

LuK-tutkielma

**Kromatiinin rakennemuutosten vaikutus HSV-1 -
kapsidien sijaintiin tumassa**

Ida Koivisto, Nuutti Lahtinen ja Jennika Vartiainen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

3.12.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia

Ida Koivisto, Kromatiinin rakennemuutosten vaikutus HSV-1 –
Nuutti Lahtinen, kapsidien sijaintiin tumassa
Jennika Vartiainen:

Kandidaatin tutkielma: 19 s., 1 (1 s.)
Tutkielman ohjaajat: Väitöskirjatutkija Sami Salminen ja dosentti Maija
Vihinen-Ranta

12/2021

Hakusanat: Kromatiinin dekonsoitaatio, kromatiinin kondensaatio, lyyttinen
infektio, tyypin 1 Herpes Simplex -virus

Tyypin 1 Herpes Simplex -virus on maailmanlaajuisesti levinnyt yleinen virus. Se leviää yleisimmin limakalvokontaktissa ja voi aiheuttaa huuliherpeksen. Virus aiheuttaa lyyttisen infektion epiteelisoluissa. Infektio voi myöhemmin levitä myös aluetta hermottaviin hermosoluihin, joissa se aiheuttaa latentin infektion. Virus replikoituu isäntäsolun tumassa, jossa tapahtuu myös uusien kapsidien kokoaminen. Isäntäsolun perimä on pakattu tumaan pieneen tilavuuteen kromatiiniksi, jonka rakenne vaikuttaa siihen, miten viruskapsidit pääsevät liikkumaan tumassa. Herpesinfektio aiheuttaa isäntäsolun tuman rakenteissa muutoksia, joihin kuuluu replikaatioalueiden laajeneminen, kromatiinin pakkautuminen tuman reunoille sekä tuman koon kasvaminen. Tumassa kapsidit liikkuvat diffuusion avulla pääasiassa kromatiinin välitiloissa ja poistuvat kuroutumalla sisempään tumakalvoon. Tässä tutkielmassa pyrimme selvittämään, vaikuttaako isäntäsolun tuman kromatiinin rakenteen muuntelu siihen, miten tyypin 1 Herpes Simplex -viruskapsidit sijoittuvat tumassa. Tämän selvittämiseksi Vero-solulinjan solujen kromatiinia kondensoitiin tai dekonsoitiin, ja solut infektoitiin viruksilla. Näytesolut immunoleimattiin ja kuvattiin konfokaalimikroskoopilla. Kuvista havaittiin, että viruskapsidit pääsivät dekonsoitujen solujen kromatiinin sekaan paremmin kuin kondensoitujen. Kuitenkaan kapsidijakaumissa ei näkynyt merkittävää eroa. Kapsidijakauma oli samankaltainen lähes koko mittausalueella, mikä poikkesi odotetusta.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Cell and Molecular Biology

Ida Koivisto, Nuutti Lahtinen, Jennika Vartiainen: The effects of chromatin structural changes on the HSV-1 capsid localization in the nucleus

Bachelor of Science Thesis: 19 p., 1 (1 p.)

Supervisors: PhD student Sami Salminen and Adjunct Professor
Maija Vihinen-Ranta

12/2021

Keywords: chromatin condensation, chromatin decondensation, lytic infection, type 1 Herpes Simplex virus

Type 1 Herpes Simplex virus (HSV-1) is a common globally spread virus. It is transmitted most commonly by direct mucous membrane contact and it can be a cause of cold sores. The virus causes a lytic infection in epithelial cells. The infection can later spread to nerve cells innervating the area where it causes a latent infection. Replication of the virus takes place inside the nucleus of a host cell where also progeny capsids are assembled. The genome of a host cell is packed in the nucleus into a smaller volume as chromatin and its structure affects how the capsids move in the nucleus. Herpes infection leads to structural changes in the host cell's nucleus including chromatin marginalization to nucleus's periphery and expansion of the nucleus and viral replication compartment. In the nucleus capsids move by diffusion mainly in interchromatin spaces and egress by budding into the inner nuclear membrane. In this study our goal was to examine if the changes in host cell's chromatin structure affects the localization of the type 1 Herpes Simplex virus capsids in the nucleus. This was studied by condensing or decondensing the chromatin structure of infected Vero cells. Sample cells were immunolabeled and imaged using confocal microscopy. Image data analyses showed that the viral capsids had better access into the chromatin in the decondensed cells than in the condensed cells. However, no significant difference was seen in the capsid distributions. The capsid distribution was similar over almost the entire measuring range which differed from the expected.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	5
2.1 Käytetyt solut ja virukset	5
2.2 Solujen infektointi, kemikaalikäsittelyt ja fiksaus	5
2.3 Solujen immunoleimaus.....	5
2.4 Solujen kuvantaminen ja kuva-analyysi	6
3 TULOKSET	8
3.1 Kuvatut näytteet.....	8
3.2 Data-analyysi	10
3.2.1 Tumien kromatiinijakauma	10
3.2.2 Tumien kapsidijakauma.....	11
4 TULOSTEN TARKASTELU	13
Kiitokset	15
KIRJALLISUUS	16
LIITE 1. Infektoimattomat solut	20

LYHENTEET

HSV-1	tyypin 1 Herpes simplex -virus
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
TSA	trikostatiini A

1 JOHDANTO

Tyypin 1 Herpes simplex -virus (HSV-1) on DNA-virus ja huuliherpeksen päätaudinaiheuttaja (McElwee ym. 2018). Samalla se on yksi yleisimmistä silmän virusinfektioiden aiheuttajista (Srivastava ym. 2015). HSV-1:n kaksijuosteinen DNA (Pramod ym. 2013) on pakattu halkaisijaltaan 125 nm olevaan ikosahedraaliseen kapsidiin (Ojala ym. 2000), jota ympäröi proteiinikerros, tegumentti (McElwee ym. 2018). Tegumentin ympärillä on vielä isäntäsolusta saatu lipidikalvo (McElwee ym. 2018).

Tämä alfaherpesvirus (Wu ym. 2009) aiheuttaa lyyttisen infektion epiteelisoluissa (Spraza ym. 2014) yleensä jo lapsuudessa, ja myöhemmin virus pääsee infektoimaan myös näitä epiteelisoluja hermottavia hermosoluja (Held & Derfuss 2011). Hermosoluissa HSV-1 kykenee aiheuttamaan elinikäisen latentin infektion (Szpara ym. 2014), jolloin infektio voi jäädä kantajaltaan kokonaan huomaamatta (Bradley ym. 2014). Tämän vaiheen aikana isäntäsolussa on toimiva virusperimä, mutta uusia viruksia ei tuoteta (Held & Derfuss 2011). Latentin vaiheen virus voi aktivoitua uudelleen lyyttiseen kiertoon sattumanvaraisesti tai esimerkiksi stressin ja joidenkin sairauksien laukaisemana aiheuttaen iho-oireita epiteelipinnoilla. Tämän vaiheen aikana myös viruksen tartunnat ovat todennäköisimpiä (Held & Derfuss 2011).

Tyypin 1 Herpes Simplex -viruksen on arvioitu olevan yleisin ihmisten keskuudessa leviävä patogeeni, mikä tekee siitä merkittävän viruksen (Lee ym. 2021). Lukuina tämän esittivät Looker ym. vuonna 2015: virusta kantavat mahdollisesti noin 70 % alle 50-vuotiaista ihmisistä (Looker ym. 2015). HSV-1 -infektio tarttuu yleisimmin limakalvojen kontaktissa, mikä mahdollistaa

esimerkiksi sen, että synnytyksessä äiti voi tartuttaa alateitse syntyvän lapsensa (Buxbaum ym. 2003).

HSV-1 pääsee sisälle soluun virusvaipan ja isäntäsolun solukalvon välisen fuusion avulla (Arii ym. 2009). Solussa viruskapsidit kuljetetaan tumahuokoselle (Sodeik ym. 1997) aktiivisesti mikrotubuluksia pitkin dyneiiniiniproteiinien avulla (Döhner ym. 2002). Tumahuokosella kapsidin sisällä oleva virus-DNA vapautuu tumaan, jolloin alkaa välittömien varhaisgeenien ilmentäminen (Subak-Sharpe & Dargan 1998). Nämä välittömät varhaisgeenit edistävät muun muassa viruksen varhaisten ja myöhäisten geenien ilmentämistä sekä uusien virusten tuottamista (Samaniego ym. 1998). Tämän jälkeen ilmennetään myöhäisiä geenejä, jotka koodaavat suurta osaa tuotettavista viruspartikkeleiden rakenneproteiineista (Honest & Roizman 1974). Tumassa tapahtuu myös virus-DNA:n replikaatio sekä uusien viruskapsidien kokoaminen (Subak-Sharpe & Dargan 1998).

HSV-1-infektion aikana viruksen replikaatioalue (Ghazal ym. 2000, Simpson-Holley ym. 2004) sekä isäntäsolun tuma laajenee ja kromatiini marginalisoituu tuman reunalle. Infektio saa aikaan myös tumalaminan fosforylaation sekä sen osittaisen hajoamisen isäntäsolussa (Simpson-Holley ym. 2005, Leach & Roller 2010). Näiden lisäksi infektio aiheuttaa myös isäntäsolun tumajyväsien hajoamisen (Besse & Puvion-Dutilleul 1996).

Tumassa viruskapsidien kuljettamiseen ei hyödynnetä aktiivisia kuljetusmekanismeja, vaan kapsidit liikkuvat diffuusion avulla (Bosse ym. 2015). Isäntäsolun tuman täyttää sen oma geneettinen materiaali, joka on pakattu kromatiinirakenteeksi. Rakenteen perusyksikkö on nukleosomi, jossa DNA:ta on kietoutunut histoniproteiinien muodostaman ytimen ympärille (Luger ym. 1997). Nukleosomit järjestäytyvät edelleen 30 nm:n levyisiksi säikeiksi, jotka muodostavat kromatiinille tumaan verkkomaisen rakenteen (Thoma ym. 1979).

Viruskapsideja ympäröivän kromatiinin rakenne vaikuttaa siihen, kuinka kapsidit kulkeutuvat diffuusion avulla tumassa. Kapsidit nimittäin liikkuvat enimmäkseen sellaisilla alueilla, joissa kromatiinia ei ole. Tällaisia alueita kutsutaan kromatiinin

“välitiloiksi”, ja viruskapsidit saattavatkin “hyppiä” kromatiinin välitiloista toisiin. HSV-1-infektio kasvattaa kromatiinin välitiloja, jolloin viruskapsidit pääsevät liikkumaan tumassa paremmin. Kromatiinin välitilojen kasvaessa kromatiini rajoittaa kapsidien liikkumista vähemmän, jolloin kapsidit myös saavuttavat tumakalvon aiempaa paremmin (Bosse ym. 2015).

Kapsidien pääseminen tumakalvolle on tärkeää (Mettenleiter ym. 2013). Koska ne ovat liian suuria poistua kytösuksen kautta sytoplasmaan (Hofemeister & O’Haren 2008), täytyy niiden kuroutua sisempään tumakalvoon. Sisempään tumakalvoon kuroutumisessa avustaa viruksen oma NEC-kompleksi (engl. *Nuclear egress complex*). Se on vakaa heterodimeeri, joka koostuu U_L31- ja U_L34-proteiineista (Bigalke ym. 2014). Tumakalvojen välitilassa kapsideilla on ympärillään sisemmästä tumakalvosta saatu väliaikainen lipidivaippa, jonka avulla ne fuusioituvat ulompaan tumakalvoon ja vapautuvat sytoplasmaan ilman lipidivaippaa. Kapsidit kuljetetaan sytoplasmassa Golgin laitteelle, jolta poistuessaan niillä on ympärillään tegumentti sekä glykoproteiinien ympäröimä lipidivaippa. Golgin laitteelta kapsidit kulkeutuvat solukalvolle vesikkeleissä, jotka fuusioituvat solukalvoon vapauttaen uudet virukset solusta (Everett 2014).

Isäntäsolun kromatiinin rakenne on luonnostaan dynaaminen ja sen niin kutsuttu pakkautumisaste vaihtelee alueittain solun tarpeiden mukaan (Zhang ym. 2016). Rakenteen tiivistymistä kutsutaan kromatiinin kondensaatioksi ja löyhentymistä kromatiinin dekonkondensaatioksi. Pakkautumisasteella on tärkeä rooli etenkin solun geenien ilmentymisen säätelyssä. Geenien luenta on aktiivisempaa kromatiinin löyhemmin pakkautuneilla eukromatiinin alueilla ja geenit, joiden ilmentyminen halutaan estää, voidaan pakata tiukaksi heterokromatiiniksi (Sexton ym. 2007).

Kromatiinin pakkautumisastetta voidaan muokata myös keinotekoisesti. Histoniproteiinit ovat kromatiinin tukiranka (Luger ym. 1997), mutta niiden translaation jälkeinen muokkaaminen erilaisilla toiminnallisilla ryhmillä mahdollistaa myös solun toiminnoille tärkeän kromatiinin rakenteen muuntelun (Biswas ym. 2011). Tällainen toiminnallinen ryhmä on muun muassa

asetyyliryhmä, jonka negatiivinen varaus dekonsoi kromatiinin rakennetta tasoittamalla varauseroa positiivisten histoniproteiinien ja negatiivisen DNA:n välillä (Grunstein 1997). On havaittu, että kromatiinista asetyyliyhmiä poistavien entsyymien toimintaa inhiboivilla yhdisteillä, kuten trikostatiini A:lla (TSA), voidaan dekonsoida solujen kromatiinin rakennetta koeoloissa (Chalut ym. 2012). Kromatiinin rakenteeseen vaikuttavat myös solun liukoiset kationit. Ne edesauttavat kromatiinin tiheämpää pakkautumista vähentämällä DNA:n negatiivisesti varautuneiden fosfaattiosien välistä hylkimistä. Etenkin kaksiarvoisten kationien, kuten magnesiumin (Mg^{2+}) ja kalsiumin (Ca^{2+}), tiedetään kondensoivan kromatiinin rakennetta jo pieninäkin pitoisuuksina (Borochov ym. 1984).

Tumakalvolle ja tämän myötä tumasta ulos pääseminen ovat kriittisiä vaiheita HSV-1:n elinkierrossa. Koska kromatiiniverkosto rajoittaa kapsidien liikettä tumassa, on näiden vuorovaikutusten tutkiminen tärkeää viruksen elinkierron ymmärtämiseksi. Tämän LuK-tutkielman tavoitteena oli lisätä ymmärrystä HSV-1:n elinkierrosta selvittämällä vaikuttaako isäntäsolun tuman kromatiinin kondensoiminen tai dekonsoiminen siihen, miten viruskapsidit sijoittuvat tumaan infektion aikana. Tätä tutkittiin infektoimalla tutkittavat solut HSV-1:llä ja käsittelemällä niitä joko TSA:lla tai magnesiumkloridia ($MgCl_2$) ja kalsiumkloridia ($CaCl_2$) sisältävällä liuoksella. Solut immunoleimattiin ja kuvattiin konfokaalimikroskoopilla. Kuvista tarkasteltiin käytettyjen DNA- sekä VP5-kapsidileimojen intensiteetin voimakkuutta eri etäisyyksillä tuman reunoista. Hypoteesi 1 tutkimukselle oli, että kromatiinin rakennemuutokset vaikuttavat siihen, kuinka hyvin kapsidit pääsevät kromatiinin sekaan. Hypoteesi 2 oli aiempaan hypoteesiin pohjautuen, että viruskapsidien sijainnissa tulee näkymään eroja eri tavoin käsiteltyjen solujen välillä. Nollahypoteesi oli, ettei kromatiinin rakenteen muutos vaikuta viruskapsidien sijaintiin tumassa.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Käytetyt solut ja virukset

Tutkimuksessa käytettiin vihermarakatin munuaisesta eristettyjä Vero-solulinjan soluja. Solujen elatusaineena käytettiin Dulbeccos's modified Eagle's medium - elatusainetta (DMEM) 1 g/l glukoosipitoisuudella (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), jota oli täydennetty 10 % naudan sikiön seerumilla (Biowest, Nuaille, Ranska), 1 % penisilliini streptomysiinillä (Thermo Fisher Scientific) ja 1 % ei välttämättömillä aminohapoilla (Thermo Fisher Scientific). Soluviljelmät kasvatettiin 3 cm Ø kasvatusmaljoilla (MatTek, Ashland, USA) yhdessä kerroksessa ja inkuboitiin lämpökaapissa (Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific) 37 °C:n lämpötilassa ja CO₂-pitoisuus oli 5 %. Laboratoriotyöt suoritettiin solujen fiksaamiseen asti laminaarissa aseptisen työskentelyn periaatteita noudattaen. Solujen infektoinnissa käytettiin Sandra Weller:n (UCONN Health, USA) lahjoittamia KOS-kannan villityyppiä olevia HSV-1 -viruksia.

2.2 Solujen infektointi, kemikaalikäsittelyt ja fiksaus

Solut infektoitiin HSV-1 -viruksilla siten, että jokaista solua kohden oli 5 viruspartikkelia. Kasvatusmaljoja inokuloitiin lämpökaapissa tunnin ajan, jonka jälkeen maljoille vaihdettiin 2 ml tuoretta mediumia. Poikkeuksena oli, että dekonzensoitaville soluille vaihdettiin 1,324 µM trikostatiini A -medium. Solut fiksattiin kahdeksan tuntia infektoinnin jälkeen käsittelemällä ne 4 % paraformaldehydillä 12 min ajan. Kationeilla käsiteltäviin näytteisiin vaihdettiin 30 min ennen fiksausta uusi medium, jonka MgCl₂/CaCl₂-pitoisuus oli 2 mM.

2.3 Solujen immunoleimaus

Fiksatus näytteet käsiteltiin läpäisyyspuskurilla, joka oli fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) sisältäen 0,1 % permeabilisoivaa Triton X-100:aa ja 0,5 % naudan seerumin albumiinia (engl. *bovine serum albumin*,

BSA). Maljoja inkuboitiin huoneenlämmössä 15 min. Näytteiden peitinlasit siirrettiin solupuoli ylöspäin kahdelle puhtaalle 6-kuoppaveylle yksi peitinlasi kaivoa kohden. Primäärivasta-aineena käytettiin hiiren VP5-kapsidiproteiinin vastaista vasta-ainetta (6F10) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) laimennettuna 1:500 3 % BSA PBS-liuokseen. Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 1 h. Näytteet pestiin läpäisypuskurilla, PBS:llä ja vielä uudestaan läpäisypuskurilla aina 15 min huoneenlämmössä inkuboiden. Sekundäärivasta-aineena käytettiin hiirenvastaista Alexa Fluor 546 -vasta-ainetta (Abcam, Cambridge, UK) laimennettuna 1:500 3 % BSA PBS-liuokseen. Näytteitä inkuboitiin 30 min huoneenlämmössä valolta suojattuna. Näytteet pestiin läpäisypuskurilla inkuboiden 15 min huoneenlämmössä valolta suojattuna. Näytteiden peitinlasit pedattiin objektilaseille DNA:ta leimaavaa NucBlue-väriainetta sisältävällä ProLong Glass Antifade Mountant -petausaineella (Invitrogen, Waltham, USA). Näytteitä inkuboitiin valolta suojattuna huoneenlämmössä yön yli, minkä jälkeen näytteet siirrettiin jääkaappiin vuorokaudeksi.

2.4 Solujen kuvantaminen ja kuva-analyysi

Näytteet kuvattiin konfokaalimikroskoopilla (TCS SP8X Falcon, Leica, Wetzlar, Saksa) kymmenen solua per näyte. Kuvauksessa käytettiin HC PL APO 63x -öljyimmersio-objektiivia (N.A 1,4). Kuvien pikselikoko oli x-y -suunnassa 80 nm/pikseli ja z-suunnassa kuvien korkeusero oli 160 nm. NucBlue-väriaine viritettiin diodilaserin aallonpituudella 405 nm ja Alexa Fluor 546 viritettiin säädettävällä valkolaserilla aallonpituudella 557 nm. Fluoresenssin emissiota mitattiin aallonpituuksilla 410–550 nm ja 565–709 nm.

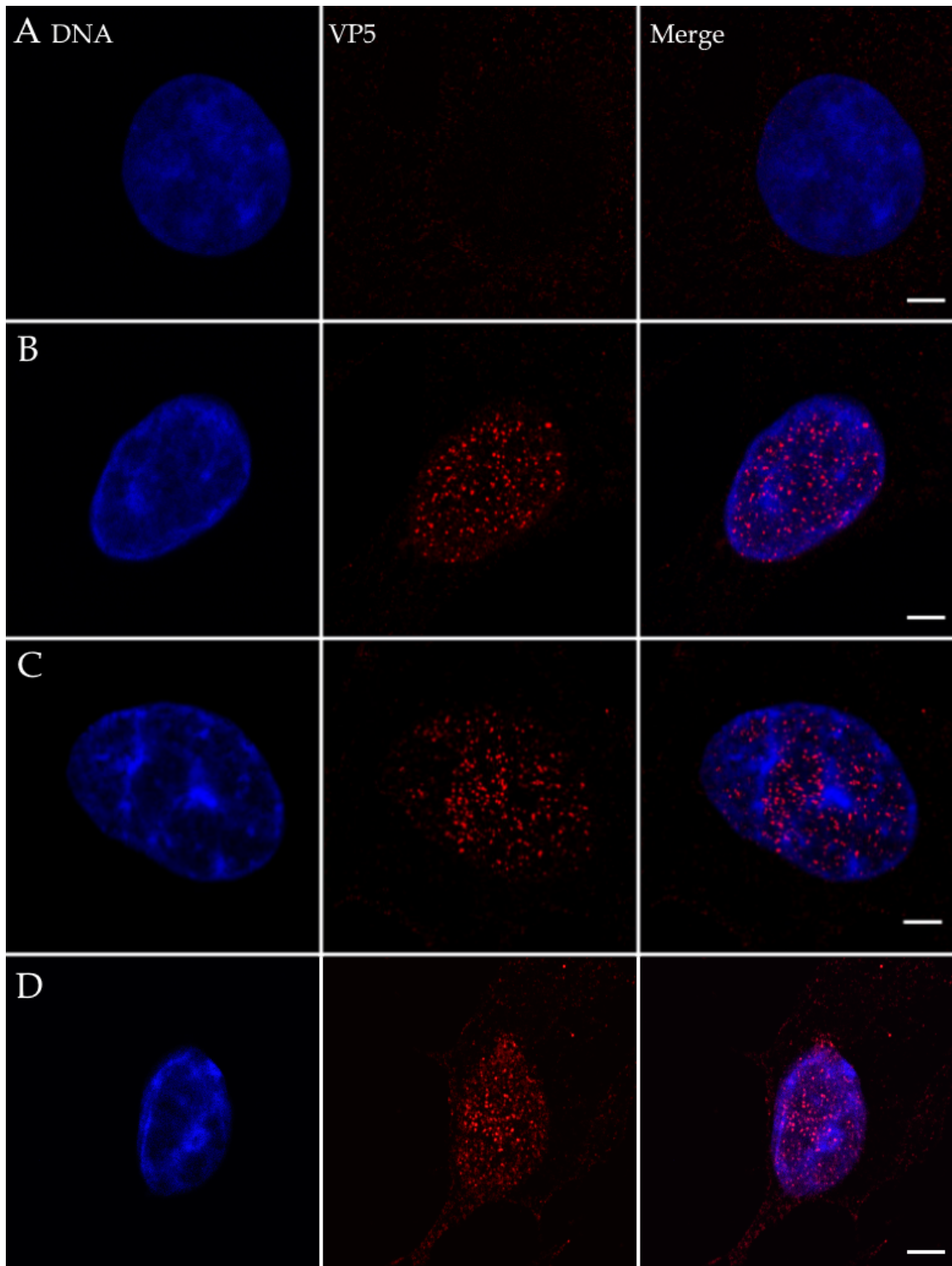
VP5- ja DNA-leimojen intensiteetit tuman reunan etäisyyden funktiona laskettiin määrittämällä ensin 3D-kuvasta DNA-kanavalle kynnyсарvo Otsu-algoritmia (Otsu 1979) käyttämällä. Tämän jälkeen mahdolliset segmentaation sisälle jääneet reiät suljettiin jokaisessa konfokaalitasossa, ja analyysiin valittiin taso, jossa tuman pinta-ala oli suurin. Tässä tasossa jokaiselle tuman pikselille laskettiin 2D-etäisyys tuman

reunaan. Seuraavaksi pikselit ryhmiteltiin etäisyysarvojen perusteella niin, että ensimmäiseen ryhmään kuuluivat pikselit, joiden etäisyys tuman reunalle oli 0-2 pikseliä, toiseen ryhmään pikselit, joiden etäisyys oli 2-4 pikseliä jne. Jokaiseen ryhmään kuuluvien pikselien intensiteettien keskiarvo laskettiin sekä DNA- että VP5-kanavalle, jolloin saatiin leimojen keskimääräinen intensiteetti tuman reunan etäisyyden funktiona. Leimojen kirkkauserot solujen välillä otettiin huomioon laskemalla lopuksi normalisoitu intensiteettiarvo, joissa kunkin etäisyysarvon intensiteetti jaettiin kaikkien etäisyysarvojen intensiteettien summalla. Lopuksi kaikille soluille saaduista intensiteettikäyristä laskettiin keskiarvo ja keskihajonta solujen yli.

3 TULOKSET

3.1 Kuvatut näytteet

Konfokaalimikroskoopilla kuvattujen solujen kromatiinin ja VP5-kapsidiproteiinien sijaintia tumassa tarkasteltiin niiden leimojen perusteella (Kuva 1). Infektoiduissa soluissa, joiden kromatiinin rakennetta ei oltu käsitelty, kromatiinin nähtiin marginalisoituneen vahvasti tumien reunoille, kun taas infektoimattomissa soluissa kromatiini oli jakautunut paljon tasaisemmin tumiin. Infektoimattomien solujen kuvista (Liite 1) nähtiin, ettei soluissa ollut apoptoosiin viittaavia muutoksia. Kuvista nähtiin myös, että infektoimattojen solujen kromatiini oli paljon tasaisemmin levittäytynyt tumaan verrattaessa vastaaviin infektoituihin. $MgCl_2/CaCl_2$:lla käsiteltyjen infektoitujen solujen kromatiini oli pakkautunut selkeästi tiiviimmin tumiin muodostaen laajoja, tummempina näkyviä harvan kromatiinin alueita. Infektoitujen TSA:lla dekonsoitujen solujen kromatiinin pakkautumisessa nähtiin vähiten alueellisia eroja viitaten kromatiinin tasaisempaan jakautumiseen koko tuman alueelle. Tämän nähtiin VP5-leiman perusteella vaikuttavan kapsideihin siten, että dekonsoidun kromatiinin soluissa kapsidit olivat jakautuneet tasaisimmin tumiin. Kondensoidun kromatiinin näytteissä nähtiin myös, ettei VP5-leimaa ollut alueilla, joissa DNA-leiman intensiteetti oli voimakkaimmillaan. Dekonsoiduissa soluissa ei tällaista ilmiötä havaittu: VP5-leimaa näkyi myös siellä, missä DNA-leiman intensiteetti oli suurta.



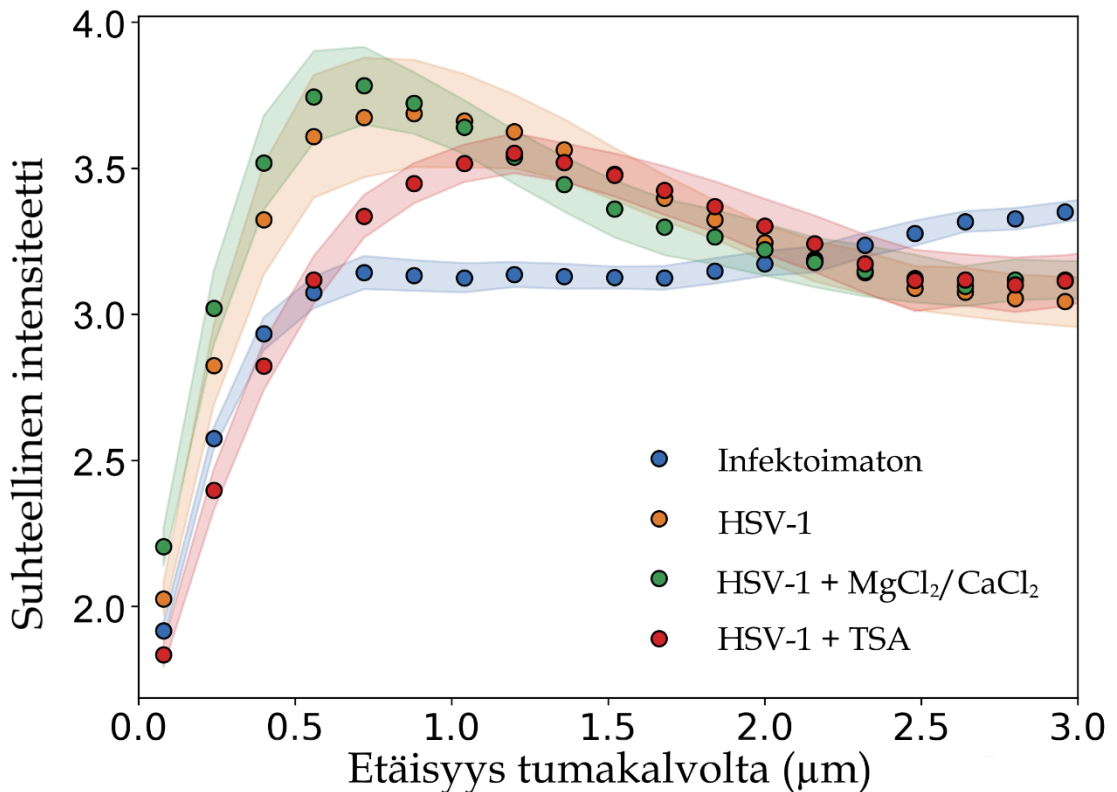
Kuva 1. DNA:n ja VP5-kapsidiproteiinien sijoittuminen immunoleimattujen solujen tumiin konfokaalimikroskoopilla kuvattuna. Paneeleissa DNA on leimattu NucBlue-väriaineella (sininen, DNA) ja VP5-kapsidiproteiinit Alexa Fluor 546 -vasta-aineella (punainen, VP5). A: Infektoimaton ja käsittelemätön kontrollisolu. B: Infektoitu käsittelemätön solu. C: Infektoitu ja $MgCl_2 / CaCl_2$ -mediumissa kasvatettu solu. D: Infektoitu TSA:lla käsitelty solu. Mittapalkkien pituus on 5 μm .

3.2 Data-analyysi

Tässä kappaleessa käsitellään konfokaalimikroskooppikuvista analysoitua dataa ja niiden perusteella tehtyjä kuvaajia. DNA:n ja VP5-kapsidiproteiinien tuman sisäistä jakautuneisuutta tarkasteltiin suhteuttamalla emission intensiteetin määrä keskiarvoiseen etäisyyteen tumakalvosta. DNA-kappaleessa käsitellään NucBlue-väriaineella leimatun DNA:n intensiteetin kuvaajaa ja VP5-kappaleessa Alexa Fluor 546 -vasta-aineella leimattujen VP5-kapsidiproteiinien intensiteetin kuvaajaa.

3.2.1 Tumien kromatiinijakauma

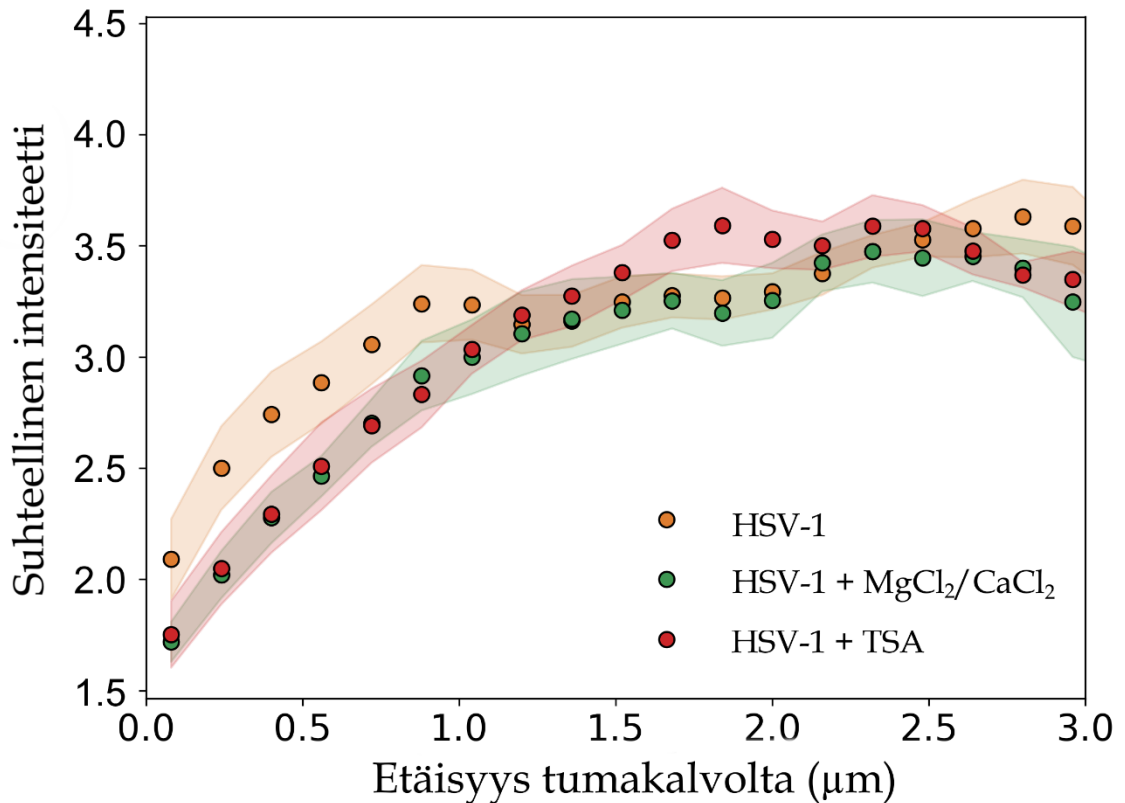
Analysoidusta DNA:n sijaintidatasta havaittiin eroja eri käsittelyjen välillä DNA-leiman keskiarvoisissa etäisyyksissä tumakalvosta (Kuva 2). DNA oli kaikkein tasaisimmin jakautunut infektoimattomissa käsittelemättömissä soluissa. Näissä DNA-leiman intensiteetti pysyi lähes yhdenlaisena koko mittausvälillä lukuun ottamatta intensiteetin laskua aivan tumakalvon välittömässä läheisyydessä, mikä nähtiin samankaltaisena kaikissa näytteissä. Muiden näytteiden DNA-intensiteetin määrä kasvoi suuremmin välillä 0–1,25 μm , minkä jälkeen se laski tasaisesti. Kondensoitujen ja pelkästään infektoitujen solujen DNA-leimojen intensiteetit olivat hiukan voimakkaampia lähempänä tumakalvoa ja kasvoivat selkeästi eniten välillä 0–0,75 μm . Tämän jälkeen näiden DNA-leiman intensiteetit laskivat dekonsoitujen solujen kanssa samalle tasolle. Dekonsoiduissa soluissa DNA oli vähiten marginalisoitunut ja DNA-leiman intensiteetti kasvoikin näytteistä hitaimmin välillä 0–1,0 μm . Vaikka kromatiinin marginalisoituminen oli dekonsoitujen soluissa vähäisintä, kaikissa infektoitujen soluissa näkyi merkkejä kromatiinin marginalisoitumisesta. Voimakkain kromatiinin marginalisoituminen oli tapahtunut kondensoitujen soluissa, joissa nähtiin käsittelyistä nopein ja korkein DNA-intensiteetin kasvu heti tumakalvon läheisyydessä välillä 0–0,75 μm .



Kuva 2. Analysoitu DNA:n jakauma konfokaalimikroskoopilla kuvattujen solujen tumissa. Esitettyinä infektoimattomien ($n = 10$) ja kromatiinia eri tavoin käsiteltyjen infektoitujen solujen ($n = 10$) DNA:n intensiteetin määrä suhteutettuna keskiarvoiseen etäisyyteen (μm) tumakalvosta. Intensiteettiarvojen keskivirhe kuvattuna väritettyinä alueina kuvaajassa.

3.2.2 Tumien kapsidijakauma

VP5-leiman sijaintidatasta nähtiin dekondensoiduissa soluissa olevan voimakkaimmat intensiteetit noin $1,9 \mu\text{m}$ etäisyydellä tumakalvosta (Kuva 3). Pienimmät VP5-leiman intensiteetit kondensoitujen ja dekondensoitujen näytteiden soluissa havaittiin tumakalvon välittömässä läheisyydessä ja intensiteetit kasvoivat lähes samankaltaisesti välillä $0-1,2 \mu\text{m}$. Dekondensoiduissa soluissa VP5-leiman intensiteetit jatkoivat kasvamista välillä $1,2-1,9 \mu\text{m}$ kondensoitujen solujen intensiteettiä voimakkaammin. HSV-1:llä infektoidun käsittelemättömän solun



Kuva 3. Analysoitu HSV-1 -kapsidien jakauma konfokaalimikroskoopilla kuvattujen solujen tumissa. Esitettynä eri tavoin käsiteltyjen solujen ($n = 10$) VP5-kapsidiproteiinien keskiarvoinen sijainti suhteutettuna etäisyyteen (μm) solukalvosta. Intensiteettiarvojen keskivirhe kuvattuna väritettyinä alueina kuvaajassa.

VP5-leiman intensiteetti oli muihin verrattuna voimakkain välillä 0–1,0 μm . Kokonaisuudessaan VP5-leiman intensiteetin kuvaajat olivat samankaltaiset kaikissa käsitellyissä soluissa.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tulosten perusteella näyttäisi siltä, etteivät kromatiinin rakennemuutokset vaikuta merkittävästi siihen, miten viruskapsidit sijoittuvat tumaan. Viruskapsidit näyttävät mikroskooppikuvien sekä kuvaajien perusteella noudattavan lähes samaa etäisyyskäyrää tumakalvosta. Tuloksista nähtiin myös, että kromatiinin marginalisoituminen kuitenkin muuttui eri käsittelyiden mukaan.

Mikroskooppikuvista ja DNA:n sijaintidatasta nähtiin, että kromatiinin dekonsetsaatio ja kondensaatio oli tapahtunut. Tulokset eivät siis ole ristiriidassa aiempien tutkimusten (Chalut ym. 2012) kanssa, joiden mukaan TSA-käsittely dekonsetsoi ja $MgCl_2/CaCl_2$ -käsittely kondensoi kromatiinin rakennetta. Infektoimattomia ja infektoituja käsittelemättömiä soluja vertailtaessa huomattiin myös, että tyypin 1 Herpes Simplex -infektio on selvästi lisännyt kromatiinin pakkautumista sekä marginalisoitumista tuman reunoille, kuten myös Aho ym. (2019) tutkimuksessaan saivat tulokseksi. Kuvatuista soluista huomattiin myös, että mitä löyhemmin kromatiini on järjestäytynyt tumassa, sitä tiiviimmin ja enemmän kapsideita näyttäisi soluissa olevan.

Kun mikroskooppikuvista tarkastellaan kondensoidun kromatiinin soluja ja verrataan niitä dekonsetsoituihin, huomataan, että kapsidit ovat sijoittuneet dekonsetsoituihin soluihin tasaisemmin. Kapsideja näyttäisi olevan myös huomattavasti enemmän kromatiinin seassa dekonsetsoiduissa soluissa, kun taas kondensoitujen solujen kromatiinin seassa näyttäisi olevan vähiten viruskapsideita. Tämä tarkoittaisi sitä, että viruskapsidit pääsisivät paremmin dekonsetsoidun kuin kondensoidun kromatiinin sekaan. Tämä tukee Görisch ym. (2005) tutkimusta, missä 42–2500 kDa dekstraanien liike kromatiinin seassa lisääntyi TSA:lla dekonsetsoimisen vaikutuksesta.

DNA-kuvaajasta nähtiin, että infektoitujen solujen kuvaajat olivat hyvin samanlaisia, mutta pieniä eroja kuitenkin havaittiin. Dekonsetsoitujen solujen kromatiini näyttäisi olevan hiukan tasaisemmin jakautunut tumaan, jolloin se ei

olisi niin marginalisoitunut tuman reunoille kuin muiden käsittelyiden soluissa. Tämä tukee ajatusta siitä, että dekonkondensaatio on todella tapahtunut ja kromatiini on löyhemmin tumassa. Enemmän marginalisoitumista havaittiin kondensoiduissa sekä infektoiduissa käsittelemättömissä soluissa. Infektoimattomissa soluissa kromatiini oli jakautunut tasaisesti koko mittausalueella, joten marginalisoitumista ei havaittu.

Viruskapsidien kuvaajasta huomattiin, ettei dekonkondensoitujen ja kondensoitujen solujen viruskapsidien jakaumissa ollut suurta eroa. Tulos on ristiriidassa aikaisempien tutkimusten (Görisch ym. 2005) perusteella tehtyjen hypoteesien kanssa. Aiemmissä tutkimuksissa TSA-käsittelyn on havaittu lisäävän merkittävästi histonien asetylaatiota, ja siten helpottavan 42–2500 kDa dekstraanien pääsemistä kromatiinin sekaan verrattaessa ilman käsittelyä oleviin kontrollisoluihin. Tutkimuksessamme olisi siis voinut odottaa, että HSV-1:llä infektoidujen solujen kondensaatio olisi tuonut selkeän eron VP5-jakaumaan verrattaessa dekonkondensoituihin soluihin. On siis mahdollista, että HSV-1:llä on jokin tekijä, mikä helpottaa sen liikkumista kondensoiduissa soluissa niin tehokkaasti, ettei merkittävää eroa VP5-jakauman dekonkondensoituihin soluihin muodostu.

Kapsideja näytti mikroskooppikuvien perusteella olevan kromatiinin seassa enemmän dekonkondensoiduissa soluissa, joten odotimme myös, että kapsidijakaumissa olisi ollut merkittävämpi ero dekonkondensoitujen ja kondensoitujen solujen välillä. Tästä voidaan päätellä, että vaikka viruskapsidit pääsevät huomattavasti helpommin kondensoidun kromatiinin sekaan, ne olisivat silti infektiassa samalla etäisyydellä tumakalvosta kuin ne kapsidit, jotka pääsevät helpommin kromatiinin sekaan. Vaikka kromatiinin rakennemuutokset vaikuttavat viruskapsidien sijaintiin tumassa ja kromatiinin sekaan pääsemiseen, se ei näyttäisi vaikuttavan merkittävästi siihen, miten hyvin kapsidit pääsevät tumakalvon läheisyyteen. Vaikuttaisi siltä, ettei kromatiinin pakkautumisaste ole ainoa tekijä, joka vaikuttaa viruskapsidien liikkumiseen tumassa.

Tarkastelimme tutkimuksessamme vain tumakalvon läheisyydessä olevien kapsidien jakaumaa, jolloin olisi tärkeää tarkastella tulevaisuudessa myös sitä, minkälaiset niin kapsidi- kuin kromatiinijakaumat olisivat tuman sisäosissa. Viruksen elinkierron ymmärtämiseksi on myös tärkeää selvittää, mikä todellisuudessa vaikutti kapsidien kulkuun kondensoiduissa soluissa niin paljon, ettei kapsidijakaumassa ollut merkittävää eroa dekonsoituihin soluihin, vaikka kromatiinin pakkautumisessa oli eroja. On myös mahdollista, että kapsidien sijoittumisessa voitaisiin nähdä enemmän eroja käyttämällä suurempia pitoisuuksia kromatiinin rakennetta muokkaavia aineita. Tutkimuksessamme kapsidien sijoittumista tarkasteltiin vain kahdeksan tunnin kohdalla infektiota, joten voisi olla tärkeää tutkia sijoittumista myös infektion eri ajankohtina. Tuloksissa voitaisiin havaita enemmän eroja myöhempänä infektiota, sillä kromatiinin marginalisoitumisen ja kapsidien määrän tiedetään kasvavan infektion edetessä (Aho ym. 2019). HSV-1:n elinkierron paremmaksi tuntemiseksi tarvitaan lisää tietoa itse viruksen toiminnasta tumassa sekä laajempaa tietoa siitä, miten kapsidit käyttäytyvät eri asteisesti pakkautuneen kromatiinin kanssa.

KIITOKSET

Haluamme kiittää ohjaajiamme Sami Salmista sekä Maija Vihinen-Rantaa. Kiitos myös Vesa Ahoa, jonka tekemällä liitännäisohjelmalla analysoimme tulokset.

KIRJALLISUUS

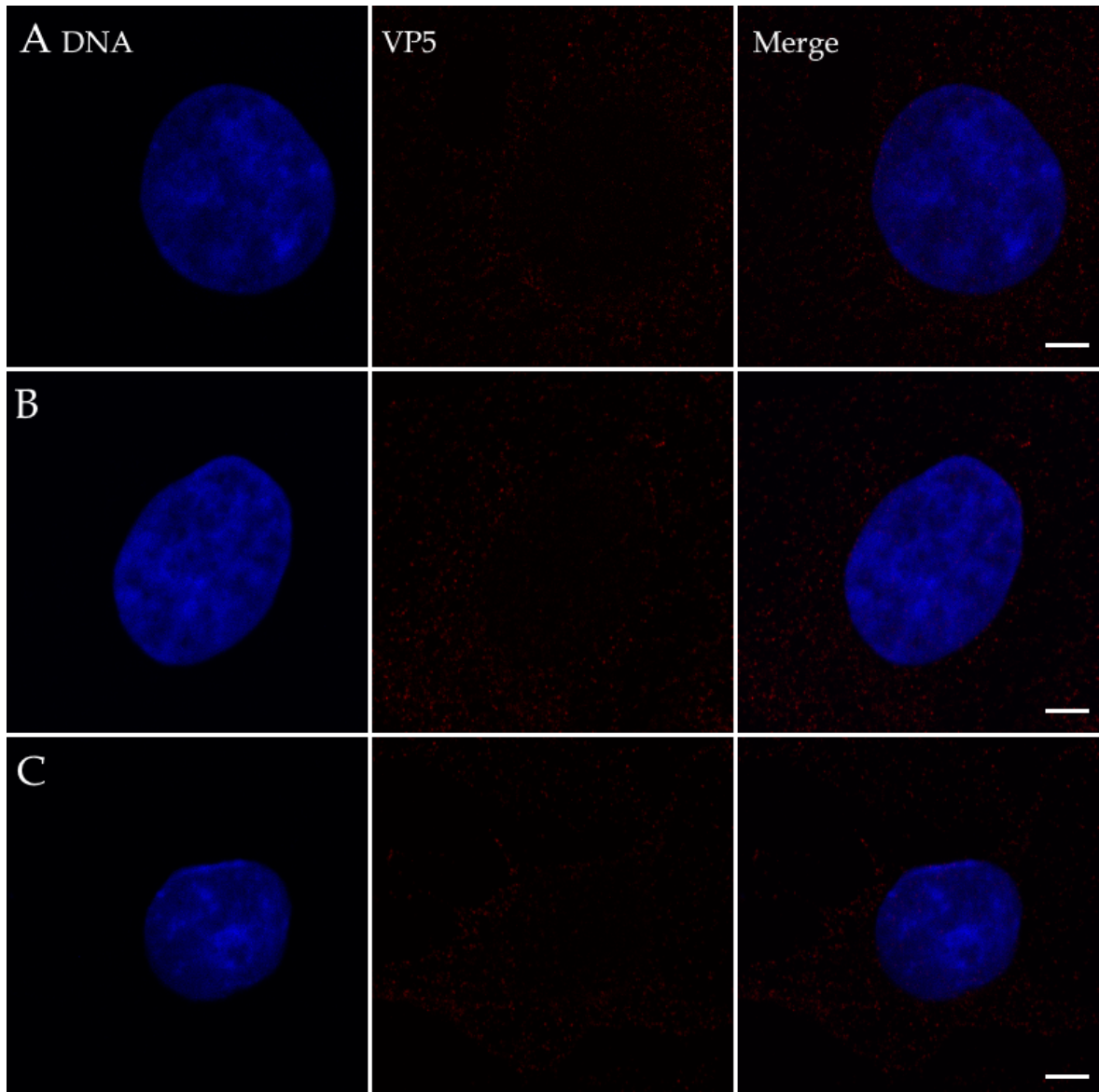
- Aho V., Mäntylä E., Ekman A., Hakanen S. & Mattola S. 2019. Quantitative Microscopy Reveals Stepwise Alteration of Chromatin Structure During Herpesvirus Infection. *Viruses*. 11: 935.
- Arii J., Uema M., Morimoto T., Sagara H., Akashi H., Ono E., Arase H. & Kawaguchi Y. 2009. Entry of Herpes Simplex Virus 1 and Other Alphaherpesviruses via the Paired Immunoglobulin-Like Type 2 Receptor α . *J. Virol.* 83: 4520-4527.
- Besse S. & Puvion-Dutilleul F. 1996. Intranuclear Retention of Ribosomal RNAs in Response To Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. *J. Cell Sci.* 109: 119-129.
- Bigalke J., Heuser T., Nicastro D. & Heldwein E. 2014. Membrane Deformation and Scission by the HSV-1 Nuclear Egress Complex. *Nat. Commun.* 5: 4131.
- Biswas M., Voltz K., Smith J. C. & Langowski J. 2011. Role of Histone Tails in Structural Stability of the Nucleosome. *PLoS Comput. Biol.* 7: doi:10.1371/journal.pcbi.1002279.
- Borochoy N., Ausio J. & Eisenberg H. 1984. Interaction and Conformational Changes of Chromatin with Divalent Ions. *Nucleic Acids Res.* 12: 3089-3096.
- Bosse J.B., Hogue I. B., Feric M., Thiberge S. Y., Sodeik B., Brangwynne C. P. & Enquist L. W. 2015. Remodeling Nuclear Architecture Allows Efficient Transport of Herpesvirus Capsids by Diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.1513876112.
- Bradley H., Markowitz L. E., Gibson T. & McQuillan G. M. 2014. Seroprevalence of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 -United States, 1999-2010. *J. Infect. Dis.* 209: 325-333.
- Buxbaum S., Geers S., Gross G., Schöfer H., Rabenau H. F. & Doerr H. W. 2003. Epidemiology of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 in Germany: What Has Changed? *Med. Microbiol. Immunol.* 192: 177-181.
- Chalut, K. J., Höpfler M., Lautenschläger F., Boyde L., Chan C. J., Ekpenyong A., Martinez-Arias A. & Guck J. 2012. Chromatin Decondensation and Nuclear Softening Accompany Nanog Downregulation in Embryonic Stem Cells. *Biophys. J.* 103: 2060-2070.
- Döhner K., Wolfstein A., Prank U., Echeverri C., Dujardin D., Vallee R. & Sodeik B. 2002. Function of Dynein and Dynactin in Herpes Simplex Virus Capsid Transport. *Mol. Biol. Cell.* 13: 2795-2809.
- Everett R. D. 2014. HSV-1 Biology and Life Cycle. *Methods Mol. Biol.* 1144: 1-17.

- Ghazal P., Sullivan K. F., Monier K., Armas J. C. G. & Etteldorf S. 2000. Annexation of the Interchromosomal Space During Viral Infection. *Nat. Cell Biol.* 2: 661-665.
- Grunstein M. 1997. Histone Acetylation in Chromatin Structure and Transcription. *Nature.* 389: 349-352.
- Görisch S. M., Wachsmuth M., Tóth K. F., Lichter P. & Rippe K. 2005. Histone Acetylation Increases Chromatin Accessibility. *J. Cell. Sci.* 118: 5825-5834.
- Held K. & Derfuss T. 2011. Control of HSV-1 Latency in Human Trigeminal Ganglia - Current Overview. *J. Neurovirol.* 17: 518-527.
- Hofemeister H. & O'Hare P. 2008. Nuclear Pore Composition and Gating in Herpes Simplex Virus-Infected Cells. *J. Virol.* 82: 8392-8399.
- Honess R. W. & Roizman B. 1974. Regulation of Herpesvirus Macromolecular Synthesis I. Cascade Regulation of the Synthesis of Three Groups of Viral Proteins. *J. Virol.* 14: 8-19.
- Leach N.R. & Roller R. J. 2010. Significance of Host Cell Kinases in Herpes Simplex Virus Type 1 Egress and Lamin-Associated Protein Disassembly from the Nuclear Lamina. *Virology.* 406: 127-137.
- Lee J-H., Shim J. & Kim S. J. 2021. Stunning Symmetries Involved in the Self-assembly of the HSV-1 Capsid. *J. Korean. Phys. Soc.* 78: 357-364.
- Looker K. J., Magaret A. S., May M. T., Turner K. M. E., Vickerman P., Gottlieb S. L. & Newman L. M. 2015. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0140765.
- Luger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. & Richmond T. J. 1997. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature.* 389: 251-260.
- McElwee M., Vijaykrishnan S., Rixon F. & Bhella D. 2018. Structure of the Herpes Simplex Virus Portal-Vertex. *PLoS Biol.* doi:10.1371/journal.pbio.2006191.
- Mettenleiter T. C., Müller F., Granzow H. & Klupp B. G. 2013. The Way Out: What We Know and Do Not Know About Herpesvirus Nuclear Egress. *Cell. Microbiol.* 15: 170-178.
- Ojala P. M., Sodeik B., Ebersold M. W., Kutay U. & Helenius A. 2000. Herpes Simplex Virus Type 1 Entry into Host Cells: Reconstitution of Capsid Binding and Uncoating at the Nuclear Pore Complex In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4922-4931.

- Otsu N. 1979. A Threshold Selection Method From Gray -Level Histograms. *IEEE Trans. Sys. Man. Cyber.* 9: 62-66.
- Pramod T., Bhatia T., Gauba D., Wood J., Long C., Prasad K., Dickerson F., Gur R. E., Gur R. C., Yolken R. H., Nimgaonkar V. L. & Deshpande S. N. 2013. Exposure to Herpes Simplex Virus, Type 1 and Reduced Cognitive Function. *J. Psychiatr. Res.* 47: 1680-1685.
- Samaniego L. A., Neiderhiser L. & DeLuca N. A. 1998. Persistence and Expression of the Herpes Simplex Virus Genome in the Absence of Immediate-Early Proteins. *J. Virol.* 72: 3307-3320.
- Sexton T., Schober H., Fraser P. & Gasser S. M. 2007. Gene Regulation Through Nuclear Organization. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 1049-1055.
- Simpson-Holley M., Baines J., Roller R. & Knipe D. M. 2004. Herpes Simplex Virus 1 UL31 and UL34 Gene Products Promote the Late Maturation of Viral Replication Compartments to the Nuclear Periphery. *J. Virol.* 78: 5591-5600.
- Simpson-Holley M., Colgrove R. C., Nalepa G., Harper J. W. & Knipe D. M. 2005. Identification and Functional Evaluation of Cellular and Viral Factors Involved in the Alternation of Nuclear Architecture During Herpes Simplex Virus 1 Infection. *J. Virol.* 79: 12840-12851.
- Sodeik B., Ebersold M. W. & Helenius. A. 1997. Microtubule-Mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids of the Nucleus. *J. Cell. Biol.* 136: 1007-1021.
- Srivastava R., Khan A. A., Huang J., Nesburn A. B., Wechsler S. L. & BenMohamed L. 2015. A Herpes Simplex Virus Type 1 Human Asymptomatic CD8+ T-Cell Epitopes-Based Vaccine Protects Against Ocular Herpes in a "Humanized" HLA Transgenic Rabbit Model. *Iovs.* 56: 4013-4028.
- Subak-Sharpe J.H. & Dargan D.J. 1998. HSV Molecular Biology: General Aspects of Herpes Simplex Virus Molecular Biology. *Virus Genes.* 16: 239-251.
- Szpara M. L., Gatherer D., Ochoa A., Greenbaum B., Dolan A., Bowden R. J., Enquist L. W., Legendre M. & Davison A. J. 2014. Evolution and Diversity in Human Herpes Simplex Virus Genomes. *J. Virol.* 88: 1209-1227.
- Thoma F., Koller T. & Klug A. 1979. Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-Dependent Superstructures of Chromatin. *J. Cell. Biol.* 83: 403-427.
- Zhang P., Torres K., Liu C. & Pollock R. E. 2016. An Overview of Chromatin-Regulating Proteins in Cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* 17: 401-410.

Wu Z., Zhu Y., Bisaro D. M. & Parris D. S. 2009. Herpes Simplex Virus Type 1 Suppresses RNA Induced Gene Silencing in Mammalian Cells. *J. Virol.* 83: doi:10.1128/JVI.00260-09.

LIITE 1. INFEKTOIMATTOMAT SOLUT



Liite 1. DNA:n ja VP5-kapsidiproteiinien sijoittuminen immunoleimattujen solujen tumiin konfokaalimikroskoopilla kuvattuna. Paneeleissa DNA on leimattu NucBlue-väriaineella (sininen, DNA) ja VP5-kapsidiproteiinit Alexa Fluor 546 -vasta-aineella (punainen, VP5). A: Infektoimaton ja käsittelemätön kontrollisolu. B: Infektoimaton ja $MgCl_2$ / $CaCl_2$ -mediumissa kasvatettu kontrollisolu. C: Infektoimaton ja TSA:lla käsitelty kontrollisolu. Mittapalkkien pituus on 5 μm .