

Pro gradu -tutkielma

ENTEROVIRUSTEN DETEKTIO HAIMAKUDOKSESTA *IN SITU* -HYBRIDISAATIOLLA JA IMMUNOFLUORESENSSIIN PERUSTUVALLA KAKSOISVÄRJÄYSMENETELMÄLLÄ

Teppo Haapaniemi



Jyväskylän yliopisto

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solubiologia

Elokuu 2010

ALKUSANAT

Tämä Pro gradu -tutkielma tehtiin Tampereen yliopiston lääketieteellisessä tiedekunnassa virologian yksikössä 2009 – 2010 välisenä aikana. Tutkielman kokeellinen osuus suoritettiin lääketieteellisen tiedekunnan virologian ja patologian yksiköissä.

Haluan kiittää ohjaajiani dosentti, FT Sisko Tauriaista ja FM Maarit Oikarista asiantuntevasta ohjauksesta, mielenkiintoisista keskusteluista sekä neuvoista. Haluan kiittää heitä myös ajasta ja kärsivällisyydestä vastata tutkielmaani liittyviin kysymyksiin ja ongelmiin. Lisäksi haluan kiittää biolääketieteen Professori Heikki Hyötyä kannustuksesta, neuvoista sekä mahdollisuudesta olla mukana tutkimusryhmässä.

Suuret kiitokset FM Sami Oikariselle koettimien suunnittelusta ja teknisestä tuesta. Lisäksi haluan kiittää laboratoriomestari Eeva Tolvasta sekä laboratorioanalyytikko Eini Eskolaa tuesta näytteenvalmistuksen eri vaiheissa. Osoitan kiitokseni myös ”työhuonekaverini” FM Hanna Honkaselle, jonka kanssa keskusteltiin mielenkiintoisista aiheista sekä biotekniikan opiskelija Milka Vuoksiolle, jonka kanssa pureuduttiin *in situ* -hybridisaation ongelmien ytimeen.

Lopuksi osoitan suurella lämmöllä kiitokseni puolisolleni FM Satu Luhtalalle kannustuksesta, asiantuntevista neuvoista sekä etenkin kärsivällisestä tuesta.

Tampereella, 02.08.2010

Teppo Haapaniemi

Tekijä:	Teppo Haapaniemi	
Tutkielman nimi:	Enterovirusten detektio haimakudoksesta <i>in situ</i> -hybridisaatiolla ja immunofluoresenssiin perustuvalla kaksoisvärjäysmenetelmällä	
English title:	Detection of enteroviruses in pancreas by <i>in situ</i> -hybridization and immunofluorescence double-staining	
Päivämäärä:	02.08.2010	Sivumäärä: 89+2
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Solubiologia	
Tutkielman ohjaajat:	Dosentti, FT Sisko Tauriainen ja FM Maarit Oikarinen	

Tiivistelmä:

Ihmistä infektoivat enterovirukset luokitellaan ihmisen enterovirus A-, B-, C- ja D -lajeihin sekä rinoviruslajeihin. Nämä lajit sisältävät runsaasti alalajeja, joita tunnetaan yli 200. Enterovirus on pieni, ikosaedraalinen, genomiltaan yksijuosteinen ja positiivissäikeinen RNA-virus, joka on yleinen taudinaiheuttaja kaikissa ikäryhmissä. Enterovirusinfektioiden epäillään olevan monien autoimmuunisairauksien patogeenin taustalla. Enterovirusinfektioita on todettu diabeetikoilta terveitä useammin monissa eri tutkimuksissa. Vaikka enterovirusinfektio on yhdistetty T1D:n patogeenisiin, ei enterovirusten osuutta sairauden puhkeamisessa ole kyetty täysin todistamaan. Enterovirusten ja T1D:n välisen epidemiologisen yhteyden osoittaminen on haastavaa, sillä tutkimuksia vaikeuttavat T1D:n oireeton, jopa vuosia kestävä esivaihe sekä haimakudosnäytteiden heikko saatavuus. Vaikka enterovirusdetektiossa immunohistokemialliset menetelmät (IHC) ja *in situ* -hybridisaatio (ISH) ovat osoittautuneet toimiviksi formaliinifiksattuja kudoksetäytteitä käytettäessä, tulee näitä menetelmiä edelleen kehittää detektio luotettavuuden varmistamiseksi. Tutkielman tarkoituksena oli vahvistaa enterovirusdetektio luotettavuutta suunnittelemillamme lajispesifisillä koettimilla sekä omassa laboratorio-samme tuotetuilla polyklonaalisilla enterovirusvasta-aineilla ja arvioida näiden soveltuvuutta enterovirusdetektioon haimakudoksesta. Tutkielman tarkoituksena oli myös selvittää tietoa enterovirusten isäntäsoluspesifisyydestä ihmisen haimakudoksessa. Tutkimuksessa näyttemateriaalina käytettiin formaliinifiksattuja ja parafiiniin valettuja ihmisten haimakudosleikkeitä ja Balb/c-hiirten monikudosleikkeitä. Enterovirusvasta-aineina käytettiin polyklonaalisia kanin vasta-aineita, jotka olivat suunniteltu coxsackievirus A16 (CAV16)-, coxsackievirus B3 (CBV3)- ja echovirus 11 -spesifisiksi. Tutkimuksessa käytettiin ISH-menetelmää sekä kahta erilaista IHC-menetelmää: immunoperoksidaasivärjäystä sekä immunofluoresenssiin perustuvaa kaksoisvärjäystä (IFA). Immunoperoksidaasivärjäyksen avulla seulottiin enterovirusia ihmisen haimakudosleikkeistä (n=12). Viruspositiivisuutta löydettiin kolmesta haimakudoksesta CAV16 spesifisellä vasta-aineella. CBV3- ja Echo11 -vasta-aineilla positiivisuutta ei löydetty. CAV16 saarekesoluspesifisyyden määrittämiseksi IFA toteutettiin käyttäen CAV16 vasta-ainetta sekä kaupallisia vasta-aineita saarekesoluspesifisiä peptidihormoneja insuliinia, glukagonia ja somatostatiinia vastaan. ISH-määrittystä varten enteroviruslajispesifiset DNA-koettimet suunniteltiin sitoutumaan enterovirusgenomin konservoituneille 2C- ja 3D -geenialueille. Lisäksi suunniteltiin koetin, joka sitoutuu enteroviruksen negatiiviseen RNA-juosteeseen, jota virus käyttää templaattina replikaatiossaan. ISH-menetelmä optimoitiin CBV3 infektoidun Balb/c -hiiren kudoksetäytteillä. IFA:n mukaan CAV16 infektio rajoittuu haimakudoksessa ainoastaan saarekkeiden insuliinia tuottaviin β -soluihin ja tulokset tukevat yleistä käsitystä enterovirusinfektion β -soluspesifisyydestä. Löytö on merkittävä sillä CAV16 saarekesoluspesifisyyttä ei ole aiemmin osoitettu. Ainoastaan enterovirus B-lajispesifiset koettimet sekä enteroviruksen negatiiviseen juosteeseen sitoutuva koetin, tunnistivat CBV3-virusta hiiren haimakudoksesta, mikä viittaa lajispesifiseen hybridisoitumiseen. Koettimien yhtäaikaista käyttöä samassa ISH-reaktiossa ei häirinyt enterovirus B-lajispesifisten koettimien hybridisoitumista. Itsesuunnitellut koettimet sekä itse tuotetut vasta-aineet lisäävät enterovirusdetektio luotettavuutta merkittävästi, varsinkin jos niitä käytetään kaupallisten koettimien ja vasta-aineiden rinnalla.

Avainsanat: Enterovirus, tyypin 1 diabetes, T1D, enterovirusdetektio, *in situ* -hybridisaatio, immunofluoresenssi, haima, CAV16, CBV3, Echo11.

Author: Teppo Haapaniemi
Title of thesis: Detection of enteroviruses in pancreas by *in situ* -hybridization and immunofluorescence double-staining
Finnish title: Enterovirusten detektio haimakudoksesta *in situ* -hybridisaatiolla ja immunofluoresenssiin perustuvalla kaksoisvärjäysmenetelmällä
Date: 02.08.2010 **Pages:** 89+2
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell Biology
Supervisors: Sisko Tauriainen, Ph.D. Docent and Maarit Oikarinen, M.Sc.

Abstract:

Human enteroviruses are classified into human enterovirus A, B, C and D species and a group of human rhinoviruses A, B and C. These enterovirus species consist of over 200 different serotypes. Enterovirus is small. It has an icosahedral symmetry and a single positive-strand genomic RNA. Enteroviruses induce a wide range of clinical manifestations and infections are common in all age groups. There is prevailing hypothesis that enteroviruses have a significant role in the pathogenesis of certain autoimmunity diseases. Enterovirus infections have been connected to the pathogenesis of type 1 diabetes (T1D), but the presence of enteroviruses in the human pancreas is still inadequately confirmed. This epidemiological connection between enteroviruses and T1D is very challenging to prove because the symptomless prediabetic autoimmunity leading of T1D can start years before symptoms appear. Additionally, lack of human pancreas specimens has been a major problem in this research field. Although immunohistochemistry (IHC) and *in situ* -hybridization (ISH) methods have been used in enterovirus detection, there is a lack of accurate and reliable detection methods for formalin-fixed paraffin-embedded pancreatic tissue samples. The aim of this study was to reinforce reliability of enterovirus detection in pancreatic specimens by using non-commercial in-house enterovirus antibodies and self-designed enterovirus probes and to clarify the cell specificity of enterovirus in infected human pancreas. In this study ISH and indirect immunofluorescence double-staining (IFA) methods were optimised for detection of enteroviruses in the pancreas. Additionally, immunoperoxidase staining was used to screen enterovirus positivity from pancreas specimens (n=12) using in-house polyclonal coxsackievirus A16 (CAV16), coxsackievirus B3 (CBV3) and echovirus 11 antibodies. Enterovirus probe which detects negative strand RNA of all human enteroviruses were designed. Species specific probes were designed to hybridize to the conserved 2C or 3D regions in the enterovirus genome. ISH assays were optimised for these in-house DNA probes using tissue sections derived from CBV3 infected mice (BALB/c). Enterovirus positivity was detected in three pancreatic samples using CAV16-antibody. No positivity was detected using CBV3 and Echo11 antibodies. IFA was utilised to demonstrate CAV16 localization and host cell specificity in pancreatic tissues from healthy human organ donors by using CAV16 antibody together with antibodies against islet cell specific hormones insulin, glucagon and somatostatin. CAV16 capsid proteins were only found in the human insulin-producing β -cells of Langerhans islets by IFA. Results of IFA confirm the concept that pancreatic enterovirus infection is restricted to β -cells. This finding is significant because islet cell specificity of CAV16 has not been shown earlier. Earlier results demonstrating autoimmune destruction of β -cells in diabetic pancreas together with the present results may elucidate the epidemiological connection between enterovirus infection and T1D. Enterovirus group-B -specific and enteronegative probes exploited in ISH were able to identify conserved sequences of CBV3. Other enterovirus specific probes did not detect CBV3 RNA. Addition of up to 3 more probes to the B-group specific ISH probe, did not interfere with hybridization. Usage of self-designed probes and in-house antibodies together with commercial ones could offer more versatile applications and reliable enterovirus detection.

Keywords: Enterovirus, type 1 diabetes, T1D, enterovirus detection, *in situ* -hybridization, immunofluorescence, pancreas, CAV16, CBV3, Echo11.

SISÄLLYSLUETTELO

ALKUSANAT
PRO GRADU -TUTKIELMAN TIIVISTELMÄ
ABSTRACT OF MASTER'S THESIS
SISÄLLYSLUETTELO
LYHENTEET

1 JOHDANTO	8
1.1 Enterovirukset.....	8
1.1.1 Genomi ja geenien ilmentäminen	9
1.1.2 Enterovirusinfektioiden epidemiologia ja patogeneesi.....	12
1.2 Tyypin 1 diabetes	13
1.2.1 Altistavat perintö- ja ympäristötekijät	16
1.2.2 Tyypin 1 diabeteksen luokittelu.....	17
1.3 Enterovirusinfektioiden ja T1D:n välinen yhteys.....	19
1.3.1 Autovasta-aineet ja autoimmuniprosessin syntymekanismit.....	22
1.3.2 Onko kroonisella enterovirusinfektiolla yhteys tyypin 1 diabetekseen?	24
1.4 Enterovirusten detektointi kudoksista.....	25
1.4.1 Nukleinihapposekvenssin tunnistamisen perustuvat detektiomenetelmät.....	26
1.4.1.1 Käänteiskopiointiin perustuva RT-PCR.....	27
1.4.1.2 In situ -hybridisaatio.....	28
1.4.1.3 Kudoksetäällä tehtävät PCR -reaktiot.....	30
1.4.2 Antigeenien tunnistamiseen perustuvat detektiomenetelmät.....	31
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	36
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	37
3.1 Kudoksetäytteet ja näytteiden valmistus	37
3.2 DNA-koettimet ja vasta-aineet	38
3.3 Dakon 5-D8/1-vasta-aineen epitoopin rinnastus BLAST-työkalulla.....	40
3.4 Immunohistokemiallinen peroksidaasivärjäys	41
3.5 Fluoresenssiin perustuva immunohistokemiallinen kaksoisvärjäys	42
3.6 In situ -hybridisaatio ja sen optimointi.....	45
3.7 Näytteiden analysointi	49

4 TULOKSET	52
4.1 Immunoperoksidaasivärjäys.....	52
4.2 Immunofluoresenssiin perustuvan kaksoisvärjäyksen optimointi.....	55
4.3 Cocksackievirus A16:n saarekesoluspesifisyyden määrittäminen	56
4.4 ISH:n ja koetinpitoisuuksien optimointi hiiren kudoksilla	58
4.5 Enteroviruskoettimien optimointi: signaalin vahvuuden ja lajispesifisyyden määrittäminen	59
4.6 In situ -hybridisaatio ihmisen haimakudoksilla.....	63
4.7 Enterovirusvasta-aineen 5-D8/1 sitoutumiskohdan rinnastus.....	64
4.8 β -solujen suhteellisen osuuden määrittäminen.....	64
5 TULOSTEN TARKASTELU	66
5.1 Immunovärjykset haimanäytteistä	67
5.2 In situ -hybridisaation optimointi suunnittelemllemme koettimille.....	71
5.3 β -solujen suhteellisen osuuden määrittäminen.....	77
5.4 Tulosten merkitys	77
6 LÄHTEET	79
LIITTEET	90
Liite 1 Immunoperoksidaasivärjäyksessä käytetty värjäysohjelma	90
Liite 2 Kudosprosessointiohjelmat	91

LYHENTEET

CAV	<i>Coxsackievirus A</i>
CAV16	<i>Coxsackievirus A16</i>
CBV	<i>Coxsackievirus B</i>
CBV3	<i>Coxsackievirus B3</i>
CBV4	<i>Coxsackievirus B4</i>
CRE	<i>cis-aktivoiva replikaatioelementti</i> (Engl. <i>cis-acting replication element</i>)
DAB	<i>3,3'-diaminobentsidiinitetrahydrokloridi</i>
Echo11	<i>Echovirus 11</i>
HLA	<i>Ihmisen leukosyyttiantigeeni</i>
HRP	<i>Piparjuuren peroksidaasi</i>
IHC	<i>Immunohistokemia</i>
ISH	<i>In situ -hybridisaatio</i>
IRES	<i>Ribosomin sitoutumiskohta</i>
LADA	<i>Latentti aikuisten autoimmuuni diabetes</i>
T1AD	<i>Tyypin 1 autoimmuuni diabetes</i>
T1BD	<i>Tyypin 1 idiopaattinen diabetes</i>
T1D	<i>Tyypin 1 diabetes</i>
T2D	<i>Tyypin 2 diabetes</i>

1 JOHDANTO

Tyyppi 1 diabeteksen (T1D) etiologiaa on tutkittu tiiviisti useita vuosikymmeniä. T1D luokitellaan autoimmuunisairaudeksi, joka kehittyy immuunivasteesta haiman insuliinia tuottavia β -soluja kohtaan. Vallalla olevan käsityksen mukaan geneettisillä tekijöillä on taudin patogeneesissä merkittävä asema. Geneettisten tekijöiden ohella myös ympäristötekijöiden uskotaan olevan T1D:n patogeneesin käynnistymisen taustalla. Näyttöä ympäristötekijöiden ja T1D:n välisestä yhteydestä on saatu ja yhtenä todennäköisimmistä diabetogeenisistä ympäristötekijöistä pidetään enterovirusinfektioita.

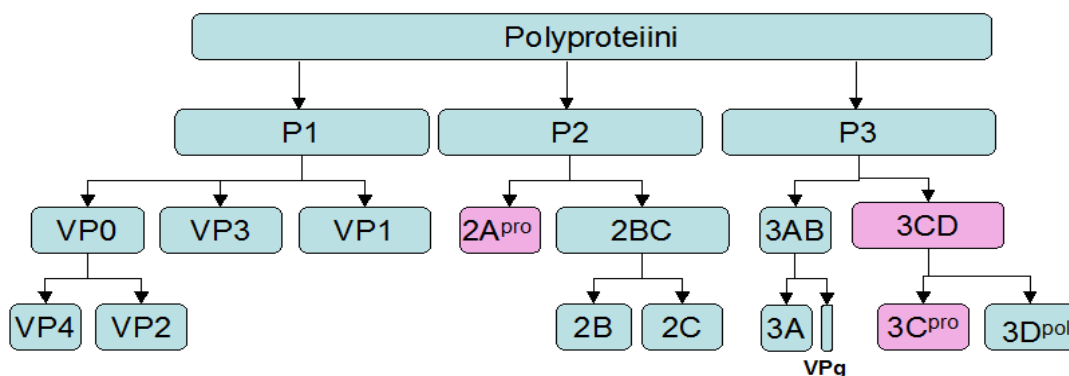
1.1 Enterovirukset

Enterovirukset kuuluvat pikornavirus-heimoon, joka jaetaan 12 eri sukuun. Enterovirukset jaetaan kymmeneen eri lajiin ja ihmistä infektoivat lajit jaetaan ihmisen enterovirus A-, B-, C-, D- ja rinovirus A-, B- ja C -lajeihin. Nämä lajit koostuvat lukuisista serotyypeistä, joita tunnetaan nykyisin yli 200. Uuden luokitusjärjestelmän mukaan enterovirusten tyyppilajina pidetään ihmisen enterovirus C:tä, johon kuuluvat muun muassa poliovirusserotyypit. Enterovirusten luokittelu enteroviruslajien ja serotyyppien välillä perustuu virusten eroihin pinta-antigeeneissä, genomissa, replikaatiostrategiassa ja fysiokemiallisissa ominaisuuksissa. Enterovirusgenomi on hyvin herkkä mutaatioille sekä geneettiselle rekombinaatiolle. Nämä aiheuttavat paljon vaihtelua geenisekvenssissä sekä geneettisessä informaatiossa, ja enterovirusten suurta serotyyppimäärää virussuvun ja viruslajin sisällä voidaan pitää evolutiivisena kehityksenä. Koko genomi ei ole mutaatioille ja geneettiselle rekombinaatiolle altis, vaan se sisältää konservoituneita alueita, joiden sekvenssi-identtisyys enteroviruslajien ja serotyyppien välillä on huomattavaa (ks. yleiskatsaus Hellen ja Wimmer, 1995; ks. yleiskatsaus Pallansch ja Roos, 2007). Nykyään yleisimpänä serotyyppityskäytönä käytetään VP1-kapsomeerin sekvenssointia. VP1-nukleotidi- ja aminohappotähdesekvenssien identtisuuden perusteella enterovirukset luokitellaan samaksi serotyypiksi, jos VP1-nukleotidisekvenssi on enemmän kuin 75 %:sti identtinen tai aminohappotähdesekvenssi enemmän kuin 88 %:sti identtinen (Oberste ym., 1999; Oberste ym., 2004a,b,c).

Enterovirukset ovat pieniä vaipattomia ja positiivissäikeisiä RNA-virusia. Enterovirusten RNA molekyyli on yksijuosteinen, 7000 – 7500 nukleotidiä pitkä ja sen replikaatio tapahtuu sytoplasmassa vesikkelimäisten replikaatiokompleksien sisällä. Enterovirusten kapsidi on ikosahedraalinen ja se rakentuu VP1, VP2, VP3 ja VP4 kapsomeerien muodostamista yksiköistä. Enteroviruksilla näitä yksiköitä on 60 ja jokainen yksikkö sisältää yhden kutakin kapsomeeriä. VP1-, VP2- ja VP3 -kapsomeerit muodostavat kapsidin ulkopinnan VP4-kapsomeerin sijaitessa kuoren sisäpinnalla. Kypsät virionit ovat halkaisijaltaan noin 30 nm (Muckelbauer ym., 1995). Enterovirusten kapsidi on happamissa olosuhteissa stabiili ja virukset säilyvät vielä infektiivisinä pH:n ollessa alle 3. Enterovirusten ensisijaisena replikaatiopaikkana pidetään ohutsuolen limakalvoa. Poikkeuksen tekevät rinovirukset, jotka luokitellaan uuden luokitusjärjestelmän mukaan osaksi enterovirussukua. Ne eivät säilytä infektiivisyyttään happamissa olosuhteissa, vaan replikoituvat hengitysteissä ja ovat yleisin ylähengitystieinfektioita aiheuttava viruslaji (ks. yleiskatsaus Racaniello, 2007).

1.1.1 Genomi ja geenien ilmentäminen

Enterovirusgenomin avoin lukuraami rakentuu P1-, P2- ja P3 -alueista. P1-alueella sijaitsevat viruksen VP1-, VP2-, VP3- ja VP4-kapsomeerien geenit. P2- ja P3 -alueet sisältävät viruksen rakenteeseen kuulumattomien proteiinien geenejä. Enterovirusgenomin 5'-päässä on RNA-juosteeseen kovalenttisesti kiinnittynyt VPg-proteiini sekä noin 750 nukleotidiä pitkä konservatiivinen proteiineja koodittamaton alue (ks. yleiskatsaus Bedard ja Semler, 2004). Tällä alueella ovat enteroviruksen translaatioon tarvittavat konsensussekvenssit sekä ribosomin sitoutumiskohta (IRES) (ks. yleiskatsaus Balvay ym., 2009). Myös genomin 3'-päässä oleva koodittamaton alue on konservoitunut. Alueella on tärkeä rooli enteroviruksen replikaatiossa, sillä se tarjoaa 3D-polymeraasille sitoutumiskohdan replikaation aloituksessa (Jacobson ym., 1993). Replikaation aloitukseen osallistuu lisäksi 3'-pään polyadeniinihantä (Silvestri ym., 2006). Ennen replikaation käynnistymistä genomi toimii templaattina proteiinisynteesille. Enteroviruksen genomi on positiivisjuosteinen, joten se toimii suoraan lähetti-RNA:na (ks. yleiskatsaus Bedard ja Semler, 2004). Lukuraami koodittaa suurta polyproteiinia (250 kDa) (Kuva 1). Proteolyttisen pilkkonnan seurauksena muodostuu viraalisia proteiineja sekä niiden prekursoreita, joilla on monia tehtäviä viruksen elinkierrossa (Taulukko 1).



Kuva 1. Enteroviraalisen polyproteiinin proteolyttinen pilkkoutuminen. Proteinaasit 2A^{pro}-sekä 3C^{pro} pilkkovat polyproteiinin. Pilkkoutumiskaskaadi tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa 2A^{pro} katkaisee polyproteiinin kolmeen osaan (P1, P2 ja P3). Toisessa vaiheessa 3C^{pro} sekä proteinaasin kaltainen 3CD-proteiini pilkkovat P1-, P2- ja P3 -prekursoriproteiinit pienemmiksi prekursoreiksi. Pilkkoutuminen jatkuu edelleen ja kolmannen vaiheen jälkeen se pysähtyy. Viruskapsidiin kuuluvat rakenteelliset proteiinit pilkkoutuvat P1-proteiinista (Muokattu lähteestä: ks. yleiskatsaus Bedard ja Semler, 2004).

Taulukko 1. Enterovirusproteiinit ja niiden tehtävät (Tiedot peräisin: ks. yleiskatsaus Bedard ja Semler, 2004; Pathak ym., 2008).

Viraalinen proteiini	Viraalisen proteiinin tai sen prekursorin tehtävät
VP1-VP4	Toimivat kapsidiproteiineina ja ovat tärkeässä roolissa viruksen tunkeutuessa soluun.
2A ^{pro}	Osallistuu polyproteiinin proteolyttiseen pilkkomiseen sekä hiljentää isäntäsolun translaation.
2BC ja 2B	Replikaation aloitus sekä viruksen elinkiertoon liittyvien sytoplasmisten vesikkelien indusointi.
2C	Solukalvon permeabilisointi lyyttisen kierron loppuvaiheessa. Sisältää NTPaasi aktiivisuutta.
3AB	Osallistuu RNA-replikaatioon muodostaen aloituskompleksin.
3CD	Osallistuu RNA-replikaatioon ja polyA-hännän muodostumiseen. Lisäksi proteolyttistä aktiivisuutta. Isäntäsolun transkription lamauttaminen tumassa.
3A	Osallistuu RNA-replikaatioon.
VPg (3B)	Sitoutuu enterovirusgenomin 5'-päähen ja osallistuu polyA-hännän muodostumiseen sekä replikaation ja translaation aloitukseen.
3C ^{pro}	Osallistuu proteolyttiseen polyproteiinin pilkkomiseen sekä replikaatioon.
3D ^{pol}	RNA Polymeerasi. Rooli replikaatiossa.

Enterovirusgenomi toimii suoraan lähetti-RNA:na, josta koodittuvat virusproteiinit. Translaatiota pidetään enterovirusten replikaation ensimmäisenä vaiheena ja siinä syntetisoidaan replikaatioon vaadittavat proteiinit. Virusgenomin replikaatio tapahtuu sytoplasmassa sijaitsevassa replikaatiokompleksissa negatiivisen juosteen kautta. Tämä negatiivinen juoste toimii templaattina uusien positiivisten RNA-juosteiden synteesissä. Tutkimusten mukaan infektoituneessa isäntäsolussa on negatiivista juostetta noin 50 – 100 kertaa positiivista juostetta vähemmän (Chehadeh ym., 2000; ks. yleiskatsaus Bedard ja Semler, 2004; ks.

yleiskatsaus Egger ja Bienz, 2005). Juosteen 5'-päähän kovalenttisesti sitoutunut VPg osallistuu sekä positiivisen että negatiivisen juosteen replikaatioon, ja sen vuorovaikutus urasiilitähteiden (uridyylaatio) kanssa on välttämätöntä positiivisen juosteen synteesin aloitukselle (ks. yleiskatsaus Bedard ja Semler, 2004). Vaikka enterovirusten replikaatio tapahtuu sytoplasmassa, on se tiiviissä vuorovaikutussuhteessa isäntäsolun tumaan. Enteroviruksen genomista transloitu 3CD-proteiini sisältää tumakuljetussignaalin, jonka avulla se siirtyy tumaan, inhiboi isäntäsolun transkription ja häiritsee tumakuljetusliikennettä (ks. yleiskatsaus Weidman ym., 2003; ks. yleiskatsaus Gustin, 2003).

Virusproteiinit sekä positiivinen RNA-genomi esiintyvät heti translaation jälkeen laajalle sytoplasmaan levinneinä. Translaation jälkeen sytoplasmassa alkaa kehittyä vesikkelejä, jotka kerääntyvät ja sulautuvat solulimakalvostoon. Vesikkeleistä muodostuu solulimakalvostossa replikaatiokomplekseja, joiden sisältö koostuu enteroviraalisesta negatiivisjuosteisesta RNA:sta sekä viraalisista proteiineista. Tämän jälkeen replikaatiokompleksit haakeutuvat tuman läheisyyteen, perinukleaariseen tilaan, jossa tapahtuu varsinainen positiivisen juosteen synteesi. Enterovirusinfektio aiheuttaa solussa suuria morfologisia muutoksia, sillä virus indusoi solun sisäisten membraanirakenteiden hajoamisen ja uudelleen järjestäytymisen (ks. yleiskatsaus Egger ja Bienz, 2005; ks. yleiskatsaus Belov ja Ehrenfeld, 2007; Belov ym., 2008).

Enterovirusten morfogeneesi alkaa virusproteiinien synteesin jälkeen. Sen ensimmäisessä vaiheessa VP0-, VP1- ja VP3 -kapsomeerit muodostavat protomeeriyksikön, jossa on rakenteena yksi kutakin kapsomeeriä. Protomeerit järjestäytyvät pentameereiksi, joissa on viisi yksikköä (Palmenberg, 1982). Pentameerit järjestäytyvät itsenäisesti tyhjiksi kapsideiksi, joihin RNA siirtyy myöhemmin. Pikornaviruksille on kuitenkin esitetty toinenkin morfogeneesimalli, jossa RNA pakkautuu kapsidiin samanaikaisesti kokoamisen kanssa (ks. yleiskatsaus Hellen ja Wimmer, 1995). Virusten vapautuminen solusta tapahtuu sytopaattisten vaikutusten avulla, jolloin solun kalvojen läpäisevyys lisääntyy, kromatiini kondensoituu, solun sisäinen neste vuotaa ulos sekä solu kutistuu. Sytopaattisten vaikutusten laukaisevaa tekijää ei ole kyetty osoittamaan, mutta todennäköistä on, että viraaliset P2- ja P3 -alueen proteiinit olisivat tämän takana (ks. yleiskatsaus Racaniello, 2007).

1.1.2 Enterovirusinfektioiden epidemiologia ja patogeneesi

Enterovirukset ovat yleisimpiä taudinaiheuttajia ympäri maailman ja ne leviävät vähintään neljällä eri tavalla: fekaali-oraalisesti, veden ja ravinnon kautta, hengitysteiden eritteiden ja veren välityksellä. Lauhkean ilmastoinnossa, kuten Pohjoismaissa, enterovirusinfektiot ovat tavallisia etenkin loppukesällä ja syksyllä ja niiden esiintyvyyteen vaikuttaa ratkaisevasti ilmasto. Pohjoismaissa enterovirusten kierto on hyvin kausittaista, kun taas tropiikissa esiintyvyys on tasaisempaa (ks. yleiskatsaus Morens ja Pallansch, 1995). Enterovirusilla on erittäin laaja tautikirjo ja niiden aiheuttamia tauteja tunnetaan yli 20. Yleisesti tunnettujen enterovirusten aiheuttamien sairauksien, kuten poliohalvauksen, aivokalvontulehdusten ja lievien hengitystieinfektioiden ohella enterovirusilla on havaittu olevan epidemiologinen yhteys muun muassa hepatiittiin, krooniseen väsymysoireyhtymään, ruoansulatuskanavan tulehdukseen, sydänlihastulehdukseen, haimatulehdukseen sekä T1D:een (ks. yleiskatsaus Morens ja Pallansch, 1995). Enterovirusinfektiot ovat yleisiä ja niitä tavataan kaikissa ikäryhmissä. Vaikka suurin osa infektiosta on lieviä tai oireettomia, vaihtelevat niiden aiheuttamat oireet viruserotyypin sekä yksilön iän, sosiaalisen aseman ja terveydentilan mukaan (ks. yleiskatsaus Palacios ja Oberste, 2005). Neonataaliset enterovirusinfektiot vaihtelevat oireettomista vakaviin henkeä uhkaaviin infektioiden. Infektiot ovat usein vakavia ja lapsikuolleisuuden riski kasvaa merkittävästi, jos infektio on peritty äidiltä prenataalisesti (Bendig ym., 2003; ks. yleiskatsaus Tebruegge ja Curtis, 2009).

Enterovirusinfektioiden patogeneesiä on tutkittu paljon enterovirusten prototyypillä, poliovirusella. Enteroviruslaji sisältää kuitenkin runsaasti eri lajeihin kuuluvia viruserotyyppejä, joiden leviämisen, isäntäsoluspesifisyyden, replikaatiopaikassa sekä infektion laajuudessa ja sen aiheuttamissa oireissa on merkittäviä eroja. Poliovirustutkimus saattaa tarjota kattavan mallin tiettyjen enterovirusinfektioiden patogeneesille, mutta esimerkiksi happamille olosuhteille herkkien ja hengitysteissä replikoituvien enterovirusten kohdalla poliovirusmallia ei voida täysin soveltaa (ks. yleiskatsaus Pallansch ja Roos, 2007).

Enterovirusinfektio saa alkunsa viruksen sitoutuessa isäntäsolun pintareseptorimolekyyleihin. Solukalvon pintareseptorit vastaavat suurelta osalta enterovirusten solu- ja kudostropismista (Ylipaasto ym., 2004; Zanone ym., 2007). Enterovirusten käyttämiä solun pintareseptoreita on useita erilaisia ja ne ovat usein spesifisiä vain tietyille enteroviruslajeille.

Monet enterovirukset vaativat kuitenkin soluun siirtyäkseen pintareseptorien ohella korseptoreita (ks. yleiskatsaus Racaniello, 2007). Poliovirusinfektiossa virukset replikoituvat ensin limakalvojen epiteelisoluissa, etenkin nielurisoissa sekä ohutsuolen Peyerin levyissä. Tämän jälkeen virukset siirtyvät mesenteerisiin imusolmukkeisiin, replikoituvat ja aiheuttavat lievän viremian. Varsinainen replikaatio ja monistuminen tapahtuu retikuloendoteelissä kudoksissa, joihin virus pääsee veren välityksellä. Poliovirusten runsas monistuminen voi johtaa varsinaiseen viremiaan, jolloin infektio leviää keskushermostoon ja aiheuttaa neuronituhoa ja halvaantumista. Suurimmalla osalla infektio ei kuitenkaan aiheuta varsinaista viremiaa, jolloin virus ei pääse keskushermostoon. Eläinkokeissa on kuitenkin osoitettu, että poliovirus voi siirtyä perifeeristen neuronien avulla keskushermostoon ilman varsinaista viremiaa ja aiheuttaa mahdollisesti myös tällä tavalla halvaantumista (ks. yleiskatsaus Pallansch ja Roos, 2007). Enterovirusinfektio on yleensä akuutti, mutta jotkut enterovirukset saattavat aiheuttaa kroonisia infektoita. Krooniset infektiot aiheuttavat kudoksessa lievän tulehdusvasteen (Kim ym., 2005; Feuer ym., 2009).

1.2 Tyypin 1 diabetes

Diabetes luokitellaan ryhmäksi aineenvaihdunnallisia sairauksia, joille tyypillisenä oireena on seerumin kohonnut glukoosipitoisuus, hyperglykemia. Hyperglykemia on glukoosihomöostasian häiriö, joka on seuraus haiman β -solujen tuottaman insuliinin puutteesta, insuliinin toiminnan heikkenemisestä tai näistä molemmista. Etiologisesti diabetes luokitellaan T1D:een ja tyypin 2 diabetekseen (T2D) sekä raskauden ajan diabetekseen.

Haima on rauhanen, joka jaetaan toiminnaltaan endo- ja eksokriiniseen osaan. Endokriininen osa osallistuu pääasiassa glukoosihomöostasian säätelyyn ja eksokriininen osa ruoansulatukseen haimanestettä tuottamalla. Haima koostuu rakenteellisesti haiman päästä, rungosta ja hännästä. Endokriinisen haimakudoksen osuus on noin 1 % haiman kokonaispainosta ja endokriininen haimakudos on painoltaan noin 1400 mg (Rahier ym., 1983). Haiman endokriininen osa koostuu toiminnallisista yksiköistä, Langerhansin saarekkeista, joiden solutyypit on esitetty Taulukossa 2. Saarekkeiden solutyypin kvantitatiivinen määrittäminen perustuu *in situ* -määrittäisiin, joissa histologisista leikkeistä määritetään solutyypit sekä solujakauma. *In situ* -menetelmä antaa ainoastaan arvion solujakaumasta, sillä näytteenvalmistus muuttaa solujakaumaa esim. rasvasolujen osalta (Saisho ym., 2007).

Taulukko 2. Saarekkeen solutyypit, solujakauma ja eritettävät peptidit.

<i>Solutyypit</i>	<i>Suhteellinen osuus %</i>	<i>Eritettävät peptidit</i>
β -solut	70	Insuliini, amyliini
α -solut	20	Glukagoni,
δ -solut	<10	Somatostatiini
PP-solut	<5	Haiman polypeptidi
ϵ -solut	<0.5	Greliini

Lähteet: Cabrera ym., 2005; Andralojc ym., 2008

Langerhansin saarekkeita ympäröi ohut Schwannin solukerros, joka on vuorovaikutuksessa haiman endo- ja eksokriinisen osan kanssa. Solukerroksella uskotaan olevan rooli endokriinisen osan hermotuksessa sekä plasmamembraanikerroksen permeabilisaatiossa helpottaen kalvoliikennettä (Sunami ym., 2001). Endokriinisten solujen suhteellinen osuus vaihtelee haiman eri osissa ja yksilön iän mukaan (Rahier ym., 1983; Meier ym., 2008). Rahierin ym. (1983) mukaan α - ja β -soluja on etenkin haiman häntäosassa, kun taas PP-soluja on runsaasti haiman pään posteriorisessa osassa. Iän on havaittu olevan merkittävä haiman morfologiaa ja endokriinisten solujen suhteellista osuutta muuttava tekijä. Meier ym. (2008) havaitsivat, että β -solujen syntymän jälkeinen replikaatio on suurimmillaan kahden ensimmäisen elinvuoden aikana ja se hiljenee lähes kokonaan yksilön saavuttaessa aikuisuuden. ϵ -solujen suhteellinen osuus sikiökehityksen aikana muuttuu muihin endokriinisoluihin nähden merkittävästi, sillä kehitysviikolla 23 ϵ -solujen osuus on jo 30 %. ϵ -solujen suhteellista osuutta kehittyvässä yksilössä voidaan kuvata paraabelina, sillä syntymässä suhteellinen osuus on laskenut 5 %:iin, kun aikuisen saarekkeissa ϵ -solujen suhteellinen osuus on alle 1 % (Andralojc ym., 2008).

Tyyppin 1 diabeetikon haima on keskiarvon mukaan yli puolet kevyempi kuin terveen ihmisen haima. Rahierin ym. (1983) mukaan terveen ihmisen haima painaa noin 82 g ja T1D:tä sairastavan alle 40 g. Terveillä ihmisillä haiman endokriininen osa on noin 1400 mg haiman kokonaispainosta, kun taas T1D-sairailla endokriinisten solujen osuus on vain noin 400 mg. Tyyppin 2 diabeetikoilla haiman ja endokriinisen osan painoissa ei ole havaittu merkittävää muutosta. T1D-sairaiden saarekkeiden solujakauma on muuttunut merkittävästi, sillä Rahierin ym. (1983) tutkimuksen mukaan sairaiden saarekkeissa ei havaittu insuliinia tuottavia β -soluja. β -solujen tuhoutuminen lisää merkittävästi muiden endokriinisten solujen suhteellista osuutta saarekkeissa. Sayaman ym. (2005) mukaan β -solujen ohella saarekkeista häviää merkittävästi myös α -soluja. Tulosten mukaan α -soluja on fulminaattia diabetestä sairastavilla saarekkeissaan yli kolme kertaa verrokkeja vähemmän ja yli kaksi

kertaa autoimmuunidiabetestä sairastavia vähemmän. Klöppelin ym. (1984) mukaan esidiabetesvaihe on kroonisesti etenevä ja T1D:n patogeneesi alkaa vuosia ennen oireiden alkamista. Heidän hypoteesinsa mukaan esivaiheen lineaarisesti etenevä β -solutuho aiheuttaa taudin kehittymisen diabetesvaiheeseen, jolloin β -soluja on jäljellä 20 % normaaliarvosta. Selektiivinen β -solutuho jatkuu diabetesvaiheessa, kunnes insuliinia tuottavat solut ovat tuhoutuneet saarekkeista kokonaan. Vallalla olevan näkemyksen mukaan lineaarisesti etenevää β -solutuhomallia pidetään liian yksinkertaistettuna, johon ei lasketa mukaan β -solutuhoon nopeuteen vaikuttavia tulehdusvasteita, patogeneejä ja tulehduksen indusoimaa β -solureplikaatiota (ks. yleiskatsaus Akirav ym., 2008; Meier ym., 2008).

Tutkimusten mukaan T1D:n lisääntyminen on globaalinen ilmiö ja sairauden esiintyvyydessä on merkittäviä maantieteellisiä eroja. T1D:n sairastumisriski on suurin pohjois-eurooppalaisilla ja maailman korkein T1D:n ilmaantuvuus on Suomessa; 64/100000 tapausta vuotta kohden. Aasiassa ja Etelä-Amerikassa vuosittainen ilmaantuvuus on vastaavasti pienintä; 0.1/100000 tapausta vuotta kohden. Globaalisesti T1D:n ilmaantuvuus lisääntyy noin 4 %:n vuosivauhdilla, kun sen kasvu on ollut aiempina vuosikymmeninä noin 3 %. Onkin arveltu, että tämän hetkinen T1D:n ilmaantuvuus on globaalisti jo yli 30/100000 tapausta vuodessa (Onkamo ym., 1999; Harjutsalo ym., 2008).

T1D:stä pidetään etiologialtaan epäselvänä T-soluvälitteisenä autoimmuunisairautena, jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinia tuottavat β -solut tuhoutuvat. Taudin patogeneesiin kuuluu jopa useita vuosia kestävä esidiabetesvaihe ennen taudin varsinaista puhkeamista. Esidiabetesvaihe muuttuu diabetekseksi, kun β -solujen määrä on vähentynyt 70-95 % normaalista (Cnop ym., 2005; ks. yleiskatsaus Atkinson ja Gianani, 2009). Esivaihe voidaan havaita autovasta-aineiden ilmaantumisenä verenkiertoon. Autovasta-aineet ovat vasta-aineita, jotka ovat muodostuneet autoimmuuniprosessin käynnistyttyä haiman saarekesolujen rakenteita vastaan. Vaikka taudin kehittymiseen liittyy vahvasti geneettinen alttius, erilaisilla ympäristötekijöillä uskotaan olevan ratkaiseva asema autoimmuuniprosessin käynnistymisessä ja T1D:n puhkeamisessa (ks. yleiskatsaus Tauriainen ym., 2003).

1.2.1 Altistavat perintö- ja ympäristötekijät

Perintötekijöiden rooli T1D:lle altistavina tekijöinä on varsin suuri, sillä kaksostutkimuksilla on osoitettu geneettisten tekijöiden olevan avainasemassa diabeteksen puhkeamisessa. Suomalaisen tutkimuksen mukaan diabeteksen puhkeaminen on 88 %:sti geneettisten tekijöiden aiheuttamaa (Hyttinen ym. 2003). Hyvin samankaltaisia tuloksia on saatu aikaisemminkin. Kaprio ym. (1992) raportoivat T1D:n olevan periytyvä 73.6 % todennäköisyydellä, mikä korreloi hyvin tanskalaisilla kaksosilla tehtyjen tutkimusten tuloksiin. Tanskalaisen kaksostutkimuksen mukaan diabetes on 72 %:sti perintötekijöiden aiheuttamaa (Kyvik ym., 1995). Nykykäsityksen mukaan kuitenkin ajatellaan, että perintötekijöiden rooli T1D:n puhkeamisessa olisi vähenemässä ja ympäristötekijöiden vastaavasti kasvamassa. T1D:n ilmaantuvuus on kasvanut viime vuosikymmeninä nopeasti, varsinkin nuorten keskuudessa, eikä geneettinen alttius riitä yksin selittämään viime vuosikymmenien jyrkkää ja edelleen kiihtyvää T1D:n ilmaantuvuuden muutosta. T1D:n yleistyminen alle 15 -vuotiailla on ollut niin nopeaa, että populaatiogenetiikan näkökulmasta alttiusgeenien rikastuminen väestön geenipoolissa on mahdotonta tässä ajassa. Onkin ajateltu, että erilaisilla ympäristötekijöillä saattaa olla merkittävä rooli T1D:n yleistymisessä (Hyttinen ym., 2003).

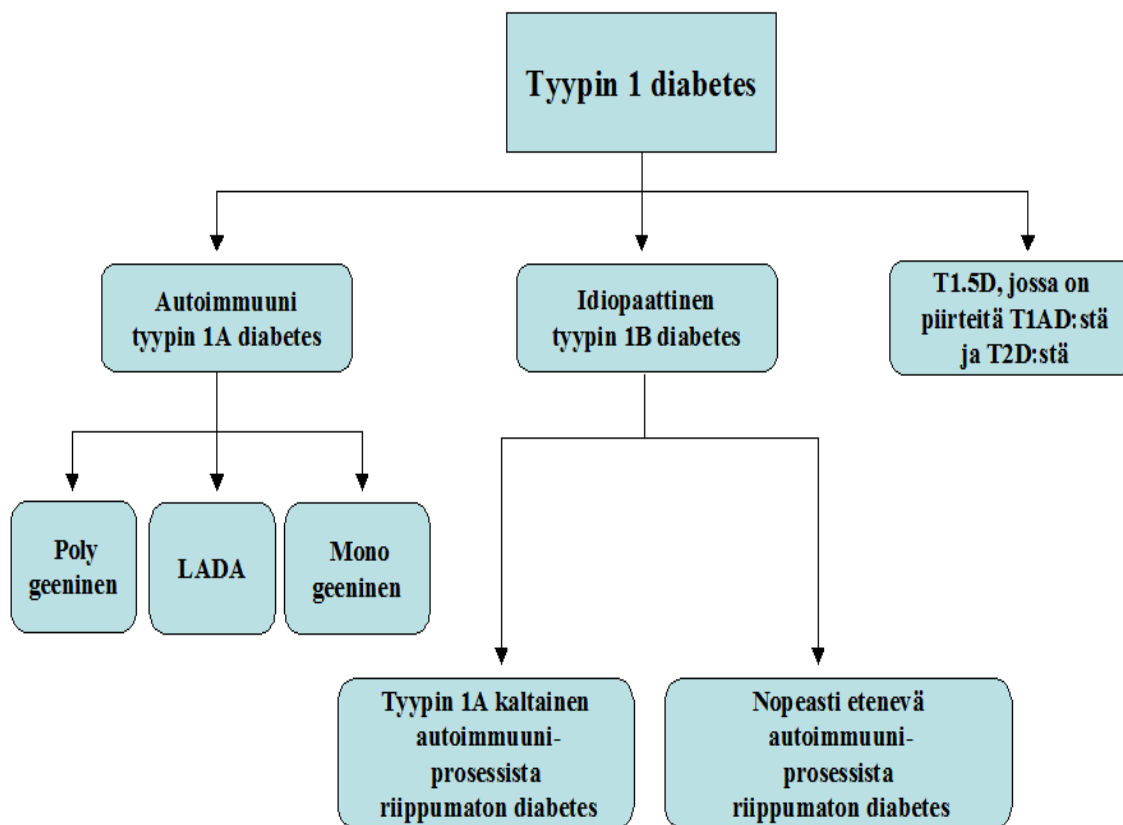
Polygeneettisesti periytyvän T1D:n taustalla vaikuttavat useat geenit. 1970 -luvun puolivälissä havaittiin luokan I ja II *HLA* (Engl. human leukocyte antigen) -geenien ja T1D:n välinen yhteys. *HLA*-diabetesgeenien osuudeksi T1D:n sairastumisalttiudessa on arvioitu noin 50 % kaikista geneettisistä tekijöistä. Luokan II *HLA*-geenit jaetaan T1D:n puhkeamisalttiuden mukaan suojaaviin-, neutraaleihin,- ja riskihaplotyyppeihin. T1D:n puhkeamisriski on korkeimmillaan, kun yksilöllä on genomissaan kaksi erilaista riskihaplotyyppiä. T1D:n puhkeamisriskiksi on tällöin arvioitu noin 7 %. Suomalaisten geenipooli koostuu 69 %:sti suojaavista haplotyypeistä. Tällä osalla väestöstä riski sairastua T1D:een on alle 0.2 % (ks. yleiskatsaus Ilonen ym., 2002). T1D:n geneettinen tausta ei ole kuitenkaan näin yksiselitteinen, vaan *HLA*-haplotyyppien rinnalla diabetesalttiuteen vaikuttaa myös useita muita eri lokuksissa sijaitsevia riskigenejä (ks. yleiskatsaus Mehers ja Gillespie, 2008).

Vahvimman näytön ympäristötekijöiden yhteydestä diabeteksen patogeneesiin antavat virukset, varsinkin enterovirukset, joita on detektoitu diabetekseen sairastuneiden potilaiden verestä ja endokriinisesta haimakudoksesta (ks. yleiskatsaus Hyöty ja Taylor, 2002; Dotta ym., 2007; Rickhardson ym., 2009). Elintavoilla on merkityksensä sekä T1D:n että T2D:n ilmenemisessä. Hyppösen ym., (2000) mukaan lasten liikalihavuudella ja T1D:lla on yhteys, sillä lihavuuden yleistymisen on havaittu korreloivan voimakkaasti T1D:n ilmenemisen kanssa. Kiistanalaisia viitteitä diabetogeenisyydestä on muun muassa lehmän maidon β -kaseiineilla sekä nitriiteistä muodostuvilla *N*-nitrosoyhdisteillä (ks. yleiskatsaus Akerblom ja Knip, 1998; ks. yleiskatsaus Truswell, 2005). Tarkemmin T1D:n ja enterovirusten välisestä yhteydestä on kerrottu luvussa 1.3 *Enterovirusinfektioiden ja T1D:n välinen yhteys* (alkaan s. 19).

Ympäristötekijöiden ja T1D:n välistä yhteyttä selvitetään parhaillaan laajojen tutkimushankkeiden avulla. Suomalainen DIPP (Engl. Diabetes Prediction and Prevention-study) on T1D:n ennustamista ja ehkäisyä tutkiva prospektiivinen seurantaprojekti, jossa vastasyntyneiltä etsitään T1D:lle altistavia perintötekijöitä. Geneettisesti T1D:lle alttiita lapsia seurataan autovasta-aineseulonnoin, joilla pyritään saamaan tietoa autoimmuuniprosessin alkuketkistä. Vuonna 2003 perustettiin kansainvälinen tutkimushanke TEDDY (Engl. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young), joka on laaja DIPP:in kaltainen prospektiivinen tutkimus. Tutkimuksen tarkoituksena on kartoittaa tekijöitä, jotka vaikuttavat β -solujen autoimmuuniprosessin syntyyn tai estoon (TEDDY study group, 2008).

1.2.2 Tyypin 1 diabeteksen luokittelu

T1D luokitellaan kolmeen luokkaan: autoimmuuniin ja idiopaattiseen diabetekseen sekä tyypin 1.5 diabetekseen (T1.5D). T1.5D:tä pidetään T1D:n ja T2D:n välimuotona ja tästä tulee myös taudin nimitys T1.5D (Kuva 2). Uusimmat tutkimustulokset antavat viitteitä nopeasti etenevän eli fulminantin T1BD:n etiologiasta ja saattaa olla, että sen luokittelu voi tulevaisuudessa muuttua.



Kuva 2. Tyypin 1 diabeteksen luokittelu. T1D luokitellaan autoimmuuniin, idiopaattiseen ja T1.5D:een, jossa on autoimmuunivasteen ohella piirteitä T2D:stä. T1AD jaetaan polygeeniseen, monogeeniseen sekä LADA-diabetekseen. Polygeeninen T1AD on hyvin yleinen diabeteksen muodoista ja sen taustalla on useita diabetesgeenejä. Monogeeninen T1AD on yhden geenin mutaatiosta johtuva autoimmuuni diabetes. Taustalla on usein autoimmuunimekanismeja säätelevän *AIRE*-geenin mutaatio. LADA on aikuisilla esiintyvä autoimmuuni diabetes ja sen ohella esiintyy usein myös muita endokriinisiä kudoksia häiritseviä autoimmuunisairauksia. T1BD:n kehittyminen on etiologialtaan tuntematon. T1BD:n kehittymisen luonteenpiirteinä on autoimmuunivasteen puuttuminen ja se on vahvasti periytyvä. T1.5D on autoimmuuninen sairaus, jossa β -solutuhoon ohella glukoosihomeostasiaan vaikuttavat esimerkiksi insuliiniresistenssi ja ylipaino (Muokattu lähteistä: Furlanos ym., 2006; ks yleiskatsaus. American Diabetes Association, 2008; ks. yleiskatsaus Dib ja Gomes, 2009).

Shibasakin ym. (2010) tutkimustulokset vahvistavat, että fulminantti T1BD ei ole autoimmuunisairaus. Tulosta vahvistavat autoimmuuniprosessissa muodostuvien autovasta-aineiden puuttuminen kolmen fulminanttiin T1BD:een kuolleen potilaan seerumista. Tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että fulminaatin T1D:n laukaisevana tekijänä on makrofaagivälitteinen tulehdusvaste, joka aiheuttaa insuliitin haiman endokriinisessä osassa. Shibasakin ym. (2010) mukaan tulehdusvasteen aiheuttajana saattaa olla enterovirusinfektio, jota heidän tuloksensa vahvasti tukevat.

1.3 Enterovirusinfektioiden ja T1D:n välinen yhteys

Virusten ja T1D:n välistä yhteyttä on tutkittu pitkään ja todennäköisimpänä diabetesta aiheuttavana virusryhmänä voidaan pitää enterovirusia, joita on osoitettu diabeetikoiden insuliinia tuottavista β -soluista (Ylipaasto ym., 2004; Dotta ym., 2007; Richardson ym., 2009). Diabetogeenisimpänä enteroviruslajina pidetään enterovirus B -ryhmän viruksia (Roivainen ym., 2000). Enterovirusten osuutta T1D:n puhkeamisen laukaisevana tekijänä ei ole kyetty täysin todistamaan eikä suoraa näyttöä enterovirusinfektioiden aiheuttamasta diabeteksestä ole. Viitteitä enterovirusten ja T1D:n välisestä epidemiologisesta yhteydestä on kirjallisuudessa kuitenkin runsaasti. Ensimmäiset viitteet enterovirusten ja diabeteksen välisestä yhteydestä saatiin 1960-luvun loppupuolella. Gamble ym. (1969) osoittivat diabetekseen sairastuneiden seerumista kohonneita coxsackievirus B (CBV) vasta-ainepitoisuuksia. Varsinkin CBV4 vasta-ainetiitterit olivat merkittävästi kohonneet verrokkeihin nähden. Varsinaisia todisteita T1D:n ja enterovirusten yhteydestä saatiin vuosikymmen Gamblen ym. (1969) tutkimuksen jälkeen. Yoon ym. (1979) eristivät ketoasidoosiin menehtyneen T1D-lapsen haimasta CBV4-enterovirusta, joka aiheutti myös hiirille diabeteksen. Tämä löytö on lisännyt diabetestutkimusta merkittävästi. Yoonin ym. (1979) tutkimuksen jälkeen on osoitettu, että CBV4 on diabetogeeninen myös hiiren ja ihmisen saarekesoluviljelmissä (Horwitz ym., 1998; Roivainen ym., 2000). Enterovirusten ja T1D:n välistä epidemiologista yhteyttä on kuitenkin ollut haasteellista todistaa. Tutkimuksia ovat vaikeuttaneet monet seikat;

- 1) Diabetekseen liittyvän autoimmuniprosessin hitaus. Oireeton esidiabetesvaihe ja autoimmuniprosessi voivat käynnistyä jopa vuosia ennen oireiden ilmaantumista.
- 2) Ihmisperäisten haimakudosten saaminen tutkimuskäyttöön on erittäin ongelmallista.
- 3) Enterovirusinfektioiden osoittaminen diabeetikkojen haimakudoksesta on ollut haastavaa (Foulis ym., 1990; Buesa-Gomez ym., 1994; Foulis ym., 1997). Saattaakin olla, että diabeetikoilta on huomattavasti vaikeampaa osoittaa saarekkeisiin ja β -soluihin paikallistuvia enterovirusinfektioita, jos isäntäsolujen autoimmunivasteesta johtuva tuhoutuminen on täydellistä.

Enterovirusdetektion ajoittaminen autoimmuniprosessin alkuvaiheisiin on haastavaa ja se vaatii prospektiivisiä seurantatutkimuksia. Enterovirusinfektio ja autoimmuniprosessin käynnistyminen ovat usein oireettomia ja viitteitä potilaiden esidiabeteksesta saadaan ainoastaan plasmasta seulottavien autovasta-aineiden avulla (Salminen ym., 2003). Autovasta-ainepositiivisten yksilöiden haimanäytteiden saaminen on ongelmallista, sillä koepalojen otto haimasta on vaikeaa siihen liittyvien komplikaatioriskien vuoksi (ks. yleiskatsaus Drecher ja Tracy, 2008). Vaikka haimabiopsioiden ottoon on kehitetty menetelmä, (Hanafusa ym., 1990; Itoh ym., 1993; Imagawa ym., 2001) lienee selvää, että tutkimuskäyttöön ei oireettomien esidiabeetikoiden haimabiopsioita saada riskien ja mahdollisten komplikaatioiden vuoksi. Muutamit tutkimusryhmät ovatkin tehneet tutkimuksensa aivokuolleiden elinluovuttajien haimanäytteillä tai *post mortem* -haimanäytteillä (Foulis ym., 1990; Dotta ym., 2007). Richardsonin ym. (2009) tutkimuksessa on saatu käyttöön runsaasti T1D:een juuri sairastuneiden henkilöiden *post mortem* -haimanäytteitä, joista 61 % osoitettiin enteroviruspositiivisiksi (Taulukko 3). Tulokset vahvistavat näkemystä T1D:n ja enterovirusten välisestä yhteydestä, vaikka Roivaisen ja Klingelin (2009) mukaan tulosten luotettavuudessa on puutteita. Heidän mukaansa IHC-tulokset olisi syytä aina vahvistaa esimerkiksi enterovirusten nukleiinihappoja tunnistamalla tai eristämällä virus tuoreinäytteestä. Lisäksi Richardsonin ym. (2009) käyttämä detektio perustuu 5-D8/1 -enterovirusvasta-aineeseen, jonka spesifisyydestä on saatu ristiriitaisia tuloksia (Härkönen ym., 2000 ja 2002).

Taulukko 3. Tyypin 1 diabeetikoiden ja esidiabeetikoiden haimanäytteistä on detektoitu enterovirusia vaihtelevin tuloksin. Useimmissa tutkimuksissa, joiden tulokset ovat olleet positiivisia, enterovirusia on detektoitu 5-D8/1 vasta-aineeseen perustuvalla IHC-detektio menetelmällä (Muokattu lähteestä: ks. yleiskatsaus Tauriainen ym., 2010).

<i>Diabetes-haimat</i>	<i>Enterovirus-positiivisia</i>	<i>Detektio-menetelmä</i>	<i>Vasta-aine/koetin</i>	<i>Lähde</i>
88	0	IHC	CBV -viruksille.	Foulis ym. 1990
2	0	RT-PCR	-	Buesa-Gomez ym. 1994
29	0	ISH	CBV1-5 -viruksille	Foulis ym. 1997
65	4	ISH, IHC	CBV3 -koetin	Ylipaasto ym. 2004
6	3	IHC, EM	Dako 5-D8/1	Dotta ym. 2007
1	1	IHC	Dako 5-D8/1	Oikarinen ym. 2008
72	44	IHC	Dako 5-D8/1	Richardson ym. 2009

Viitteitä enterovirusten osuudesta T1D:n patogeneesissä on saatu myös diabeetikoiden seruminäytteistä, sillä useiden RT-PCR:llä tehtyjen tutkimusten mukaan enterovirusinfektioituneita diabeetikoita on merkittävästi infektoituneita verrokkeja enemmän (Taulukko 4).

Mielenkiintoisia tuloksia on saatu detektoimalla enterovirusia tyypin 1 diabeetikoiden ohutsuolibiopsioista. Oikarinen ym. (2007) havaitsivat, että T1D:llä ja ohutsuolen enterovirusinfektioilla saattaa olla yhteys, sillä he detektoivat enterovirusia tyypin 1 diabeetikoilta (n = 12) merkittävästi verrokkeja (n = 10) enemmän. ISH:lla diabeetikoiden näytteistä enteroviruspositiivisia oli 50 %, verrokinäytteiden ollessa negatiivisia. Vastaavasti IHC:lla diabeetikoiden näytteistä positiivisia oli 75 % ja verrokkeista 10 %.

Taulukko 4. RT-PCR -tulosten mukaan enterovirusinfektioita esiintyy diabeetikoilla merkittävästi verrokkeja enemmän. RT-PCR -analyysit on tehty seerumi tai veri näytteistä. (Muokattu lähteestä: ks. yleiskatsaus Tauriainen ym., 2010).

<i>Diabeetikot n</i>	<i>Enterovirus- positiivisia: %</i>	<i>Verrokkit n</i>	<i>Enterovirus- positiivisia: %</i>	<i>Lähde</i>
10	40	20	0	Schulte ym., 2010
14	64	45	4	Clements ym., 1995
23	42	27	0	Androletti ym., 1997
24	50	24	0	Yin ym., 2002
34	26.5	68	3	Sarmiento ym., 2007
55	41	43	31	Foy ym., 1996
56	38	37	0	Cehadeh ym., 2000
61	38	58	3	Kawashima ym., 2004
110	27	182	5	Nairn ym., 1999
206	30	160	4	Craig ym., 2003

Enterovirusinfektio käynnistää tyypin 1 interferonituotannon β -soluissa

Enterovirusinfektion varhaisessa vaiheessa elimistö reagoi infektiioon käynnistämällä paikallisen sytokiini- ja interferonituotannon. Interferonien on osoitettu suojaavan tehokkaasti β -soluja virusinfektioilta (Cehadeh ym., 2000; Flodström ym., 2002). Hiljattain on havaittu, että interferonit aktivoivat antiviraalisten reseptorimolekyylien synteesin. Reseptorimolekyylien, kuten TLR3:n (Engl. Toll like receptor 3), RIG-I:n (Engl. Retinoic acid inducible-gene I receptor) ja MDA-5:n (Engl. Melanoma differentiation-associated gene-5 receptor) geeniekspressio lisääntyy enterovirusinfektiossa merkittävästi. Näitä enterovirusinfektiossa syntetisoituvia reseptorimolekyyliä voidaan hyödyntää arvioidessa virusten osuutta kroonisissa sairauksissa, kuten T1D:ssa. Reseptorimolekyylien paikallinen ekspressiotason jyrkkä muutos saattaa kertoa virusinfektioista. Lisäksi interferonien ja sen indusoimien antiviraalisten reseptorien krooninen erittyminen solukalvoille antaa tietoa muun muassa mahdollisesta kroonisesta infektiosta (Cehadeh ym., 2000; Hultcrantz ym., 2007; Shibasaki ym., 2010).

1.3.1 Autovasta-aineet ja autoimmuniprosessin syntymekanismit

Haiman saarekkeiden autovasta-aineiden löytyminen 1970-luvun puolivälissä osoitti T1D:n krooniseksi autoimmuunisairaudeksi (Bottazzo ym., 1974; MacCuish ym., 1974). T1AD:n kehittymisessä elimistön omat puolustusmekanismit alkavat vaurioittaa haiman saarekkeiden insuliinia tuottavia β -soluja. Vallalla olevan käsityksen mukaan T-lymfosyytit aktivoituvat β -soluja vastaan, jolloin vaurioituvista β -soluista vapautuu intrasellulaarisia proteiineja. Vasta-aineita tuottavat B-lymfosyytit tunnistavat proteiinien antigeenit vierainiksi ja ne alkavat tuottaa vasta-aineita näitä proteiineja vastaan. Omia proteiineja vastaan tuotetut autovasta-aineet ovat voimakkaasti kytköksissä T1D:n kehitykseen ja kertovat β -solutuhon olevan käynnissä. Tämä oireeton esidiabetesvaihe havaitaan seerumin autovasta-ainepitoisuuksista (ks. yleiskatsaus Seissler ja Scherbaum, 2006). Autovasta-aineita tunnetaan neljä spesifisesti sitoutuvaa. Näitä ovat insuliiniautovasta-aineet (IAA), jotka sitoutuvat insuliiniin, glutamaattidekarboksylaasiautovasta-aineet (GADA), jotka sitoutuvat glutamaattidekarboksylaasiin ja tyrosiinifosfataasiautovasta-aineet (IA-2A), jotka sitoutuvat tyrosiinifosfataasiin. Hiljattain on löydetty myös sinkkikuljettajaan sitoutuvat ZnT8-autovasta-aineet (Pietropaolo ym., 2005; Wenzlau ym., 2007). Lisäksi voidaan määrittää epäspesifisesti saarekesoluautovasta-aineita (ICA), jotka sitoutuvat saarekkeiden solujen antigeeneihin. Useamman yhtäaikaisen autovasta-ainepitoisuuden kohoaminen esidiabetesvaiheessa ennustaa T1D:n puhkeamista varsin hyvin (Strebelow ym., 1999), mutta yksittäisen autovasta-aineen matala plasmapitoisuus ei ole yhteydessä T1D:n puhkeamiseen, vaikka autovasta-ainepitoisuus olisi lievästi koholla yli vuoden (ks. yleiskatsaus Seissler ja Scherbaum, 2006). Autoimmuniprosessista riippumattoman idiopaattisen T1D:n kehittämisessä autovasta-aineita ei erity lainkaan (Shibasaki ym., 2010).

Enterovirusten osuutta autoimmuniprosessin laukaisevana tekijänä on tutkittu paljon, mutta täysin varmaa kuvaa virusten aiheuttamasta autoimmunitietin aktivoitumisen mekanismeista ei ole saatu. Vallalla olevan näkemyksen mukaan enterovirukset indusoivat autoimmuniprosessin β -soluja kohtaan infektoituneiden solujen erittämien stressitekijöiden kautta (Engl. bystander damage). Myös molekyllärisen matkimisen (Engl. molecular mimicry) ja virusten aiheuttamien sytopaattisten vaikutusten sekä kroonisten infektioiden on arveltu olevan autoimmuunivasteen takana (ks. yleiskatsaus Richer ja Horwitz, 2009a). Li-

säksi muutokset T-säätelijäsolujen (Treg) pitoisuuksissa ovat autoimmuuniprosessin syntyä edesauttavia tekijöitä. Viimeaikoina on saatu viitteitä siitä, että Treg-solujen väheneminen haimakudoksessa on riskitekijä T1D:n patogeneesille. Hiirikokein on osoitettu, että Treg-solujen väheneminen kiihdyttää merkittävästi T1D:n autoimmuuniprosessin etenemistä (Richer ym., 2008; ks. yleiskatsaus Richer ja Horwitz, 2009b). Hiirikokein on saatu viitteitä myös siitä, että enterovirusinfektion aiheuttama immuunivaste saattaa olla T1D:tä edistävä tai estävä tekijä (Horwitz ym., 1998; Tracy ym., 2002). Filippi ym. (2009) havaitsivat, että eri serotyypin aiheuttama enterovirusinfektio aiheuttaa immuunivasteen, joka voi lisätä tai vähentää Treg-solujen määrää hiirillä. Heidän mukaan varhain saatu CBV3 on NOD-hiiren diabetestä estävä, kun taas aikaisemmissa tutkimuksissa on toisella hiirikanalla osoitettu, että CBV4 on diabetogeeninen (Horwitz ym., 1998). Hiirillä enterovirukset lokalisoituvat haiman eksokriiniseen osaan, eivätkä aiheuta saarekkeisiin infektiota (Tracy ym., 2002). Vaikka NOD-hiiret (Engl. Non-obese diabetic) ehkä soveltuvat hyvin T1D:n autoimmuuniprosessin tutkimiseen, ei tämä koe-eläinmalli ole hyvä β -solutuhon aiheuttajien tutkimiseen, sillä NOD-hiirten T1D syntyy spontaanisti. Tuloksista ei siten voida suoraan päätellä, vaikuttavatko enterovirusinfektiot ihmisillä T1D:tä edistävästi vai estävästi.

Roivainen ym. (2000) osoittivat, että CBV3, 4 ja 5 replikoituvat saarekkeiden β -soluissa *in vitro* ja aiheuttavat insuliinivasteen heikkenemistä sekä sytopaattisten vaikutusten kautta nekroosia. Tutkimuksen mukaan apoptoosin rooli β -solujen vähenemisessä oli merkityksentöntä. Enterovirusten lyyttisen elinkierron aiheuttamat suorat soluvauriot johtavat nekroosiin ja β -solutuhoon, mutta sitä ei kuitenkaan pidetä ensisijaisena T1D:n syntymekanismina. Primäärisenä autoimmuuniprosessin syntymekanismina pidetään bystander damage -mekanismia, johon ei välttämättä liity viruksen aiheuttamaa nekroosia, vaan mekanismi kattaa myös krooniset enterovirusinfektiot. Bystander damage -mekanismin mukaan infektoituneet β -solut erittävät solukalvolleen stressitekijöitä, joita APC-solut (Engl. Antigen presenting cells) tunnistavat. APC-soluvälitteinen β -solujen endosytoosi johtaa siihen, että APC-solujen MHC-proteiinit esittelevät β -solujen stressitekijöitä immuunipuolustukselle. Tämä voi johtaa autoreaktiivisten T-lymfosyyttien muodostumiseen ja β -soluspesifiseen autoimmuuniprosessin käynnistymiseen (Horwitz ym., 1998; ks. yleiskatsaus Richer ja Horwitz, 2009a). Molekyylläinen matkiminen on yhdistetty enterovirusinfektion aiheuttamaan T1D:n patogeneesiin ja sen oletetaan aiheuttavan autoimmuunireaktion ristireak-

tion kautta. Härkösen ym. (2003) mukaan enteroviruksen kapsidiproteiineilla on homologinen autoantigeenirakenne β -solujen tyrosiinifosfataasin, ja heat shock 60/65 -proteiinien kanssa. Lisäksi useissa tutkimuksissa on havaittu, että enteroviruksen 2C-proteiinilla on sekvenssi-identtisyttä solujen tuottamien glutamaattidekarboksylaasiproteiinien kanssa. Virus- ja β -soluproteiinien autoantigeenien sekvenssi-identtisyydestä johtuen, T-solu- ja humoraalisen immuunivasteen uskotaan syntyvän myös solurakenteita kohtaan (ks. yleiskatsaus Jaïdane ja Hober, 2008).

1.3.2 Onko kroonisella enterovirusinfektiolla yhteys tyypin 1 diabetekseen?

Enterovirusinfektiota pidetään akuuttina ja lyyttisenä infektiona. Kroonisista enterovirusinfektioista on ainoastaan viitteitä, jotka perustuvat koe-eläinmalleilla sekä soluviljelmillä tehtyihin tutkimuksiin. Ihmisen kroonisista enterovirusinfektioista ei ole vielä riittävästi näyttöä. Kirjallisuudessa on kuitenkin viitteitä jopa kymmeniä vuosia kestävästä oireettomista kroonisista poliovirusinfektioista ja vallalla olevan teorian mukaan PPS (Engl. Post-polio syndrome) olisi kroonisen poliovirusinfektion aiheuttama polion jälkitauti (Muir ym., 1995). Myös poliovirusiin kuulumattomien enterovirusserotyypin kroonisista infektioista on viitteitä. Onkin arveltu, että kroonisilla enterovirusinfektioilla voisi olla yhteys useisiin sairauksiin, kuten muun muassa viivästyneeseen sydänlihastulehdukseen tai T1D:een. Näiden infektioiden kausaalista yhteyttä kroonisiin sairauksiin on ollut hankala todistaa. Viimeaikoina on kuitenkin ilmestynyt julkaisuja, joiden perusteella kroonista enterovirusinfektiota voidaan pitää merkittävänä riskitekijänä kroonisten sairauksien puhkeamiselle (Zhang ym., 2004; Oikarinen ym., 2007; ks. yleiskatsaus Chapman ja Kim, 2008; Chia ym., 2009). Hiirikokeet sekä kokeet saarekesoluviljelmillä ovat antaneet runsaasti tietoa kroonisista enterovirusinfektioista, mutta ihmisillä ei haimasta ole löydetty riittäviä todisteita vastaavasta. Dottan ym. (2007) tutkimukset antavat viitteitä kroonisesta infektiosta, mutta tutkimuksen luotettavuudesta ei ole takeita (ks. yleiskatsaus Drecher ja Tracy, 2008). Ehkä luotettavimman kuvan kroonisesta enterovirusinfektiosta antaa Richardsonin ym. (2009) tutkimus, jossa detektoitiin enterovirusia T1D:een juuri sairastuneiden saarekkeista. Kumpikaan edellä mainituista tutkimuksista ei kuitenkaan todista, että havaitut enterovirusinfektiot olisivat olleet kroonisia.

Kroonisen enterovirusinfektion edellytyksenä on viruksen evoluutio vähemmän lyyttiseen muotoon esimerkiksi mutaation seurauksena (Julien ym., 1999; ks. yleiskatsaus Chapman ja Kim, 2008). Evoluutio ei estä virusta täysin replikoitumasta, vaan replikaatio hidastuu ja enterovirusten positiivisten ja negatiivisten RNA-juosteiden osuus jakaantuu infektoituneissa soluissa tasan (Klingel ym., 1992). Ihmisen haimasta eristettyjen saarekesoluviljelmien mukaan akuutissa enterovirusinfektiossa CBV4:n positiivisjuosteista RNA:ta on noin 50-100 kertaa negatiivista juostetta enemmän, joten muutos juosteiden osuuksissa kroonisen ja akuutin infektion välillä on merkittävä (Chehadeh ym., 2000). Tamin ja Messnerin (1999) tutkimuksen mukaan enterovirusinfektion siirtyminen latentiksi ei ole mutaatoriippuvaista vaan CBV:n negatiiviset ja positiiviset RNA-juosteet sitoutuvat keskenään ja muodostavat vakaan kaksijuosteisen RNA-genomin. Sitoutuminen selittäisi ekvivalenttisen määrän enterovirusten negatiivisia ja positiivisia RNA-juosteita infektoituneissa soluissa.

Enterovirusinfektion kroonistumisesta on myös toisenlainen malli, jonka mukaan kroonisen infektion taustalla on enterovirusgenomin 5'-päässä tapahtuva deleetio. Kimin ym. (2005) mukaan genomin 5'-päähän 7-49 nukleotidin deleetio on spontaani ja johtaa krooniseen infekioon. Tutkimuksessa havaittiin, että CBV3 aiheuttaa hiirten sydänlihaksessa yli viisi kuukautta kestävästä infektiosta ilman sytopaattisia vaikutuksia. Lisäksi merkittävää on, että deleetion seurauksena CBV3:n replikaatio on normaalia heikompaa ja viruspartikkeleihin pakkautuu negatiivisjuosteista RNA:ta. Myös tässä tutkimuksessa havaittiin infektoituneissa soluissa ekvivalentti määrä negatiivisia ja positiivisia enterovirus RNA-juosteita. Myös ihmisen sydänlihaksesta on havaittu akuutti coxsackie B2 infektio, jonka aiheuttajana oli 5'-päästään deletoitunut coxsackie B2 virus (Chapman ym., 2008). Potilaan oireet tässä tapauksessa olivat akuutteja, mutta viruksen läsnäoloaika kudoksessa on mahdoton arvioida esitettyjen tulosten perusteella.

1.4 Enterovirusten detektointi kudoksista

Enterovirusten genomi on mutaatioaltis ja VP1-proteiinia koodittavaa geeniä käytetään hyväksi serotyypitykseen liittyvissä tutkimuksissa. Enterovirusten detektiossa käytetään usein genomin konservatiivista 5'-päähän proteiineja koodittamatonta aluetta sekä VP1-proteiinin antigeenista aluetta (Oberste ym., 1999; Zhang ym., 2000; Blomqvist ym., 2008). Enterovirusten kudoksetektiössä käytetyimpiä menetelmiä ovat immunohistokemialliset menetel-

mät (IHC), *in situ* -hybridisaatiomenetelmät (ISH) ja käänteiskopiointiin perustuva RT-PCR sekä näiden yhdistelmät. Enterovirusten detektio jakaantuukin karkeasti määriteltynä nukleiinihapposekvenssin sekä aminohapposekvenssin tunnistusmenetelmiin.

1.4.1 Nukleiinihapposekvenssin tunnistamisen perustuvat detektiomenetelmät

Enterovirusten nukleiinihapposekvenssin tunnistamisessa pyritään havaitsemaan joko naatiivin genomisen RNA:n tai siitä käänteiskopioidun cDNA:n sekvenssin osia. RNA:n detektio kudoksista on haastavaa, sillä se on hyvin epästabiili ja herkkä muutoksille. ISH:ta on käytetty enterovirusten RNA:n detektointiin kudoksista, kun taas polymeraasiketjureaktiota (PCR) on käytetty enterovirusten cDNA-molekyylien detektioon kudoshomogenaatista. Molempien menetelmien käytettävyys on kuitenkin helpottunut menetelmien kehittymisen myötä ja niitä hyödynnetään yleisesti enterovirusten detektiossa. Kirjallisuudessa on myös viitteitä PCR- ja ISH -tekniikan yhdistelmämenetelmästä, joka ei kuitenkaan ole tehnyt läpimurtoa enterovirustutkimuksen alalla. Nukleiinihappodetektion onnistuminen riippuu monista seikoista, kuten kudostyypistä, näytteiden *post mortem* -ajasta ennen fiksaatiota, fiksatiivista ja fiksaatioajasta sekä käytettävästä detektiomenetelmästä (Scicchitano ym., 2006). Enterovirusdetektio kudoksenäytteistä on haastavaa varsinkin, jos käytössä on ainoastaan formaliinifiksattuja ja parafiiniin valettuja näytteitä. Formaliinifiksatus asettaa rajoituksia RNA-genomin detektiolle, sillä on osoitettu, että formaliini aiheuttaa muutoksia RNA-juosteen rakenteessa. Masudan ym. (1999) mukaan formaliini muodostaa hydroksimetyleenisiltoja proteiinien aminoryhmien ja nukleiinihappotähteiden välille ja hydroksimetyleenisillat sitovat nukleiinihapot ja proteiinit kolmiulotteiseksi intrasellulaariseksi matriksiksi. Masudan ym. (1999) mukaan pitkät formaliinifiksaatioajat saattavat aiheuttaa nukleiinihappotähteissä palautumattomia muutoksia, jotka heikentävät nukleiinihappojuosteen laatua ja käytettävyyttä molekyylibiologisissa tutkimuksissa. Parafiinilla ei ole kuitenkaan vaikutusta nukleiinihappojuosteiden laatuun.

Enteroviraalisen RNA:n pilkkoutuminen saattaa olla yksi syy siihen, että kirjallisuudessa on melko vähän viitteitä enterovirusten RT-PCR menetelmään perustuvasta detektiosta fiksaatuista kudoksista. Liian pitkä *post mortem* -aika ennen kudosten fiksausta johtaa endogeenisten RNA:sien aktivaatioon ja RNA:n pilkkoutumiseen. Lisäksi formaliini aiheuttaa RNA-juosteiden pilkkoutumista noin 200 nukleiinihappotähteen mittaisiksi juosteiksi, mi-

kä häiritsee molekyylibiologisia tutkimusmenetelmiä merkittävästi (Krafft ym., 1997; Mizuno ym., 1998). Hieman ristiriitaista tietoa antavat kuitenkin mikrosirutekniikkaan perustuvat tutkimukset, joissa on vertailtu fiksaamattomien ja formaliinifiksattujen näytteiden RNA:n stabiilisuutta. Tutkimusten mukaan fiksaamattomien ja fiksettujen näytteiden RNA:n säilyvyydessä ei havaittu suurta eroa eikä formaliini aiheuta merkittävää RNA:n tuhoutumista (Scicchitano ym., 2006; Xi ym., 2007). Saattaakin olla, että formaliinin osuutta RNA:n hajoamisprosessissa on hieman liioiteltu.

1.4.1.1 Käänteiskopiointiin perustuva RT-PCR

Viime vuosikymmeninä PCR on yleistynyt virusdiagnoosiin ja virustutkimuksen perusmenetelmäksi. Enterovirusien detektoinnissa käytetään kaksivaiheista käänteiskopiointiin perustuvaa PCR-menetelmää, jonka ensimmäisessä vaiheessa enterovirusten RNA:sta tuotetaan monistettavaa cDNA:ta käänteiskopiointiin kykenevän polymeraasin avulla. Toisessa vaiheessa cDNA-molekyylejä monistetaan PCR-tekniikalla haluttuun pitoisuuteen. Enterovirusdiagnoosissa alukkeet suunnitellaan usein virusgenomin 5'-pään konservatiiviselle proteiineja koodittamattomalle alueelle. Enterovirusten detektoinnissa näytteet ovat usein seerumi- tai ulostenäytteitä, mutta veren ohella myös muistakin kudoksista on enterovirusia detektoitu (ks. yleiskatsaus Santti ym., 1999; ks. yleiskatsaus VanGuilder ym., 2008). Käänteiskopiointiin perustuva PCR voidaan toteuttaa detektoimalla tuotteet agarosigeeliltä tai havainnoimalla ne reaaliaikaisesti fluoresoivia leimoja hyväksikäyttäen. Reaaliaikainen RT-PCR menetelmä mahdollistaa PCR-syklien monitoroinnin sekä detektoitavien tuotteiden matemaattisen analyysin. Menetelmä antaa tiedon muun muassa enterovirusten määrästä ja on normaalia RT-PCR-menetelmää herkempi (Kares ym., 2004; ks. yleiskatsaus VanGuilder ym., 2008; ks. yleiskatsaus Piqueur ym., 2009).

Enteroviraalista RNA:ta on detektoitu onnistuneesti formaliinifiksatusluuytimestä (Woodall ym., 1993), sydänlihaksesta (Shimizu ym., 1994) sekä maksasta (Redline ym., 1991). Lisäksi enterovirusia on detektoitu fiksaamattomista kudoksista. Oikarinen ym. (2007) ovat detektoineet enteroviraalista RNA:ta ohutsuolen biopsianäytteistä ja Desailoud ym. (2009) kilpirauhasesta.

1.4.1.2 *In situ* -hybridisaatio

In situ -hybridisaatio on menetelmä, jota käytetään tunnistamaan haluttua nukleiinihapposekvenssiä kudoksenäytteistä. ISH ei tuhoa näytteen kudost morfologiaa, toisin kuin PCR-menetelmät tai kalvolla suoritettavat hybridisaatiomenetelmät, vaan tarjoaa tietoa myös detektoitavien nukleiinihappojen sijainnista kudoksessa ja soluissa. ISH:n toiminnallisena osana ovat koettimet, jotka suunnitellaan komplementtaarisiksi kohdesekvenssiin nähden. Koettimia on pääosin kolme eri tyyppiä; DNA-koettimia, RNA-koettimia sekä peptidinukleiinihappokoettimia (PNA), joiden rakenteessa nukleotidit ovat kiinnittyneet peptidisidoksin toisiinsa (ks. yleiskatsaus Harvey ja Schønau, 2006). Oikean koetintyyppin valinta ja tietämys detektoitavasta nukleiinihapposekvenssistä ovat edellytyksenä ISH:n onnistumiselle.

Ensimmäisten ISH-kokeiden detektio perustui radioaktiivisilla merkkiaineilla leimattuihin koettimiin. Isotoopeilla leimatut hybridisoituneet koettimet havainnoitiin autoradiografian avulla, joka vaati pitkiä valotusaikoja (Gall ja Pardue, 1969; Das ja Alfert, 1969). Nykyään ISH-menetelmässä hyödynnetään yhä enemmän isotoopittomia koettimia ja niiden detektioherkkyys on kasvanut merkittävästi. Isotoopittomat ISH-menetelmät ovat turvallisia, nopeita ja niiden detektiokynnys on hyvä; 20 – 50 sekvenssikopiota solua kohti. Detektiokynnystä voidaan kuitenkin tästä vielä parantaa käyttäen erilaisia epäsuoria signaalin vahvistusmenetelmiä, joita on mainittu Taulukossa 6, sivulla 34 (ks. yleiskatsaus Kadkol ym., 1999). Enteroviruskoettimia voidaan suunnitella ja valmistaa itse, mutta nykyään kaupallisesti syntetisoidut koettimet ovat puhtaudeltaan sekä laadultaan hyviä ja varmistettuja.

Formaliinifiksattujen ja parafiiniin valettujen kudoksenäytteiden ISH-menetelmässä on kolme päävaihetta; 1) näytteiden esikäsittely, 2) hybridisaatio ja hybridisaation jälkeiset pesut sekä 3) detektio. Menetelmän päävaiheiden tarkempi kuvaus on kerrottu luvussa 3 *Materiaalit ja menetelmät* (alkaen s. 37). ISH:ssa käytetään useita erilaisia liuoksia, jotka vaikuttavat menetelmän onnistumiseen. Taustan muodostumista ja koettimen epäspesifistä sitoutumista pyritään estämään käyttämällä koetinliuoksessa kalan maidin DNA:ta sekä Dendhardtin liuosta (Braissant ja Wahli, 1998). Lisäksi on hybridisaation parametreihin ja kineetiikkaan vaikuttavia liuoksia, jotka nopeuttavat ja helpottavat menetelmän toteuttamista.

Dextraanisulfaatti on hepariinin kaltainen polysakkaridi, joka lyhentää merkittävästi hybridisaatioaikaa ja lisää koettimen konsentraatiota vesiliuoksessa (Wieder ja Wetmur, 1982). Formamidi puolestaan epävakauttaa näytteiden nukleinihappojuosteita sekä estää koettimen dimerisoitumista. Formamidipitoisuus koetinliuoksessa on usein 50 % tilavuudesta, jolloin se alentaa hybridisaatiolämpötilaa 36 celsiusastetta (Sigma-Aldrich, Inc., 2010).

ISH on haastava menetelmä, jonka onnistuminen riippuu monista tekijöistä. Menetelmän optimointia vaikeuttavat etenkin työvaiheet, jotka ovat kompromisseja inkubointiaikojen, pesuaikojen ja käytettävien liuospitoisuuksien suhteen. Usein törmätäänkin kahteen yleiseen ongelmaan; hybridisaatiosignaalin puuttumiseen tai runsaaseen taustavärjäytymiseen. Ongelmat voivat johtua näytteiden esivalmisteluista, hybridisaation jälkeisten pesujen epäonnistumisesta, vääristä hybridisaatioparametreista ja liuospitoisuuksista, näytteiden kuivumisesta, koettimista ja niiden leimauksesta, näytteen nukleaasikontaminaatioista sekä permeabilisaation epäonnistumisesta. Lisäksi endogeeniset peroksidaasit ja alkaliset fosfaatasit voivat reagoida kromogeenin kanssa tuottaen runsasta epäspesifistä taustaa. Myös erilaiset artefaktat, kuten liiallisesta kuivumisesta tai liian pitkästä proteinaasipermeabilisaatiosta johtuvat kudismorfologian muutokset häiritsevät tulosten tulkintaa (Braissant ja Wahli, 1998; ks. yleiskatsaus Kadkol ym., 1999).

ISH on melko käytetty enterovirusten tutkimusmenetelmä, jota käytetään joko varmistavana tai ensisijaisena detektiomenetelmänä. Tulokset ovat olleet vaihtelevia ja usein on osoittautunut, että RT-PCR ja IHC ovat herkempiä menetelmiä enterovirusdetektiossa. Tähän saattaa ainakin vaikuttaa edellä mainittujen seikkojen ohella se, että suurien kudospalojen formaliinifiksaatio ei ole riittävän nopea inhiboimaan endogeenisiä ribonukleaaseja ja estämään virus RNA:n pilkkoutumista. Luonnollisesti myös *post mortem* -kudosnäytteen irrotuksen ja fiksatiivikäsittelyn välinen aika tulee minimoida, jolloin RNA säilyisi mahdollisimman ehjänä (Chu ym., 2005; Oikarinen ym., 2007; Oikarinen ym., 2008). Onnistunut formaliinifiksaatio ja parafiinivalu säilyttää kudospalojen RNA:ta hyvin, sillä Ylipaasto ym. (2004) detektoivat enteroviraalista RNA:ta yli 30 vuotta vanhoista näytteistä ja osoittivat ISH:lla, että 65 diabeetikosta neljällä oli haiman saarekkeissaan enterovirusinfektio. He tutkivat myös 12 akuuttiin virusinfektioon menehtynyttä vastasyntyntä, joista seitsemällä oli kuollessaan infektio haimassa. Enterovirusdetektiossa yhdistelmämenetelmät eivät ole

saavuttaneet suurta suosiota, vaikka ISH voidaan yhdistää IHC-menetelmään siten, että nukleiinihappojen ja antigenien detektio samalta kudosleikkeeltä on mahdollista. Yhdistelmämenetelmät ovat varsin haastavia, koska detektoitavat kohteet vaativat erilaiset esikäsittelyolosuhteet. Menetelmä jaetaan usein kahteen erilliseen vaiheeseen; ensimmäisessä vaiheessa toteutetaan ISH-menetelmä ja toisessa IHC (ks. yleiskatsaus Christensen ja Winther, 2006). Enterovirusedektioista ISH/IHC -yhdistelmämenetelmällä ei löytynyt kirjallisuusviitteitä.

1.4.1.3 Kudosleikkeellä tehtävät PCR -reaktiot

Haase ym. (1990) kehittivät virusten detektioon yhdistelmämenetelmän, joka yhdistää *in situ* -hybridisaation ja PCR:n yhdeksi menetelmäksi. Menetelmä perustuu kudos- tai solu- leikkeellä tapahtuvaan PCR:ään, jonka tarkoituksena on monistaa kohdesekvenssiä ja vahvistaa havainnoitavaa signaalia. *In situ* PCR -menetelmässä fiksattujen kudosten kudosleikkeiden päälle luodaan puoliläpäisevä kalvo, joka sallii alukkeiden ja polymeeraasien pääsyn intrasellulaariseen tilaan, mutta estää monistettujen PCR-tuotteiden liukenemisen soluista. Kudosleikkeellä tehtävät PCR -reaktiot jaetaan kolmeen erilaiseen tyyppiin, jotka ovat esitetty tarkemmin taulukossa 5 (ks. yleiskatsaus Nuovo, 1996).

Taulukko 5. Kudosleikkeellä tehtävät PCR-reaktiotyypit. Sekä suorissa että epäsuorissa menetelmissä voidaan käyttää esimerkiksi digoksigeniinillä leimattuja dUTP-molekyylejä.

Menetelmä:	Menetelmän kuvaus:	Lähde:
<i>In situ</i> PCR	Suora menetelmä, jossa detektoidaan monistettuun tuotteeseen syntetisoidut reporterit nukleotidit.	ks. yleiskatsaus Nuovo, 1996a ks. yleiskatsaus Komminoth ja Werner, 1997
<i>In situ</i> RT-PCR	Suora menetelmä, jossa RNA:sta monistetaan reporterinukleotidejä sisältävää cDNA:ta.	Berger ym., 1997 Bettinger ym., 1999
PCR-ISH RT-PCR-ISH	Epäsuoria menetelmiä, joissa monistettu tuote havainnoidaan leimatun koettimen ja tuotteen välisen hybridisaation avulla.	Steinhoff ym., 2001 Nuovo ym., 2009

Kudosleikkeellä tapahtuva PCR mahdollistaa ISH:ta merkittävästi herkemmän detektio- menetelmän ilman kudismorfologian tuhoutumista. Ilman kohdesekvenssin monistamista tai signaalin vahvistusmenetelmää ISH:n detektiokynnykseksi on raportoitu 10 - 50 kopiota kohdesekvenssiä solua kohden (Walboomers ym., 1988; ks. yleiskatsaus Nuovo, 1996b; ks. yleiskatsaus Komminoth ja Werner, 1997). Teoriassa *in situ* PCR:n detektiokynnys on yksi kohdesekvenssi, jota monistetaan ISH-detektiokynnyksen yläpuolelle, jolloin saadaan

vahva signaali (ks. yleiskatsaus Nuovo, 2008). *In situ* -PCR ei ole kuitenkaan saavuttanut sellaista asemaa, että sitä voitaisiin pitää virustutkimuksen perustyökaluna. Vaikka teoriassa menetelmä on erittäin käyttökelpoinen, on sen käytännön toteutus haasteellista. Ongelmia ovat aiheuttaneet etenkin artefaktat, jotka vähentävät merkittävästi menetelmän luotettavuutta. Alukkeiden epäspesifinen sitoutuminen, solun sisäiset inhibiittorit, solumorfologian heikkous ja PCR-tuotteiden diffuusio ekstrasellulaariseen tilaan johtavat väärin positiivisiin tuloksiin, jotka ovat heikentäneet menetelmän asemaa enterovirustutkimuksessa (ks. yleiskatsaus Höfler, 1993; Berger ym., 1998).

1.4.2 Antigeenien tunnistamiseen perustuvat detektiomenetelmät

Enterovirusten antigeeneja tunnistavat detektiomenetelmät ovat yleisiä enterovirustutkimuksessa. Kirjallisuudessa onkin esitelty runsaasti sovelluksia, jotka perustuvat vasta-aiheen ja detektoitavan antigeenin väliseen reaktioon. Viitteitä on muun muassa immunofluoresenssiin perustuvista menetelmistä sekä erilaisista entsymaattisiin reaktioihin perustuvista menetelmistä, kuten immunoperoksidaasivärjäyksistä.

Immunohistokemialliset tutkimusmenetelmät perustuvat vasta-aiheen ja tunnistettavan antigeenin väliseen spesifiseen sitoutumisreaktioon. Sitoutunut vasta-aine detektoidaan suoraan siihen liitetyn merkkiaineen avulla tai epäsuorasti merkkiaineella leimatulla sekundäärisellä tai sitä useammalla vasta-aineella. Merkkiaine voi olla esimerkiksi fluorokromi tai entsyymi. Yousef ym. (1987) kehittivät laajakirjoisen hiiren monoklonaalisen enterovirusvasta-aiheen, joka tunnistaa enterovirusten VP1-alueella sijaitsevan konservatiivisen epitoopin. Tämä vasta-ainekloni 5-D8/1, isotyyppeä IgG_{2aκ}, on kaupallisesti saatavilla (DakoCytomation, Tanska). Tällä vasta-aineella on tehty useita tutkimuksia, joilla on pyritty selvittämään enterovirusten osuutta T1D:n patogeneesissä (Taulukko 3, s. 20).

Samuelson ym. (1995) ovat tutkineet enterovirusten VP1-aluetta sekä 5-D8/1:n diagnostista potentiaalia. VP1-proteiinissa oleva epitooppi on yhdeksän aminohappotähdettä pitkä ja sen sekvenssi on muotoa: Glu-Ile-Pro-Ala-Leu-Thr-Ala-Val-Glu. Epitooppi sijoittuu VP1-proteiinin N-terminaalisen pään aminohappotähteiden 40 - 48 välille. Zhangin ym. (2000) mukaan epitooppi on lineaarinen ja se on VP1-proteiinin natiivissa rakenteessa kätkeytyneenä. Onnistunut IHC-menetelmä 5-D8/1 -vasta-aineella vaatiikin epitoopin paljas-

tamisen. Samuelsonin ym. (1995) ja Trabelsin ym. (1995) tutkimukset osoittavat, että 5-D8/1-vasta-aine soveltuu erinomaisesti nopeaan ja lähes kaikkien enterovirusserotyypin VP1-proteiinin detektioon soluviljelmistä. Härkönen ym. (2000 ja 2002) kuitenkin havaitsivat tutkimuksissaan, että enterovirusten VP1-epitoppi jakaa merkittävää sekvenssien samankaltaisuutta saarekeautoantigeenien, tyrosiinifosfataasin sekä heat shock -proteiinien (HSP60/65) kanssa. Sekvenssien samankaltaisuus saattaa aiheuttaa vasta-aineen epäspesifistä sitoutumista ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Oikarinen ym. (2008) eivät immunovärijäyksissään kuitenkaan havainneet 5-D8/1 -vasta-aineen sitoutuvan heat shock -proteiini 60:n rakenteeseen. Dakon 5-D8/1 -vasta-aineen tiedetään sitoutuvan haimassa epäspesifisesti ainakin sentroakinaarisoluihin sekä haimatiehyisiin (Richardson ym., 2009).

Mono- ja polyklonaalisia enterovirusvasta-aineita on tehty monissa laboratorioissa myös itse. Usein suunnitellun vasta-aineen antigeeni on VP1-proteiinissa, mutta myös VP2- ja VP3 -kapsideihin sitoutuvia vasta-aineita on suunniteltu. Omissa laboratorioissa tuotetut monoklonaaliset enterovirusvasta-aineet ovat osoittautuneet toimiviksi ja niiden herkkyys ja spesifisyys on tutkimusten mukaan hyvää luokkaa (Henke ym., 1995; Jeong ym., 2007; Terletskaja-Ladwig ym., 2008; Miao ym., 2009). Myös polyklonaalisia VP1 ja VP2/VP3/VP4 -vasta-aineita on tuotettu ja niillä on detektoitu enterovirusta sydän- ja haimakudoksesta potilailta, jotka ovat menehtyneet sydänlihastulehduksen ja diabeteksen aiheuttamiin oireisiin (Foulis ym., 1990). Miao ym. (2009) ovat tutkimuksessaan vertailleet omassa laboratoriossaan tuotettujen ja kaupallisten enterovirusvasta-aineiden herkkyyttä ja spesifisyyttä. Omassa laboratoriossa tuotettuna vasta-aineena oli monoklonaalisten enterovirusvasta-aineiden sekoitus ja kaupallisina 5-D8/1- sekä Milliporen PanEnterovirus blend vasta-aineet. PanEnterovirus blend on monoklonaalisten enterovirusvasta-aineiden sekoitus, joka osoittautui erittäin herkäksi; sen avulla detektoitiin kaikki tutkimuksen 41 enterovirusserotyyppiä. Lähes samaan herkkyYTEEN ylsivät omat vasta-aineet, jotka tunnistivat infektoituista GMK (Engl. Green Monkey Kidney) soluista 40 eri serotyyppiä. Dakon 5-D8/1 -vasta-aineen herkkyys oli tutkimuksen heikoin ja se jätti tunnistamatta kahdeksan serotyyppiä ja detektoi neljä heikosti. Merkittävää on, että vasta-aine tunnisti heikosti CAV-ryhmän enterovirusia ja jätti tunnistamatta kaikki neljä HEV (Engl. *human enterovirus*) 68-71-serotyyppiä sekä CAV16-serotyyppin. Terletskaja-Ladwig ym. (2008) tutkimuksen tulokset olivat samansuuntaisia. Miao ym. (2009) tutkivat myös enterovirusvasta-

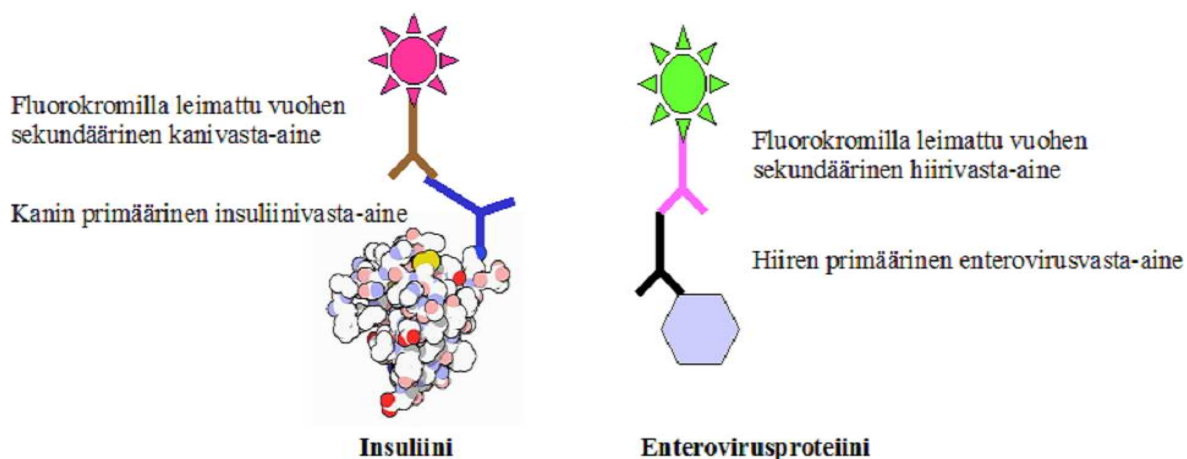
aineiden spesifisyyttä. Heidän laboratoriossaan tuotetut vasta-aineet sekä 5-D8/1 -vasta-aine eivät detektoineet kymmenestä enterovirusiin kuulumattomista virusserotyypeistä yhtäkään. Milliporen PanEnterovirus blend tunnisti seitsemän, mikä osoittaa melko suurta epäspesifistä sitoutumista. Oikarinen ym. (2010) tutkimuksessa tutkittiin sekä edellä mainittujen kaupallisten että omassa laboratoriossa tuotettujen lajispesifisten polyklonaalisten vasta-aineiden detektiotehoa sekä detektiospesifisyyttä formaliinifiksatuista ja parafiiniin valetuista soluleikkeistä sekä jääleikkeistä. Tutkimuksessa käytettiin myös kaupallisia Milliporen lajispesifisiä enterovirus-, coxsackievirus B-, echovirus- ja poliovirus vasta-ainekoituksia. Tulokset vasta-aineiden detektiotehosta ovat aiempien tutkimusten kaltaisia (Terletskaia-Ladwig ym., 2008; Miao ym., 2009). Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että Milliporen CBV-spesifiset vasta-aineet tunnistivat CBV-infektion ainoastaan jääleikkeiltä. Polyklonaalisten vasta-aineiden havaittiin toimivan hyvin fiksatuilla solunäytteillä (Oikarinen ym., 2010). Nämä omassa laboratoriossa tuotetut vasta-aineet on esitetty tarkemmin luvussa 3.2 *DNA-koettimet ja vasta-aineet* (alkaen s. 38).

Haimakudosnäytteiden enterovirusdetektiossa erilaiset IHC-värjäykset ovat olleet suosittuja. Nakane ja Pierce (1966) kehittivät suoran immunoperoksidaasivärjäyksen, jossa piparjuuren peroksidaasi (HRP) on liitetty primääriseen vasta-aineeseen. Heidän tutkimuksensa loi pohjan nykyajan immunoentsyymaattisille värjäysmenetelmille. Tämän jälkeen menetelmät ovat kehittyneet nopeasti ja käyttöön on otettu muitakin entsyymejä (Taulukko 6). Foulis ym. (1990) osoittivat, että ABC-detektiomenetelmä on riittävän herkkä tunnistamaan VP1-proteiineja haimakudoksesta. Monissa hiljattain julkaistuissa enterovirustutkimuksissa käytetään polymeeritekniikkaan perustuvaa EnVision™ + -signaalinvahvistusmenetelmää. Menetelmä soveltuu enterovirusdetektioon hyvin, sillä menetelmä vahvistaa signaalia taustavärjäytymisen häiritsevästi lisääntymättä (Zhang ym., 2000; Oikarinen ym., 2007 ja 2008; Richardson ym., 2009). Zhang ym. (2000) vertasivat tutkimuksessaan LSAB- ja EnVision- menetelmiä enterovirusten detektioinnissa. EnVision-menetelmän etuja LSAB-menetelmään verrattuna ovat sen helppo toteutus, nopeus sekä erinomainen herkkyys. Lisäksi taustavärjäytyminen on heikompaa kuin LSAB-menetelmällä.

Taulukko 6: Immunoentsyymaattiset signaalin vahvistusmenetelmät. Immunoentsyymaattisten menetelmien kehitys on ollut nopeaa ja menetelmät ovat tulleet yhä herkemiksi. Vaikka herkkyserot ovat merkittäviä, itse väriä tuottava reaktio on pysynyt samana ja valtaosa immunoentsyymaattisista menetelmistä perustuu Nakane ja Pierce (1966) kehittämään HRP:n ja sen substraatin väliseen väriä tuottavaan reaktioon.

<i>Menetelmä</i>	<i>Menetelmän kuvaus</i>	<i>Herkkyys</i>	<i>Lähde</i>
HRP	Primääri- tai sekundäärivasta-aineeseen liitetty HRP:n ja substraatin välinen reaktio.	+	Nakane ja Pierce, 1966
PAP	Peroksidaasi-anti-peroksidaasi -menetelmä, jossa sekundäärivasta-aineen peroksidaasiin sitoutuu tertiäärinen peroksidaasilla leimattu vasta-aine. Toimintaperiaatteeltaan kuten HRP-menetelmä.	++	Stenberger ym., 1970
ABC	Avidiini-biotiini kompleksi -menetelmä perustuu avidiinin ja biotiinin väliseen affiniteettiin. Primääriseen vasta-aineeseen sitoutuu biotiinileimattu sekundäärivasta-aine. Sekundäärivasta-aineeseen puolestaan sitoutuu avidiini-biotiini-peroksidaasi kompleksi. Kompleksi sisältää useita peroksidaasimolekyylejä ja kompleksin kokoa voi kasvattaa.	++	Guesdon ym., 1979
LSAB	Leimattu strepavidini-biotiini -menetelmä, joka on toiminnaltaan kuten ABC-menetelmä, mutta sekundäärivasta-aineeseen sitoutuu strepavidini-HRP-kompleksi. Myös tässä menetelmässä kompleksi sisältää useita peroksidaasimolekyylejä ja kompleksin kokoa voi kasvattaa.	++	Hsu ym., 1981
APAAP	Alkalinen fosfataasi-monoklonaalinen-anti-alkalinen fosfataasi -menetelmä on toimintaperiaatteeltaan kuin PAP, mutta entsyyminä on alkalinenfosfataasi (AP).	++	Cordell ym., 1984
EnVision™ +	Menetelmä on epäsuora signaalinvahvistusmenetelmä, joka perustuu dextraanipolymeerirunkoon. Runkoon on liitetty kymmeniä entsyymimolekyylejä ja sekundäärisiä vasta-aineita.	+++	Sabattini ym., 1998 Ramos-Vara ja Miller, 2006
ImmPRESS™	Epäsuora signaalinvahvistusmenetelmä, joka perustuu sekundäärivasta-aineeseen liitettyyn HRP-polymeeriketjuun.	++++	Ramos-Vara ja Miller, 2006 Vector Laboratories, 2005
CSA	CSA (Engl. Catalyzed Signal Amplification) on epäsuora fluoresyyli- tai biotinylytyramidiin perustuva signaalinvahvistusmenetelmä. Sekundääriseen vasta-aineeseen liitetty HRP katalysoi fluoresyyli-tyramidin hapettumisen, jolloin ne sakkautuvat näytteelle. Sakkautuneet fluoresyyli-tyramidimolekyylit tunnistetaan anti-fluoresyylivasta-aineella, johon on liitetty HRP. Fluoresyylimolekyylit voidaan havaita myös suoraan fluoresenssimikroskoopilla.	+++++	Bobrow ym., 1989; 1991

Enterovirusten detektoinnissa käytetään myös fluoresenssiin perustuvia menetelmiä ja ne ovat yleisiä tutkimuksissa, joissa pyritään selvittämään enterovirusten lokalisaatiota ja isäntäsoluspesifisyyttä haiman saarekkeissa. Nämä menetelmät ovat usein immunofluoresenssiin perustuvia kaksoisvärjyksiä (Ylipaasto ym., 2004; Dotta ym., 2007; Oikarinen ym., 2008; Richardson ym., 2009). Menetelmän etuna on kahden antigeeniseltä alueeltaan erilaisen kohteen samanaikainen detektio, mikä mahdollistaa kohteiden kolokalisaatiotutkimukset (Kuva 3). Kaksoisvärjyksen suunnitteluun tulee kiinnittää erityistä huomiota, sillä väärin valitut vasta-ainetyypit toistensa tai kudoksen suhteen, saattavat aiheuttaa merkittävää tausta- tai epäspesifistä värjäytymistä, mitkä voivat johtaa virhetulkintoihin (ks. yleiskatsaus Christensen ja Winther, 2006; Richardson ym., 2009).



Kuva 3. Immunofluoresenssiin perustuvassa epäsuorassa kaksoisvärjyksessä tunnistetaan samanaikaisesti kahta eri detektoitavaa kohdetta. Kanin primäärinen insuliinivasta-aine on sitoutunut insuliini-peptidissä olevaan epitooppinsa. Kanin vasta-aine detektoidaan vuohen fluorokromileimatulla vasta-aineella. Vastaavasti hiiren enterovirusvasta-aine sitoutuu enteroviruksen kapsidiproteiinin epitooppiin. Vuohen fluorokromilla leimattu vasta-aine sitoutuu spesifisesti hiirivasta-aineeseen (Muokattu lähteistä: ks. yleiskatsaus Lite, 2009; ks. yleiskatsaus Christensen ja Winther, 2006).

Oikarinen ym. (2008) osoittivat, enterovirus voi lokalisoitua myös saarekkeiden glukagonia tuottaviin α -soluihin. Löytö on mielenkiintoinen, sillä α -solujen ei ole havaittu tuhoutuvan autoimmuunisessa T1D:ssä. Täysin poikkeuksellinen löytö ei kuitenkaan ole, sillä viitteitä α -solujen enterovirusinfektiosta on saatu aikaisemmin ihmisen saarekeviljelmillä *in vitro* (Chehadeh ym., 2000; Roivainen ym., 2002). Molemmista tutkimuksista käytettiin kaupallista 5-D8/1 -enterovirusvasta-ainetta. Täydellistä kuvaa enterovirusten saareketropismista ei ole saatu, sillä kirjallisuudesta ei löydy viitteitä siitä, että isäntäsoluspesifisyyttutkimukset olisivat kattaneet kaikki saarekkeen solut, PP-solut, Schwannin solut ja ε -solut mukaan lukien.

2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tampereen lääketieteellisen tiedekunnan virologian yksikössä on kehitetty laaja testi-paneeli, jonka avulla voidaan osoittaa enterovirusinfektioita haimakudoksesta (Oikarinen ym., 2007, 2008 ja 2010). Testipaneeli pitää sisällään sekä enterovirusten rakenneproteiinien tunnistamiseen perustuvan IHC-detektiomenetelmän sekä viruksen RNA:ta tunnistavat ISH- sekä jo aiemmin kehitetyn RT-PCR -menetelmän (Lönnrot ym., 1999).

Pro gradu -tutkielmani tarkoituksena oli:

- 1) Varmentaa IHC- ja ISH-menetelmiin perustuvaa enterovirusdetektiota haimakudoksesta itsetuotetuilla enterovirusvasta-aineilla sekä enteroviruskoettimilla, jotka suunniteltiin itse.
- 2) Osoittaa ISH-menetelmällä haimakudoksesta komplementaarista negatiivisjuosteista RNA:ta kehittämällämme koettimella.
- 3) Selventää tietoa enterovirusten isäntäsoluspesifisyydestä ja lokalisaatiosta Langerhansin saarekkeissa sekä vahvistaa ja varmentaa fluoresenssiin perustuvan immunohistokemiallisen kaksoisvärjäyksen toimivuutta.

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Kudosnäytteet ja näytteiden valmistus

Näytemateriaalina käytettiin formaliinifiksattuja ja parafiiniin valettuja ihmisen haimakudoksia ja hiiren sydänlihaskudosta, ohutsuoli-, perna-, ja haimakudoksia. Ihmisen haimakudokset ovat peräisin terveiltä elinluovuttajilta (Taulukko 7) kahdesta eri kudospankista (suomalainen PanFin- ja yhdysvaltalainen nPOD -kudospankki, (<http://www.jdrfnpod.org/>)) ja hiiren kudosnäytteet Balb/c-laboratoriokannan hiiristä. PanFin-kudospankista saatujen haimakudosten aika irrotuksesta käsittelyyn oli keskimäärin 9-10 tuntia ja vaihteli kolmesta tunnista 33 tuntiin. Positiivisena kontrollina käytettiin CBV3-infektoidun hiiren haimakudosta. Hiirileike leikattiin monikudosblokista ja samalla leikkeellä oli haima-, sydänlihaskudosta, ohutsuoli- ja pernakudosta. Hiiret oli infektoidu annostelemalla fysiologisessa suolaliuoksessa olevat CBV3-virukset *i.m.* Hiiret oli lopetettu kolmen päivän kuluttua infektiosta ja kudokset oli otettu talteen. Negatiivisena kontrollina käytettiin kudisleikkeitä hiirestä, jota ei ollut infektoidu. Hiiren parafiiniin valetut kudosnäytteet olivat vuodelta 1996. ISH:n optimoinnissa ei voitu käyttää ihmisen haimakudosta, sillä enteroviruspositiivista kudosta ei ollut saatavilla.

Näytepalat immersiofiksattiin 10 % formaliinissa ja huoneenlämmössä vuorokauden ajan. Kudospesointi tehtiin Tissue-Tek Vip[®] (Sakura Finetek Europe B.V. Alankomaat) -kudoksenkäsittelyautomaatilla. Vesi poistettiin kudusrakenteesta nousevalla etanonsarjalla ja etanoli puolestaan ksyleenillä. Tämän jälkeen näytteet upotettiin parafiiniin ja parafiinikäsittelyn jälkeen suoritettiin näytteiden valu parafiiniin. Nämä näytteiden esikäsittelyvaiheet oli tehty jo ennen tätä tutkimusta. Tarkemmat tiedot näytteiden esivalmistuksesta ja kudospesoinnista ovat Liitteessä 2, sivulla 91. Parafiiniin valetuista näytteistä leikattiin 5 µm paksuisia kudisleikkeitä Leican SM 200R -mikrotomilla. ISH:lla tutkittavien näytteiden leikkaus- ja kiinnitysprosessi tehtiin huolellisesti varoen kontaminoimasta näytettä ribonukleaseilla (RNAasit). Kudisleikkeiden oikaisussa käytettiin dietyylipyrokarbonaatti (DEPC) vettä suuren RNAasi kontaminaatoriskin vuoksi. Näytteiden kiinnitys objektilaseille (Superfrost[®] Plus, Thermo Scientific, Saksa) suoritettiin pitämällä laseja lämpökaapissa +60 °C:ssa noin 1.5 h:n ajan. Tämän jälkeen näytteitä varastoitettiin +4 °C:ssa.

nPOD-kudospankista saadut näytteet olivat formaliinifiksattuja ja parafiiniin valettuja kudospätkiä ja ne saatiin Yhdysvalloista valmiiksi laseille kiinnitettyinä leikkeinä.

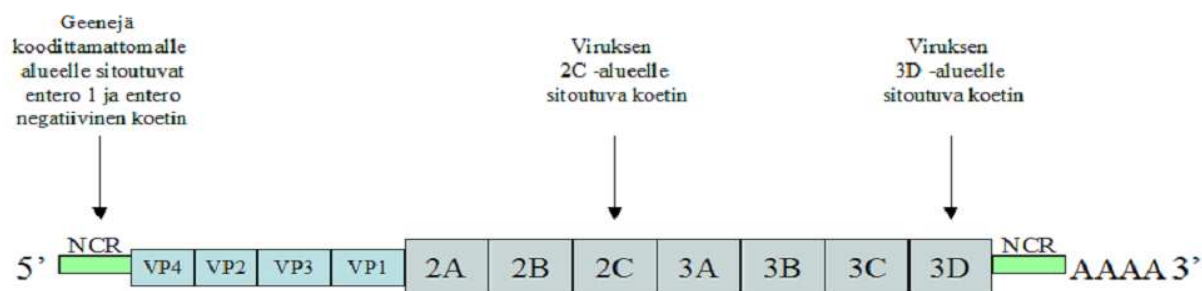
Taulukko 7. Ihmisen haimanäytteet. Haima 1-10 -kudokset olivat peräisin suomalaisilta elinluovuttajilta PanFin -kudospankista. Haimaleikkeet 6001 ja 6007 saatiin valmiina leikkeinä nPOD-kudospankista Yhdysvalloista.

<i>Näyte</i>	<i>Sukupuoli</i>	<i>Ikä/Vuotta</i>	<i>Diabetes status</i>
Haima 1	Nainen	52	Terve verrokki
Haima 2	Nainen	36	Terve verrokki
Haima 3	Mies	16	Terve verrokki
Haima 4	Mies	55	Terve verrokki
Haima 5	Nainen	62	Terve verrokki
Haima 6	Mies	43	Terve verrokki
Haima 7	Mies	56	Terve verrokki
Haima 8	Mies	22	Terve verrokki
Haima 9	Mies	61	T2D
Haima 10	Nainen	38	Terve verrokki
Haima 6001	Mies	22	Terve verrokki
Haima 6007	Mies	9	Terve verrokki

3.2 DNA-koettimet ja vasta-aineet

Enterovirusgenomin konservoituneille 2C-, ja 3D-alueille suunniteltiin lajispesifiset koettimet, joiden tarkoituksena on tunnistaa spesifisesti eri enteroviruslajeihin kuuluvat virusserotyypit. Enterovirusgenomin 5'-koodittamattomalle alueelle suunniteltiin koetin, joka on komplementaarinen enterovirusgenomin replikaatiossa syntyvää negatiivista juostetta kohtaan. Tämä koetin tunnistaa kaikki enterovirusgenotyypit ja se on negatiivikopio Oikarinen ym. (2008) tutkimuksessa käytetystä E1-koettimesta (Kuva 4 ja Taulukko 8). Kaikissa koettimissa käytettiin vaihtoemäksiä, jotta koettimet hybridisoituisivat tietyn enteroviruslajin kaikkien serotyyppien genomiin. Vaihtoemäksien käytöllä mahdollistetaan laajempi ja spesifisempi eri enterovirusserotyyppien tunnistaminen. Vaihtoemäksien vuoksi koetinliuoksessa ei ole ainoastaan identtisiä koettimia, vaan liuos on vaihtoemäksiä sisältävien koettimien seos. Koettimien sekvenssit ovat Taulukossa 8. Kukin koetintyyppi liuotettiin ultrapuhtaaseen veteen siten, että koetinkonsentraatioksi saatiin 100 µM.

IHC:ssä käytettiin sekä kaupallisia että itse tuotettuja primäärisiä vasta-aineita. Kaupalliset vasta-aineet olivat hiiren monoklonaalisia vasta-aineita: insuliini Ab-6- (Klooni: INS04 + INS05. Valmistaja: NeoMarker's, Jakelija: Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat), glukagoni- (Klooni: K79Bb10. GenWay Biotech, Inc., Yhdysvallat) ja somatostatiinivasta-aineita (Klooni: SOM-18. GenWay Biotech, Inc., Yhdysvallat). Immunoperoksidaasiväryksessä käytettiin kotitekoisten enterovirusvasta-aineiden ohella myös kaupallista marsun insuliinivasta-ainetta (Klooni: A0564. DakoCytomation, Tanska), jonka avulla saatiin tietoa β -solujen suhteellisesta pinta-alasta leikkeellä. Omassa laboratoriossa tuotetut kanin polyklonaaliset CAV16- (0.6 mg/ml), CBV3- (0.61 mg/ml), ja echovirus11 (0.21 mg/ml) IgG-vasta-aineet on eristetty näillä virusserotyypeillä infektoidun kanin seerumista. *In vitro*-infektoiduista soluista virukset ovat saatu hajottamalla solut pakastus-sulatus sykleillä, jolloin virukset ovat vapautuneet ympäröivään liuokseen. Infektiiviset virukset on puhdistettu sokerigradienttisentrifugaatiolla. Proteiini G:n avulla puolestaan puhdistettiin viruksia vastaan muodostuneet vasta-aineet kanin seerumista. Näiden polyklonaalisten vasta-aineiden tuotto-prosessi oli tehty jo ennen tämän gradutyön aloittamista Abrahamin ja Colonnin (1984) tutkimuksessa esitellyn menetelmän mukaan. Tutkimuksessa käyttämäni sekundääriset vasta-aineet olivat vuohessa tuotettuja Alexa Fluor 488 nm ja Alexa Fluor 555 nm vasta-aineita. (Invitrogen Corporation, Yhdysvallat). Alexa Fluor 488 nm on kanivasta-aine, kun taas Alexa Fluor 555 nm on hiirivasta-aine.



Kuva 4. Positiivisjuosteinen enterovirusgenomi ja itsesuunniteltujen koettimien sitoutumiskohdat. Lajispesifiset enteroviruskoettimet suunniteltiin sitoutumaan enteroviruksen 2C- ja 3D -alueille. Enteronegatiivista juostetta tunnistava koetin hybridisoituu enterovirusten negatiivisen juosteen 3'-päähän, joka on kopio positiivisen säikeen 5'-päätä.

Taulukko 8. Enterovirusten detektioon suunnitellut koettimet. Enterovirusgenomin 2C- ja 3D -alueille sitoutuvat DNA-oligonukleotidikoettimet on suunniteltu lajispesifisiksi ja ne tunnistavat ainoastaan tietyn lajin enterovirusgenomeja. Koettimen nimen yhteydessä oleva a-, b-, c- tai d -kirjain symboloi enteroviruslajia.

	Enterovirusgenomin 2C -alueelle sitoutuvat DNA-koettimet	Emäksiä kpl	GC%	TM °C
2Ca	5'GIN GCN AAR RCA TAC AAG TTC AAT WCGGTG TTT GCT CTT GAA CTG CAT GTA TTR TTC ATY CTK3'	63	33-45	68-72
2Cb	5'GCN AAR RCA TAC AGG YTC AAT ACG GCA TTT GGA CTT GAA CTG TAT GTA RIT RCT CAT YTT3'	60	33-45	67-72
2Cc	5'GTD GCWAAN ACA TAC TGG TTC AAT ACG GTG TTT GCT CTT GAA CTG TAT RTA RIT DIT DAT KTG G3'	64	31-42	67-72
2Cd	5'GAD GCH RAA ACA WACHGG TTC AAT GCG AGA TTT GGA CTT GAA CTG KAT GTA RIT RIT WAT TTT C3'	64	31-42	67-72
	Enterovirusgenomin 3D -alueelle sitoutuvat DNA-koettimet			
3Da	5'AAV TTY TCA TAY TCY TSY TTM CCR TTR TGC CAT GCY ARN AAR CAV AGG GAS CGC ACR TGR TCT TGR GTR TT3'	71	32-56	69-79
3Db	5'AAV TCY TCA TAY TCD TGC TCY CCR TTG TGC CAR GCC AAT ARR CAC ARB GAK CGC ACR TGR TCY TGR GTG TT3'	71	38-61	71-80
3Dc	5'AAT TTR TTR TAT TCT TCT TCD CCR TTG TGC CAA GCC AAT ARG CAC ARY GAK CGN ACR TGA TCC TGN GTG TTT3'	72	35-50	70-76
3Dd	5'ACM CCT CCA CAY TGW CCWGCY CTW GTK GGR AAR TTR TAC ATT ARW AIT CKR TKG GTD GG3'	59	36-56	68-76
	Enterovirusgenomin 5' -pään negatiivisen juosteen koodittamattomalle alueelle sitoutuva DNA-koetin			
E-	5'TGT CGT AAY GGG YAA CTC YGC AGC GGA ACC GAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT TTC3'	54	52-57	74-76
	Enterovirusgenomin 5' -pään koodittamattomalle alueelle sitoutuva DNA-koetin			
E1	5'GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA GTC GGT TCC GCT GCR GAG TTR CCC RIT ACG ACA3'	54	52-57	74-76

Vaihtelevat emäket (Eng. Wobbles) IUPAC-IUB merkinnöin: **R**=(A ja G), **Y**=(C ja T), **M**=(A ja C), **K**=(G ja T), **S**=(G ja C), **W**=(A ja T), **H**=(A ja C ja T), **B**=(G ja T ja C), **V**=(G ja C ja A), **D**=(G ja T ja A) ja **N**=(G ja A ja T ja C).

3.3 Dakon 5-D8/1-vasta-aineen epitoopin rinnastus BLAST-työkalulla

Rinnastuksella haluttiin selvittää, mitkä ihmisen tuottamat proteiinit jakavat sekvenssi-identtisyyden enterovirusten VP1-proteiiniin sitoutuvan 5-D8/1 -vasta-aineen sitoutumiskohdan kanssa. Tutkimus on tarpeen, sillä se selventää tietoa vasta-aineen mahdollisesta epäspesifisestä sitoutumisesta IHC:ssa, ja täten mahdollistaa osaltaan tulosten luotettavuuden arvioinnin.

VP1-proteiinissa sijaitsevan 5-D8/1 -vasta-aineen epitoopin aminohapposekvenssi on Glu-Ile-Pro-Ala-Leu-Thr-Ala-Val-Glu (Samuelson ym., 1995) ja se käännettiin FASTA-muotoon. FASTA-muodossa yhtä aminohappoa koodittaa yksi kirjain ja epitoopin sekvenssi on muotoa E-I-P-A-L-T-A-V-E. Sekvenssin rinnastus tehtiin BLAST-ohjelmalla. Epitoopin FASTA-sekvenssi liitettiin Protein BLAST -ohjelman tekstikenttään ja rinnastuksen para-

metreiksi valittiin blastp 2.2.23+ ohjelma ja pisteytysmatriksiksi PAM30-matriksi. Rinastus tehtiin ihmisen proteiineja kohtaan ja tietokannaksi valittiin useita eri proteiinitietokantoja.

3.4 Immunohistokemiallinen peroksidaasivärjäys

Tässä tutkimuksessa käytetyt ihmisen haimanäytteet (n = 12) (Taulukko 7) seulottiin ensin immunoperoksidaasivärjäyksellä mahdollisten enterovirusinfektioiden havainnoimiseksi. Vasta-aineina käytettiin polyklonaalisia CAV16-, CBV3-, ja Echo11 -vasta-aineita. Värjäystulosten perusteella saatiin tietoa enteroviruspositiivisista haimoista, joita voitiin jatkossa käyttää ISH:ssa sekä virusten isäntäsoluspesifisyystutkimuksiin immunohistokemiallisessa kaksoisvärjäyksessä. Haimaleikkeet 1-10 värjättiin lisäksi kaupallisella insuliinivasta-aineella, jotta niistä voitiin laskea β -solujen suhteellinen osuus.

Immunoperoksidaasivärjäyksen tulos tulkittiin enteroviruspositiiviseksi, jos se täytti kolme ehtoa:

1. Värjäytymisen täytyi olla intensiteetiltään voimakas ja selkeästi taustastaan erottuva.
2. Värjäytymisen täytyi rajoittua selkeästi saarekkeisiin, mutta ei leikkeen kaikkiin saarekkeisiin eikä saarekesoluihin.
3. Taustavärjäytymisen tuli olla vähäistä.

Immunoperoksidaasivärjäykset tehtiin epäsuoralla menetelmällä hyödyntäen kaupallista marsun insuliinivasta-ainetta (Taulukko 9) ja primäärisiä polyklonaalisia enterovirusvasta-aineita sekä HRP:lla leimattuja kaupallisia vuohen sekundäärisiä vasta-aineita. Värjäyksessä käytettiin BenchMark[®] LT Staining Module (Ventana Medical Systems INC, Yhdysvallat) -värjäysautomaattia ja NexES v9.30 ohjelmistoa. Värjäyksessä käytetyt pus-kuri- ja pesuliuokset olivat Ventanan kaupallisia liuoksia ja detektiossa käytettiin Ventanan *ultraView*[™] Universal DAB Detection Kittiiä valmistajan ohjeen mukaan. Reagenssipak-

kauksen vasta-aineet ovat usealla peroksidaasimolekyylillä leimattuja vuohen vasta-aineita, jotka tunnistavat hiiren IgG-, IgM -vasta-aineita ja kanin primäärisiä vasta-aineita. Immunoperoksidaasivärjäyksen ohjelma kokonaisuudessaan Liitteessä 1, s. 90.

Värjäysprotokollan ensimmäisenä vaiheena oli näytteen kiinnittäminen lasille, jonka jälkeen näytteestä poistettiin parafiini EZ-Prep -liuoksen avulla. EZ-Prep -liuos huuhdeltiin pois vedellä, minkä jälkeen solut permeabilisoitiin käyttämällä Cell Conditioner -permeabilisointiliuosta. Epitootit paljastettiin kuumentamalla. Ennen primäärivasta-aineiden lisäystä kudokset käsiteltiin 3 % peroksidaasilla, joka inhiboi endogeeniset peroksidaasit. Leikkeille pipetoitiin käsin ainoastaan primääriset vasta-aineet. Sitoutumattomien vasta-aineiden pesun jälkeen leikkeille lisättiin Ventanan HRP:llä leimatut vuohen sekundääri-vasta-aineet. Inkubointien ajaksi näyte suojattiin nestemäisellä peitinkalvolla kuivamisen estämiseksi. Inkubointiajat ja vasta-ainelaimennokset ovat Taulukossa 9. Kromogeeninä värjäysreaktiossa käytettiin DAB:ia ja sen substraattina 0.04 % vetyperoksidia PBS:ssä. Huuhteluiden jälkeen näytteille lisättiin kuparisulfaattia (5g/l) asetaattipuskurissa ja annettiin inkuboitua. Kuparisulfaatin tarkoitus oli vahvistaa DAB:in sävyä. Vastaväriä käytettiin Harrisin hematoksyliiniä ja hematoksyliinin sävyä sinertäväksi muuttavaa reagenssia (Engl. Bluing reagent). Lopuksi näytteet huuhdeltiin ja pedattiin käsin ksyleenipitoisella Pertex (HistoLab[®], Ruotsi) petausaineella.

Taulukko 9. Immunoperoksidaasivärjäyksessä käytetyt vasta-aineet, niiden laimennossuhde sekä käytetty inkubointiaika.

<i>Primääriset vasta-aineet</i>	<i>Laimennossuhde</i>	<i>Inkubointiaika</i>
CAV-16	1:100 ja 1:200	30 min.
CBV-3	1:300	26 min.
ECHO-11	1:100	26 min.
Insuliini (klooni: A0564 DakoCytomation, Tanska)	1:2000	30 min.

3.5 Fluoresenssiin perustuva immunohistokemiallinen kaksoisvärjäys

Kaksoisvärjäyksen optimoinneissa käytettiin immunoperoksidaasivärjäyksen mukaan enteroviruspositiiviseksi osoittautuneita ihmisen haimanäytteitä (n = 4). Immunohistokemiallisessa kaksoisvärjäyksessä formaliinifiksatuista ja parafiiniin valetuista ihmisen haimanäytteistä poistettiin parafiini inkuboimalla näytelaseja ksyleenissä kolme kertaa viisi min.

kerrallaan. Parafiinin poiston jälkeen näytteille tehtiin rehydraatio, jossa laskevan etanolisarjan ja ultrasuodatetun veden (Millipore) avulla näytteisiin saatettiin vesi. Rehydraatiossa näytteet olivat kaksi kertaa kaksi min. 99 % ja 94 %:ssa ja kaksi min. 70 %:ssa alkoholi-laimennoksessa. Tämän jälkeen näytteen solut permeabilisoitiin. Permeabilisaatio ja anti-geenien paljastus tehtiin mikroaaltouunissa kaksi kertaa seitsemän min. Tris-HCl -puskurissa (pH 9.0). Mikroaaltouunikäsittelyn jälkeen näytteet jäätyivät 20 min., minkä jälkeen näytteet pestiin ultrasuodatetulla vedellä ja PBS:llä viisi min. kullakin. Lisäksi näytteet kastettiin PBS-Tween:iin vasta-aineiden epäspesifisten sitoutumisen estämiseksi.

Primäärivasta-aineet pipetoitiin leikkeille kahden vasta-aineen sekoituksena siten, että toinen vasta-aine oli CAV16- ja toinen joko insuliini-, glukagoni-, tai somatostatiinivasta-aine. Vasta-aineet liuotettiin 0.1 % BSA/PBS -laimennusliuokseen Taulukon 10 mukaan ja liuosta lisättiin leikkeille 200 µl. BSA oli Calbiochemin (Merck KGaA, Saksa) nukleiinivapaata naudan seerumin albumiinia. Vasta-aineiden annettiin inkuboitua kosteassa kammiossa tunti (RT). Näytteet pestiin kolme kertaa viisi min. PBS-Tweenillä sitoutumattomien vasta-aineiden poistamiseksi. Tämän jälkeen näytteille lisättiin sekundäärivasta-aineet sekoituksena, jonka jälkeen näytteitä inkubointiin kosteassa kammiossa 30 min. RT:ssä. Seuraavaksi näytteet pestiin, kuten primäärivasta-aineinkubaation jälkeen. Lisänä oli kuitenkin 5 min. vesipesu (Millipore), jonka jälkeen näytteet pedattiin ja niiden annettiin kuivua RT:ssä 24 h. Fluoresenssin haalistumisen estämiseksi kokeiltiin ProLong Gold antifade agent -petausainetta (Invitrogen Ltd. Iso-Britannia), joka otettiin hyvien ominaisuuksiensa vuoksi käyttöön. Petausainetta käytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Taulukko 10. Vasta-aineet, niiden pitoisuus sekä laimennussuhde.

<i>Vasta-aine</i>	<i>Pitoisuus mg/ml</i>	<i>Laimennos</i>
CAV16-vasta-aine	0.6	1:5
Insuliini Ab-6-vasta-aine	0.2	1:150
Glukagonivasta-aine	11.8	1:300
Somatostatiinivasta-aine	0.14	1:500
Alexa-Fluor 488 nm	2	1:200
Alexa-Fluor 555 nm	2	1:400

Immunofluoresenssiin perustuvan kaksoisvärjäyksen optimointi

Immunofluoresenssiin perustuva kaksoisvärjäys optimoitiin polyklonaaliselle kanin CAV16-vasta-aineelle. Optimoitu menetelmä on kerrottu kokonaisuudessaan luvussa 3.5 *Fluoresenssiin perustuva immunohistokemiallinen kaksoisvärjäys*. Optimoinnissa käytettiin immunoperoksidaasivärjäyksellä CAV16-positiivisiksi todettuja ihmisen haimaleikkeitä. Optimoinnissa pyrittiin löytämään optimaalinen vasta-aineen laimennossuhde suhteessa spesifisen värjäytymisen sekä taustavärjäytymisen intensiteetin kanssa. Vasta-aineen laimennoksessa käytettiin laimennossuhteita välillä 1:5 - 1:100. Primäärivasta-aineiden annettiin inkuboitua huoneenlämmössä tunnin ajan kaikilla laimennoksilla; poikkeuksena oli laimennos 1:100, joka inkuboitiin yön yli +4 °C:ssa. Taustavärjäytymistä vähennettiin autofluoresenssin estokäsittelyllä ja epäspesifisten sitoutumiskohtien poistokäsittelyllä. Autofluoresenssi estettiin 0.1 % Sudan Black:llä, joka oli liuotettuna 70 % etanoliin. Laseille pipetoitiin ennen primäärivasta-aineiden lisäystä noin 200 µl Sudan Black:iä ja annettiin inkuboitua kosteassa kammiossa 20 min., jonka jälkeen näytteet pestiin kolme kertaa viiden min. ajan PBS-Tween:illä. Lisäksi leikkeille kokeiltiin myös käsittelyä 0.25 % ammoniakilla autofluoresenssin vähentämiseksi. Laseille pipetoitiin 200 µl 70 % etanoliin laimennettua 0.25 % ammoniakia ja annettiin inkuboitua tunnin ajan kosteassa kammiossa. Epäspesifiset sitoutumiskohdat leikkeeltä estettiin 5 % PBS:ään liuotetulla BSA:lla. Näytteille pipetoitiin blokkauслиuosta 200 µl ja annettiin inkuboitua 20 min. BSA:ta ei pesty pois näytteestä ennen primäärivasta-aineinkubaatiota. CAV16-vasta-aineen laimennokseen käytettiin PBS:ää, 0.1 %:sta BSA-liuosta tai viherapinan munuaisepiteelin verosoluista tehtyä 50 % suspensiota. Verosolususpensio valmistettiin konfluentilta maljalta irrotetuista verosoluista. Solut irrotettiin maljasta kolmella jäädytys-sulatus syklillä. Liukenematon solufraktio erotettiin sentrifugoimalla. Liuoksesta käytettiin erottunut supernatantti, joka laimennettiin PBS:ään. Tämän laimennosliuoksen tarkoituksena oli estää epäspesifisten vasta-aineiden sitoutuminen leikkeeseen. Sekundäärisen vuohen kanivasta-aineen aiheuttama taustavärjäytyminen poissuljettiin kontrollileikettä käyttäen. Kontrollileikkeelle pipetoitiin ainoastaan PBS-liuosta primäärivasta-aineen sijaan.

3.6 *In situ* -hybridisaatio ja sen optimointi

Tässä tutkimuksessa käytetyn ISH-menetelmä perustuu aikaisempiin julkaisuihin (Hohenadl ym., 1991; Breitschopf ym., 1992). Tutkimuksessani käytetyt näytteet olivat formaliinifiksattuja ja parafiiniin valettuja hiiren monikudosleikkeitä ja ihmisen haimaleikkeitä. ISH:n kontrolloinnissa käytettiin formaliinifiksattuja ja parafiiniin valettuja Balb/c-hiirten kudospäytteitä (n = 2). Näytteiden esivalmisteluissa ja käsittelyssä kiinnitettiin huomiota RNAasi-kontaminaatoriskiin, kuten luvussa 3.1 *Kudospäytteet ja näytteiden valmistus* (alkaen s. 37) on kerrottu. Liuoksiin kastojen jälkeen näytelasien pohjat, reunat ja leikettä ympäröivä lasi kuivattiin puhtaalla paperilla pipetointien helpottamiseksi. Koko ISH-menetelmän aikana pyrittiin välttämään kuitenkin näytteen kuivumista.

Koettimien leimaus ja koetinseoksen valmistaminen

Koettimien leimauksessa käytettiin DIG Oligonucleotide Tailing Kit, 2nd Generation (Roche Diagnostics, Saksa) -pakkausta ja koettimien leimaus ja leimauskontrolli tehtiin valmistajan ohjeiden mukaan. Pakkauksen reagenssit sekä leimauksessa käytetyt liuostilavuudet on kerrottu Taulukossa 11.

Ultrasuodatettuun veteen liuotettua koetinta (100 µmol/l) käytettiin leimausreaktiossa 10 pmol. Reagenssit pipetoitiin Taulukon 11 mukaisessa järjestyksessä. Leimausreaktio tehtiin +37 °C:ssa 15 min., minkä jälkeen reaktio pysäytettiin 0,2 M EDTA:lla, pH 8. Tämän jälkeen leimatut koettimet varastoitettiin pakastimeen -20 °C tai niistä valmistettiin hybridisaatioreaktion käyttöliuos Taulukon 12 mukaan.

Taulukko 11. Koettimien leimaukseen tarvittavat reagenssit.

<i>Reagenssi:</i>	<i>Tilavuus: µl</i>
Vesi	8
Koetin (10 µmol/l)	1
Reaktiopuskuri (Kalium kakodylaatti, Tris-HCl, BSA)	4
CoCl ₂ (25 mM)	4
DIG-dUTP (1 mM)	1
dATP (10 mM)	1
Terminaalinen transferaasi (400 U/µl)	1

Taulukko 12. Koetinseoksessa on koettimen ohella hybridisaation olosuhteisiin ja kinetiikkaan vaikuttavia liuoksia.

<i>Reagenssi:</i>	<i>Tilavuus: µl</i>	<i>Valmistaja</i>
Vesi (Ultrasuodatettu)	77	-
SSC 20 X	100	Roche Diagnostics, Saksa
Denhardtin liuos 50 X	10	Applichem, Saksa
Dextraanisulfaatti 50 %	50	Applichem, Saksa
Kalan maidin DNA (10 µg/ml)	10	Roche Diagnostics, Saksa
Leimattu koetin	2,25	TAG Copenhagen A/S, Tanska
Formamidi	250	Sigma-Aldrich®, Saksa

Näytteiden esikäsittely

ISH:n ensimmäisessä vaiheessa poistettiin kudisleikkeistä parafiini, minkä jälkeen näytteisiin saatettiin vesi laskevan etanolisarjan avulla. Parafiini poistettiin ksyleenissä, jossa näytelaseja inkuboitii 5-10 min. riippuen leikkeen koosta. Ksyleeni poistettiin etanolisarjan (99 %, 96 % ja 70 %) ja ultrasuodatetun veden avulla. Leikkeen solut tehtiin koettimia läpäiseviksi proteinaasi K:n (MagNA Pure LC Total. Roche Diagnostics, Saksa) avulla. Proteinaasi K laimennettiin TES-puskuriin (10 mM Tris, 1 Mm EDTA, 0,15 M NaCl) 1:10, (100 µg/ml). Lasit asetettiin kosteaan kammioon ja leikkeille pipetoitiin noin 100 µl proteinaasi K -liuosta siten, että leike peittyi kokonaan. Näytteitä inkuboitii kosteassa kammiossa +37 °C:ssa 15 min. ilman peitinlaseja. Näytteet postfiksattiin 0,4 % formaldehydissä 5 min. +4 °C:ssa, minkä jälkeen näytteitä pestiin vedellä 5 min.

Hybridisaatioreaktio ja pesut

Leikkeille pipetoitiin 20-30 µl koetinseosta leikkeen koosta riippuen. Leikkeiden päälle asetettiin peitinlasit ja näytelasit lämpökäsiteltiin lämpölevyllä (+95 °C, 6 min.), jossa suoritettiin koettimien ja nukleiinihappojen denaturaatio sekä formaliinin muodostamien hydroksimetyleenisiltojen purkaminen. Tämän jälkeen lasit jäähdytettiin nopeasti jäähauteessa noin 1 min. ajan. Laseja inkubointiin 3 h, +42 °C:ssa, kosteassa kammiossa, jossa varsinainen hybridisaatio tapahtui.

Hybridisoitumattomat koettimet pestiin pois 2xSSC-puskurilla (Roche Diagnostics, Saksa) kaksi kertaa 5 min. Seuraavaksi näytteet pestiin + 42 °C:ssa, 10 min., 0,1xSSC-puskurilla, joka pesi vielä epäspesifisesti sitoutuneet koettimet leikkeeltä.

Taulukko 13. Käyttämämme ISH-menetelmän detektio perustuu Roche Diagnostics:in reagenssiin.

<i>Liuos:</i>	<i>Valmistus:</i>	<i>Liuoksen tehtävä:</i>
Blocking solution -liuos	10xBlocking solution -liuosta laimennettiin 1xmaleiinihappo puskuriin 1:10.	Estää anti-DIG-AP -vasta-aineen sitoutumisen epäspesifisesti.
Anti-Digoksigeniini-AP, 150 U	Vasta-aine sentrifugoitiin 5 min. 10000 rpm, ennen laimennusta. Laimennus Blocking solution -käyttöliuokseen 1:500.	Vasta-aine sitoutuu digoksigeniini leimaan mahdollistaen epäsuoran immunoentsyymaattisen detektiomenetelmän.
NBT/BCIP -detektioliuos	NBT/BCIP -detektioliuos laimennettiin detektiopuskuriin 1:50.	NBT/BCIP defosforyloituu alkalisen fosfataasin katalysoimassa reaktiossa muodostaen purppuran tai sinertävän värin.

Koettimien detektio

Ennen koettimien detektiota, näytelasit kastettiin 1xmaleiinihappopuskuriin (Roche Diagnostics, Saksa), jonka jälkeen näytteille pipetoitiin Blocking solution -liuosta. Liuosta pipetoitiin leikkeelle noin 100 µl siten, että leike peittyi kokonaan ja annettiin inkuboitua kosteassa kammiossa, RT, 15 min. Seuraavaksi näytelasit kastettiin maleiinihappopuskuriin, jonka jälkeen laselle pipetoitiin anti-Dig-AP -vasta-aineliuosta, noin 80 µl siten, että leike peittyi kokonaan (Taulukko 13). Näytteitä inkuboitiin kosteassa kammiossa RT:ssä 1 h. Tämän jälkeen näytelaseja pestiin kaksi kertaa 10 min. 1xmaleiinihappopuskurissa ja 5 min. 1xdetektiopuskurissa. Seuraavaksi laselle pipetoitiin NBT/BCIP -detektioliuos. Liuosta pipetoitiin laselle 20-50 µl leikkeen koosta riippuen. Näytteiden ja detektioliuoksen päälle asetettiin peitinlasi. Näytteet inkuboituvat kosteassa kammiossa, pimeässä ja RT:ssä yön yli. Seuraavana päivänä näytelaseilta poistettiin peitinlasit varoen vaurioittamasta näyttettä. Ylimääräinen NBT/BCIP -detektioliuos huuhdeltiin pois vedellä. Tämän jälkeen näytteet värjättiin vastavärillä (Nuclear Fast Red, Sigma Aldrich®, Yhdysvallat) noin 2 min. ajan. Ylimääräinen väri huuhdeltiin vedellä pois. Tämän jälkeen näytteistä poistettiin vesi etanolilla (96 % ja 99 %). Lopuksi näytteet kastettiin ksyleeniin 45-60 s. Näytteiden ksyleenissä kirkastamisen jälkeen ne pedattiin nopeasti kuivumisen välttämiseksi. Petausaineena käytettiin ksyleenipitoista Mount-Quick (Daido Sangyo CO., Japani) petausainetta.

In situ -hybridisaation optimointi

ISH-menetelmän optimoinnissa haettiin oikeat olosuhteet uusille suunnittelemillemme koettimille. Positiivisena kontrollina käytettiin formaliinifiksattuja ja parafiiniin valettuja hiiren monikudosleikkeitä. Hiirinäytteet olivat CBV3-infektoituja Balb/c-hiiren kudoksia. Negatiivisena kontrollina käytettiin kudosleikkeitä infektoimattomasta hiirestä. ISH-menetelmä optimoitiin hiirinäytteillä, koska ihmisen enteroviruspositiivista haimakudosta ei ollut saatavilla.

Optimoitu menetelmä on kerrottu luvussa 3.6 *In situ -hybridisaatio ja sen optimointi* (alkaen s. 45). Olosuhteista optimoimme koettimien ja näyteleikkeiden nukleiinihappojen denaturaatiolämpötilaa sekä hybridisaation jälkeisen pesun lämpötilaa. Denaturaatiolämpötilan optimointi suoritettiin, koska epäiltiin, ettei näytelasien lämpötila nouse riittävästi purkamaan formaliinifiksauksessa syntyneitä hydroksimetyyleenisiltoja sekä erottamaan sekundäärisiä nukleiinihapporakenteita ja kaksoisjuosteita toisistaan. Denaturaatiota kokeiltiin 95 °C ja 110 °C lämpötiloilla. Hybridisaation jälkeisten pesujen optimoinnissa kokeiltiin lämpötiloja välillä +23 - +42 °C.

Näiden jälkeen koettimille optimoitiin oikeat käyttöpitoisuudet. Käyttöpitoisuuksien optimoinnilla haluttiin lisätä koettimien detektiotehoa ja vähentää samalla epäspesifistä sitoutumista sekä taustavärjäytymistä. Koska positiivisena kontrollina käytetyt kudosleikkeet ovat peräisin CBV3-infektoidusta hiirestä, optimoinnissa käytettiin enterovirus B -lajispesifisiä koettimia, jotka on suunniteltu tunnistamaan ainoastaan enterovirus B -lajiryhmän serotyyppejä. Lisäksi käytettiin koetinta, joka suunniteltiin sitoutuvan kaikkien enteroviruslajien negatiiviseen RNA-juosteeseen. Koettimen kokonaismäärä puolikertaisessa koetinseoksessa oli 125 ng, jolloin koetinseoksen koetinpitoisuudeksi saatiin 250 ng/ml. Yksinkertaisessa seoksessa koetinmäärä oli 250 ng (500 ng/ml), kaksinkertaisessa seoksessa 500 ng (1000 ng/ml) ja viisinkertaisessa seoksessa 1250 ng (2500 ng/ml). Taulukossa 12, on kerrottu koetinseoksessa tarvittavien reagenssien pipetointilavuudet ja yksinkertaiseen koetinpitoisuuteen tarvittava koetintilavuus.

Yhdistämällä enterovirusgenomin eri kohtiin sitoutuvat 2Cb- ja 3Db -koettimet haluttiin saada tietoa, että vahvistuuko hybridisaatiosignaali vai häiritsevätkö koettimet toistensa hybridisoitumista. Näiden koettimen määrät olivat 125 ng + 125 ng, 250 ng + 250 ng ja 500 ng + 500 ng. Lisäksi selvitettiin, häiritsevätkö eri enteroviruslajeja tunnistavien koettimien yhdistäminen 2Cb-koettimen detektiotehoa. Lajispesifiset koettimet pipetoitiin leikkeille Taulukon 14 mukaisesti.

Taulukko 14. Koetinseoksien valmistaminen. Koetinseos 1 on kontrolli, eikä siihen lisätty muita enteroviruslajeja tunnistavia koettimia. Koetinseos 4 puolestaan sisältää kaikki koetintyyppit.

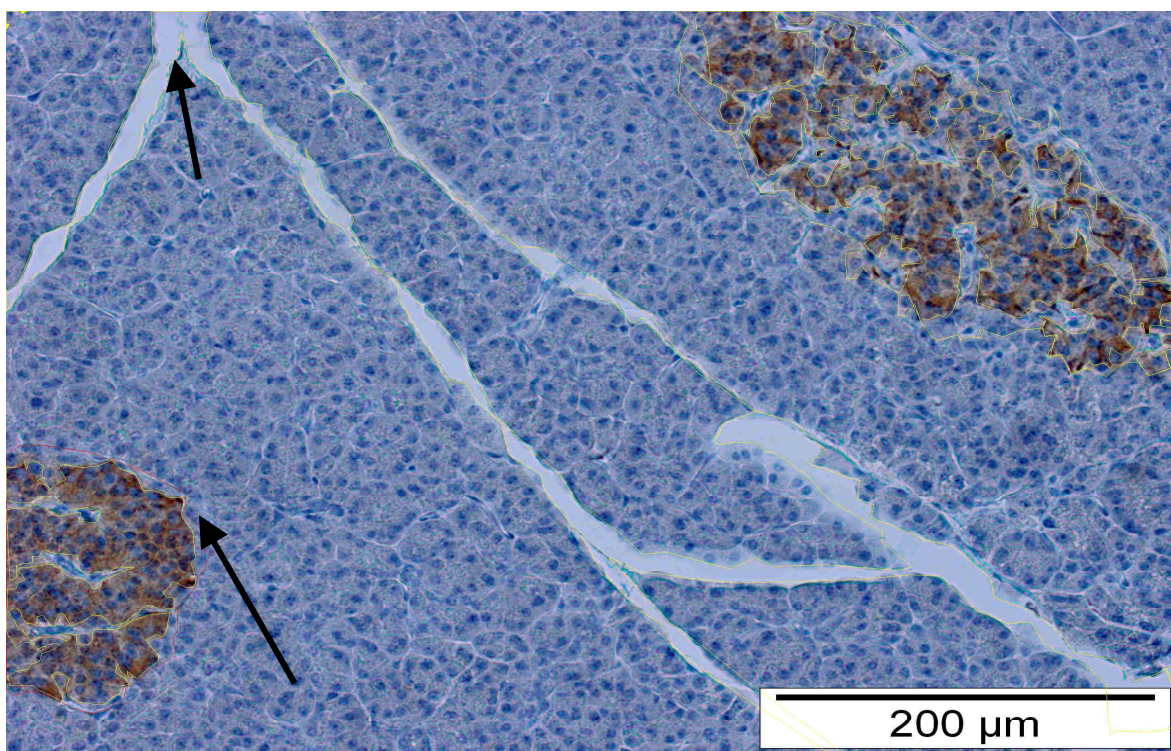
<i>Koettimet</i>	<i>2Cb</i>	<i>2Ca</i>	<i>2Cc</i>	<i>2Cd</i>
<i>Koetinseokset</i>				
Koetinseos 1	20 µl	-	-	-
Koetinseos 2	10 µl	10 µl	-	-
Koetinseos 3	7 µl	7 µl	7 µl	-
Koetinseos 4	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Koettimien detektiotehon ohella haluttiin tietoa myös koettimien lajispesifisyydestä. Koska käytössämme oli ainoastaan CBV3-positiivista näytekudosta, koettimien lajispesifisyyttä voitiin arvioida enterovirus B -lajeja tunnistavien 2Cb- ja 3Db -koettimien osalta. Koettimien lajispesifisyyden varmistamiseksi CBV3-positiivisen hiiren kudokset leikettiin ISH-kokeita, joissa käytettiin koettimina enterovirus a, c ja d -lajit tunnistavia 2C- ja 3D -alueille suunniteltuja koettimia. Positiivisena kontrollina käytettiin 2Cb- ja 3Db -koetinta. Lajispesifisyyden määrittämisessä käytetyt koetinseokset sisälsivät koetinta 250 ng.

3.7 Näytteiden analysointi

Näytteet, jotka värjättiin immunoperoksidaasi- ja ISH -menetelmillä, analysoitiin Leica DM 2000 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Saksa) valomikroskoopilla. Valomikroskooppiin oli kytkettynä Olympuksen digitaalinen DP 25 (Olympus America Inc., Yhdysvallat) kamera ja sitä ohjattiin Olympuksen Cell[^]D (Olympus America Inc., Yhdysvallat) -tietokoneohjelman välityksellä. Näytteiden analysoinnissa käytettiin Leican Hi Plan objektiivisarjaa 4x, 10x/0.25 SL, 20x/0.45, 40x/0.65 ja 63x/0.75 pol. Neljä kertaa ja 20 kertaa suurentavia objektiiveja sekä edellä mainittua mikroskooppia käytettiin myös β-solujen pinta-alan ja niiden osuuden määrittämisessä haimakudosleikkeiltä. Immunoperoksidaasivärjätystä 1-10 -haimaleikkeistä otettiin kymmenen kuvaa kustakin leikkeestä käyt-

täen 20-kertaista objektiivia. Nelikertaista objektiivia käytettäessä kuvia otettiin viisi haimaleikettä kohden. Kuvat otettiin satunnaisista kohdista, jotta saataisiin luotettavampi kuva β -solujen osuudesta leikkeellä. Jokainen kuva käsiteltiin Cell[^]D-ohjelman piirtotyökalulla, jolla rajattiin eksokriininen kudos endokriinisestä kudoksesta (Kuva 5). Endokriinisestä kudoksesta rajattiin lisäksi β -solujen osuus. Tietokoneohjelma laski rajattujen alueiden pinta-alat (μm^2). Pinta-alojen määrittämisen ensimmäisessä vaiheessa määritettiin koko kuvan pinta-ala. Tämän jälkeen rajattiin kuvasta pois eksokriiniseen kudokseen kuulumattomat alueet, kuten haimatiehyiden epiteelisolut ja tukikudoksen solut kuten adiposyytit. Aukot ja alueet, joissa ei ollut leikettä, rajattiin pois. Seuraavaksi määritettiin endokriinisen kudoksen pinta-ala ja endokriinisestä kudoksesta β -solujen pinta-ala. Poisrajattujen alueiden pinta-ala ja endokriinisen kudoksen pinta-ala laskettiin yhteen ja summa vähennettiin koko kuvan pinta-alasta. Vähentämisen erotuksena saatiin eksokriinisen kudoksen pinta-ala. β -solujen suhteellisen osuuden määrittämiseksi β -solujen pinta-ala jaettiin eksokriinisen kudoksen pinta-alalla ja kerrottiin sadalla.



Kuva 5. Immunoperoksidaasivärjätty haima 3 -leike, josta määritettiin β -solujen ja eksokriinisen kudoksen pinta-ala. Nuolet osoittavat piirtotyökalun jättämiä merkintöjä, joiden avulla Cell[^]D-ohjelma laski rajauksen sisään jääneen pinta-alan (μm^2). Värjäyksen primäärinenä vasta-aineena käytettiin marsussa tuotettua insuliinivasta-ainetta.

Kaksoisvärjättyjen haimaleikkeiden immunofluoresenssia tarkasteltiin Olympuksen IX 70 (Olympus America Inc., Yhdysvallat) konfokaalimikroskoopilla. Mikroskooppia ohjattiin Andor IQ 1.4 (Andor Technology plc., Yhdysvallat) ohjelmalla. Objektiiveina käytettiin Olympuksen 100x/1.25 -öljymersio-objektiivia sekä Olympuksen LCAch 20x/0.40 php -objektiivia. Kamerana käytettiin Hamamatsun ORCA -sarjan digitaalikameraa (Hamamatsu Corporation, Japani).

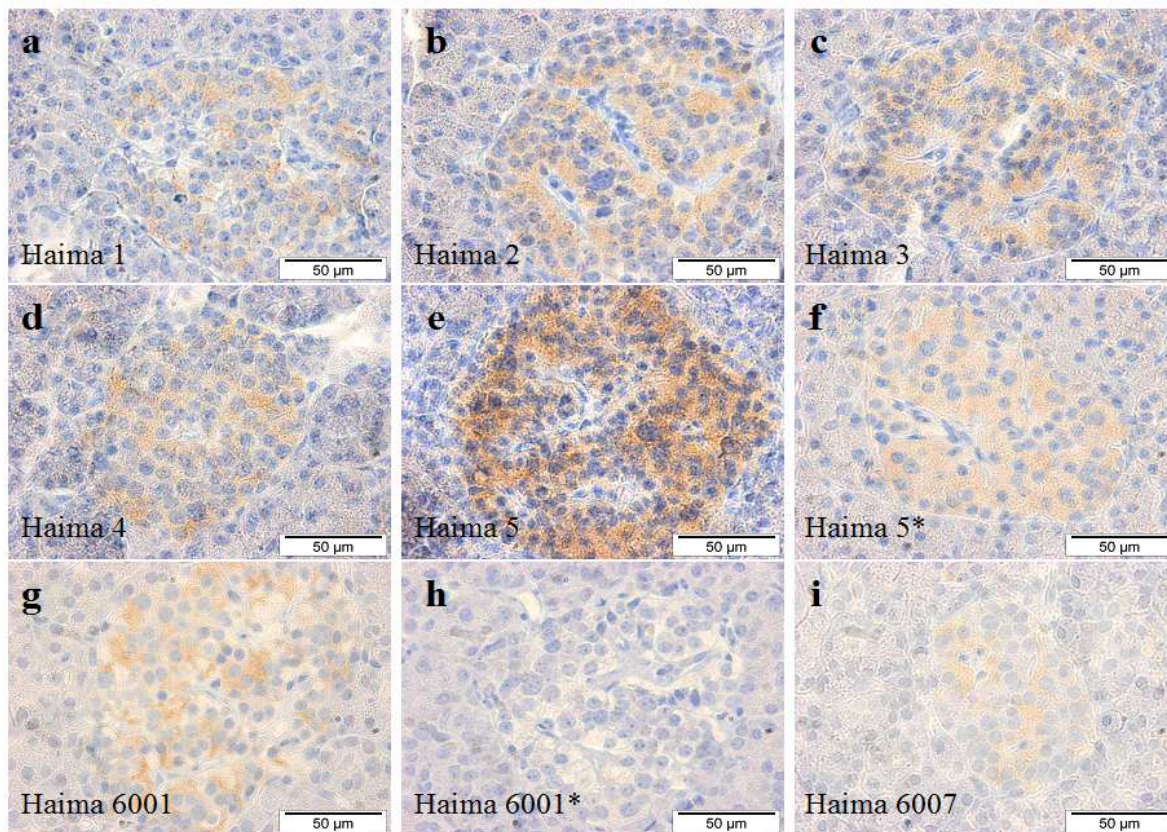
Molempien kanavien intensiteetti sekä valotusaika tasapainotettiin ja suhteutettiin fluoresenssin intensiteettiin. EM gain -arvo (Engl. Electron-multiplying gain) asetettiin molemmilla kanavilla arvojen 180 – 190 väliin ja valotusaika vaihteli objektiivista ja suurennuksesta riippuen 600 ja 1500 millisekunnin välillä. Kanavien vuotamisesta johtuva väärä kolokalisaatio estettiin jakamalla kanavat ja skannaamalla eri eksitaatioaallonpituuksilta syntyvät fluoresenssit erikseen. Kuva muodostettiin kalmantekniikalla neljän kuvaraamin keskiarvosta. Valotusajan ja kuvanmuodostumisen jälkeen voitiin molemmilta kanavilta muodostuneet kuvat sulauttaa tarvittaessa yhdeksi kuvaksi, josta voitiin tarkastella kolokalisaatiota. Kuvista säädettiin kontrastia jyrkemmäksi ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, Yhdysvallat) kuvankäsittelyohjelmalla.

4 TULOKSET

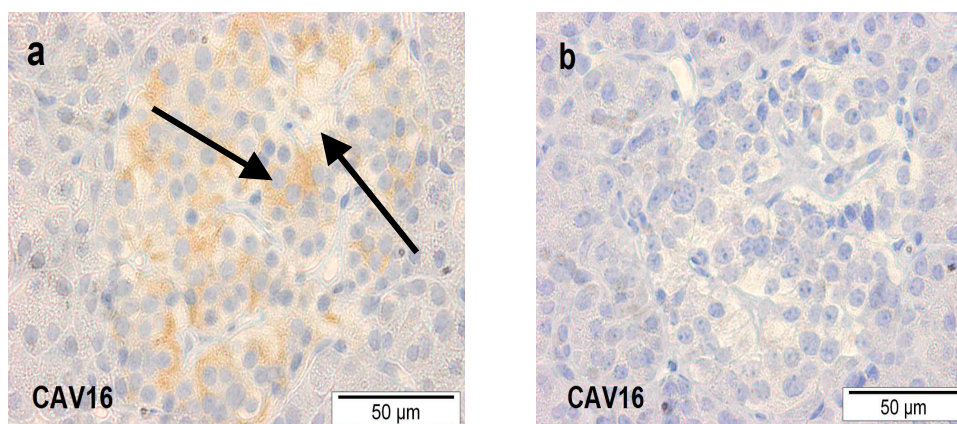
Pro gradu -tutkielmani tulokset on jaettu kolmeen eri osa-alueeseen. Ensimmäisessä osassa on immunoperoksidaasivärjäyksen tuloksia ja toisessa osassa tuloksia ISH:n ja immunofluoresenssiin perustuvan kaksoisvärjäyksen optimoinnista sekä CAV16-saarekesoluspesifisyyden määrittämisestä. Kolmannessa osassa on tuloksia β -solujen suhteellisista osuuksista haima 1-10 -kudosleikkeistä. Lisäksi kolmannessa osassa on tuloksia 5-D8/1 vasta-aiheen epitoopin BLAST-hausta.

4.1 Immunoperoksidaasivärjäys

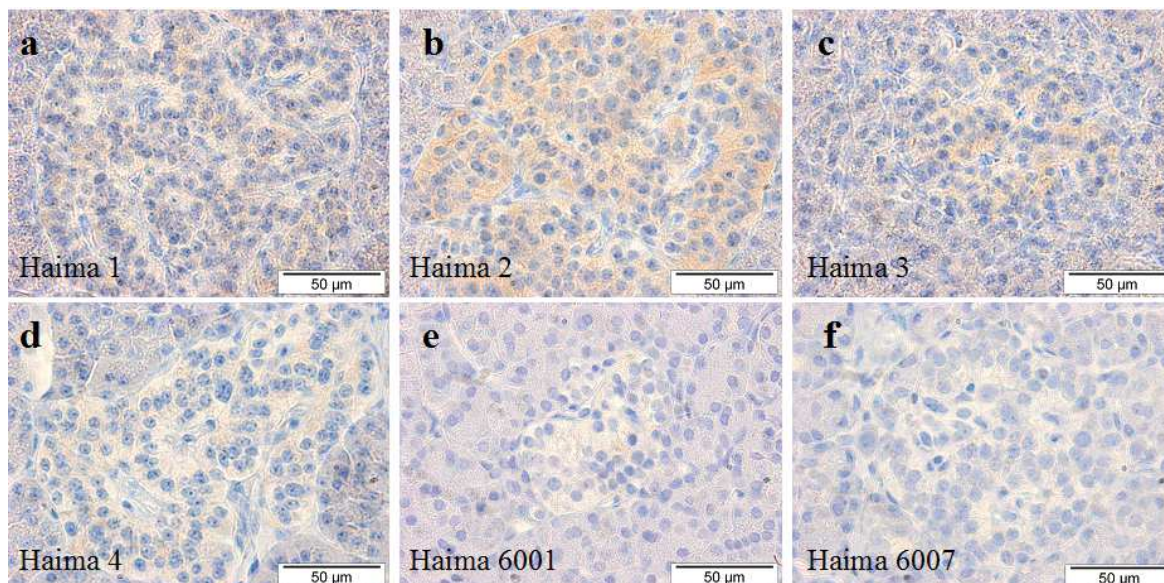
Kaikissa haima 1-10 -leikkeissä havaittiin haiman endokriinisessä osassa värjäytymistä CAV16-vasta-aineella (Kuva 6). Värjäytyminen lokalisoitui pääasiassa haiman saarekkeisiin. Taustavärjäytymistä havaittiin haimakudoksen eksokriinisessä osassa. Kaikki saarekkeet värjäytyivät haima 1-10 -leikkeistä eikä värjäytymättömiä saarekkeita havaittu. Osa leikkeiden saarekkeista värjäytyi kokonaan ja osassa kromogeeni lokalisoitui tiettyihin saarekesoluihin. Värjäyksen intensiteetti vaihteli eri haimaleikkeiden välillä merkittävästi. Vaihtelua intensiteetissä havaittiin myös saman haimaleikkeen eri saarekkeiden välillä. CAV16-vasta-ainetta käytettäessä haima 6001 ja 6007 -leikkeiden saarekkeet värjäytyivät hyvällä intensiteetillä ja taustavärjäytyminen oli vähäistä. Haima 6001 -leikkeen saarekkeet värjäytyivät voimakkaammin kuin haima 6007 -leikkeen saarekkeet (vrt. Kuva 6g ja 6i). Saarekkeiden värjäytyminen oli soluspesifistä, mikä näkyy hyvin Kuvasta 7a. Haima 6001 -leikkeen saarekkeista noin 70 % värjäytyi selkeästi ja loput olivat täysin värjäytymättömiä. Kokonaan värjäytyneitä saarekkeita ei leikkeiltä havaittu.



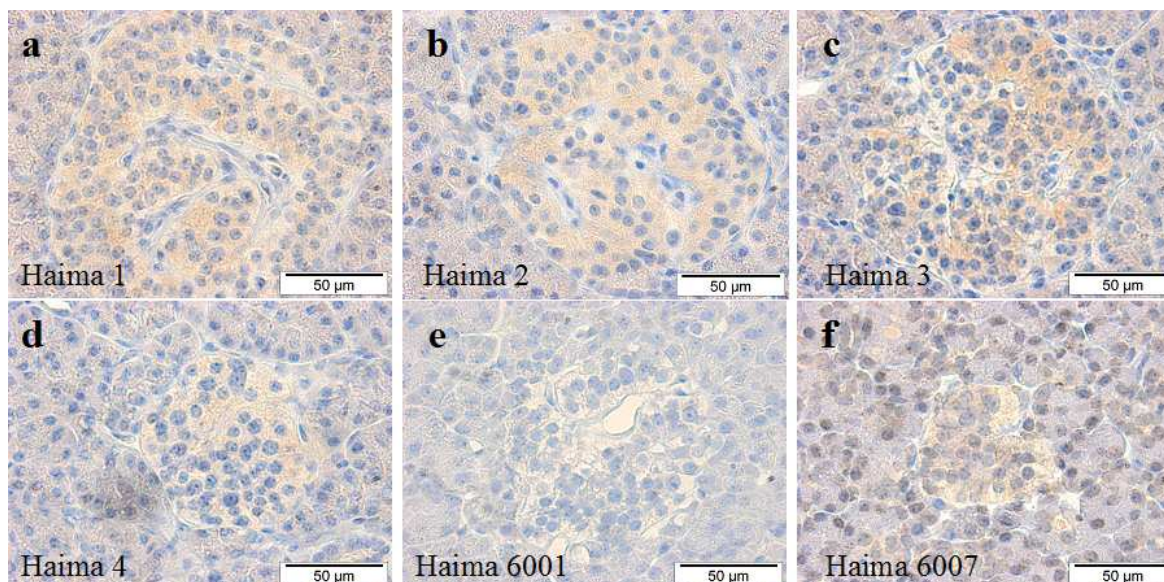
Kuva 6. Haimaleikkeiden CAV16-immunoperoksidaasivärjäys. Värjäytyminen näkyy kuvissa ruskeana värinä, joka on rajoittunut haiman endokriiniseen osaan. Saarekkeet ovat värjäytyneet lähes kokonaan ja värjäytymättömät solut sijaitsevat saarekkeen sisäosissa. Värjäyksen intensiteetti vaihteli eri haimanäytteiden välillä. Haima 6001 -leikkeen saarekkeet värjäytyivät ilman taustavärjäytymistä (g) ja värjäytyminen täytti kappaleessa 3.4 *Immunohistokemiallinen peroksidaasivärjäys* mainitut kolme enteroviruspositiiviseen värjäytymiseen vaadittavaa ehtoa. Haima 6001 -leikkeellä havaittiin myös värjäytymättömiä saarekkeita (h). Taustavärjäytymistä havaittiin haimaleikkeissä a-f ja se näkyy haaleana oranssin ruskeana värinä haiman eksokriinisessä osassa. Suurinta taustavärjäytymistä havaittiin haima 5:n (e) leikkeessä. Vähiten taustaa oli haima 6001 ja 6007- (g, h ja i) sekä haima 5* -leikkeessä (f), joka värjättiin 1:200 CAV16-vasta-ainepitoisuudella. Muut leikkeet värjättiin käyttäen CAV16-vasta-ainelaimennosta 1:100. Kuvien suurennus on 630-kertainen. Mittajana on 50 µm.



Kuva 7. Saarekkeet samalta 6001 -haimaleikkeeltä. Saarekkeessa a kromogeeni on lokalisoitunut selkeästi vain osaan saarekkeen soluista (vrt. nuolet). Saarekkeessa b kromogeeniä ei ole lainkaan. Mittajana on 50 µm ja suurennos 630-kertainen.



Kuva 8. Haimaleikkeiden CBV3-immunoperoksidaasivärjäys. Saarekevärjäytyminen on erittäin heikkoa eikä se eroa merkittävästi taustavärjäytymisestä. Taustavärjäytyminen on voimakasta kaikissa haima 1-10 -saarekkeissa (a-d). Värjäytymisen voimakkuuden vaihtelu saarekkeissa eri haimanäytteiden välillä on vähäistä. Haima 2 -saarekkeiden värjäytyminen on voimakkainta (b), mutta taustaa on kuitenkin runsaasti. Värjäytymättömiä saarekkeita havaittiin leikealueilla, joissa taustavärjäytyminen oli heikkoa. Värjäytymättömät saarekkeet havaittiin eksokriinisestä kudoksesta erottuvina tarkkarajaisina vaaleina alueina. Taustavärjäytymistä havaittiin etenkin haimaleikkeistä, joilta saarekkeet olivat värjäytyneet vahvimmin. Haima 6001 ja 6007 -leikkeillä (e ja f) ei havaittu taustavärjäytymistä eikä saarekevärjäytymistä. Värjäyksen primäärinenä vasta-aineena käytettiin itsetuotettua polyklonaalista CBV3-vasta-ainetta. Kuvien suurennus on 630-kertainen. Mittajanan pituus on 50 µm.



Kuva 9. Haimaleikkeiden Echo-11-immunoperoksidaasivärjäys. Saarekevärjäytyminen on intensiteetiltään heikkoa ja runsasta taustavärjäytymistä havaittiin jokaisessa haima 1-10 ja haima 6007 -leikkeessä (f). Haima 6001 -leikkeet eivät värjäytyneet lainkaan (e). Värjäytymättömiä saarekkeita ei haima 1-10 -leikkeissä havaittu. Saarekkeet ovat värjäytyneet kokonaan, eikä saaarekesoluvalikoivaa värjäytymistä detektoitu. Poikkeuksen muodostaa kuitenkin haima 3, jossa oli useita saarekkeita, jotka eivät olleet värjäytyneet kokonaan. Taustavärjäytyminen oli tälläkin leikkeellä kuitenkin merkittävää (c). Värjäyksen primäärinenä vasta-aineena käytettiin itsetuotettua polyklonaalista Echo11-vasta-ainetta. Kuvien suurennus on 630-kertainen. Mittajanan pituus on 50 µm.

CBV3- ja Echo11 -vasta-aineita käytettäessä värjäystulokset olivat samansuuntaisia kuin CAV16-vasta-ainetta käytettäessä, mutta saarekkeiden värjäytyminen oli heikompaa. Mielenkiintoinen tulos on, että CBV3- ja Echo11 -vasta-aineilla suurin osa haimojen saarekkeista värjäytyi kokonaan ja saarekesoluspesifinen värjäytyminen oli vähäistä (Kuva 8a-d ja Kuva 9a-d). CBV3- ja Echo11 -vasta-aineilla saarekkeiden värjäytymisen suhde taustavärjäytymiseen oli heikompaa kuin CAV16-vasta-aineella. Taustavärjäytyminen oli runsasta etenkin Echo11-vasta-aineella värjäytyissä leikkeissä (Kuva 9a-d ja f). Haima 6001 leikkeen saarekkeet eivät värjäytyneet kummallakaan vasta-aineella. Haima 6001 ja 6007 -leikkeet osoittautuivat CBV3-värjäyksen mukaan CBV3-negatiivisiksi (Kuva 8e ja f). Värjäytymistä ei havaittu saarekkeista eikä haiman eksokriinisistä osista. Myöskään taustavärjäytymistä ei havaittu. Echo11-vasta-aineella tehty värjäys antoi mielenkiintoisen tuloksen, sillä haima 6001 -leike oli täysin värjäytymätön, kun taas haima 6007 -leikkeessä oli erittäin runsasta taustavärjäytymistä (Kuva 9f).

4.2 Immunofluoresenssiin perustuvan kaksoisvärjäyksen optimointi

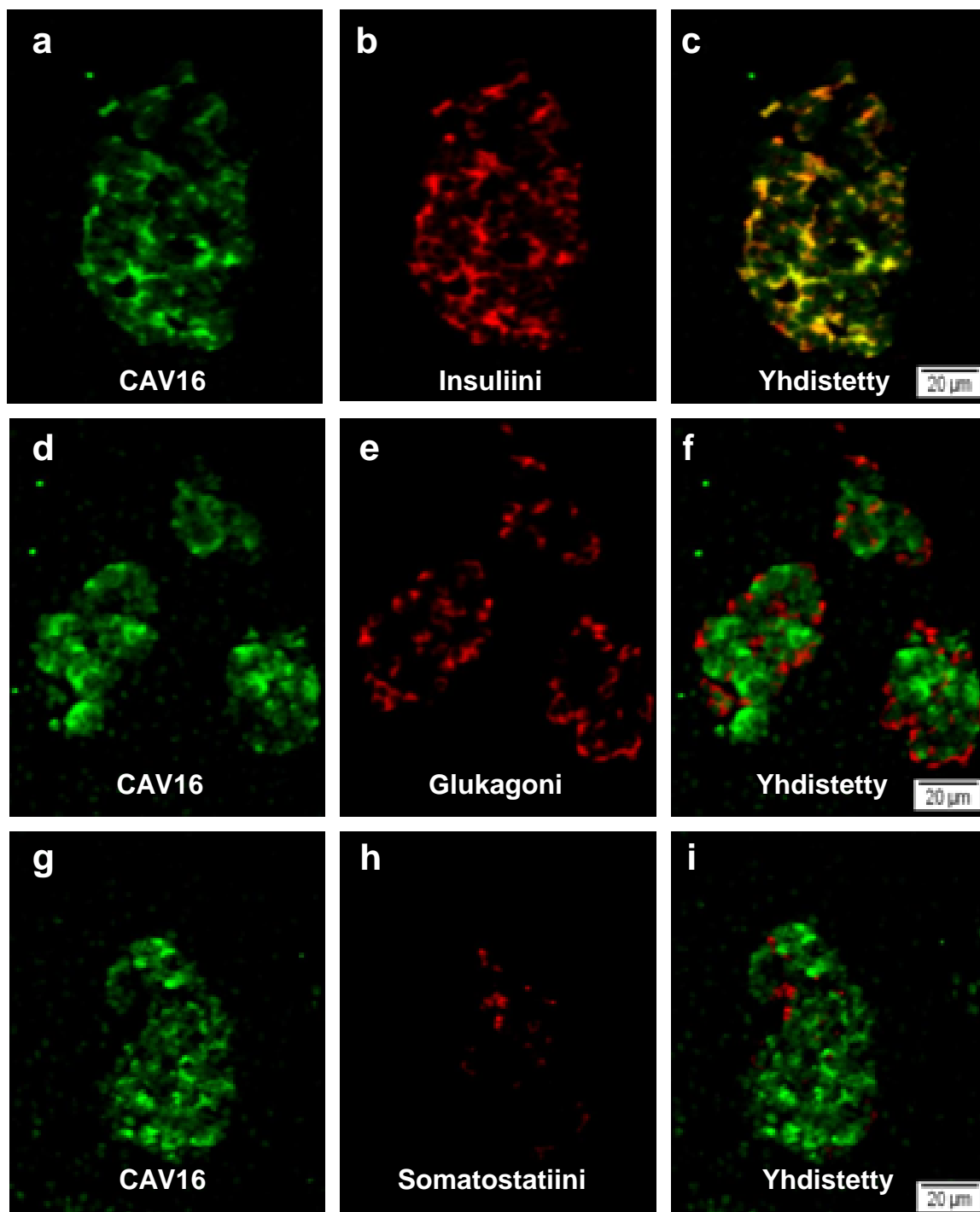
Immunofluoresenssiin perustuvan kaksoisvärjäyksen optimoinnissa kokeiltiin CAV16-vasta-aineen eri pitoisuuksia. Optimoitu menetelmä on kerrottu kokonaisuudessaan luvussa 3.5 *Fluoresenssiin perustuva immunohistokemiallinen kaksoisvärjäys* (alkaen s. 42). Näytteinä käytettiin immunoperoksidaasivärjäyksellä enteroviruspositiiviseksi todettuja haima 6001 ja 6007- sekä haima 5 ja 3 -leikkeitä. Vasta-aine laimennoksina käytettiin pitoisuuksia väliltä 1:5 - 1:100. Enterovirusta detektoitiin 1:5, 1:10 ja 1:20 vasta-ainelaimennoksilla. Laimeammilla vasta-ainepitoisuuksilla enterovirusta ei kyetty detektoimaan. Voimakkain fluoresenssi saavutettiin laimennoksella 1:5.

Polyklonaalinen CAV16-vasta-aine aiheutti melko runsasta taustavärjäytymistä, mitä havaittiin varsinkin tumissa (Kuva 11d, s. 58). Kaupallisia insuliini-, glukagoni-, ja somatostatiniivasta-aineita käytettäessä ei havaittu merkittävää taustavärjäytymistä. Signaalin suhdetta taustaan (Engl. signal to noise ratio) pyrittiin nostamaan vähentämällä taustaa. Leikkeelle pipetoitavat 5 % BSA- ja 0.1 % Sudan Black -liuos heikensivät merkittävästi molempien signaalien muodostumista ilman tumavärjäytymisen vähenemistä. Vasta-aineen laimennosliuoksena käytetyt 0.1 % BSA sekä verosoluista tehty 50 % suspensio eivät vä-

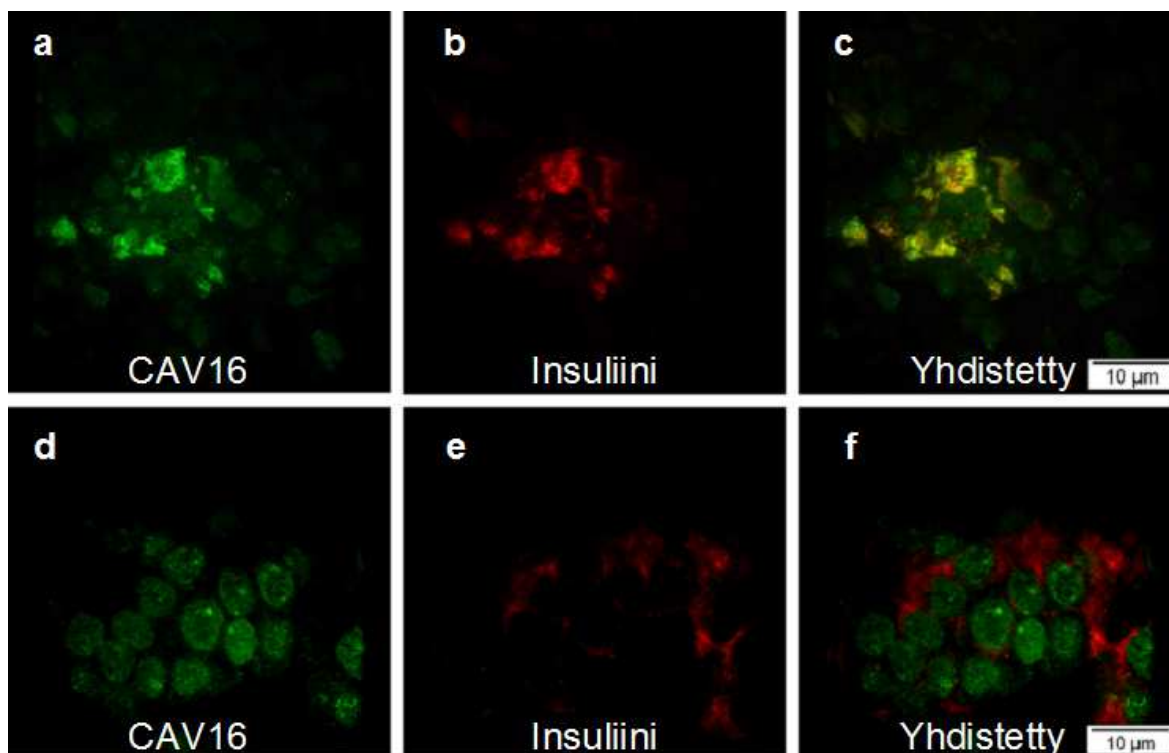
hentäneet tumavärjäytymistä, mutta eivät myöskään haluttuja signaaleja. Autofluoresenssia ei havaittu vasta-ainelaimennoksilla 1:5 ja 1:10 ja se oli haima 6001 ja 6007 -leikkeillä hieman vähäisempää kuin haima 3 ja 5 -leikkeillä. ProLong Gold antifade agent -petausaineella (Invitrogen Ltd., Iso-Britannia) pedatut leikkeet säilyivät +4 °C:ssa ja pimeässä fluoresenssin haalistumatta todella hyvin. Leikkeet kestivät fluoresenssin haalistumatta yli viiden kuukauden varastoinnin sekä useat mikroskopointikerrat.

4.3 Cocksackievirus A16:n saarekesoluspesifisyyden määrittäminen

CAV16-saarekesoluspesifisyyttä määritettiin immunofluoresenssiin perustuvalla kaksoisvärjäyksellä 6001 ja 6007 -haimaleikkeistä sekä haima 3 ja 5 -haimaleikkeistä. Tutkituista näytteistä kyettiin osoittamaan enterovirusinfektio haima 6001 ja haima 5 -haimaleikkeistä (Kuva 10 ja Kuva 11). CAV16-vasta-aineet sekä insuliinivasta-aineet lokalisoituvat samoihin saarekesoluihin haima 6001 -leikkeessä (Kuva 10). Vasta-aineiden kolokalisaatio näkyy keltaisena fluoresenssina sytoplasmassa (Kuva 10c ja Kuva 11c ja i). CAV16 -vasta-aine ei kolokalisoisi glukagoni- tai somatostatiinivasta-aineiden kanssa (Kuva 10f ja i). Kuten immunoperoksidaasivärjäyksessä, haima 6001 -leikkeeltä löytyi sekä CAV16-värjäytyneitä että värjäntymättömiä saarekkeita (Kuva 11a-f). CAV16-värjäystuloksen havaittiin korreloivan immunoperoksidaasivärjäystuloksen kanssa. Kokonaan fluoresoivia saarekkeita ei leikkeeltä todettu.



Kuva 10. CAV16-SAAREKEsoluspesifisyyden määrittäminen haima 6001 -leikkeistä. CAV16-värjäytyminen näkyy konfokaalikuvista vihreänä fluoresenssinä. Punaisena fluoresenssinä näkyvät saarekesolujen tuottamat soluspesifiset peptidihormonit. Polyklonaalinen kanin CAV16-vasta-aine mahdollistaa vahvan fluoresoivan signaalin muodostumisen insuliinia tuottavista β -soluista (a,b ja c). Kaksoisvärjäyksen mukaan CAV16-proteiinit ja insuliini kolokalisoituvat lähes täysin, mikä näkyy keltaisena värinä kuvassa c. Kolokalisaatiota glukagonin tai somatostatiinin kanssa ei havaittu (f ja i). Suurenus on 200-kertainen ja mittajana on pituudeltaan 20 μm .



Kuva 11. CAV16-infektoitunut ja infektoitumaton haima 6001 -saareke. Infektoituneessa haima 6001 -saarekkeessa CAV16-vasta-aine kolokalisoi insuliinin kanssa voimakkaasti. Voimakkaasta kolokalisaatiosta huolimatta sytoplasmassa havaittiin pieniä lokalisaatioeroja (c). Infektoitumattomassa haima 6001 -saarekkeessa CAV16-vasta-aine sitoutuu ainoastaan tumiin, eikä spesifistä värjäytymistä tapahdu (d,e,f). Suurenus on 1000 kertainen ja mittajana on pituudeltaan 10 µm.

4.4 ISH:n ja koetinpitoisuuksien optimointi hiiren kudoksilla

Optimointi tehtiin Enterovirus B -lajien genomien 2C- ja 3D -alueelle ja enterovirusten negatiivisuuteen RNA:han sitoutuvilla koettimilla. Ensimmäisissä ISH kokeiluissa havaittiin, että infektoituneet hiiren kudokset ovat erittäin herkkiä leikkeiden käsittelystä johtuville vaurioille. Peitinlasien jättäminen pois kolmesta inkubaatiovaiheesta vähensi käsittelystä johtuvia irtoamisia ja leikevaurioita. Peitinlasin ja kudosten välillä jäävää liuostilavuutta kasvatettiin kaksinkertaiseksi, mikä vähensi peitinlasia poistettaessa mukana irtoavan kudoksen määrää. Enterovirusnegatiivisen hiiren kudosten leikkeet eivät olleet herkkiä käsittelystä aiheutuville vaurioille.

ISH:n olosuhteiden optimoinnissa kokeiltiin denaturaation sekä hybridisaation jälkeisen pesun lämpötilamuutoksia. Denaturaatiolämpötilan muutos kuumemmaksi heikensi hybridisaatiosignaalin voimakkuutta merkittävästi. Lämpötilan ollessa +95 °C, saatiin vahvin

hybridisaatiosignaali. Hybridisaation jälkeisen pesun lämpötilan laskulla ei ollut suurta vaikutusta hybridisaatiosignaaliin tai taustavärjäytymisen muodostumiseen, kun käytettiin 2Cb-koetinta. Pesut RT:ssä, +30 °C:ssa ja +36 °C:ssa eivät lisänneet taustavärjäytymistä. Hybridisaatiosignaali oli aavistuksen vahvempi alhaisemmilla pesulämpötiloilla. Huomionarvoista kuitenkin on, että käytettäessä +36 °C:n ja +42 °C:n pesulämpötiloja hybridisaatiosignaali selkenee ja värjäytyneet solut erottuvat toisistaan paremmin.

4.5 Enteroviruskoettimien optimointi: signaalin vahvuuden ja lajispesifisyyden määrittäminen

Koettimet tunnistivat positiivisesta hiirileikkeestä CBV3-infektion ainoastaan haimakudoksen ekrokriinisestä osasta, mikä oli odotettu tulos. Pernakudos ja sydänlihaskudos olivat aina enterovirusnegatiivisia. Ohutsuolen kudokset värjäytyivät aina epäspesifisesti sekä positiivisilla että negatiivisilla kontrolleilla (Kuva 12).

Enterovirus B -lajeja tunnistavat enteroviruskoettimet toimivat hyvin ja ne antoivat vahvan hybridisaatiosignaalin (Taulukko 16). Enterovirus B -lajien genomien 2C-alueelle sitoutuva 2Cb-koetin tunnistaa tämän enteroviraalisen genomialueen muita koettimia herkemmin. Vahvin hybridisaatiosignaali saavutettiin käyttäen enterovirusgenomin 2C- ja 3D -alueille sitoutuvia koettimia hybridisaatioreaktiossa samanaikaisesti. Enterovirusgenomin negatiivisen juosteen 3'-pään konservatiiviselle osalle sitoutuva koetin tunnistaa CBV3-positiivisista hiirileikkeistä negatiivisjuosteista enteroviraalista RNA:ta (Kuva 13a). Koetinseoksen koetinkonsentraation muutoksilla osoitettiin olevan suuri vaikutus hybridisaatiosignaalin voimakkuuteen sekä taustavärjäytymiseen.

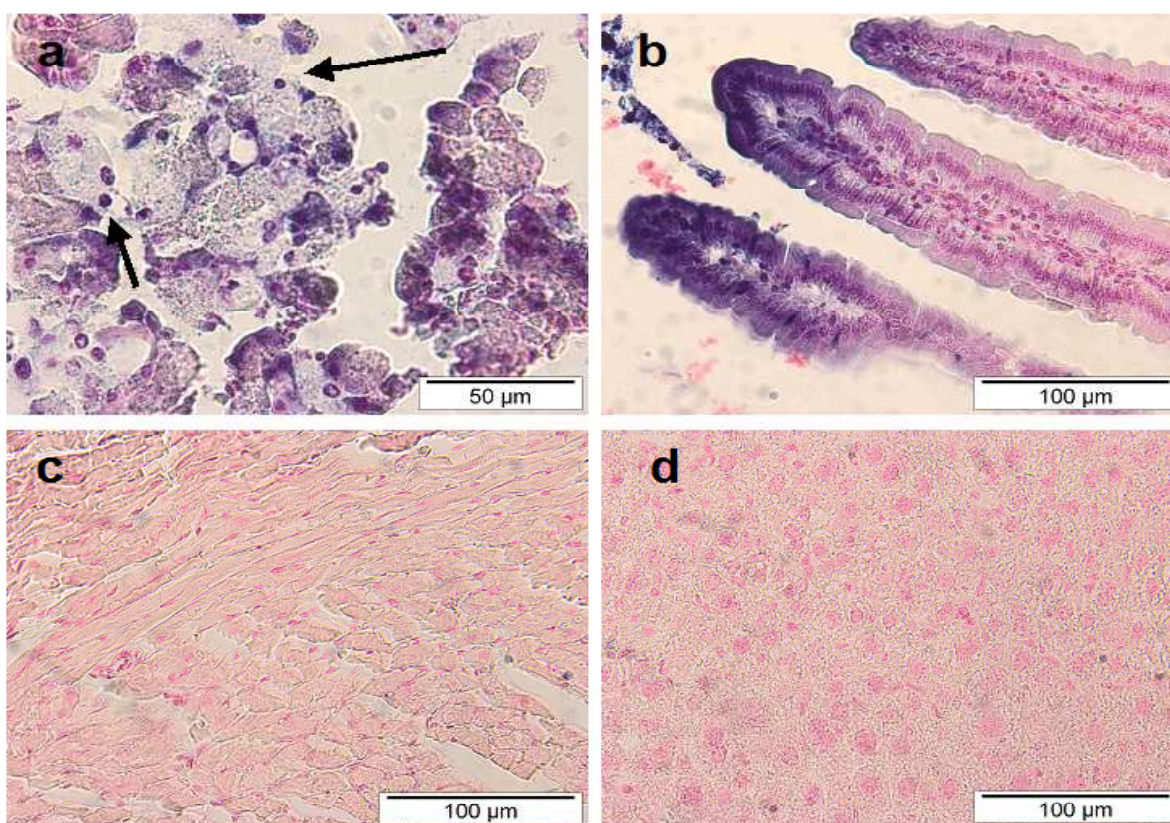
Taulukko 15. Koettimien yhdistämisen vaikutusten tutkiminen. Lajispesifisten 2Ca-, 2Cc- ja 2Cd -koettimien lisääminen samaan hybridisaatioreaktioon ei häirinnyt merkittävästi 2Cb-koettimen detektiotehoa. Koetinseos 4:n detektioteho on muita koetinseoksia heikompi hybridisaatioreaktiossa käytetyn pienen 2Cb-koetinmäärän vuoksi.

<i>Koettimet</i>	<i>2Cb</i>	<i>2Ca</i>	<i>2Cc</i>	<i>2Cd</i>	<i>Hybridisaatiosignaalin voimakkuus</i>
Koetinseos 1	20 µl	-	-	-	++
Koetinseos 2	10 µl	10 µl	-	-	++
Koetinseos 3	7 µl	7 µl	7 µl	-	++
Koetinseos 4	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	+

Taulukko 16. Enteroviruskoettimien pitoisuuksien optimointi. Vahvin signaali saatiin käytettäessä koetinseoksen valmistamisessa 500 ng:n koetinmäärää. Yksin käytettynä 2Cb- ja 3Db -koettimilla paras värjäystulos saavutettiin käyttämällä koetinseoksessa 250 ng koetinta. 2Cb- ja 3Db -koettimien yhdistäminen samalle leikkeelle antoi vahvan hybridisaati signaalin ilman taustavärjäytymistä.

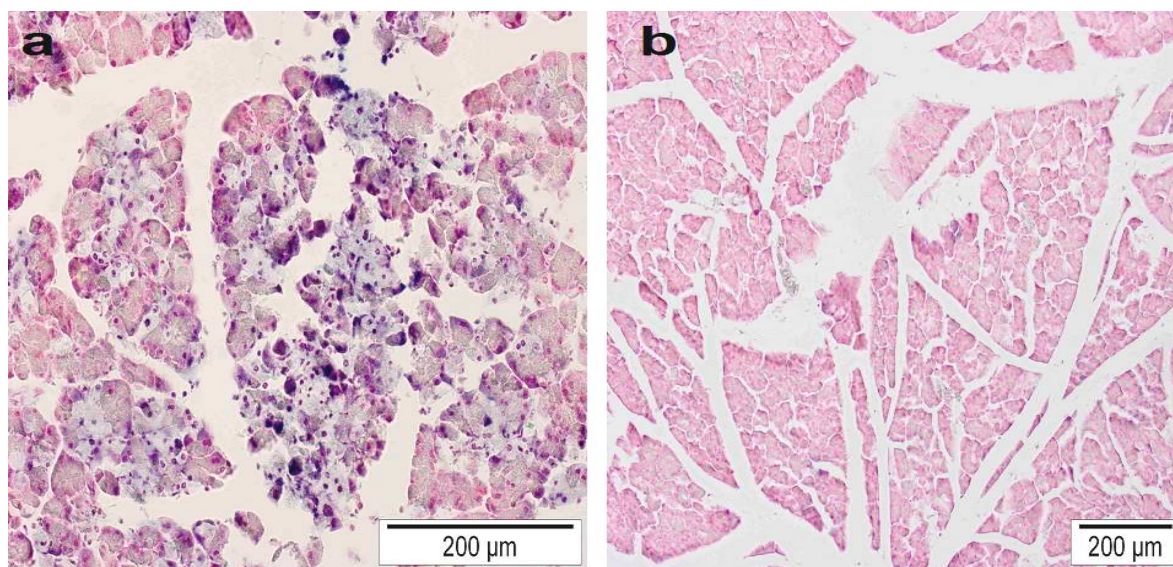
<i>Koetin-</i> <i>määrä</i>	<i>125 ng</i> <i>(250 ng/ml)</i>		<i>250 ng</i> <i>(500 ng/ml)</i>		<i>500 ng</i> <i>(1000 ng/ml)</i>		<i>1250 ng</i> <i>(1500 ng/ml)</i>	
<i>Koetin</i>	<i>Signaali</i>	<i>Tausta</i>	<i>Signaali</i>	<i>Tausta</i>	<i>Signaali</i>	<i>Tausta</i>	<i>Signaali</i>	<i>Tausta</i>
2Cb	++	-	+++	-	+++	+	na.	na.
3Db	+	-	++	-	++	+	na.	na.
E-	+	+	+	+	++	+	+++	++
<i>Koetin-</i> <i>määrä</i>	<i>125 ng + 125 ng</i> <i>(250 ng/ml)</i>		<i>250 ng + 250 ng</i> <i>(500 ng/ml)</i>		<i>500 ng + 500 ng</i> <i>(1000 ng/ml)</i>			
<i>Koetinseos</i>	<i>Signaali</i>	<i>Tausta</i>	<i>Signaali</i>	<i>Tausta</i>	<i>Signaali</i>	<i>Tausta</i>		
2Cb + 3Db	+	+	+++	+	+++	-		

- = ei värjäytymistä, + = lievä värjäytyminen, ++ = hyvä värjäytyminen, +++ = erinomainen värjäytyminen, na. = ei analysoitu

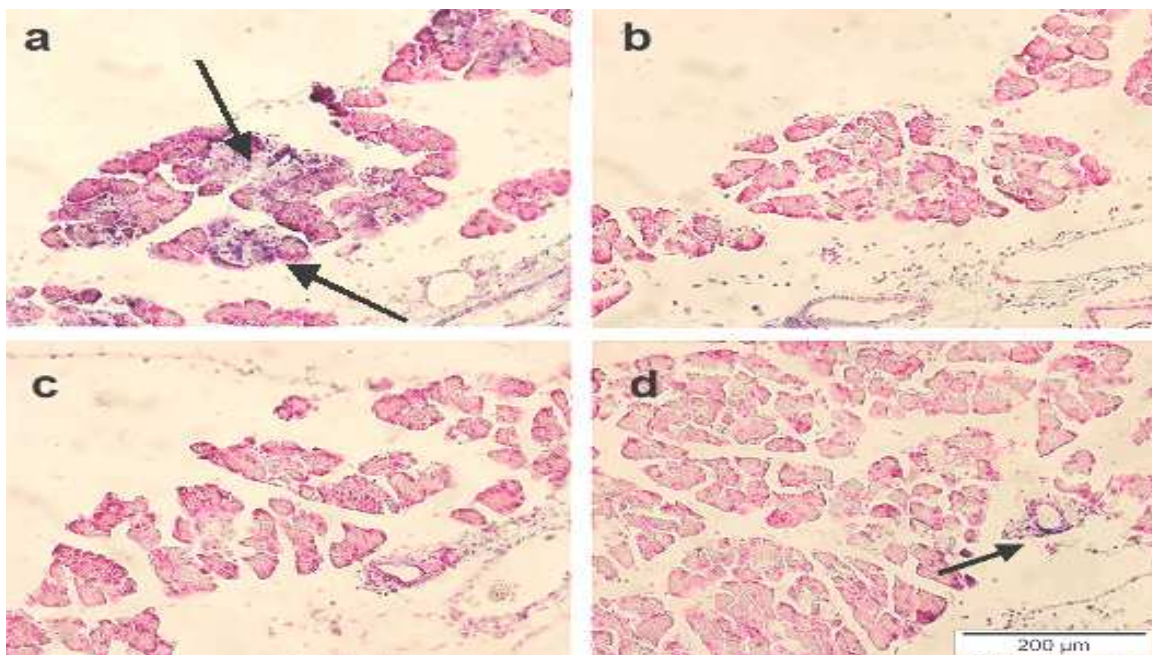


Kuva 12. CBV3-infektoidun hiiren kudoksia. Suunnittelemamme koettimet tunnistivat enteroviraalista genomia ainoastaan haimakudoksen eksokriinisestä osasta (a). Kuvan a nuolet osoittavat pyknoottisia tumia. Spesifistä värjäytymistä ei havaittu sydänlihaskudoksesta (c ja d). Suolen nukkalisäkkeet ja mikro-villukset värjäytyivät sekä negatiivisesta että positiivisesta kontrollista (b). Kuvan a hybridisaatioreaktiossa koettimena käytettiin E1-koetinta (500 ng/ml) ja kuvien b,c ja d hybridisaatioreaktiossa 2Cb-koetinta (500 ng/ml). Kuvan a suurennos on 630-kertainen ja mittajana on pituudeltaan 50 µm. Kuvat b, c ja d ovat suurennettu 400-kertaisiksi ja mittajana on 100 µm.

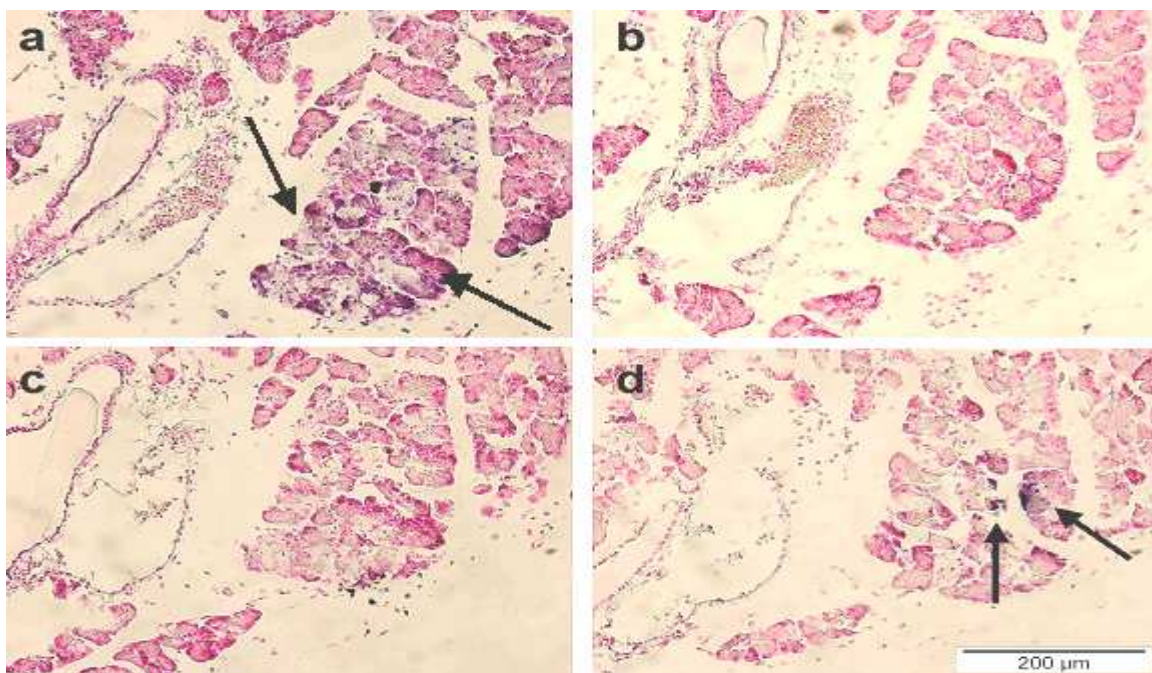
B -lajin enterovirusia tunnistamaan suunnitellut 2Cb ja 3Db -koettimet antoi vahvan hybridisaatiosignaalin, kun näytteenä oli CBV3-infektoidun hiiren kudoksia. Muita enteroviruslajeja tunnistamaan suunniteltuja koettimia käytettäessä ei havaittu merkittävää hybridisaatiosignaalia (Kuva 14 ja Kuva 15). Lisäksi havaittiin, että eri enteroviruslajeille suunnitellut koettimet 2Ca, 2Cc ja 2Cd, eivät häirinneet 2Cb-koettimen detektiotehoa (Taulukko 15).



Kuva 13. *In situ* -hybrisaatio positiivisesta ja negatiivisesta hiirikontrollista enteroviruksen negatiivista juostetta tunnistavalla koettimella (1000 ng/ml). CBV3-infektoidun hiiren leikkeestä ainoastaan haimakudos oli värjäytynyt. Detektiosignaali oli voimakas eikä taustavärjäytymistä merkittävästi havaittu (a). Infektoimattomasta hiirestä koettimelle komplementtaarista nukleiinihappoa ei kyetty osoittamaan (b). Kuvan a suurennus on 200-kertainen ja Kuvan b 100-kertainen. Mittajanat ovat 200 µm.



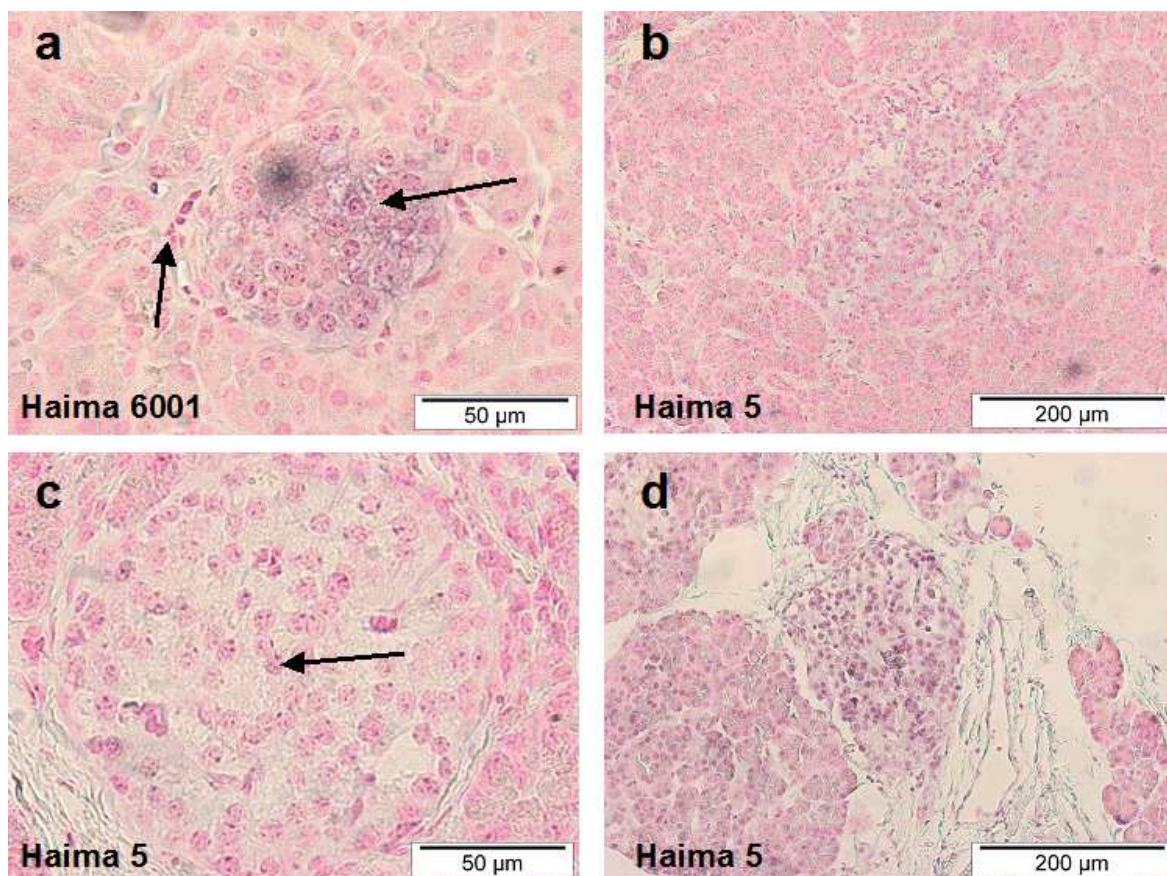
Kuva 14. Enterovirusgenomin 2C-alueelle sitoutuvien lajispesifisten koettimien kyky tunnistaa enterovirus B-lajin virusta. 2Cb-koetin tunnisti hiiren eksokriinisestä haimakudosesta komplementtaarista CBV3:n RNA:ta ja hybridisaatiosignaali näkyy kuvassa violetina (a). 2Ca- ja 2Cc -koettimet eivät tunnista 2C-geenialueen RNA:ta (b ja c). 2Cd -koetin värjäsi epiteelisoluja (d). Suurennus on 200-kertainen ja mittajanan pituus on 200 µm.



Kuva 15. Enterovirusgenomin 3D-alueelle sitoutuvien koettimien lajispesifisten koettimien kyky tunnistaa enterovirus B-lajin virusta. 3Db-koetin tunnisti hiiren eksokriinisestä haimakudosesta komplementtaarista CBV3:n 3D-geenialueen RNA:ta. Hybridisaatiosignaali näkyy kuvassa violetina (a). 3Da- ja 3Dc -koettimet eivät tunnista CBV3:n RNA:ta (b ja c), mutta 3Cd -koettimella havaittiin heikko signaali. Kuvan nuolet osoittavat värjäytymiskohdat. Suurennus on 200-kertainen ja mittajanan pituus on 200 µm.

4.6 *In situ* -hybridisaatio ihmisen haimakudoksilla

Vahvimman hybridisaatiosignaalin antoi haima 6001 -leikkeen saareke, joka erottui värjäytyneenä ympäröivästä kudoksesta. Saareke ei ollut kokonaan värjäytynyt ja siitä erottui värjäytymättömiä alueita (Kuva 16a). Leikkeen kaikki muut saarekkeet olivat värjäytymättömiä eikä leikkeellä ei ollut merkittävää taustavärjäytymistä. Haima 5 -leikkeillä havaittiin taustavärjäytymistä, minkä vuoksi näyte tulkittiin enterovirusnegatiiviseksi. Haima 1-10 -leikkeiden ISH:ssa ei havaittu hybridisaatiosignaalia enterovirusten negatiivista RNA-juostetta tunnistavalla koettimella. Leikkeiden vähäisestä määrästä johtuen haima 6001 -leike tutkittiin ainoastaan jo aikaisemmin käytössä olleella E1-koettimella.



Kuva 16. *In situ* -hybridisaatio ihmisen haima 6001- ja haima 5 -kudosleikkeistä. Haima 6001 -leikkeelle ISH tehtiin E1-koettimella. Leikkeeltä löydettiin saareke, jonka soluista on osa voimakkaasti värjäytynyt. Värjäytymistä havaitaan sekä sytoplasmassa (nuoli) että tumissa. Osa saarekkeen ulkoreunassa olevista soluista on värjäytynyt muuta saareketta voimakkaammin (nuoli). Muut leikkeen saarekkeista olivat värjäytymättömiä (a). Haima 5 -kudosleikkeille värjäykset tehtiin käyttäen 2Ca-koetinta (d) sekä enteronegatiivisen, 2Cb:n, 3Da:n ja 2Ca:n koettimien seosta. Enteronegatiivisen ja 2Cb -koettimien pitoisuus oli (1000 ng/ml) ja 2Ca- ja 3Da -koettimien (500 ng/ml) (b ja c). Haima 5 -leikkeillä havaittiin erittäin heikkoa värjäytymistä joka saarekkeessa ja eksokriinisessä osassa. Värjäytyminen näkyy haaleana vaaleansinisena värjäytymisenä sytoplasmassa sekä tummina pisteinä tumissa (c). Kuvien a ja c suurennus on 630-kertainen ja kuvien b ja d 200-kertainen. Mittajanan pituus kuvissa a ja c on 50 µm ja kuvissa b ja d 200 µm.

4.7 Enterovirusvasta-aineen 5-D8/1 sitoutumiskohdan rinnastus

Dakon 5-D8/1-vasta-aineen sitoutumiskohdan rinnastuksella ihmisen proteiineja kohtaan löydettiin useita proteiineja, joilla on rakenteessaan täydellinen aminohappojen sekvenssi-identtisyys vasta-aineen VP1-epitoopin kanssa (Tauluko 17). Täydellisen sekvenssi-identtisyiden jakavat useat tyrosiinifosfataasiperheeseen kuuluvat proteiinit sekä reseptorit. Myös sinkkisormiproteiiniperheeseen kuuluvien proteiinien rakenteista löydettiin täydellistä sekvenssi-identtisyttä. Immuunipuolustukselle tärkeiden MHC II -luokan proteiinien rakenteista löydettiin 66-88 %:sta sekvenssi-identtisyttä VP1-epitooppisekvenssin kanssa. Nämä identtiset epitoopit voivat aiheuttaa väärän positiivisen signaalin määrittäessä enterovirusta ihmisen kudoksista 5-D8/1 vasta-aineella.

Taulukko 17. Useat ihmisen proteiinit jakavat sekvenssi-identtisyttä enteroviruksen konservatiivisen VP1-epitoopin kanssa.

<i>Proteiini</i>	<i>Sekvenssi-identtisyys %</i>
Tyrosiini-proteiini fosfataasi	100
Seriini/threoniini-proteiini fosfataasi 4	100
Sinkkisormiproteiini	100
Dystroteliini	100
Rasvahapposyntaasi	100
Ubikitiini-proteiini ligaasi, E3	100
Death domeenia avustava proteiini	100
HLA luokan II antigeeni	88
HLA luokan I antigeeni	66
Heat shock 17 kDa proteiini	88
Heat shock 75 kDa proteiini	66
Heat shock 60 kDa proteiini	44

4.8 β -solujen suhteellisen osuuden määrittäminen

β -solujen suhteelliset osuudet vaihtelevat eri haimaleikkeiden välillä merkittävästi. Kaksisataakertaisella suurennoksella tehdyn pinta-alamäärityksen mukaan β -solujen osuus vaihteli välillä 0.92 % (haima 8) ja 4.50 % (haima 3) ja nelikertaisen suurennoksen mukaan välillä 0.42 % (haima 1) ja 3.28 % (haima 3) (Taulukko 18). Samalta haimaleikkeeltä eri suurennuksilla määritettyjen β -solujen osuudet korreloivat heikosti keskenään. Näiden tulosten välinen korrelaatio on vähäistä, vaikka molemmilla suurennoksilla saatiinkin haima 3 -leikkeelle suurin β -solujen osuus.

Taulukko 18. Eksokriinisen haimakudoksen ja β -solujen pinta-alan määrittäminen β -solujen suhteelliset osuudet vaihtelevat voimakkaasti eri haimaleikkeiden välillä. Vaihtelua on myös samojen haimaleikkeiden välillä, kun näytteitä tarkastellaan eri suurennoksilla (200x ja 4x). β -solujen osuudet korreloivat heikosti eri suurennuksilla.

	<i>200 -kertainen suurennos</i>		<i>4 -kertainen suurennos</i>	
Haima 1	Pinta-alat	β -solujen osuus	Pinta-alat	β -solujen osuus
Eksokriininen kudosis	2690489.25 μm^2	1.57 %	23110598.25 μm^2	0.42 %
β -solut	42467.70 μm^2		137774.75 μm^2	
Haima 2				
Eksokriininen osuus	2389083.26 μm^2	2.48 %	26566027.72 μm^2	1.20 %
β -solut	59383.94 μm^2		320467.91 μm^2	
Haima 3				
Eksokriininen osuus	2550219.62 μm^2	4.50 %	30177218.77 μm^2	3.28 %
β -solut	115008.54 μm^2		992397.99 μm^2	
Haima 4				
Eksokriininen osuus	2701353.92 μm^2	1.03 %	29055420.81 μm^2	2.58 %
β -solut	27955.84 μm^2		750113.19 μm^2	
Haima 5				
Eksokriininen osuus	1885999.38 μm^2	3.11 %	25781634.46 μm^2	1.94 %
β -solut	58759.68 μm^2		502415.55 μm^2	
Haima 6				
Eksokriininen osuus	2399108.38 μm^2	1.22 %	28841815.07 μm^2	2.16 %
β -solut	29401.68 μm^2		625657.18 μm^2	
Haima 7				
Eksokriininen osuus	2474141.48 μm^2	2.82 %	30830483.18 μm^2	1.84 %
β -solut	69844.60 μm^2		570020.10 μm^2	
Haima 8				
Eksokriininen osuus	2090368.84 μm^2	0.92 %	27210460.49 μm^2	1.56 %
β -solut	19350.21 μm^2		425495.26 μm^2	
Haima 9				
Eksokriininen osuus	1568879.71 μm^2	1.46 %	24111682.32 μm^2	2.02 %
β -solut	23001.48 μm^2		488022.51 μm^2	
Haima 10				
Eksokriininen osuus	2311890.98 μm^2	1.11 %	29465581.76 μm^2	0.90 %
β -solut	25728.34 μm^2		266427.15 μm^2	

5 TULOSTEN TARKASTELU

Tieto enterovirusten ja T1D:n epidemiologisesta yhteydestä vahvistuu koko ajan. Vaikka viitteitä tästä yhteydestä on runsaasti, enterovirusten rooli T1D:n patogeneesissä on edelleen epäselvä. Tutkimuksia on hankaloittanut merkittävästi haimanäytteiden erittäin heikko saatavuus. Näytemateriaalin puute hankaloittaa merkittävästi tutkimustyötä ja heikentää tulosten luotettavuutta, sillä suurimmassa osassa julkaisuja on liian vähän tapauksia ja kudosnäytteen laatu on heikko johtuen kuolemanjälkeisistä muutoksista. Usein tulokset, joiden mukaan enterovirus on detektoitu diabeetikoiden haimakudoksesta ovat muilla menetelmillä vahvistamattomia. Lisäksi tutkimusten toteutuksissa on havaittu puutteita tai tulokset ovat osoittautuneet epäluotettaviksi (ks. yleiskatsaus Drecher ja Tracy, 2008; ks. yleiskatsaus Priest, 2009; ks. yleiskatsaus Roivainen ja Klingel, 2009). Dotta ym. (2007) immunohistokemialliset tulokset ovat vahvistettu elektronimikroskoopilla ja eristämällä CBV4-virus enteroviruspositiivisesta haimakudoksesta. Tuloksia on arvosteltu, erityisesti siksi että eristettyä viruskanta pidetään sekvenssianalyysien mukaan laboratoriokontaminaationa (ks. yleiskatsaus Drecher ja Tracy, 2008). Dotta ym. (2007) ovat käyttäneet enterovirusdetektiossa ainoastaan 5-D8/1-enterovirusvasta-ainetta ja kuvat immunoperoksidaasimenetelmällä värjäytyistä saarekkeista ovat epätarkkoja ja niistä erottuu runsasta saarekkeiden ulkopuolista taustavärjäytymistä.

Kaupallista 5-D8/1-enterovirusvasta-ainetta on käytetty monissa IHC:aan perustuvissa enterovirustutkimuksissa, joissa on pyritty selvittämään T1D:n ja enterovirusinfektion välistä yhteyttä (Taulukko 3, s. 20). Pelkästään tämän vasta-aineen käyttö enterovirusten detektiossa ei mielestäni anna luotettavaa kuvaa enteroviruspositiivisuudesta, sillä vasta-aineen detektiotehosta sekä epäspesifisestä sitoutumisesta saarekesoluspesifisiin antigeeneihin on kirjallisuudessa ristiriitaisia tietoja (Härkönen ym., 2000 ja 2002; Oikarinen ym., 2008). Dakon 5-D8/1 -enterovirusvasta-ainella määritetyt tulokset tulisi aina vahvistaa myös muilla enterovirusvasta-aineilla, jos mahdollista. Immunohistokemiallisen enterovirusdetektion luotettavuuden varmistamiseksi tulisi myös osoittaa enteroviraalisten nukleiinihappojen sekä aminohappojen kolokalisaatio leikkeeltä, sillä positiivinen enterovirusdetektio molemmilla menetelmillä poissulkee vasta-aineiden epäspesifisestä sitoutumisesta johtuvaa virheellisen enterovirusdetektion mahdollisuutta.

Pro gradu -tutkielmani päätarkoituksena oli vahvistaa enterovirusdetektion luotettavuutta suunnittelemissamme koettimilla sekä omassa laboratoriossamme tuotetuilla polyklonaalisilla vasta-aineilla ja arvioida näiden koettimien ja vasta-aineiden soveltuvuutta enterovirusdetektioon. Lisäksi tutkielmani tarkoituksena oli selvittää tietoa enterovirusten isäntäsoluspesifisyydestä ihmisen haimakudoksessa.

5.1 Immunovärjäykset haimanäytteistä

Tulokset haima 1-10 -leikkeiden immunoperoksidaasivärjäyksestä kaikilla kolmella kotitekoisella vasta-aineella ovat hyvin tulkinnanvaraisia eikä tuloksista voida päätellä sitä, että onko yksikään tutkittu haimaleike CBV3-, CAV16- tai Echo11 -positiivinen sillä kaikissa leikkeissä havaittiin taustavärjäytymistä. Taustavärjäytymisen vuoksi näytteet tulkittiin enterovirusnegatiivisiksi. Suurimpana ongelmana oli varmojen enteroviruspositiivisten ihmisperäisten kontrollinäytteiden puuttuminen värjäyksistä, joiden avulla IHC värjäysprotokollat olisi saatu paremmin optimoitua, jolloin taustavärjäytymisen ja positiivisen värjäytymisen ero olisi muodostunut riittävän suureksi. Positiiviset kontrollit olisivat myös lisänneet tulosten luotettavuuden arviointia merkittävästi ja näin ollen helpottanut tulosten tulkintaa.

Vaikka tiedetään, että enterovirusinfektiot ovat hyvin yleisiä, on hyvin epätodennäköistä, että kaikissa haima 1-10 -leikkeissä olisi CAV16-infektio (Kuva 6a-e, s. 53). Näkemystä tulosten enteroviruspositiivisuudesta tukevat saarekkeiden eksokriinistä kudosta voimakkaampi värjäytyminen sekä vain osittainen saarekevärjäytyminen, mitä havaittiin etenkin CAV16-vasta-ainetta käytettäessä. Merkittävästi vähemmän vastaavaa havaittiin CBV3- ja Echo11 -vasta-aineita käytettäessä (Kuva 7a-d, s. 54 ja Kuva 8a-d, s. 54). Vastaavasti leikkeiden paikoin melko runsas taustavärjäytyminen ja kaikkien saarekkeiden lievä värjäytyminen puoltavat sitä, että haima 1-10 -leikkeet ovat enterovirusnegatiivisia, vaikka saarekkeet olivatkin värjäytyneet muuta kudosta voimakkaammin. Lisäksi saarekevärjäytyminen korreloi voimakkaasti eksokriinisen taustavärjäytymisen intensiteetin kanssa, sillä CAV16-vasta-ainepitoisuuden puolittaminen vähensi kokonaisvärjäyksen intensiteettiä merkittävästi haima 5 -leikkeellä. Tausta- ja saarekevärjäytymisen korrelaatiota havaittiin kaikilla polyklonaalisilla vasta-aineilla värjäytyillä leikkeillä. Haimaleikkeiden taustavär-

jäytymistä voitaisiin mahdollisesti saada vähennettyä optimoimalla itse tuotettujen vasta-aineiden käyttöpitoisuudet merkittävästi laimeammiksi ja vahvistamalla detektiosignaalia esimerkiksi polymeeritekniikkaan perustuvalla EnVision™ + -signaalinvahvistusmenetelmällä. Menetelmä soveltuu enterovirusten detektioon erinomaisesti, sillä menetelmä vahvistaa signaalia taustavärjäytymisen häiritsevästi lisääntymättä. EnVision™ + -menetelmän herkkyys on tässä tutkimuksessa käytettyä ABC-menetelmää muistuttavaa signaalinvahvistusmenetelmää merkittävästi parempi ja tätä menetelmää käytettäessä spesifisen signaalin osuus taustavärjäytymisestä kasvaa (Zhang ym., 2000).

Taustavärjäytymisen pienentämisellä ja signaalin vahvistamisella ei ole merkitystä, jos polyklonaaliset CBV3-, CAV16- ja Echo11 -vasta-aineet jakavat epitooppeja saarekesolurakenteiden ja enteroviraalisten pintarakenteiden kanssa. Tällöin saarekkeen solut värjäytyvät ja väärän enteroviruspositiivisen detektion riski kasvaa. Tällaista väärää spesifistä sitoutumista epäillään olevan myös kaupallisella 5-D8/1-vasta-aineella, ainakin tyrosiinifosfataasiperheeseen kuuluvia proteiineja kohtaan. Tyrosiinifosfataasit ovat muun muassa β-soluissa esiintyviä proteiineja, joita kohtaan T1D:n autoimmuniprosessissa muodostuu immuunivaste. Muodostuvat autovasta-aineet ovat IA-2A -vasta-aineita. (Härkönen ym., 2000 ja 2002) BLAST-rinnastusohjelman tulosten mukaan 5-D8/1-vasta-aineen VP1-epitoppi jakaa täydellisen sekvenssi-identtisyyden useiden tyrosiinifosfataasiproteiinien ja sinkkisormiproteiinien kanssa sekä jakaa 88 %:sen sekvenssi-identtisyyden MHC II -luokan proteiinikompleksin kanssa (Taulukko 17, s. 64). Tämän havainnon perusteella tulokset, jotka perustuvat ainoastaan 5-D8/1-enterovirusvasta-aineella detektoituihin haimakudoksen enteroviruslöydöksiin, eivät ole täysin luotettavia, vaikka verrokkinäytteet olisivatkin negatiivisia. Virheellisen tuloksen riskiä tulisi pienentää varmistamalla positiivinen enterovirusdetektio esimerkiksi eri epitoppiin sitoutuvan monoklonaalisen enterovirusvasta-aineen käytöllä.

Polyklonaaliset enterovirusvasta-aineet ovat osoittautuneet hieman ongelmallisiksi, sillä Foulisin ym. (1990) käyttämä CBV3:n VP2/VP3/VP4 -kapsidiproteiineja kohtaan tuotettu kanin polyklonaalinen vasta-aine värjäsi saarekkeita normaaleista kontrollinäytteinä käytetyistä haimaleikkeistä (n = 43). Noin puolessa kontrollinäytteitä havaittiin saarekkeiden heikkoa värjäytymistä ja se rajoittui ainoastaan osaan saarekesoluja. Tämä epäspesifinen

värjäytyminen kuitenkin erosi merkittävästi CBV3-positiivisen näytteen värjäytymisestä ja se oli helposti havaittavissa. Vasta-aineen epäspesifisestä sitoutumisesta johtuen tutkimusryhmä luopui vasta-aineen käytöstä väärin tulosten välttämiseksi. Polyklonaaliset vastaaineet ovat useista B-lymfosyyteistä erittyneitä vasta-aineita, jotka sisältävät useita erilaisia paratoppeja. Tällainen vasta-aineiden seos saattaa jakaa epitooppeja solurakenteiden ja detektoitavan kohteen kanssa ja aiheuttaa valheellista värjäytymistä, epäspesifistä värjäytymistä sekä taustavärjäytymistä, mitkä tulee ottaa huomioon käytettäessä kyseisiä vastaaineita. Onkin hyvin todennäköistä, että haima 1-10 -leikkeiden saarekevärjäytyminen johtuu juuri CAV16-, CBV3- ja Ehcho11 -vasta-aineiden sitoutumisesta solurakenteiden epitooppeihin. Tähän voivat olla syynä kaniin injektoidun viruspreparaatin epäpuhtaus, jolloin viruspreparaatti saattaa sisältää kasvatussolukomponentteja, joita kohtaan muodostuu vastaaineita. Nämä mahdolliset vastaaineet saattavat aiheuttaa taustavärjäytymistä. Lisäksi mahdollinen vasta-ainepuhdistuksen riittämättömyys saattaa aiheuttaa ongelmia immunovärjäyksissä. Tästä johtuva taustavärjäytyminen kuitenkin poissuljettiin käyttämällä verosolususpensiota polyklonaalisten vasta-aineiden laimennosliuoksessa. Ehkä suurin ongelma on kuitenkin spesifinen sitoutuminen viruksen kapsidiproteiinien jakaessa epitooppeja saarekesolujen kanssa. Tätä sitoutumista ei voida täysin estää, sillä blokatessa sitoutumiskohtia leikkeeltä tai vasta-aineita liuoksesta myös haluttu sitoutuminen viruskapsidiproteiineihin heikkenee tai estyy kokonaan. Myös värjäystekniset syyt voivat olla heikon saarekevärjäytymisen taustalla, sillä DAB-kromogeeni saattaa hakeutua etenkin saarekesoluihin ja hapettua ruskeaksi sakaksi endogeenisten peroksidaasien vuoksi. Tämä värjäytyminen kuitenkin poissuljettiin käyttämällä kontrollia, josta jätettiin pirimäärivastaaine pois. Saarekesolujen eksokriinisiä soluja laajempi ekstrasellulaarinen matriksi näkyy leikkeellä vaaleampana alueena, jota vastavärinä käytetty hematoksyliini ei värjää. Kromogeenin aiheuttama taustavärjäytyminen näkyy saarekkeista erityisen hyvin, koska kontrasti värjäytymättömän ja värjäytyneen saarekesolun välillä on erittäin suuri. Tämä saattaa johtaa virheellisiin tulosten tulkintoihin.

Immunofluoresenssiin perustuvassa immunovärjäyksessä CAV16-vasta-aineen havaittiin värjäävän tumia, eikä sitoutumista saatu vähennettyä edes erilaisin blokkauksen menetelmin tai vasta-aineen käyttökonsentraatiota laimentamalla. Vasta-aineen laimentaminen sen sijaan heikensi merkittävästi sytoplasman CAV16-fluoresenssia. Tumavärjäytyminen ei kuitenkaan häirinnyt tulosten tulkintaa, sillä värjäytymisen intensiteetti oli matala ja se oli hel-

posti erotettavissa positiivisesta sytoplasmaan lokalisoituvasta CAV16-värjäytymisestä. Tumavärjäytyminen viittaa siihen, että CAV16-vasta-aineessa on paratoppeja, jotka sitoutuvat spesifisesti tumassa tai tumakalvolla oleviin solun proteiinien epitooppeihin. Immunoperoksidaasivärjäyksessä tumavärjäytymistä ei havaittu, mikä johtuu todennäköisesti hematoksyliinin aiheuttamasta voimakkaasta tumaväristä tai steerisestä esteestä, jolloin vasta-aine ei kykene situtumaan epitooppiinsa.

Erittäin mielenkiintoista on, että immunoperoksidaasivärjäyksen sekä immunofluoresenssiin perustuvan kaksoisvärjäyksen mukaan haimassa 6001 oli enterovirusinfektio, joka havaittiin CAV16 vasta-aineella ja immunoperoksidaasivärjäystulos eroaa merkittävästi haima 1-10 -leikkeiden CAV16-värjäystuloksesta (Kuva 6a-f ja g-h s. 53). Immunofluoresenssiin perustuvalla kaksoisvärjäyksellä haima 6007 -leikkeeltä ei positiivisuutta kyetty osoittamaan. Enterovirusinfektion ja infektion β -soluspesifisyyden osoittaminen ihmisen haimakudoksesta on merkittävä löytö, sillä kirjallisuudessa ei ole viitteitä CAV16 β -soluspesifisyydestä. Tähän saattaa olla syynä lähinnä se, että 5-D8/1 enterovirusvasta-aine ei ole riittävän herkkä tunnistamaan CAV-ryhmän viruksia, sekä se että lajispesifisillä enterovirusvasta-aineilla on detektoitu enteroviruksia varsin vähän (Terletskaia-Ladwig ym., 2008; Miao ym., 2009; Oikarinen ym., 2010). Aikaisemmin on saatu viitteitä siitä, että CAV16-vasta-aine on serotyypispesifinen formaliinifiksatuilla soluleikkeillä (Oikarinen ym., 2010). Tutkimuksessa oli mukna vain kaksi eri CAV ryhmän virusta, joten tutkimuksen perusteella ei voida arvioida CAV16 vasta-aineen todellista serotyypispesifisyyttä.

Kaksoisvärjäystulosten mukaan CAV16-infektio rajoittuu haimakudoksessa ainoastaan saarekkeiden insuliinia tuottaviin β -soluihin eikä infektiota havaittu glukagonia tuottavissa α -soluissa eikä somatostatiinia tuottavissa δ -soluissa. Tulokset CAV16-saarekesoluspesifisyyden määrittämisestä ovat erittäin mielenkiintoisia, sillä 5-D8/1-enterovirusvasta-aineella enteroviruksia on osoitettu myös glukagonia erittävistä α -soluista sekä *in situ* että *in vitro* (Chehadeh ym., 2000; Oikarinen ym., 2008). Oikarisen ym. (2008) tulosten mukaan jopa suurin osa enteroviruspositiivisuudesta rajoittuisi α -soluihin *in situ*. Värjäytyminen oli selkeää, eikä voida olettaa leikkeellä olevien sytoarkkitehtuuristen erojen, kuten α -ja β -solujen päällekkäisyyden, aiheuttavan valheellista kolokalisaatiota. Tässä tutkimuksessa emme kuitenkaan havainneet α -soluspesifistä värjäytymistä polyklonaalisella CAV16-vasta-aineella.

Vallalla olevan näkemyksen mukaan enterovirusten saarekesoluspesifisyys rajoittuu ainoastaan β -soluihin, mitä myös tämän tutkimuksen tulokset vahvasti tukevat. Onkin mielenkiintoista arvioida 5-D8/1-enterovirusvasta-aineella saatujen immunovärjäysten luotettavuutta sekä toisaalta myös sitä, mitkä tekijät rajoittaisivat enterovirusinfektion tiukasti ainoastaan β -soluihin haimakudoksessa. Vaikka kirjallisuudessa on hyvin vähän tietoa tekijöistä, jotka rajaavat enterovirusten saarekesoluspesifisyyden β -soluihin, on hyvin oletettavaa, että saarekesolujen pintareseptorikompositiossa on merkittäviä eroja. Eri enterovirusserotyypien käyttämät pintareseptorit ja koreseptorit vaihtelevat merkittävästi eri serotyyppien mukaan ja vaihtoetoisia enteroviruspintareseptoreja tunnetaan samankin serotyypin välillä useita. Tämän tiedon sekä Chehadehin ym. (2000) ja Oikarisen ym. (2008) tutkimusten pohjalta on todennäköisempää, että enterovirukset voisivat infektoida serotyypispesifisesti β -solujen ohella myös saarekkeen muita soluja. Enterovirusten saarekesoluspesifisyystutkimukset ovat hieman puutteellisia, sillä saarekkeen PP- ja ϵ -soluja eikä saarekkeita ympäröiviä Schwannin soluja ole tutkittu lainkaan mahdollisina enterovirusten isäntäsoluina. Vaikka näitä soluja on suhteellisen vähän saarekkeissa verrattuna muihin saarekesoluihin, olisi mielestäni tärkeää osoittaa myös näiden solujen alttius enterovirusinfektioille. Teoriassa tämä olisi helposti toteutettavissa soluspesifisten greliini-, PP- ja S100 β vasta-aineiden avulla.

5.2 *In situ* -hybridisaation optimointi suunnittelemillemme koettimille

In situ -hybridisaatiota on käytetty useissa enterovirusdetektioon liittyvissä tutkimuksissa joko ensisijaisena tai tuloksia varmistavana detektiomenetelmänä. Vaikka menetelmä on toteutettavuudeltaan erittäin haastava, on enterovirusdetektio ihmisen haiman saarekesoluista, myokardiumista sekä ohutsuolesta (Foulis ym., 1997; Ylipaasto ym., 2004; Oikarinen ym., 2007). Enterovirusdetektio on ISH:lla detektoitu myokardiittiin menehtyneiden vastasyntyneiden haiman saarekesoluista useammassakin tutkimuksessa, mutta diabeetikoiden haimoista enterovirusdetektio on julkaisujen mukaan ainoastaan kahdessa tutkimuksessa. Ylipaasto ym. (2004) löysivät radioaktiivisella CBV1-5 -serotyyppeihin sitoutuvalla koettimella neljästä vasta diagnostisoitujen diabeetikoiden (n=64) haimoista enterovirusta. Lisäksi autoimmuuniprosessista riippumattomaan fulminanttiin diabetekseen menehtyneen haimasta on detektoitu enterovirusta (Shibasaki ym., 2010).

ISH:lla saatujen tulosten tarkoituksena on arvioida suunniteltujen koettimien soveltuvuutta enterovirusten detektiin ihmisen haimakudoksesta. ISH-menetelmän optimointi suoritettiin hiiren kudoksilla, koska emme saaneet käyttöömmme varmuudella enterovirusinfektioita ihmisperäisiä näytteitä. Toisin kuin ihmisen haimakudoksessa, hiiren haimakudoksessa enterovirusinfektiot lokalisoituvat ainoastaan eksokriiniseen kudokseen (Arola ym., 1995; Klingel ym., 1996). Enterovirusinfektion lokalisaatioero hiiren ja ihmisen haimakudoksessa ja erilainen isäntäsolotropismi, ovat mielestäni merkittäviä syitä käyttää ihmisperäisiä haimakudoskontrolleja, jos sopivaa kudosta on saatavilla.

Koettimien lajispesifisyyden määrittämisestä saatujen tulosten perusteella on tarkoitus kehittää koetinsarja, joka tarjoaa kattavan ja lajispesifisen enterovirusdetektion haimakudoksesta. Tällaisesta enteroviruslajispesifisestä koetinsarjasta ei ole kirjallisuudessa viitteitä. Koettimien lajispesifisyyden määrittäminen tehtiin CBV3-infektoidun hiiren kudostenleikkillä ja tulosten mukaan infektion tunnisti ainoastaan 2Cb- ja 3Db -koettimet, vaikka lievää hybridisaatiosignaalia havaittiin enterovirus D lajin 2C ja 3C -geenialueita tunnistavilla koettimilla (Kuva 14 ja Kuva 15, s. 62). Koettimien lajispesifisyyden varmistamiseksi ja tulosten luotettavuuden vuoksi vastaavat tulokset olisi hyvä määrittää myös enterovirus A, C ja D lajien serotyypeillä.

ISH-menetelmän olosuhteiden optimointi suunnittelemllemme koettimille ja eri enterovirusserotyypeille oli haastava toteuttaa, sillä koettimien hybridisaatioparametrejä ei voinut optimoida tarkasti, sillä koettimet sisälsivät vaihtoehtoja, jotka vaikuttivat muun muassa hybridisaatiolämpötilaan. Koetinpitoisuuksien optimointi osoitti, että koetinpitoisuudella 500 ng/ml saavutetaan taustavärjäytymisen ja halutun signaalin suhteen parhaimmat ISH-tulokset. Samaa koetinpitoisuutta ovat käyttäneet muutkin tutkimusryhmät tutkimuksissaan (Ylipaasto ym., 2004; Oikarinen ym., 2007 ja 2008). Kuitenkin käyttämällä enterovirusten negatiivisen juosteen 3'-pään koodittamattomalle alueelle sitoutuvaa koetinta, parhain hybridisaatiosignaali suhteessa taustanmuodostumiseen saavutettiin koetinpitoisuudella 1000 ng/ml. (Taulukko 16, s. 60) Hybridisaatiosignaalin vahvuutta saatiin lisättyä huomattavasti käyttäen enterovirusgenomin 2C- ja 3D -alueelle sitoutuvia koettimia (1000 ng/ml + 1000 ng/ml) hybridisaatioreaktiossa samanaikaisesti. Eri genomin alueille sitoutuvat koettimet toimivat erinomaisesti toisiaan täydentäen ja vahvistavat hybridisaatiosignaalia merkittä-

västi ilman taustavärjäytymisen muodostumista. Tämä on tärkeä havainto ja ihmettelenkin, että en kirjallisuudesta havainnut viitteitä vastaavasta. Ehkä syynä saattaa olla käyttämämme lyhyet, sekvenssiltään tunnetut DNA-koettimet, jotka mahdollistavat hybridisoinnin helposti juosteen eri kohtiin. Koettimien lyhyys vähentää yhdessä käytettynä koettimien dimerisoinnin riskiä. Mielenkiintoista on myös havaita, että enterovirusdetektiossa käytetyistä koettimista suurin osa on ainoastaan tietyn enteroviruslajin tunnistavia omassa laboratoriossa kloonattuja ja puhdistettuja koettimia (Foulis ym., 1997; Braissant ja Wahli, 1998; Ylipaasto ym., 2004).

Enterovirukset kykenevät siirtymään akuutista infektiosta krooniseen kahdella erilaisella mekanismilla. Mutaatio riippuvaisen mekanismin mukaan enterovirusgenomin 5'-päässä tapahtuu deletio, jolloin mutaatio aiheuttaa viruksen siirtymisen vähemmän lyyttiseen ja replikoituvaan muotoon (Kim ym., 2005). Toinen mekanismi ei vaadi mutaatiota, vaan Tamin ja Messnerin (1999) tutkimuksen mukaan enterovirusten negatiiviset ja positiiviset RNA-juosteet sitoutuvat keskenään ja muodostavat vakaan kaksijuosteisen RNA-genomin. Tällöin isäntäsolussa on ekvivalenttinen määrä juosteita, mikä on osoitettu kvantitatiivisella RT-PCR:llä *in vitro*. Enterovirusten kroonista infektiota ihmisen kudoksissa esim. haimakudoksen saarekesoluissa ei ole kyetty todistamaan eikä enterovirusten negatiivisjuosteista RNA:ta ole detektoitu ihmisen haimakudoksesta ISH:lla. Tulokset haima 1-10 -leikkeillä viittaavat samaan eikä hybridisaatiosignaalia näillä leikkeillä havaittu. Immunovärjäysten mukaan enteroviruspositiivisilla haima 6001 -leikkeillä ei näy tepulan vuoksi tehty hybridisaatiota enteronegatiivista RNA-juostetta tunnistavalla koettimella. Tämä tulisi mielestäni tehdä, jos kyseistä näytettä saadaan myöhemmin lisää.

Siihen, miksi enterovirusten kroonista infektiota ei ole ihmisen haimakudoksesta kyetty todistamaan, voi liittyä useita biologisia ja menetelmätekniisiä syitä. Yhtenä merkittävänä biologisena tekijänä koen isäntäsolujen tuottamat endogeeniset RNAsit, jotka pilkkovat tehokkaasti RNA-juosteita. Enterovirusten persistoinnin edellytyksenä on, että virusgenomi sisältää sekvenssejä, jotka tukevat sen stabiilisuutta ja persistenssiä, sillä RNA-juosteiden stabiilisuus ja puoliintumisaika vaihtelevat eukaryoottisoluissa merkittävästi. Erilaiset signaalsekvenssit, polyadeniinihänkä sekä mahdollinen kaksijuosteisuus saattavat estää nukleaasien enterovirusgenomia pilkkovan vaikutuksen. Lisäksi kapsidirakenteeseen kuu-

lumattomat enteroviraaliset proteiinit saattavat inhiboida nukleaasien vaikutuksen. Kroonisen enterovirusinfektion edellytyksenä on aina muutokset enterovirusten genomissa, joten jos saarekkeiden β -solujen RNAasit aktivoituvat pilkkomaan enteroviraalista RNA:ta, ei kroonista infektiota haimakudoksessa esiinny. Tällöin negatiivisen juosteen detektoiminen kudoksesta on mahdotonta.

Menetelmätekniset syyt voivat myös olla esteenä sille, ettei enterovirusten kroonista infektiota ole kyetty formaliinifiksata ihmisen haimakudoksesta osoittamaan. Syynä tähän voivat olla muun muassa näytteiden liian pitkä *post mortem* -aika ennen fiksausta, formaliinin nukleiinihappujuosteita hajottava vaikutus, koettimen luonne sekä menetelmän detektioherkkyyden riittämättömyys. Liian pitkällä *post mortem* -ajalla on suuri merkitys nukleiinihappojen ja kudomorfologian säilymiseen, sillä RNAasien aktivaatio ja proteolyttisen pilkkoutumisen katalysointi pilaavat näytekudoksen nopeasti. Saattaakin olla, että tutkimuksessani käyttämissäni haima 1-10 -kudosleikkeissä RNAasit ovat aktivoituneet ennen fiksaation alkua, sillä haimakudospalojen aika irrotuksesta käsittelyyn vaihteli 3:sta tunnista 33 tuntiin, vaikka kudokset ovat laitettu irrotuksen jälkeen entsyymattista toimintaa hidastavaan säilytysnesteeseen. Formaliinin on osoitettu pilkkovan RNA-juosteita noin 200 nukleotiditähteen mittaisiksi fragmenteiksi (ks. yleiskatsaus Krafft ym., 1997; Mizuno ym., 1998). Formaliinin nukleiinihappujuosteita pilkkovasta vaikutuksesta on kuitenkin ristiriitaista tietoa ja Scicchitanon ym. (2006) ja Xi:n ym. (2007) tutkimusten mukaan formalini ei aiheuta merkittävää RNA:n tuhoutumista. Formaliinin RNA:ta pilkkovaa vaikutusta on hieman liioiteltu, eikä formalinifiksauksen uskota olevan yksistään syynä enterovirusdetektion epäonnistumiselle. Ylipaasto ym. (2004) osoittivat enteroviraalista RNA:ta ISH:lla yli 30 vuotta vanhoista formalinifiksatuista haimakudosnäytteistä, mikä osaltaan todistaa formalinifiksauksen pikemminkin säilyttävän nukleiinihappujuosteita, kuin pilkkovan niitä.

ISH-menetelmän detektion herkkyyden riittämättömyydellä ja koettimen luonteella saattaa olla suuri vaikutus siihen, että kroonista enterovirusinfektiota ei haimakudoksesta ole kyetty osoittamaan. Tässä tutkimuksessa käytetyt koettimet olivat lyhyitä DNA-koettimia, jotka sitoutuvat RNA-juosteisiin kohtalaisella affiniteetilla. Positiivisena kontrollina käytetyt CBV3-infektoidun hiiren haimakudosleikkeet värjäytyivät enteronegatiivista RNA-juostetta tunnistavalla koettimella, joten enteroviraalista negatiivista RNA-juostetta oli

akuutissa infektiossa yli detektiokynnyksen. Epäilen kuitenkin tämän koettimen soveltuvuutta persistoivien enterovirusten negatiivisten RNA-juosteiden detektioon. Saattaakin olla, että koetin ei kykene hybridisoitumaan riittävän tehokkaasti negatiiviseen juosteeseen, jos enterovirusten kroonisen infektion edellytyksenä on muodostaa vakaa kaksoisjuosteinen RNA-genomi. Tällöin ISH-menetelmän denaturointivaiheen aikana DNA-koetin ei kykene syrjäyttämään riittävällä tehokkuudella positiivista enteroviraalista RNA-juostetta, sillä RNA/RNA -hybridi on vakaampi rakenne kuin DNA/RNA -hybridi. Ongelmaa voisi pienentää käyttämällä suurempaa koetinkonsentraatiota, mutta tällöin taustan osuus saattaisi kasvaa merkittävästi. Parempi hybridisaatiotulos saavutettaisiin RNA-koettimia käyttäen, koska ne sitoutuvat samalla affiniteetilla negatiivisiin RNA-juosteisiin kuin positiiviset enterovirusjuosteetkin (ks. yleiskatsaus Harvey ja Schønau, 2006). Riskinä on kuitenkin koetinliuoksen kontaminaatio RNAaseilla ja koettimien pilkkoutuminen. Enterovirusten mutaatioon perustuvan persistointiteorian mukaan enterovirusgenomin 5'-päässä tapahtuu deleetio. Deleetio voi olla 7-49 nukleotidin mittainen (Kim ym., 2005). Mielestäni deleetio voi häiritä merkittävästi 5'-pään proteiineja koodittamattomalle alueelle suunniteltujen koettimien hybridisaatiota ja se voi estää enterovirusdetektioita jopa kokonaan jos koetin on suunniteltu deleetioalueelle.

Tässä työssä käytetty ISH-menetelmä on detektioherkkyydeltään keskinkertainen ja se vastaa ABC-menetelmän detektiotehoa (Taulukko 6, s. 34). Vaikka koetin sisältää 3'-päässään muutamia digoksigeniinileimoja, joihin alkalisella fosfataasilla leimattu vasta-aine kykenee sitoutumaan, ei sen detektioteho välttämättä riitä tunnistamaan persistoivia enterovirusgenomeja haimakudoksesta. ISH:n detektiokynnyksenä pidetään 20 – 50 sekvenssikopiota solua kohden. Detektiokynnystä voidaan tästä merkittävästi vielä parantaa käyttämällä erilaisia epäsuoria signaalinvahvistusmenetelmiä, kuten biotinyylityramidiin perustuvia signaalinvahvistusmenetelmiä (ks. yleiskatsaus Kadkol ym., 1999). Saattaakin olla, että persistoivien enterovirusten genomiluku jää käyttämämme ISH-menetelmän detektiokynnyksen alapuolelle. Tällöin signaalinvahvistusmenetelmät parantaisivat käyttämämme ISH-menetelmän detektioherkkyyttä merkittävästi ja saattaisivat mahdollistaa persistoivien enterovirusten havaitsemisen haimakudoksesta. Myös fluoresenssi *in situ* -hybridisaatio (FISH) -menetelmä toisi lisää herkkyyttä, ja se mahdollistaisi suuremman suurenoksen käytön konfokaalimikroskoopilla.

ISH-tulokseni ihmisen haimakudoksista eivät täysin vahvista immunohistokemiallisilla menetelmillä saatuja enteroviruspositiivisia värjäystuloksia, vaikka haima 6001 -leikkeessä yksi saareke värjäytyi hyvin (Kuva 16a, s. 63). Värjäytyminen rajoittuu solujen sytoplasmaan, eikä sitä näy kaikissa saarekkeen soluissa, mikä lisää löydöksen luotettavuutta. Toisaalta, luotettavuutta laskee se, että kaikki muut saarekkeet ovat täysin negatiivisia ISH:lla, vaikka immunoperoksidaasivärjäyksellä ja immunofluoresenssiin perustuvalla kaksoisvärjäyksellä osoitettiin CAV16-proteiineja useista, mutta ei kaikista leikkeen saarekkeista (Kuva 10, s. 57 ja Kuva 11, s. 58).

Immunovärjäysten luotettavuuden kannalta olisi ensisijaista varmentaa CAV16-detektio tulokset ISH:lla sillä teoriassa enteroviraalisten RNA-genomien tulee kolokalisoitua enteroviraalisten kapsidiproteiinien kanssa samoihin isäntäsoluihin. Tätä ei ole kuitenkaan kyetty osoittamaan *in situ*. Tähän saattaa olla syynä jokin biologinen tekijä, sillä enteroviruspositiivisissa suoli- ja mahabiopsianäytteissä enteroviraaliset nukleiinihapot sekä enteroviraaliset proteiinit lokalisoituvat täysin eri soluihin (Tutkimusryhmän julkaisematon tieto). Voikin olla, että enterovirusdetektio immunohistokemiallisilla menetelmillä on ISH:ta helpompi toteuttaa, sillä enterovirusten elinkierto isäntäsoluissa saattaa tukea IHC-menetelmien ja enterovirusdetektion onnistumista. Mielestäni merkittävän parannuksen enterovirusten detektio tutkimuksiin toisi fluoresenssiin perustuva ISH:n ja IHC:n yhdistelmämenetelmän kehittäminen. Yhdistelmämenetelmällä pystyttäisiin määrittämään enteroviraalisten nukleiinihappojen sekä aminohappojen lokalisaatiota samasta haimaleikkeestä esimerkiksi konfokaalimikroskoopin avulla. Yhdistelmämenetelmät ovat kuitenkin varsin haastavia toteuttaa, koska detektoitavat kohteet vaativat huomattavan erilaiset esikäsittelyolosuhteet.

5.3 β -solujen suhteellisen osuuden määrittäminen

Butlerin ym. (2003) kehittämä menetelmä β -solujen osuuden määrittämiseksi formaliinifikaatulta haimakudosleikkeeltä ei mielestäni anna tarkkaa kuvaa β -solujen osuudesta. Tätä puoltavat myös tulokseni, jotka eri suurennoksilla tehtyjen määritysten mukaan korreloivat vain heikosti keskenään. Butler ym. (2003) ja Meier ym. (2008) ovat tutkimuksissaan käyttäneet nelikertaista suurennusta, joka on liian pieni suurennos erottamaan saarekkeiden sisällä olevat saarekesolut toisistaan riittävällä tarkkuudella. Paremman kuvan β -solujen suhteellisesta pinta-alan osuudesta suhteessa eksokriiniseen kudokseen pinta-alaan saisi käyttäen suurempaa suurennosta, jolloin värjäytyneet solut erottuisivat merkittävästi paremmin.

5.4 Tulosten merkitys

Enterovirusinfektion ja T1D:n välisen epidemiologisen yhteyden osoittaminen on todettu vaikeaksi eikä syy-seuraussuhdetta ole pystytty vielä todistamaan. Viitteitä epidemiologisesta yhteydestä on 1960-luvun loppupuolelta lähtien ja enterovirusten diabetogeeninen riskivaikutus on noussut esiin useissa kliinisissä tutkimuksissa. Vaikka enterovirusia on todettu diabeetikoiden haimakudoksesta *in situ*, ei enterovirusten diabetogeenisyydestä ole varmuutta. Täytyykin muistaa, että enterovirukset tarjoavat vain yhden näkemyksen T1D:n patogeneesin laukaisevista ulkoisista tekijöistä ja etiologialtaan epäselvän T1D:n taustalla saattaa enterovirusten ohella olla useita muitakin tekijöitä. Molekyylibiologisten tutkimusmenetelmien kehittyminen on lisännyt tietoa enterovirusista ja T1D:stä valtavasti, mutta yhä dramaattisesti lisääntyvä T1D on edelleen epäselvä autoimmuunisairaus, jonka taustalla vaikuttavat useat geneettiset ja ulkoiset riskitekijät. Tutkimuksia enterovirusten ja T1D:n epidemiologisesta yhteydestä ovat hidastaneet etenkin riittävän hyvin tutkimuksiin soveltuvien haimanäytteiden pula sekä taudin hitaasti ja oireettomasti etenevä patogeneesi.

Tutkielman tarkoituksena oli lisätä enterovirusdetektioita ihmisen haimakudoksesta. Tutkimukselle asetetut tavoitteet täyttyivät hyvin sillä suunnittelemiemme enteroviruslajispesifisten koettimien käyttö saattaa lisätä enterovirusdetektioita luotettavuutta merkittävästi tulevaisuudessa. Lisäksi enterovirusgenomin eri kohtiin sitoutuvat lajispesifi-

set koettimet erikseen käytettyinä varmentavat detektiotulosta. Lajispesifiset koettimet soveltuvat enterovirusdiagnostiikkaan erinomaisesti, sillä koettimien käyttö samanaikaisesti mahdollistaa enterovirusten seulontamenetelmän, jonka tarkoituksena on kattaa kaikkien enteroviruslajien serotyypit. Tarvittaessa enterovirusten tunnistaminen ISH-menetelmällä voidaan rajata ainoastaan tietyn enteroviruslajin serotyyppeihin käyttämällä vain tietyn enteroviruslajin genomia tunnistavia koettimia. Lajispesifisistä enterovirusvasta-aineista ja enteroviruskoettimista on kirjallisuudessa hyvin vähän tietoa, joten tulosteni pohjalta kyseisten vasta-aineiden ja koettimien kaupallistaminen saattaa olla järkevää. IHC-menetelmällä saadut enteroviruspositiiviset detektiotulokset tulisi aina varmistaa myös muilla kaupallisilla tai omassa laboratorioissa tuotetuilla vasta-aineilla ja itsetuotetut enterovirusvasta-aineet parantaisivat yhdessä kaupallisten enterovirusvasta-aineiden kanssa enterovirusdetektion luotettavuutta merkittävästi. Immunohistokemiallisilla menetelmillä saadut tulokset tukevat vahvasti yleistä käsitystä enterovirusten saarekesoluspesifisyydestä haimakudoksessa. Tulokset CAV16-saarekesolutropismista ovat merkittäviä, sillä siitä ei ole julkaisuja.

Tällä hetkellä enterovirusten ja T1D:n yhteyttä selvittävä tutkimus etenee suurin harppauksin ja ratkaisun avaimet T1D:n patogeenin selvittämiseksi saattavat olla lähellä. Esidiabeettisten haimanäytteiden saatavuus on parantunut merkittävästi prospektiivisten seurantatutkimusten ja kudospankkien avulla. Prospektiiviset tutkimukset ja esidiabeettiset haimanäytteet ovatkin ensiarvoisessa asemassa tulevaisuuden tutkimuksissa, joissa selvitetään T1D:n autoimmuuniprosessin laukaisevia tekijöitä. Tutkimustulosten edelleen tukiessa enterovirusten osuutta T1D:n patogeenisissä, enterovirusrokotteen kehittäminen saattaa pysäyttää yhä globaalisti kiihtyvän T1D:n ilmenemisen ja kääntää sen laskuun. Voikin olla, että tulevaisuuden diabetestutkimusten ja rokotetutkimusten avulla saattaa selkeytyä osin myös muiden etiologialtaan tuntemattomien autoimmuunisairauksien patogeneettisiä syitä.

6 LÄHTEET

Kirjallisuuslähteet:

Abraham, G. ja R.J. Colonno. 1984. Many rhinovirus serotypes share the same cellular receptor. *J. Virol.* 51(2):340-345.

Akerblom, H.K. ja M. Knip. 1998. Putative environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Rev.* 14:31-67.

Akirav, E., J.A. Kushner ja K.C. Herold. 2008. Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone? *Diabetes.* 57(11):2883-2888.

American Diabetes Association. 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1:S55-60.

Andralojc, K.M., A. Mercalli, K.W. Nowak, L. Albarello, R. Calcagno, L. Luzi, E. Bonifacio, C. Doglioni ja L. Piemonti. 2009. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia.* 52(3):486-493.

Arola, A., H. Kalimo, O. Ruuskanen ja T. Hyypiä. 1995. Experimental myocarditis induced by two different coxsackievirus B3 variants: aspects of pathogenesis and comparison of diagnostic methods. *J. Med. Virol.* 47(3):251-259.

Atkinson, M.A., ja R. Gianani. 2009. The pancreas in human type 1 diabetes: providing new answers to age-old questions. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 16(4):279-285.

Balvay, L., R. Soto Rifo, E.P. Ricci, D. Decimo ja T. Ohlmann. 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta.* (9-10):542-557.

Bedard, K.M. ja B.L. Semler. 2004. Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes Infect.* 6(7):702-713.

Belov, G.A. ja E. Ehrenfeld. 2007. Involvement of cellular membrane traffic proteins in poliovirus replication. *Cell Cycle.* Jan 1;6(1):36-38.

Belov, G.A., Q. Feng, K. Nikovics, C.L. Jackson ja E. Ehrenfeld. 2008. A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog.* 4(11):e1000216.

Bendig, J.W., O.M. Franklin, A.K. Hebden, P.J. Backhouse, J.P. Clewley, A.P. Goldman ja N. Piggott. 2003. Coxsackievirus B3 sequences in the blood of a neonate with congenital myocarditis, plus serological evidence of maternal infection. *J. Med. Virol.* 70(4):606-609.

Berger, M.M., D.M. See, B. Redl, M. Aymard ja L. Bruno. 1997. Direct in situ transcriptase polymerase chain reaction for the detection of Enterovirus genome in liver tissues. *J. Virol. Methods.* 65(1):55-66.

Berger, M.M., D.M. See, M. Aymard ja B. Lina. 1998. Demonstration of persistent enterovirus in the pancreas of diabetic mice by in situ polymerase chain reaction. *Clin. Diagn. Virol.* 9(2-3):141-143.

Bettinger, D., C. Mougin, B. Fouqué, B. Kantelip, J.P. Miguét ja M. Lab. 1999. Direct in situ reverse transcriptase-linked polymerase chain reaction with biotinylated primers for the detection of hepatitis C virus RNA in liver biopsies. *J. Clin. Virol.* 12(3):233-241.

Blomqvist, S., A. Paananen, C. Savolainen-Kopra, T. Hovi ja M. Roivainen. 2008. Eight years of experience with molecular identification of human enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 46(7):2410-2413.

- Bobrow, M.N., T.D. Harris, K.J. Shaughnessy ja G.J. Litt. 1989. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods*. 20;125(1-2):279-285.
- Bobrow, M.N., K.J. Shaughnessy ja G.J. Litt. 1991. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J. Immunol. Methods*. 1;137(1):103-112.
- Boenisch, T. 2006. Basic Enzymology. *Teoksessa: Immunohistochemical Staining Methods*, Fourth Edition. Key, M., editor. Dako, Carpinteria, Kalifornia, Yhdysvallat. 19-25.
- Bottazzo, G.F., A. Florin-Christensen ja D. Doniach. 1974. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 30;2(7892):1279-1283.
- Braissant, O. ja W. Wahli. 1998. A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *Biochemica*. 1:10-16.
- Breitschopf, H., G. Suchanek, R.M. Gould, D.R. Colman ja H. Lassmann. 1992. In situ hybridization with digoxigenin-labeled probes: sensitive and reliable detection method applied to myelinating rat brain. *Acta Neuropathol*. 84(6):581-587.
- Buesa-Gomez, J., J.C. de la Torre, T. Dyrberg, M. Landin-Olsson, R.S. Mauseth, A. Lernmark ja M.B. Oldstone. 1994. Failure to detect genomic viral sequences in pancreatic tissues from two children with acute-onset diabetes mellitus. *J. Med. Virol*. 42(2):193-197.
- Butler, A.E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza ja P.C. Butler. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 52(1):102-110.
- Cabrera, O., D.M. Berman, N.S. Kenyon, C. Ricordi, P.O. Berggren ja A. Caicedo. 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 14;103(7):2334-2339.
- Chapman, N.M., K.S. Kim, K.M. Drescher, K. Oka ja S. Tracy. 2008. 5' terminal deletions in the genome of a coxsackievirus B2 strain occurred naturally in human heart. *Virology*. 5;375(2):480-491.
- Chapman, K.M. ja K.S. Kim. 2008. Persistent Coxsackievirus Infection: Enterovirus Persistence in Chronic Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy. *Teoksessa: Group B Coxsackieviruses*. Tracy, S., M.S. Oberste ja K.M. Drescher, editoijat. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 275-292.
- Chehadeh, W., J. Kerr-Conte, F. Pattou, G. Alm, J. Lefebvre, P. Wattré, D. Hober. 2000. Persistent infection of human pancreatic islets by Coxsackie virus B is associated with alpha-interferon synthesis by beta-cells. *J. Virol*. 74:10153-10164.
- Chia, J., A. Chia, M. Voeller, T. Lee ja R. Chang. 2010. Acute enterovirus infection followed by myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) and viral persistence. *J. Clin. Pathol*. 63(2):165-168.
- Christensen, N.K. ja L. Winther. 2006. Multi-Staining Immunohistochemistry. *Teoksessa: Immunohistochemical Staining Methods*, Fourth Edition. Key, M., editor. Dako, Carpinteria, Kalifornia, Yhdysvallat. 61-67.
- Chow, M., J.F. Newman, D. Filman, J.M. Hogle, D.J. Rowlands ja Brown. 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*. 11-17;327(6122):482-486.
- Chu, W.S., Q. Liang, Y. Tang, R. King, K. Wong, M. Gong, M. Wei, J. Liu, S.H. Feng, S.C. Lo, J.A. Andriko ja M. Orr. 2006. Ultrasound-accelerated tissue fixation/processing achieves superior morphology and macromolecule integrity with storage stability. *J. Histochem. Cytochem*. 54(5):503-513.
- Cnop, M., N. Welsh, J.C. Jonas, A. Jörns, S. Lenzen ja D.L. Eizirik. 2005. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*. 2:97-107.

- Cordell, J.L., B. Falini, W.N. Erber, A.K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K.A. Pulford, H. Stein ja D.Y. Mason. 1984. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* 32(2):219-229.
- Das, N.K. ja M. Alfert. 1969. Binding of labeled ribonucleic acid to basic proteins, a major difficulty in ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in fixed cells in situ. *J. Histochem. Cytochem.* 17(6):418-422.
- Desailloud, R., A. Goffard, C. Page, B. Kairis, S. Fronval, D. Chatelain, V. Strunski, A. Dubreuil ja D. Hober. 2009. Detection of enterovirus RNA in postoperative thyroid tissue specimens. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 70(2):331-334.
- Dib, S.A. ja M.B. Gomes. 2009. Etiopathogenesis of type 1 diabetes mellitus: prognostic factors for the evolution of residual beta cell function. *Diabetol. Metab. Syndr.* 4;1(1):25.
- Dotta, F., S. Censini, A.G. van Halteren, L. Marselli, M. Masini, S. Dionisi, F. Mosca, U. Boggi, A.O. Muda, S.D. Prato, J.F. Elliott, A. Covacci, R. Rappuoli, B.O. Roep, ja P. Marchetti. 2007. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:5115-5120.
- Drescher, K.M. ja S.M. Tracy. 2008. The CBV and Etiology of Type 1 Diabetes. *Teoksessa: Group B Coxsackieviruses*. Tracy, S., M.S. Oberste ja K.M. Drescher, editoijat. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 259-274.
- Egger, D. ja K. Bienz. 2005. Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *J. Gen. Virol. (Pt 3)*:707-718.
- Feuer, R., C.M. Ruller, N. An, J.M. Tabor-Godwin, R.E. Rhoades, S. Maciejewski, R.R. Pagarigan, C.T. Cornell, S.J. Crocker, W.B. Kiosses, N. Pham-Mitchell, I.L. Campbell ja J.L. Whitton. 2009. Viral persistence and chronic immunopathology in the adult central nervous system following Coxsackievirus infection during the neonatal period. *J. Virol.* 83(18):9356-9369.
- Filippi, C.M., E.A. Estes, J.E. Oldham ja M.G. von Herrath. 2009. Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. *J. Clin. Invest.* 119(6):1515-1523.
- Flodström, M., A. Maday, D. Balakrishna, M.M. Cleary, A. Yoshimura ja N. Sarvetnick. 2002. Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection. *Nat Immunol.* 3(4):373-382.
- Foulis, A.K., M.A. Farquharson, S.O. Cameron, M. McGill, H. Schönke ja R. Kandolf. 1990. A search for the presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreases of patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes and pancreases and hearts of infants who died of coxsackieviral myocarditis. *Diabetologia.* 33:290-298.
- Foulis, A.K., M. McGill, M.A. Farquharson, D.A. Hilton. 1997. A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia.* 40:53-61.
- Fourlanos, S., C. Perry, M.S. Stein, J. Stankovich, L.C. Harrison ja P.G. Colman. 2006. A clinical screening tool identifies autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care.* 29(5):970-975.
- Gall, J.G. ja M.L. Pardue. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 63(2):378-383.
- Gamble, D.R., M.L. Kinsley, M.G. FitzGerald, R. Bolton ja K.W. Taylor. 1969. Viral antibodies in diabetes mellitus. *BMJ.* 3:627-630.

- Craig, M.E., P. Robertson, N.J. Howard, M. Silink ja W.D. Rawlinson. 2003. Diagnosis of enterovirus infection by genus-specific PCR and enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 41(2):841-844.
- Guesdon, J.L., T. Ternynck ja S. Avrameas. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27(8):1131-1139.
- Gustin, KE. 2003. Inhibition of nucleo-cytoplasmic trafficking by RNA viruses: targeting the nuclear pore complex. *Virus Res.* (1-2):35-44.
- Haase, A.T., E.F. Retzel ja K.A. Staskus. 1990. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87(13):4971-4975.
- Hanafusa, T., A. Miyazaki, J. Miyagawa, S. Tamura, M. Inada, K. Yamada, Y. Shinji, H. Katsura, K. Yamagata, N. Itoh, H. Asakawa, C. Nakagawa, A. Otsuka, S. Kawata, N. Kono ja S. Tarui. 1990. Examination of islets in the pancreas biopsy specimens from newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia.* 33(2):105-111.
- Harjutsalo, V., L. Sjöberg ja J. Tuomilehto. 2008. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet.* 24;371(9626):1777-1782.
- Harvey, R. ja A. Schönau. 2006. In Situ Hybridization. *Teoksessa: Immunohistochemical Staining Methods*, Fourth Edition. Key, M., editor. Dako, Carpinteria, Kalifornia, Yhdysvallat. 89-94.
- Hellen, C.U.T. ja E. Wimmer. 1995. Enterovirus Genetics. *Teoksessa: Human Enterovirus Infections*. Rotbart, H.A., editoija. American Society for Microbiology. Washington, DC. 25-65.
- Henke, A., S. Huber, A. Stelzner ja J.L. Whitton. 1995. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J. Virol.* 69(11):6720-6728.
- Hohenadl, C., K. Klingel, J. Mertsching, P.H. Hofschneider ja R. Kandolf. 1991. Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol. Cell. Probes.* 5:11-20.
- Horwitz, M.S., L.M. Bradley, J. Harbertson, T. Krahl, J. Lee ja N. Sarvetnick. 1998. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat. Med.* 4(7):781-785.
- Hsu, S.M., L. Raine ja H. Fanger. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29(4):577-580.
- Hultcrantz, M., M.H. Hühn, M. Wolf, A. Olsson, S. Jacobson, B.R. Williams, O. Korsgren ja M. Flodström-Tullberg. 2007. Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cells. *Virology.* 10;367(1):92-101.
- Hyppönen, E., S.M. Virtanen, M.G. Kenward, M. Knip ja H.K. Akerblom; Childhood Diabetes in Finland Study Group. 2000. Obesity, increased linear growth, and risk of type 1 diabetes in children. *Diabetes Care.* 23(12):1755-1760.
- Hyttinen, V., J. Kaprio, L. Kinnunen, M. Koskenvuo ja J. Tuomilehto. 2003. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes.* 52(4):1052-1055.
- Hyöty, H. ja K. W. Taylor. 2002. The role of viruses in human diabetes. Yleiskatsaus. *Diabetologia.* 45:1353-1361.
- Härkönen, T., M. Puolakkainen, M. Sarvas, U. Airaksinen, T. Hovi, ja M. Roivainen. 2000. Picornavirus proteins share antigenic determinants with heat shock proteins 60/65. *J. Med. Virol.* 62:383-391.

- Härkönen, T., H. Lankinen, B. Davydova, T. Hovi ja M. Roivainen. 2002. Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J. Med. Virol.* 66:340-350.
- Härkönen, T., A. Paananen, H. Lankinen, T. Hovi, O. Vaarala ja M. Roivainen. 2003. Enterovirus infection may induce humoral immune response reacting with islet cell autoantigens in humans. *J. Med. Virol.* 69(3):426-440.
- Höfler, H. 1993. In situ polymerase chain reaction: toy or tool? *Histochemistry.* 99(2):103-104.
- Imagawa, A., T. Hanafusa, S. Tamura, M. Moriwaki, N. Itoh, K. Yamamoto, H. Iwahashi, K. Yamagata, M. Waguri, T. Nanmo, S. Uno, H. Nakajima, M. Namba, S. Kawata, J.L. Miyagawa ja Y. Matsuzawa. 2001. Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes.* 2001. 50(6):1269-1273.
- Itoh, N., T. Hanafusa, A. Miyazaki, J. Miyagawa, K. Yamagata, K. Yamamoto, M. Waguri, A. Imagawa, S. Tamura, M. Inada, S. Kawata, S. Tarui, N. Kono ja Y. Matsuzawa. 1993. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J. Clin. Invest.* 92(5):2313-2322.
- Jacobson, S.J., D.A. Konings ja P. Sarnow. 1993. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J. Virol.* (6):2961-2971.
- Jäidane, H. ja D. Hober. 2008. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* 34(6 Pt 1):537-548.
- Jeong, S.Y., J. Ahn, Y.J. Cho, Y.J. Kim, D.S. Kim, Y. Jee, H. Lee ja J.H. Nam. 2007. Production of cross-reactive peptide antibodies against viral capsid proteins of human enterovirus B to apply diagnostic reagent. *Microbiol. Immunol.* 51(11):1091-1098.
- Julien, J., I. Leparac-Goffart, B. Lina, F. Fuchs, S. Foray, I. Janatova, M. Aymard ja H. Kopecka. 1999. Post-polio syndrome: poliovirus persistence is involved in the pathogenesis. *J. Neurol.* 246(6):472-476.
- Kadkol, S.S., W.R. Gage ja G.R. Pasternack. 1999. In situ hybridization-theory and practice. *Mol. Diagn.* 4(3):169-183.
- Kaprio, J., J. Tuomilehto, M. Koskenvuo, K. Romanov, A. Reunanen, J. Eriksson, J. Stengård ja Y.A. Kesäniemi. 1992. Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia.* 35(11):1060-1067.
- Kares, S., M. Lönnrot, P. Vuorinen, S. Oikarinen, S. Taurianen ja H. Hyöty. 2004. Real-time PCR for rapid diagnosis of entero- and rhinovirus infections using LightCycler. *J. Clin. Virol.* 29(2):99-104.
- Krafft, A.E., B.W. Duncan, K.E. Bijwaard, J.K. Taubenberger ja J.H. Lichy. 1997. Optimization of the Isolation and Amplification of RNA From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue: The Armed Forces Institute of Pathology Experience and Literature Review. *Mol. Diagn.* 2(3):217-230.
- Kawashima, H., T. Ihara, H. Ioi, S. Oana, S. Sato, N. Kato, T. Takami, Y. Kashiwagi, K. Takekuma, A. Hoshika ja T. Mori. 2004. Enterovirus-related type 1 diabetes mellitus and antibodies to glutamic acid decarboxylase in Japan. *J. Infect.* 2004. 49(2):147-151.
- Kim, K.-S., S. Tracy, W. Tappich, J. Bailey, C.K. Lee, K. Kim, W.H. Barry ja N.M. Chapman. 2005. 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J. Virol.* 79(11):7024-7041.

- Klingel, K., C. Hohenadl, A. Canu, M. Albrecht, M. Seemann, G. Mall ja R. Kandolf. 1992. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1;89(1):314-318.
- Klingel, K., S. Stephan, M. Sauter, R. Zell, B.M. McManus, B. Bültmann ja R. Kandolf. 1996. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J. Virol.* 70(12):8888-8895.
- Klöppel, G., C.R. Drenck, A. Carstensen ja P.U. Heitz. 1984. The B cell mass at the clinical onset of type I diabetes. *Behring Inst. Mitt.* (75):42-49.
- Komminoth, P. ja M. Werner. 1997. Target and signal amplification: approaches to increase the sensitivity of in situ hybridization. *Histochem. Cell Biol.* 108(4-5):325-333.
- Kyvik, K.O., A. Green ja H. Beck-Nielsen. 1995. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ.* 311(7010):913-917.
- Lönnrot, M., M. Sjöroos, K. Salminen, M. Maaronen, T. Hyypiä ja H. Hyöty. 1999. Diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections by RT-PCR and time-resolved fluorometry with lanthanide chelate labeled probes. *J. Med. Virol.* 59(3):378-384.
- MacCuish, A.C., W.J. Irvine, E.W. Barnes ja L.J. Duncan. 1974. Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet.* 28;2(7896):1529-1531.
- Masuda, N., T. Ohnishi, S. Kawamoto, M. Monden ja K. Okubo. 1999. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res.* 27(22):4436-4443.
- Mehers, K.L. ja K.M. Gillespie. 2008. The genetic basis for type 1 diabetes. *Br. Med. Bull.* 88(1):115-1129.
- Meier, J.J., A.E. Butler, Y. Saisho, T. Monchamp, R. Galassol, A. Bhushanl, R.A. Rizza ja P.C. Butler. 2008. Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes.* 57:1584-1594.
- Miao, L.Y., C. Pierce, J. Gray-Johnson, J. DeLotell, C. Shaw, N. Chapman, E. Yeh, D. Schnurr ja Y.T. Huang. 2009. Monoclonal antibodies to VP1 recognize a broad range of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 47(10):3108-3113.
- Mizuno, T., H. Nagamura, K.S. Iwamoto, T. Ito, T. Fukuhara, M. Tokunaga, S. Tokuoka, K. Mabuchi ja T. Seyama. 1998. RNA from decades-old archival tissue blocks for retrospective studies. *Diagn. Mol. Pathol.* 7(4):202-208.
- Morens, D.M. ja M.A. Pallansch. 1995. Epidemiology. Yleiskatsaus. *Teoksessa: Human Enterovirus Infections.* Rotbart, H.A., editoija. American Society for Microbiology. Washington, DC. 3-24.
- Muckelbauer, J.K., M. Kremer, I. Minor, L. Tong, A. Zlotnick, J.E. Johnson ja M.G. Rossmann. 1995. Structure determination of coxsackievirus B3 to 3.5 Å resolution. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 51(Pt 6):871-887.
- Muir, P., F. Nicholson, M.K. Sharief, E.J. Thompson, N.J. Cairns, P. Lantos, G.T. Spencer, H.J. Kaminski ja J.E. Banatvala. 1995. Evidence for persistent enterovirus infection of the central nervous system in patients with previous paralytic poliomyelitis. *Ann. N Y Acad. Sci.* 25;753:219-232.
- Murray, K.E., ja D.J. Barton. 2003. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* (8):4739-4750.
- Nairn, C., D.N. Galbraith, K.W. Taylor ja G.B. Clements. 1999. Enterovirus variants in the serum of children at the onset of Type 1 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 16(6):509-513.

- Nakane, P.K., G.B. Jr. Pierce. 1966. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14(12):929-931.
- Nuovo, G.J. 1996a. The foundations of successful RT in situ PCR. *Front Biosci.* 1;1:c4-15.
- Nuovo, G.J. 1996b. Detection of viral infections by in situ PCR: theoretical considerations and possible value in diagnostic pathology. *J. Clin. Lab. Anal.* 10(6):335-349.
- Nuovo, G.J. 2008. In situ detection of precursor and mature microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and cell preparations. *Methods.* 44(1):39-46.
- Nuovo, G.J., E.J. Lee, S. Lawler, J. Godlewski ja T. Schmittgen. 2009. In situ detection of mature microRNAs by labeled extension on ultramer templates. *Biotechniques.* 46(2):115-126.
- Oberste, M.S., K. Maher, D.R. Kilpatrick ja M.A. Pallansch. 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941-1948.
- Oberste, M.S., S.M. Michele, K. Maher, D. Schnurr, D. Cisterna, N. Junttila, M. Uddin, J.J. Chomel, C.S. Lau, W. Ridha, S. al-Busaidy, H. Nordner, L.O. Magnus ja M.A. Pallansch. 2004a. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* 85:3205-3212.
- Oberste, M.S., S. Penaranda, K. Maher K ja M.A. Pallansch. 2004b. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J. Gen. Virol.* 85:1597-1607.
- Oberste, M.S., S. Penaranda ja M.A. Pallansch. 2004c. RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J. Virol.* 78:2948-2955.
- Oikarinen, M., S. Tauriainen, T. Honkanen, S. Oikarinen, K. Vuori, K. Kaukinen, I. Rantala, M. Mäki ja H. Hyöty. 2007. Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. *Clin. Exp. Immunol.* 151:71-75.
- Oikarinen, M., S. Tauriainen, T. Honkanen, K. Vuori, P. Karhunen, C. Vasama-Nolvi, S. Oikarinen, C. Verbeke, G.E. Blair, I. Rantala, J. Ilonen, O. Simell, M. Knipp ja H. Hyöty. 2008. Analysis of pancreas tissue in a child positive for islet cell antibodies. *Diabetologia.* 51:1796-1802.
- Oikarinen, M., S. Tauriainen, P. Penttilä, J. Keim, I. Rantala, T. Honkanen ja H. Hyöty. 2010. Evaluation of immunohistochemistry and in situ hybridization methods for the detection of enteroviruses using infected cell culture samples. *J. Clin. Virol.* 47(3):224-228.
- Onkamo, P., S. Väänänen, M. Karvonen ja J. Tuomilehto. 1999. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia.* 42(12):1395-1403.
- Palacios, G. ja M.S. Oberste. 2005. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J. Neurovirol.* 11(5):424-433.
- Pallansch, M. ja R. Roos. 2007. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. *Teoksessa: Fields Virology. Fifth Edition, Volume one.* Fields, B.N., D.M. Knipe, P.M. Howley ja D.E. Griffin, editoijat. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Philadelphia, U.S.A. 839-894.
- Palmenberg, A.C. 1982. In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures. *J. Virol.* 44(3):900-906.
- Pathak, H.B., H.S. Oh, I.G. Goodfellow, J.J. Arnold ja C.E. Cameron. 2008. Picornavirus genome replication: roles of precursor proteins and rate-limiting steps in oriI-dependent VPg uridylylation. *J. Biol. Chem.* (45):30677-30688.

- Pietropaolo, M., S. Yu, I.M. Libman, S.L. Pietropaolo, K. Riley, R.E. LaPorte, A.L. Drash, S. Mazumdar, M. Trucco ja D.J. Becker. 2005. Cytoplasmic islet cell antibodies remain valuable in defining risk of progression to type 1 diabetes in subjects with other islet autoantibodies. *Pediatr. Diabetes*. 6(4):184-192.
- Piqueur, M.A., W.A. Verstrepen, P. Bruynseels ja A.H. Mertens. 2009. Improvement of a real-time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Viol. J.* 7;6:95.
- Priest, P.C. 2009. Causal interpretation requires appropriate study design. *Diabetologia*. 52(7):1451; 1452-1453.
- Racaniello, V.R. 2007. *Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. Teoksessa: Fields Virology*. Fifth Edition, Volume one. Fields, B.N., D.M. Knipe, P.M. Howley ja D.E. Griffin, editoijat. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. Philadelphia, U.S.A. 796-837.
- Rahier, J., R.M. Goebbels ja J.C. Henquin. 1983. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia*. 24(5):366-371.
- Ramos-Vara, J.A. ja M.A. Miller. 2006. Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION+ and ImmPRESS. *J. Microsc.* 224(Pt 2):135-139.
- Redline, R.W., D.R. Genest ja B. Tycko. 1991. Detection of enteroviral infection in paraffin-embedded tissue by the RNA polymerase chain reaction technique. *Am. J. Clin. Pathol.* 96(5):568-571.
- Richardson, S.J., A. Willcox, A. J. Bone, A.K. Foulis ja N.G. Morgan. 2009. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 52:1143-1151.
- Richer, M.J., N. Straka, D. Fang, I. Shanina ja M.S. Horwitz. 2008. Regulatory T-cells protect from type 1 diabetes after induction by coxsackievirus infection in the context of transforming growth factor-beta. *Diabetes*. 57(5):1302-1311.
- Richer, M.J. ja M.S. Horwitz. 2009a. Coxsackievirus infection as an environmental factor in the etiology of type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 8(7):611-615.
- Richer, M.J. ja M.S. Horwitz. 2009b. Preventing viral-induced type 1 diabetes. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1173:487-492.
- Roivainen, M., S. Rasilainen, P. Ylipaasto, R. Nissinen, J. Ustinov, L. Bouwens, D.L. Eizirik, T. Hovi ja T. Otonkoski. 2000. Mechanisms of coxsackievirus induced damage to human pancreatic beta cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:1-9.
- Roivainen, M., P. Ylipaasto, C. Savolainen, J. Galama, T. Hovi ja T. Otonkoski. 2002. Functional impairment and killing of human beta cells by enteroviruses: the capacity is shared by a wide range of serotypes, but the extent is a characteristic of individual virus strains. *Diabetologia*. 45(5):693-702.
- Roivainen, M. ja K. Klingel. 2009. Role of enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. Yleiskatsaus. *Diabetologia*. 52(6):995-996.
- Sabattini, E., K. Bisgaard, S. Ascani, S. Poggi, M. Piccioli, C. Ceccarelli, F. Pieri, G. Fraternali-Orcioni ja S.A. Pileri. 1998. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J. Clin. Pathol.* 51(7):506-511.
- Saisho, Y., A.E. Butler, J.J. Meier, T. Monchamp, M. Allen-Auerbach, R.A. Rizza ja P.C. Butler. 2007. Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clin. Anat.* 20(8):933-942.

- Salminen, K., K. Sadeharju, M. Lönnrot, P. Vähäsalo, A. Kupila, S. Korhonen, J. Ilonen, O. Simell, M. Knip ja H. Hyöty. 2003. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J. Med. Virol.* 69(1):91-98.
- Santti, J., R. Vainionpää ja T. Hyypiä. 1999. Molecular detection and typing of human picornaviruses. *Virus Res.* 62(2):177-183.
- Samuelson, A., M. Forsgren ja M. Sällberg. 1995. Characterization of the recognition site and diagnostic potential of an enterovirus group-reactive monoclonal antibody. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2(3):385-386.
- Sayama, K., A. Imagawa, K. Okita, S. Uno, M. Moriwaki, J. Kozawa, H. Iwahashi, K. Yamagata, S. Tamura, Y. Matsuzawa, T. Hanafusa, J. Miyagawa ja I. Shimomura. 2005. Pancreatic beta and alpha cells are both decreased in patients with fulminant type 1 diabetes: a morphometrical assessment. *Diabetologia.* 2005. 48(8):1560-1564.
- Scicchitano, M.S., D.A. Dalmas, M.A. Bertiaux, S.M. Anderson, L.R. Turner, R.A. Thomas, R. Mirable ja R.W. Boyce. 2006. Preliminary comparison of quantity, quality, and microarray performance of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded, and unfixed frozen tissue samples. *J. Histochem. Cytochem.* 54(11):1229-1237.
- Schulte, B.M., J. Bakkers, K.H. Lanke, W.J. Melchers, C. Westerlaken, W. Allebes, H.J. Aanstoot, G.J. Bruining, G.J. Adema, F.J. Van Kuppeveld ja J.M. Galama. 2010. Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients beyond the stage of acute infection. *Viral Immunol.* 23(1):99-104.
- Shibasaki, S., A. Imagawa, S. Tauriainen, M. Iino, M. Oikarinen, H. Abiru, K. Tamaki, H. Seino, K. Nishi, I. Takase, Y. Okada, S. Uno, Y. Murase-Mishiba, J. Terasaki, H. Makino, I. Shimomura, H. Hyöty ja T. Hanafusa. 2010. Expression of toll-like receptors in the pancreas of recent-onset fulminant type 1 diabetes. *Endocr. J.* 2;57(3):211-219.
- Shimizu, H., D.P. Schnurr ja J.C. Burns. 1994. Comparison of methods to detect enteroviral genome in frozen and fixed myocardium by polymerase chain reaction. *Lab. Invest.* 71(4):612-616.
- Seissler, J. ja W.A. Scherbaum. 2006. Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med.* 44(2):133-137.
- Silvestri, L.S., J.M. Parilla, B.J. Morasco, S.A. Ogram ja J.B. Flanagan. 2006. Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3' poly(A) tail. *Virology.* (2):509-519.
- Steinhoff, M., H. Hesse, B. Göke, A. Steinhoff, R. Eissele ja E.P. Slater. 2001. Indirect RT-PCR in-situ hybridization: a novel non-radioactive method for detecting glucose-dependent insulinotropic peptide. *Regul. Pept.* 2;97(2-3):187-194.
- Sternberger, L.A., P.H. Jr. Hardy, J.J. Cuculis ja H.G. Meyer. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18(5):315-333.
- Strebelow, M., M. Schlosser, B. Ziegler, I. Rjasanowski ja M. Ziegler. 1999. Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9419 schoolchildren. *Diabetologia.* 42(6):661-670.
- Sunami, E., H. Kanazawa, H. Hashizume, M. Takeda, K. Hatakeyama ja T. Ushiki. 2001. Morphological characteristics of Schwann cells in the islets of Langerhans of the murine pancreas. *Arch. Histol. Cytol.* 64(2):191-201.

- Tam, P.E. ja R.P. Messner. 1999. Molecular mechanisms of Coxsackie virus persistence in chronic inflammatory myopathy: viral RNA persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J. Virol.* 73:10113-10121.
- Tauriainen, S., K. Salminen ja H. Hyöty. 2003. Can enteroviruses cause type 1 diabetes? *Ann. N Y Acad. Sci.* 1005:13-22.
- Tauriainen, S., S. Oikarinen, M. Oikarinen ja H. Hyöty. 2010. Enteroviruses in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Semin Immunopathol.* Apr. 28.
- Tebruegge, M. ja N. Curtis. 2009. Enterovirus infections in neonates. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 14(4):222-227.
- TEDDY Study Group. 2008. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1150:1-13.
- Terletskaia-Ladwig, E., S. Meier, R. Hahn, M. Leinmüller, F. Schneider ja M. Enders. 2008. A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR. *J. Med. Microbiol.* 57(Pt 8):1000-1006.
- Trabelsi, A., F. Grattard, M. Nejmeddine, M. Aouni, T. Bourlet ja B. Pozzetto. 1995. Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 33(9):2454-2457.
- Tracy, S., K.M. Drescher, N.M. Chapman, K.S. Kim, S.D. Carson, S. Pirruccello, P.H. Lane, J.R. Romero ja J.S. Leser. 2002. Toward testing the hypothesis that group B coxsackieviruses (CVB) trigger insulin-dependent diabetes: inoculating nonobese diabetic mice with CVB markedly lowers diabetes incidence. *J. Virol.* 76(23):12097-12111.
- Truswell, A.S. 2005. The A2 milk case: a critical review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59(5):623-631.
- VanGuilder, H.D., K.E. Vrana ja W.M. Freeman. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques.* 44(5):619-626.
- Walboomers, J.M., W.J. Melchers, H. Mullink, C.J. Meijer, A. Struyk, W.G. Quint, J. van der Noordaa ja J. ter Schegget. 1988. Sensitivity of in situ detection with biotinylated probes of human papilloma virus type 16 DNA in frozen tissue sections of squamous cell carcinomas of the cervix. *Am. J. Pathol.* 131(3):587-594.
- Weber, F., V. Wagner, N. Kessler ja O. Haller. 2006. Induction of interferon synthesis by the PKR-inhibitory VA RNAs of adenoviruses. *J. Interferon Cytokine Res.* 26(1):1-7.
- Weidman, M.K., R. Sharma, S. Raychaudhuri, P. Kundu, W. Tsai ja A. Dasgupta. 2003. The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res.* (1-2):75-85.
- Wenzlau, J.M., K. Juhl, L. Yu, O. Moua, S.A. Sarkar, P. Gottlieb, M. Rewers, G.S. Eisenbarth, J. Jensen, H.W. Davidson ja J.C. Hutton. 2007. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 23;104(43):17040-17045.
- Wieder, R. ja J.G. Wetmur. 1982. Factors affecting the kinetics of DNA reassociation in phenol-water emulsion at high DNA concentrations. *Biopolymers.* 21(3):665-677.
- Woodall, C.J., N.J. Watt ja G.B. Clements. 1993. Simple technique for detecting RNA viruses by PCR in single sections of wax embedded tissue. *J. Clin. Pathol.* 46(3):276-277.
- Xi, Y., G. Nakajima, E. Gavin, C.G. Morris, K. Kudo, K. Hayashi ja J. Ju. 2007. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA.* 13(10):1668-1674.

Yin, H., A.K. Berg, T. Tuvemo ja G. Frisk. 2002. Enterovirus RNA is found in peripheral blood mononuclear cells in a majority of type 1 diabetic children at onset. *Diabetes*. 51(6):1964-1971.

Ylipaasto, P., K. Klingel, A.M. Lindberg, T. Otonkoski, R. Kandolf, T. Hovi ja M. Roivainen. 2004. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia*. 47:225-239.

Yoon, J.W., M. Austin, T. Onodera, A.L. Notkins. 1979. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *Neagl. J. Med.* 300:1173-1179.

Yousef, G.E., I.N. Brown, J.F. Mowbray. 1987. Derivation and biochemical characterization of an enterovirus group-specific monoclonal antibody. *Intervirology*. 28:163-170.

Zanone, M.M., E. Favaro, E. Ferioli, G.C. Huang, N.J. Klein, P.C. Perin, M. Peakman, P.G. Conaldi ja G. Camussi. 2007. Human pancreatic islet endothelial cells express coxsackievirus and adenovirus receptor and are activated by coxsackie B virus infection. *FASEB. J.* 21(12):3308-3317.

Zhang, H., Y. Li, T. Peng, M. Aasa, L. Zhang, Y. Yang ja L.C. Archard. 2000. Localization of enteroviral antigen in myocardium and other tissues from patients with heart muscle disease by an improved immunohistochemical technique. *J. Histochem. Cytochem.* 48(5):579-584.

Internet -lähteet:

Lite, J. 2009. Diabetics insulin-free after stem-cell transplants. *Sci Am*. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com): <http://www.scientificamerican.com/blog/60-second-science/post.cfm?id=diabetics-insulin-free-after-stem-c-2009-04-14>. Päivitetty: 14.4.2009. Viitattu: 14.02.2010.

Sigma-Aldrich, Inc. 2007. SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets. Datasheet. Saatavilla PDF-muodossa: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/3/d4418dat.Par.0001.File.tmp/d4418dat.pdf>. Viitattu: 11.01.2010.

Sigma-Aldrich, Inc. 2010. Formamide. Datasheet. Saatavilla [www-muodossa](http://www.muodossa.com): http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F9037|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC. Viitattu: 16.02.2010.

Vector Laboratories. 2005. A Guide to Multiple Antigen Labeling. Saatavilla PDF-muodossa: <http://www.vectorlabs.com/data/descriptions/pdf/MLB.pdf>. Viitattu: 11.01.2010.

LIITTEET

Liite 1 Immunoperoksidaasivärjäyksessä käytetty värjäysohjelma

Taulukko 1: BenchMark® LT -värjäysohjelma CAV16-, CBV3- ja Echo11 -vasta-aineille.

1. ***EZ Prepin valinta***	41. Long Cell Conditioner -liuoksen lisäys
2. ***Ajastettujen vaiheiden aloitus***	42. Nestemäisen peitinkalvon lisäys
3. ***Sekoittajat pysähdyksissä***	43. Long Cell Conditioner -liuoksen lisäys
4. Leikkeen lämmitys 75 °C, inkubointi 4 min.	44. Nestemäisen peitinkalvon lisäys
5. EZ Prep -liuoksen lisäys	45. Inkubointi 4 min.
6. Inkubointi 4 min.	46. Huuhtelu
7. Huuhtelu	47. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
8. EZ Prep -liuoksen lisäys	48. Nestemäisen peitinkalvon lisäys
9. Inkubointi 4 min.	49. ***Reaktiopuskurin valinta***
10. Huuhtelu	50. Leikkeen lämmitys 37 °C, inkubointi 2 min.
11. EZ Prep -liuoksen lisäys	51. Huuhtelu
12. Nestemäisen peitinkalvon lisäys	52. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
13. Leikkeen lämmitys 75 °C, inkubointi 4 min.	53. UV –inhibiittorin lisäys, tippa. Nestemäisen peitinkalvon lisäys ja inkubointi 4 min.
14. Huuhtelu	54. Huuhtelu
15. Depar Volume Adjust -lisäys	55. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
16. Nestemäisen peitinkalvon lisäys	56. Nestemäisen peitinkalvon lisäys
17. Leikkeenlämmittäjän poistaminen	57. Primäärivasta-aineiden käsin lisäys. Inkubointi 30 min.
18. ***Sekoittajien aktivoituminen***	58. Huuhtelu
19. *** 8 min. käsittely (liuosten sekoitus)***	59. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
20. Huuhtelu	60. UV HRP UNIV MULT –vasta-aineiden lisäys. Tippa. Nestemäisen peitinkalvon lisäys ja inkubointi 8 min.
21. Cell Conditioner -liuoksen lisäys (lyhyesti)	61. Huuhtelu
22. CC Long nestemäisen peitinkalvon lisäys	62. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
23. Leikkeen kuumennus 94 °C, inkubointi 8 min.	63. Nestemäisen peitinkalvon lisäys
24. *** 30 min. käsittely (liuosten sekoitus)***	64. Huuhtelu
25. Cell Conditioner -liuoksen lisäys	65. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
26. CC Long nestemäisen peitinkalvon lisäys	66. UV DAB ja UV DAB H ₂ O ₂ –liuosten lisäys. Molempia tippa. Nestemäisen peitinkalvon lisäys ja inkubointi 8 min.
27. Leikkeen kuumennus 95 °C, inkubointi 4 min.	67. Huuhtelu
28. Nestemäisen peitinkalvon lisäys	68. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
29. Cell Conditioner -liuoksen lisäys	69. UV COPPER –liuoksen lisäys. Tippa. Nestemäisen peitinkalvon lisäys ja inkubointi 4 min.
30. Inkubointi 4 min.	70. Huuhtelu
31. Nestemäisen peitinkalvon lisäys	71. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
32. EZ Prep CC liuoksen -lisäys	72. Nestemäisen peitinkalvon lisäys
33. Inkubointi 4 min.	73. ***Ajastettujen vaiheiden aloitus***
34. Nestemäisen peitinkalvon lisäys	74. Huuhtelu
35. Cell Conditioner -liuoksen lisäys	75. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
36. Inkubointi 4 min.	76. Hematoksyliinin lisäys. Tippa. Nestemäisen peitinkalvon lisäys ja inkubointi 4 min.
37. Nestemäisen peitinkalvon lisäys	77. Huuhtelu
38. Cell Conditioner -liuoksen lisäys	78. ***Leikkeen tilavuuden arvio***
39. Inkubointi 4 min.	79. Bluing Reagent –liuoksen lisäys. Tippa. Nestemäisen peitinkalvon lisäys ja inkubointi 4 min.
40. Leikkeen lämmittäjän poistaminen	80. Huuhtelu

Liite 2 Kudosprosessointiohjelmat

Taulukko 2. Kudosprosessointi suurille kudospaloille (Ihmisen haimakudospalat). Kudospalat olivat fiksaatiivissa vuorokauden ajan (1440 min.).

<i>Asema</i>	<i>Liuos</i>	<i>Pitoisuus %</i>	<i>Aika min.</i>	<i>Lämpötila °C</i>
1	Formaliini	10	1440	RT
2	Etanoli	70	60	RT
3	Etanoli	80	60	RT
4	Etanoli	94	60	RT
5	Etanoli	94	60	RT
6	Etanoli	100	60	RT
7	Etanoli	100	60	RT
8	Etanoli	100	60	RT
9	Ksyleeni	100	60	RT
10	Ksyleeni	100	60	RT
11	Parafiini		60	60
12	Parafiini		60	60
13	Parafiini		60	60
14	Parafiini		60	60

RT = Huoneenlämpö

Taulukko 3. Pikaprosessointi pienille kudospaloille. (Hiiren kudospalat). Kudospalat olivat fiksaatiivissa vuorokauden ajan (1440 min.).

<i>Asema</i>	<i>Liuos</i>	<i>Pitoisuus %</i>	<i>Aika min.</i>	<i>Lämpötila °C</i>
1	Formaliini	10	1440	RT
2	Etanoli	70	9	RT
3	Etanoli	80	9	37
4	Etanoli	94	15	RT
5	Etanoli	94	15	RT
6	Etanoli	100	15	37
7	Etanoli	100	25	RT
8	Ksyleeni	100	15	37
9	Ksyleeni	100	20	RT
10	Parafiini		30	60
11	Parafiini		30	60

RT = Huoneenlämpö