

Pauliina Tryykilä

Jyväskylän yliopisto

Biotekniikka 2008

EPSTEIN-BARR VIRUKSEN NUKLEAARISEN ANTIGEENIN (EBNA1) KLOONAUUS
BAKULOVIRUSVEKTORIIN

ALKUSANAT

Tämä työ tehtiin Jyväskylän yliopiston bio- ja ympäristötieteiden laitoksen biotekniikan osastolla vuoden 2002 aikana. Haluan osoittaa sydämelliset kiitokset lukuisista neuvoista ja mukavasta ilmapiiristä professori Christian Oker-Blomille, tutkijoille Kirsi Ojalalle, Heli Matilaiselle, Tomi Lahtiselle ja Leona Gilbertille. Erityisesti haluan kiittää Pro gradu-työtäni ohjannutta Patrik Micheliä, jonka johdolla sain tutustua bakulovirusten maailmaan

Työn kirjoitusosuus ajoittui vasta vuodelle 2007, jolloin tauon jälkeen jatkoin pitkään keskeytyneenä olleita opintojani. Kiitos Krickelle, Patrikille sekä Anna Mäkelälle siitä, että vielä näinkin monen tauon jälkeen sain kannustusta ja ohjausta opinnäytetyön tekoon.

Turussa 7. helmikuuta 2008

Pauliina Tryykilä

Jyväskylän yliopisto

Pro gradu –tutkielman tiivistelmä

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Tekijä: Pauliina Tryykilä

Tutkielman nimi: Epstein-Barr viruksen nukleaarisen antigeenin (EBNA1) kloonaukseen baculovirusvektoriin

English title: Cloning of Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1) into a baculovirus vector

Päivämäärä: 7.2.2008

Sivumäärä: 61+6

Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Oppiaine: Biotekniikka

Tutkielman ohjaajat: Christian Oker-Blom, Patrik Michel

Tiivistelmä:

Epstein-Barr virus (EBV) on gamma-ryhmään kuuluva ihmisen herpesvirus, joka on infektoinut yli 90 % maailman väestöstä. EBV aiheuttaa pääasiassa infektiivistä mononukleoosia, mutta se on osallisena myös monien syöpien synnyssä. Epstein-Barr viruksen tumallinen antigeeni 1 (EBNA1) on välttämätön viruksen lisääntymiselle sekä EBV genomien ylläpidolle latentisti infektoituneissa B-lymfosyyteissä. Kyseisellä proteiinilla epäillään olevan merkittävä rooli tiettyjen syöpätyyppien synnyssä. EBNA1 vasta-aineita löytyy suurimmalta osalta EBV:n kantajista ja sillä on diagnostista merkitystä, joten sen tuotto on perusteltua. Tämän tutkimuksen tarkoitus oli kehittää rekombinantti bakulovirus, jolla EBNA1 proteiinin tuotto hyönteissoluissa olisi mahdollista.

Kohdeproteiiniin liitettiin polyhistidiinihantä (6xHis) metalliaffiniteettikromatografiapuhdistusta (IMAC) silmälläpitäen. Polyhistidiinihännällinen EBNA1-proteiinin geeni siirrettiin *Autographa californica* multiple polyhedroviruksen (AcMNPV) genomiin käyttäen Bac-to-Bac[®] expressiosysteemiä.

EBNA1 proteiinin tuoton onnistumista hyönteissoluissa seurattiin immunoblotauksella.

Käytetyt menetelmät: DNA:n eristys, PCR, agarosigeelielektroforeesi, DNA digestio ja ligaatio, plasmidien transformaatio, pesäke-PCR, plasmidien monistaminen ja puhdistus, Bacmid-DNA:n tuotto ja eristys, SDS-PAGE, immunoblotaus.

Author: Pauliina Tryykilä
Title of thesis: Cloning of Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1) into a baculovirus vector
Finnish title: Epstein-Barr viruksen nukleaarisen antigeenin (EBNA1) kloonaus baculovirusvektoriin
Date: 7.2.2008 **Pages:** 61+6

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Biotechnology
Supervisors: Christian Oker-Blom, Patrik Michel

Abstract:

Epstein-Barr virus (EBV), a gamma –human herpesvirus infecting more than 90 % of the world population, is the causative agent of infectious mononucleosis. The Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1) is essential for replication and maintenance of EBV genomes in latently infected B-lymphocytes. EBNA1 is also suggested to be oncogenic and antibodies to EBNA1 are abundantly detected in serum of most EBV carriers. There is an interest in producing the EBNA1 protein as it could be used in diagnostics. The aim of this study was to construct a recombinant baculovirus encoding the expression of EBNA1 proteins in insect cells.

EBNA1 protein was produced in insect cell culture and purified by using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). In that method, metal ion chromatography matrix binds to the polyhistidine affinity tag in target protein. The polyhistidine affinity tag (6xHis) was fused into EBNA1 protein, and this fusion protein was transferred into *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) genome using Bac-to-Bac® expression system.

The success of the EBNA1 expression in insect cells using these constructs was confirmed by immunoblotting.

Methods: DNA isolation, PCR, agarose gel electrophoresis, digestion and ligation of DNA, plasmid transformation, colony-PCR, amplification and purification of plasmids, Bacmid-DNA, SDS-PAGE, immunoblotting.

LYHENTEET

EBV	Epstein-Barr virus
HHV4	Human Herpesvirus 4, Epstein-Barr virus
EBNA1	Epstein-Barr viruksen nukleaarinen antigeeni 1
BL	Burkittin lymfooma
HD	Hodgkinin sairaus
NPC	Nasopharyngeal carcinoma, nenänielun syöpä
VCA	Virus capsid antigen, viruksen kapsidiproteiini
PTLD	Post-transplant lymphoproliferative disease, elinsiirtoporilaiden lymfoomasyöpä
HIV	Human immunodeficiency virus, HI-virus
AIDS	Autoimmune disease, autoimmuunisairaus
IM	Infectious mononucleosis, mononukleosis eli rauhaskuume
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IFA	Immunofluorescent assay, immunofluoresenssimenetelmä
PCNSL	Primary lymphoma of the central nervous system, keskushermostosyöpä
WHO	World Health Organization, maailman terveysjärjestö
RGG	Glysiini-arginiini toistosekvenssi
GAr	Glysiini-alaniini toistosekvenssi
NLS	Nuclear localization signal, tumakuljetussignaalisekvenssi
USP7	Ubiquitinone specific protease
IMAC	Immobilized metal-ion affinity chromatography

SISÄLLYSLUETTELO

ALKUSANAT	1
TIIVISTELMÄ.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ABSTRACT	2
LYHENTEET	4
SISÄLLYSLUETTELO	5
JOHDANTO.....	8
1 EPSTEIN-BARR VIRUS	8
1.1 EPSTEIN-BARR VIRUKSEN TUTKIMUKSEN HISTORIAA.....	8
1.2 EPSTEIN-BARR VIRUS INFEKTOI B-SOLUJA.....	9
1.3 EPSTEIN-BARR VIRUS SYÖVÄN AIHEUTTAJANA	12
1.3.1 Burkittin lymfooma on monen tekijän summa.....	14
1.3.2 Hodgkinin sairaus on länsimaiden yleisin imusolmukeisyöpä.....	15
1.3.3 Nenänielun syöpä aiheuttaa suurimman osan Kaakkois-Aasian syöpäkuolemista	16
1.3.4 Immuunivasteen heikentyminen indusoi EBV johdannaisten sairauksien syntyä.....	17
1.3.5 Mononukleosi on länsimaissa tyypillinen teini-ikäin sairaus	18
1.4 TULOSTEN TULKINTA ON HANKALAA EBV-DIAGNOSTIIKASSA	19
1.5 EBV JOHDANNAISIIN SAIRAUKSIIN ON KEHITTEILLÄ USEITA HOITOMENETELMIÄ.....	21
1.6 MAAILMAN TERVEYSJÄRJESTÖ WHO TUKEE EBV ROKOTETUTKIMUSTA	23
2 EPSTEIN-BARR VIRUKSEN NUKLEAARINEN ANTIGEENI 1 (EBNA1)	24
2.1 EBNA1 RAKENNE JA TOIMINTA.....	24
2.1.1 Glysiini-arginiini-toistojakso vaikuttaa EBNA1 proteiinin toimintaan.....	24
2.1.2 Pitkä glysiini-alaniini toistojakso estää proteiinin hajotuksen isäntäsoluissa	25
2.1.3 Keskellä EBNA1 proteiinia on tumakuljetussekvenssi	26
2.1.4 USP7-proteaasin sitoutumiskohta	27
2.1.5 Dimerisoituva, DNA:han sitoutuva domeeni	27
3 PROTEIININ TUOTTO JA PUHDISTUS, EBNA1	28
3.1 TUOTTOSYSTEEMIT.....	28
3.2 PROTEIININ PUHDISTUSMENETELMIÄ.....	29
TUTKIMUKSEN TARKOITUS	31
MATERIAALIT JA MENETELMÄT	32

4	EBNA1-GEENIKONSTRUKTIIN LIITTÄMINEN PFASTBAC™ VEKTORIIN	32
4.1	VIRUS-DNA:N ERISTYS	32
4.2	PCR-REAKTIOT	33
4.2.1	Agaroosigeelielektroforeesi.....	34
4.3	DIGESTIOT	34
4.3.1	PCR-tuotteiden digestointi	34
4.3.2	Plasmidien digestiot.....	35
4.3.3	Tarkistusdigestiot.....	36
4.4	LIGAATIOT	37
4.4.1	Oligojen pariuttaminen.....	37
4.4.2	Ligaatiot pBluescript® plasmidiin.....	38
4.4.3	Insertin sisältävän pFastBac™ I vektorin valmistus	39
5	TRANSFORMAATIOT	40
5.1	PLASMIDIN TRANSFORMAATIO JM109 SOLUIHIN.....	40
5.2	PESÄKE-PCR.....	41
5.3	HALUTUN PLASMIDIN SISÄLTÄVIEN PESÄKKEIDEN JATKOKASVATUS JA PLASMIDIEN PUHDISTUS KASVATUKSESTA.....	42
6	BAKULOVIRUKSEN VALMISTUS	42
6.1	BACMID DNA:N TUOTTO JA ERISTYS.....	42
6.2	BAC-TO-BAC® SYSTEEMI	43
7	PROTEIININ TUOTTO JA PUHDISTUS	44
7.1	METALLI-IONI AFFINITEETTIKROMATOGRAFIA	44
7.2	SDS-PAGE JA IMMUNOBLOTTAUS	44
	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	46
8	PCR-REAKTIOT	46
9	6XHis-EBNA1 (1,4)	47
10	EBNA1-6XHis (2,3)	48
10.1	PESÄKE-PCR.....	48
10.2	LIGAATIO PFASTBAC™-PLASMIDIIN	49
10.3	BACMID DNAN TUOTTO.....	49
10.4	BACULOVIRUS-EBNA1 (2,3).....	50
11	6XHis-EBNA1-6XHis (1,3)	50
11.1	LIGAATIO PBLUESCRIPT®-PLASMIDIIN.....	50
11.2	LIGAATIO PFASTBAC™ I-VEKTORIIN.....	51

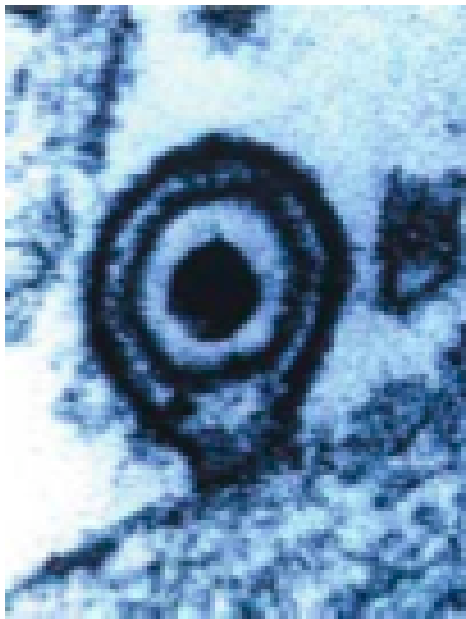
YHTEENVETO JA POHDINTA	54
LÄHTEET	56
LIITTEET	62

JOHDANTO

1 Epstein-Barr virus

1.1 Epstein-Barr viruksen tutkimuksen historiaa

Ensimmäisen sysäyksen Epstein-Barr viruksen (EBV) tutkimukselle antoi irlantilainen kirurgi Dennis Burkitt, joka toimi 1950- ja 60-lukujen vaihteessa Ugandassa lastenlääkärinä ja kiinnostui tietyillä alueilla lapsilla runsaana esiintyvään leukaperän kasvaimeen. Burkitt epäili kyseisen sairauden leviävän malarian lailla hyönteisten välityksellä, sillä sairauden maantieteellinen levinneisyys vastasi malarian levinneisyyttä. Burkitt julkisti tuloksensa seminaarissa Middlesex'n sairaalassa Lontoossa vuonna 1961, jossa patologi M. Anthony Epstein oli kuulijana ja kiinnostui asiasta. Kyseistä sairautta alettiin kutsua Burkittin lymfoomaksi (BL). (Sung ja Pagano, 2001)



Kuva 1.1: Elektronimikroskooppikuva Epstein-Barr Viruksesta (Epstein ym. 1965)

Epstein pystyi tutkimusryhmineen, johon kuuluivat Yvonne Barr ja Bert Achong, ensimmäisinä elektronimikroskopian avulla kuvantamaan herpesviruksen kaltaisia partikkeleja (kuva 1.1) Burkittin lymfoomasolunäytteistä. (Epstein ym., 1964). Myöhemmin voitiin todeta, että löydetty virus ei ollut mikään aikaisemmin tunnetuista kolmesta herpesviruksesta (Hausen ym., 1967). Tähän perustuu myös viruksen taksonominen nimi ”ihmisen herpesvirus 4” (human herpesvirus 4, HHV4). Biologiansa perusteella herpesvirukset jaetaan kolmeen eri alaryhmään, ja EBV kuuluu HHV8-

viruksen kanssa *Gammaherpesviridae* –alaluokkaan. Molemmat infektoivat B-soluja. Yhteensä herpesviruksia tunnetaan nykyään 8 erilaista (Sung ja Pagano, 2001)

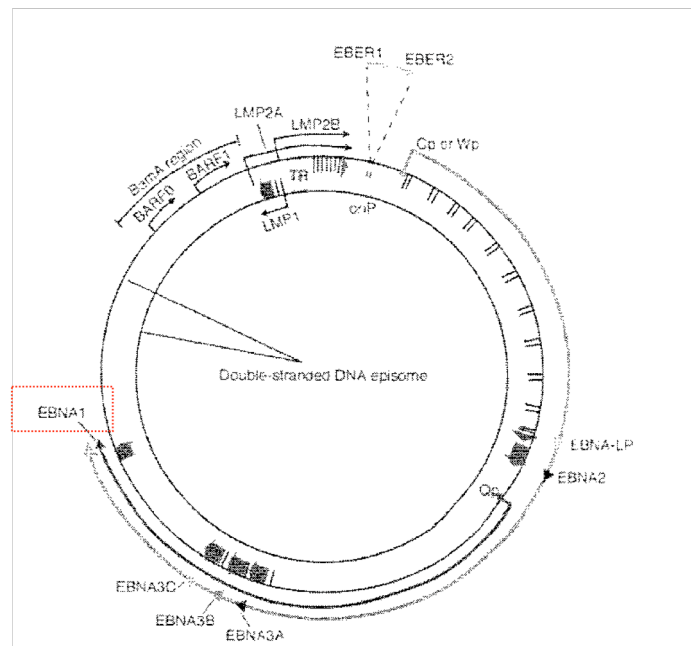
1970-luvun alussa alkoi olla jo selvää, että käytännössä jokainen Afrikan BL tapauksista kantoi Epstein-Barr-viruksen genomia, ja virusta pidettiin erittäin merkittävänä tekijänä sairauden synnyssä. Myöhemmin käsitys on muokkautunut siten, että virusta pidetään suoran taudinaiheuttajan sijasta merkityksellisenä osatekijänä. Samalla kuitenkin sairauksien joukko, joiden synnyssä EBV jollain tavoin on mukana, on merkittävästi kasvanut. Kirjavuudestaan huolimatta kyseisillä sairauksilla on mitä ilmeisemmin molekyylitasolla vahvoja samankaltaisuuksia. (Sung ja Pagano, 2001)

Epstein-Barr virusta tunnetaan kaksi eri tyyppiä, joista ensimmäistä tavataan pääasiassa kehitysmaissa. Siellä suurin osa väestöstä saa virustartunnan 3 ensimmäisen elinvuotensa aikana, ja kymmeneen ikävuoteen mennessä 100 % ikäluokasta on infektoitunut viruksella. Länsimaissa noin 95 % väestöstä saa tartunnan jossain elämänsä vaiheessa, mutta korkeamman hygienian vuoksi pääosin syljen välityksellä leviävä virustartunta ajoittuu yleensä vasta varhaiselle aikuisiälle. (Rickinson ja Kieff, 2001b)

1.2 Epstein-Barr virus infektoi B-soluja

Epstein-Barr virus infektoi tehokkaasti B-lymfosyyttejä. Muiden solutyyppeiden, kuten nielun epiteelisolukon infektiot ovat paljon tehottomampi ja toimii eri mekanismeilla kuin B-solujen infektiot (Borza ja Hutt-Fletcher, 2002).

Kuten muilla herpesviruksilla, myös EBV:llä on amorfisesta proteiinitegmentistä koostuva vaippa kapsidikuorensa ympärillä. Vaippaan on integroitunut gp 350/220 glykoproteiineja, jotka infektiossa tarttuvat kohdesolun (B-solun) CD21-reseptoriin johtaen viruksen pääsyyn solun sisään (Nemerow ym, 1987). CD21-reseptorin rakenne julkaistiin vuonna 2000 (Prota ym.) ja gp350-ligandin vuonna 2006 (Szakonyi ym.). Ilmentämällä adenovirusvektorin avulla CD21-reseptoria erilaisissa nisäkässoluissa, on Epstein-Barr viruksen infektiot myös muihin kuin B-soluihin saatu keinotekoisesti onnistumaan (Yang ym., 2000).



Kuva 1.2: Epstein-Barr viruksen genomi, latentissa infektiossa ilmentyvät proteiinit. (Murray ja Young, 2001)

Viruksen nukleokapsidi koostuu 162 kapsomeeristä, jotka ovat järjestäytyneen ikosaedraaliseen muotoon. Kapsidiproteiinit vastaavat kooltaan Herpes Simplex 1-viruksen kuoriproteiineja. Lisäksi vaipan ja nukleokapsidin välissä on proteiinkerros. Nukleokapsidin sisällä sijaitseva viruksen genomi on 172 kiloemäsparia pitkä, lineaarinen DNA genomi. Epstein-Barr viruksen capsidin liukenemisestä ja genomien siirtymisestä tumaan ei tietoa toistaiseksi juuri ole saatavilla. Genomin molemmissa päissä on 538 emästä pitkät toistojaksot, joiden välityksellä genomi muodostaa episomin (kuva 1.2) latentissa infektiossa. Lisäksi se sisältää 3000 emäksen pituisen toistojakson lähellä 5' päätä, joka jakaa genomia lyhyeseen (12 000 emästä) ja pitkään (134 000 emästä) sekvenssiin. (Rickinson ja Kieff, 2001a)

Herpesvirusten erityispiirre on niiden kyky muodostaa yksilön eliniän kestävä latentti infektio kohdesoluissaan. Epstein-Barr virus kykenee muuttamaan normaalit B-solut pysyviksi, latentisti infektioituneiksi lymfoomasolulinjoiksi *in vitro*. Jokaisesta muuntuneesta B-solusta on löydettävissä useita kromosomin ulkopuolisia, episomaalisia virusgenomeja, jotka ilmentävät viruksen latenttiproteiineja. Latenttiproteiineihin kuuluvat kuusi EBV nukleaarista antigeenia (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C ja -LP) sekä kolme membraaniproteiinia (LMP1, -2A ja 2B). Latenttiproteiinien lisäksi solulinjat ilmentävät

myös pieniä, polyadenyloimattomia (jotka tämän takia eivät toimi koodina proteiinisynteesissä) EBER1 ja EBER2 RNA-molekyylejä. Molekyylit ilmenevät kaikissa latenssityypeissä, eikä niiden merkitys ei ole vielä täysin selvää. (Rickinson & Kieff, 2001a)

Primääri-infektiossa EBV infektoi suun ja nielun epiteelisolukkoa (kuva 1.3). Tässä vaiheessa virus hajottaa isäntäsolunsa muodostaessaan uusia viruspartikkeleja, eli sykli on lyhyttinen. Lyyttisessä syklissä viruksen genomi pysyy lineaarisena. Primääri-infektiossa muodostuvat virukset puolestaan infektoivat imunesteen mukana epiteelisolukon läpi kulkevia B-soluja, joissa ne muodostavat latentin infektion. Latentisti infektoituneet solut alkavat tuottaa virusperäistä RNA:ta, suurenevat, niiden geenien ilmeneminen aktivoituu, ne aggregoituvat ja alkavat lopulta erittää vasta-aineita pian infektion jälkeen. 16 tuntia virukselle altistumisen jälkeen jokainen infektoitunut solu sisältää yhden EBV episomin. Latentti infektio johtaa B-solujen hallitsemattomaan jakautumiseen, jonka yksilön soluvälitteinen immuunivaste saa kuriin tuhoamalla infektoituneita B-soluja. (Sung ja Pagano, 2001, Rickinson ja Kieff, 2001a)

Viruksella infektoituneiden B-solujen määrä vaihtelee yksilöittäin. Määrä pysyy melko tasaisena läpi eliniän yksilön immuunivasteen ja B-solujen jakautumisen välisen tasapainon ansiosta (Zou, 2006). Viruksen genomien kopiokopioita isäntäsoluissa pysyy samana solusukupolvesta toiseen, ja genominsa monistamiseen virus käyttää isäntäsolun polymeraasia. Episomin ylläpitämiseen jakautuvissa soluissa tarvitaan vain yhtä virusperäistä proteiinia. Latentti infektio voidaan jakaa neljään eri tyyppiin ilmenevien proteiinien perusteella (Young ja Rickinson, 2004). Eri latenssityypit ovat tyypillisiä eri sairauksille, joissa EBV on osallisena (taulukko 1.1) (Zou 2006).

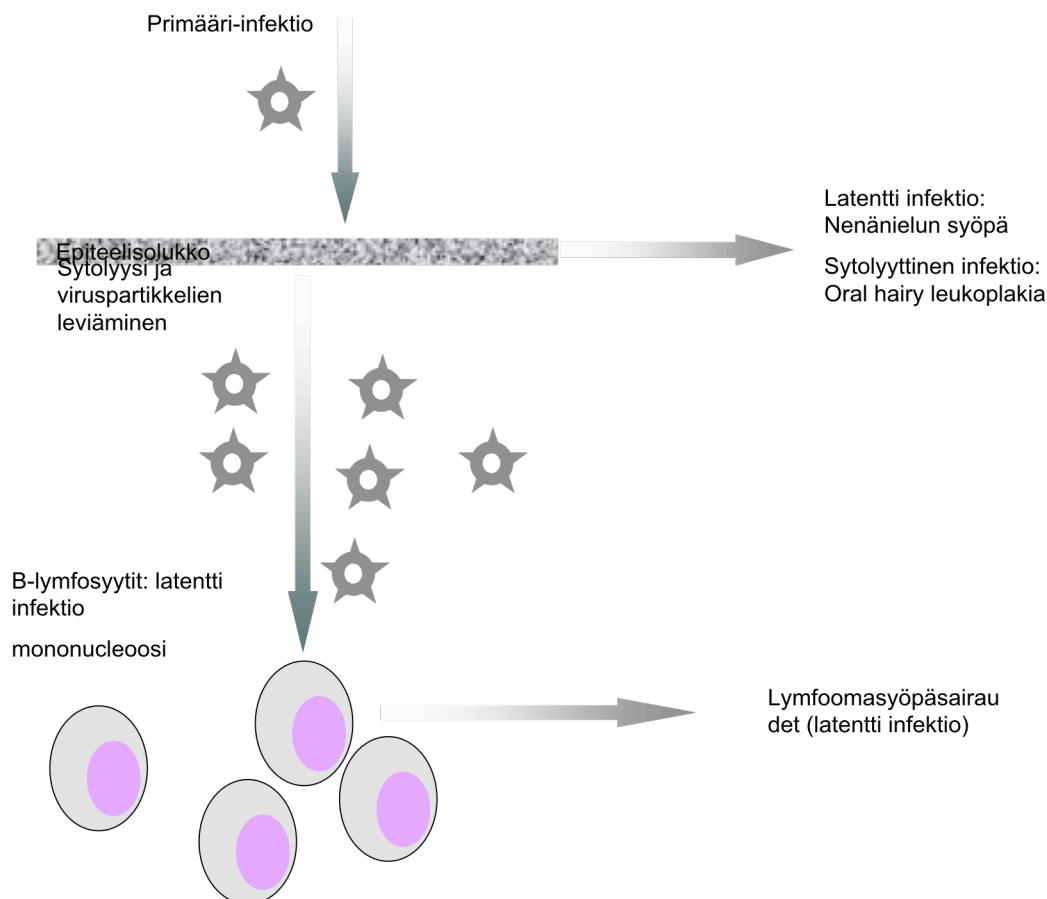
Taulukko 1.1: Latentissa infektiossa ilmenevät virusproteiinit latenssityypin mukaan.

Latenssi 0	EBER 1 & 2 LMP2 a +/-	Terve kantaja
Latenssi I	EBER 1 & 2 EBNA1	Burkittin lymfooma NPC
Latenssi II	EBER 1 & 2 EBNA1 LMP1 LMP2b	NPC Hodckinin sairaus
Latenssi III	EBER 1 & 2 EBNA1-6 LMP1 LMP2 a & b	AIDS-lymfoomat Elinsiirtopotilaiden lymfoomat lymfoomasolulinjat <i>in vitro</i>

1.3 Epstein-Barr virus syövän aiheuttajana

Nykytiedon valossa noin kuudesosa kaikista ihmisillä esiintyvistä syövästä on jollain tavoin virusten aiheuttamia. Epstein-Barr virus oli ensimmäinen, jonka yhteys syövän syntyyn kävi ilmeiseksi. Hepatiitti-virus aiheuttaa valtaosan maksasyövästä, aikuisten leukemia on ihmisen t-solu leukemiavirustyyppin 1 aiheuttama. Papilloomavirus, jolle on jo rokotteita saatavilla, aiheuttaa tunnetusti kohdunkaulansyöpää. (Hamerschmidt ja Sudgen, 2004)

Viruksen ja syövän synnyn välinen yhteys ja mekanismi ei ole vielä selvä, ja se mitä ilmeisemmin vaihtelee paljon syöpätyypistä riippuen. Solumuutosten kehittyminen EBV:n vaikutuksesta on monimutkainen prosessi, johon ottavat osaa monet viruksen tuottamat proteiinit. Epstein-Barr viruksen onkogeenisin proteiini on LMP1, tosin syöpäsoluksi



Kuva 1.3: EBV infektio. Ensin virus infektoi nielun epiteelisolukkoa, jossa se muodostaa lyttisen syklin. Vapautuneet uudet viruspartikkelit infektoivat B-soluja latentisti. Tyypillisesti EBV johdannaiset syövät ovat B-imusolusyöpiä, poikkeuksena epiteelisolukossa esiintyvä latentti infektio, joka voi johtaa nenänielun syöpään. AIDS potilailla epiteelisolukon lyttinen infektio voi olla erityisen voimakasta, ja johtaa suun ja kielen ninnan "karvaisuuteen" (oral hairy leukoplakia) viruksen haiottaessa solua.

muuttumiseen ihmisen B-imusolu pitää lisäksi altistaa ainakin neljälle muullekin viruksen koodaamalle proteiinille. On kuitenkin ilmeistä, että Epstein Barr viruksen nukleaarinen proteiini 1 (EBNA1) inhiboi B-solujen normaaliin kehitykseen liittyvää apoptoosia. (Rowe ja Dickinson 2001)

EBV:n osallisuus syövän synnyssä selittyy kyvyllä muuttaa solujen normaali jakautumissykli hallitsemattomaksi, jolloin immuunipuolustuksen heikentyessä esimerkiksi HIV-positiivisilla tai elinsiirtopotilailla jatkuvasti jakautuvat B-solut alkavat muodostaa syöpäkasvaimia (Zou, 2006). Suurin osa EBV-johdannaisista syövästä esiintyy AIDS-potilailla tai muuten heikentyneen immuunivasteen omaavilla potilailla, kuten elinsiirtopotilailla joilla oma immuunivaste ajetaan alas lääkityksellä hylkimisreaktion estämiseksi. AIDS potilailla EBV syövä ilmenevät sairauden loppuvaiheessa ja johtavat yleensä lopulta kuolemaan. (Sung ja Pagano 2001).

Tyypillisesti EBV on osallisena imusolmukesyövässä kuten Hodgkinin sairaudessa sekä Burkittin lymfoomassa. Afrikkalainen muoto Burkittin lymfoomasta on aina EBV positiivinen ja aiheuttaa alueella suurimman osan lasten syöpäkuolemista. Saman

Taulukko 1.2: Tunnetuimmat EBV johdannaiset syöpätyypit, EBVn genomien ilmeneminen syöpäsoluissa sekä muut syövän syntyyn vaikuttavat, tunnetut tekijät. (Rowe ja Rickinson, 2001)

Syöpä	EBV-positiivisten tuumorien esiintyvyys (%)	Muut tunnetut tekijät
Burkittin lymfooma	Endeeminen: 95-100% Hajanainen: < 20 AIDS: 30-40	<i>c-myc</i> geenin kromosomaalinen translokaatio Malaria HIV (AIDS)
immunoblastien lymfoomat	100	heikentynyt immuunivaste HIV (AIDS)
Hodgkinin sairaus	Vaihtelee runsaasti	?
Nenänielun syöpä (NPC)	100	Ympäristön ja ruokavalion karsinogeenit

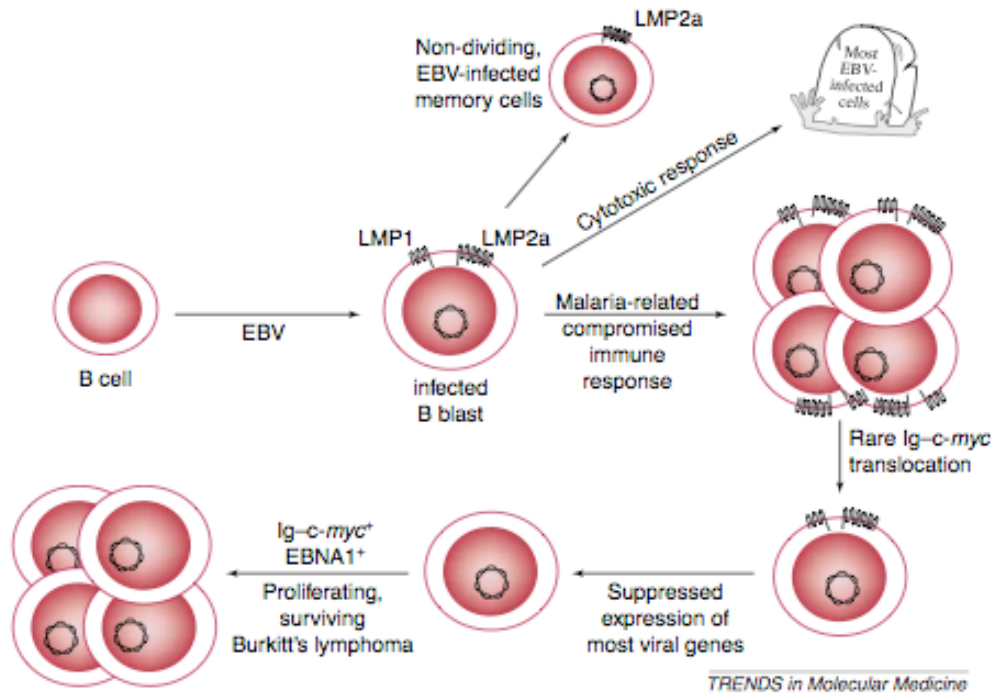
sairauden Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa esiintyvässä muodossa vain harvoin tuumorisoluiista on löydettävissä EBV episomi. Kiinassa on alueita, joissa nenänielun syöpä (nasopharyngeal carcinoma, NPC) on eräs tärkeimmistä kuolinsyistä ja johon aktiivisesti etsitään hoitokeinoja. Tunnetuimmat syöpätyypit, joissa EBV:llä katsotaan olevan merkitystä, on esitetty taulukossa 1.2.

1.3.1 Burkittin lymfooma on monen tekijän summa

Burkittin lymfooma on imusolujen syöpäsairaus, jota esiintyy lapsilla endeemisesti pääasiassa Afrikassa ja Papua Uuden Guinean alueilla. Kyseisillä alueilla ilmenee vuosittain 5-10 sairastumista joka 100 000 lasta kohden. USA:ssa ja Länsi-Euroopassa vastaava luku on yli 50-kertaa pienempi. Endeemisillä alueilla ilmenevissä lymfoomissa Epstein-Barr virus infektio voidaan havaita käytännössä 100 % tuumorisoluiista, kun taas muualla vastaava luku on vain 15 %. Tästä huolimatta viime vuosina on kuitenkin alettu uskoa, että Epstein-Barr viruksella on silti varsin suuri merkitys myös länsimaissa esiintyvissä BL tapauksissa. (Young ja Murray, 2003)

Denis Burkitt arveli malarialoision *Plasmodium falciparum*in levittävän virusta, sillä lymfooman maantieteellinen ilmenemisalue korreloi loision esiintyvyyden kanssa. Näin ei kuitenkaan nykytiedon valossa ole, vaan malarian uskotaan edesauttavan EBV:n syöpävaikutusta potilaassa. Samanaikaisesti tapahtuva EBV ja malarialoisiotartunta aiheuttaa voimakkaan T-soluvälitteisen immuunivasteen heikentymisen. Tässä tilanteessa kolmas tekijä, kuten kromosomimutaatio *c-myc* geenin kohdalla mitä ilmeisemmin johtaa syöpäkasvaimen muodostumiseen. Burkittin lymfooman syntyyn vaikuttavia tekijöitä on esitetty kuvassa 1.4. Vielä eräs BL:n kehittymiseen johtava tekijä saattaa olla kasvi *Euphorbia tirucalli*, jota käytetään lääkkeenomaisesti tietyissä Afrikan osissa. Kasvin yhdisteiden epäillään vahvistavan Epstein-Barr viruksen transformaatiota B-soluihin. (Rowe ja Dickinson 2001)

BL on yleinen myös HI-viruksen kantajilla kehittyneissä maissa, ja usein se on sairaus, jonka perusteella HIV-kantajan todetaan sairastuneen AIDSiin.



Kuva 1.4: B-solujen muuttuminen Burkittin lymfoomasoluksi Epstein-Barr viruksen vaikutuksesta. B-solun infektoituttua viruksella se alkaa jakautua joutuessaan siten immuunipuolustuksen kohteeksi. Malaria vähentää immuunivastetta EBV-infektoituneita soluja kohtaan, jolloin soluja alkaa kasaantua. c-myc-geenin translokaatio johtaa solujen jakutumiseen ilman, että immuunivasteen tunnistettavissa olevia virusproteiineja ilmenee, jolloin kasvaimen muodostuminen on mahdollista. (Lähde: Hammerschmit ja Sudgen, 2004)

1.3.2 Hodgkinin sairaus on länsimaiden yleisin imusolmukesyöpä

Hodgkinin sairaus (HD) on saanut nimensä brittiläisen patologi Thomas Hodgkinin mukaan, joka esitteli sairauden vuonna 1832 Lontoon lääketieteelliselle ja kirurgiselle yhteisölle osoittamassaan artikkelissa. Sairautta esiintyy pääasiassa kehittyneissä länsimaissa, joissa se on yleisin imusolmukkeiden syöpämuoto. Sen esiintyvyys on n. 2,5/100 000. Hodgkinin sairaudessa esiintyviä kliinisiä oireita ovat mm. jatkuva kuumeilu, yöhikoilu, painon menetys ja imusolmuketulehdus. Hodgkinin lymfoomaa hoidetaan -ja on hoidettu jo vuosia- pääasiassa kemoterapialla ja sädehoidolla. Kiinnostusta on herättänyt myös immunoterapiamenetelmän kehittäminen, jossa syöpäkasvainta pyritään hoitamaan viruksen antigeeneille spesifisillä T-soluilla. Hoitoennuste on hyvä, keskimäärin 80 % HD potilaista paranee. (Andersson, 2006)

Hodgkinin sairaudessa tuumorikasvaimessa esiintyy pahalaatuisia Reed-Sternbergin soluja, jotka ovat muita syöpäsoluja isompia ja niissä on löydettävissä usein kaksi tumaa. Kasvaimen soluista näitä soluja on n. 1-2 %. (Rowe ja Dickinson, 2001)

Epstein-Barr viruksen on jo pitkään uskottu olevan eräs sairauden kehittymiseen vaikuttava tekijä, sillä aiemmin sairastettu mononukleoosi kolminkertaistaa riskin sairastua Hodgkinin sairauteen verrattuna mononukleosia sairastamattomaan väestöön. Länsimaissa sairaus esiintyy vain harvoin lapsilla, toisin kuin kehitysmaissa joissa lapsilla esiintyvä HD on aikuisten sairautta yleisempi. Länsimaissa HD esiintyy tyypillisesti 25-35 vuotiailla, toinen tyypillinen sairastunut ikäryhmä on n. 45 ikävuoden tietämissä. (Rowe ja Dickinson, 2001. Andersson, 2006)

Reed-Sternbergin solut eivät ilmennä kaikkia viruksen latenttiproteiineja, mutta sen sijaan ne ilmentävät huomattavia määriä LMP1 proteiinia, joka on Epstein-Barr viruksen onkogeenisuuden kannalta tärkein proteiini. LMP1 proteiinin pitäisi kuitenkin olla sytotoksisten T-lymfosyyttien tunnistettavissa, ja vielä ei tiedetä, miksei Hodgkinin sairaudessa soluvälitteinen immuunivaste tuhoa Reed-Sternbergin soluja. (Rowe ja Dickinson, 2001)

1.3.3 Nenänielun syöpä aiheuttaa suurimman osan Kaakkois-Aasian syöpäkuolemista

Vuonna 2000 raportoitiin maailmanlaajuisesti 64 798 uutta nenänielun syöpätapausta, joista 80 % Kiinassa. Nasopharyngeal carcinoma (NPC) eli nenänielun syöpä on hyvin yleinen myös muualla Kaakkois-Aasiassa jossa se on yleisin syöpätyyppi miehillä. NPCaa esiintyy myös eskimoiden keskuudessa Alaskassa ja Grönlannissa. Muualla maailmassa kyseinen syöpätyyppi on verrattain harvinainen. Nenänielun syövän esiintyvyys kyseisillä alueilla on n. 20/100 000 kun muualla maailmassa se on n. 1/100 000. Myös länsimaissa kiinalaisilla maahanmuuttajilla syöpätyyppi on selvästi paikallista väestöä yleisempi. Toisen sukupolven maahanmuuttajien riski sairastua nenänielun syöpään on edellistä sukupolvea matalampi, mutta kuitenkin alkuperäisväestöä korkeampi. Selvän maantieteellisen ilmenemissensä takia syövän merkittävänä tekijöinä pidetään Epstein-Barr viruksen lisäksi perimää sekä paikallisia olosuhteita, kuten ruokavaliota. Viimeisten 20

vuoden aikana tautitapausten määrä on selkeästi laskenut, joka on ehkä selitettävissä ympäristötekijöiden muutoksina. (Lo ym. 2004. Kieff ja Rickinson, 2001b. Ng ym. 2004)

Sairauden ja Epstein-Barr viruksen välillä on nähtävissä selkeä yhteys, sillä virus on läsnä käytännössä kaikissa endeemisillä alueilla löydettyissä kasvaimissa. Sairauden syntyyn vaikuttavina ympäristötekijöinä pidetään pääasiassa paikallista ruokavaliota, joka sisältää runsaasti nitroamineja sisältävää suolattua kalaa. (Lo ym. 2004)

NPC on suun ja nielun epiteelisolukon syöpä, jossa EBV on muodostanut latentin infektion epiteelisoluihin. Terveillä viruksen kantajilla EBV:tä ei tavata latentisti epiteelisolusta, eikä viruksen epiteelisolujen infektiomekanismista ole juuri tietoa. (Lo ym, 2004)

Kiinassa kuolleisuus nenänielun syöpään on niin merkittävä, että EBV vasta-aineisiin perustuvaa seulontaa on harjoitettu jo pitkään. Seulonnan takana on tutkimus, jonka mukaan syövän diagnoosi ajoittuu 8-30 kk päähän siitä kun seerumista on detektoitu kohonneita pitoisuuksia IgA-vasta-aineita viruksen kapsidiproteiinille (VCA). Nykyisin seulonnassa ollaan siirtymässä RT-PCR menetelmiin, joilla saadaan tarkempi kuva taudin etenemisestä immunologiin menetelmiin verrattuna. (Lo ym. 2004)

1.3.4 Immuunivasteen heikentyminen indusoi EBV johdannaisten sairauksien syntyä

Tyypillisesti Epstein-Barr viruksella on suuri merkitys syövän kehittymiseen heikentyneen immuunivasteen omaavilla potilailla. Tällaisia ovat esimerkiksi AIDS-potilaat, elinsiirtopotilaat, joilla hylkimisreaktio pyritään estämään heikentämällä luonnollista immuunivastetta sekä muut autoimmunisairauksia sairastavilla potilailla. Terveillä Epstein-Barr viruksen kantajilla infektio pysyy hiljaisena soluvälitteisen immuunivasteen ansiosta. Immuunivasteen kuitenkin heikentyessä virusspesifisiä T-soluja ei ole riittävästi, jolloin B-lymfosyyttien EBV-infektiosta johtuva jatkuva jakautuminen saattaa johtaa syöpäkasvaimen kehittymiseen. Onneksi kuitenkin useimmiten T-solujen toiminta pysyy riittävänä. (Rowe ja Dickinson 2001)

Epstein-Barr viruksen läsnäolo on havaittu lähes kaikilla B- lymfoomasyöpiä (post-transplant lymphoproliferative disorders, PTL) sairastavilla elinsiirrännäispotilailla. Riski

sairastua lymfoomasyöpään vaihtelee jonkun verran siirrännäisestä riippuen. Keuhkosiirrännäispotilaiden riski sairastua lymfoomasyöpään on arvioitu niinkin korkeaksi kuin n. 5-10 %. Luuydinsiirtopotilailla lymfoomasyöpä saa usein alkunsa infektoituneista, luovutetuista B-soluista. Myös potilaan EBV infektion status toimenpidehetkellä vaikuttaa lymfoomasyövän kehittymiseen. Mikäli potilas on EBV negatiivinen ennen toimenpidettä, riski sairastua lymfoomasyöpään luuydinsiirron jälkeen kasvaa moninkertaiseksi. (Kieff ja Rickinson, 2001b)

HI-viruksen kantajilla on suurempi riski sairastua lymfoomasyöpiin ja syövän esiintymiskirjo on myös huomattavasti suurempi kuin elinsiirtopotilailla. Keskimäärin puolet AIDS-potilailla esiintyvistä syöivistä ovat jollain tavoin yhteydessä Epstein-Barr virukseen. (Kieff ja Rickinson, 2001b)

2000-luvulla on käynyt selväksi, että kuten muissakin autoimmuunisairauksissa, Epstein-Barr viruksella on merkittävä rooli myös MS-taudin kehittämisessä. 99 % MS-taudin sairastajista on EBV seropositiivisia. Mononukleosin sairastaminen ja siten EBV primääri-infektion ajoittuminen lähelle aikuisikää on riski sairastua MS-tautiin. Lisäksi EBNA1-IgG vasta-aineiden korkea pitoisuus seerumissa ennustaa 36 kertaista riskiä sairastua MS-tautiin. (Pender ja Greer, 2007)

1.3.5 Mononukleosi on länsimaissa tyypillinen teini-iän sairaus

Tavallisesti lapsuudessa saatu EBV infektio ei aiheuta juurikaan oireita. Nuorilla ja aikuisilla Primääri-infektio aiheuttaa usein mononukleosia (rauhaskuume, pusutauti, infectious mononucleosis, IM). Länsimaissa mononukleosi on yleensä teini-ikäisten sairaus, johon väestöstä sairastuu vuosittain noin 5/10000. Evoluutiivisesti mononukleosi on verrattain uusi sairaus, joka on ilmennyt vasta hygienian paranemisen jälkeen, jolloin virusinfektio ajoittuu myöhemmälle iälle. (Rickinson ja Kieff, 2001b)

Primääri EBV infektio johtaa voimakkaaseen soluvälitteiseen immuunivasteeseen, joka nopeasti alkaa kontrolloida infektiota ja B-solujen jakautumista. EBV-spesifisten muistisolujen määrä on jopa 5 % kaikista verenkierron CD8⁺-soluista, myös viruksen kantajilla joilla infektio ei ole johtanut akuuttiin mononukleosiin.

Mononukleosin oireita ovat mm. kipeä ja turvonnut kurkku, korkea kuume, hikoilu, ruokahaluttomuus, päänsärky ja väsymys. Tyypillinen oire on myös imusolmukkeiden turpoaminen kaulalla ja niskassa. Joissain harvoissa tapauksissa turvotus on erittäin voimakasta ja saattaa haitata myös hengitystä. Useilla potilailla on havaittavissa myös pernan ja maksan suurentumista. Hoitona mononukleosiin käytetään vuodelepoa ja kuumetta laskevaa lääkitystä. Myös asikloviiri -lääkityksestä saattaa olla etua. Kun kuume on laskenut, potilaille suositellaan nousemista ja jotain aktiviteetteja heti kun vointi niin sallii. Raskasta liikuntaa ei kuitenkaan suositella ennen kuin suurentunut perna on palautunut normaaliin kokoonsa.

Lievä mononukleosi saattaa olla ohi muutamassa päivässä, mutta useimmiten sairaus kestää 2-3 viikkoa. Harvassa tapauksessa infektio saattaa muodostua krooniseksi, jota kutsutaan krooniseksi mononukleosiksi tai krooniseksi akuutiksi EBV infektioksi. Tämän sairauden ja Epstein-Barr viruksen yhteyttä ei olla kuitenkaan vielä kiistattomasti todistettu. Mononukleosi on helposti diagnosoitavissa, eikä sitä yleensä diagnosoida virheellisesti. Cytomegalovirus ja toxoplasma aiheuttavat kuitenkin samantapaisia oireita, ja joskus EBV-infektio on mahdollista sekoittaa niihin. (Epstein, 2001)

1.4 Tulosten tulkinta on hankalaa EBV-diagnostiikassa

Epstein-Barr virusdiagnostiikan pääasiallisena tavoitteena on yleensä erottaa infektio mahdollisista muista vastaavanlaisia oireita aiheuttavista taudinaiheuttajista (sytomegalovirus, HI-virus, rubellavirus, *toxoplasma gondii*) sekä eritellä positiivisesta näytteestä onko kyseessä primääri- vai aikaisempi infektio (Gärtner ym. 2003). Pääasiassa rutiinilaboratoriodiagnostiikkamenetelmät perustuvat viruksen antigeenejä kohtaan muodostuneiden vasta-aineiden löytymiseen potilasseerumista ELISA-menetelmällä, mutta myös muita menetelmiä on käytössä. Ralf Hess käsittelee erilaisia, myös harvoin käytettyjä EBV-diagnostiikkamenetelmiä katsausartikkelissaan (2004).

Ensimmäinen mononukleosin diagnostiikkaan käytetty testi oli Paul-Bunnellin testi, jossa potilaan seerumia sekoitetaan lampaan punasolujen kanssa. EBV infektio aiheuttaa virusspesifisten IgM molekyylien muodostumisen, joilla taas on kyky muodostaa silmin havaittavia komplekseja lampaiden punasolujen kanssa. Menetelmä oli käytössä vielä 90-

luvulla, mutta on myöhemmin syrjäytynyt ELISA-testien kehittymisen myötä. (Weber ym. 1995).

EBV diagnostiikan standardimenetelmänä on pitkään pidetty epäsuoraa immunofluoresenssimenetelmää (IFA). Rutiinimenetelmäksi se on kuitenkin liian kallis, vaivalloinen ja aikaa vievä, joten markkinoille onkin aktiivisesti kehitelty muihin menetelmiin perustuvia diagnostiikkakattejä. EBV:n diagnostiikassa tärkeimmät detektoitavat vasta-aineet ovat IgG ja IgM vasta-aineet viruksen kuoriproteiinille (VCA), sekä IgG vasta-aineet nuklearisille antigeeneille 1 ja 2 (EBNA1 ja EBNA2). Näiden perusteella voidaan määrittää, onko näyte EBV negatiivinen tai positiivinen ja jälkimmäisessä tapauksessa myös onko kyseessä primääri, aikaisempi vai uudelleen aktivoitunut infektio. NPC riskiseulonnassa, lähinnä Etelä-Kiinassa käytetään myös viruksen kapsidin IgA-vasta-aineiden detektiota seerumista. Positiivinen IgA-VCA tulos verinäytteestä ilmentää kyseisellä alueella merkitsevästi kohonnutta riskiä sairastua kyseiseen syöpätyyppiin. EBNA1-proteiinin vasta-aineiden detektio seerumista yhdessä VCA IgG tai IgM-molekyylien kanssa sulkee pois akuutin infektion mahdollisuuden. Mikäli tällainen vasta-aineyhdistelmä potilaalta löydetään, on syytä epäillä viruksen aktivoituneen uudelleen. Taulukossa 1.3 on yhteenveto merkittävimmistä EBV diagnostiikassa käytetyistä vasta-aineista ja niiden perusteella arvioitavissa oleva infektion vaihe. (Gärtner ym. 2003, Schenk ym. 2007, Ng ym. 2004).

EBV diagnostiikassa ongelmia aiheuttavat yksilölliset eroavaisuudet vasta-aineiden muodostumisessa, viruksen uudelleen aktivoitumisen epätarkka vasta-aineprofiili seerumissa sekä mahdolliset akuutit virusinfektiot potilaalla (esimerkiksi muut herpesvirukset) joiden tuottamat vasta-aineet häiritsevät määrittystä. Esimerkiksi kaikilla viruksen kantajilla EBNA1 IgG -molekyylejä ei aina esiinny läpi elämän, vaikka suurimmalla osalla potilaista näin onkin. EBNA-IgG vasta-aineiden muodostuminen saattaa lakata myös yleisen immuunivasteen heikentymisen myötä. Esimerkiksi AIDS-potilailla vasta-aineisiin perustuvaa määrittystä ei voida pitää luotettavana (Gärtner ym., 2000).

Lisähaasteen EBV diagnostiikkaan antaa markkinoilla olevien testikittien valmistajien käyttämä epäyhtenäinen ja hämmentävä terminologia. Viruksen lyyttisen syklin aktivoitumisesta on vain vähän tietoa tarjolla, ja se aiheuttaa diagnoosin tekoon lisäongelmia. Tulosten tulkinta vaihtelee analysoivan laboratorion ja testivalmistajien mukaan (Gärtner ym., 2001).

VCA igG	VCA IgM	EBNA1 IgG	Tulosten tulkinta
+	+	-	Akuutti infektio
+	-	+	Aikaisempi infektio
-	-	-	Ei infektiota
+	-	-	Määrittelemätön*
+	+	+	Määrittelemätön*
-	+	-	Määrittelemätön*
-	-	+	Ei mahdollinen

* Lisätutkimuksia tarvitaan diagnoosin varmistamiseksi

Taulukko 1.3: Serologisen profiilin EBV-spesifisten vasta-aineiden tulkintataulukko diagnoosin tueksi (Hess, 2004)

1.5 EBV johdannaisiin sairauksiin on kehitteillä useita hoitomenetelmiä

Imusolmukeesyöissä, joissa Epstein-Barr virus on osallisena, viruksen genomi löytyy lähes kaikista tuumorisoluiista, mutta vain harvoista normaaleista soluista (Kieff ja Rickinson, 2001). Tästä johtuen voidaan Epstein-Barr virusta käyttää kohteena kehiteltäessä hoitomenetelmiä näille sairauksille (Israel ja Kennedy, 2003).

Epstein-Barr -viruksen latenssivaiheen geenituotteet ovat ilmeisesti osallisena syöpäsolujen jatkuvaan kasvuun. Ainakin EBV:n tuottamalla proteiinilla LMP1 on ilmeisen suuri onkogeeminen potentiaali, mutta myös muut latentit virusproteiinit ovat merkityksellisiä syövän synnyn kannalta (Kieff ja Rickinson, 2001).

Eräs mahdollinen hoitokeino on hyödyntää EBV:n omia promootteri- ja replikoitumisalueita geeniterapiavektoreissa. Vuonna 2002 Li ym kehittivät adenovirusvektoriin lisättyyn EBV OriP-alueeseen perustuvan nenänielun syövän (NPC)

hoitoon kohdennetun geeniterapiamenetelmän, jonka avulla ilmennetään joko sytotoksisia tai inhiboivia proteiineja kohdesoluissa. Tutkimuksessa soluihin vietiin p53 geeni, jonka ilmentämä tuote laukaisee kohdesolujen apoptoosin. Geeniterapiassa erityisen tärkeää on sen kohdentaminen oikeisiin soluihin. Epstein-Barr virus on osallisena lähes kaikissa nenänielun syöpätapauksissa, ja EBV latenssvaihe II on löydettävissä kaikista NPC tuumorisolusta, mutta ei ympäröivästä kudoksesta. Tässä tapauksessa kohdentamiseen käytettiin viruksen OriP-aluetta, joka toimii vain viruksen EBNA1-proteiinia ilmentävissä soluissa. Ongelman saattavat muodostaa kuitenkin ”normaalit” B-solut, jotka kantavat Epstein-Barr viruksen genomia mutta eivät ole syöpäsoluja. Yleensä kuitenkin B-soluista EBV:lla infektoituneita on kuitenkin vain $1-50 / 10^6$, jolloin geeniterapiavektorin kohdentuminen myös näihin soluihin ei välttämättä muodostu ylittämättömäksi ongelmaksi.

Toisenlaisena hoitokeinona voidaan pitää EBV:n lyyttisen syklin induktiota, jolloin virus replikoituessaan tuhoaa isäntäsolunsa, EBV-johdannaisessa syövässä siis syöpäsolun. Induktioon voidaan käyttää viruksen varhaisia proteiineja (immediate-early proteins), jotka toimivat toistensa säätelytekijöinä ja laukaisevat lyyttisen syklin. Lyyttisen syklin seurauksena myöskin soluvälitteinen immuunivaste aktivoituu ja auttaa osaltaan tuumorisolujen tuhoamisessa. Lyyttisen infektion syöpäsoluja tuhoavaa vaikutusta tehostaa gansikloviirihoito, joka myös toimii lyyttisen syklin idusorina. Lisäksi lyyttisessä vaiheessa viruksen tuottamat kinaasit muokkaavat gansikloviiristä aktiivista, sytotoksista muotoa (Feng ym, 2004, Israel ja Kenney, 2003).

Viruksen DNA:ta demetyloiva agentti (DNA metyyli transferaasi-inhibiittori), kuten 5-azacitidiini voi olla käyttökelpoinen EBV -johdannaisten sairauksien hoidossa. Virusgenomin demetylaatio johtaa lyyttisen syklin virusproteiinien ilmentämiseen ja sitä kautta soluvälitteisen immuunivasteen aktivoitumiseen. 5-azacitidiini on markkinoilla kauppanimellä Vidaza (Pharmion), ja se on tällä hetkellä kliinisissä testeissä NPCn, Hodkinin sairauden ja AIDS-lymfoomien hoidon osalta. (Young ja Rickinson 2004, Chan ym 2004, Ambinder ym 1999)

Hydroxyurea on mm. leukemian hoitoon käytetty lääkeaine. Hydroxyureakäsittelyllä ollaan saatu myös EBV positiivisista Burkittin lymfoomasoluista saatu viruksen episomi katoamaan *in vitro*, jolloin myös solujen hallitsematon jakautuminen pysähtyi (Chodosh

ym. 1998). Hydroxyureahoidolla saatiin myös vuonna 2000 ja 2006 julkaistujen tutkimusraporttien perusteella lupaavia tuloksia EBV-johdannaiseen keskushermostosyöpään (primary lymphoma of the central nervous system, PCNSL) sairastuneilla AIDS-potilailla (Slobod ym. 2000 ja Aboulafia ym. 2006)

Kehitteillä on myös tarkemmin tiettyihin EBV:n tuottamiin proteiineihin kuten esimerkiksi EBNA1-proteiiniin, joka esiintyy kaikissa EBV-positiivisissa syöpäsoluissa. Kyseisen proteiinin EBV episomaalista genomia ylläpitävä funktio saattaa olla potentiaalinen hoitojen kohde. Tätä lähestymistapaa ovat käyttäneet ainakin Kirchmaier ja Sudgen 1997 ilmestyneessä tutkimuksessaan, jossa he kehittivät EBNA1 –mutantteja, jotka kykenevät sitoutumaan viruksen DNA:han kuten alkuperäinen proteiini mutta eivät toimi transkription ja replikaation aktivaattorina alkuperäisen tapaan. Myös muihin virusproteiineihin kohdennettuja hotiomuotoja on kehitteillä, esim LMP1 –proteiini on houkutteleva kohde sen onkogeenisen potentiaalin takia. Uusinta uutta EBV johdannaisten syöpien hoidossa on bortezomid (kauppanimeltään Velcade, Millenium Pharmaceuticals). Bortezomidin on todettu häiritsevän apoptoosin inhibiittoriproteiinien ilmentymistä ja siten auttavan syöpäsolujen tuhoutumisessa. (Zou ym. 2007).

1.6 Maailman terveysjärjestö WHO tukee EBV rokotetutkimusta

Epstein-Barr virusrokotteella pyritään pääasiassa taistelemaan nenänielun syöpää vastaan (nasopharyngeal carcinoma, NPC), jonka esiintyvyys on suurimmassa osassa maailmaa vain 1/100 000 mutta tietyillä alueilla, kuten Etelä-Kiinassa sekä eskimoiden ja grönlantilaisten keskuudessa muodostaa paljon merkittävämmän riskin esiintyvyyden ollessa näissä väestöissä 20/100 000. (World Health Organization 2007)

Maailman terveysjärjestö WHO tukee rokotteen kehitystä. EBV rokotteen kehittämiseen on tähän mennessä perehtynyt kolme eri projektia, joista yksi on keskeytynyt. MedImmune, GSK ja Henogen kehittävät yhteistyössä rokotetta, joka perustuu Epstein-Barr viruksen vaipan proteiiniin gp350. Kyseinen proteiini on vastuussa viruksen kohdesolun tunnistamisesta. Tällä hetkellä tämä rokote etenee faasi II vaiheessa. Australiassa CLS yrityksen EBNA-3A peptidiin perustuva rokotetutkimus eteni faasi I vaiheeseen, mutta on nykyisin keskeytettynä. Saksassa kehitellään MVA-LMP2A rekombinattivirukseen perustuva rokotetta Saksan kansallisessa terveyden ja

ympäristöntutkimuskeskuksessa, GSF:a. Tutkimus on tällä hetkellä prekliinisessä vaiheessa. (World Health Organization 2006)

Työn alla on myös perinteisistä rokotteista eroava lähestymistapa, joka perustuu vasta-aineiden sijasta soluvälitteiseen immuunivasteen aktivoimiseen. Menetelmässä ei pyritä estämään infektiota, vaan tuhoamaan infektoidut, viruspartikkeleja tuottavat solut sytotoksisten T-solujen avulla ja siten vähentämään infektion aiheuttamia oireita. (Epstein 2001)

2 Epstein-Barr Viruksen nukleaarinen antigeeni 1 (EBNA1)

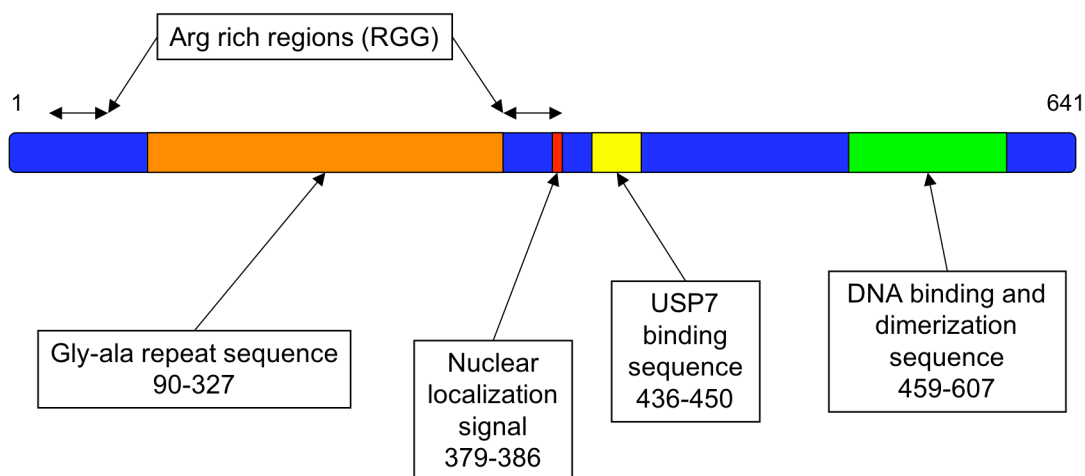
2.1 EBNA1 rakenne ja toiminta

EBNA1 –proteiinin aminohapposekvenssi on esitelty liitteessä 1 (Baer ym. 1984).

Tyypillisestä, B95 EBV solulinjasta eristetty EBNA1 proteiini on 641 aminohapon pituinen, noin 76 kDa kokoinen varautunut proteiini. Eri lähteistä eristetyt EBNA1 proteiinit saattavat hieman vaihdella kooltaan, vaihtelevan pituisesta glysiini-alaniini toistosekvenssistä johtuen. EBNA1 sekvenssi voidaan jakaa eri domeeneihin niiden aminohappokoostumuksen ja toiminnan perusteella (kuva 2.1). (Rickinson ja Kieff, 2001a)

2.1.1 Glysiini-arginiini –toistojakso vaikuttaa EBNA1 proteiinin toimintaan

Proteiinin aminopäästä löytyy lyhyt, glysiiniä ja arginiinia sisältävä sekvenssi (RGG) (ah 61-82). Vastaavanlainen sekvenssi löytyy proteiinin keskiosasta (ah 325-376). Keskiosan RGG sekvenssin merkitystä on tutkittu mm vuonna 2006 julkaistussa tutkimuksessa (Shire ym.), jossa keskityttiin sekvenssin sisällä esiintyvien seriini-aminohappojen fosforylaatioon sekä arginiini-aminohappojen metylaatioon. Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että EBNA1 proteiineilla esiintyy translaation jälkeistä muokkausta näillä alueilla, ja ainakin proteiinin virusegenomia ylläpitävä toiminta isäntäsolun jakautuessa on



jotenkin riippuvainen näistä alueista. RGG sekvenssin onkin todettu sitoutuvan jakautuvan, meioosivaiheessa olevan solun kromosomeihin. (Shire ym., 2006)

2.1.2 Pitkä glysiini-alaniini toistojakso estää proteiinin hajotuksen isäntäsoluissa

Aminopäässä on myös yli kahdensadan aminohapon pituinen glysiini-alaniini toistosekvenssi (GAR). Kyseisen sekvenssin pituus vaihtelee 60-300 aminohapon välillä EBV kannasta riippuen (Falk ym. 1995). Toisessa samana vuonna julkaistussa tutkimuksessa (Levitskaya ym.) selvisi, että kyseisellä aminohappojaksolla saattaa olla tärkeä rooli proteiinin puolustusmekanismissa solun proteaaseja vastaan.

Normaalisti soluissa proteasomit huolehtivat soluille vieraiden tai solun omien, väärin laskostuneiden proteiinien pilkkomisesta. Tätä kautta peptidifragmentit kulkeutuvat MHC-I-molekyyleille T-solujen tunnistettaviksi, jolloin vieraat (virusperäiset) peptidifragmentit saavat aikaan infektoituneen solun tuhoamisen soluvälitteisen immuunivasteen avulla. Pilkkottavat proteiinit merkitään soluissa ubiquitiinillä, joka toimii signaalina proteiinin hajotusreitille. EBNA1-proteiinin GAR sekvenssi ilmeisesti suojelee proteiinia pilkkomiselta. Tätä on tutkittu mm. liittämällä GAR sekvenssi proteiineihin, jotka normaalisti pilkkoutuisivat kyseisellä hajotusreitillä mutta sekvenssin avulla välttävät pilkkoutumisen. (Mingzeng ja Coffino 2004, Sharipo ym 1998).

EBNA1-proteiinia on keinotekoisesti ubikitinoitu, jolloin se on joutunut myös proteasomaaliselle hajotusreitille ja sitä kautta prosessoitu ilmennettäväksi solun pinnalla MHC-I- molekyylien välityksellä (Tellam ym. 2001). Saman tutkimuksen tulosten perusteella arveltiin myös, GAR sekvenssi jollain tavoin inhiboi proteiinin ubikitinointia välttämällä siten proteasomaalisen hajoituksen.

Hieman erilainen näkökulma GAR sekvenssin merkitykseen on Yin ym. tutkimuksessa (2003), jossa pyrittiin osoittamaan, että GAR sekvenssin suojautumiskyky sytotoksisilta T-soluilta johtuu enemmän sekvenssin mRNA:n translaatiota inhiboivasta vaikutuksesta. Tämän näkökulman mukaan proteasomaalisen inhibition vaikutus ei yksinään estä antigeenien päätymistä MHC-I solujen esittelemiksi, vaan myös ribosomeilta joutuu hajotustuotteilta suoraan MHC molekyylielle, ja siten EBNA1 translaatio väistämättä johtaisi T_C-solujen tunnistukseen. Tällainen tutkimuksessa esitetty peptidin toimiminen translaation inhibiittorina on harvinaista, ja erinomainen esimerkki virusten moninaisista solujen puolustusmekanismien välttelykeinoista. GAR sekvenssin aiheuttama soluvälitteisen immuunivasteen välttäminen saattaa selittää myös sen, miten Burkittin lymfoomassa syöpäsolut selviytyvät normaalin immuunivasteen omaavien potilaiden T-solujen tunnistukselta ja siten tuhoutumiselta, muut EBV syöpätyypitän ilmenevät pääasiassa potilailla, joilla soluvälitteinen immuunivaste ei toimi normaalisti. GAR sekvenssin käsittelyyn liittyvät menetelmät saattavat olla hyvin merkityksellisiä, kun etsitään tulevaisuuden hoitokeinoja Epstein-Barr virukseen liittyviin sairauksiin.

2.1.3 Keskellä EBNA1 proteiinia on tumakuljetussekvenssi

GAR sekvenssin jälkeen on toinen arginiinipitoinen sekvenssi, jota seuraa tumakuljetussignaali (NLS, aminohapot 379-386). Tämän signaalin ansiosta solun kuljetusmekanismit vievät EBNA1-proteiinin tumaan. Kokonaisuudessaan tumakuljetussignaali sisältää aminohapot Lysiini-Arginiini-Proliini-Arginiini-Seriini-Proliini-Seriini-Seriini. Kitamuran tutkimus (2006) osoitti, että näistä kaksi ensimmäistä aminohappoa (Lys ja Arg) olivat välttämättömiä tumakuljetuksen onnistumiseksi.

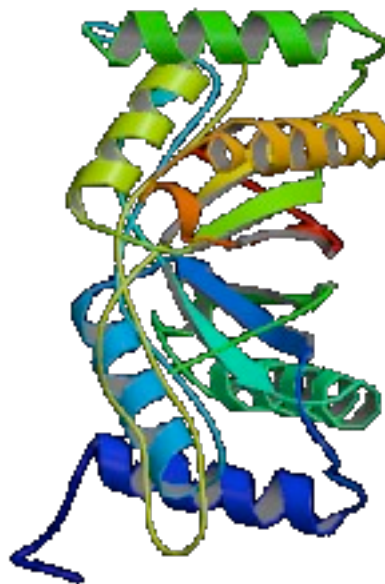
2.1.4 USP7-proteaasin sitoutumiskohta

EBNA1 proteiinilla on monenlaista vuorovaikutusta myös isäntäsolun proteiinien kanssa. Viime vuosina on mielenkiinto kohdistunut USP7-proteaasiin (ubiquitine-specific protease) sitoutuvaan kohtaan (aminohapot 395-450). USP proteiineilla arvellaan olevan merkitystä eukaryoottisolujen monissa biologisissa prosesseissa, kuten monisoluisien eliöiden solujen välisten interaktioiden säätelytekijänä. USP7-proteiini sitoutuu p53 proteiiniin, joka tunnetaan ohjelmoidun solukuoleman (apoptoosin) säätelytekijänä. EBNA1 kilpailee mahdollisesti kyseisen proteiinin kanssa sitoutumisessa USP7-proteiiniin tai inhiboi muulla tavoin normaalin USP7-p53 kompleksin muodostumista ja siten häiritsee normaalia solukuolemaa. Tämä saattaa aiheuttaa EBV infektiolle tyypillisen isäntäsolun kuolemattomuuden ja siten mahdollisesti syöpäkasvaimen kehittymisen. (Holowaty ym. 2003)

2.1.5 Dimerisoituva, DNA:han sitoutuva domeeni

Aivan proteiinin karboksyylipäässä on proteiinin toiminnan kannalta tärkeimpänä pidetty domeeni, eli dimeerisoituva DNA:han sitoutuva kohta. Tämä on myös proteiinin ainoa domeeni, jonka kolmiulotteinen rakenne on saatu selvitettyä (Bochkarev ym. 1995). Domeeni on n. 150 aminohappoa pitkä. Proteiini tarttuu sen avulla episomaalisen EBV DNA:n *oriP*-alueeseen ja säätelee siten DNA:n kopioitumista tytärsoluihin.

Domeenin sisus koostuu kahdeksan peptidijuosteen muodostamasta β -tynnyristä ja sitä ympäröivistä kuudesta α -helixistä.



Kuva 2.2.: EBNA1-proteiinin dimeerisoituva domeeni

Sisin osa domeenia saa aikaan dimerisoitumisen, kun taas domeenin uloimmat osat ovat vastuussa sen sitoutumisesta spesifiseen kohtaan DNA-juosteessa. (Cruickshank ym., 2000)

3 Proteiinin tuotto ja puhdistus, EBNA1

3.1 Tuottosysteemit

EBNA1-proteiinin tuottaminen saattaa olla hankalaa *E.coli* soluissa, sillä proteiini sisältää paljon kodoneja, jotka ovat harvinaisia *E.colissa*. Tällöin proteiinin tuottotaso jää yleensä alhaiseksi. Tähän mennessä EBNA1-proteiinista on tuotettu *E.colissa* vain dimerisoituva, DNA:han sitoutuva osa, joka sisältää vain vähän harvinaisia kodoneita (Bochkarev ym. 1995). Duellman ja Burgess kertovat kuitenkin artikkelissaan (2005) tuottaneensa kokonaista EBNA1-proteiinia menestyksekkäästi *E.coli* BL21 (DE3) Rosetta2 solulinjassa. Kyseinen solulinja sisältää myös plasmidin, joka koodaa harvinaisien kodonien tRNA:n geenejä. Duellman ja Burgess arvioivat saavuttaneensa EBNA1 tuottotasoksi 0,5-1 % kokonaisproteiinimäärästä. Proteiinin puhdistus suoritettiin tutkimuksessa C-terminukseen liitetyn His-tagin avulla.

Prokaryoottisoluissa biologisesti aktiivisen EBNA1 proteiinin tuotto saattaa olla ongelmallista myös siksi, että proteiini sisältää translaation jälkeisiä modifikaatioita, mm. fosforylaatiota (Polvino-Bodnar 1988), joihin prokaryoottisolut eivät kykene. Siitä huolimatta Duellmanin ja Burgessin tuottama EBNA1 oli aktiivista (se kykeni sitoutumaan kohde-DNA:han). Tutkimuksessa tuotettua proteiinia käytettiin mm. monoklonaalisten vasta-aineiden tuottoon.

Hyönteissoluissa EBNA1-proteiinia on tuotettu varsin menestyksekkäästi. Eräs hyönteissolutuoton etuna on niiden kyky nisäkässolujen kaltaisiin translaation jälkeisiin modifikaatioihin, kuten fosforylaatioihin, ja tällöin biologisesti aktiivisen proteiinin saantoon on suurempi mahdollisuus kuin esim. prokaryoottisoluilla (Kost ym. 2005). Ensimmäisen baculo-EBNA konstruktin esittelivät Frappier ja O'Donnell vuonna 1991. He tuottivat EBNA1 proteiinia hyönteissoluissa ja puhdistivat proteiinin käyttäen

affiniteettikromatografiaa. Tuloksena saatiin 1 mg homogeenista EBNA1 proteiinia/ 9×10^8 Sf9 hyönteissoluja. Samaa bakulovirusta käytti myös Meij tutkimuksessaan (2000), jossa pyrittiin bioreaktoritason kasvatukseen ja proteiinin puhdistusprosessin tehostamiseen. Meij ym. tuottivat proteiinia 1 litran vetoisessa bioreaktorissa ja optimoivat puhdistuksen yksivaiheiseksi, jolloin proteiinin saanto oli $0,8 \text{ mg}/6 \times 10^7$ Sf9 soluja.

Nisäkässolujen käyttöä humaaniproteiinien tuotossa puoltaa niiden kyky translaation jälkeisiin muokkauksiin, jolloin varmimmin saadaan tuloksena biologisesti aktiivista proteiinia. EBNA1-proteiinin tuotosta nisäkässoluissa ei löytynyt kirjallisuudesta mainintaa, johtuen todennäköisesti siitä, että vaivattomimmillakin tuottosysteemeillä kuten *E.coli* ja baculovirussysteemit (Duellmann ja Burgess 2005, Frappier ja O'Donnel 1991 ja Meij ym. 2000) ollaan saatu riittävän tarkasti alkuperäisen kaltaista EBNA1-proteiinia.

3.2 Proteiinin puhdistusmenetelmiä

EBNA1 proteiinia voidaan puhdistaa tehokkaasti käyttämällä sen sitoutumiskykyä spesifiseen DNA sekvenssiin. Tätä ominaisuutta käyttivät hyväkseen ainakin Meij ym. tutkimuksessaan (2000) kehittäessään yhden vaiheen puhdistussysteemin EBNA1-proteiinille. Menetelmässä he käyttivät FR-domeenin PCR-tuotetta sidottuna kromatografia pylvääseen.

EBNA1-proteiinia on puhdistettu myös kokoon perustuvalla kromatografialla (Duellman ja Burgess, 2005). Tavoitteena oli ennemmin proteiinin karakterisointi kuin puhdistaminen. Prosessissa käytettiin modifioitua EBNA1-muotoa, jonka monomeerin koko olisi n. 50 kDa, joten dimeerisen muodon kooksi oletettiin n. 100 kDa. Lähtökohtaisesti oletettiin, että EBNA1 on dimeerisessä muodossa. Vertailuproteiineina käytettiin aldolaasia (158 kDa) ja albumiinia (66 kDa), jotka eluoituivat fraktioihin 62-69 ja 74-78 ml, tässä järjestyksessä, EBNA1 eluoituessa fraktioihin 62-66 ml. Tästä päätellen EBNA1 ilmenee joko epäsymmetrisenä dimeerinä tai jonkinlaisena monomeerinä.

Metalli-ionin ja histidiinihännän välistä sitoutumista on jo pitkään käytetty tehokkaana proteiinien puhdistusmenetelmänä (immobilized metal ion affinity chromatography IMAC). Menetelmä perustuu histidiinin imidatsoliryhmien kykyyn sitoutua metalli-ioneihin. Proteiiniin liitetään 6-8 histidiinin pituinen jakso, jolla proteiini puhdistetaan expression

jälkeen muista soluproteiineista. Kromatografiamatriksista proteiini irrotetaan joko eluimalla vapaalla imidatsolilla tai käyttämällä histidiinihännän ja proteiinin väliin liitettyä entsyymaattista katkaisukohtaa (esim. thrombiini) (Porath 1992). Menetelmä ei ole hinnaltaan erityisen edullinen, mutta sillä saadaan puhdistettua proteiinia nopeasti ja tehokkaasti, jopa pelkästään yhdellä puhdistusstepillä (Meij ym. 2000).

TUTKIMUKSEN TARKOITUS

Tämä tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää bakuloviruskonstruktin, jolla EBNA1-proteiinin tuotto hyönteissoluissa olisi mahdollista. Tuotettu proteiini oli tarkoitus puhdistaa metalli-ioni affiniteettikromatografialla ja tuloksena saatu proteiini käyttää EBV-diagnostiikkakiteissä.

Tämän työn kirjallisessa osassa perehdyttiin Epstein-Barr viruksen merkitykseen taudinaiheuttajana ja syöpää aiheuttavana viruksena. Johdannossa sivutaan myös EBV-diagnostiikkaa. Lisäksi perehdytään Epstein-Barr viruksen nukleaariseen antigeeniin 1 (EBNA1) ja sen toimintaan, rakenteeseen ja ominaisuuksiin.

MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4 EBNA1-geenikonstruktion liittäminen pFastBac™ vektoriin

pFastBac™ vektorin avulla pystytään viemään haluttu kohdegeeni osaksi baculoviruksen genomia. EBNA-geeni eristettiin Kanadasta Lori Frappierilta saadusta bakuloviruksesta (bEBNA1) PCR-reaktioiden avulla. Kohdegeenistä oli jo valmiiksi poistettu gly-ala toistosekvenssi (emäsparit 90-327). Geenin nukleotidisekvenssi on esitetty liitteenä 1.

4.1 Virus-DNA:n eristys

Baculoviruksen DNA eristettiin hyönteissolukasvatuksesta, joka oli infektoitu viruksella 3-4 vuorokautta aikaisemmin. Solut ja solujäämät poistettiin sentrifugoimalla. Viruspartikkelit ultrasentrifugoitiin saadusta supernatantista putken pohjalle, jonka jälkeen poistettiin supernatantti ja liuotettiin viruspelletti 0,1 × TE-puskuriin.

Eristetyt virukset siirrettiin DNA uuttoa varten eppendorf-putkeen ja siihen lisättiin natriumdodekyylisulfaattia siten, että pitoisuudeksi tuli 2 %. Putkeen lisättiin myös fenolia. Näin muodostetut kaksi faasia erotettiin sekoituksen jälkeen sentrifugoimalla, jonka jälkeen yläfaasisiirrettiin uuteen eppendorf-putkeen ja siihen lisättiin fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholia (25:24:1). Jälleen sekoitettiin ja sentrifugoitiin, jonka jälkeen yläfaasi siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen. Yläfaasiin lisättiin kloroformi-isoamyylialkoholia (24:1), ja sekoituksen jälkeen faasit erotettiin jälleen sentrifugoimalla. Yläfaasi siirrettiin taas uuteen koeputkeen, ja sekaan lisättiin natriumkloridia siten, että sen pitoisuus oli 0,2 M, sekä jääkylmää etanolia. DNA:n annettiin saostua -20 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä saostunut DNA sentrifugoitiin putken pohjalle ja pestiin 70 % etanolilla. Pesun jälkeen pelletti kuivattiin huoneenlämmössä etanolijäämien poistamiseksi, jonka jälkeen DNA jälleen liuotettiin 0,1 × TE-puskuriin. Eristettyä DNA:ta säilytettiin + 4 °C:ssa.

4.2 PCR-reaktiot

Koska tavoitteena oli tehdä kolme erilaista konstruktia, piti kohdeproteiinin geenisekvenssiin lisätä erilaiset restriktioentsyymien tunnistuskohdat. Kaikissa liitoksissa käytettiin eri restriktioentsyymiä, jotta välttyttäisiin vääriltä positiivisilta tuloksilta. Restriktioensyymien kohdat liitettiin kohdeproteiinin geenisekvenssiin erilaisia PCR-alukkeita käyttäen. Alukkeet tilattiin TAG Copenhagenilta, ja niiden sekvenssit on esitetty taulukossa 4.1 (restriktioentsyymien tunnistuskohdat merkitty nuolella).

Alukkeen 1 restriktioentsyymien tunnistuskohtaa käytettiin puhdistussekvenssin (6xHis) sisältävän oligonukleotidin liittämiseen EBNA1-geenin 5' päähän ja vastaavasti aluketta 3 oligonukleotidin liittämiseen 3' päähän. Alukkeiden 2 ja 4 sisältämiä restriktioentsyymien tunnistuskohtia käytettiin kohdegeenin viemiseen plasmidiin geenin 5'- ja 3'-päissä tässä järjestyksessä. Muodostuneet PCR-tuotteet nimettiin primerien mukaan siten, että geeni, joka sisälsi 6xHis-tagin 5'-päissä nimettiin EBNA1 (1,4) -konstrukiksi, 3'-päissä oleva puhdistustagillinen geeni sai nimen EBNA1 (2,3) ja 6xHis lisättynä geenin molempiin päihin on yhtä kuin EBNA1 (1,3). PCR-reaktioseoksen koostumus on esitetty taulukossa 4.2, ja käytetyn puskurin koostumus liitteessä 1. Reaktioissa käytetty PCR-sykli on esitetty taulukossa 4.3.

Taulukko 4.1: PCR-alukkeet.

Aluke	Nukleotidisekvenssi	Restriktioents.
Primer 1	5'-CGT ACG A [↓] AG CTT TCT GAC GAG GGG CCA GG-3'	HindIII
Primer 2	5'-CGT AGC G [↓] AA TTC ATG TCT GAC GAG GGG CC-3'	EcoRI
Primer 3	5'-CGC CTA C [↓] TC GAG CTC CTG CCC TTC CTC AC-3'	XhoI
Primer 4	5'-GCA AGT G [↓] CG GCC GCT CAC TCC TGC CCT TCC TC-3'	NotI

PCR reaktiotuotteet ajettiin reaktion jälkeen agarosigeelielektroforeesissa oikeiden PCR tuotteiden toteamiseksi. PCR-tuotteet eristettiin geeliltä käyttäen GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kittä (Amersham Biosciences).

Taulukko 4.2: PCR-reaktioseos

5' aluke	1,5 µl
3' aluke	1,5 µl
templaatti DNA	3,0 µl
10 × puskuri	5,0 µl
dNTP sekoitus 1 mM	5,0 µl
DMSO	3,0 µl
H ₂ O	25,0 µl
DynazymeII-entsyymi	1,0 µl
Yhteensä	50 µl

Taulukko 4.3: PCR-sykli

Sykli toistettiin kohdasta 4 kohtaan 2 35 kertaa.

1°	94 °C	3 min
2°	94 °C	45 s
3°	61/65 °C *	45 s
4°	72 °C	1 min
5°	72 °C	10 min
6°	4 °C	∞

×35

** Annealing lämpötila riippui käytetyistä alukkeista. Reaktiolle, jossa käytettiin alukkeita 1 ja 3, annealing lämpötila oli 61 °C, muut reaktiot toimivat paremmin annealing-lämpötilassa 65 °C.*

4.2.1 Agarosigeelielektroforeesi

PCR-tuotteet tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla. AGE ajossa käytettiin 0,8 % agarosigeeliä, johon oli valmistusvaiheessa lisätty etidiumbromidia siten, että sen lopullinen pitoisuus geelissä oli 5 µg/ml. Geelin koostumus on esitetty taulukossa 4.4.

4.3 Digestiot

4.3.1 PCR-tuotteiden digestointi

PCR tuotteet piti digestoida ennen ligaatiota kohessiivisten päiden muodostamiseksi. Digestioissa käytettiin MBI Fermentasin restriktioentsyymejä ja puskureita. Digestointiin käytetyt reaktioseokset on esitetty EBNA1 (1,3) ja EBNA1 (1,4) osalta taulukossa 4.5. Konstruktin EBNA1 (2,3) digestioreaktion komponentit ovat taulukossa 4.6. Viimeinen

reaktio piti jakaa kahteen osaan, sillä entsyymeille ei löytynyt yhteistä puskuria. Tällöin reaktiotuote piti välillä puhdistaa ja jatkaa puhdistuksen jälkeen reaktiolla 2^o.

Kaikkia reaktioita inkuboitiin + 37 °C:ssa yön yli. Inkuboinnin jälkeen reaktiotuotteet puhdistettiin entsyymeistä ja pilkkotuista DNA pätkistä GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kitillä (Amersham Biosciences). Valmiita digestiotuotteita säilytettiin + 4 °C:ssa.

Taulukko 4.5: EBNA1 (1,3) ja EBNA1 (1,4) digestioreaktioseos

EBNA1 (1,3)		EBNA1 (1,4)	
PCR-tuote	52 µl	PCR-tuote	46 µl
HindIII	1 µl	EcoRI	1 µl
XhoI	1 µl	XhoI	1 µl
R ⁺ 10 x puskuri	6 µl	Y ⁺ tango 2 x puskuri	12 µl
	60 µl		60 µl

Taulukko 4.6: EBNA (2,3) digestioreaktioseos

Reaktio 1 ^o		Reaktio 2 ^o	
PCR-tuote	53 µl	1 ^o reaktiosta puhdistettu DNA	26 µl
HindIII	1 µl	NotI	1 µl
R ⁺ 10 x puskuri	6 µl	O ⁺ 10 x puskuri	3 µl
	60 µl		60 µl

4.3.2 Plasmidien digestiot

Kloonauksessa käytetyt plasmidit pBluescript ja pFastBacI digestoitiin EcoRI ja NotI restriktioentsyymeillä insertin lisäämistä varten. Reaktioseoksen koostumus on esitetty taulukossa 4.7. Reaktiota inkuboitiin + 37 °C:ssa n. 2,5 tuntia. Inkuboinnin jälkeen reaktioseos ajettiin agarosigeelillä digestion onnistumisen toteamiseksi.

4.3.3 Tarkistusdigestiot

pFastBac™ vektorin transformaatio JM109 solujen jatkokasvatuksista varmistettiin tarkastusdigestiolla. Plasmidit eristettiin kasvatuksista Macherey-Nalgel plasmidineristyskitin avulla. Digestio EBNA1 (1,3) insertin sisältävälle vektorille tehtiin Hind III ja XhoI restriktioentsyymeillä yhdessä ja erikseen (1^o, 2^o ja 3^o) talukon 4.9 mukaisesti, ja EBNA1 (2,3) insertin sisältävän plasmidin tarkastusdigestio pelkällä EcoRI entsyymillä taulukossa 4.8. Digestion annettiin tapahtua + 37 °C:ssa n. 2,5 tuntia, jonka jälkeen se ajettiin agarosigeelillä. Lopullinen varmistus tehtiin vielä sekvensoimalla plasmidi.

Taulukko 4.4. AGE-geelin koostumus

Agaroosi	1,6 g
TAE-puskuri	200 ml
Etidiumbromidi (10 mg/ml)	10 µl

Taulukko 4.7: Plasmidien digestiot

Plasmidia	20 µl
EcoRI	0,5 µl
NotI	0,5 µl
O ⁺ 10 × puskuri	5 µl
	50 µl

Taulukko 4.8: EBNA1 (2,3) pFastBac™ tarkistusdigestio

Plasmidia	17 µl
EcoRI	1 µl
O ⁺ 10 × puskuri	2 µl
	20 µl

Taulukko 4.9: EBNA1 (1,3) pFastBac™ tarkistusdigestio

	1°	2°	3°
Plasmidia	5 µl	5 µl	5 µl
HindIII	1 µl	1 µl	
XhoI	1 µl		2 µl
R ⁺ 10 × puskuri	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	11 µl	12 µl	12 µl
	20 µl	20 µl	20 µl

4.4 Ligaatiot

4.4.1 Oligojen pariuttaminen

Puhdistustagi eli polyhistidiinisekvenssi liitettiin kohdegeeniin oligonukleotidin avulla. Oligot tilattiin TAG Copenhagenilta yksijuosteisena DNA:na, ja ne liuotettiin valmistajan ohjeen mukaisesti veteen, jolloin niiden pitoisuudeksi saatiin 100 µM. Oligojen sekvenssi on esitetty taulukossa 4.10. Sekvenssi sisältää puhdistukseen käytettävän histidiinihännän, tunnistuskohdan thrombiini-entsyymille His-tagin poistamiseksi tarvittaessa sekä restriktioentsyymien tunnistuskohdan. Yksijuosteiset oligot piti pariuttaa keskenään kaksijuosteisen DNA:n ja kohessiivisten päiden muodostamiseksi. Kohessiivisten päiden avulla oligonukleotidit ligatoitiin kohdegeeniin ja plasmideihin. Oligojen pariuttamiseen käytetty reaktioseos on esitetty taulukossa 4.11. Reaktioseos lämmitettiin 100 °C:n, jossa se pidettiin 10 minuuttia. Tämän jälkeen sen annettiin hitaasti jäähtyä huoneenlämpöiseksi. Pariutettuja oligoja säilytettiin + 4 °C:ssa.

Taulukko 4.10: Oligonukleotidit

His-tagia kodaavat jaksot merkitty kursivilla, stop-kodonit punaisella. Trombiini-entsyymien tunnistuskohta on merkitty sinisellä.

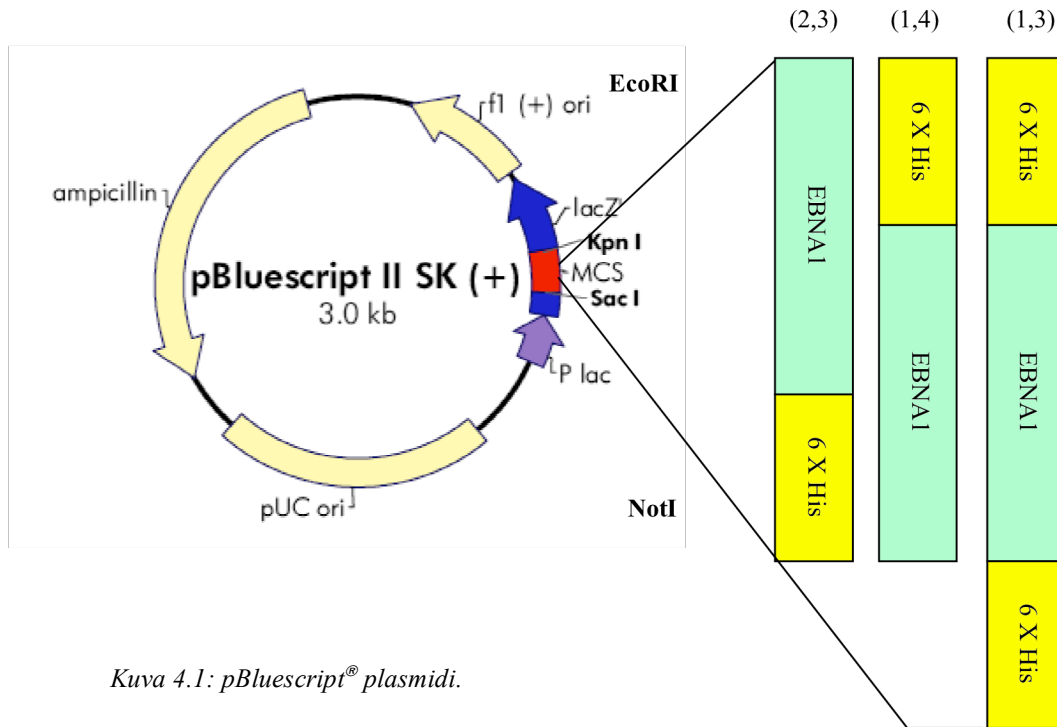
Oligonukleotidi	Sekvenssi
5' oligo coding	5'-AA TTC ATG <i>CAT CAT CAT CAT CAT CAT</i> AGC AGC GGC A-3'
5' oligo noncoding	3'-G TAC <i>GTA GTA GTA GTA GTA GTA</i> TCG TCG CCG TT CGA-5'
3' oligo coding	5'-TC GAG AGC AGC GGC <i>CAC CAC CAC CAC CAC CAC</i> TGA GC-3'
3' oligo noncoding	3'-C TCG TCG CCG <i>GTG GTG GTG GTG GTG GTG</i> ACT CGC CGG -5'

Taulukko 4.11: Oligojen pariuttamiseen käytetty reaktioseos

Oligo A	1 µl
Oligo B	1 µl
H ₂ O	98 µl
	100 µl

4.4.2 Ligaatiot pBluescript® plasmidiin

Alakloonauksvektorina käytettiin MBI Fermentasin pBluescript® II SK-plasmidia, jonka geenikartta on kuvassa 4.1. Kuvassa on myös esitetty eri EBNA1-konstruktien kaavamainen sijoittaminen vektoriin. Ligaatiot alakloonauksvektoriin tehtiin lisäämällä kaikki tarvittavat DNA juosteet (EBNA-1, oligot ja plasmidi) samaan reaktioseokseen. Tarkoitus oli tuottaa suuri määrä valmista inserttiä pienemmässä plasmidissa jotta ligaatio suurempaan pFastBac™ vektoriin onnistuisi varmemmin. Reaktioseos EBNA1 (1,3)-konstruktille on esitetty taulukossa 4.12. Kahdelle muulle konstruktille käytetty reaktioseos on esitetty taulukossa 4.13. Reaktioiden annettiin tapahtua iltapäivän ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne siirrettiin +4 °C:seen 2-3 vrk ajaksi.



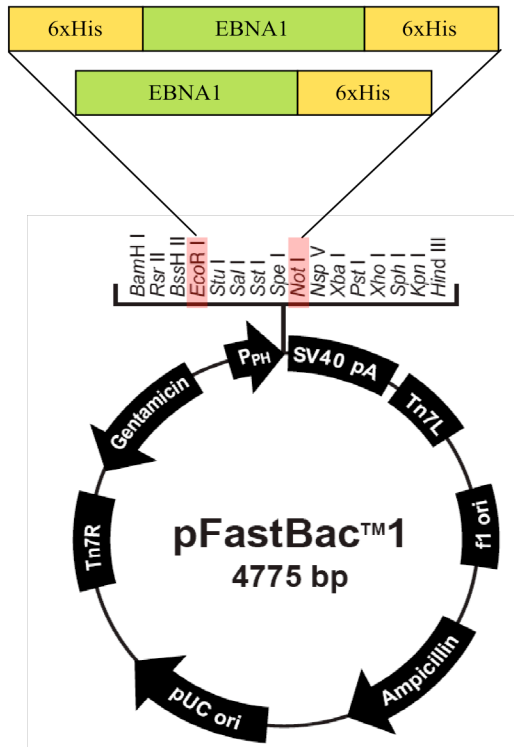
Kuva 4.1: pBluescript® plasmidi.

4.4.3 Insertin sisältävän pFastBac™ I vektorin valmistus

pBluescript® plasmidista eristetty ja digestoitu insertti ligatoitiin pFastBac™ I-vektoriin (kuva 3.2), jonka avulla halutun proteiinin geeni oli mahdollista liittää osaksi baculoviruksen genomia. Ligaation reaktioseos on esitetty taulukossa 3.12. Ligaation annettiin tapahtua aluksi huoneenlämmössä, jonka jälkeen se siirrettiin jääkaappiin muutamaksi vuorokaudeksi.

Taulukko 4.12: Ligaatiot pBluescript®-plasmidiin

EBNA1 (1,3)		EBNA1 (1,4) ja (2,3)	
Digestoitu plasmidi	2 µl	Digestoitu plasmidi	2 µl
EBNA1	3 µl	EBNA1	4 µl
5' pään oligo	1,5 µl	Oligo	2 µl
3' pään oligo	1,5 µl	10 x puskuri	1 µl
10 x puskuri	1 µl	T4 DNA ligaasi	1 µl
T4 DNA ligaasi	1 µl		
	10 µl		10 µl



Kuva 4.2: pFastBac™-vektori

Taulukko 4.13: Insertin ligoatio pFastBac™-vektoriin

Digestoitu pFastBacI	4 µl
T4 DNA ligaasi	2 µl
Insertti	8 µl
10 × ligoatiopuskuri	2 µl
H ₂ O	4 µl
	20 µl

5 Transformaatiot

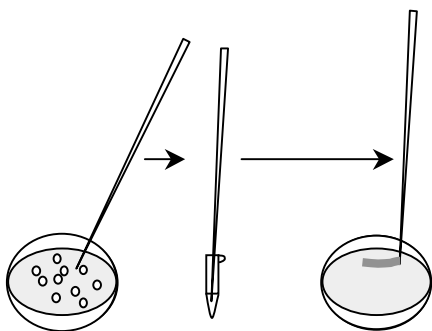
5.1 Plasmidin transformaatio JM109 soluihin

Transformaatiossa käytettiin kompetentteja JM109 soluja, joita säilytettiin – 70 °C:ssa. Pakastimesta solut siirrettiin suoraan jäälle, jossa niiden annettiin sulaa. Solut jaettiin eppendorf-putkiin 30 mikrolitran eriin. Kuhunkin putkeen lisättiin 0,5-1,0 µl ligoatioreaktioseosta. Tämän jälkeen putkia inkuboitiin jäällä 30 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen soluille tehtiin lämpösokkikäsittely, jossa niitä pidettiin + 42 °C vesihauteella 40 sekuntia. Seuraavaksi putkiin lisättiin SOC kasvatusliuosta ja solut jätettiin kasvamaan + 37 °C ravisteluun. Tunnin ravistelun jälkeen kasvustot levitettiin LB_{amp} maljoille ja niitä inkuboitiin + 37 °C:ssa yön yli. Seuraavana päivänä saaduista pesäkkeistä tehtiin pesäke-PCR varmistamaan, että pesäke sisälsi myös halutun insertin.

5.2 Pesäke-PCR

Transformaatiassa saaduista pesäkkeistä valittiin 20 pesäkettä pesäke-PCR tarkastelua varten. Pesäke otettiin maljalta siirrostussilmukkaan, joka upotettiin PCR reaktioseokseen ja siitä vielä viivasiirrostuksena maljalle, josta jatkokasvatus oli mahdollista tehdä, mikäli PCR tulos olisi positiivinen (kuva 5.1). Pesäke-PCR reaktioseos on esitetty taulukossa 5.1. Alukkeina käytettiin samoja alukkeita kuin EBNA1-geenin eristämiseen bakulovirusgenomista (taulukko 4.1), ja myös käytetty reaktiosykli oli sama (taulukko 4.3). Reaktion jälkeen PCR tuotteet ajettiin agarosigeelillä positiivisten pesäkkeiden toteamiseksi. Positiivisista tuloksista valittiin parhaimmat jatkokasvatukseen.

Kuva 5.1: Pesäke-PCR



Taulukko 5.1: Pesäke-PCR reaktioseos

5' aluke (20 pmol)	0,5 µl
3' aluke (20 pmol)	0,5 µl
10 × puskuri	3,0 µl
dNTP sekoitus 10 mM	1,0 µl
DMSO	2,0 µl
H ₂ O	21,0 µl
DynazymeII-entsyymi	1,0 µl
	30 µl

5.3 Halutun plasmidin sisältävien pesäkkeiden jatkokasvatus ja plasmidien puhdistus kasvatuksesta

Pesäkkeet, joista pesäke-PCR:ssä saatiin positiivinen tulos, valittiin jatkokasvatukseen. Jatkokasvatus tehtiin liukoisessa LB mediumissa, johon oli lisätty ampicilliinia siten, että sen lopullinen pitoisuus mediumissa oli 50 µg/ml. Kasvatus tehtiin ravistelussa, + 37 °C yön yli.

Seuraavana päivänä kasvatuksesta eristettiin plasmidi Macherey-Nagel plasmidineristyskitin avulla. Eristetylle plasmidille tehtiin digestio (taulukko 5.2), jossa insertti pilkottiin pBluescriptista jatkoligaatiota varten.

Digestion annettiin tapahtua + 37 °C:ssa 3 tuntia, jonka jälkeen digestiotuotteet ajettiin agarosigeelielektroforeesilla. Insertti eristettiin geeliltä kaupallista geelieristyskittiä käyttäen.

Taulukko 5.2: EBNAI-konstruktin digestio plasmidista:

Puhdistettu plasmidi	30 µl
EcoRI	1 µl
NotI	1 µl
O ⁺ 10 × puskuri	4 µl
H ₂ O	4 µl
	60 µl

6 Bakuloviruksen valmistus

6.1 Bacmid DNA:n tuotto ja eristys

Edellisenä päivänä laitettiin DHC10 bakteereja kasvamaan LB maljalle, joka sisälsi tetramysiini ja kanamysiini antibiootteja. Maljaa inkuboitiin yön yli + 37 °C:ssa. Seuraavana päivänä kasvatetut solut tehtiin kompetenteiksi suspensoimalla niitä

jääkylmään kalsiumkloridiin. Kompetenteille soluille lisättiin insertin sisältävää pFastBacI plasmidia, jonka jälkeen seosta inkuboitii jäällä 30 minuuttia. Tämän jälkeen soluille annettiin lämpösokki + 37 °C 2 minuuttia, jonka jälkeen solut jäädytettiin jälleen jäähauteessa. Putkeen lisättiin SOC kasvatusliuosta ja sitä inkuboitii + 37 °C:ssa ravistelussa neljä tuntia. Kasvatuksen jälkeen solut levitettiin LB maljoille, jotka sisälsivät tetra-, kana- ja gentamysiiniä sekä IPTG:tä ja BluoGalia. Maljoja inkuboitii kaksi päivää + 37 °C:ssa, jonka jälkeen tarkasteltiin muodostuneiden pesäkkeiden värejä. Jatkokasvatukseen valittiin valkoiset pesäkkeet. Valituille pesäkkeille tehtiin jatkokasvatus LB mediumissa, johon oli lisätty tetra-, kana- ja gentamysiiniä. Kasvatusta inkuboitii + 37 °C:ssa 24 tuntia. Kasvatuksen jälkeen solut sentrifugoitii pohjaan ja supernatantti poistettiin. Solupelletti liuotettiin SOLI liuokseen. Putkeen lisättiin SOLII liuosta, joka hajotti solut ja vapautti DNA:n. Viiden minuutin inkuboinnin jälkeen lisättiin tipoittain ja samalla varovasti sekoittaen SOLIII liuosta. Putkea inkuboitii jäällä kymmenen minuuttia, jonka jälkeen se sentrifugoitii. Supernatantti siirrettiin uuteen putkeen ja siihen lisättiin isopropanolia DNA:n saostamista varten. DNA:n annettiin saostua jäällä 10 minuuttia, jonka jälkeen se pelletoitii putken pohjalle sentrifugoimalla. Pelletti pestii 70 % etanolilla ja annettiin kuivua huoneenlämmössä. Lopuksi Bacmid-DNA liuotettiin TE puskuriin ja säilytettiin + 4 °C:ssa.

6.2 *Bac-to-bac®* systeemi

Bakulovirus valmistettiin transfektoimalla viruksen genomi hyönteissolun sisään. Aluksi maljattiin 1×10^6 solua maljalle, ja odotettiin kunnes ne olivat kiinnittyneet pohjaan. Sillä aikaa valmistettiin transfektioon käytetystä lipofektiinistä laimennos hyönteissolumediumiin, sekä liuos, joka sisälsi Bacmid DNAta sekä hyönteissolumediumia. 45 minuutin inkubaation jälkeen nämä laimennokset yhdistettiin ja niitä inkuboitii huoneenlämmössä vielä 15 minuuttia.

Pohjaan kiinnittyneiltä hyönteissoluilta poistettiin mediumi, ja tilalle lisättiin medium, joka sisälsi lipofektiini-DNA kompleksin. Soluja inkuboitii + 28 °C:ssa viisi tuntia. Puolen tunnin välein varmistettiin, että medium oli levittynyt tasaisesti solukerroksen päälle. inkubaation jälkeen soluille lisättiin normaalia mediumia ja kasvatusta jatkettiin vielä 72 tuntia.

Kasvatuksen jälkeen soluja tarkasteltiin mikroskopioimalla. Mikäli solut vaikuttivat infektoituneilta, kerättiin virus ja tehtiin jatkoinfektio. Jatkoinfektiossa siirrostettiin 2×10^6 solua soluviljelypulloon 5 ml:ssa hyönteissolumediumia. Solut infektoidaan 100 mikrolitralla transfektiosta saadulla virusmediumilla, ja inkuboidaan 3-4 vrk. Mikroskopoinnissa hyvin infektoituneelta näyttävästä kasvatuksesta tehtiin virusstokki ja soluista tehtiin SDS-page ja immunoblottaus kohdeproteiinin detektoimiseksi.

7 Proteiinin tuotto ja puhdistus

7.1 Metallioni affiniteettikromatografia

Affiniteettikromatografia perustuu kohdemolekyylin reversiibeliin sitoutumiseen ligandiin, joka on kovalenttisesti kiinnitetty matrixiin. Affiniteettikromatografian onnistumiseksi vaaditaan usein kohdemolekyylin biologisen aktiivisuuden sekä rakenteen varsin tarkkaa tietämystä, jotta erotteluolosuhteet voidaan määritellä sopiviksi. Affiniteettikromatografiassa käytettävä ligandi riippuu puhdistettavasta molekyylistä. Entsyymien puhdistamiseen voidaan käyttää esimerkiksi kohde-entsyymin substraattia. Affiniteettikromatografialla voidaan periaatteessa saavuttaa absoluuttinen puhtausaste juuri kohdemolekyylin ja ligandin välillä tapahtuvan spesifisen sitoutumisen ansiosta.

Metallioni affiniteettikromatografiassa käytetään matrixiin sidottua metalli-iona (esimerkiksi nikkeli, sinkki, kupari tai koboltti)

7.2 SDS-page ja immunoblottaus

SDS-Pagessa käytettiin 12 % geeliä, jonka koostumus esitetty taulukossa 7.1. Geelit valettiin 1,5 mm:n paksuisiksi ja ajoon käytettiin BioRadin MiniProtean geelielektroforeesilaitetta. Ajoon käytettiin 80-160 V jännitettä. Näytteisiin pyrittiin saamaan n. 2×10^6 solua, joiden päälle lisättiin 200 μ l näytepuskuria. Näytteet keitettiin (95 °C, 5 min) ennen ajoa.

Immunoblottauksessa toiselta SDS-page geeliltä siirrettiin proteiinit nitroselluloosakalvolle BioRadin blottauslaitteella. Proteiinien siirtämisen jälkeen kalvoa pestiin 3 x 5 min TBS

Tween-liuoksella. Kohdeproteiini detektoitiin nitroselluloosakalvolta immunologisesti polyhistidiinihännälle spesifisen vasta-aineen avulla (6xHis Monoclonan ab, 1:5000, Clontech, Palo Alto, CA, USA). Vasta-aineliuoskäsittely kesti tunnin, jonka jälkeen toistettiin jälleen TBS-tween-pesut 3 x 5 min. Sekundäärisenä vasta-aineen käytettiin Goat Anti-Mouse-vasta-ainetta (1:3000, Bio-Rad). Myös sekundäärisellä vasta-aineella käsittely kesti tunnin, jonka jälkeen toistettiin jälleen pesut TBS-Tweenillä. Lopuksi kalvoa käsiteltiin APA-puskurilla viiden minuutin ajan detektion mahdollistamiseksi. Vasta-aineissa käytettiin maitojauhetta 0,5 g/10 ml epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi.

Taulukko 7.1: SDS-page, geelin koostumus

	Erotteleva geeli	Konsentroiva geeli
H ₂ O	13,2 ml	6,8 ml
30 % akryyliamidimix	14 ml	1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8	10 ml	1,25 ml
10 % SDS	0,4 ml	0,1 ml
10 % APS	0,4 ml	0,1 ml
TEMED	0,016 ml	0,01 ml

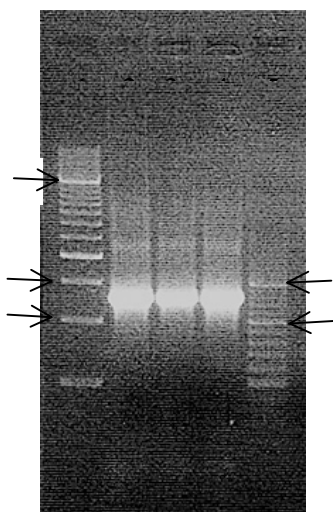
TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

Seuraavassa on esitetty työn eri vaiheissa saatuja tuloksia. Kappaleessa 8 on kaikkiin konstruktihin tarvittavien PCR-reaktioiden tulokset, jonka jälkeen kunkin konstruktin kohdalla saadut tulokset esitetään erikseen kappaleissa 9, 10 ja 11.

8 PCR-reaktiot

EBNA1 (1,4), (2,3) ja (1,3) konstruktija varten tarvittiin sopivat PCR-tuotteet, joihin alukkeiden avulla saatiin liitettyä tarvittavat restriktioentsyymikohdat. PCR-tuotteiden tulokset kuvassa 8.1. Geelille pipetoidut kontrollireaktiot primeri ilman templaattia ja templaatti ilman primereita eivät antaneet bandeja.

PCR-reaktiot onnistuivat hyvin, ja niiden pohjalta lähdettiin kehittämään toimivaa, EBNA1-proteiinia puhdistushäntineen koodaavaa bakulovirusta.



Kuva 8.1. PCR reaktiot

Kaivo 1: MW 500 bp O'Range Ruler, MBI Fermentas

Kaivo 2: PCR-tuote, EBNA1 (1-3)

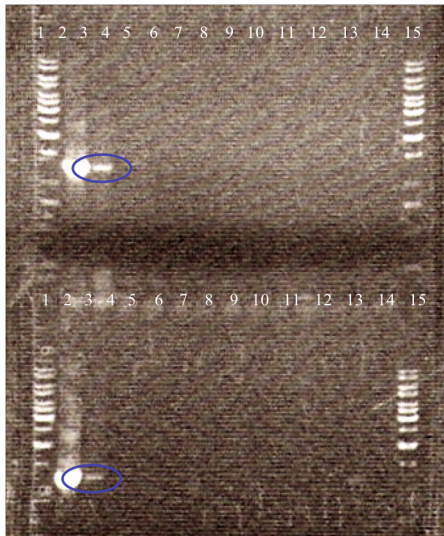
Kaivo 3: PCR-tuote, EBNA1 (1-4)

Kaivo 4: PCR-tuote, EBNA1 (2-3)

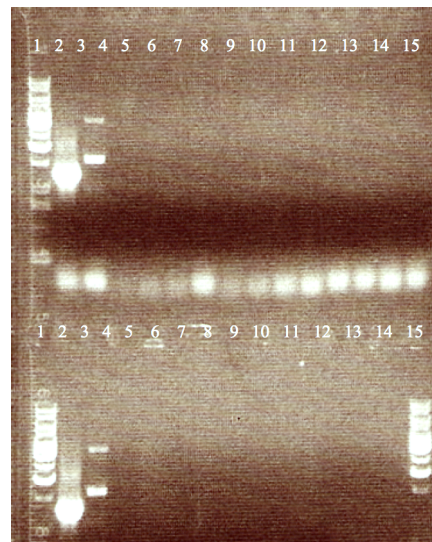
Kaivo 5: MW 100 bp O'Range Ruler, MBI Fermentas

9 6xHis-EBNA1 (1,4)

PCR-tuotteen liittämisen pBluescript-plasmidiin tehtiin kuten kappaleessa 4.4.2 on esitetty. Plasmidit transformoitiin JM109 soluihin ja maljattiin LB_{amp}-alustoille. Muodostuneista pesäkkeistä tehtiin pesäke-PCR, jonka tulokset on esitetty kuvassa 9.1. Mikään pesäkkeistä ei antanut positiivista tulosta, mutta huolestuttavampaa oli se, että negatiivinen kontrolli antoi positiivisen tuloksen (kuvassa ympyröity sinisellä). Tästä johtuen päätettiin konstruktin 1-4 transformaatio JM 109-soluihin tehdä uudestaan. Se ei kuitenkaan auttanut, vaan uudessakaan pesäke-PCR:ssä ei saatu positiivisi tuloksia (kuva 9.2). Lopulta tämän konstruktin valmistaminen päätettiin jättää tähän ja keskittyä muihin, jotka tässä vaiheessa antoivat lupaavampia tuloksia.



*Kuva 9.1: Pesäke-PCR EBNA1 (1,4)
YLÄ-JA ALARIVI
Kaivot 1 ja 15: MW MBI Fermentas Gene
Ruler 1 kb DNA ladder
Kaivo 2: Positiivinen kontrolli
Kaivo 3: Negatiivinen kontrolli
Kaivot 4-14: Näytteet*

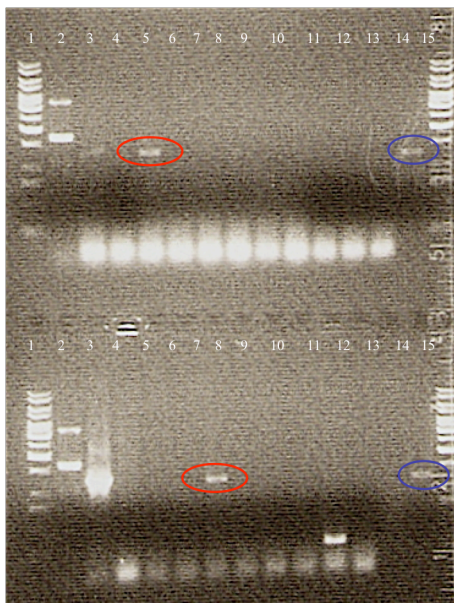


*Kuva 9.2: Pesäke-PCR EBNA1 (1,4)
YLÄ- JA ALARIVI
Kaivot 1 ja 15: MW MBI Fermentas
Gene Ruler 1 kb DNA ladder
Kaivo 2: Positiivinen kontrolli
Kaivo 3: Negatiivinen kontrolli
Kaivot 4-14: NäytteetEBNA1-6xHis*

10 EBNA1-6xHis (2,3)

10.1 Pesäke-PCR

JM109-soluihin viety pBluescript®-EBNA1 (2,3) konstruktin pesäke-PCR tulokset on esitetty kuvassa 10.1. Tulosten perusteella jatkokasvatukseen valittiin pesäkkeet 3 ja 15 (kuvassa ympyröity punaisella). Geelille pipetoitiin kontrolliksi myös valmista inserttiä, jonka perusteella voitiin varmistaa, että pesäke-PCR tuote on oikean kokoista (kuvassa ympyröity sinisellä). Jatkokasvatuksen jälkeen insertti digestoitiin ulos plasmidista EcoRI ja NotI-restriktioentsyymien avulla. Digestoinnin tulos näkyy kuvassa 10.2. Kuvien perusteella voidaan todeta, että kohdegeenin ligaatio plasmidiin onnistui hyvin, ja jatkokasvatukseen valitut pesäkkeet sisälsivät insertin.



Kuva 10.1: Pesäke-PCR EBNA1 (2,3)

YLÄRIVI:

Kaivot 1 ja 15: MW MBI Fermentas Gene Ruler 1 kb DNA ladder

Kaivo 2: Positiivinen kontrolli

Kaivot 3-13: Pesäke-PCR 1-11

Kaivo 14: Pelkkä insertti 2-3

ALARIVI:

Kaivot 1 ja 15: MW MBI Fermentas Gene Ruler 1 kb DNA ladder

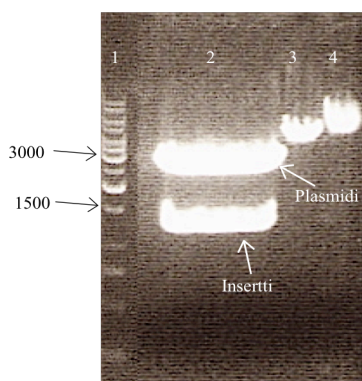
Kaivo 2: Positiivinen kontrolli

Kaivo 3: Negatiivinen kontrolli

Kaivot 4-12: Pesäke-PCR 12-20

Kaivo 13: Tyhjä

Kaivo 14: Pelkkä insertti 2-3



Kuva 10.2: Digestio pBluescript-EBNA1 (2-3)

Kaivo 1: MW MBI Fermentas Gene Ruler 1 kb DNA ladder

Kaivo 2: Digestoitu pBluescript-EBNA1 (2-3)

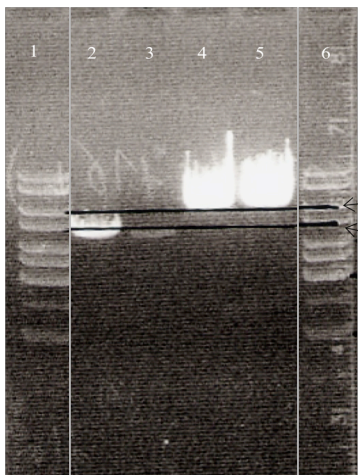
Kaivo 3: pBluescript-EBNA1 (2-3) digestoitu EcoRI

Kaivo 4: pBluescript-EBNA1 (2-3) digestoitu NotI

10.2 Ligaatio pFastBacTM-plasmidiin

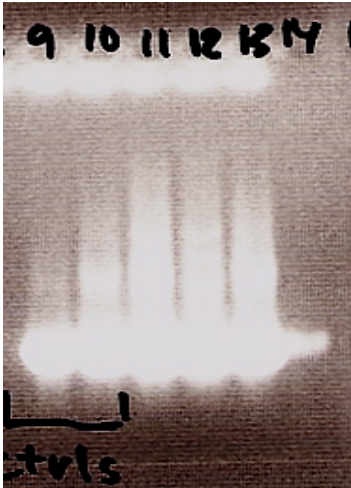
Geeliltä eristetty insertti EBNA1 (2,3) liitettiin pFastBacTMI-plasmidiin kuten kappaleessa 4.4.3 on kuvattu. Tuloksena LB_{amp} maljauksella saatiin yhteensä 30 pesäkettä. Pesäkkeistä valittiin 8 kasvatettavaksi LB-mediumissa. Plasmidien puhdistuksen jälkeen tehtiin tarkastusdigestio (kuva 10.3) varmistamaan, että valitut pesäkkeet varmasti sisälsivät plasmidin halutulla insertillä. Konstruktin sisältämä insertti myös sekvensoitiin (16.1.2003, Jarno Hörhä), aminohapposekvenssi on esitetty liitteenä 2. Aminohapposekvenssi oli odotetun kaltainen. Onnistuneiden pFastBacTMI-EBNA1-6xHis (2,3) konstruktien kanssa jatkettiin bacmidin, eli kohdegeenin sisältävän baculovirusgenomin valmistukseen.

10.3 Bacmid DNAn tuotto



Kuva 10.3: Tarkistusdigestio, konstrukt EBNA1 (2,3)
 Kaivo 1 ja 6: MW MBI Fermentas Gene Ruler 1 kb DNA ladder
 Kaivo 2: pilkottu pFastBac-plasmidi (EcoRI)
 Kaivo 3: Pilkottu pFastBac-plasmidi (EcoRI ja NotI)
 Kaivot 4 ja 5: pFastBac-EBNA1 (2-3), pilkottu EcoRI
 pFastBacTMkoko: 4775 bp (kaivo 2), n. 4740 bp (kaivo 3)

Bacmid-kasvatuksista valittiin 6 valkoista pesäkettä jatkokasvatukseen. Viivasiirrostuksella varmistettiin, että pesäkkeet olivat varmasti valkoisia, jonka jälkeen Bacmid-DNA eristettiin kasvatuksista ja tarkastettiin PCR:llä, että se varmasti sisälsi insertin. Tarkistus-PCR-tuotteiden ajo geelillä on nähtävissä kuvassa 10.4. Monistuneet EBNA1-sekvenssit näkyvät kuvasta selvästi, joten bacmid voidaan todeta onnistuneeksi.



*Kuva 10.4: EBNA1 (2,3) Bacmidin PCR-tarkistus.
Kaivo 9 ja 10: positiiviset kontrollit.
Kaivot 11-13: Bacmid-EBNA1 (2,3) PCR
Kaivo 14: Alkuperäinen BaculoEBNA1*

10.4 Baculovirus-EBNA1 (2,3)

Seuraavaksi tarkastetulla Bacmid-EBNA1 (2,3)-DNA:lla transfektoitiin sf9 hyönteissoluja. Muodostuneesta viruksesta tehtiin virusstockit pakastimeen myöhempää infektiota ja proteiinin tuottoa varten. Viruskonstruktin toimivuus tarkastettiin immunoblottauksella.

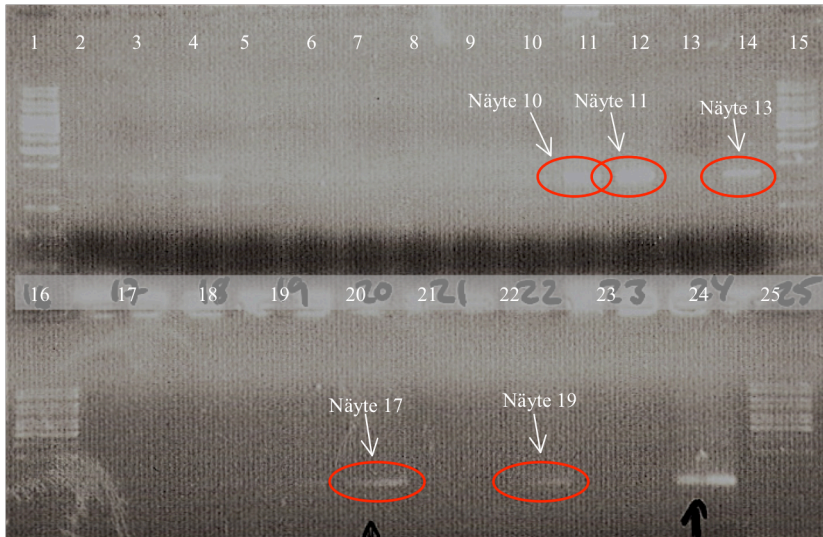
Blottauksen tuloksena voitiin todeta, että virus tuottaa EBNA1-proteiinia. Tuottomäärä oli kuitenkin varsin vähäinen, eikä proteiinin puhdistus onnistunut toivotulla tavalla. Saanto jäi liian pieneksi hyödynnettäväksi.

11 6xHis-EBNA1-6xHis (1,3)

11.1 Ligaatio pBluescript®-plasmidiin

Polymeraasiketjureaktiolla virustemplaattista monistettu EBNA1 ligatoitiin pBluescript®-plasmidiin ja transformoitiin tämän jälkeen JM109-soluihin. Myös kontrollitransformatio (pelkkä digestoitu pBluescript®) antoi pesäkkeitä, joten voidaan päätellä, ettei digestio ollut täydellinen.

Pesäke-PCR tulokset EBNA1 (1,3) pBluescript® plasmidille on esitetty kuvassa 11.1. Tulosten perusteella jatkokasvatukseen ja digestoitavaksi valittiin viisi pesäkettä (pesäkkeet 10, 11, 13, 17 ja 19, kuva 11.1)

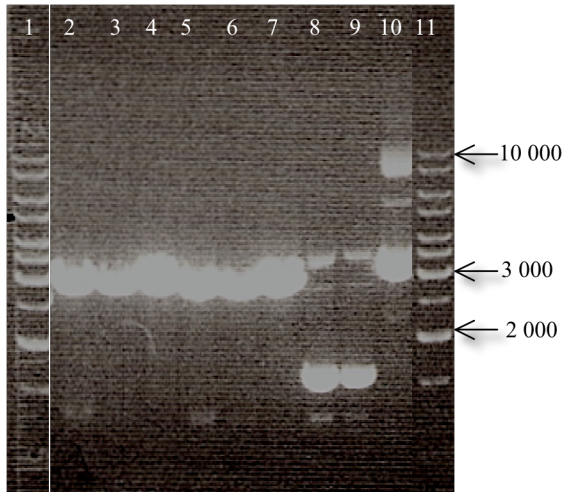


*Kuva 11.1: Pesäke-PCR EBNA1 (2-3)
Kaivot 1, 15, 16 ja 25: MW MBI
Gene Ruler, 1 kb DNA
ladder*

*Kaivot 2-14: Näytteet 1-13
Kaivot 17-23: Näytteet 14-20
Kaivo 24: Positiivinen kontrolli*

11.2 Ligaatio pFastBac™ I-vektoriin

Valittujen pesäkkeiden jatkokasvatuksen jälkeen tarkistettiin digestiolla agarosigeelielektroforeesilla pesäkkeistä 10, 11 ja 13, että ne todella sisälsivät halutunlaisen plasmidin (kuva 11.2). Kuvan perusteella voitiin todeta, että digestointi antoi vahvan, pBluescriptin kokoisen bandin (n. 3000 bp). Myös alempana on havaittavissa heikompia, pienempiä bandeja jotka viittaavat inserttiin. Digestoimattomat plasmidit kulkeutuivat geelillä pidemmälle superkierteisen konformaationsa vuoksi, paitsi pesäkkeen 13 plasmidi, joka jostain syystä näkyy geelillä ylempänä. Tästä eteenpäin jatkokasvatukset LB_A-mediumissa tehtiin käyttäen pesäkettä 10.



Kuva 11.2: pBluescript® 6xHis-EBNA1-6xHis konstruktin tarkistus

Kaivot 1 ja 11: MW MBI Fermantas Gene Ruler 1 kb DNA ladder

Kaivot 2-4: Pesäkkeistä 10, 11 ja 13 eristetty plasmidi, digestoitu NotI ja EcoRI-entsyymeillä

Kaivot 5-7: Pesäkkeistä 10, 11 ja 13 eristetty plasmidi, digestoitu HindIII ja XhoI-entsyymeillä

Kaivot 8-10: Pesäkkeistä 10, 11 ja 13 eristetyt plasmidit, digestoimaton

Plasmidin puhdistus kasvatuksista tehtiin NucleoSpin-kitillä (Macherey-Nalgel) ja niistä digestoitiin insertti ulos, jonka jälkeen se liitettiin pFastBac™ I-vektoriin. Saadut konstruktin sisältävät plasmidit transformoitiin JM109-soluihin, jonka jälkeen ne maljattiin LB_A-maljoille. Tuloksena maljauksesta saatiin 1 pesäke. Pesäke jatkokasvatettiin LB_{amp} mediumissa, jonka jälkeen tehtiin plasmidin eristys sekä tarkistusdigestio jonka tulokset ajettiin geelillä. Digestiossa pesäke vaikutti lähinnä pBluescript-kontaminaatiolta, joten siitä ei ollut syytä jatkaa eteenpäin. Palattiin pesäke-PCR:n perusteella tehtyihin jatkokasvatuksiin. Insertti ligatoitiin uudelleen pFastBac™ I-vektoriin joka transformoitiin JM109-soluihin, mutta jälleen tulokseksi saatiin ainoastaan 1 pesäke. Jatkokasvatuksessa ja tarkistusdigestiossa selvisi, että pesäke ei sisällä haluttua konstruktia (kuva11.3).

Ligaatiot ja transformaatiot toistettiin vielä useasti, mutta aina tulokseksi saatiin pelkkää plasmidia, inserttiä vain häviävän vähän. Konstruktia yritettiin saada onnistumaan tekemällä vaiheet alusta alkaen uudestaan, alkuperäisistä PCR-reaktioista alkaen, mutta aina yhtä huonoin tuloksin.

Lopulta lukuisten turhien yritysten jälkeen yritettiin



Kuva 11.3: pFastBac™ 6xHis-EBNA1-6xHis konstruktin

toisenlaista lähestymistapaa ongelmaan: valmiista pFastBac™ I-EBNA1-6xHis (2,3)-konstruktista voitaisiin digestoida pois EBNA1-geeni, jättäen His-tag plasmidiin (restriktioentsyymeillä EcoRI ja XhoI-entsyymejä). Digestoituun plasmidiin ligatoidaan alkupään oligo sekä PCR tuotteena virustemplaattista saatu EBNA1 (1,3)-geeni.

Lopulta rajoittavaksi tekijäksi osoittautui kuitenkin aika. Koska kunnollisia eikä erityisen lupaavia tuloksia konstruktin toimimisesta ei ollut, lopulta päädyttiin tuottamaan proteiinia Lori Frappierilta saadulla valmiilla viruksella. (Frappier ja O'Donnel, 1991)

YHTEENVETO JA POHDINTA

Epstein-Barr virusta on tutkittu jo yli 40 vuotta. Se on kuitenkin edelleen haastava ja mielenkiintoinen tutkimuskohde.

Tässä työssä keskityttiin yhteen viruksen toiminnan kannalta tärkeimmistä proteiineista. EBNA1-proteiinilla on suuri merkitys virusdiagnoosissa, esimerkiksi selvittäessä potilaan virusinfektion vaihetta. Tavoitteena oli muodostaa bakuloviruskonstruktia, jolla olisi mahdollista tuottaa proteiinia riittävän tehokkaasti ja riittävän puhtaana diagnostista kättä varten. Tavoitteeseen pääsemiseksi päätettiin kokeilla puhdistussekvenssin liittämistä joko proteiinin amino- tai karboksyyli-päähän sekä lisäksi konstruktia, jossa sekvenssi on liitettyä proteiinin molempiin päihin.

Yrityksistä edes kohtuullisesti onnistui kuitenkin vain konstruktia, jossa puhdistussekvenssi liitettiin proteiinin aminopäähän. Muut konstruktit epäonnistuivat jo melko aikaisessa vaiheessa, joten emme tiedä, miten puhdistus-tagin karboksyyli-pää vaikuttanut mm. proteiinin kolmiulotteiseen laskostumiseen ja siten sen käytettävyyteen diagnoosissa.

6xHis-EBNA1 (1,4) konstruktiin ongelmat ilmenivät jo heti alussa kun pBuescript-ligaation jälkeen pesäke-PCR ei tuottanut lainkaan positiivisia tuloksia. Tämä antoi aiheen olettaa, ettei geenin ligaatio ensimmäiseen plasmidiin onnistunut. Koska EBNA1-6xHis (2,3) konstruktia kuitenkin onnistui kyseisessä vaiheessa aivan hyvin, herää epäily, onko ensimmäisenä mainitun konstruktiin oligonukleotidien, PCR-alkukkeiden ja näitä yhdistävissä restriktioentsyymien tunnistuskohtien suunnittelussa tehty jonkinlainen virhe, joka teki geenin liittämisen plasmidiin mahdottomaksi. Tämän tyyppinen suunnitteluvirhe huomattiin kuitenkin vain konstruktiin 6xHis-EBNA1-6xHis (1,3) kohdalla, jolloin pilkkominen jouduttiin tekemään kahdessa vaiheessa entsyymien erilaisten puskurivaatimusten takia.

Yllättäen konstruktiin EBNA1 (1,3) monimutkainen ligaatio pBluescript-plasmidiin onnistui ja pesäke-PCR:ssä saatiin positiivisia tuloksia. Tämän konstruktiin kehittäminen tyssäsi kuitenkin, kun sen liittäminen pFastBacTMI- plasmidiin ei syystä tai toisesta onnistunut.

Tämä projektin jälkeen EBNA1-proteiinia tuotettiin alkuperäisellä konstruktilla, jossa puhdistussekvenssi oli liitettynä proteiinin aminopäähän. Proteiinin tuotto onnistui riittävässä määrin, joskin sen puhdistaminen on edelleen hankalaa mutta kuitenkin mahdollista. Diagnostiikkakitti, jossa tuotettu proteiini on käytössä on esitelty artikkelissa Schenk ym., 2007.

EBNA1 on tumaan kulkeutuva proteiini, joten sen vaikeaa puhdistusprosessia saattaisi helpottaa tumakuljetussignaalin poistaminen. Tässä proteiinissa tumakuljetussignaali sijaitsee kuitenkin keskellä proteiinia, joten sen muokkaaminen on hankalaa ja siitä saattaa aiheutua hankaluuksia proteiinin oikeaan laskotumiseen ja siten sen toiminnallisiin ominaisuuksiin.

Epstein-Barr virusta tutkitaan aktiivisesti, ja uusimman tiedon mukaan se saattaa olla eräs tekijä myös MS-taudin taustalla. Vielä ei tiedetä, kuinka pitkäksi lista sairauksista joissa EBV on osallisena, vielä kasvaa. Kun tietämys viruksen infektiomekanismeista lisääntyy, myös EBV-diagnostiikan merkitys kasvaa. Tällä hetkellä EBV seulonnalla on suuri merkitys Kaakkois-Aasiassa nenänielun syövän riskin arvioinnissa, ja ehkä jonain päivänä myös länsimaissa voidaan potilaan EBV statuksen perusteella arvioida riskiä sairastua esimerkiksi imusolmuke-syöpään tai MS-tautiin.

EBNA1- proteiinin erikoisominaisuuksia osataan valjastaa hyötykäyttöön. Sen kykyä sitoutua viruksen DNA:n *oriP*-alueeseen ja siten ylläpitää geeniä kohdesolussa on käytetty proteiinin tuoton tehostamiseen nisäkässolulinjoissa.

Lisäksi EBNA1 proteiinin merkitys viruksen genomien ylläpitämiseksi kohdesoluissa on kiistaton. Sen kyky väistää elimistön puolustusjärjestelmiä saattaa hyvinkin olla tulevaisuudessa uusien, tehokkaiden syöpälääkkeiden kohde.

LÄHTEET

Aboulafia D.M., L. Ratner, S.A. Miles, W.J. Harrington. AIDS Associated Malignancies Clinical Trials Consortium. 2006. Antiviral and immunomodulatory treatment for AIDS-related primary lymphoma: AIDS Malignancies Consortium pilot study 019. *Clinical lymphoma & myeloma*. 6: 399-402.

Ambinder, R.F., K.D. Robertson ja Q.Tao. 1999. DNA methylation and the Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol.* 369-375.

Andersson, J. 2006. Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma. *Herpes: the journal of the IHMF*. 13:12-16

Baer, R., A.T. Bamkier, M.D. Biggin, P.L. Deininger, P.J. Farrel, T.J. Gibson, G. Hatfull, G.S. Hudson, S.C. Satchwell ja C. Séguin. 1984. DNA sequence and expression of the B-95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. 310:207-211.

Bocharev, A., J.A. Barwell, R.A. Pfuetzner, W. Furey, A.M. Edwards, and L. Frappier. 1995. Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA1. *Cell*. 83:39-46.

Borza, C.M. ja L.M. Hutt-Fletcher. 2002. Alternate replication in B-cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nature Med* 8:594-599.

Chan, A.T., Q. Tao, K.D. Robertson, I.W. Flinn, R.B. Mann, B. Klencke, W.H. Kwan, T.W. Leung, P.J. Johnson, R.F. Ambinder. 2004. Azacitidine induces demethylation of the Epstein-Barr virus genome in tumors. *J Clin Oncol*. 22:1373-1381.

Chodosh, J., V.P. Holder, Y.J. Gan, A. Belgaumi, J.Sample, J.W. Sixbey. 1998. Eradication of latent Epstein-Barr virus by hydroxyurea alters the growth-transformed cell phenotype. *J Infect Dis*. 177:1194-1201.

Cruickshank, J., K. Shire, A.R. Davidson, A.M. Edwards ja L. Frappier. 2000. Two domains of the Epstein-Barr virus origin DNA-binding protein, EBNA1, orchestrate sequence-specific DNA binding. *J Biol Chem.* 275: 22273-22277.

Debyzer, Z., M. Reynders, P. Goubau ja J. Desmyter. 1997. Comparative evaluation of three ELISA techniques and an indirect immunofluorescence assay for the serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection. *Clin Diagn Virol.* 8:71-81.

Duellman S. J., R.B. Burgess. 2005. Overproduction in *Escherichia coli* and purification of Epstein-Barr virus EBNA1. *Protein Expr Purif.* 47: 434-440.

Epstein, M.A, G. Henle, B.G. Achong, and Y.M. Barr. 1965. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *J Exp Med.* May 1;121:761-70.

Epstein, M.A. 2001. Infectious mononucleosis. Encyclopedia of life sciences, John Wiley and Sons, Ltd. www.els.net.

Epstein, M.A. 2001. Reflections on Epstein-Barr virus: Some recently resolved old uncertainties. Review. *Journal of infection.* 43: 111-115.

Epstein, M.A., B.G. Achong, ja Y. Barr. 1964. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet.* i 702-703.

Epstein, M.A., G. Henle, B.G. Achong ja Y. Barr. 1964. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *J Exp Med.* 121:761-770

Falk K., J.W. Gratama, M. Rowe, J. Z. Zou, F. Khanim, L.S. Young, M.A. Oosterveer, and I. Ernberg. 1995. The role of repetitive DNA sequences in the size variation of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens, and the identification of different EBV isolates using RFLP and PCR analysis. *J Gen Virol.* 76:779-790.

Feng, W. H., G. Hong, H.J. Delecluse ja S.C. Kenney. 2004. Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J Virol.* 78:1893-1902.

- Frappier, L., M. O'Donnell. 1991. Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. *J Biol Chem.* 266:7819-7826.
- Gärtner, B.C., J.M. Fischinger, K. Roemer, M. Mak, B. Fleurent and N. Mueller-Lantzsch. 2001. Evaluation of a recombinant line blot for diagnosis of Epstein-Barr virus compared with ELISA, using immunofluorescence as reference method. *J Virol Met.* 93: 89-96.
- Gärtner, B.C., K. Kortmann, M. Schäfer, N. Mueller-Lantzsch, U. Sester, H. Kaul, ja H. Pees. 2000. No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. *J Clin Microbiol.* 38 (6):2458.
- Gärtner, B.C., R.D. Hess, D. Brandt, A. Kruse, A. Rethwilm, K. Roemer, ja N. Mueller-Lahtsch. 2003. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as reference method. *Clin Diag Lab Immunol.* 1:78-82
- Hausen, H.Z., W. Henle, K. Hummeler, V. Diehl ja G. Henle. 1967. Comparative study of cultured Burkitt tumor cells by immunofluorescence, autoradiography, and electron microscopy. *J Virol.* 4:830-837.
- Hess, R.D. 2004. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective. Still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol.* 42(8):3381-3387.
- Holowaty, M.N., Y. Sheng, T. Nguyen, C. Arrowsmith, and L. Frappier. 2003. Protein interaction domains of the ubiquitin-specific protease, USP7/HAUSP. *J Biol Chem.* 278 (48):47753-47761.
- Israel, B. F., ja S.C. Kennedy. 2003. Virally targeted therapies for EBV-associated malignancies. *Oncogene.* 22: 5122-5130.
- Junker, A.K., E.E. Thomas, A. Radcliffe, R.B. Forsyth, A.G. Davidson, and L. Rymo. 1991. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci.* 302(4):220-3.
- Kirchmaier, A.L. ja B. Sugden. 1997. Dominant-negative inhibitors of EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *J Virol.* 71:1766-1775.

- Levitskaya J, M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P.M. Steigerwald-Mullen, G. Klein, M.G. Kurilla, and M.G. Masucci. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*. Jun 22;375(6533):685-8.
- Li, J.H., M.Chia, W. Shi, D. Ngo, C.A. Strathdee, D. Huang, H. Klamut ja F.F. Liu. 2002. Tumour-targeted gene therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 62:171-178.
- Lo, K.W., K.F. To ja D.P: Huang. 2004. Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer cell*. 5:423-428.
- Meij, P., M. B. Vervoort, K. de Gooijer, E. Blomena, C.J. Meijer, and J.M. Middeldorp. 2000. Bioreactor-scale production and one-step purification of Epstein-Barr nuclear antigen 1 expressed in baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif*. 20:324-333.
- Murray, P.G., L.S. Young. 2001. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Exp Rew Mol Med*. 2001:1-20.
- Nemerow, G.R., C. Mold, V.K. Schwend, V. Tolleson ja N.R. Cooper. 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B-cells. sequence homology of gp 350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61:1416-1420.
- Ng W-T., T-K. Yau, R.W.H. Young, W-M. Sze, A.H.L. Tsang, A.L.Y. Law, and A.W.M. Lee. 2004. A.Screening for family members of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 113:998-1001.
- Pender, M.P. ja J.M. Greer. 2007. Immunology of multiple sclerosis. *Current allergy and asthma reports*. 7:285-292.
- Polvino-Bodnar, M., J. Kiso, P.A. Schaffer. 1988. Mutational analysis of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA 1). *Nucleic Acids Res*. 16:3415-3435.
- Porath, J. 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. Review. *Protein Expr Purif*. 3: 263-281.

- Prota, A. E., D.R. Sage, T. Stehle ja J.D. Fingeroth. 2002. The crystal structure of human CD21: Implications for Epstein-Barr virus and C3d binding. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:10641-10646.
- Rickinson, A.B., E. Kieff. 2001a. Epstein-Barr Virus and its replication. *In* Fields Virology. D.M. Knipe, P.M. Howley, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2511-2573.
- Rickinson, A.B., E. Kieff. 2001b. Epstein-Barr Virus. *In* Fields Virology. D.M. Knipe, P.M. Howley, editors. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2575-2627.
- Rowe, M. and A.B. Rickonson. 2001. Epstein-Barr virus and cancer. Encyclopedia of life sciences. John Wiley and Sons, Ltd. www.els.net
- Schenk, B.I., P.O. Michel, G. Enders, N.Thilo, M. Radtke, C. Oker-Blom, and D. Franke. 2007. Evaluation of a New ELISA for Detection of Specific IgG to the Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA-1). *Clin. Lab.*53:151-155.
- Sharipo, A., M. Imreh, A. Leonchiks, S. Imreh, and M.G. Masucci. 1998. A miniman glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquinated I kappaB alpha with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis. *Nat Med.* 4: 939-944.
- Shire, K., P. Kapoor, K. Jiang, M. Ng, T. Hing, N. Sivachandran, T. Nguyen, and L. Frappier. 2006. Regulation of the EBNA1 Epstein_barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation. *J Virol.* 80:5261-5272.
- Slobod, K.S., G.H. Taylor, J.T. Sandlund, P. Furth, K.J. Helton ja J.W. Sixbey. 2000. Epstein-Barr virus targeted therapy for AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system. *Lancet.* 356:1493-1494.
- Sung, N. S. and J. S. Pagano. 2001. Epstein-Barr Virus. Encyclopedia of life sciences. John Wiley and Sons, Ltd. www.els.net
- Szakonyi, G., M.G. Klein, J.P. Hannan, K.A. Young, R.Z. Ma, R. Asokan, V.M. Holers ja X.S. Chen. 2006. structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. 13:996-1001.

Tellam, J., M. Sherritt, S. Thomson, R. Tellam., D.J. Moss, S.R. Burrows, E. Wiertz, and R. Khanna. 2001. Targeting of EBNA1 for rapid intracellular degradation overrides the inhibitory effects of the gly-ala repeat domain and restores CD8+ T cell recognition. *J Biol Chem.* 276(36): 33353-33360.

Weber B., M. Brunner, W. Preiser, and H.W. Doerr. 1995. Evaluation of 11 enzyme immunoassays for the detection of immunoglobulin M antibodies to Epstein-Barr Virus. *J Virol Meth.* 57: 87-93.

World Health Organization. 2006. Current status of vaccines in development. Initiative for vaccine research (IVR), WHO April 2005, updated February 2006. http://www.who.int/entity/vaccine_research/documents/en/Status_Table.pdf

World Health Organization. 2007. Viral Cancers. Tulostettu 19.4.2007. http://www.who.int/vaccine_research/diseases/viral_cancers/en/index1.html

Yang, L., S. Maruo ja K. Takada. 2000. CD21-mediated entry and stable infection by Epstein-Barr virus in canine and rat cells. *J Virol.* 74:10745-10751.

Yin, Y., B. Manoury, and R. Fåhræus. 2003. Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science.* 301:1371-1374.

Young, L.S. ja A.B. Rickinson. 2004. Epstein-Barr Virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 4:757-768. Katsausartikkeli.

Zhang, M. and P. Coffino. 2004. Repeat sequence of Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 protein interrupts proteasome substrate processing. *J Biol Chem.* 279 (10): 8635-8641.

Zou, J.Z. 2006. Epstein-Barr virus latency in vivo and in vitro. Thesis for doctoral degree, Karolinska University Press, Stockholm. 71 pp.

LIITTEET

LIITE 1: EBNA1 aminohapposekvenssi

1	Met	Ser	Asp	Glu	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Gly	15
16	Glu	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Pro	Glu	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	30
31	Pro	Gln	Arg	Arg	Gly	Gly	Asp	Asn	His	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	45
46	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Ser	60
61	Gly	Ser	Gly	Pro	Arg	His	Arg	Asp	Gly	Val	Arg	Arg	Pro	Gln	Lys	75
76	Arg	Pro	Ser	Cys	Ile	Gly	Cys	Lys	Gly	Thr	His	Gly	Gly	Thr	Gly	90
91	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	105
106	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	120
121	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	135
136	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	150
151	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	165
166	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	180
181	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	195
196	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	210
211	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	225
226	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	240
241	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	255
256	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	270
271	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	285
286	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	300
301	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	315
316	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Arg	330
331	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	345
346	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	360
361	Ala	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Glu	Arg	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	375
376	Arg	Gly	Glu	Lys	Arg	Pro	Arg	Ser	Pro	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	390
391	Ser	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Pro	Pro	Pro	Gly	Arg	Arg	Pro	Phe	405
406	Phe	His	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Glu	Tyr	His	Gln	Glu	420
421	Gly	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Asp	Val	Pro	Pro	Gly	Ala	Ile	Glu	435
436	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp	Asp	Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Thr	Gly	Pro	450
451	Arg	Gly	Gln	Gly	Asp	Gly	Gly	Arg	Arg	Lys	Lys	Gly	Gly	Trp	Phe	465
466	Gly	Lys	His	Arg	Gly	Gln	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Lys	Phe	Glu	Asn	480
481	Ile	Ala	Glu	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Arg	Ser	His	Val	Glu	495
496	Arg	Thr	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Trp	Val	Ala	Gly	Val	Phe	Val	Tyr	510
511	Gly	Gly	Ser	Lys	Thr	Ser	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Arg	Gly	Thr	Ala	525
526	Leu	Ala	Ile	Pro	Gln	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Pro	540
541	Phe	Gly	Met	Ala	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gln	Pro	Gly	Pro	Leu	Arg	555
556	Glu	Ser	Ile	Val	Cys	Tyr	Phe	Met	Val	Phe	Leu	Gln	Thr	His	Ile	570
571	Phe	Ala	Glu	Val	Leu	Lys	Asp	Ala	Ile	Lys	Asp	Leu	Val	Met	Thr	585
586	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Cys	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Val	Cys	Ser	Phe	600
601	Asp	Asp	Gly	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Trp	Phe	Pro	Pro	Met	Val	Glu	615
616	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	Glu	Gly	630
631	Gly	Asp	Gly	Asp	Glu	Gly	Glu	Glu	Gly	Gln	Glu					

LIITE 2: LIUOKSET JA REAGENSIT

SOL I

15 mM Tris pH 8

10 mM EDTA

RNAase

SOL II

0,2 M NaOH

1 % SDS

SOL III

K-asetatti 3 M pH 5,5

0,8 % agarosigeeli

0,8 g agarooosi, analyysilaatu, Promega/100 ml TAE-puskuria

1,6,ml 10 mg/ml etidumbromidi, Sigma

Agarooosi liuotetaan puskuriin keittämällä. Liuos jäädytettiin alle 60 °C:ksi, jonka jälkeen lisättiin etidumbromidi. Agarosiliuos valettiin geelimuottiin jähmettymään.

Blottauspuskuri

25 mM Tris

192 mM glysiini

200 ml 20 % metanoli

Elektrodiastiapuskuri (pH 8,3)

30,3 g Tris base

144,0 g glysiini

10,0 g SDS

10 x latauspuskuri DNA:lle

5 mg bromofenolisini, Sigma

5 mg ksyleenisyanoli

300 mg Ficoll 400

Liuoksen tilavuus säädettiin vedellä 1 ml:ksi

LB (Luria Bertani)-liuos

10 g Bacto-tryptoni

5 g Bacto-hiivauute

10g NaCl

Liuoksen tilavuus säädettiin vedellä litraksi ja pH säädettiin 7,5

LB-ampisilliini-maljat

LB-liuos jossa 0,8 til-% agarua ja 50 µg/ml ampisilliinia

10 % SDS-Page

Ajogeeli:

6,6 ml 30 % akryyliamidi, Bio-Rad

2,8 ml Tris, pH 8,8

0,2 ml 10% SDS (natriumdodekyylisulfaatti)

10,4 ml H₂O

133,2 µl 100 mg/ml APS (ammoniumpersulfaatti), Bio-Rad

20 µl TEMED (N,N,N', N'-Tetrametyylietyleenidiamiini), Bio-Rad

Konsentroitigeeli--:

2 ml 30 % akryyliamidi, Bio-Rad

2,8 ml 0,5 M Tris, pH 6,8

0,2 ml 10 % SDS

9,9 ml H₂O

137 µl APS

20 µl TEMED

Näytteet pipetoitiin kaivoihin, ja proteiinit ajettiin konsentroitigeelin läpi 100 V:lla ja ajogeelin läpi 180 V:lla

2 x SDS-PAGE-näytepuskuri (denaturoiva)

3,55 ml H₂O

1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

2,5 ml glyseroli

2,0 ml 10 5 % SDS

0,2 ml 0,5 % bromofenolinsini

Lisätään 50 µl merkaptoetanolia 950 µl:aan näytepuskuria

SOC

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

2 % baktotryptoni

0,5 % hiivauute

48,6 ml H₂O

Liuos autoklavoidaan ja jäähtyneeseen liemeen lisätään 250 µl 10 Mm MgCl₂ ja 500 µl 20 mM glukoosia steriilisti

50 x TAE kantaliuos

242 g Tris

57,1 ml etikkahappo

100 ml 0,5 M EDTA pH 8

Liuokseen lisättiin vettä, kunnes kokonaistilavuus oli 1 l. Liuos autoklavoitiin.

1 x TBS

20 mM Tris

0,5 M NaCl

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

27,23 g Tris Base

80 ml H₂O

Asetettiin pH 8,8:aan 6 N HCl:lla. Lisättiin vettä lopulliseen tilavuuteen 150 ml

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

6 g Tris base

60 ml H₂O

Asetettiin pH 6 N HCl:lla. Lisättiin vettä lopulliseen tilavuuteen 100 ml