiden ja puhdistusnäytteiden infektiivisyyttä. Infektiivisyys viittaa infektoivien virusten määrään näytteessä. Plakkititraus tehtiin vain HSV-infektoiduille näytteille ja kaikki näytteet pidettiin kylmässä jäällä. Kaikki vaiheet suoritettiin laminaarivirtauskaapissa, kunnes HSV inaktivoitiin.

Työ aloitettiin valmistamalla kasvatus- ja infektiomediumia B-Vero (African green monkey kidney epithelial cells) soluille. (Sigma-Aldrich 2017)

Kasvatusmediumin valmistus:

Laminaarivirtauskaapissa aseptisesti työskennellen. Steriiliin 1 litran säilytyspulloon mitattiin mittasyliinterillä inaktivoitua FBS:ää (Fetal Bovine Serum) 70 ml. Seerumiin pipetoitiin 200 µl gentamysiiniä, joka toimii antibioottina mediumissa. Lopuksi säilytyspullo täytettiin DMEM:lla (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco Thermo Fisher Scientific) litran merkkiviivaan asti.

Infektiomediumin valmistus:

300 ml:n steriiliin säilytyspulloon lisättiin 7,5 ml 4 % BSA (Bovine Serum Albumin), sekä pipetoitiin 60 µl gentamysiiniä. Lopuksi pullo täytettiin merkkiviivaan asti RPMI mediumilla (Roswell Park Memorial Institute medium).

Laimennokset tehtiin infektiomediumiin, joka pipetoitiin valmiiksi laimennoksia varten 1,5 ml putkiin. Tehdyt laimennokset: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} ja 10^{-12} , joista titraukseen käytettiin

-3,-6, -9 ja -12 laimennoksia. Laimennokset valmistettiin pipetoimalla voimakkaammasta laimennoksesta seuraavaksi laimeampi näyte.

B-Vero-solut (African green monkey kidney epithelial cells) pestiin 24-kuoppalevyissä ennen infektointia infektiomediumilla. HSV laimennokset pipetoitiin solujen päälle 250 µl ja siirrettiin huoneen lämpöön inkubointiin 55 min heilurissa. Inkuboinnin jälkeen HSV laimennokset imettiin varoen pois solujen päältä. Soluille pipetoitiin aikaisemmin valmistettua kasvatusmediumia, johon lisättiin IgG suhteessa 20 µl/100 ml. IgG:llä saatiin esitettyä viruksen leviämisen soluja ympäröivän nesteen kautta. Se kuitenkin salli viruksen leviämisen solusta soluun, sekä virusplakin muodostumisen. Kasvatusmediumia lisättiin 1 ml joka kuoppaan. Solut siirrettiin +37°C lämpökaappiin inkuboitumaan kolmeksi vuorokaudeksi.

Inkuboinnin päätyttyä kasvatusmediumi imettiin pois kuoppalevyiltä ja kuoppiin lisättiin metanolia. Metanoli kiinnitti solut kuoppien pohjiin, sekä inaktivoi viruksen. Metanolin annettiin olla kuopissa noin 2 minuuttia, jonka jälkeen se imettiin pois ja kuoppalevyjen annettiin kuivua laminaarivirtauskaapin sisällä. Metanolin haihduttua kuoppalevyt otettiin ulos laminaarivirtauskaapista ja suoritettiin solujen värjäys kristallivioletilla. Kristalliviolettia lisättiin jokaiseen kuoppaan noin 350 µl niin, että pohja peittyi. Solujen annettiin värjäytyä kristallivioletissa 12 minuuttia, jonka jälkeen kristallivioletti pipetoitiin talteen kuopista. Kuoppalevyt pestiin hanan alla vedellä ja siirrettiin kuivumaan. Viruksen muodostamat plakit voitiin laskea solumatosta kuoppalevyjen kuivuttua. Plakkien määrästä voitiin määrittellä HSV:n määrä näytteissä. Infektiivisyys (pfu/ml) laskettiin alla olevan kaavan mukaan:

$$5 \times 10^6 \times \frac{1000 \text{ ul}}{250 \text{ ul}} = 2 \times 10^7 \text{ pfu/ml}$$

Tässä tapauksessa laskettujen plakkien keskiarvo on 5 plakkia ja virustitrukseen käytetty 10⁶ -laimennosta 250 µl.

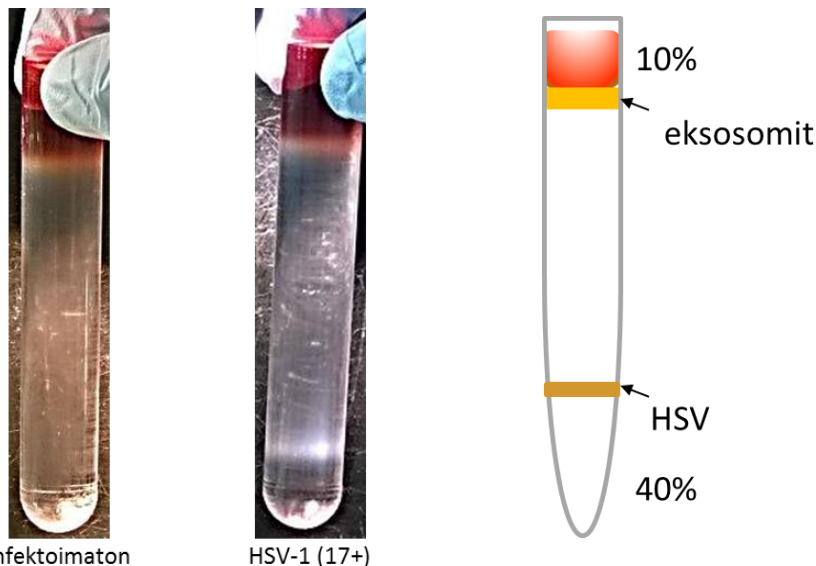
6 TULOKSET

Tuloksia tarkasteltiin koko tutkimuksen ajan, sillä tarkoituksena oli optimoida tapa, jolla virukset ja eksosomit saataisiin mahdollisimman tehokkaasti erotettua toisistaan. Ensimmäiseksi eksosomit yritettiin eristää kaupallisella eksosomieristyskitillä, jonka todettiin eristävän myös virukset eksosomien mukana. Syyksi virusten mukana pysymiseen pidettiin kovaa sentrifugointia, jonka aikana eksosomit ja virukset saattoivat tarttua tiukasti toisiinsa.

Kovia sentrifugointeja vältellen ja menetelmää vaihtamalla HSV-1 virukset ja eksosomit saatiin erotettua toisistaan.

6.1 Tiheysgradienttimenetelmä

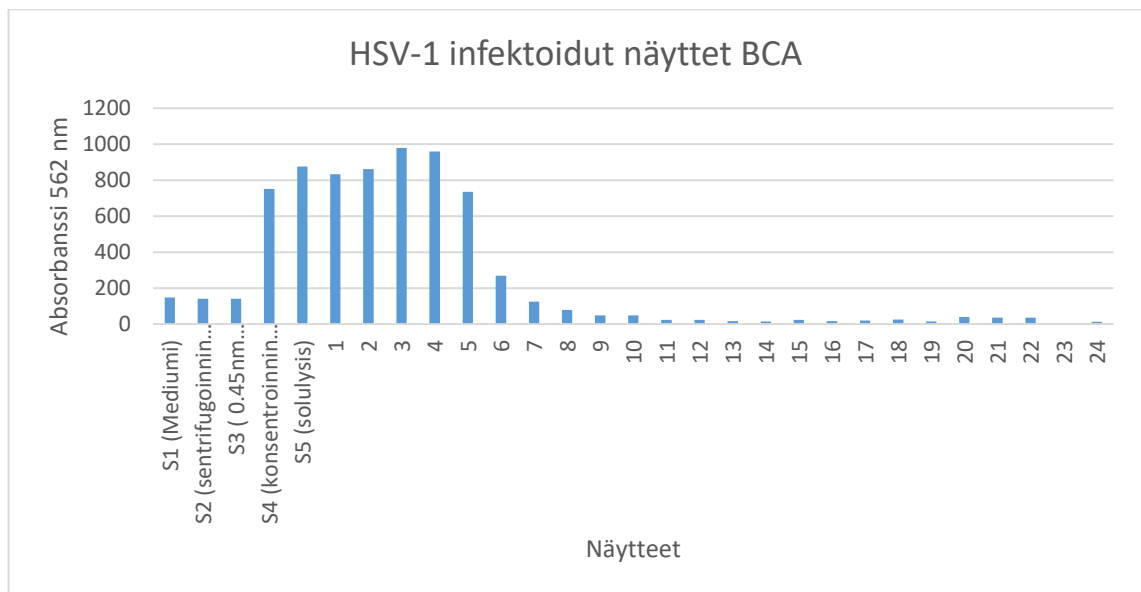
Tiheysgradientti-menetelmästä saadut fraktiot, joiden vyöhykkeet voitiin silmin havaita (katso kuva 4), karakterisoitiin ja menetelmä voitiin todeta onnistuneeksi. Jokaisen karakterisointimenetelmän tuloksista voitiin päätellä onnistumisen mahdollisuuksia, mutta lopullinen tulos saatiin vasta Western Blot geeliajon tuloksista.



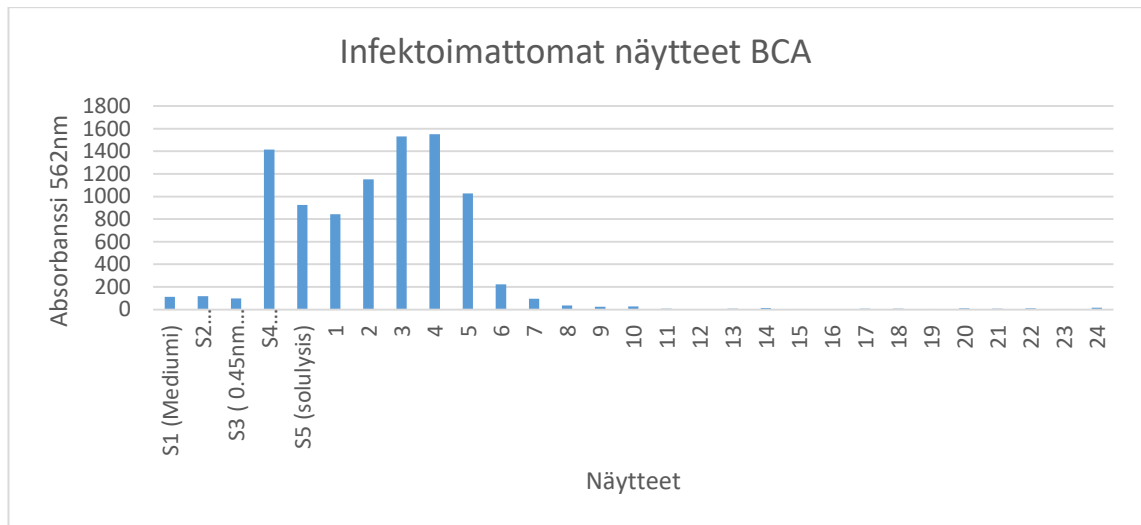
Kuva 4 Tiheysgradienttimenetelmässä muodostuneet vyöhykkeet ovat silmin nähtävissä

6.1.1 BCA proteiini määritys

BCA proteiini määrityksen tulokset kertoivat kuinka paljon missäkin näytteessä oli proteiineja. Tällä tiedolla voitiin valmistaa näytteet Westen blot geelijaon varten niin, että jokaisen näytteen proteiini määrä olisi mahdollisimman sama geelillä. BCA proteiini määritys tehtiin valmiilla kitillä, sekä käyttäen spektrofotometriä määrittämään näytteiden absorbanssi.



Kuva 5 HSV-1 näytteiden ja fraktioiden BCA proteiini määrityksen tulokset pylväskuvajana. Absorbanssi 562 nm



Kuva 6 Infektoimattomien näytteiden ja fraktioiden BCA proteiinimäärityksen tulokset pylväskuvaajana. Absorbanssi 562 nm

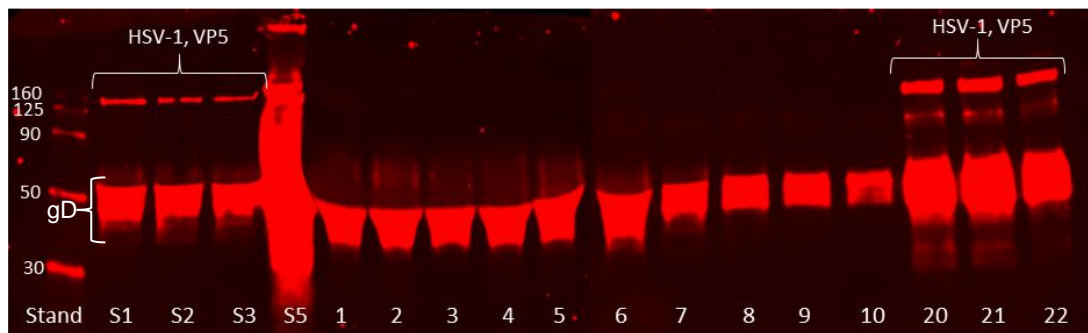
BCA proteiinimäärityksen absorbanssi on suoraan verrannollinen proteiinin määrään näytteissä. Kuvaajissa 5 ja 6 on kuvattu jokaisen näytteen antama absorbanssi. HSV infektoiduissa fraktionäytteissä 20-22 on selvästi nähtävissä absorbanssin kasvua, jonka oletettiin johtuvan viruksen proteiineista. Usein viruspuhdistuksessa HSV virus painuu tiheysgradientissa alimpien fraktioiden kohdalle. Lopullinen vastaus fraktioiden sisältämistä proteiineista saatiin kuitenkin vasta Western-blot geelijaon ja infektiivisyyden selvittämisen jälkeen.

6.1.2 Western-blot

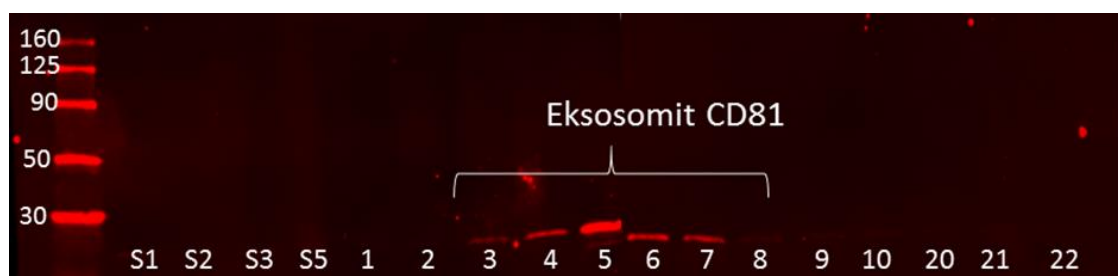
Western-blot-geelijaolla selvitetään vasta-aineiden avulla mitä tiedossa olevia proteiineja fraktiot sisälsivät. Eksosomien ja HSV-1 virusten pinnalla ja sisällä olevat proteiinit ovat erilaisia, jolloin niillä on myös omat spesifiset vasta-aineensa. Eksosomien membraaneissa on tietyille vasta-aineille spesifisiä reseptoreja samoin kuin HSV-virusten pinnalla. HSV-1 viruksen membraanivaipan alla on viruksen kapsidi, jossa on viruksen spesifisiä ICP5-kapsidiproteiineja. Tällöin ICP5 vasta-aineella voitiin paikantaa missä fraktioissa viruksen kapsidiproteiinia on läsnä.

Geeliat tehtiin kahdesti molemmille HSV-infektoiduille sekä infektoimattomille näytteille. Jokaisessa ajoissa ajettiin samalla kertaa 4 geeliä, joista kahdessa geelissä käytettiin ei-pelkistävää latauspuskuria. Ei-pelkistävä latauspuskuri ei sisällä beta-merkaptoetanolia ja joissain tapauksissa vasta-aineet näkyvät sillä paremmin. Toisissa näytteissä käytettiin pelkistävää latauspuskuria. Puhdistus ja fraktionäytteistä tehtiin siis jokaiselle ajolle kahdet identtiset näytteet ei-pelkistävälle ja pelkistävälle latauspuskureille omansa.

Ensimmäiset ajot tehtiin maksimiproteiinimäärällä, jotta voitaisiin olla varmoja, että pienemmätkin määrät proteiinia näkyvät geelillä niitä kuvatessa. Western-blot geeliat toistettiin niin, että näytteiden proteiinimäärät olivat vertailukelpoisia eli proteiinimäärät jokaisessa näytteessä laskettiin samoiksi.



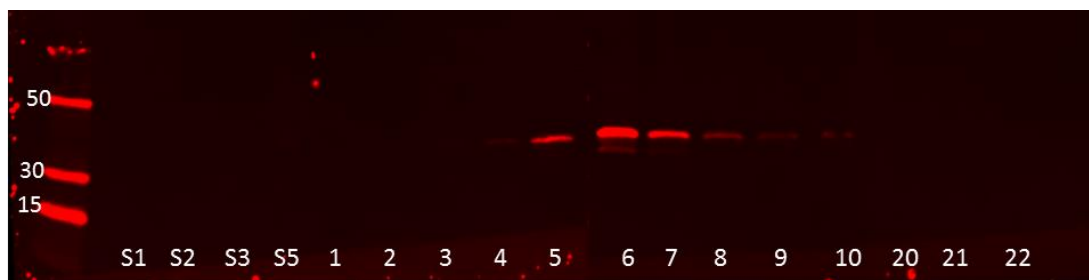
Kuva 7 HSV-1 fraktiot ja puhdistusvaiheet Western-blot membraanikuvassa.



Kuva 8 HSV-1 infektoitujen fraktioiden eksosomit.

Ensimmäisissä ajoissa nähtiin, että HSV kulkeutui puhdistusvaiheiden näytteissä mukana tasaisesti. Tiheysgradientti-puhdistuksen jälkeen viruksen kapsidiin tarttuva vasta-aine näkyy fraktioissa 20-22, jolloin virus on erottunut tiheämpään päähän gradienttia

(katso kuva 7). HSV-1 viruksen havaitsemiseen membraanilla käytettiin ICP5 vasta-ainetta, joka tarttui viruksen kapsidin proteiineihin. gD vasta-aine tarttui HSV-1 viruksen vaipan proteiineihin, mutta on laajasti havaittavissa sillä gD ilmenee kaikenlaisilla infektioituneilla kalvoilla ja kalvostoilla. Eksosomit näkyivät heikosti puhdistusvaiheiden näytteissä, mutta konsentroinnin jälkeen tiheysgradientti-puhdistuksessa eksosomit näkyivät vahvimmillaan fraktioissa 4-6 kuvassa 8. Tiheysgradientissa eksosomeista muodostunut vyöhyke oli siis melko alkupäässä gradienttia. Näin ollen HSV-1 ja solujen erittämät eksosomit saatiin erotettua toisistaan käyttämällä konsentroitua ennen tiheysgradientti-puhdistusta.

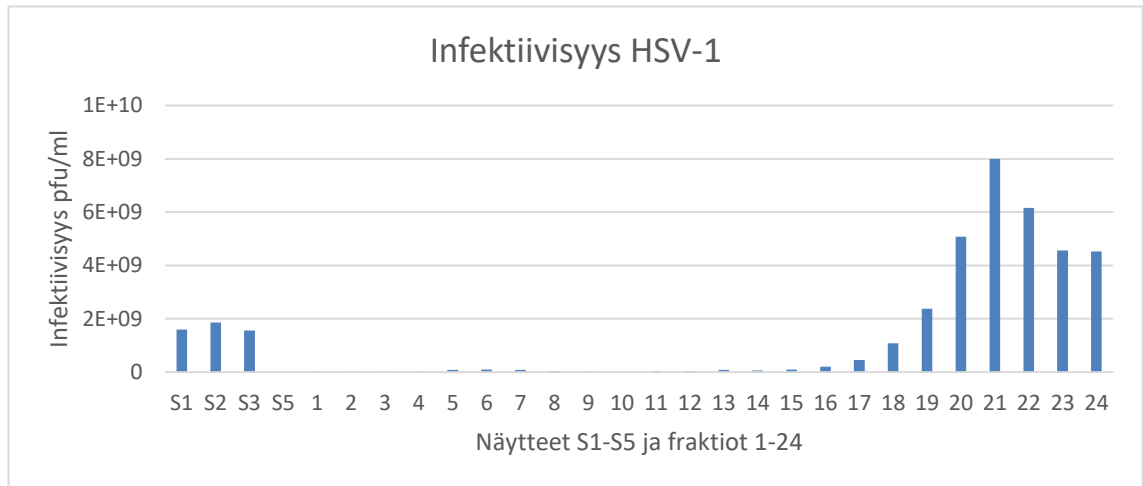


Kuva 9 Infektoimattomien näytteiden eksosomit Wester-blot membraanilla

Infektoimattomissa fraktioissa eksosomeista muodostunut vyöhyke oli samassa kohdassa kuin HSV-1 infektoiduissa fraktioissa 5-7 (katso kuva 9).

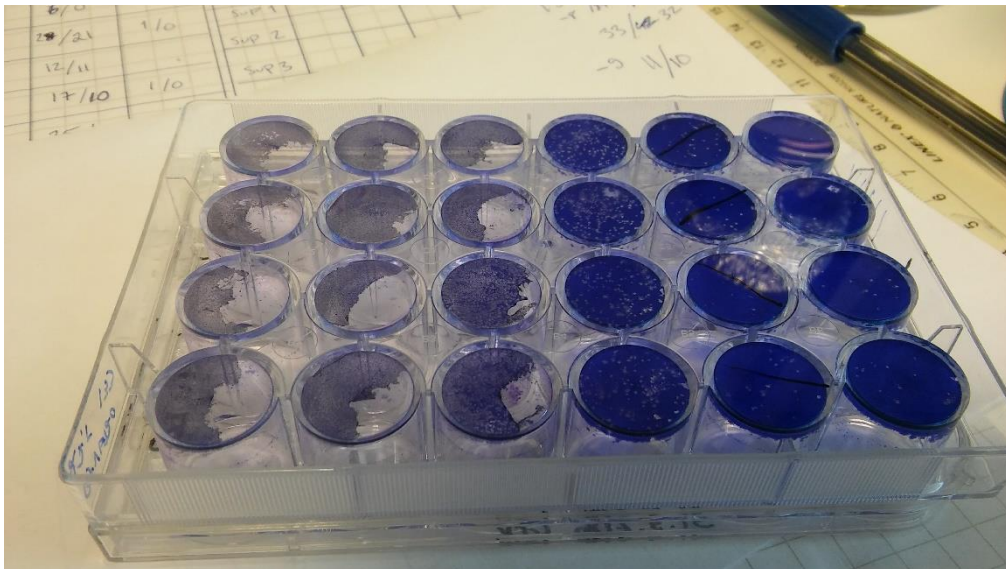
6.1.3 Virustitraus

Virustitrauksessa näytelaimennoksilla infektoitiin B-vero-soluja ja viruksen aiheuttamien plakkien mukaan laskettiin näytteiden infektiivisyys pfu/ml. Infektiivisyys kertoo suoraan kuinka paljon näytteessä on viruksia. Tässä tapauksessa se myös osoitti, missä fraktioissa suurin osa viruksista oli. Lisäksi voitiin tarkastella eksosomeja sisältävien fraktioiden infektiivisyyttä. Mikäli eksosomifraktioiden 4-6 infektiivisyys olisi huomattavan korkea, voitaisiin epäillä, etteivät virukset ja eksosomit olisi erottuneet tiheysgradientissa.



Kuva 10 Näytteiden ja fraktioiden infektiivisyys pfu/ml pylväskuvaajana

Kuvaajassa 10 voidaan havaita kuinka fraktioissa infektiivisyys alkaa nousta fraktion 16 jälkeen. Korkein infektiivisyys oli fraktiossa 21. Eksosomeja sisältävissä fraktioissa voitiin havaita infektiivisyyttä, sillä virusta oli puhdistuksen jälkeenkin vielä kaikissa fraktioissa. Kuvassa 11 on virusplakkititrauksen tulos, jossa näkyy laskettavia plakkeja värjättyssä solumatossa.



Kuva 11 Plakkititraus. Virusplakit valmiina laskettavaksi

7 TARKASTELU JA LOPPUPÄÄTELMÄT

Työ tavoite toteutui ja eksosomit ja virukset saatiin erotettua toisistaan infektoitujen solujen mediumista käyttämällä tiheysgradienttimenetelmää. Onnistuneella puhdistuksella todettiin, että voimakkaalla sentrifugaatiolla on vaikutusta HSV-1 ja eksosomien erottamiseen toisistaan. Voidaan olettaa niiden kalvomaisten rakenteiden tarttuvan toisiinsa kiinni sentrifugaation voimasta johtuen. Jättämällä voimakkaat sentrifugoinnit puhdistuksessa pois, voidaan välttää tämän tapahtuminen.

HSV-1 infektoitujen solujen mediumista erotettujen eksosomien avulla voidaan selvittää muun muassa:

1. Erilaisten eksosomien erittymistä. Erittävätkö virusinfektoidut solut erilaisia eksosomeja kuin terveet ei infektoidut solut ja millä tavalla erilaisia?
2. Mahdollisuutta kuljettaa lääkkeitä eksosomien sisällä spesifisesti halutuille soluille.
3. Mahdollisuutta käyttää eksosomeja rokotteiden kehityksessä.
4. Eksosomien käyttö esimerkiksi syöpämarkkereina. On jo tiedossa, että eksosomit voivat toimia bioindikaattoreina (Stoorvogel 2013).
5. Eksosomien roolia virusinfektion leviämisessä:
 - Edistävätkö eksosomit infektion leviämistä kuljettamalla virusta sisällään muualle elimistöön?
 - Hidastavatko eksosomit infektion leviämistä ”varoittamalla” muita soluja niiden reseptorien ja signaalien avulla tulevasta infektiosta. Terveet solut varautuisivat tulevaan infektiin ja aktivoisivat immuunivasteen.

HSV-1 infektoitujen solujen mediumista erotetuista viruksista saadaan puhdas virusvalmiste, jonka käyttö tutkimuksissa on luotettavampaa. Voidaan myös selvittää johtuvatko immuunivasteen mahdolliset ongelmat itse viruksista vai eksosomeista.

7.1 Mahdolliset riskit ja menetelmän parantaminen

Suurin riski kaikkien solujen kanssa toimimisessa on kontaminaatio. Kontaminaatio voi tulla mistä tahansa epäpuhtaasta välineestä tai ilmasta. Mikrobit viihtyvät hyvin samankaltaisissa olosuhteissa kuin niskässolut ja juuri siksi kontaminaatioiden estäminen voi olla haastavaa.

Puhdistuksen lopuksi tehtävän konsentroinnin aikana osa HSV-1 viruksista ja eksoosomeista on saattanut jäädä kiinni ultrasuodatuskalvoon. Kalvoon juuttuneiden partikkelien määrä on suoraan hävikkiä lopullisesta tuloksesta tiheysgradientissa näkyvistä vyöhykkeistä. Virusvalmisteita tehtäessä pyritään saamaan kaikki virus talteen, sillä itse puhdistusprosessi on rahallisesti melko kallista.

Menetelmässä on vielä kehitettävää, esimerkiksi virussaannon maksimointi ja eksosomien jatkopuhdistus. Eksosomifraktioiden näytteisiin olisi mahdollista kokeilla aikaisemmin optimoinnissa käytettyä eksosomien eristysreagenssia. Näin olisi mahdollista saada puhtaampia eksosominäytteitä.

8 LÄHTEET

Abcam, 2017. *Sample preparation for western blot*. Viitattu: 5.1.2017
<http://www.abcam.com/protocols/sample-preparation-for-western-blot>.

Anderson; Kashanchi, F. & Jacobson, S., 2016. Exosomes in Viral Disease. *Neurotherapeutics*, Vol. 13(3), 535-546.

Dargan, D.J. & Subak-Sharpe, J.H., 1997. The effect of herpes simplex virus type 1 L-particles on virus entry, replication, and the infectivity of naked herpesvirus DNA. *Virology*, No.239/1997, 378-388.

Deschaps, T. & Kalamvoki, M., 2016. Extracellular vesicles during Herpes Simplex Virus type 1 infection: an inquire. *Virology Journal*, No. 13/2016, 1-12.

Giebel, B. & Ludvig, A-K., 2012. Exosomes: Small vesicles participating in intercellular communication. *The International Journal of Biochemistry and Cell biology*, No. 1/44, 11-15.

Heikkilä, O., 2016. *Henkilökohtainen tiedonanto* (06.06.2016).

Järvinen, O., 2013. *Angiotensiinikonvertaasientsyymi 1 (ACE1) ohutsuolessa — fluorometrinen menetelmä aktiivisuuden määrittämiseksi*, Helsinki: Metropolia ammattikorkeakoulu, opinnäytetyö.

Ochs, 2004. Molecular models of transport. Teoksessa: *A History of Nerve Functions*. Sidney: Cambridge University Press, 271-275.

Raab-Traub, D.G. & Meckes Jr, N., 2011. Microvesicles and Viral Infection. *Journal of Virology*, No.24/2011, 44-54.

Sigma-Aldrich, 2017. *Sigma-Aldrich VERO Cell Line*. Viitattu: 4.5.2017
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/84113001?lang=fi®ion=FI>.

Solunetti, 2006a. *Solunetti- Virusten rakenne*. Viitattu:1.3.2017
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/virusten_rakenne/.

Solunetti, 2006b. *Solunetti Aksonaalinen kuljetus*. Viitattu: 22.4.2017
http://www.solunetti.fi/fi/histologia/aksonaalinen_kuljetus/.

Solunetti, 2006c. *Solunetti replikaatio*. Viitattu: 27.2.2017
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/replikaatio_2/3/.

Solunetti, 2006d. *Solunetti Virusten vapautuminen solusta*. Viitattu: 17.2.2017
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solusta_vapautuminen/2/.

Solunetti, 2006e. *Solunetti Varhaiset endosomit*. Viitattu: 22.1.2017
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/varhaiset_endosomit/2/.

Solunetti, 2006f. *Solunetti - Myöhäiset endosomit*. Viitattu: 26.4.2017
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/myohaiset_endosomit/2/.

Solunetti, 2006g. *Solunetti Eksosytoosi*. Viitattu: 3.2.2017
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/eksosytoosi/2/>.

Stoorvogel, W. & Raposo, G., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, No.4/2013, 373-383.

Théry, C., 2011. *Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications*, Pariisi: F1000 Reports BIOLOGY, Vol. 3/15, 1-8.

Hukkanen, V.; Mattila, R.K. & Paavilainen, H., 2010. Host responses to herpes simplex virus and herpes simplex virus vectors. *Future Virology*, No. 5/2010, 493-512.

Whitley; Kimberlin & Roizman R., 1998. Herpes Simplex viruses. *Clinical Infectious Diseases*, No. 3/26, 541-553.

Vuorinen, T. & Korkeakangas-Savolainen, O., 2007. Trends in Herpes Simplex Virus Type 1 and 2 Infections Among Patients Diagnosed With Genital Herpes in a Finnish Sexually Transmitted Disease Clinic, 1994-2002. *Sexually transmitted diseases*, No. 1/34, 37-40.

Välimaa, H.; Seppänen, M. & Hukkanen, V., 2013. Herpes Simplex-virusinfektioiden nykykuva ja hoito. *Duodecim*, No. 129/2013, 31-40.

Taulukko 3 BCA proteiinimäärityksen pipetointitaulukko

0	100	S1	S5	4	8	12	16	20	24	
0	100	S1	S5	4	8	12	16	20	24	
10	200	S2		1	5	9	13	17	21	
10	200	S2		1	5	9	13	17	21	
20	400	S3		2	6	10	14	18	22	
20	400	S3		2	6	10	14	18	22	
50	50	S4		3	7	11	15	19	23	
50	50	S4		3	7	11	15	19	23	