

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2011

Mikko Välimäki

Rinovirusinfektio keuhkoputkisoluissa



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

Toukokuu 2011 | Sivumäärä: 25

Ohjaajat: Petri Susi, Kari Haajanen

Mikko Välimäki

Rinovirusinfektio keuhkoputkisoluissa

Rinovirus on yleisin flunssaa aiheuttava virus maailmassa. Sen tutkimuksissa on tarkoitus etsiä hoito-, diagnosointi- ja ennaltaehkäisy menetelmiä. Rinovirusiin kuuluu yli 150 virustyyppiä, joista tässä työssä tutkitaan noin sataa.

Tämän työn tarkoituksena oli kartoittaa, mitkä kyseisistä viruksista infektoi HBE-solulinjaa, jota käytetään mallisoluna alahengitysteiden soluista. Apuna työssä käytettiin HeLa-soluja, jotka toimivat kasvatus ja vertailusoluina.

Työ on osa kokonaisuutta, jossa etsitään HBE-soluja infektoivien rinovirusten indusoimia immuunimolekyylejä. Tulokset voivat johtaa uusien sovellusten äärelle, joissa voitaisiin tunnistaa yleisimmät ja patogeenisimmat rinovirukset sekä löytää niille mahdollisesti täsmälääke tai jopa rokotus.

ASIASANAT:

virus, immuunivaste, infektio, virustitraus, soluviljely

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Specialisation: Biotechnology

May 2011 | Total number of pages: 25

Instructors: Petri Susi, Kari Haajanen

Mikko Välimäki

Rhinovirus infection in human bronchial epithelial cell line

The rhinovirus is the most endemic common cold virus in the world. In studies on the rhinovirus the goal is to find a treatment, diagnosis and prevention methods for the illness. The rhinovirus-group includes more than 150 types of virus. In this thesis, about a hundred of them are examined.

The purpose of this study was to identify which of the viruses infect the HBE cell line, which is used as a model of lower bronchial tube cells. HeLa cells were used, as reference and for cultivation purposes.

This thesis is part of research where the goal is to find immune molecules from HBE-cells, which have been infected with rhinoviruses. The results may lead to new applications, for the identification of the most common and pathogenic rhinoviruses and help in finding potential smart drugs or even a vaccine.

KEYWORDS: virus, immune response, infection, virus titration, cell culture

SISÄLTÖ

1	LYHENTEET	5
2	TAUSTAA	6
3	TYÖN TARKOITUS	8
4	MENETELMÄT	9
4.1	Virustitraus	10
4.2	RNA:n eristys ja qRT-PCR	11
4.3	Hoechst/SytoxOrange-värjäys	12
4.4	ApoTox-Glo™ Triplex analyysi	12
5	TULOKSET	14
5.1	Rinovirusserotyyppien infektiivisyys HeLa- ja HBE-soluissa	14
5.2	Infektioajan määrittäminen	20
5.3	Kvantioinnit titraamalla	21
5.4	Kliiniset näytteet	22
5.5	ApoTox-Glo™ Triplex-analyysi	23
6	TULOSTEN TARKASTELU JA YHTEENVETO	24
	LÄHTEET	25
	KUVAT	
	Kuva 1 Infektion eteneminen soluissa.	11
	KUVIOT	
	Kuvio 1. Virusten infektiokaavio.	15
	TAULUKOT	
Taulukko 1	PCR-monistuksen vaiheet ja niiden kestot.	12
Taulukko 2	Virustitraukset HBE soluilla 1-100. Numero; HRV-serotyyppi, inf; infektion eteneminen (maksimi 8)	14
Taulukko 3	Virusten infektiot ja uudelleen infektiot. Uudelleen infektoinnissa lähteenä oli HBE-solut. (maksimi kuopassa 4)	16
Taulukko 4	Virusten infektiot ja uudelleen infektiot (maksimi 4)	17
Taulukko 5	Yhteenveto infektiivisyyksistä	19
Taulukko 6	infektioajan vaikutus viruksilla 14, 69, 84 ja 92. 3 vkr.	20
Taulukko 7	Virusten endpoint-titraus HeLa-soluilla ja uusi laimennos	21
Taulukko 8	Aikasarjan endpoint-titraus HeLa-soluilla.	22
Taulukko 9	Sytotoksisuus mittaukset 485/535 nm.	23
Taulukko 10	Luminesenssimittaukset	23

1 Lyhenteet

CAV	Coxsackie A virus, Enterovirus B-lajin serotyyppi
CBV	Coxsackie B virus, Enterovirus B-lajin serotyyppi
DEPC	RNAasi vapaa vesi
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
FCS	Fetal calf serum
HBE	<i>Human bronchial epithelial</i> (16HBE14o ⁺)
HRV	Human rhinovirus
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukiini (proteiini)
LDL	Low density lipoprotein
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1 (proteiini)
MEM	Minimal Essential Medium
QLV	Puskuri
qRT-PCR	Quantitative Real-time polymerase chain reaction
RANTES	Chemokine (C-C motif) ligand 5 (proteiini)
RNA	Ribonucleic acid
RWB	Puskuri
VP1-4	viraalinen proteiini (1-4)

2 Taustaa

Hengitysteiden infektoita on tutkittu jo 1900-luvun alusta asti. Rinovirus eristettiin ensimmäisen kerran vuonna 1956 ja pian sen jälkeen suoritetuissa laajoissa tutkimuksissa se tunnistettiin yleiseksi hengitystieinfektioiden aiheuttajaksi. 1960-luvulla tehtiin muun muassa Tecumsch Study, the Seattle Virus Watch ja the New York Virus Watch, joissa rinoviruksen todettiin aiheuttavan neljäsosan kaikista ylempien hengitysteiden infektoista.^{1,2}

Pikornavirukset (*Picornaviridae*-suku) muodostavat erään suurimmista ja tärkeimmistä virusryhmistä. Siihen kuuluu lähes 250 ihmisiä infektoivaa virusta, joista tunnetuimmat ovat poliovirukset, hepatiitti A-virus ja rinovirus. Ihmisiä infektoivat pikornavirukset kuuluvat pääasiassa entero-, rino- ja parechovirussukuihin ja ne aiheuttavat erilaisia tauteja, joiden vakavuusaste vaihtelee tavallisesta flunssasta aivokalvontulehdus- ja halvausoireisiin. Virukset aiheuttavat vuosittain epidemioita eri puolilla maailmaa. Pikornavirukset liittyvät myös erilaisten kroonisten oireyhtymien syntyyn, joista merkittävimmät ovat lapsuusiän diabetes ja astma sekä toistuvat korvatulehdusepisodit. Pikornavirukset ovat yleisimpiä taudinaiheuttajia ja niillä on suuri taloudellinen ja lääketieteellinen merkitys.³

Pikornavirukset ovat rakenteeltaan 20-tahokkaita eli ikosaedrisia ja pieniä, noin 30 nm läpimitaltaan. Niiden proteiiniakuoren pinta koostuu, VP1, VP2 ja VP3-proteiineista.⁴ VP4 sijaitsee kuoren sisäpuolella yksinauhaisen ja –säikeisen RNA-genomin kanssa. RNA-genomi on pieni, keskimäärin 7.5 kiloemästä ja siitä koodautuu keskimäärin 10 proteiinituotetta polyproteiiniprosessoinnin tuotteena. Nämä proteiinit osallistuvat viruksen elinkierron eri vaiheisiin. Virus tunkeutuu solun sisään käyttäen solupinnan reseptoreita hyväkseen ja lisääntyy solun sytoplasmassa. Pikornavirukset jaetaan geneettisesti 12 ryhmään, joista merkittävimmät ihmisvirukset kuuluvat enterovirusiin, joihin nykyisen taksonomisen jaottelun mukaan kuuluvat myös rinovirukset. Rinovirusiin kuuluu yli 150 virustyyppiä.⁵ Geneettisesti rinovirukset jaetaan kolmeen lajiin (A-C) ja reseptorispesifisyytensä mukaan kahteen lajiin (ICAM-1 ja LDL) kaikissa genoryhmissä. C-lajia ei ole onnistuttu kasvattamaan soluissa, ja on

todennäköistä, että se käyttää eri solureseptoreita kuin A- ja B-lajin rinovirukset.⁶ ICAM-1 on ihmisen yleisin rinovirusreseptori.⁷

Rinovirus tunnetaan ”flunssaviruksena” ja se on siten yleisin virus maailmassa. Vaikka virus ei normaalisti aiheuta kuolemaanjohtavaa tautia, voi se silti olla tappava immunovajavaisissa ja vanhoissa ihmisissä. Rino on merkittävin infektiota aiheuttava patogeeni lapsipotilaissa. Se on selkeästi yleisin yli yksivuotiaiden lapsien hengitystieinfektioiden aiheuttaja ja sitä tavataan yleisesti korvatulehduksen yhteydessä ja rinoviruksen liittyminen lapsuusiän astman ja ylipäänsä hengitysvaikeuksien muodostumiseen on yleisesti hyväksytty asia. Tällä hetkellä ei tiedetä, johtuuko erilaiset virustautioireet viruksen sytotoksisista vaikutuksista (solujen hajottamisesta) vai välillisesti siitä, että virus indusoi immuunivastetta, jonka välittäjämolekyylit aiheuttavat solukoon haitallisia muutoksia, esim. keuhkoputkien supistumista, mikä johtaa hengitysvaikeuksiin. Virus voi myös ”raivata” tietä myöhemmälle bakteeri-infektioille, mistä voi seurata uusi vakavampi tautitila, kuin mitä pelkästä virusinfektiosta aiheutuisi.⁵

Keuhkoputkisoluissa, kuten SAE ja BEAS-2B, on tutkittu enterovirusten aiheuttamaa immuunivastetta ja ajan funktiona. Käytetyt keuhkoputkisolut kuvantavat ihmisen keuhkoputkisolujen käyttäytymistä. Tutkimuksissa solut erittivät merkittäviä määriä immuunivastemolekyylejä kuten RANTES, MCP-1 ja IL-8-proteiineja sen jälkeen, kun solut oli infektoitu viruksilla. Kyseiset proteiinit esiintyvät usein tulehtuneissa soluissa aktivoituneiden eosinofiilejä ja aiheuttaa IgE ja IgG4 eritystä ja niiden esiintyminen soluissa johtaa yleensä solun kuolemaan.⁸

Rinovirusia on tutkittu solumalleissa jo yli 30 vuotta, mutta lähinnä käyttäen muutamaa mallivirustyyppiä (HRV1b, HRV2, HRV14 ja HRV16). Kaikki A- ja B-lajin rinovirukset lisääntyvät hyvin HeLa-soluissa, joita käytetään yleisesti rinovirusten lisäämisessä. Rinoviruksen aiheuttaman alahengitysinfektion mallisoluina on käytetty erityisesti HBE-solulinjaa (16HBE14o⁻; *Human bronchial epithelial*). HBE-soluja on infektoitu mm. HRV14-virusta, joka aiheuttaa kyseisissä soluissa apoptoosia eli solukuolemaa. Apoptoosin rooli rinovirusinfektiossa ei kuitenkaan ole selvä.⁹

3 Työn tarkoitus

Työssä tutkittiin flunssan aiheuttajaviruksen, rinon, vaikutuksia keuhkoputkisoluissa (HBE), joita infektoidessaan, viruksen ajatellaan aiheuttavan tautioireita. Työssä tutkittiin kaikkien 99:n ”klassisen” rinovirusserotyypin infektiivisyyttä HBE-soluissa. Klassisten rinovirustyyppien lisäksi testattiin 16 potilasnäytteistä eristettyä rino-isolaattia, joiden joukossa oli myös ns. C-lajiin kuuluvia rinovirusia. Koetilanteessa käytettiin kontrolleina myös enterovirusia, jotka sitoutuvat ICAM-1-reseptoriin.

Ne virustyyppit, jotka näyttivät aiheuttavan HBE-soluissa muutoksia, valittiin jatkokokeisiin. HeLa-soluja käytettiin vertailusoluina, ja niillä pystyttiin todentamaan, että infektoiva ympäristö sisälsi viruksia. Pipetoimalla sama määrä viruksia HBE- ja HeLa-soluille voitiin todeta viruksen infektiivisyys vertailemalla soluilla tapahtuvaa reaktiota. Valikoiduilla viruksilla tehtiin myös uudelleeninfektointi, eli HBE-soluissa kasvaneilla viruksilla infektoitiin HeLa-soluja uudelleen, jolloin voitiin todeta kasvoiko virukset solulla, vaikka näkyvää vastetta ei soluissa olisi tapahtunutkaan.

Virustitrauksia tutkittiin silmämääräisesti mikroskoopilla. Osasta viruksista infektion etenemisen tutkiminen tehtiin eri värjäysmenetelmiä hyväksikäyttäen, jolloin saatiin enemmän tietoa solujen tilasta ja infektion etenemisestä. Muutamasta viruksesta tehtiin myös aikasarja, jolla infektion eteneminen pyrittiin toteamaan ajan funktiona. Kyseinen analysointi tehtiin qRT-PCR:llä, jolla pitäisi nähdä virusten kvantitatiivinen määrä näytteessä.

Työn seuraava tavoite oli tutkia ja tunnistaa HBE-soluja infektoivien rinovirusten indusoimia immuunimolekyylejä (geeni-ekspressio ja mediumiin erittyvät proteiinit) ja soluvasteeseen liittyviä tekijöitä, joita tutkittiin yhden kaupallisen kitin avulla ja jolla saatiin määritettyä mm. kahden kaspasiinin esiintymistä.

4 Menetelmät

3.1. Soluviljely

Työssä käytettiin kahta solulinjaa. HeLa-soluja virusten ylläpitoon ja HBE-soluja, joissa niiden muutoksia tarkasteltiin infektoinnin jälkeen. Virusten kasvatus tapahtui HeLa-soluilla, joissa virukset lisääntyvät hyvin. Virusinfektioissa käytettiin virus-solususpensioita, koska kaikkien virusten puhdistaminen ei ollut ajan puitteissa mahdollista. Haittapuolina olivat virus-solususpensioiden mahdolliset sytotoksiset vaikutukset soluille, joita pyrittiin estämään tekemällä laimeita suspensioita tai käyttämällä suspensioiden supernatantteja.

HeLa (cervix epithelial adenocarcinoma) on rinoviruskasvatuksissa käytettävä standardi solumalli¹⁰. Soluja kasvatettiin DMEM-mediumissa, johon oli lisätty 10 % seerumia FCS (fetal calf serum) ja gentamycin-antibiootti (200µl/L; 20 mg/ml). Käytössä olleet pasaasit, P-37 – P-57. HeLa-solujen viljely tehtiin 260 ml kasvatusmaljoilla. Solujen irrotus tehtiin 0,02 %:lla Versene-liuoksella. Jakosuhte uuteen kasvatukseen oli 1/10.

-*Human bronchial epithelial* (16HBE14o⁻) on hengitystiekanavien mallisolu¹¹ ja hankittu Kaliforniasta (California Pacific Medical Center Research Institute, University of California, San Francisco, USA). Solujen kasvatus tehtiin MEM-mediumissa (minimal essential medium), jossa oli 7 % FCS. Viljely tehtiin 260 ml kasvatusmaljoilla, joiden muovipinta oli päällystetty ekstrasellulaarisilla matrix-proteiineilla (kollageeni, fibronektiini). Käytössä olleet pasaasit, p2.42 – p2.51. Solujen irrotus tehtiin Trypsiinin 0,02 % ja Versenen 0,02 % seoksella 1/1. Jakosuhte uuteen kasvatukseen oli 1/6-1/4.

Molemmat solut kasvatettiin 37 °C lämpötilassa ja 5 % hiilidioksidi-ilmakehässä.

Työssä käytetyt virustyyppit:

- HRV 1-99 (Human rhinovirus); rinovirustyyppit
- CBV3 (coxsackie B virus); ihmisen enterovirus B-lajin serotyyppi, joka sitoutuu CAR-reseptoriin.

-CAV9 (coxsackie B virus); ihmisen enterovirus B-lajin serotyyppi, joka sitoutuu aV-integriini-reseptoriin.

-CAV21 (coxsackie C virus); ihmisen enterovirus C-lajin serotyyppi, joka sitoutuu ICAM-1-reseptoriin.

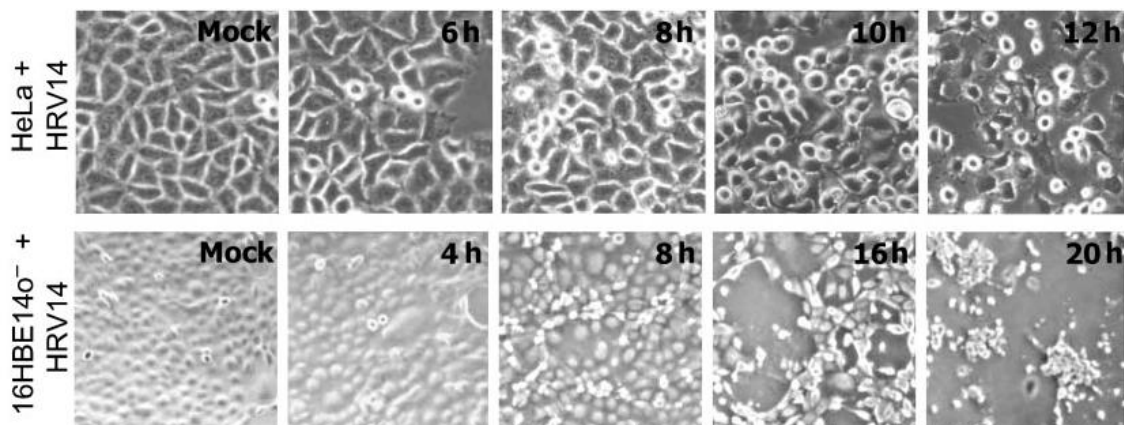
Virukset olivat joko HeLa- tai HBE-soluissa ja näitä virus-solususpensioita säilytettiin -70 °C lämpötilassa.

4.1 Virustitraus

Virustitraukset suoritettiin 96-kuoppalevyllä. Kuoppaan pipetoitiin solususpensio sopivassa mediumissa, yleensä 200 µl ja sen annettiin kasvaa, niin että suurin osa pohjasta oli solujen peitossa. Virusta sisältävää solususpensiota pipetoitiin reunimmaiseen kuoppaan ja siitä kuopasta pipetoitiin 10 µl seuraavaan kuoppaan ja siitä 10 µl seuraavaan jne. Viruksia inkuboitiin 33 °C lämpötilassa ja 5 % hiilidioksidi-ilmakehässä.

Näin saatiin joko 8 tai 12 kuoppaa sisältävä titraussarja, josta voitiin päätellä näytteen infektiivisyys ja viruspitoisuus. Menetelmällä ei pysty määrittämään absoluuttisia viruspitoisuuksia, mutta sillä pystyi vertaamaan eri näytteiden infektiivisyyksiä keskenään. Menetelmällä pystyi myös tutkimaan infektoiko virukset ollenkaan soluja, kun referenssinä käytettiin soluja, jotka infektoituvat.

Titrausta seurattiin tarkastelemalla solujen kuntoa ja vertailemalla niitä käsittelemättömiin soluihin. Vertailu tehtiin mikroskoopilla ja tarkastelu perustui pääsääntöisesti näköhavaintoihin. Oletus oli, että HeLa-soluissa tulee ns. CPE (cytopathic effect) eli solut pyöristyvät ja irtoavat infektion seurauksena. HBE-soluissa CPE ilmenee ennemminkin jonkinlaisena kuroumana. Kuvassa 1 nähdään miten infektio etenee ja useampi solu muuttuu muotoaan ja lopulta hajoaa. Tutkimuksessa, josta kuva on käytetty HRV14-serotyyppiä ja se oli puhdistettu, eli virusta on lisätty enemmän soluille, kun solususpensioita käyttämällä.⁹



Kuva 1 Infektion eteneminen soluissa.

Solujen kunnan pystyy määrittämään myös erilaisilla värjäyksillä, kuten myöhemmin tulee ilmi, mutta kyseinen titraus päättyy silloin siihen.

4.2 RNA:n eristys ja qRT-PCR

Näytteiden valmistus: Näytteiden valmistuksessa käytettiin E.Z.N.A™ –kittiä. Näytettä otettiin 50 µl ja laimennettiin 150 µl PBS:llä. Saatuun liuokseen lisättiin QLV-puskurin ja carrier RNA:n seosta 500 µl. Seosta vorteksoitiin 30 s, jonka jälkeen siihen lisättiin 350 µl puhdasta etanolia. Näyte vorteksoitiin uudelleen ja imeytettiin Hibind® RNA-kolonneihin. Kolonnia pestiin RWB-puskurilla, joka oli laimennettu etanolilla. Kolonni spinnattiin kuivaksi ja kolonneihin tarttunut RNA liuotettiin 50 µl DEPC-käsitellyllä vedellä. Näyte koko monistusta varten oli 10 µl.¹²

Taulukko 1 PCR-monistuksen vaiheet ja niiden kestot.

Aloitus	95 °C	10 min
Step 1	95 °C	15 sek
Step 2	65 °C	20 sek
Step 3	72 °C	40 sek
Loppu	95 °C	15 sek

4.3 Hoechst/SytoxOrange-värjäys

Solujen kuntoa voidaan tutkia Hoechst/SytoxOrange-värjäyksellä. Menetelmä perustuu siihen, että Hoechst-väri värjää kaikkien solujen tumat ja SytoxOrange-väri värjää huonokuntoisten/sairaiden solujen tumat. Vertaamalla kyseisiä tuloksia (Hoechst / SytoxOrange) vertailusoluihin, jotka on terveitä, saadaan suhdeluku, joka kertoo solujen kunnon.

Värjäykset voidaan tehdä samassa kuopassa, joten saadaan suhde samasta määrästä soluja. Kyseiset väriaineet absorboivat valoa eri aallonpituuksilla ja siksi eivät häiritse toisiaan. SytoxOrange, abs/em : 547/570 nm, kun se on sitoutunut DNA:han¹³. Hoechst väri absorboi 278 nm. Mittaukset tehtiin Victor³ 1420 Multilabel counterilla.

Näytteiden valmistus: Mediumit imetään pois ja lisätään 70 µl värien seosta kuoppaan. (SytoxOrange 1:3000 + Hoechst 33342, Sigma 13-2261, 1 mg/ml. 1:1000 + TBS pH 7,5). Ravistellaan 30 min valolta suojattuna RT ravistelijalla. Poistetaan värit ja lisätään 100 µl TBS / kuoppa.

4.4 ApoTox-Glo™ Triplex analyysi¹⁴

Triplex-analyysillä pystytään tekemään samasta näytteestä kolme eri määrittystä. Näytteestä voidaan määrittää solujen viabiliteetti eli elinkelpoisuus, sytotoksisuus ja kaspasiaktiivisuus. Kaspasit ovat entsyymejä, joita erittyy kun solu ajautuu apoptoosiin eli ohjelmoituun solukuolemaan. Kaspaseja erittyy soluun erityisesti silloin, kun solu on infektoitunut ja se yrittää puolustautua

tuhoamalla itsensä. Solu voi kuolla myös nekroosiin, jos se altistuu solulle liian rajuille ulkoisille olosuhteille.¹⁵ Testi havaitsee kaspasi 3 ja 7.

Määrittystä varten esikoutatulle 96-kuoppalevyllä viljeltiin HBE-soluja. Mittauksia varten jokaista näytettä tehtiin kolme rinnakkaiskuoppaa. Vertailua varten tehtiin kolme sarjaa, joista yhdessä ei ollut soluja lainkaan, toisessa solut kasvoivat normaalisti ja kolmas käsiteltiin metyyli-beta-syklodekstriinillä, jonka tiedetään vaurioittavan solua.

Mittaukset tehtiin samassa näyttetilavuudessa, joka oli yksi 96-kuoppalevyn kuoppa. Kasvatuksen jälkeen kuoppiin laitettiin 100 µl uutta mediumia. Siihen lisättiin ensin kitin mukana tulevaa seosta, jossa oli GF-AFC ja bis-AAFR110 substraattia ja 2,0 ml näytepuskuria yhteensä 20 µl. Pienen ravistelun (300-500 rpm, 30 s) ja 30 min inkuboinnin (37 °C) jälkeen voitiin tehdä fluorosenssi mittaukset, elikelpoisuus $405_{Ex}/505_{Em}$ ja sytotoksisuus $485_{Ex}/520_{Em}$. Kaspasi määrittäystä varten lisättiin vielä 100 µl Caspase-Glo[®] 3/7 reagenssia, sekoitettiin kuten edellä ja inkuboitiin huoneenlämmössä 30 minuuttia ja mitattiin luminesenssi.

5 Tulokset

5.1 Rinovirusserotyyppien infektiivisyys HeLa- ja HBE-soluissa

Koska tutkittiin 99 eri virusta, niin ei ollut mahdollisuutta käyttää puhdistettuja näytteitä. Tämän johdosta, tehtiin soluumppejä, joiden infektiivisyys testattiin ensin HeLa-soluissa ja mikäli tämä oli hyvä, niin vastaavaa ympäriä käytettiin HBE-soluissa.

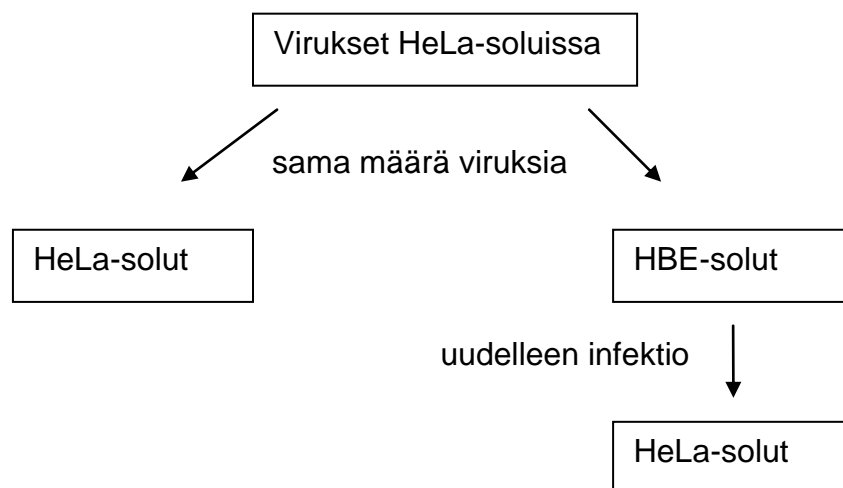
Aluksi tutkittiin rinovirusten infektiivisyyttä HBE-soluilta HeLa-soluihin. Rinovirusilla 1a, 1b, 2-99 aiemmin infektoiduista HBE-soluista otetuista näytteistä titrattiin HeLa-soluille infektiosarja, josta tarkasteltiin virusten infektiivisyyttä. Läheskään kaikista näytteistä virus ei lähtenyt kasvamaan HeLa-soluilla. Titraukset suoritettiin 96-kuoppalevyillä. Levyllä yhdelle riville tuli kahdeksan laimennosta, joista tulkittiin virusten infektiivisyys. Rinnakkainen määrittäminen taulukossa on tehty eri soluista. Kyseisissä soluissa on todennäköisesti eri määrä virusta.

Taulukko 2 Virustitraukset HBE soluilla 1-100. Numero; HRV-serotyyppi, inf;
infektion eteneminen (maksimi 8)

Nro.	inf.	Nro.	inf.	Nro.	inf.	Nro.	inf.	Nro.	inf.
1a	2/-	21	-	42	1	63	-	84	2
1b	-	22	-	43	-	64	-	85	1
2	-	23	-	44	-	65	-	86	4
3	2/4	24	-	45	-	66	-	87	-
4	1/1	25	-	46	-/1	67	-	88	-
5	2	26	2	47	-	68	1	89	-
6	1	27	2	48	4/4	69	8/8	90	-
7	-	28	-	49	-	70	3/8	91	2/5
8	-	29	-	50	-	71	-	92	5
9	-	30	-	51	-	72	1/2	93	1/3
10	-	31	-	52	4/4	73	-	94	-
11	-	32	-	53	-	74	-	95	-
12	-	33	-	54	-	75	-	96	-
13	-	34	-	55	-	76	-	97	1
14	2/3	35	2/3	56	-	77	-	98	-
15	-	36	-	57	-	78	-	99	2/2
16	-/1	37	3/4	58	-	79	1	100	-/-
17	2/4	38	-	59	-	80	-		
18	-	39	-	60	-	81	-		
19	-	40	-	61	-	82	-		
20	-	41	-	62	-	83	2		

Listasta valittiin jatkotarkasteluun ne virukset, jotka aiheuttivat uudelleen infektion HeLa-soluilla. Kyseiset virukset vielä titrattiin 96-kuoppalevyille uudelleen HeLa-soluilta HeLa-soluille, jolloin virusymppeä saatiin korkeampaan tiitteriin. Kuoppalevyiltä pyrittiin keräämään uudelleen kasvatetut virukset vasta virustitrauksen kolmannesta tai sen jälkeen olevasta kuopasta, koska haluttiin varmistua, että solukuolemat ovat aiheutuneet viruksista eikä solususpension sytotoksisuudesta, mikä usein näkyy ensimmäisen kuopan solujen nopeana kuolemisenä.

Valitusta määrästä viruksia infektoitiin HeLa- ja HBE-soluja ja HBE-soluilta tehtiin vielä uudelleen infektointi HeLa-soluille, Kuvio 1. Täten samalla varmistettiin alkuperäisen 1-99 infektioiden listaa ja supistettua edelleen tutkittavien virusten määrää. Taulukossa 3. esitettävään uudelleeninfektioon otettiin vain ne, jotka antoivat kunnon vasteen ensimmäisellä infektiokerralla. Taulukossa 3 samassa ruudussa olevat luvut ovat titrausten rinnakkaismääritykset ja toiston tulokset. Maksimaalinen infektiivisyys havaittiin kuopassa 4.



Kuvio 1. Virusten infektiokaavio.

Taulukko 3 Virusten infektiot ja uudelleen infektiot. Uudelleen infektoinnissa lähteenä oli HBE-solut. (maksimi kuopassa 4)

Nro.	Infektointi HeLa	infektointi HBE	uudelleen inf. HeLa
1a	1/-	-/-	-/-
1b	2/2	-/-	-
2	4/4	1/1	-
3	4/4	1/1	1/2
4	1/1	-/-	-/-
5	2/2	1/1	1/1
6	1/1	-/-	
7	1/1	-/-	-/-
14	4/4	1/1	4/4
16	4/4	-/-	1/1
17	4/4	1/1	1/3
18	2/2	-/-	
26	2/2	1/1	1/2
35	4/4	1/1	2/2
37	4/4	-/-	2/4
42	4/4	1/1	1/1
48	4/4	1/1	2/4
49	2/2	1/-	-/-
52	4/4	1/1	½
53	3/3	-/-	-
54	2/2	1/1	-/-
69	4/4	4/4	4/4
70	4/4	1/1	4/4
72	4/4	1/-	1/1
77	-/-	-/-	
79	1/1	1/1	-/-
83	2/2	1/1	2/1
84	4/4	1/1	4/4
85	4/4	1/-	3/4
86	4/4	-/-	4/3
87	2/2	-/-	-
91	4/4	1/-	2/2
92	4/3	1/1	-/-
93	3/2	-/-	1/1
97	3/3	1/1	1/2
98	4/4	-/-	1/2
99	2/2	1/1	2

Osasta viruksista tehtiin uudelleenmääritys, koska alkuperäinen määritys ei antanut selkeää vastetta tai näytteen vaste oli hyvä ja se haluttiin varmistaa. Mukana oli myös negatiivisia kontrollinäytteitä, joiden ei ollut tarkoituskaan antaa jatkoviljelyssä mitään vastetta. Toisto tehtiin serotyypeillä 1a, 4, 5, 6, 7,

14, 18, 26, 37, 42, 53, 54, 77, 79, 83, 85, 87 ja 99. Taulukossa 4. on infektoinneista tehty rinnakkaismääritykset. Titrausta tehtiin neljän kuopan verran. Uudelleen infektoinnissa HeLa soluille ei tehty rinnakkaismääritystä.

Taulukko 4 Virusten infektiot ja uudelleen infektiot (maksimi 4)

Nro.	Infektointi HeLa	infektointi HBE	uudelleen inf. HeLa
1a	2/2	-/-	
toisto	1/1	-/-	
4	1/1	-/-	
toisto	-/-	-/-	
5	2/2	-/-	
toisto	1/1	1/1	1
6	2/1	-/-	
toisto	1/1	-/-	
7	2/2	-/-	
toisto	-/-	-/-	-
14	4/4	-/-	
toisto	4/4	1/1	3
18	4/4	-/-	
toisto	2/2	-/-	-
26	4/3	-/-	
toisto	2/2	1/1	1
37	4/4	-/-	
toisto	3/2	-/-	2
42	2/3	-/-	
toisto	2/2	-/-	-
53	4/4	-/-	
toisto	3/3	-/-	-
54	1/1	-/-	
toisto	1/1	-/-	
77	2/2	-/-	
toisto	-/-	-/-	
79	1/1	-/-	
toisto	1/1	-/-	-
83	2/2	-/-	
toisto	1/1	2/2	1
85	4/4	-/-	
toisto	4/4	-/-	2
87	4/3	-/-	
toisto	2/2	-/-	-
99	2/2	-/-	
toisto	2/2	1/1	2

Näytteistä 1a, 4, 5, 6, 7, 18, 26, 42, 54, 79, 83 ja 99 oli mukana, koska niillä tulokset eivät olleet tarpeeksi selkeitä. Näyte 14 oli mukana, koska siitä on tehty paljon tutkimuksia ja se toimi mukana kontrollinäytteenä. Näytteet 37, ja 85 olivat mukana, koska niillä HBE-soluissa ei tapahdu merkittävää muutosta,

mutta uudelleen infektoitaessa HeLa-solut infektoituivat. Virukset 18, 53, 77 ja 87 toimivat negatiivisena kontrollina, joiden jatkoviljelyssä HBE-soluille ja siitä eteenpäin HeLa-soluille ei pitäisi tulla mitään reaktiota.

Taulukossa 4 on näytteillä tehty kaksi kasvatusta, koska ensimmäisen kasvatuksen tuloksena HBE-soluilla ei tapahtunut lainkaan virusten kasvua, kyseinen kasvatustapa jouduttiin uusimaan, eikä ensimmäisestä kerrasta tehty uudelleen kasvatusta HeLa-soluille.

Virusten riittävyden takaamiseksi tehtiin uudelleen kasvatusta serotyypeillä 1a, 4, 5, 6, 7, 14, 18, 26, 37, 42, 53, 54, 77, 79, 83, 85, 87 ja 99. Kyseisistä viruksista 1a, 4, 6, 54, 77 eivät kasvaneet kunnolla johtuen ehkä alkuperäisestä näytteestä tai näytteen käsittelystä.

Virusten viljely HeLa-solujen kanssa rinnakkain tehtiin, koska haluttiin varmistaa miten infektiivistä virusta HBE-soluille oli laitettu. HeLa-soluja pestiin kerran PBS:llä (200 µl) tunti infektion jälkeen. HBE-soluja pestiin 5 x PBS:llä kahden tunnin infektion jälkeen. Pesuilla haluttiin välttää solujen sytotoksista efektiä, jolloin solukuolemien syynä olisi pelkästään virusinfektio.

Taulukossa 5 on yhteenveto tarkemmin tutkituista viruksista.

Taulukko 5 Yhteenveto infektiivisyyksistä

Nro.	Infektointi HeLa	infektointi HBE	uudelleen inf. HeLa
1a	x	-	-
1b	x	-	-
2	xx	x	-
3	xx	x	x
4	x	-	-
5	x	x	x
6	x	-	0
7	x	-	-
14	xx	x	xx
16	xx	-	x
17	xx	x	x
18	x	-	0
26	x	x	x
35	xx	x	x
37	xx	-	xx
42	xx	x	x
48	xx	x	xx
49	x	x	-
52	xx	x	x
53	xx	-	-
54	x	x	-
69	xx	xx	xx
70	xx	x	xx
72	xx	x	x
77	-	-	0
79	x	x	-
83	x	x	x
84	xx	x	xx
85	xx	x	xx
86	xx	-	xx
87	x	-	-
91	xx	x	x
92	xx	x	-
93	xx	-	x
97	xx	x	x
98	xx	-	x
99	x	x	x

- = ei selkeää CPE:tä (infektiota) x = infektoi selkeästi

0 = ei tutkittu

xx = infektoi voimakkaasti

5.2 Infektioajan määrittäminen

Työn tarkoituksena oli tutkia kuinka kauan virukselta menee solujen infektoimiseen. Perinteisesti virusinfektio mallisoluihin on hyvin nopea tapahtuma, mutta on tehty havaintoja, joissa natiivimmat solut infektoituvat hitaammin ja näin voi tapahtua myös todellisessa infektiotapahtumassa esim. keuhkoputkissa. Vertailtavina aikoina olivat 2h ja 24h. Kyseisen ajan solukko on altistettuna viruksia sisältävälle solususpensiolle. Virusten infektioajan merkitystä tutkittiin neljällä viruksella HBE-soluilla. Virukset olivat 14, 69, 84 ja 92. Kyseiset virukset valittiin, koska niiden kasvu oli voimakasta HBE-soluilla. Infektioajan jälkeen kuopat pestiin 5 x (200 µl) PBS:llä ja lisättiin uudet mediumit (200 µl) kuoppiin. Solukkoa tarkasteltiin silmämääräisesti kolmen vuorokauden jälkeen taulukko 3. Tulosten perusteella infektioajalla on merkitystä infektion voimakkuuteen, koska 24h infektoituneet solut olivat selkeästi huonommassa kunnossa, kuin 2h infektoituneet solut. Koska viruksella 69 infektio ero näkyy kuopissa 2 ja 3 voidaan olettaa, että kyseessä ei ole pelkästään solususpension aiheuttama sytotoksinen reaktio.

Taulukko 6 infektioajan vaikutus viruksilla 14, 69, 84 ja 92. 3 vkr.

14	2 h	1/1
14	24 h	1/1
69	2 h	2/2
69	24 h	3/3
84	2 h	-/-
84	24 h	1/1
92	2 h	-/-
92	24 h	1/1

Viruksista otettiin näytteet myös mahdollisia RT-PCR-analyysiä varten. Viruksista 14 ja 69 otettiin myös nolla-näyte, joka otettiin talteen kahden tunnin infektoinnin kohdalta pesujen jälkeen. Nolla näytteellä saadaan selville virusten lähtötaso, koska kahdessa tunnissa virukset eivät vielä ehdi lisääntyä, näytteessä on vain alkuperäinen soluun tarttunut määrä viruksia.

5.3 Kvantioinnit titraamalla

Titraamalla tehtyyn kvantitointiin pyrittiin saamaan mahdollisimman samanlaiset määrät viruksia eri näytteistä tai mahdollisimman samankaltaiset infektiivisyydet. Tutkittavilla viruksilla tehtiin titraus HeLa-soluilla ja sen perusteella määritettiin tuleva laimennos niin, että infektoitavat HBE-solut käsiteltäisiin suurin piirtein yhtä infektiivisellä virusmäärällä. Taulukko 4. Taulukosta näkee mitä viruksia käytettiin ja kuinka paljon virusta sisältävää solususpensiota laitettiin HeLa soluille ja miten pitkälle infektio eteni. Laimennos laskettiin niin, että yksi kuoppa vastaa 1/10 laimennosta. Suhteellinen kuoppa arvioitiin alkuperäisen tuloksen ja laimennoksen perusteella.

Taulukko 7 Virusten endpoint-titraus HeLa-soluilla ja uusi laimennos

Virus	alkuperäinen ymppe (μl)	kuinka pitkälle infektio eteni	laimennos	jatkossa käytettävä ymppe (μl)	suht. kuoppa
CBV-3	3	9	1/1000	3	6
CAV-21	5	2	1/1	20	3
HRV-14	20	5	1/1	20	5
HRV-69	10	8	1/100	10	6
HRV-84	10	5	1/1	10	5

Näytteet pipetoitiin HBE-soluille. Solujen annettiin infektoitua 2h, minkä jälkeen kuopat pestiin 5 x PBS:llä ja lisättiin 200 μl uutta mediumia. 0-näyte kerättiin talteen pesun jälkeen. Muut näytteet otettiin seuraavin väliajoin: 6 h, 24 h, 48 h, 72 h ja 96 h kohdalla. Jokaisella näytteenottokerralla otettiin myös rinnakkaisnäytteet.

Näytteet titrattiin HeLa soluilla 96-kuoppalevyillä kahdeksaan kuoppaan. Kuopasta otettiin tulokset kolmen ja neljän päivän infektion jälkeen. Taulukossa 5 on kuvattuna kuinka pitkälle infektiio oli edennyt 3 päivän/4 päivän jälkeen.

Taulukko 8 Aikasarjan endpoint-titraus HeLa-soluilla.

Aika	CBV-3	CAV-21	HRV-14	HRV-69	HRV-84
0	-/-	-/-	-/1	-/-	-/-
2h A	-/-	-/-	-/1	-/-	-/-
2h B	-/-	-/-	-/1	-/-	-/-
24h A	1 /2	1 /2	1 /2	2 /2	1 /2
24h B	1 /2	1 /2	1 /3	2 /2	1 /2
48h A	2 /3	2 /3	1 /2	4 /6	1 /2
48h B	2 /3	2 /3	1 /3	4 /6	1 /2
72h A	3 /4	2 /3	2 /3	7 /8	1 /2
72h B	3 /4	2 /3	2 /3	7 /8	1 /2
96h A	4 /6	2 /3	2 /3	8 /8	2 /3
96h B	4 /6	2 /3	2 /3	8 /8	2 /3

5.4 Kliiniset näytteet

Pientä määrää kliinisiä näytteitä viljeltiin HeLa- ja HBE-soluille, mutta havaittavaa kasvua ei nähty. Osalle näytteistä tehtiin RNA-monistus, jossa vertailtiin 0-näytettä solukasvatettuihin. Osa kliinisistä näytteistä oli C-ryhmän viruksia, jotka eivät kasvaneet kummassakaan solulinjassa.

Tulokset eivät olleet yllättäviä, koska kliinisten näytteiden virustitraukset eivät helposti anna positiivista tulosta.

5.5 ApoTox-Glo™ Triplex-analyysi

Sytotoksisuus-, viabiliteetti- ja kaspasimääritystä varten HBE-soluja infektoitiin HRV-14, HRV-37, HRV-53 ja HRV-69-viruksilla. Tuloksissa huomioitavaa on, että HRV-69 kohdalla suurin osa soluista oli kuollut ja liuosten vaihdon aikana voinut hävitä, jolloin mittaustarkkuus on epävarma.

Sytotoksisuusmittauksissa aallonpituuksien piti olla absorptio/emissio 485/520 nm, mutta mittauksissa käytettiin aallonpituuksia 485/535 nm. Kyseinen heitto ei tässä tapauksessa, koska emissio näkyy yhtäläillä mitatuilla aallonpituuksilla, kuin optimaalilla aallonpituuksilla. Korkeat sytotoksisuusarvot indikoivat sitä, että solut kuolevat ensisijaisesti nekroosin kautta.

Taulukko 9 Sytotoksisuus mittaukset 485/535 nm.

	Ref.	Ei käsit.	ei soluja	HRV-69	HRV-37	HRV-53	HRV-14
1.	3517744	367755	161659	204954	347142	259240	336679
2.	4328724	301630	154918	235670	345477	266451	240195
3.	3218874	288910	108763	169200	264431	261531	286773
ka.	3688447	319432	141780	203275	319017	262407	287882

Luminesenssimittauksilla saatiin mitattua kaspasien 3 ja 7 läsnäoloa. Kaspasien läsnäolo tarkoittaa yleensä sitä, että solut kuolevat apoptoosin kautta.

Taulukko 10 Luminesenssimittaukset

	Ref.	Ei käsit.	ei soluja	HRV-69	HRV-37	HRV-53	HRV-14
1.	7407	13084	2671	7371	16443	15267	20296
2.	8657	14041	3398	7397	17147	14303	12928
3.	7825	11379	1482	5288	15926	12878	16400
ka.	7963	12835	2517	6685	16505	14149	16541

Viabiliteetti-mittauksia varten piti aallonpituuksien olla 400/505 nm, mutta mittalaitteessa ei siinä vaiheessa ollut mitään sinne päinkään olevia filtereitä, joten viabiliteettimittaukset jäivät tekemättä.

6 Tulosten tarkastelu ja yhteenveto

Tämän tutkimuksen puitteissa tehdyissä kokeissa voi todeta, että vain osa rinovirusista infektoi HBE-keuhkoputkisoluja. Taulukossa 5 on listattuna virukset, jotka aiheuttavat muutoksen infektoituneissa soluissa. Taulukossa näkyy myös ne virukset, jotka infektoivat HBE-soluja, mutta eivät aiheuttaneet solumuutoksia. Tämä käy ilmi siitä, että jatkoviljelyssä HBE-solulyysaatissa oli infektiivistä virusta, joka infektoi HeLa-solut. Tutkimuksissa selvisi myös se, että infektiotaikalla, eli kuinka kauan solut ovat tekemisissä infektion alkuvaiheessa virusten kanssa on vaikutusta. Pitempi infektiotaika lisää infektiota. Tätä on tarkoitus jatkossa tutkia tarkemmin värjäämällä solut virusvasta-aineilla ja mikroskopoimalla niitä. Tulokset ovat sikäli merkittäviä, että on esitetty, että rinovirusinfektio ei välttämättä ole soluille tuhoisa eli solut eivät hajoa virusinfektion seurauksena, vaan virusinfektiosta seuraa immuunivaste, mistä johtuu haitalliset vaikutukset kuten keuhkoputkien supistuminen ja hengenahdistus. Tutkimuksessa määritettiin ne virustyyppit, jotka aiheuttavat näkyvän ja näkymättömän, mutta todellisen infektion ja näiden virusten kykyä indusoida immuunivasteita on jatkossa tarkoitus vertailla. Taulukosta 5 voidaan valita kuhunkin tarkoitukseen sopivat virukset.

Virusten infektionopeutta seurataan vertaamalla viruksen lisääntymistä ja indusoituja vasteita. Immuunivasteen muodostumista verrataan eri virusten välillä. Koska kyseessä on kokeellinen infektiomalli, on mielenkiintoista odottaa sellaisia tutkimuksia, joissa alahengitystievirukset on tyyhitetty ja edustaako nämä rinovirukset samoja virustyyppijä kuin mitä tässä työssä on havaittu ja erityisesti ovatko ne sytopaattisia vai eivät. Vastaavat tulokset ovat myös epidemisesti tärkeitä, koska tunnistamalla yleisimmät ja patogeenisimmat rinovirukset, voidaan yrittää kehittää täsmälääkkeitä ja jopa rokotteita tärkeimmille rinovirusille.

LÄHTEET

-
- ¹ Monto A S, *Am J Med.* Epidemiology of Viral Respiratory Infections. 2002;112(6A):4s-12s
- ² Monto A S, *Epidemiologic Reviews.* 1994 Vol 16, No. 2, 351-373.
- ³ <http://www.picornaviridae.com/>
- ⁴ Putnak R J ja Phillips B A, *Microbiological Reviews.* 1981 Vol 45. 287-315.
- ⁵ Ruuskanen O, Hyypiä T. Rhinovirus: is it really a relevant pathogen? In: Kimpen JLL, Ramilo O, eds. *The microbe-host in interface in respiratory tract infections*, p. 291-317. Englanti: Horizon Bioscience, 2005.
- ⁶ Lau S, Yip C, Woo P ja Yuen Kwok-yung. Human rhinovirus C: a newly discovered human rhinovirus species *Emerging Health Threats Journal* 2009 **3**:e2 doi: 10.3134/ehj.10.003
- ⁷ Gerve J et al. Cell. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. 1989 Vol 56. 829-847.
- ⁸ Ruuskanen O, Hyypiä T. Rhinovirus: is it really a relevant pathogen? In: Kimpen JLL, Ramilo O, eds. *The microbe-host in interface in respiratory tract infections*, p. 291-317. Englanti: Horizon Bioscience, 2005.
- ⁹ Renois F, Jacques J et al, *Virus Research*, Respiratory echovirus 30 and coxsackievirus B5 can induce production of RANTES, MCP-1 and IL-8 by human bronchial epithelial cells, 2010 Vol 152, 41-49
- ¹⁰ Deszcz L et al, *Journal of General Virology*, Apoptotic events induced by human rhinovirus infection. 2005 vol 86, 1379-1389
- ¹¹ Landecker H., *Culturing Life: How Cells became Technologies.* Harvard University Press, London, 135-138
- ¹² Winton et al, *Clinical & Experimental Allergy.* Cell lines of pulmonary and non-pulmonary origin as tools to study the effects of house dust mite proteinases on the regulation of epithelial permeability. 1998, Vol 28., 1273-1285
- ¹³ E.Z.N.A™ Vital RNA Kit Manual, March 2007
- ¹⁴ Molekular Probes, Product Information: Revised: 13-January-2001
- ¹⁵ ApoTox-Glo™ Triplex Assay Manual, USA 8/09
- ¹⁶ <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/solukuolema/>